



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa de Doctorado
Ciencias de la Salud.

Título

Efectos de la radiación de diferentes longitudes de onda del espectro visible con aplicación en procesos patológicos del sistema visual.

Claudia Núñez Álvarez

Oviedo, junio 2019.

ISBN



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Efectos de la radiación de diferentes longitudes de onda del espectro visible con aplicación en procesos patológicos del sistema visual.	Inglés: Potential effects of selected wavelengths of the visual spectrum on the visual system in relation to disease processes.
2.- Autor	
Nombre: Claudia Núñez Álvarez	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Ciencias de la Salud	
Órgano responsable: Centro Internacional de Postgrado	

RESUMEN (en español)

El funcionamiento del sistema visual es el que permite la integración de gran parte de la información que nos rodea. Este proceso depende directamente de la interacción de la radiación lumínica con la materia y las modificaciones que se producen. La forma en que las diferentes estructuras oculares procesan la energía luminosa que llega al sistema visual, es la base de complejas respuestas metabólicas, entre ellas el proceso de la visión que se produce en la corteza cerebral. La estructura anatómica y fisiológica del globo ocular está, por lo tanto, adaptada para realizar la función receptora de esa energía y su adecuado procesamiento. La interacción posterior de la luz con las diferentes estructuras oculares y las células que las conforman, tiene relevancia en diferentes procesos fisiológicos. Esa interacción se produce en diferentes lugares celulares, uno de ellos es la mitocondria, el orgánulo encargado de producir la energía celular, que se ve afectado de distinta manera según sea la composición de la luz incidente y la intensidad de la misma. Las mitocondrias son orgánulos ricos en cromóforos que se ven afectados por diferentes longitudes de onda. Las longitudes de onda cortas desencadenan procesos metabólicos relacionados con la disminución de la viabilidad celular, incremento del nivel de estrés oxidativo, disminución de la actividad mitocondrial y de la producción de ATP... Por el contrario, las longitudes de onda largas tienen un efecto citoprotector por su acción en la mitocondria, incrementando la tasa de producción de ATP. Cuando la exposición a longitudes de onda cortas se hace en estructuras oculares con un daño previo, el daño se incrementa notablemente, mientras que las longitudes de onda largas son capaces de mitigarlo. Este es el caso de las heridas epiteliales corneales, cuya dinámica de cerrado se estudió en un modelo *in vitro*, y el caso de la neuroretina, estudiada en un modelo animal en el que se indujo isquemia en el polo posterior. Como consecuencia de dichos hallazgos, se plantearon las bases físicas para la creación de un filtro elaborado con partículas nanoluminiscentes capaz de transformar longitudes de onda, se comprobaron sus



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

características físicas y su efecto biológico *in vitro*, además de consideraciones microbiológicas para su aplicación.

RESUMEN (en Inglés)

The visual system allows the integration of important information surround us. This process depends directly on the interaction of radiation from the visual light spectrum with matter and the changes that promotes. The way in which different ocular structures process the light energy that reaches the visual system is the basis of complex metabolic responses, including the process of vision that occurs in the cerebral cortex. The anatomical and physiological structure of the eye is, therefore, adapted to perform the receptor function of that energy and its proper processing. The subsequent interaction of the light with the different ocular structures and their cells, has relevance in different physiological processes. This interaction takes place in different subcellular localisations, one of them is the mitochondria, the organelle responsible for producing cellular energy, which is affected in different ways depending on the composition and intensity of the incident light. Mitochondria are rich in chromophores affected by different wavelengths. Short wavelengths trigger metabolic processes related to decreased cell viability, increased level of oxidative stress, decreased mitochondrial activity and production of ATP ... On the other hand, long wavelengths have a cytoprotective effect when acting in the mitochondria, increasing the rate of ATP production. If exposure to concrete short wavelengths happens in ocular structures with previous damage, the injury increases significantly, while long wavelengths are able to mitigate it. This is the case of corneal epithelial insults, where wound healing dynamics were studied in an *in vitro* model, and the case of the neuroretina, studied in an animal model in which ischemia was induced in the posterior pole. As a consequence of these findings, it was established the physical basis for the creation of a filter with nanoluminescent particles capable of transforming wavelengths, their physical characteristics and them *in vitro* biological effects were tested, beside microbiological considerations for its use.

SR. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN ACADÉMICA DEL PROGRAMA DE DOCTORADO
EN _____



El estanque de Ninfas (1899)

El puente japonés (1922)

... a partir de 1919, Claude Monet temía dejar de pintar. Sólo lo hacía a ciertas horas del día, cuando la iluminación era óptima, y era muy consciente de que en sus pinturas se perdían los colores y no se percibían formas con definición. Así lo describe el propio Monet: “los colores ya no tenían la misma intensidad para mí, los rojos comenzaron a enfangarse... mi pintura se hacía cada vez más oscuras.” Su agudeza visual por aquel entonces se estimaba en torno a 20/100, llegando disminuir hasta 20/200 tres años más tarde, en 1922, fecha de finalización de la obra “El puente japonés”, pintura del mismo rincón de su jardín retratado en 1899 con perfecta definición...

~ Las cataratas de Monet ~

A mi abuela. A mi madre.

Agradecimientos

Agradecimientos

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral, han sido muchas las personas que han estado a mi lado y a las que quiero mostrar mi más sincero agradecimiento.

A mis directores de tesis, Neville y Jesús, cuyas personalidades y criterios opuestos me han enseñado a encontrar el equilibrio y a madurar como investigadora. Neville, it has been an honour to have you as my mentor in this experience, inspiring me with your meticulousness and your perspective of Science. Thank you for being by my side. Gracias, Jesús, por abrirme las puertas de la FIO hace más de 9 años y por empujarme a esta aventura de la que tanto he aprendido.

A mis compañeras: Belén, Carlota, Eva, Joana, Mairobi y Raquel. Este trabajo no existiría sin vosotras, habéis sido mi apoyo y mi alegría. ¡Sois imprescindibles!

A mis compañeros de la FIO, Enol, Carlos Alberto, Montse, Paola, Héctor, Lydia, Esther, Andrea, Omar, Fede, Almu, Ana, Sara, Andrés, Nacho, Cristina, Sergio, Lola, Alberto (con el que me hubiera gustado trabajar mano a mano), Carlos, Manuel, Natalia, Iriana... Muchas gracias por estos años llenos de consejos y de apoyo, especialmente a Héctor, por su interminable paciencia y su forma de entender el mundo.

A mis chicos de prácticas, Iván, Carmen y Luis, a quienes espero haberos enseñado casi tanto como aprendí de vosotros.

A los chicos del Departamento de Microbiología de la Universidad de Oviedo, especialmente y Carla y Bea.

A mis compañeros del IUFV, Marta, Bea, Fabi, Silvia, Gloria, Ramón, Ana C., Mari, María, Montse, Natalia, Esther, Silvia, Víctor, Belinda y a todos los demás, gracias por lo colaborativos y amables que habéis sido siempre.

A mis amigos, que sois mi familia:

A Rocío, Laura, Lisi, Esther y Noelia, por vuestra fuerza. A Ían, June, Emma, Óscar, Mai, Julio, Rober y Álvaro. Con especial cariño a Mario.

A Cris, Sonia, Romina, Marleni, Davicín, Iago, Elena, Raquel, Pelli, Sergio, Manu... lo que une la Biología, dura para siempre. Con especial cariño a Daniela, Clara, Alberto y Sara. A Natalia, por toda la guerra que me ha dado en estos últimos meses.

A Eli, Raquel (otra vez), Lupe, Noemí, Carmen y Noelia. Algún día esta amistad ¡se convertirá en negocio!

A Miri, Rebe, Mai, Con, Maldí y Lore y ¡a todos los peludos!

A Dani, especialmente por su aportación artística. A Prada, Iván, Alberto, Tere, Edu, Óscar, Chema, Dani N. Fer, y a todos los demás "chicos", porque sois simplemente geniales.

A Satur, Cada, Bea, Caba, Fierro, Isa, Isma, Maíllo, Caro, Peches... ahora que voy a tener más tiempo libre, espero que me ayudéis a decidirme por la política o por la cocina.

A Camino y a Regue, por la suerte que tenemos de tenernos.

A Helen, gracias por esperar a que pueda tener más tiempo libre para dedicártelo.

A mi familia, especialmente a mis padres, Marta y José Luis, con quienes he convivido a lo largo de esta experiencia y quienes han aguantado estoicamente a mi lado durante este duro camino. A mi tío Eugenio.

A Marcos, por ser el co-protagonista de la siguiente aventura de mi vida.

A todos a los que involuntariamente me he dejado en el tintero.

Muchas gracias por haber compartido mis preocupaciones y por haber aguantado siempre con una sonrisa todas las veces que la palabra tesis monopolizó nuestras conversaciones.

Prometo no hacer otra.

Índice

Índice

DOCUMENTOS OFICIALES DE LA UNIVERSIDAD DE OVIEDO	III
---	------------

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS Y SIGLAS	XXXI
--	-------------

MOTIVACIÓN Y ORGANIZACIÓN	XXXIX
----------------------------------	--------------

INTRODUCCIÓN	43
---------------------	-----------

A. SISTEMA VISUAL HUMANO: EL GLOBO OCULAR.	45
---	-----------

A.1. ANATOMOFISIOLOGÍA E HISTOLOGÍA DE LA CÓRNEA.	48
---	----

A.2. ANATOMOFISIOLOGÍA E HISTOLOGÍA DE LA RETINA.	50
---	----

A.3. BIOLOGÍA CELULAR Y EL SISTEMA VISUAL.	53
--	----

a.3.1. Energía celular y mitocondria.	53
---------------------------------------	----

a.3.2. Muerte celular.	57
------------------------	----

a.3.3. Especies reactivas.	61
----------------------------	----

A.4. ENFERMEDADES Y DISFUNCIONES DEL SISTEMA VISUAL.	65
--	----

B. LA LUZ Y EL SISTEMA VISUAL.	67
---------------------------------------	-----------

B.1. FUENTES DE LUZ ARTIFICIAL. FILTROS.	70
--	----

B.2. TRANSFORMACIÓN DE LA LUZ EN EL SISTEMA VISUAL. RADIACIÓN AMBIENTE.	72
---	----

b.2.1. Luz, córnea y medios oculares.	75
---------------------------------------	----

b.2.2. Luz y retina. Fototransducción y fotorreceptores.	76
--	----

B.3. EFECTO BIOLÓGICO DE LA LUZ. INTERACCIÓN CON LA MITOCONDRIA.	78
--	----

b.3.1. Longitudes de onda cortas.	81
-----------------------------------	----

b.3.2. Longitudes de onda largas.	81
JUSTIFICACIÓN	83
HIPÓTESIS	87
OBJETIVOS	89
MATERIAL Y MÉTODO	93
A. ANIMALES.	95
INCREMENTO DE LA PIO EN CÁMARA ANTERIOR. INDUCCIÓN DE ISQUEMIA.	96
ESCALADO DE DATOS. INTENSIDAD DE LA LUZ EN LA RETINA.	97
PROCESAMIENTO DE LOS OJOS. RECuento DEL NÚMERO DE CÉLULAS GANGLIONARES.	97
B. CULTIVOS CELULARES.	98
C. MEDIDA DE LA PROLIFERACIÓN Y VIABILIDAD CELULAR.	101
ENSAYO DE BROMURO 3-(4,5-DIMETHYLTHIAZOL-2-YL)-2,5-DIPHENYLTETRAZOLIO (MTT).	101
ENSAYO DE IODURO DE PROPIDIO (PI).	101
D. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y ESTADO DE OXIDACIÓN.	102
ESTADO DE ACTIVIDAD MITOCONDRIAL.	102
DETERMINACIÓN DE EROS.	102
DETERMINACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ATP.	103
CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA Y RELATIVA DE GLUTATIÓN.	104
DETERMINACIÓN DEL NIVEL DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.	104
E. ENSAYOS MOLECULARES.	105
E.1. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN PROTEICA POR <i>WESTERN BLOT</i> .	105
E.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN GÉNICA POR RT-PCR.	107
F. INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA.	108

G. CITOMETRÍA DE FLUJO.	109
H. ELECTROENSAYOS.	110
H.2. ELECTORRETINOGRAMA FOCAL.	111
I. MICROBIOLOGÍA	113
J. LÁMPARAS, FILTROS Y MEDIDAS ÓPTICAS.	114
TECNICAS DE FABRICACIÓN DE LOS FILTROS:	115
K. ANÁLISIS DE IMÁGENES Y DATOS.	116
<u>CAPÍTULO I: BIOLOGÍA MOLECULAR DE LA LUZ: EL PAPEL DE LA MITOCONDRIA.</u>	<u>121</u>
C1. INTRODUCCIÓN.	121
C1.1. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DIFERENTES TIPOS DE LONGITUDES DE ONDA DEL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO DE LA LUZ VISIBLE EN MODELOS DE CULTIVOS CELULARES <i>IN VITRO</i>.	123
C1.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.	123
C1.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	125
C1.2. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DIFERENTES LONGITUDES DE ONDA DE NEURONAS <i>IN VITRO</i>.	136
C1.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.	136
C1.2.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	137
<u>CAPÍTULO II: LUZ Y SUPERFICIE OCULAR I. INCREMENTO DE LA SUPERVIVENCIA, PROLIFERACIÓN Y MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DE EPITELIO CORNEAL <i>IN VITRO</i> EXPUESTAS A LONGITUDES DE ONDA LARGAS DEL ESPECTRO ELECTROMAGNÉTICO DE LA LUZ. RELEVANCIA EN PROCESOS DE CICATRIZACIÓN CORNEAL.</u>	<u>147</u>
C2.1. INTRODUCCIÓN.	147
C2.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	148
C2.3. RESULTADOS.	149

c2.4. DISCUSIÓN.	156
<u>CAPÍTULO III: LUZ Y SUPERFICIE OCULAR II. CAPACIDAD DE LA LUZ ROJA DE ATENUAR LA DISFUNCIÓN DEL ENDOTELIO CORNEAL IN VITRO E IN VIVO.</u>	163
c3.1. INTRODUCCIÓN.	163
c3.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	164
c3.4. RESULTADOS.	164
c.3.4. DISCUSIÓN.	173
<u>CAPÍTULO IV: LUZ Y RETINA I. EFECTO DE LA EXPOSICIÓN A DIFERENTES RADIACIONES LUMÍNICAS DURANTE EL PROCESO ISQUÉMICO.</u>	179
c4.1. INTRODUCCIÓN.	179
c4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	180
c4.3. RESULTADOS	181
c4.4. DISCUSIÓN	190
<u>CAPÍTULO V: LUZ Y RETINA II. LA LUZ ROJA Y SU CAPACIDAD PARA CONTRARRESTAR EL DAÑO DE LA LUZ AZUL EN UN MODELO IN VITRO DE EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA: ARPE19.</u>	199
c5.1. INTRODUCCIÓN.	199
c5.2. DISEÑO EXPERIMENTAL.	200
c5.3. RESULTADOS.	201
c5.4. DISCUSIÓN.	208
<u>CAPÍTULO VI: PRINCIPIOS PARA LA APLICACIÓN CLÍNICA.</u>	215

C6.1. DISEÑO Y ELECCIÓN DE LENTES OFTÁLMICAS.	217
C6.1.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.	218
C6.1.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	219
C6.2. ESTUDIOS INICIALES PARA EL DESARROLLO DE FILTROS NANOLUMINISCENTES QUE MODIFICAN EL ESPECTRO VISIBLE DE LA LUZ.	226
C6.2.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.	227
C6.2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	229
C6.3. MICROBIOLOGÍA OCULAR.	234
C6.3.1. DISEÑO EXPERIMENTAL.	235
C6.3.2. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	236
DISCUSIÓN	245
CONCLUSIONES	253
BIBLIOGRAFÍA	257
DIVULGACIÓN CIENTÍFICA	287
FINANCIACIÓN	293
ANEXOS	295

Abreviaturas, símbolos y siglas

2-VP	2-vinilpiridina
3-NP	Ácido 3-nitropropiónico
4-HNE	4-hidroxiacetaldehído
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADP	Adenosín difosfato
ADP	Adenosín bifosfato
AIF	Factor inductor de apoptosis (del inglés: <i>apoptosis inducing factor</i>)
AMP	Adenosín monofosfato
AP-1	Proteína 1 activadora (del inglés: <i>activator protein 1</i>)
ARE	Elemento de respuesta antioxidante (del inglés: <i>antioxidant responsive element</i>)
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARVO	Asociación para la investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión (del inglés: <i>The Association for Research in Vision and Ophthalmology</i>)
ATP	Adenosín trifosfato
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BHI	Caldo de infusión cerebro-corazón (del inglés: <i>brain-heart infusion</i>)
BSO	Butionina sulfoximina
C	Carbono
CAT	Catalasa
cds	Medida internacional de intensidad luminosa, candela
CGR	Células ganglionares de la retina
CICD	Muerte celular independiente de caspasas (del inglés: <i>caspase-independent cell death</i>)
CIE	Comisión Internacional de la Iluminación
CO₂	Dióxido de carbono
COX	Citocromo C oxidasa
CypD	<i>Cyclophilin D</i>
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
dB	Medida internacional de potencia, decibelio
DMAE	Degeneración macular asociada a la edad
DMEM	Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés: <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>)

dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
Drp1	<i>Dynamin related protein</i>
DTNB	ácido 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoico
DTT	ditiotreitól
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EEM	Espectro electromagnético
EGF	Factor de crecimiento epitelial (del inglés: <i>epithelial growth factor</i>)
EGF-R	Receptor del factor de crecimiento epitelial (del inglés: <i>epithelial growth factor receptor</i>)
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERG	Electrorretinograma
ERNs	Especies reactivas del nitrógeno
EROs	Especies reactivas del oxígeno
FBS	Suero fetal bovino (del inglés: <i>fetal bovine serum</i>)
FdU	5-Fluoro-2'-deoxyuridine
Fig.	Figura
FIO	Fundación de Investigación Oftalmológica
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster (del inglés: <i>Frörster resonance energy transfer</i>)
g	Fuerza g, medida de aceleración
GSH	Glutación en su forma reducida
GSSG	Glutación en su forma oxidada
GST	Glutación transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
GTPx	Glutación peroxidasa
Hepes	Solución tampón de ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazineetanesulfónico
Hg	Mercurio
HIF-1	Factor 1 inducible por hipoxia (del inglés: <i>hypoxia-inducible factor 1</i>)
HO-1	Hemoxigenasa-1
hTERT	Transcriptasa reversa de la telomerasa humana (del inglés: <i>human telomerase reverse transcriptase</i>)
HUCA	Hospital Universitario Central de Asturias
Hz	Hertzios

ipCGR	Células ganglionares intrínsecamente fotosensibles
IRC	Índice de reproducción cromática
ITMA	Instituto Tecnológico de Materiales de Asturias
JNK	Quinasas c-Jun N-terminal
K	Kelvin
kDa	KiloDaltons
LED	Diodo emisor de luz (del inglés: <i>light emitting diode</i>)
LIOs	Lentes intraoculares
LSC	Concentradores solares luminiscentes (del inglés: <i>luminescent solar concentrators</i>)
M	molar
m²	Metro cuadrado
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos (del inglés: <i>mitogen-activated protein kinases</i>)
MDA	Malondialdehido
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanesulfónico
Mfn1	Mitofusina 1
Mfn2	Mitofusina 2
MgCl₂	Cloruro de magnesio
mm	Milímetros
MnSOD	Superóxido dismutase tipo manganeso
MOMP	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa (del inglés: <i>mitochondrial outer membrane permeabilization</i>)
MTT	bromuro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio
N	Nitrógeno
Na⁺/K⁺	Bomba sodio-potasio
NaCl	Cloruro de sodio
NAD	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido (forma reducida)
NF-AT	Factor nuclear de las células T activadas
NF-κB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NGF	Factor de crecimiento nervioso (del inglés: <i>nerve growth factor</i>)
NO	Óxido nítrico

NP-40	Nonidet P-40
Nrf2	Factor nuclear eritroide 2 (del inglés: <i>nuclear factor erythroid 2-related factor</i>)
OCT	Medio para temperatura óptima de corte (del inglés: <i>optimal cutting temperature</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OPA1	Proteína 1 de atrofia óptica (del inglés: <i>optic atrophy protein 1</i>)
Pa	Pascales
PAR	Poli ADP ribosa
PARP-1	Poli ADP ribosa polimerasa
PBS	Tampón fosfato salino (del inglés: <i>phosphate saline buffer</i>)
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés: <i>platelet derived growth factor</i>)
PDGF-R	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés: <i>platelet derived growth factor receptor</i>)
PI	Ioduro de propidio
PIO	Presión intraocular
PMMA	Polimetilmetacrilato
PMSF	fluoruro de fenilmetil sulfonilo
PPi	Pirofosfato
PRX	Peroxirredoxina
PTPm	Transición de la permeabilidad mitocondrial
REDOX	Estado de reducción-oxidación
ROCK	Proteína quinasa asociada a Rho (del inglés: <i>Rho-associated protein kinase</i>)
RT	Temperatura ambiente (del inglés: <i>room temperature</i>)
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa de transcripción inversa (del inglés: <i>reverse-transcription polymerase chain reaction</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico
SEM	Error estándar de la media (del inglés: <i>standard error of the mean</i>)
Smac/Diablo	<i>Second Mitochondria derived Activator of Caspase/Direct IAP binding protein with low isoelectric point</i>
SNC	Sistema nervioso central
SOD	Superóxido dismutasa
TER / TEER	Resistencia transepitelial (del inglés: <i>trans-epithelial resistance</i>)

TGF-β	Factor de crecimiento transformante β (del inglés: <i>transforming growth factor beta</i>)
TNB	5-tio2-nitrobenzoico
TRIS	Tris(hidroximetil)aminometano
TRX	Tiorredoxina
UFC	Unidad formadora de colonias
UV	Ultravioleta
v	voltio
VEGF-R	Receptor del factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés: <i>vascular endothelial growth factor receptor</i>)
W	Vatio
WB	<i>Western blot</i>
ϵ	Absortividad lumínica
Ω	Medida internacional de resistencia eléctrica, ohmio

Motivación y organización

Motivación y organización

En el verano de 2010, todavía cursando las últimas asignaturas de la Licenciatura en Biotecnología en la Universidad de León, tuve la oportunidad de comenzar mi andadura en el mundo de la investigación básica en Oftalmología. Fue el Doctor Jesús Merayo quién me abrió las puertas de la Fundación de Investigación Oftalmológica (FIO) y gracias a la elaboración del primer convenio de prácticas con el que contó esta Institución (convenio de colaboración con la Universidad de León) pude iniciar un período de prácticas en el laboratorio de Superficie Ocular. Allí, además de aprender numerosas técnicas y metodologías, desarrollé mi primer trabajo relacionado con el efecto del PRGF®-Endoret® (Plasma rico en factores de crecimiento) en la cicatrización del epitelio corneal in vitro, cuyos resultados dieron lugar a la elaboración de un póster para el Congreso anual de ARVO 2011. Posteriormente, a principios de 2012, me incorporé ya como investigadora contratada al Laboratorio de Neurobiología de la Retina, dirigido por el Profesor Neville N. Osborne, en el que he desarrollado mi labor de investigación básica en el ámbito de la neurobiología. Los primeros años de mi carrera investigadora en este laboratorio estuvieron ligados a la búsqueda de diferentes agentes neuroprotectores capaces de frenar el avance de enfermedades neurodegenerativas de la retina, principalmente el glaucoma. El estudio del papel de las mitocondrias en esta enfermedad ha sido una de las líneas mantenidas en el tiempo, alrededor de la cual han girado las investigaciones del grupo. Otra línea especialmente importante es la de la luz, en la que se estudia la interacción de diferentes longitudes de onda del espectro electromagnético con las mitocondrias y su consecuente efecto en la neurorretina. La investigación de la luz ha ido ganando evolucionando, gracias a los notables resultados, y se ha ampliado el campo de estudio a otras estructuras oculares.

Esta tesis doctoral está compuesta por los resultados obtenidos en los estudios, desarrollados desde 2016, de los aspectos moleculares de la interacción entre la célula y la luz de diferentes longitudes de onda, y su relevancia en estructuras tanto de la superficie ocular (endotelio y epitelio corneal) como en neurorretina y epitelio pigmentario de la retina. Consta de una introducción dividida en dos partes. En la primera se revisan conceptos generales de oftalmología y biología celular, y se describen las enfermedades oculares de interés para este trabajo. La segunda parte revisa conceptos generales de física de la luz y su interacción con sistemas biológicos.

Seguidamente, tras la justificación, se plantea la hipótesis de trabajo, así como los objetivos del mismo.

A continuación, se hace una descripción general de la metodología empleada, que será ampliada, cuando sea necesario, en los epígrafes denominados “diseño experimental” dentro de cada capítulo.

Los capítulos se numeran del I al VI y se corresponden con el desarrollo de los estudios concretos llevados a cabo en esta tesis doctoral:

- Capítulo I: hace referencia al efecto molecular de la luz y su relación con la mitocondria en modelos in vitro tanto de líneas celulares (capítulo 1.1) como en cultivos primarios neuronales (capítulo 1.2).
- Capítulos II y III: se centran en el estudio de la interacción de la luz con la córnea.
- Capítulos IV y V: desarrollan los resultados de la exposición a diferentes longitudes de onda de la retina.
- Capítulo VI: es el capítulo de investigación traslacional. En el que se desarrollan las aplicaciones clínicas derivadas de los resultados de los estudios anteriores, tanto en el uso de lentes oftálmicas intraoculares (capítulo 6.1) como en el desarrollo de filtros nanotecnológicos (capítulo 6.2). Además, se hace un breve estudio del efecto de la exposición a diferentes radiaciones a microorganismos tipo de la microbiota ocular (capítulo 6.3).

Por último, se hace una discusión inclusiva de los resultados obtenidos, de los cuales se extraen las conclusiones expuestas en el epígrafe del mismo nombre.

Las imágenes incluidas se nombran con respecto a la sección, de modo que las letras se corresponden con:

- i: introducción
- m: material y método
- cX: capítulo con su número correspondiente
- d: discusión

Al final del documento se encuentra el desglose de la financiación y proyectos. En el apartado “Anexos” están los artículos publicados durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Introducción

Introducción

El funcionamiento del sistema visual, que permite la integración de gran parte de la información que nos rodea, depende directamente de la interacción de la radiación lumínica con la materia y las modificaciones que se producen en este proceso. La forma en que las diferentes estructuras oculares procesan la energía luminosa que llega al sistema visual, es la base de complejas respuestas metabólicas, entre ellas el proceso de la visión que se produce en la corteza cerebral. La estructura anatómica y fisiológica del globo ocular está, por lo tanto, adaptada para realizar la función receptora de esa energía y su adecuado procesamiento. La interacción posterior de la luz con las diferentes estructuras oculares y las células que las conforman, tiene relevancia en diferentes procesos fisiológicos. Esa interacción se produce en diferentes lugares celulares, uno de ellos es la mitocondria, el orgánulo encargado de producir la energía celular, que se ve afectado de distinta manera según sea la composición de la luz incidente y la intensidad de la misma, desencadenando diferentes consecuencias biológicas.

a. Sistema visual humano: el globo ocular¹⁻⁴.

La denominación de sistema visual incluye al conjunto anatomofisiológico que constituyen:

- el globo ocular,
- los órganos adyacentes que rodean y protegen la órbita, incluida ella misma,
- los elementos vasculares y nerviosos relacionados con estos órganos y estructuras,
- los centros y vías ópticas y del sistema nervioso central (SNC) relacionados con la visión.

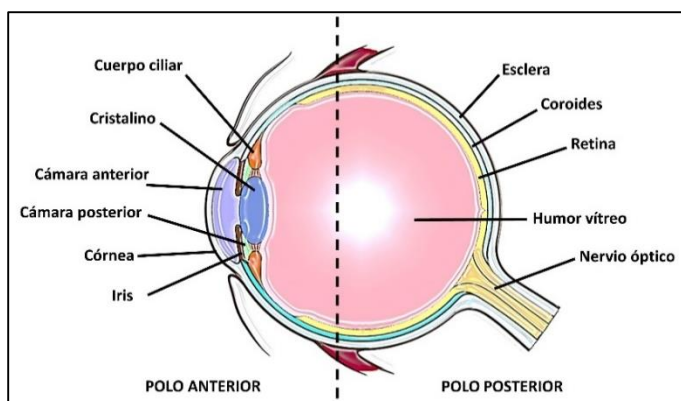


Figura i.1. Esquema del globo ocular. En este esquema se resaltan las diferentes estructuras oculares pertenecientes a los denominados polo anterior y posterior.

El globo ocular es una estructura esferoide con un diámetro anteroposterior de 23 a 25 mm aproximadamente, y un diámetro transversal de 24 mm de media en el ojo adulto. Se compone de tres túnicas, la más externa o esclerótica, la túnica media o úvea y la túnica interna o retina (figura i.1).

La esclerótica o esclera, de origen embriológico mesodérmico, recubre la mayor parte del globo ocular. Es una membrana resistente, de grosor variable y de color blanquecino, formada por dos láminas, de fuera hacia dentro: la epiesclera y el estroma. La epiesclera es un tejido conectivo muy laxo y moderadamente vascularizado. El estroma, prácticamente avascular, está formado por haces de fibras de colágeno (principalmente de tipo I y en menor medida de tipos III, V, VI) y algunos fibroblastos. Está cubierta por la membrana conjuntiva, membrana de tipo mucoso que lubrica el globo ocular y presenta varios orificios, los más importantes son:

- uno en la parte posterior (lámina cribosa) por el que salen del globo las fibras que van a formar el nervio óptico,
- uno en la parte anterior en el que se inserta la córnea.

La úvea, situada debajo de la esclera, es una capa vascular, formada por tres estructuras: el iris y el cuerpo ciliar en la parte anterior, y la coroides en la posterior. La retina es la capa más interna y constituye la capa funcional del globo ocular. En el centro de estas túnicas o envolturas se localizan tres estructuras transparentes:

- el cristalino, lente biconvexa situada entre el iris y el vítreo y fijado a esta zona por las fibras que conforman la zónula de Zinn,
- el humor acuoso, que ocupa la parte anterior del ojo comprendida entre el plano del cristalino y la córnea,
- el humor vítreo, situado entre la retina y el cristalino, es el más grande en volumen.

El cristalino, de origen embriológico ectodérmico, es una importante estructura de gran plasticidad, característica que le permite modificar su curvatura y espesor, cambiando así su índice de refracción. Este proceso, que se denomina acomodación, ayuda al enfoque de objetos cercanos, ya que las estructuras oculares en estado de reposo enfocan objetos lejanos. Es una estructura avascular que se puede ir opacificando por diversos motivos, siendo el principal el paso del tiempo. El cristalino en individuos muy jóvenes tiene un aspecto transparente, mientras que a lo largo de la vida modifica su tonalidad, adquiriendo aspecto amarillento. Histológicamente está formado por:

- Cápsula: membrana basal compuesta por colágeno de tipo IV depositado por las células epiteliales. En su capa más externa se insertan las fibras zonulares.
- Fibras zonulares: que parten de las láminas basales del epitelio no pigmentado del cuerpo ciliar.
- Epitelio del cristalino: capa única de células epiteliales, metabólicamente activas, situadas únicamente en la parte anterior del cristalino, en contacto con el humor acuoso.

Conforme las células epiteliales migran hacia la región arqueada del cristalino, se inicia el proceso de diferenciación hacia fibras lenticulares. Las células pierden sus orgánulos en este proceso, pérdida que ofrece ventajas ópticas ya que la luz que atraviesa el cristalino deja de ser absorbida o dispersada por las estructuras intracelulares. Estas células transformadas a fibras carecen de las funciones metabólicas que cumplían los orgánulos que van perdiendo, especialmente las de las mitocondrias, por lo que dependen por completo de la glucólisis para la producción de energía.

El cuerpo ciliar, de origen neuroectodérmico, pertenece a la úvea anterior y no sólo se ocupa de dar soporte a los músculos ciliares que anclan y acomodan el cristalino, sino que también tiene la función de generar el humor acuoso en contacto directo, además de con la córnea, con las células epiteliales del cristalino. Este humor es un líquido transparente e incoloro generado por filtración de los capilares sanguíneos. Fluye hacia la cámara anterior a través de la pupila, donde se reabsorbe por la red trabecular hacia el canal de Schlemm, lugar en el que es finalmente drenado de nuevo a la circulación venosa. Su composición es muy baja en proteína, y tiene niveles de azúcares, urea y ácido úrico ligeramente inferiores a los del plasma sanguíneo. La concentración iónica es similar a la del plasma y además posee ácido ascórbico y láctico en concentraciones superiores. Nutre y elimina metabolitos de las estructuras avasculares con las que contacta: córnea y cristalino.

A diferencia del humor acuoso, el vítreo no se renueva. Es de origen neuroectodérmico (y en parte mesodérmico) y consiste en una masa gelatinosa transparente que rellena el espacio existente entre la retina y la cara posterior del cristalino. Dentro de él se pueden distinguir tres zonas: la membrana hialoidea que lo rodea, el córtex o porción densa periférica y una zona central de menor densidad. Está compuesto casi únicamente por agua y contiene pequeñas cantidades de colágeno, ácido hialurónico, proteínas, cloro, sodio, potasio y glucosa.

La cantidad de luz que atraviesa el globo ocular se controla a partir del iris gracias a la modificación del tamaño de su orificio pupilar. El origen embriológico del iris, perteneciente a la úvea anterior, es doble: neuroectodérmico (epitelio, músculos del esfínter y dilatador del iris) y mesodérmico (estroma iridiano y membrana pupilar). Es un disco perforado que presenta dos caras, dividiendo al globo ocular en dos cámaras, anterior y posterior, y está insertado sobre el cuerpo ciliar. Este cuerpo ciliar junto con la esclera y córnea y el iris conforman el ángulo iridocorneal en el que se sitúan el canal de Schlemm y la malla trabecular.

La úvea posterior o coroides es un manto vascular que se extiende desde el nervio óptico hasta el cuerpo ciliar, y su función principal es la nutrición de las capas más externas de la retina. Se compone de fuera hacia dentro por epicoroides, coroides y membrana de Bruch que limita con el epitelio pigmentario.

a.1. Anatomofisiología e histología de la córnea^{1,3,6,7}.

La cornea representa la prolongación anterior de la esclera, con una zona de transición entre ambas denominada limbo esclero-corneal. Embriológicamente tiene un origen mixto, el epitelio tiene origen ectodérmico mientras que el resto de estructuras tienen origen mesodérmico. Es de naturaleza similar a la esclera, aunque transparente. Su función principal es óptica, supone la estructura más refractiva del ojo con más de 40 dioptrías. Tiene un diámetro vertical de 10.66 mm y uno horizontal de 11.6 mm. Su espesor en el centro es de 0.47 mm y de 0.8 mm en la periferia. Estructuralmente se compone de cinco capas (Figura i.2):

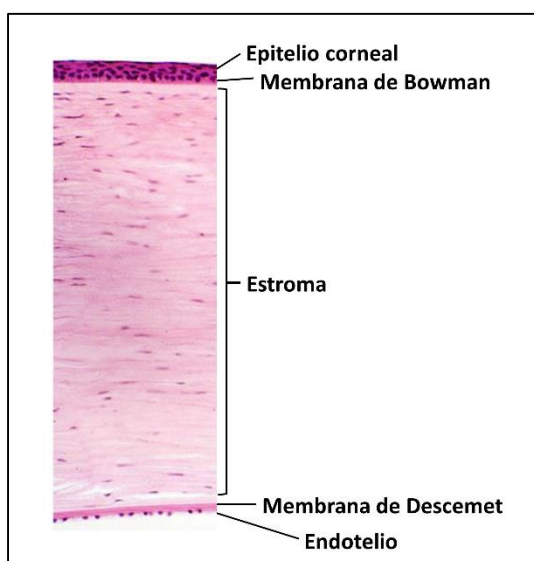


Figura i.2. Esquema de la estructura de la córnea. Esquema de las diferentes estructuras corneales en una sección de córnea teñida con hematoxilina-eosina.

- Epitelio corneal: epitelio estratificado de entre 6 y 8 capas de células no queratinizadas que por acción mecánica del párpado son eliminadas y se renuevan constantemente. Mide entre 50 y 100 μm . En la parte basal posee una capa de células altas con una gran tasa de división celular que se encargan de regenerar las células que son eliminadas de forma continua. Posee una membrana basal, fuertemente unida a la capa subyacente (membrana de Bowman).
- Membrana de Bowman: banda acelular de entre 10 y 13 μm formada por fibras de colágeno entrelazadas y muy condensadas que forman una barrera física importante contra la entrada de agentes extraños y organismos infecciosos, así como al paso de cuerpos extraños. Además, mantiene la integridad de la córnea gracias a su resistencia a la deformación.
- Estroma: con un espesor de alrededor de 500 μm constituye el 90% de del espesor total de la córnea. Es un tejido colágeno en el que las fibras se disponen de forma regular embebidas en una matriz de glicoproteínas y mucoproteínas. Tiene únicamente un 5% de contenido celular, fibroblastos (queratocitos), y no presenta vascularización, pero sí nervios.
- Membrana de Descemet: es una capa colágena fina de 10 a 12 μm de espesor con características elásticas. En la periferia es más gruesa y se continúa con las fibras del *trabeculum*. Se considera la membrana basal del endotelio.
- Endotelio: epitelio monoestratificado de células poligonales (alrededor de medio millón) con escasa o nula actividad mitótica que hace que con el paso de los años el número de células vaya en detrimento. Es capaz de reparar defectos mediante el incremento de tamaño de las células centrales. La principal función desarrollada por sus células es el mantenimiento de un nivel de hidratación del estroma corneal en valores bajos, y contribuye a la formación de la membrana de Descemet.

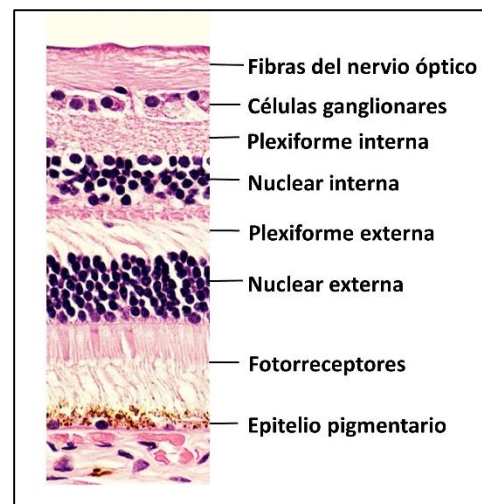
La zona de transición entre la córnea y la esclera es el limbo, a cuyo nivel, pero en profundidad, se encuentran las estructuras encargadas del drenaje del humor acuoso (malla trabecular, canal de Schlemm y sistema venoso). Las principales funciones del limbo son: la regulación de la presión intraocular mediante el drenaje del humor acuoso, la nutrición de la córnea periférica, el procesamiento del estímulo de renovación y cicatrización de la córnea y la vigilancia inmunitaria de la superficie ocular.

La inervación de la córnea consiste en una rica trama de nervios sensitivos. Estos nervios provienen de la división oftálmica del nervio trigémino (V par craneal), principalmente por la vía de los nervios ciliares largos, aunque también hay inervación de los nervios ciliares cortos que penetran en la esclera por el polo posterior, y por algunas ramas procedentes de la episclera y de la conjuntiva, denominados nervios ciliares anteriores. Tras formar un plexo anular en el limbo, éstos penetran en el estroma anterior, desde donde perforan la membrana de Bowman y penetran en el epitelio, lugar donde se encuentran sus terminaciones. La concentración de estas terminaciones es de 300 a 600 veces mayor que en la piel, incrementando su densidad en los dos tercios centrales de la córnea, lo que indica que es un tejido altamente sensible a los estímulos que actúan sobre estos terminales.

a.2. Anatomofisiología e histología de la retina⁶⁻¹².

La retina es la túnica más interna del globo ocular y se extiende desde la papila, zona de salida del nervio óptico, hasta la *ora serrata*, en contacto con el cuerpo ciliar y a pocos milímetros del limbo. Está formada por dos capas, la externa es el epitelio pigmentario (EPR) y la interna se denomina retina neurosensorial o neurorretina (figura i.3).

Figura i.3. Esquema de la estructura de la retina. Sección de retina teñida con hematoxilina-eosina en la que se señalan las diferentes capas que la componen.



El EPR está formado por una única hilera de células delgadas y altas en la zona del polo posterior y más cúbicas e irregulares en la periferia. Contienen altas cantidades de pigmento (melanina) en gránulos o melanosomas situados en la parte apical de las células. Estos pigmentos absorben el exceso de luz e impiden su dispersión dentro del ojo. Son células que están unidas entre sí fuertemente por enlaces de tipo uniones estrechas (*zonula occludens*) y desmosomas (*zonula adherens*). Su membrana basal forma parte de la membrana de Bruch y se sitúa en relación

íntima con la parte interna de la coroides. En la parte apical las células rodean los segmentos externos de los fotorreceptores gracias a unas vellosidades o proyecciones citoplasmáticas, actuando como barrera de paso selectiva de sustancias desde la coroides a la retina neurosensorial.

La neurorretina es el tejido encargado de captar los estímulos luminosos y transmitirlos en forma de impulso nervioso hacia el cerebro. Se compone de distintos tipos celulares especializados: células neuronales, células gliales y células vasculares. Los tres tipos de células neuronales relacionados con la recepción, formación y conducción de los impulsos generados por el estímulo luminoso son los fotorreceptores (conos y bastones), células bipolares y células ganglionares. Existen otros dos tipos neuronales encargados de la regulación de su actividad, las células amacrinas y las horizontales. Dentro de las células gliales se diferencian tres tipos: células de Müller, que contribuyen a la nutrición y metabolismo de la retina; astrocitos, que tienen función de soporte entre los vasos y las células neuronales, y la microglía, fagocitos mononucleares de alta especialización. Las células vasculares son las células endoteliales y los pericitos que recubren los vasos. La disposición de todos estos tipos celulares es muy concreta, forman una serie de capas ordenadas desde la más externa, en contacto con el EPR hasta la capa más interna que comunica con el vítreo:

- Capa de fotorreceptores: compuesta por los segmentos externos de los fotorreceptores, células especializadas de origen neuroepitelial que se dividen en conos y bastones. Los bastones se encuentran en un número mucho más elevado que los conos, y se encargan de la discriminación entre luz y oscuridad, mientras que los conos discriminan entre colores y se sitúan principalmente en la parte posterior de la retina (son los únicos fotorreceptores de la fóvea).
- Capa limitante externa: formada por los extremos más externos de las células de Müller.
- Capa nuclear o granulosa externa: formada por los núcleos de los fotorreceptores.
- Capa plexiforme externa: se forma por la sinapsis de los fotorreceptores con las células bipolares, y la sinapsis de ambas con las células horizontales.
- Capa nuclear o granulosa interna: formada por los núcleos de las células bipolares, las células amacrinas, las horizontales y las células de Müller.
- Capa plexiforme interna: se forma en el lugar de las sinapsis de las células bipolares con las ganglionares, y de las amacrinas con ambas.

- Capa de células ganglionares: formada por los núcleos de las células ganglionares.
- Capa de fibras del nervio óptico: formada por los axones de las células ganglionares, que se disponen perpendiculares a la orientación del resto de capas y se dirigen hacia la papila para formar el nervio óptico.
- Capa limitante interna: en contacto estrecho con el vítreo, está formada por los denominados pies de las células de Müller.

Topográficamente, la retina presenta diferencias histológicas y celulares, por lo que se puede dividir en retina central, periférica, *ora serrata* y papila óptica. La retina central es rica en conos, que se encuentran en mayor número que los bastones y la capa de células ganglionares es gruesa. En su núcleo se encuentra la mácula lútea, en cuyo centro se puede ver la fovea, zona en la que sólo hay conos y no hay células de asociación ni ganglionares ni bipolares. Representa la zona de máxima visión. La retina periférica se sitúa entre la retina central y la *ora serrata*, y en esta área los fotorreceptores son principalmente bastones. La capa de células ganglionares, así como de fibras nerviosas, se va haciendo más fina. La *ora serrata* se corresponde con la terminación anterior de la retina sensorial, un poco por delante del ecuador del globo. Representa la zona de transición en la que la retina sensorial se va modificando a dos capas de epitelio que forman parte del cuerpo ciliar. La papila óptica, sin fotorreceptores, es la zona en la que convergen todos los axones de las células ganglionares que se unen para formar el nervio óptico y salir de la retina por el agujero posterior de la esclera, junto con los grandes vasos de la retina. Estos vasos son la arteria central de la retina y la vena central de la retina. La arteria central que entra por la papila se divide en dos ramas, una superior y otra inferior, que a su vez se bifurcan en dos ramas, la temporal o la nasal. Esta división dicotómica seriada finaliza en capilares que presentan uniones del tipo *zónula occludens* los cuales, junto con una gruesa lámina basal, abundantes pericitos y los pies de los astrocitos, conforman la barrera hematorretiniana. La nutrición de la retina no depende únicamente de este sistema vascular ya que la zona de los fotorreceptores se nutre de la coriocapilar.

La papila se considera el primer tramo de nervio óptico o porción intraocular del mismo, seguida de un tramo nervioso orbitario, la porción intracanalicular y la porción intracraneal, dan lugar al primer componente de la vía óptica. Los tramos orbitario, intracanalicular e intracraneal están recubiertos por las meninges y los axones se encuentran mielinizados. Ambos nervios ópticos, provenientes de cada globo ocular, se entrecruzan en el quiasma y, posteriormente, continúan por los tractos ópticos donde la mayoría de fibras se dirigen hacia los cuerpos geniculados laterales o externos en la parte posterior inferior del tálamo. En estos cuerpos geniculados se

produce la conexión de los axones de las células ganglionares de la retina con otras neuronas, elaborándose ya información visual. Las neuronas de los cuerpos geniculados dirigen sus axones, a través de las radiaciones ópticas o áreas visuales, hacia el córtex visual, donde finalmente se produce la percepción visual.

a.3. Biología celular y el sistema visual.

En el sistema visual, como se ha descrito anteriormente, encontramos una gran variedad de tipos celulares con diferentes características morfológicas y funcionales. Por ello, todos estos tipos celulares presentan requerimientos metabólicos diferentes según correspondan a una estructura u otra y según la función que desempeñen dentro de la misma. De forma general, se podrían dividir en:

- Células del tejido epitelial de revestimiento o secretor y su membrana basal.
- Células del tejido conectivo.
- Células de tejidos conectivos especiales como el sanguíneo, el linfóide, el cartilaginoso, el óseo y el adiposo.
- Células del tejido muscular liso o estriado.
- Células del tejido nervioso.

No solo sus requerimientos metabólicos son diferentes, sino que la forma en que estas células pueden responder ante un daño para mantener la integridad y funcionalidad del tejido al que pertenecen, depende también del tipo celular.

a.3.1. Energía celular y mitocondria.

El sistema visual es uno de los sistemas que demanda más energía en el cuerpo humano después del cerebro. Defectos en el metabolismo energético suelen dar lugar a déficits visuales, cuando no a la pérdida total de la visión. Celularmente, esta demanda de energía se traduce en producción de adenosín trifosfato (ATP). La mayor parte de ATP se genera por un mecanismo oxidativo de membrana en la mitocondria, fosforilación oxidativa, aunque también se producen menores cantidades en el citosol durante la glucólisis. La ventaja de la producción de ATP mediante la fosforilación oxidativa es que por cada molécula de glucosa se generan 36 moléculas

de ATP, mientras que, en el citosol, el metabolismo glicolítico solo produce 2 moléculas de ATP por molécula de glucosa^{15,16}.

La córnea es un tejido que para permanecer transparente y mantener la hidratación parcial, requiere de considerables cantidades de energía. Los mecanismos básicos para la transparencia y función corneal correctas son la pinocitosis endotelial, la evaporación de la lágrima y la bomba activa de Sodio-Potasio (Na^+/K^+) en epitelio y endotelio. Tanto la pinocitosis como, especialmente, la función bomba Na^+/K^+ son procesos metabólicamente exigentes^{17,18}. Aun así, es la retina el tejido que tiene la demanda energética más alta del sistema visual. Las neuronas dependen enteramente del metabolismo oxidativo para generar su energía, al contrario que la glía, que puede sobrevivir largos períodos de tiempo en ambientes anóxicos. En esas condiciones de falta de oxígeno, las neuronas son las primeras en morir. El oxígeno llega a la retina, igual que la glucosa, gracias al flujo sanguíneo. Ambos, oxígeno y nutrientes, son los elementos necesarios que sustentan el proceso que da lugar a la cantidad final de ATP generado en las células. En el cerebro, un descenso del flujo sanguíneo durante cinco minutos por debajo el umbral crítico, causa un descenso de hasta el 90% de la producción de ATP y, si no es corregido a tiempo, puede desencadenar cascadas de muerte celular. Las neuronas llevan a cabo multitud de procesos que consumen energía: la síntesis de proteínas, neurotransmisores y otras moléculas; los procesos de transporte activo de macromoléculas y orgánulos a lo largo de los microtúbulos; la secreción, recaptación y reciclaje de neurotransmisores; etc. Pero el proceso que demanda, con diferencia, más energía es el transporte activo de iones contra su gradiente electroquímico o su concentración. Este transporte tiene la función de repolarizar la membrana plasmática tras una despolarización, para restablecer el gradiente iónico transmembrana. Este mecanismo se lleva a cabo principalmente por la bomba Na^+/K^+ , que utiliza una molécula de ATP por cada tres iones Na^+ expulsados, a cambio de dos iones K^+ que entran en la célula. Además, este complejo proteico se encarga del mantenimiento de la concentración de otros gradientes iónicos como el del Ca^{++} , Cl^- y HCO_3^- . Por lo tanto, en córnea y en retina, la actividad de la bomba Na^+/K^+ es crucial para el mantenimiento de la integridad y funcionalidad de ambos tejidos. Por ello, éste, junto con el resto de procesos metabólicamente exigentes, necesitan una función mitocondrial correcta que proporcione el aporte energético óptimo^{15,19,20}.

La mitocondria es un orgánulo que se encuentra en el citosol de las células eucariotas y, además de encargarse de la producción de la mayor parte del ATP celular, participa en vías de señalización, diferenciación, proliferación y muerte celular²⁰. Se encarga también de llevar a cabo los procesos de respiración y producción de energía, de la regulación intracelular de calcio y del control de la β -oxidación de los ácidos grasos. Cada mitocondria está delimitada por dos

membranas altamente especializadas, una envolviendo a la otra, definiendo así dos compartimentos mitocondriales: la matriz mitocondrial y el espacio intermembrana^{16,21,22}. La generación de ATP en la mitocondria es producto de dos fases interrelacionadas que se llevan a cabo por complejos proteicos embebidos en la membrana mitocondrial interna:

- Fase I: los electrones derivados de la oxidación de grupos acetil a través del ciclo del ácido cítrico, en forma de NADH, son transferidos a lo largo de una serie de transportadores de electrones (cadena de transporte de electrones) embebidos en la membrana mitocondrial interna. Estas transferencias de electrones liberan energía que se utiliza para bombear protones a través de la membrana y así generar un gradiente electroquímico de protones.
- Fase II: los protones fluyen a favor de su gradiente electroquímico a través del complejo proteico de la ATP sintasa, catalizando la síntesis de ATP desde adenosín difosfato (ADP) y fosfato inorgánico.

Como resultado de estas reacciones químicas, además de la generación de ATP, se producen también especies reactivas del oxígeno (EROs) en las células. Estos EROs, en caso de no ser contrarrestados por los sistemas celulares apropiados, acabarán dando lugar a un desequilibrio entre la producción de especies reactivas del oxígeno y la capacidad celular de equilibrar rápidamente los reactivos intermedios o reparar el daño que hayan podido causar. Este desequilibrio causa lo que se denomina estrés oxidativo²³⁻²⁵. La cadena de transporte de electrones está compuesta por dos transportadores de electrones móviles (la ubiquinona o coenzima Q y el citocromo c) y cuatro complejos enzimáticos (figura 1.4):

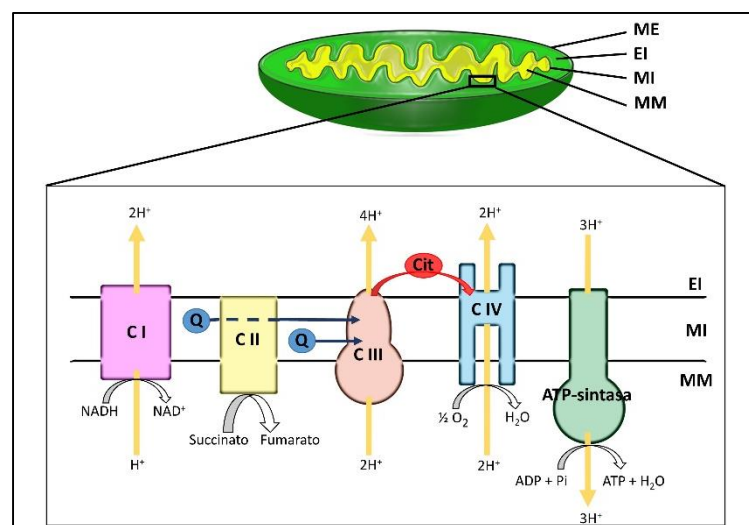


Figura i.4. Esquema de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. En el esquema se muestran las reacciones que se llevan a cabo en la cadena de transporte de electrones para generar ATP situada en la membrana mitocondrial interna.

- Complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidorreductasa): complejo multiproteico formado por al menos 45 subunidades, 38 de ellas codificadas por el genoma nuclear y el resto por el genoma mitocondrial. Es el encargado de captar dos electrones del NADH y transferirlos al transportador liposoluble coenzima Q. El producto reducido, que se conoce con el nombre de ubiquinol, difunde libremente por la membrana. Al mismo tiempo, este Complejo I transloca cuatro protones a través de membrana. Las reacciones químicas asociadas a este complejo generan EROs en la matriz mitocondrial, lo cual contribuye al estrés oxidativo celular.
- Complejo II (succinato deshidrogenasa): este complejo, formado por 4 subunidades codificadas por el genoma nuclear, no es una bomba de protones. Une el ciclo de Krebs con la cadena de transporte de electrones, siendo la única enzima de este ciclo asociada a membrana. Transfiere los electrones desde el succinato, generado en el ciclo, a la coenzima Q.
- Complejo III (complejo citocromo bc1 o ubiquinol citocromo c reductasa): está formado por 11 subunidades, 3 de ellas catalíticas, de las cuales sólo una, el citocromo B, está codificada por el genoma mitocondrial. Obtiene electrones por dos vías, desde los complejos I y II. Transfiere los electrones al citocromo c, transportador de electrones hidrosoluble que se encuentra en el espacio intermembrana de la mitocondria y, al mismo tiempo, transloca cuatro protones a través de la membrana por los dos electrones transportados desde el ubiquinol. Junto con el complejo I, son los mayores productores de EROs. (Sergio di meo)
- Complejo IV (COX o citocromo c oxidasa): es el último complejo de la cadena, y está formado por dos monómeros de 14 subunidades cada uno, de origen genómico tanto nuclear como mitocondrial. Capta cuatro electrones de las cuatro moléculas de citocromo c y las transfiere al oxígeno para producir dos moléculas de agua. Al mismo tiempo, transloca cuatro protones al espacio intermembrana, lo cual, junto con los dos protones empleados en la producción del agua, aumenta el gradiente de protones que se ha ido generando durante el proceso.

Una vez generado este gradiente de protones, es la enzima ATP-sintasa quien produce las moléculas de ATP aprovechando la energía que se genera con el paso de los protones a favor de gradiente. Este complejo proteico de la ATP sintasa está compuesto por dos módulos funcionales conectados por dos tallos: una porción hidrofílica involucrada en la síntesis e

hidrólisis de ATP y una porción hidrofóbica encargada de la traslocación de los protones desde el espacio intermembrana a la matriz mitocondrial^{16,20,22}.

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos, que cambian constantemente de forma y posición. Pueden moverse con facilidad a lo largo del citoplasma celular o permanecer ancladas a zonas con alta demanda energética. Su movilidad intracelular se relaciona con su capacidad para fusionarse entre sí, proceso que facilita el movimiento y la distribución mitocondrial, controlado por proteínas como Mfn1 y Mfn2 localizadas en la membrana externa, u OPA1 localizada en la membrana interna mitocondrial. Además, las mitocondrias pueden sufrir procesos de fisión, controlados principalmente por Drp1, proteína citosólica que actúa traslocándose hasta la membrana mitocondrial externa y dividiendo a la mitocondria en dos gracias a una hidrólisis vía guanosín trifosfato (GTP)^{26,27}. La alteración en el equilibrio fisión-fusión, así como otros procesos, desencadenan una serie de reacciones relacionados con la muerte celular, ya que la membrana mitocondrial se vuelve permeable y libera al citosol una serie de moléculas que actúan como señalizadores en cascadas de muerte celular, entre las que se encuentran el citocromo c, procaspasas 2, 3, 7 y 9 y el factor inductor de apoptosis (AIF)^{28,29}.

a.3.2. Muerte celular.

Se han definido muchos tipos diferentes de muerte celular atendiendo a las características que presentan. La gran mayoría de ellos se corresponden con procesos programados y organizados. Según diferentes autores, se pueden hacer diversas clasificaciones, aunque, de manera general, se consideran dos grandes tipos de muerte celular: apoptótica y no apoptótica. La principal diferencia entre ambas se encuentra en la intervención en el proceso, o no, de una familia de proteínas apoptóticas características: las caspasas (cisteín-proteasas)^{20,30,31}.

La muerte celular por apoptosis incluye la muerte clásica por la apoptosis y la anoikis, o muerte apoptótica inducida por la falta de sustrato o de contacto con otras células. La anoikis sólo se diferencia de la apoptosis por su particular forma de inducción. La muerte celular no apoptótica incluye la muerte celular autofágica, la necrosis, la muerte celular mitótica, la muerte celular independiente de caspasas, la muerte por excitotoxicidad, la degeneración *walleriana*, la cornificación y el partánatos, entre otros tipos. Las principales formas de muerte celular se distinguen por las siguientes características:

- a) Apoptosis (muerte celular programada de tipo I): es un tipo de muerte celular programada que conlleva una activación masiva de caspasas, lo cual implica que los

niveles energéticos se mantengan altos en la célula en las primeras etapas de la misma. Morfológicamente, se puede observar una condensación de la cromatina, así como fragmentación del ADN nuclear. El volumen celular se ve reducido y se acaban formando los cuerpos apoptóticos, vacuolizaciones de la membrana plasmática que incluyen en su interior a los orgánulos citoplasmáticos que presentan escasa o nula modificación ultraestructural. Se diferencia, según la vía de activación, en:

- Apoptosis por vía extrínseca: mediada por receptores transmembrana de muerte celular situados en la membrana plasmática, con un dominio de unión al ligando extracelular y un dominio citosólico de muerte celular. Cuando el ligando se une a la proteína transmembrana, se reclutan procaspasas iniciadoras, como la procaspasa 8, que acaba dando lugar a la activación de caspasas ejecutoras como las caspasa 3, iniciándose el proceso de apoptosis.
- Apoptosis por vía intrínseca: se dispara como consecuencia de la detección intracelular de daños irreparables de la célula por estrés, daño en el ADN... Implica cambios funcionales y estructurales de la mitocondria. La permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) (figura i.5.A) suele representar el punto de no retorno, dando lugar a la liberación de mediadores como el citocromo c o el AIF. Además, se produce la activación de la caspasa 9, caspasa iniciadora, que junto con el citocromo c y otras moléculas, forman el apoptosoma, que a su vez produce la activación de las caspasas ejecutoras 3, 6 y 7. Todo este proceso está regulado por la familia de proteínas Bcl-2, dentro de la cual hay tanto proteínas pro-apoptóticas como anti-apoptóticas. Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres familias: la familia de las proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1) la familia de proteínas pro-apoptóticas de tipo multidominio (Bax y Bak) y las proteínas pro-apoptóticas de

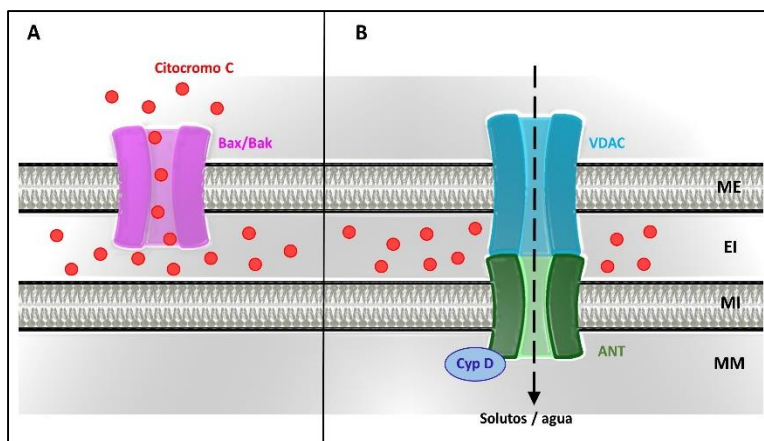


Figura i.5. Esquema de la formación del MOMP o PTPm. En la figura A se muestra el esquema de la permeabilización de membrana externa mitocondrial, mientras que en la figura B se observa el diagrama de la formación de un poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.

tipo BH3-only (Bid, Bim, Bad). Cuando se activan las proteínas pro-apoptóticas de la familia Bcl-2, se permeabiliza la membrana mitocondrial, lo que permite la salida de moléculas del espacio intermembrana al citosol³²⁻³⁵.

- b) Necrosis: habitualmente es consecuencia de condiciones fisiopatológicas concretas como infecciones, procesos inflamatorios o procesos isquémicos. Hay que destacar que en éstas células se produce una depleción energética, es decir, disminuyen drásticamente los niveles de ATP. Ello es debido a la apertura desde la membrana mitocondrial interna de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm) (figura i.5.B). Estos poros, regulados por la proteína CypD, se forman en ciertas condiciones patológicas y permiten el paso de iones y metabolitos de masa molecular inferior a 1,5 kDa. Morfológicamente, la célula presenta daño en los lípidos de membrana, con hinchazón y ruptura de la membrana celular, disfunción de los orgánulos, pérdida de la función de las bombas/canales iónicos y activación de proteasas no apoptóticas. Se ha considerado siempre como un proceso pasivo no controlado, aunque estudios recientes indican que existirían ciertos tipos de necrosis que podrían estar controlados por vías de señales de transducción y mecanismos catabólicos. A este tipo de necrosis programada se la ha denominado necroptosis. La necroptosis presenta rasgos morfológicos similares a los de la necrosis, como tumefacción celular, disfunción de los orgánulos y permeabilización de la membrana plasmática. Durante el proceso de necroptosis se forma un complejo multiproteico denominado necrosoma, en el que están presentes las proteínas RIP1 y RIP3, claves en el desarrollo de este tipo de muerte celular^{20,36}.
- c) Autofagia (muerte celular programada de tipo II): la autofagia es un mecanismo por el cual las proteínas de vida larga y ciertos componentes de los orgánulos celulares se degradan en lisosomas (autofagosomas). Permite el recambio controlado genéticamente de constituyentes celulares que ocurre en todas las células eucariotas. Es un proceso muy conservado evolutivamente. Orgánulos como las mitocondrias, lisosomas y el retículo endoplasmático juegan papeles cruciales en el desarrollo de este tipo de muerte celular. Molecularmente, está mediada por una serie de genes relacionados con la autofagia, ATG, conservados evolutivamente. Una de las proteínas más importantes en este tipo de muerte celular es Beclin-1, responsables de la formación de los autofagosomas junto con la fosfoinositol-3-kinasa de clase III. La autofagia se da en niveles basales en la mayoría de los tejidos, contribuyendo al recambio de componentes citoplasmáticos y promoviendo la adaptación y

supervivencia celular durante épocas de estrés metabólico, pero un exceso de autofagia lleva a la muerte celular, ya que destruye grandes proporciones de citosol y de orgánulos de modo que a partir de cierto umbral se produce una atrofia celular irreversible. Ciertos autores sugieren que la autofagia puede ser una respuesta primaria al estrés, que en casos de estrés alto dispare procesos de apoptosis o necrosis³⁷.

- d) **Partánatos:** es el tipo de muerte celular que implica la activación de la enzima PARP-1. Diferentes tipos de estrés pueden llevar a daño en el ADN, lo cual activa PARP-1 e induce la formación de PAR. PAR facilita la liberación de AIF de la mitocondria, y se activa la cascada que resulta en fragmentación del ADN y muerte celular. Se cree que es un tipo de muerte celular muy importante en neuronas³⁸.
- e) **Muerte celular independiente de caspasas (CICD):** la muerte celular independiente de caspasas (CICD) comparte algunos aspectos con la apoptosis clásica, como por ejemplo la inducción de la MOMP, la difusión de ciertas proteínas desde el espacio intermembrana y la fragmentación del ADN, pero no implica la activación de la cascada de caspasas y por lo tanto se clasifica como una forma de muerte celular no apoptótica. En ella se produce la liberación de AIF, así como de endonucleasa G, lo que produce fragmentación del ADN y muerte celular de forma independiente de caspasas. Como las caspasas no están implicadas en este proceso, PARP-1 está intacta y es activada por el ADN fragmentado lo que causa una síntesis masiva de PAR, y una depleción de NAD⁺ y ATP que acaban produciendo la muerte celular. PARP-1 se puede utilizar como marcador para determinar si hay apoptosis ya que es un sustrato de caspasas y aparecería fragmentada en el caso de muertes celulares apoptóticas³⁹.

La mitocondria, por lo tanto, interviene manteniendo el nivel energético necesario para el correcto funcionamiento celular y actuando de reservorio de proteínas relacionadas con diferentes procesos de muerte celular. Estas moléculas son principalmente el citocromo C, Smac/Diablo, AIF, la endonucleasa G, las procaspasas 2,3,8 y 9 y la proteasa HtrA2/Omi. La liberación de estas proteínas conduce a una secuencia de cambios morfológicos que van desde la condensación de la cromatina nuclear hasta la exposición de la fosfatidilserina y de moléculas de adhesión en la superficie celular. Más en concreto:

- el citocromo c se libera en el citosol, interactúa con el apoptosoma, activando la caspasa-9. Esta caspasa activa a su vez a las efectoras, como la caspasa-3, desencadenando las últimas fases de la apoptosis.

- Smac/Diablo en el citosol tiene afinidad por proteínas inhibidoras de la apoptosis, compitiendo como sustrato enzimático con ellas y, por lo tanto, favoreciendo la no inhibición de la misma.
- AIF es una proteína que ejerce su función en el núcleo celular. La actividad de PARP-1 es imprescindible para esa translocación de AIF desde la mitocondria al núcleo, donde AIF induce la fragmentación a gran escala del ADN y la condensación de la cromatina.
- La endonucleasa G, al igual que AIF, se trasloca al núcleo donde facilita la degradación de la cromatina.
- Las procaspasas son proteínas que una vez activadas tienen actividad caspasa sobre diferentes sustratos.
- HtrA2/Omi, serín-proteasa mitocondrial, que una vez liberada mimetiza a una caspasa por lo que se une a inhibidores de caspasas, favoreciendo el desarrollo de los procesos de muerte celular.

Por todo ello, se puede decir que la mitocondria actúa como el orgánulo integrador de una cadena de estímulos inductores de muerte celular y desencadena una serie de cascadas de señalización, además de ser uno de los orgánulos con mayor tasa de producción de EROs a nivel celular, a través de las reacciones de óxido-reducción que ocurren en la cadena de transporte de electrones en las que el oxígeno es el último aceptor de electrones^{23,28,29,40}.

a.3.3. Especies reactivas.

Los radicales libres son moléculas que tienen, al menos, un electrón desapareado. Su producción, que lleva al estado de estrés y puede desencadenar cascadas de muerte celular, es especialmente alta en mitocondrias, aunque no exclusiva de las mismas. Diversos sistemas celulares situados en la membrana plasmática, en el citosol, en lisosomas, en el retículo endoplasmático y en peroxisomas, son también generadores de estas moléculas reactivas. Se distingue entre las derivadas del oxígeno, EROs, y las especies reactivas del nitrógeno (ERNs)⁴¹⁻

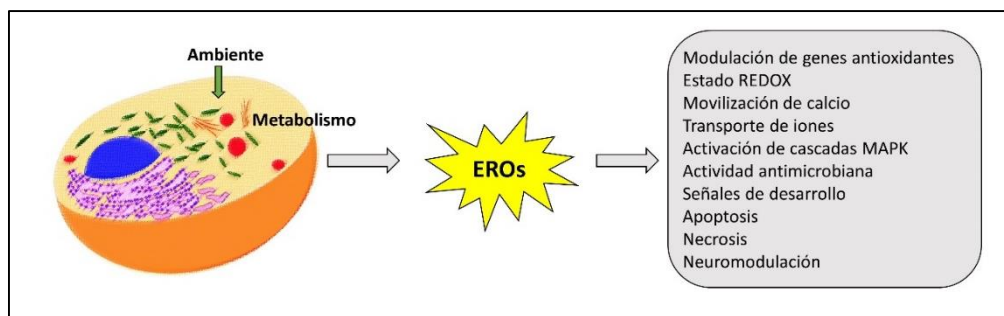


Figura i.6. Efectos celulares de la producción de EROs. Listado de algunos de los efectos de la generación de especies reactivas del oxígeno.

⁴³. Estas moléculas, que se pueden dividir también en radicales y no radicales (tabla i.1), tienen diferentes efectos en las células (figura i.6). Se sabe que las EROs y las ERNs actúan como moléculas señalizadoras de una gran variedad de funciones fisiológicas entre las que se encuentran la activación de genes⁴⁴, el crecimiento celular⁴⁵ y la modulación de ciertas reacciones químicas⁴⁶. Cuando su nivel se descontrola, son capaces de producir daños con mayor o menos especificidad en ADN, proteínas y lípidos. Por ejemplo, moléculas radicales como el radical $\cdot\text{OH}$, causan daño irreversible a macromoléculas con baja especificidad, mientras que moléculas como el peróxido de hidrógeno tienen como diana los grupos tiol de las proteínas con residuos de cisteína. La oxidación de estos residuos da lugar a cambios en la estructura y/o función de las proteínas afectadas, en algunos casos de forma reversible y en otros de manera permanente⁴⁷. Estas alteraciones de las cadenas polipeptídicas, así como alteraciones de la carga eléctrica de las mismas, fenómenos de *cross-linking* y la oxidación de aminoácidos concretos, hacen que las proteínas se conviertan en sustrato de reacciones proteolíticas llevadas a cabo por proteasas específicas^{43,48}. En el caso del ADN, las moléculas oxidantes son capaces de producir modificaciones estructurales en la molécula actuando en las bases, especialmente en la guanina por ser la base con más bajo potencial de oxidación, dando como producto más común la 8-oxoguanina⁴⁹. Por último, los lípidos sufren el ataque de las EROs en los ácidos grasos

MOLÉCULA	FUENTE	FÓRMULA	TIPO	REACCIÓN
Anión superóxido	ERO	$\text{O}_2^{\cdot-}$	Radical	$\text{NADPH} + 2\text{O}_2 \leftrightarrow \text{NADP}^+ + 2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+$ $2\text{O}_2^{\cdot-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$
Hidroxilo	ERO	$\cdot\text{OH}$	Radical	$\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^- + \cdot\text{OH}$
Óxido nítrico	ERN	NO^\cdot	Radical	$\text{L-arginina} \rightarrow \text{Citrulina} + \text{NO}$
Dióxido de nitrógeno	ERN	NO_2^\cdot	Radical	$\text{ONO}^\cdot\text{OH} \rightarrow \cdot\text{OH} + \text{NO}_2^\cdot$
Peróxido de hidrógeno	ERO	H_2O_2	No radical	$\text{Hipoxantina} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \leftrightarrow \text{Xantina} + \text{H}_2\text{O}_2$
Radicales peroxilo	ERO	ROO^\cdot	Radical	$\text{R}^\cdot + \text{O}_2 \rightarrow \text{ROO}^\cdot$
Ácido hipocloroso	ERO	HOCl	No radical	$\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Cl}^- \rightarrow \text{HOCl} + \text{H}_2\text{O}$
Peroxinitrito	ERN	ONOO^-	No radical	$\text{NO}^\cdot + \text{O}_2^{\cdot-} \rightarrow \text{ONOO}^- + \text{CO}_2$

Tabla i.1. Listado de especies reactivas. Resaltadas en gris, aquellas no radicales.

poliinsaturados que constituyen las membranas celulares, iniciando la propagación de una reacción en cadena que compromete la integridad y viabilidad celular⁵⁰.

a.3.4. Mecanismos antioxidantes y supervivencia celular.

En condiciones normales, las células tienen suficientes defensas capaces de bloquear los diferentes tipos de especies reactivas. En concreto, en la mitocondria, donde los radicales libres que se generan son principalmente EROs derivados de su metabolismo enzimático, existe un gran sistema antioxidante encargado de mantener su producción a muy bajos niveles⁵¹. Los mecanismos antioxidantes de que disponen las células pueden clasificarse en enzimáticos y no enzimáticos.

Los principales antioxidantes enzimáticos son las Superóxido dismutasas (SOD), Catalasas (CAT), Glutación peroxidadas (GTPx), Tiorredoxinas (TRX), Peroxirredoxinas (PRX), y la Glutación transferasa (GST). Dentro de las Superóxido dismutasas, existe una llamada Superóxido dismutasa 2 (SOD2), con manganeso como cofactor y de localización mitocondrial, cuya función es bloquear el daño producido por el anión superóxido generado durante la producción de ATP⁴⁷. Su deficiencia se relaciona con citotoxicidad y muerte celular^{52,53}. Todos ellos catalizan reacciones en las que se neutralizan las moléculas causantes de estrés oxidativo (Tabla i.2).

Los antioxidantes no enzimáticos son compuestos de bajo peso molecular como vitaminas (vitamina C y E), carotenoides, ácido úrico y el glutati6n (tabla i.3). El glutati6n es el principal antioxidante soluble y actúa como sensor de estrés oxidativo mediante modificaciones en su ratio GSH/GSSG. Es cofactor de varias enzimas detoxificantes, e interviene en la conversi6n de las vitaminas C y E a sus formas reducidas⁵⁴. Protege a las células frente a la apoptosis mediante su interacci6n con rutas de seálalaci6n pro y anti-apopt6ticas⁵⁵ y activa diversos factores de transcripci6n, como ya se ha descrito. El glutati6n se ha de mantener en la célula con una alta

Tabla i.2. Listado de antioxidantes enzimáticos y reacciones que catalizan. R: radical, cadena carbonada, M: metal.

Antioxidantes enzimáticos	Localizaci6n	Reacci6n
Superóxido dismutasa (SOD)	Citosol / Mitocondria	$M^{(n+1)+}\text{-SOD} + O_2^- \rightarrow M^{n+}\text{-SOD} + O_2$ / $M^{n+}\text{-SOD} + O_2^- + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+}\text{-SOD} + H_2O_2$
Catalasa (CAT)	Peroxisomas / citosol	$2H_2O_2 \rightarrow O_2 + 2H_2O$ / $H_2O_2 + Fe(III)\text{-E} \rightarrow H_2O + O=Fe(IV)\text{-E}(.)$ / $H_2O_2 + O=Fe(IV)\text{-E}(.) \rightarrow H_2O + Fe(III)\text{-E} + O_2$
Glutati6n peroxidasa (GTPx)	Citosol / Mitocondria	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + 2H_2O$ / $2GSH + ROOH \rightarrow GSSG + ROH + H_2O$
Tiorredoxina (TRX)	Citosol / Mitocondria / Núcleo	$AMP + \text{sulfito} + TRX\text{-disulfuro} \rightarrow \text{Adenilil sulfato} + TRX$ / $ADP + \text{sulfito} + TRX\text{-disulfuro} \rightarrow \text{fosfoadenilil-sulfato} + TRX$
Peroxirredoxina (PRX)	Citosol / Mitocondria / Reticulo endoplasmático	$2R'\text{-SH} + ROOH \rightarrow R'\text{-S-S-R}' + ROH + H_2O$
Glutati6n transferasa (GST)	Citosol / Mitocondria	$RX + GSH \rightarrow HX + R\text{-S-GSH}$
Metalotioneinas (MT)	Citosol	$MT\text{-tiol} \rightarrow Zn\text{-MT} \rightarrow MT\text{-disulfide}$

ratio entre sus estados reducido (GSH) y oxidado (GSSG), y la disrupción de esta ratio da lugar a la expresión de factores de transcripción sensibles al estado REDOX celular.

También hay una serie de sensores y de vías de señalización que se activan directamente por la presencia de EROs, y que convergen en la regulación de factores de transcripción, entre ellos: AP-1, Nrf-2, HIF-1 y NF-κB (figura i.7), los cuales inducen la expresión de diferentes genes⁵⁶. La activación de estas vías por EROs se lleva a cabo por cascadas de transducción que transmiten la señal hacia el interior celular. Los receptores de estas señales son del tipo tirosina quinasa y muchos de ellos son receptores de factores de crecimiento (EGF-R, VEGF-R, PDGF-R), aunque también hay tirosina fosfatasas y serina-treonina quinasas. Quinasas reguladas por señales extracelulares, como JNK o p38, miembros de la familia de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) relacionadas con procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis están también reguladas por EROs^{43,56}. Una de las proteínas reguladas por la vía del Nrf2 es la hemoxigenasa-1 (HO-1). La HO-1 es una de las dos isoformas que presenta la enzima hemoxigenasa en mamíferos. En el ojo humano se expresa en pequeña cantidad y responde a situaciones de estrés, siendo altamente inducida por una variedad de estímulos entre los que se encuentran el óxido nítrico, metales pesados, factores de crecimiento y citoquinas. Cataliza un paso limitante en la degradación del grupo hemo, dando lugar a la generación del ión hierro (II), biliverdina y monóxido de carbono. La biliverdina junto con la bilirrubina, formadas por acción de la enzima Biliverdin reductasa, son potentes antioxidantes, al igual que el resto de productos

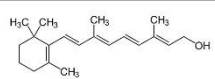
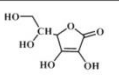
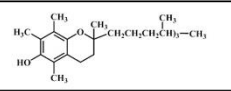
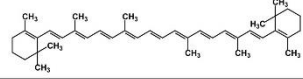
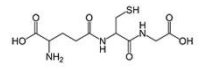

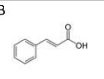

Antioxidantes no enzimáticos	Tipo	Fórmula semidesarrollada	Reacción genérica
Retinol (Vitamina A)	Liposoluble		$ROO^{\cdot} + C_{29}H_{50}O \rightarrow ROOH + C_{29}H_{49}O$
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Hidrosoluble		$ROO^{\cdot} + C_6H_8O_6 \rightarrow ROOH + C_6H_6O_6$
α-tocoferol (Vitamina E)	Liposoluble		$ROO^{\cdot} + C_{29}H_{50}O_2 \rightarrow ROOH + C_{29}H_{49}O_2$
B-caroteno	Liposoluble		$ROO^{\cdot} + C_{40}H_{56} \rightarrow ROOH + C_{40}H_{55}$
Glutatión	Hidrosoluble		$2ROO^{\cdot} + 2GSH \rightarrow ROOH + GSSG$
Polifenoles (taninos hidrolizables, condensados o ligninas)	Hidro / Liposolubles	<div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;"> <p>A</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>B</p>  </div> <div style="text-align: center;"> <p>C</p>  </div> </div>	$ROO^{\cdot} + P-C_6H_5OH \rightarrow ROOH + P-C_6H_5O$

Tabla i.3. Listado de antioxidantes no enzimáticos y reacciones que catalizan. R: radical, cadena carbonada.

de la actividad de la HO-1, y todos ellos regulan procesos de inflamación, apoptosis, proliferación celular, fibrosis y angiogénesis⁵⁷.

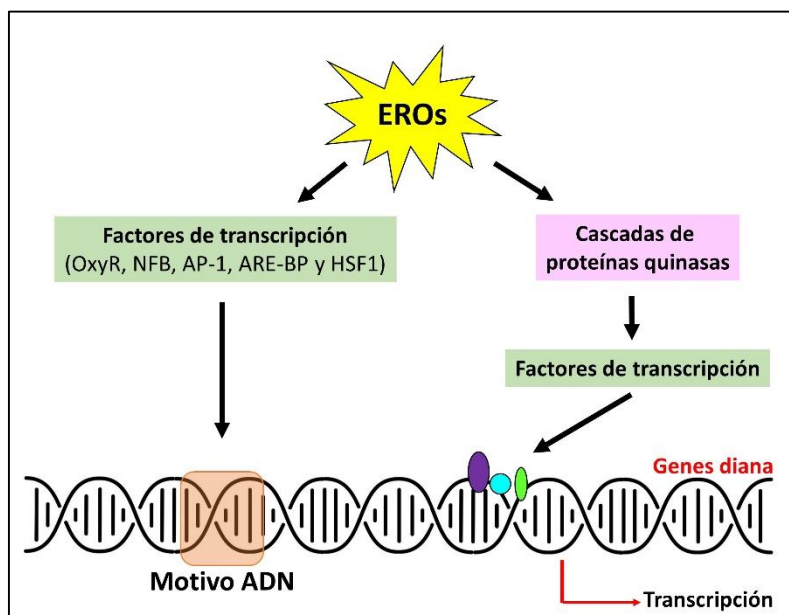


Figura i.7. Modo de acción de los EROs sobre la transcripción génica. Esquema general de las vías de actuación de las especies reactivas del oxígeno sobre los factores de transcripción.

a.4. Enfermedades y disfunciones del sistema visual.

Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), a la fecha de publicación de este trabajo, la cifra estimada de personas con discapacidad visual alcanza los 253 millones: 36 millones con ceguera y 217 millones con discapacidad visual de moderada a grave⁵⁷. De ellas, el 81% son mayores de 50 años. Las enfermedades oculares crónicas son la principal causa mundial de pérdida de visión, mientras que los errores de refracción no corregidos y las cataratas no operadas son las dos causas principales de discapacidad visual. Más del 80% del total mundial de casos se pueden evitar o curar y por ello, desde el año 2014, la OMS ha estado desarrollando un plan de acción mundial sobre salud ocular. El objetivo de este plan 2014-2019 es reducir la discapacidad visual evitable como problema de salud pública mundial y garantizar el acceso de las personas con discapacidad visual a servicios de rehabilitación.

Dentro de todas las complejas causas que pueden afectar a la integridad, transparencia y función corneal, tienen especial relación con este trabajo aquellas relacionadas con los procesos de cicatrización del epitelio corneal y ciertas disfunciones del endotelio. La córnea se puede ver afectada por diferentes procesos que causan ulceraciones y rupturas de su superficie que dan lugar al comienzo de la cicatrización corneal. Entre estos procesos se encuentran infecciones de diferente etiología, enfermedades congénitas, desórdenes de la superficie corneal, traumatismos... La formación de escaras corneales secundarias a infecciones son una de las causas principales de ceguera prevenible en el tercer mundo. En países desarrollados, la

atención de pacientes con abrasiones corneales traumáticas es el principal daño atendido en consultas de urgencia⁵⁸⁻⁶¹. Estas abrasiones pueden dar lugar a la aparición de úlceras permanentes e incrementar el riesgo de aparición de erosiones recurrentes⁵⁸. Hay, además, un incremento en el número de pacientes que se somete a cirugías refractivas, dentro de las cuales un pequeño porcentaje sufre complicaciones en la cicatrización.

Además de diferentes distrofias o degeneraciones concretas que afectan directamente a la estructura y función de las células del endotelio corneal, éste sufre un proceso de envejecimiento a lo largo de la vida que conlleva la disminución del número de células que lo componen. Durante el comienzo de algunos tipos de glaucoma, el aumento de la PIO en la cámara anterior también afecta a la integridad del endotelio corneal. Además, diversos procedimientos oftalmológicos, necesarios para el tratamiento de otras patologías, suponen que el descenso del número de células o las rupturas del endotelio se acentúen. Entre ellas destacan la implantación de los dispositivos de drenaje para glaucoma, disección estromal profunda asistida por láser, facoemulsificación o la implantación de lentes intraoculares. Cuando la densidad de células endoteliales cae por debajo de un umbral crítico o se produce una ruptura de la monocapa, las funciones de barrera y bomba no pueden ser mantenidas, y la córnea se vuelve edematosa y puede desarrollar queratopatía bullosa llegando incluso a ser necesario el trasplante corneal.

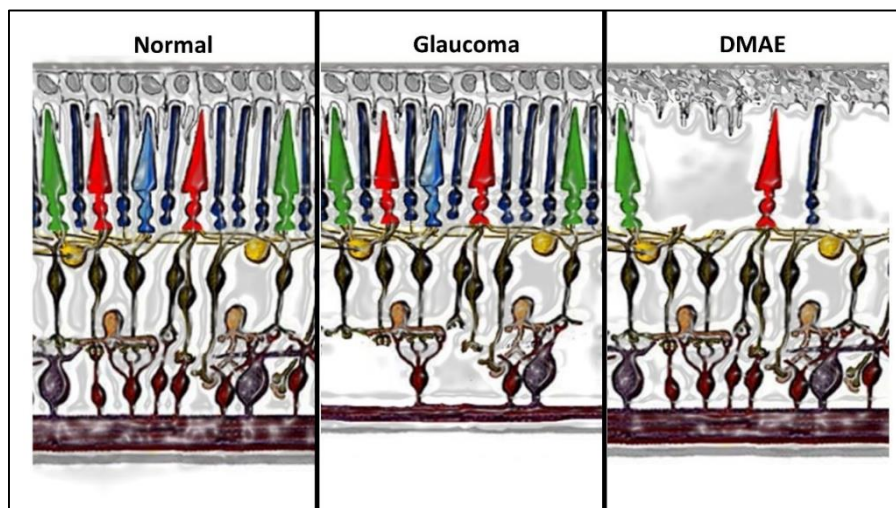


Figura i.8. Esquema de la afectación de diferentes tipos celulares de la retina en glaucoma y DMAE. En este esquema se observa una retina normal con la correspondiente distribución de tipos celulares. En el centro, el esquema correspondiente a una retina glaucomatosa en la que se observa pérdida de células ganglionares y reducción del espesor en la capa de fibras, y a la derecha una retina en la que están afectados tanto el epitelio pigmentario como los fotorreceptores a consecuencia de la DMAE.

Las disfunciones de la retina conllevan de forma habitual, a corto o largo plazo, la pérdida de visión. Las principales disfunciones de la retina suelen producirse por la afectación y

desaparición de fotorreceptores y células ganglionares (CGR). Destacan, por su prevalencia, gravedad y falta de tratamientos definitivos, el glaucoma y la degeneración macular (figura i.8). El glaucoma hace referencia a un grupo de enfermedades que tienen en común una neuropatía óptica característica asociada a pérdida de función visual debida a la pérdida de axones (CGR), vasos y células gliales de la retina^{58,62}. La pérdida de visión es periférica en las primeras etapas de la enfermedad y avanza, causando la denominada visión en túnel, hasta la pérdida total. Aunque no es un factor determinante, el aumento de la PIO es uno de los principales factores de riesgo para esta enfermedad. La degeneración macular asociada a la edad (DMAE) se presenta en dos formas, seca y húmeda. La seca es el tipo más común, y en ella se produce la muerte de los fotorreceptores de la mácula, lo que conlleva una pérdida de visión central. Se producen en ella unos depósitos de desechos metabólicos celulares llamados drusas que se acumulan debajo de la retina, entre el EPR y la membrana de Bruch. Un aumento en el tamaño y número de estas drusas suele ser el primer signo de la aparición de esta enfermedad, que evoluciona en el tiempo produciendo la muerte de las células del EPR y de los fotorreceptores de la mácula.

b. La luz y el sistema visual⁶³⁻⁶⁶.

Se denomina luz a cierto tipo de energía electromagnética radiante. El espectro electromagnético (EEM) se extiende desde las radiaciones de menor longitud de onda (rayos gamma o rayos X), pasando por la radiación ultravioleta (UV), la luz visible y la radiación infrarroja, hasta las ondas electromagnéticas de mayor longitud de onda (ondas de radio) (figura i.9). La denominada luz visible es aquella percibida por el ojo humano y que se extiende desde los 400 hasta los 780 nm (figura i.9). Esta luz está formada por partículas elementales llamadas fotones, desprovistos de masa, que responden a las características físicas del comportamiento dual onda-partícula.

La luz como onda se transmite por el aire y otros medios, además de por el vacío, pero presenta características de partícula en los fenómenos relacionados con su generación y absorción. De manera general, la oftalmología se ha centrado en el estudio de la luz como onda y sus interacciones con los medios y tejidos oculares transparentes, por lo que la interacción de la luz con la materia, que da lugar a la emisión o absorción de fotones, ha quedado históricamente relegada a un segundo plano. La luz, de forma habitual, se define por su rango de emisión dentro del EEM (nm) y por su potencia (W). La energía asociada a un fotón (E), descrita por la ecuación:

$$E = h c / \lambda$$

donde h es la constante de Planck (6.62×10^{-34} J·s), c es la velocidad de la luz en el vacío (3×10^8 m/s) y λ es la longitud de onda, viene definida por ésta última. Por lo tanto, la relación entre la energía de un fotón es inversamente proporcional a su longitud de onda. Al contrario, la frecuencia de la luz, magnitud inversa a la longitud de onda, es directamente proporcional a la energía del fotón. El color es la impresión producida por las diferentes longitudes de onda/frecuencias de la parte visible EEM percibidas por el sistema visual humano. Se identifican como longitudes de onda cortas del espectro visible aquellas de color azulado, mientras que las longitudes de onda largas se corresponden con la parte roja del espectro. Una de las maneras de definir la composición del espectro de una fuente de luz es mediante el concepto de temperatura del color. Esa temperatura se define comparando el color emitido por la fuente dentro del espectro con la luz que emitiría un cuerpo negro calentado a una temperatura determinada. Por ello, la medida se hace en grados Kelvin (K), en una escala de 1000 a 9000 grados en la que la luz denominada cálida es aquella de menor valor de K y que se corresponde con los espectros con predominancia de longitudes de onda largas, mientras que las luces denominadas frías tienen valores K más altos y predominan en sus espectros las longitudes de onda cortas.

La medida de la potencia de una radiación electromagnética es la energía que transportan las

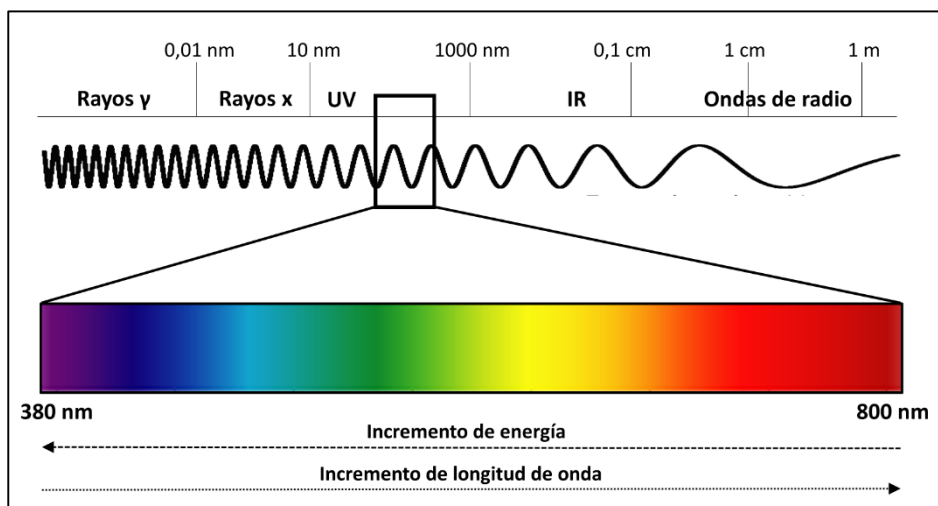


Figura i.9. Esquema de diferentes tipos de ondas en relación a su frecuencia y longitud. En este diagrama se observa cómo, dentro del espectro visible, los diferentes colores tienen distintas energías.

ondas por unidad de tiempo y se denomina flujo radiante, por lo tanto, la potencia de una fuente de luz depende de la composición colorimétrica de la misma. La cantidad de flujo que emite una fuente por unidad de ángulo sólido es la intensidad y se mide en vatios por estereorradián o candelas. Para manejar unidades menos complejas, a lo largo de este trabajo se hablará de

irradiancia en vez de intensidad. Se denomina irradiancia a la magnitud que mide la potencia incidente expresada en este caso por unidad de superficie (W/m^2).

Cuando la luz interacciona con la materia, puede sufrir diferentes modificaciones que le confieren ciertas propiedades ópticas, entre ellas:

- Reflexión: modificación de su dirección al entrar en contacto con otro medio que hace que la luz permanezca en el mismo medio.
- Refracción: modificación en la dirección y velocidad de la luz al cambiar el medio en que se propaga. La dispersión es un tipo de refracción mediante la cual un haz de luz se descompone en las diferentes longitudes de onda que lo componen. Las longitudes de onda cortas son las que más se desvían.
- Difracción: desviación de la luz al pasar por el borde de un cuerpo oscuro o por una abertura cuyo diámetro sea menor o igual que el de su longitud de onda. Las longitudes de onda más largas son las que sufren mayores desviaciones.
- Polarización: oscilación de la luz en un solo plano.
- Absorción: es el proceso por el cual la radiación es captada por la materia. En el caso de la absorción óptica, los materiales negros absorben completamente el espectro de la fuente de luz emisora mientras que un material blanco las refleja. La energía absorbida se transforma en otros tipos de energía como calor o energía eléctrica, o puede ser reemitida.

La luz, por lo tanto, al atravesar un cuerpo puede sufrir varios de estos fenómenos a la vez transformando la luz incidente y la energía de la misma. La magnitud que mide la cantidad de luz que atraviesa un cuerpo se denomina transmitancia, y describe la capacidad de ese material de transmitir energía radiante. El coeficiente de transmitancia es la ratio entre energía transmitida frente a energía incidente.

La luz que llega hasta el ojo es el estímulo necesario para el sistema visual. La percepción del estímulo luminoso que llega a la retina da lugar a la activación de diversas vías de transmisión de los impulsos generados, dependiendo de los fotorreceptores que se activen. Tradicionalmente, el sistema más conocido es el que da lugar al proceso de la visión, pero desde hace algunos años se sabe que existen más tipos de fotorreceptores en la retina, estimulados por tipos concretos de estímulos luminosos, que activan vías diferentes de transmisión del estímulo, también importantes en este caso por su efecto en el metabolismo general⁶⁷.

b.1. Fuentes de luz artificial. Filtros.

Las fuentes de luz se pueden clasificar atendiendo a diferentes aspectos. Si la luz es emitida por ellas, se denominan fuentes primarias de luz, mientras que, si la luz es consecuencia del reflejo de la luz proveniente de otra fuente, se denominan fuentes secundarias. Igualmente, se pueden dividir en fuentes naturales o artificiales, si son productoras naturales de luz o su emisión es debida a la construcción de una fuente artificial. En la actualidad, se puede diferenciar entre una gran variedad de lámparas, más o menos obsoletas, ya que su evolución responde principalmente al interés social de encontrar fuentes eléctricas de luz artificial que sean eficientes energéticamente y que ofrezcan condiciones óptimas de luminosidad. De forma general, se pueden diferenciar^{68,69,70}:

- las lámparas incandescentes: hay varios tipos según la incandescencia se produzca por la combustión de una sustancia (sólida, líquida o gaseosa) o por el paso de una corriente eléctrica a través de un hilo conductor fino. Responden a la ley de Planck, y en ellas el incremento de temperatura por encima de un nivel determinado da lugar a la emisión de energía electromagnética. Solo un 15% de la energía que consumen la transforman en luz, de modo que son poco eficientes energéticamente. El resto de energía es transformada en calor y en radiaciones de otros rangos del espectro (UV, infrarrojos). Las lámparas halógenas son una evolución de las incandescentes en las cuales dentro del dispositivo se encierra un gas inerte y una pequeña cantidad de un halógeno. Tienen mayor vida útil que las incandescentes y son un poco mejores en rendimiento energético, pero para funcionar necesitan un transformador que genera potentes campos magnéticos de baja frecuencia.
- Las lámparas de descarga, en las que el mecanismo de producción de energía es por luminiscencia. La luminiscencia es el proceso por el cual ciertas moléculas son capaces de emitir luz tras haber sido excitadas previamente por otra radiación, sin la generación de calor. En las lámparas de descarga, se excita el gas contenido en su interior al someterlo a descargas eléctricas entre dos electrodos, sin generarse prácticamente incremento de la temperatura. Se clasifican según el gas utilizado y la presión a la que se encuentre. Las lámparas fluorescentes pertenecen a las de descarga de baja presión, rellenas de vapor de mercurio. Al producirse la descarga eléctrica, el gas emite radiación en la zona UV del espectro que se convierte en radiación visible al entrar en contacto con el polvo fluorescente en la pared interior del depósito de descarga. Los diferentes

tipos de fluorescentes utilizados son los que producen las distintas tonalidades de emisión.

- El LED es un dispositivo constituido por un material semiconductor con dos terminales, que emite luz por un mecanismo de electroluminiscencia. Cuando se hace pasar corriente eléctrica por los terminales, los electrones cambian de nivel de energía durante su desplazamiento por el material semiconductor, dando lugar a la liberación de fotones. Son una fuente de luz artificial primaria que ofrece grandes ventajas frente a otros tipos de fuentes, entre otras: larga duración, elevada eficiencia de conversión y muy baja irradiación de calor. Otra característica importante es que tienen un rango estrecho en la longitud de onda de emisión. Todas estas ventajas los han posicionado como unos de los dispositivos más utilizados en la actualidad no sólo para la iluminación ambiente, sino también como componentes de las pantallas de muchos dispositivos electrónicos.

La luz emitida por las fuentes citadas suele ser una luz compleja compuesta por una gran cantidad de longitudes de onda diferentes (figura i.10). Para la modificación de estas emisiones primarias se pueden utilizar distintos tipos de filtros para múltiples finalidades.

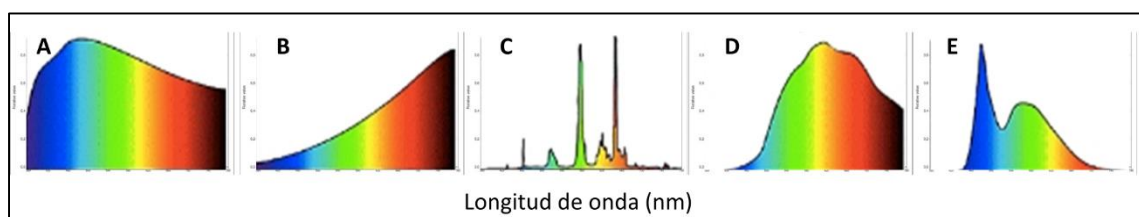


Figura i.10. Distribución espectral de diferentes tipos de fuentes de luz, representadas como energía relativa (u.a.) frente a longitud de onda (nm). A: Sol. B: Lámpara incandescente. C: Lámpara fluorescente. D: Lámpara halógena. E: LED blanco.

Filtros

Los filtros ópticos son dispositivos que de manera selectiva permiten el paso de unas u otras longitudes de onda, suprimiendo o atenuando el resto. Este proceso se debe a la absorción, reflexión o transformación selectiva de las radiaciones que reciben. Existen multitud de clasificaciones atendiendo a las diferentes características que pueden presentar estos filtros^{63,64,66}. De forma general, se denominan filtros absorbivos a aquellos que absorben ciertas longitudes de onda y transmiten las restantes, mientras que los filtros que reflejan ciertas longitudes de onda se denominan reflectivos. Existe otro tipo, desarrollado recientemente⁷¹, capaz de transformar las longitudes de onda incidentes mediante procesos de luminiscencia,

denominado filtro nanoluminiscente (figura i.11) que absorbiendo fotones de una longitud de onda y emitiéndolos en otras, consiguen la conversión espectral del espectro incidente. También existen los filtros mixtos, que reúnen características de varios tipos de los anteriores citados.

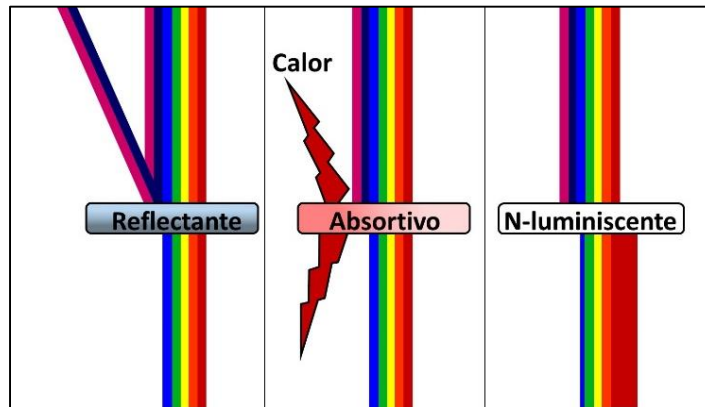


Figura i.11. Diferentes tipos de filtro y modo de actuación. En este diagrama se ve la interacción de diferentes longitudes de onda con distintos tipos de filtros, de izquierda a derecha) filtro reflectante para longitudes de onda cortas, filtro absortivo parcial para longitudes de onda corta y filtro nanoluminiscente con absorción en onda corta y emisión en onda larga.

b.2. Transformación de la luz en el sistema visual. Radiación ambiente.

La luz natural a la que estamos expuestos es principalmente la que llega a la superficie terrestre generada por el sol. Además, debido al estilo de vida actual, especialmente en los países desarrollados, gran parte de la población está expuesta durante largos periodos de tiempo a luz artificial proveniente de diferentes tipos de lámparas y dispositivos (figura i.12).

Radiación ambiente.

Se puede diferenciar entre radiación ambiente exterior diurna, proveniente del sol, la radiación ambiente exterior nocturna y radiación ambiente interior en las que la radiación, menos intensa, proviene de fuentes artificiales de luz. La energía solar radiante se crea en el núcleo del sol gracias al ciclo constante de fusión de cuatro núcleos de hidrógeno para formar un núcleo de helio. Esta fusión genera una gran cantidad de energía que antes de llegar a la superficie terrestre, se filtra en las diferentes capas de la atmósfera^{72,73}. Las moléculas de aire, los aerosoles, otros gases, las gotas que componen las nubes y los cristales de hielo interfieren con la radiación solar de diferente manera, dando lugar a fenómenos de refracción y absorción. Las moléculas de aire son las responsables de los fenómenos de dispersión, mientras que los

aerosoles no solamente dispersan, también son capaces de absorber radiación, principalmente el agua (gaseosa o líquida), el ozono, el oxígeno y el dióxido de carbono. El oxígeno absorbe parcialmente luz de la zona visible del espectro, y el agua y el dióxido de carbono tienen bandas de absorción en el rango del infrarrojo. Las moléculas de ozono tienen especial importancia ya que son capaces de absorber radiación solar del espectro visible y del UV. Bloquean la radiación perteneciente al UV-C (100 a 280 nm), y atenúan el paso de las radiaciones UV-B (280 a 315 nm) y UV-A (315 a 400 nm), así como otras longitudes de onda del espectro visible. La desaparición de la capa de ozono tiene un efecto directo en la salud ocular humana, ya que, al disminuir la cantidad de ozono, aumenta la cantidad de radiación UV que llega a la superficie terrestre^{74,75}. Según la OMS, los efectos agudos de la sobreexposición a luz UV son principalmente fotoqueratitis y fotoconjuntivitis, por lo general reversibles. Los efectos crónicos incluyen el desarrollo de pterigium, desarrollo de algunos tipos de cánceres oculares y cataratas, así como daños en la retina^{76,77}.



Figura i.12. Iluminación artificial de diferentes ambientes cotidianos.

La energía radiante del EEM que llega a la superficie ocular es la que resulta de todos estos procesos atmosféricos, además de las transformaciones ambientales que se dan en ella una vez ya en la superficie terrestre. Se diferencia, a la hora de cuantificarla, entre radiación directa, difusa y reflejada. La directa es la que proviene perpendicularmente de la fuente, en este caso el sol. La radiación difusa es la recibida de la atmósfera como consecuencia de los fenómenos explicados anteriormente y representa un porcentaje variable de la directa dependiendo del estado atmosférico (días soleados puede ser un 15%, días nublados un porcentaje mayor). La radiación reflejada es aquella que sufre fenómenos de reflexión en la superficie terrestre y su cantidad depende del material en el que incide y su coeficiente de reflexión, también llamado albedo.

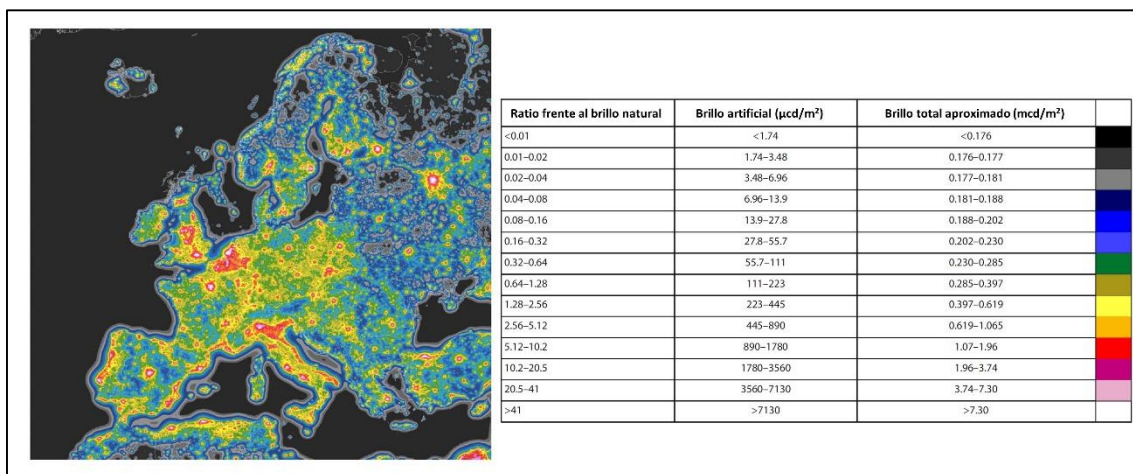


Figura i.13. Mapa europeo de contaminación lumínica. En este mapa se muestra el brillo artificial del cielo, medido como la ratio frente al brillo natural del cielo (asumido como $174 \text{ mcd}/\text{m}^2$). La tabla adjunta relaciona los valores con los colores del mapa. Imagen adaptada de “The new world atlas of artificial night sky brightness. PMID:27386582”.

La radiación proveniente de fuentes de luz artificiales tiene una composición espectral diferente a la solar. Esta radiación, que se genera por diversos procesos ya explicados, puede ser también radiación directa, difusa o reflejada⁷⁸. Cuando nos referimos a la iluminación artificial especialmente en espacios abiertos, toma importancia el concepto de contaminación lumínica. Se entiende por contaminación lumínica la alteración de la oscuridad natural del medio nocturno producida por la emisión de luz artificial⁷⁹. Según la definición aceptada por el Vocabulario Internacional de Iluminación de la Comisión Internacional de la Iluminación (CIE) la contaminación lumínica es un término genérico que recoge la suma total de todos los efectos adversos de la luz artificial. La contaminación lumínica es uno de los problemas ambientales más acuciantes especialmente en los medios urbanos de los países desarrollados debido principalmente al alumbrado nocturno de los espacios exteriores⁸⁰. Presenta un alto impacto negativo tanto en los ecosistemas como directamente en la salud humana^{77,81}. Los mapas

globales de contaminación lumínica muestran como no existe ninguna zona del territorio español desprovista de luz artificial parásita en la atmósfera (figura i.13). Esta contaminación lumínica junto con la exposición habitual y prolongada a iluminación interior artificial da como resultado la exposición casi permanente a las particulares radiaciones provenientes de estos tipos de fuentes de luz.

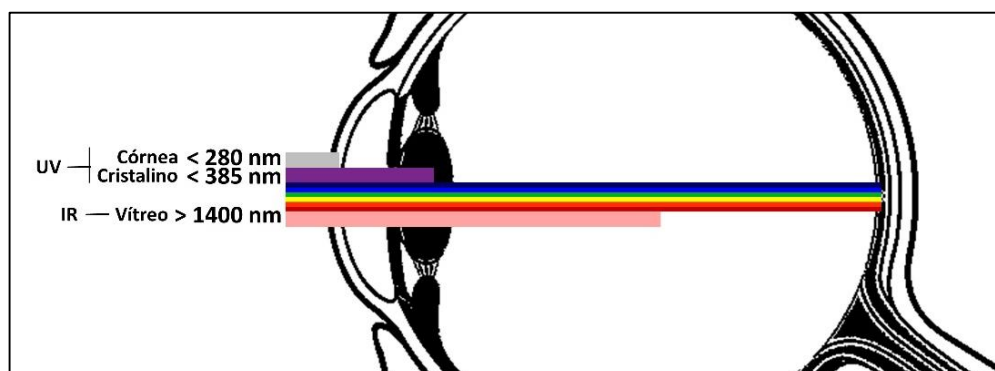
Cuando cualquier tipo de radiación entra en contacto con la superficie ocular, suele ser principalmente radiación difusa, y de nuevo sufre una serie de transformaciones al atravesar diferentes estructuras oculares, que implican procesos de reflexión, refracción y absorción.

b.2.1. Luz, córnea y medios oculares.

La córnea es la primera estructura ocular del eje visual que entra en contacto con la radiación ambiente. Posteriormente, la luz atraviesa el humor acuoso, el cristalino y el vítreo. Parte de la energía pasa a lo largo de las estructuras sin sufrir modificación, para llegar a la retina y participar en el proceso de la formación de imágenes. Otra parte de esa energía se dispersa, dando lugar a la iluminación general del ojo. Otra parte es absorbida y reirradiada y una pequeña cantidad puede ser reflejada por las superficies que separan medios con diferente índice de refracción, principalmente en la córnea. El estudio aislado de estas estructuras muestra el siguiente resultado⁸²⁻⁸⁸:

- Córnea: en ella no existe transmitancia de radiación por debajo de 280 nm, pero a partir de 300 nm la transmitancia corneal aumenta de manera drástica hasta casi un 80% a 380 nm, siendo superior al 90% desde los 500 hasta los 1300 nm. Aparecen dos bandas

Figura i.14. Diagrama de las longitudes de onda que atraviesan las diferentes estructuras oculares. Se observa en este diagrama, cómo las radiaciones inferiores a 280 nm son filtradas por la córnea y las inferiores a 385 nm no traspasan el cristalino. De la misma manera, las radiaciones superiores a 1400 nm son absorbidas en el humor vítreo.



de absorción relacionadas con el agua a 1430 y 1950 nm, pero la transmisión entre esas bandas sigue siendo muy alta.

- Humor acuoso: comienza a presentar transmitancia a partir de los 220 nm y continúa hasta los 2400 nm. Presenta una banda muy fuerte de absorción en los 265 nm en la zona del ultravioleta, y su transmitancia en el infrarrojo se ve disminuida por ciertas bandas de absorción del agua a 980, 1200, 1430 y 1950 nm.
- Cristalino: aunque su transmitancia comienza en los 300 nm, presenta una banda de absorción a 360 nm que reduce la transmitancia a valores muy bajos hasta los 390 nm. El cristalino, al ser una estructura ocular que con el tiempo modifica sus características ópticas, acumulando depósitos de proteínas y cromóforos que llevan implícito un cambio en la transmitancia de la luz con el paso del tiempo. Así, en niños, la transmitancia comienza en los 300 nm, mientras que en individuos jóvenes comienza a partir de los 390 nm y alcanza el 90% en los 450 nm. Con el paso del tiempo, el incremento de la transmitancia se vuelve menos eficaz y más lento, de manera que puede comenzar en 400 nm y no alcanzar el 90 % hasta los 540 nm, presentando también mayores fenómenos de dispersión. Igualmente ocurre en la zona del infrarrojo, donde un cristalino joven tiene una transmitancia del 88% a 700 nm mientras que en un individuo anciano rondaría el 40%. Por lo general, la transmitancia en el infrarrojo es buena, mostrando únicamente las típicas bandas de agua ya citadas en el humor acuoso.
- Humor vítreo: transmite desde los 300 nm hasta los 1400 nm. La transmitancia en el UV aumenta rápidamente desde los 350 nm, siendo su transmitancia total en el rango del visible mayor al 90%.

El estudio en conjunto de las transmitancias aisladas da lugar a la transmitancia total del eje visual completo hasta la retina⁸⁹ (figura 1.14).

b.2.2. Luz y retina. Fototransducción y fotorreceptores.

La radiación que llega a la retina tras haber sido modificada en el resto de estructuras oculares está, de manera general en individuos jóvenes, entre los 380 y los 1400 nm (exceptuando las bandas de absorción del agua de 980 y 1200 nm). La retina humana absorbe como promedio 10^{12} a 10^{15} fotones en un día, pero este promedio puede ser incrementado según la exposición a la que se someta al sistema visual durante actividades bajo condiciones de alta luminosidad. La cantidad de luz que llega a la retina varía con la edad debido a los cambios en el cristalino que

implican una mayor absorción de longitudes de onda cortas. Los fotones que llegan a la retina interactúan con diferentes moléculas, y dependiendo de la longitud de onda y su energía, el tipo de molécula en la que incidan y su localización, pueden tener un efecto fotodinámico (desencadenando diferentes procesos biológicos) o fluorescente^{90,91}.

Fototransducción y fotorreceptores.

El proceso de la visión se puede dividir en cuatro fases:

- Percepción: la luz entra en el ojo principalmente atravesando estructuras transparentes (córnea, humor acuoso, cristalino y humor vítreo) hasta la retina.
- Fototransducción: la energía luminosa que llega a la retina se transforma en impulsos nerviosos.
- Transmisión: los impulsos nerviosos inician su camino a través del nervio óptico hasta la corteza cerebral.
- Interpretación: en la corteza cerebral se interpretan los impulsos, se reconocen y se procesan para formar las imágenes finales.

La acomodación, la visión cromática, la adaptación a la oscuridad, la visión binocular o la visión periférica, son otras de las funciones visuales necesarias para la optimización del proceso.

La fototransducción, consistente en la transformación de la señal luminosa en señal eléctrica, se realiza en los segmentos externos de los fotorreceptores. Existen diferentes tipos de compuestos en las células que por su estructura química son capaces de absorber luz y por lo tanto son susceptibles a modificaciones por parte de la misma, pero no todos ellos desencadenan el mismo tipo de reacciones bioquímicas. En el caso de los fotorreceptores, al recibir el impacto de un fotón, se produce la isomerización del cromóforo de los fotopigmentos, 11-cis-retinal (vitamina A), unidos a proteínas G. Ello desencadena una reacción con la intervención de segundos mensajeros, así como un gran número de proteínas que controlan la apertura y el cierre de canales iónicos en la membrana plasmática. Estos canales permiten la entrada y salida de iones Na^+ y Ca^{2+} lo cual determina su despolarización o hiperpolarización dando lugar a la liberación o retención de neurotransmisores en el terminal sináptico situado en la parte opuesta a los segmentos. El pigmento sensible en los segmentos externos de los bastones es la rodopsina, proteína que presenta una mayor sensibilidad a las longitudes de onda cercanas a 500 nm, y encargados de la visión escotópica, en condiciones de baja luminosidad.

En los conos, las moléculas fotosensibles son las opsinas. Cada fotorreceptor de tipo cono contiene únicamente un tipo de los siguientes: eritropsina, pigmento excitado por longitudes de onda largas; cloropsina, sensible a longitudes de onda medias o cianopsina, específica para las longitudes de onda cortas. Los segmentos externos de los bastones están formados por una acumulación de discos membranosos apilados y rodeados por la membrana celular. En los conos, los discos están formados por repliegues de la propia membrana plasmática. En ambos, en la parte interna existe una región en la que se localiza un cilio conector, la cual sirve de paso de vesículas entre el segmento externo y el interno. En el segmento interno se diferencian dos partes: el elipsoide y el mioide. En el elipsoide existe una gran acumulación de mitocondrias, mientras que en el mioide se localizan las estructuras de síntesis de proteínas. La existencia de ese compartimento específico lleno de mitocondrias se debe a que los fotorreceptores presentan una elevada actividad metabólica que demanda altos niveles de energía y de oxígeno. Los fotorreceptores se comportan en su parte basal como neuronas, liberando glutamato como neurotransmisor en su terminal axónico. Realizan sinapsis con las células bipolares y éstas, a su vez, conectan con las CGR que conforman el nervio óptico. La complejidad y alta especialización de los fotorreceptores, así como su alto consumo energético y la gran cantidad de proteínas que intervienen para su funcionamiento óptimo, hacen que los fotorreceptores estén predispuestos a padecer enfermedades provocadas por causas ambientales o por mutaciones genéticas, que pueden dar lugar a disfunciones visuales o incluso ceguera^{92,93}.

Además de conos y bastones, existen otras células fotorreceptoras en la retina, las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles (ipCGR)⁹⁴. Estas células son sensibles a la luz, ya que presentan un pigmento llamado melanopsina, y son responsables de la regulación del reloj circadiano (el ritmo día/noche) del cuerpo. En este caso, la activación de las ipCGR da lugar a una señal que viaja por el nervio óptico hasta el ganglio cervical superior, y finalmente llega al núcleo supraquiasmático por medio del tracto retino-hipotalámico hasta la glándula pineal del cerebro. Esta señal por lo tanto no tiene respuesta visual, sino que se relaciona con la respuesta fisiológica y metabólica frente a las condiciones lumínicas externas.

b.3. Efecto biológico de la luz. Interacción con la mitocondria.

El efecto biológico de la exposición a diferentes radiaciones es amplio y diverso y depende de numerosos factores relacionados con la fuente de la radiación, principalmente de la intensidad o irradiancia y la forma de emisión de la fuente de luz, así como de la composición del EEM generado.

La forma de emisión de la radiación electromagnética puede ser constante o presentar fluctuaciones, el denominado *flicker* o parpadeo, que también puede provocar reacciones de fotosensibilidad, independientemente de la composición del espectro generado⁹⁵⁻⁹⁷. Este parpadeo se puede producir por la interferencia constante de la luz emitida por cualquier fuente con otros objetos y una cadencia concreta (por ejemplo, la interacción de la luz solar con los árboles a los lados de una carretera durante un viaje en coche), y tiene especial relevancia en ciertas fuentes artificiales de luz eléctricas, ya que es una característica intrínseca de las mismas. Una fuente conectada a una corriente eléctrica, puede alimentarse de forma continua o alterna. La corriente continua no tiene oscilaciones, manteniendo su voltaje y emisión fijos, pero en las corrientes alternas, en las que se produce un cambio constante de polaridad, las oscilaciones alcanzan un valor que ronda los 50 Hz. Ello se traduce en un parpadeo constante, en la mayoría de los casos imperceptible, que, aunque se mitiga con dispositivos electrónicos acoplados a las lámparas, no desaparece por completo. La exposición a este parpadeo puede tener consecuencias biológicas de diferente magnitud, como dolores de cabeza, afectación de la visión, y siendo capaz de desencadenar crisis epilépticas en pacientes con epilepsia fotosensitiva^{98,99}.

La intensidad con la que las radiaciones alcanzan los tejidos es otro factor de daño independiente de la composición de la misma. Es decir, tanto las radiaciones de longitud de onda corta, como las longitudes de onda larga dentro del EEM de la luz, pueden tener efectos perjudiciales o beneficiosos dependiendo de su intensidad o irradiancia. Altas intensidades pueden producir daños fototérmicos o fotomecánicos. El daño fototérmico ocurre por la transferencia fotones de la luz al tejido. Un fotón puede ser absorbido por una molécula, sólo si su energía es equivalente a la diferencia del estado energético de la molécula en ese momento y su posible estado de excitación máximo permitido por su composición. Especialmente en el caso de longitudes de onda largas, prevalecen los estados vibracionales y rotacionales sobre el estado de excitación. Este incremento en la energía cinética es disipado por colisión de unas moléculas con otras, lo cual provoca un aumento de temperatura. La capacidad de la luz de provocar un incremento de la energía cinética es inversamente proporcional a la longitud de onda, y directamente proporcional a la irradiancia de la misma. El daño fotomecánico hace referencia a aquel que se produce por las fuerzas compresivas o tensiles generadas por la introducción rápida de energía en las células. Se suele producir en el caso de la exposición a altas irradiancias en periodos cortos de tiempo y se deben a que la introducción de enormes cantidades de energía ocurre con mayor rapidez que el tiempo de relajación necesario para que las moléculas mitiguen el estrés mecánico producido por la expansión termoelástica. Esto da

lugar a la formación de burbujas de microcavitación y ondas de choque que causan daños permanentes en los tejidos.

Existe un tercer tipo de daño, denominado daño fotoquímico, relacionado con la longitud de onda incidente en los tejidos. Este tipo de daño es el que se desencadena por los radicales libres generados tras la exposición principalmente a longitudes de onda corta del espectro visible, intensas energéticamente⁹⁸.

No todos los efectos son dañinos, obviamente. Cuando las condiciones son las adecuadas, los efectos sobre la salud humana de la exposición a radiaciones del EEM son beneficiosos en muchos sentidos, ya que participan en procesos de regulación del sistema inmune, regulación de la producción hormonal, síntesis de vitaminas, de endorfinas¹⁰⁰⁻¹⁰²...

Interacción de la luz con la mitocondria.

Las mitocondrias tienen un gran número de cromóforos que pueden absorber luz de diferentes longitudes de onda. Moléculas como las flavinas y las proteínas COX de la cadena de transporte de electrones, involucradas en la producción de ATP, son capaces de absorber luz. Estudios de la capacidad de absorción de luz por células tumorales en el espectro del UV/verde al rango del rojo demostraron que la absorción era igual que la detectada por mitocondrias aisladas. Este resultado, llevado a las neuronas del SNC ricas en mitocondrias, tiene extrema importancia en el sistema visual, ya que sus neuronas son las únicas del cuerpo expuestas directamente a la luz. Además de las neuronas, hay que tener en cuenta que la córnea, que ha de mantener su transparencia, está igualmente expuesta a las radiaciones externas como la piel, pero carece de pigmentos que la atenúen.

La enzima COX que contiene porfirina tiene una absorción máxima de radiación del espectro visible en los 400-410 nm¹⁰³ y también presenta absorción en la parte roja del espectro tanto en su forma reducida como oxidada (Bell Hall 1981). La porfirina es un grupo prostético compuesto por un anillo tetrapirrólico con sustituyentes laterales y un átomo metálico en el centro, unido mediante cuatro enlaces de coordinación. Los tripletes de porfirina formados por la absorción de fotones puede dar lugar a la formación de singletes de oxígeno y EROs¹⁰⁴. Además de en la enzima COX, existen porfirinas en la membrana mitocondrial interna susceptibles a la radiación^{105,106}. El citocromo P450, otra enzima mitocondrial, absorbe radiación alrededor de los 450 nm cuando está unida a monóxido de carbono¹⁰⁷. Las flavinas como la riboflavina (vitamina B₂) y los nucleótidos flavoproteína son componentes esenciales de varios sistemas enzimáticos

tanto citosólicos como mitocondriales. Su espectro de absorción se encuentra entre los 450 y los 520 nm y cuando se activan, producen la oxidación de diferentes sustancias y la generación de peróxido de hidrógeno^{108,109}.

b.3.1. Longitudes de onda cortas.

Existen gran cantidad de estudios en los que se muestra que la exposición de células y tejidos a luz de longitudes de onda cortas, luz azul, provoca una disminución de la producción de ATP e incrementa la cantidad de EROs producidos, ambas características típicas asociadas al estrés oxidativo¹¹⁰⁻¹¹⁴ y a la actividad mitocondrial (figura 1.15). Como consecuencia, se desencadenan eventos celulares que pueden llevar a procesos de muerte celular como apoptosis y necroptosis¹¹⁵. La exposición a luz azul también causa fragmentación del DNA¹¹⁰ y posiblemente la activación de la caspasa-3^{110,111,114}, así como la activación también de proteínas asociadas a Bcl-2¹¹⁴, iniciando cascadas de muerte celular. En algunos estudios no se han encontrado evidencias de la activación de la caspasa-3, y los inhibidores de caspasas no fueron eficaces bloqueando la muerte celular desencadenada por la exposición a luz de longitud de onda corta^{114,116,117}, lo cual puede deberse a las características concretas de las fuentes de luz utilizadas, la duración y la intensidad del daño.

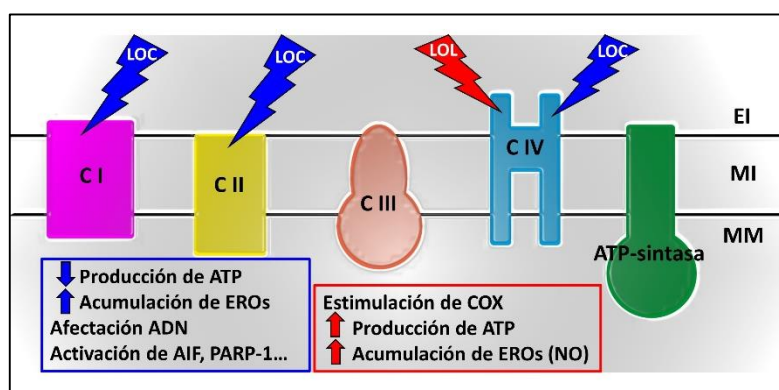


Figura i.15. Lugar de actuación y efecto de las longitudes de onda cortas y largas en la cadena de transporte de electrones. Se observa en el diagrama las dianas mitocondriales descritas sobre las que actúan las longitudes de onda cortas (LOC) y las largas (LOL).

b.3.2. Longitudes de onda largas.

Los efectos beneficiosos de la exposición a luz de longitudes de onda largas del rojo lejano y del infrarrojo cercano (630 a 1000 nm) se han descrito para diversas dolencias. Entre los efectos

positivos de la exposición a luz roja se encuentran la mejora de la cicatrización, la propagación del complemento y la reducción del estrés oxidativo, la inflamación y la muerte celular¹¹⁸⁻¹²¹, así como la mejora de la velocidad de recuperación de los daños en tejidos blandos y los infartos de miocardio^{122,123}. En el ojo, la luz roja protege a los fotorreceptores frente a procesos de muerte celular¹²⁴⁻¹²⁷, mejora lesiones producidas por retinopatía diabética^{128,129}, reduce el daño dendropático de enfermedades como glaucoma¹³⁰ y mitiga la degeneración producida por la privación de oxígeno en la retina¹³¹.

La acción precisa por la cual la luz de longitudes de onda larga es capaz de producir estos efectos beneficiosos no se sabe aún con claridad. Las evidencias de estudios hasta la fecha apuntan a que la interacción de la luz roja con cromóforos mitocondriales, particularmente la enzima COX, producen un aumento en la cantidad de ATP generado en las células, y quizá un aumento moderado de EROs, incluyendo el óxido nítrico, y su consecuente efecto en el ADN (figura i.15). De esta manera, se inducen varias vías de señalización intracelulares y diversos factores de transcripción. La luz roja tiene además la capacidad de penetrar en los tejidos a diferentes profundidades dependiendo de su intensidad, siendo capaz de mejorar lesiones traumáticas cerebrales¹³² e inducir regeneración nerviosa en el SNC¹³³ así como proteger frente al daño neuronal *in situ*^{134,135}.

Justificación

Justificación

La visión es una de las principales capacidades sensoriales del cuerpo humano. Para que se lleve a cabo, además del procesamiento cerebral posterior, es necesaria la percepción de estímulos concretos. Esta percepción conlleva la interacción de la radiación de una fracción concreta del espectro electromagnético, denominada luz visible, con los receptores sensoriales de la retina. Existen diferentes enfermedades oculares que disminuyen la calidad de la visión o que la impiden por completo. Dentro de ellas, tienen especial relevancia en el desarrollo de este trabajo las relacionadas con la córnea y la retina.

Más del 80% de los casos de disfunción o discapacidad visual se podrían evitar o curar, por lo que el estudio de posibles factores de riesgo, así como la búsqueda de terapias para paliar y/o detener el deterioro de la función visual, es una prioridad de los sistemas de salud. Problemas de cicatrización corneal y ciertas disfunciones endoteliales son causa del mal funcionamiento visual del polo anterior, así como en la retina el desarrollo de enfermedades, especialmente las crónicas y degenerativas que afectan a diferentes tipos celulares del polo posterior. Tanto en la córnea como en la retina, debido a la alta especialización de los tejidos, se encuentran tipos celulares con altos requerimientos energéticos. En el caso de la córnea, las funciones tanto del epitelio como del endotelio requieren consumos energéticos altos, mientras que, en la retina, la mayoría de los tipos celulares son neuronales, con altos consumos de ATP requeridos para las funciones metabólicas relacionadas con el procesamiento de la radiación.

El ATP celular se genera mayoritariamente en la cadena de transporte de electrones las mitocondrias, por lo que estos tipos celulares con altos requerimientos son ricos en estos orgánulos. Además, son las únicas células expuestas a la radiación electromagnética sin la protección de cromóforos, ya que la córnea ha de mantenerse transparente. En el caso de la retina, son las únicas neuronas del sistema nervioso central expuestas a la radiación lumínica directa. Por lo tanto, las mitocondrias de estos tipos celulares, capaces de absorber luz gracias a ciertas proteínas que componen la cadena de transporte de electrones entre otras estructuras, están expuestas al espectro de la luz visible que tiene diferentes efectos sobre ellas.

La luz visible comprende un amplio rango de longitudes de onda que se identifican con los diferentes colores. Estas longitudes de onda van en aumento desde las más cortas que se corresponden con los tonos violetas-azulados hasta las longitudes de onda más largas del

espectro visible que se identifican con los tonos rojizos. Las longitudes de onda de menor longitud de onda, y por lo tanto mayor frecuencia, son capaces de desencadenar situaciones de estrés oxidativo en las células, incrementando el número de radicales libres y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno. Cuando los sistemas antioxidantes no son suficientes para restaurar el equilibrio celular, se desencadenan señales intracelulares que inician rutas de muerte celular. Por el contrario, las longitudes de onda larga se relacionan con un aumento de la función mitocondrial y un incremento en la producción de ATP celular.

Actualmente, en los países desarrollados nos encontramos diariamente sometidos a la exposición a radiaciones artificiales provenientes de diferentes tipos de lámparas que, en busca de la eficiencia energética, han evolucionado generando dispositivos con menor emisión en el rango del rojo/infrarrojo y mayor emisión en la zona azul-violeta del espectro.

Por ello, el estudio del efecto de la exposición de diferentes estructuras oculares a radiación del rango del visible del espectro electromagnético de la luz generado por fuentes de luz naturales y artificiales, es de gran importancia para valorar el impacto biológico de las mismas. Además, en tipos celulares cuya función mitocondrial se haya podido ver afectada por el transcurso de ciertas enfermedades, puede que sea crucial controlar la cantidad y composición de la energía que llega a esos tejidos afectados. Por lo tanto, la modulación de la cantidad y composición de la radiación lumínica que llega a las estructuras oculares, puede suponer un nuevo modelo de terapia avanzada no invasiva de gran utilidad en ciertas enfermedades oculares.

Hipótesis

Hipótesis

La exposición de los tejidos oculares a determinadas longitudes de onda e irradiancias genera distintas respuestas biológicas de daño o protección celular a través de modificaciones mitocondriales. Estos efectos biológicos, tanto citoprotectores como perjudiciales, pueden ser incrementados en condiciones de daño celular inducido.

Objetivos

Objetivos

Los objetivos que se plantean para el desarrollo de esta tesis doctoral incluyen el estudio de:

1. los efectos sobre las mitocondrias y su repercusión celular *in vitro* de la exposición a longitudes de onda cortas o largas del espectro visible de la luz en líneas celulares con la función mitocondrial modificada y en modelos de cultivos primarios de neuronas,
2. los procesos de cicatrización *in vitro* de células de epitelio corneal expuestas a diferentes tipos de radiaciones del espectro visible,
3. el efecto *in vitro* e *in vivo* de las longitudes de onda largas en un modelo de disfunción del endotelio corneal,
4. los efectos en la retina, *in vitro* e *in vivo*, de la exposición a radiación de diferentes longitudes de onda en presencia o ausencia de daño,
5. el efecto *in vitro* sobre células de epitelio pigmentario de la retina de la exposición a longitudes de onda cortas y/o larga,
6. las características de diferentes fuentes de luz y su interacción con lentes intraoculares,
7. el diseño y la aplicación de filtros construidos con materiales nanoluminiscentes para su uso en oftalmología
8. y la influencia de diferentes radiaciones en la microbiota ocular.

Material y método

Material y método

En esta sección se exponen de forma genérica los animales, material y método empleados en los experimentos llevados a cabo para el desarrollo de esta tesis doctoral. Posteriormente, en cada capítulo, se explicará el desarrollo experimental de cada ensayo particular.

a. Animales.

Todos los experimentos llevados a cabo con animales se realizaron según las normas del ARVO *Statement for the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research*. Los proyectos redactados para el empleo de animales, así como los métodos descritos en ellos, incluyendo los empleados para la anestesia y eutanasia, fueron aprobados por el Órgano habilitado para ello, el Comité de Ética de la Universidad de Oviedo (Principado de Asturias). Los animales empleados para todos los estudios fueron ratas *Wistar*, línea albina de rata parda. Se utilizaron machos de entre 9 y 11 semanas de edad, que se mantuvieron en condiciones de temperatura ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad (50-70%) constantes y bajo un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum*. En todos los experimentos que requirieron sedación, los animales fueron anestesiados con una mezcla de Ketamina/Xilacina. La proporción empleada fue de 80/10, 80 mg/kg de ketamina Imalgene® 1000 (Merial-Boehringer Ingelheim, Rhein, Alemania) y de 10 mg/kg de xilacina Rompun® (Bayer, Leverkusen, Alemania). Para evitar la bajada de la temperatura corporal, en todos los procedimientos se tuvo a los animales con un sistema de calentamiento. La anestesia tópica ocular empleada en los procedimientos fue el Colircusi® anestésico doble (Alcon Cusí, Novartis, Basilea, Suiza), mezcla de tetracaína y oxibuprocaína. Se administraron dos gotas por ojo antes del comienzo de los procedimientos. Para el mantenimiento de la hidratación corneal a lo largo de los experimentos, se empleó hidroxietilcelulosa, Goniotal® (Alcon, Novartis, Basilea, Suiza). En los casos en los que se observaron signos de dolor leve tras la realización de los procedimientos, se administró paracetamol efervescente, Efferalgan® (UPSA, Garonne, Francia) en el agua de bebida a una concentración de 1 mg/mL. En los casos en los que los procedimientos pudieron generar dolor severo, se utilizó buprenorfina Bupaq® (Richter Pharma, Wels, Austria) por inyección subcutánea cada 24 horas a una concentración de 0.1 mg/Kg como analgésico. El sacrificio de los animales

se realizó bien mediante aturdimiento y decapitación, o mediante inyección intracardiaca de pentobarbital sódico, Dolethal® (Vetoquinol, Lure, Francia).

Incremento de la PIO en cámara anterior. Inducción de isquemia.

Para la realización de la isquemia en el polo posterior ocular se inmovilizó al animal, previamente anestesiado, con la ayuda de un marco de estereotaxia para roedores. Acoplado a este marco, se colocó un dispositivo con un reservorio de solución para perfusión glucosalina Plast Apyr® (Fresenius Kabi, Barcelona, España). El reservorio se situó 190 cm por encima del marco estereotáxico y se conectó con un tubo plástico de 0.5 cm de diámetro con un regulador, conectado a su vez con una aguja hipodérmica de 0.5 x 16 mm, 25 G (BD Microlance™, Eysins, Suiza). La presión del líquido a la salida de la aguja se calculó de forma teórica con la siguiente fórmula:

$$\Delta P = d \cdot g \cdot \Delta h$$

donde P es la presión, d la densidad de la solución (1.005 kg/m³), g la gravedad (9.81 m/s²) y h la altura (1.9 m). El valor teórico calculado, expresado en las unidades internacionales de medida de presión fue 18732.2 Pa, equivalentes a 140.52 mm de Hg. La medida de los valores de PIO en animales control fue de 8.97 ± 1.5 que se incrementó hasta los 85.24 ± 2.3 mm de Hg (medida expresada como promedio ± desviación estándar para un n = 71). El incremento medio de presión fue por lo tanto de 76.27 ± 2.9 mm de Hg. En todas las ocasiones, se canuló la cámara anterior del ojo derecho de las ratas sometidas al proceso isquémico con la aguja conectada al reservorio, aumentando así la presión ocular (figura m.1). Una vez canulado el ojo, se aplicó en ambos ojos

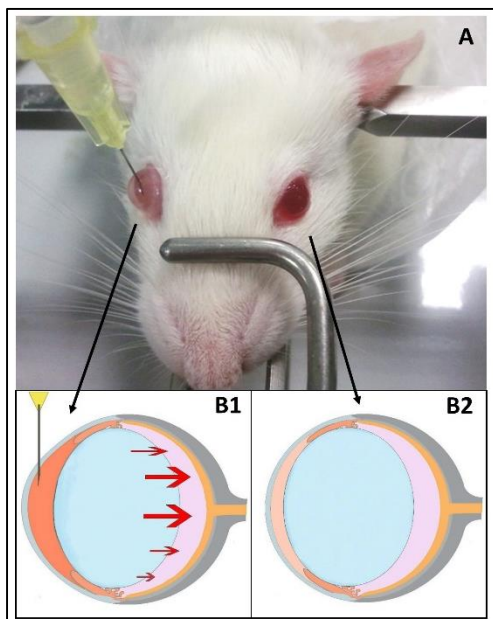


Figura m.1. Imagen de rata con el ojo derecho canulado en el proceso isquémico y diagrama de su efecto. En la imagen A se observa una rata anestesiada, inmovilizada en un marco estereotáxico, con su ojo derecho canulado en la cámara anterior. La cánula está conectada a un reservorio de suero que aumenta por presión la cantidad de líquido en dicha cámara. En la imagen B1 se ve un diagrama del efecto del aumento de volumen que produce una presión en el polo posterior, frente al diagrama de un ojo normal en la imagen B2.

una capa de Gonioftal® para evitar la desecación de la córnea. Tras mantener el ojo con el incremento de presión durante 60 minutos en diferentes condiciones experimentales que se explicarán más adelante, se procedió a retirar la aguja permitiendo de nuevo el flujo de sangre. Este procedimiento se empleó en los capítulos III y IV.

Escalado de datos. Intensidad de la luz en la retina.

Para el cálculo de las intensidades de luz necesarias para el escalado de los modelos *in vitro* a los modelos *in vivo*, se utilizaron ojos de cerdo extraídos *post mortem* y facilitados por el Matadero Central de Asturias Noreña (Oviedo, Asturias). En estos ojos se realizó una incisión en la parte central del polo posterior, para recortar un área de aproximadamente 1 cm² de tamaño. Evitando en la medida de lo posible la pérdida de humor vítreo, se procedió a medir la cantidad de luz recogida a través de ellos, comparada con la luz ambiente que alcanzaría la primera capa de la córnea únicamente. Los resultados fueron empleados en los experimentos del capítulo IV.

Procesamiento de los ojos. Recuento del número de células ganglionares.

El procesamiento de las diferentes estructuras oculares tras su enucleación siguió diferentes protocolos, según la técnica para la que fue su extracción:

- Para la medida de ciertos parámetros, como la actividad mitocondrial, las córneas de los ojos recién enucleados fueron incubadas en medio de CECs con el reactivo JC-1 (2 µg/mL) durante 30 minutos y posteriormente observadas bajo el microscopio de fluorescencia.
- Para los análisis por *Western Blot* o RT-PCR, se emplearon las soluciones de lisis tamponadas (ver sección WB / RT-PCR respectivamente).
- Para la inmunohistoquímica, los ojos enteros, copas del polo posterior o bien córneas diseccionadas, fueron incubados en paraformaldehído al 4% durante 90, 45 o 20 minutos, respectivamente, en agitación. Posteriormente se incubaron en un gradiente de sacarosa (sacarosa al 10% 60 minutos, 20% 60 minutos y al 30% toda la noche) a 4°C. Al día siguiente los ojos fueron incluidos en medio OCT (Tissue Tek Sakura, 4583) y criopreservados a -80°C hasta su uso, bien *in toto* o bien para hacer secciones.

- Para el recuento de CGR, tras la fijación con paraformaldehído y los lavados con PBS, se utilizó NaBH_4 al 0.025% durante 2 minutos en agitación manual para eliminar la autofluorescencia del tejido, seguido de varios lavados con PBS.

b. Cultivos celulares.

Durante el desarrollo de esta tesis doctoral se utilizaron diversas líneas celulares comerciales, así como varios cultivos primarios obtenidos a partir de animales de experimentación. Todos ellos se mantuvieron en atmósfera húmeda a 37°C y con una concentración de 5% de CO_2 . Los tipos celulares utilizados, todos ellos adherentes, y sus condiciones particulares fueron los siguientes (figura m.2):

- BJhTERT / Rho0. La línea BJhTERT y su modificación Rho0 fueron cedidas por Sandra Jackson, del laboratorio del Departamento de Neurología de la Universidad Técnica de Dresden (Dresden, Alemania). Es una línea inmortalizada (metodología hTERT) a partir de fibroblastos humanos de prepucio de un varón neonato. Las BJhTERT se recibieron en pase 8 y las Rho0 en pase 24. Se utilizaron hasta pases 20 y 30 respectivamente. Ambas líneas se cultivaron en un medio mezcla de DMEM (Gibco, 41966) y Medio 199 *Earle's Salts* (Gibco, 31150) en una proporción 4:1. Dicha mezcla se suplementó con un 10% v/v de suero bovino fetal (FBS) (Gibco, 10270) y antibiótico,

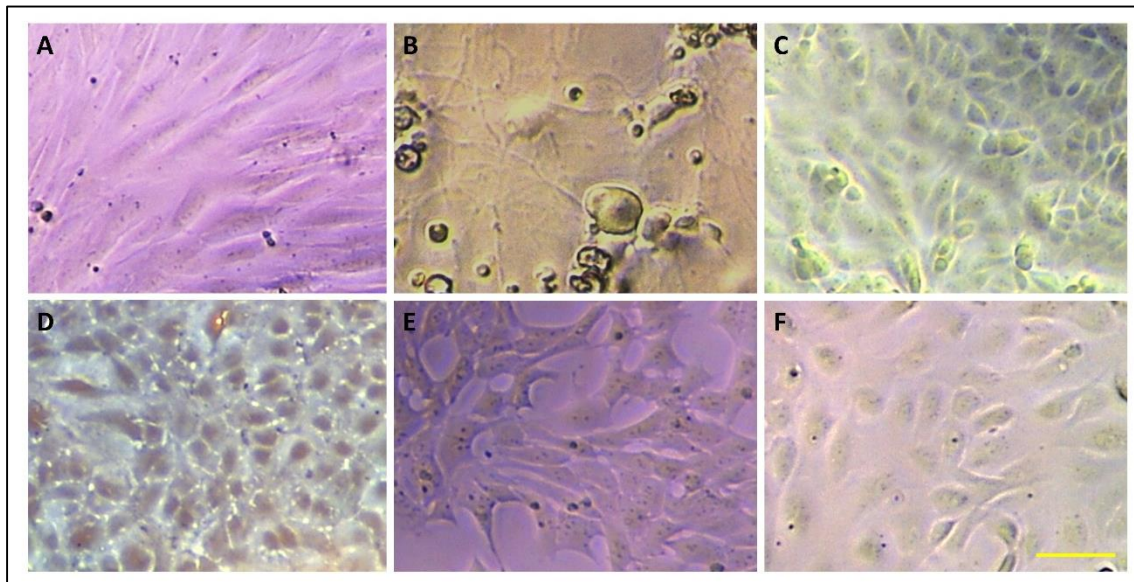


Figura m.2. Fotografías de contraste de fases de diferentes tipos celulares. 5x. Barra de escala: 50 μm . A) fibroblastos BJhTERT, B) cultivo primario de ganglio trigémino, C) línea HCE-2, D) cultivo primario de endotelio corneal, E) línea células R28, F) línea ARPE-19.

penicilina/estreptomicina (100IU/mL) (Gibco, 15140). Además, según el experimento, se suplementó el medio con piruvato de sodio (Gibco, 11360) y uridina (Sigma, U3003) a diferentes concentraciones que se especifican en los estudios llevados a cabo.

-
- Cultivo primario de neuronas del ganglio trigémino. Las neuronas del ganglio trigémino se obtuvieron de ratas *Wistar* macho de entre 9 y 11 semanas siguiendo el siguiente protocolo: una vez anestesiados los animales con la mezcla ya descrita de ketamina/xilacina, se sacrificaron mediante una inyección intracardiaca de 300µL de pentobarbital sódico. Se extrajeron los ganglios trigéminos mediante disección y se colocaron en tubos cónicos de 15mL. Se incubaron 90 minutos a 37°C en medio L-15, Leibovitz (Sigma, L4386), suplementado con un 1% v/v de penicilina/estreptomicina y colagenasa tipo II (Sigma, 9001-12-1) a una concentración final de 0.125% p/v. Una vez transcurrido este tiempo, los trigéminos se disociaron mecánicamente con la ayuda de una pipeta y se centrifugaron 5 minutos a 600 g. Se realizó un lavado del *pellet* con una solución de tampón fosfato (PBS) a temperatura ambiente (RT) y se resuspendió en medio denominado Neurobasal básico. La composición de este medio básico es: Neurobasal A (Life technologies, 10888), 2% v/v de B27 (Gibco, 10889), 2mM de glutamina, 1% v/v de penicilina/estreptomicina, 17.5 µg/mL de uridina, 7.5 µg/mL de 5-fluoro-2'-deoxyuridine (FdU) (Sigma, F0503). La suspensión se sembró en placas de pocillos de diferente tamaño, pre-tratados con polilisina (Sigma, P4707) y laminina (Sigma, L2020), a relación de 1 ganglio trigémino / 10 cm². Los cultivos se incubaron toda la noche en condiciones de oscuridad, a 37°C y con una concentración de un 5% CO₂. Al día siguiente se sustituye el medio Neurobasal básico por el Neurobasal suplementado, cuya composición es la del Neurobasal básico más 50 ng/mL de factor de crecimiento nervioso (NGF) (Sigma, N6009). Los cultivos se mantuvieron viables durante un máximo de 4 días.
- HCE-2. La línea de células HCE-2 de epitelio corneal humano fueron obtenidas de un varón e inmortalizadas con el virus Ad12-SV40. Se adquirió de forma comercial (ATCC® CRL-11135™). Las células fueron cultivadas en un medio DMEM-F12 (Gibco, 31330), suplementado con FBS al 10% v/v, factor de crecimiento epitelial (EGF) (Gibco, PHG0314) a una concentración final de 10 ng/mL, insulina (Sigma, 10908) a una concentración final de 5 µg/mL y como antibiótico al 2% v/v una mezcla comercial de penicilina/estreptomicina (Gibco, 15140). Los cultivos se utilizaron desde pase 26 hasta pase 30.

- Cultivo primario de células de endotelio corneal. Las células de endotelio corneal se obtuvieron de ratas *Wistar* macho de entre 9 y 11 semanas siguiendo el siguiente protocolo: una vez anestesiados los animales con la mezcla ya descrita de ketamina/xilacina, se sacrificaron mediante una inyección intracardiaca de 300µL de pentobarbital sódico. Se extrajeron los ojos y se diseccionaron las córneas. Con la ayuda de un cuchillete, se obtuvieron los endotelios corneales mediante disección mecánica y se colocaron en un tubo cónico de 15 mL. Se incubaron 30 minutos a 37°C en tripsina (Gibco, 25050), añadiendo 250 µL de la misma por cada córnea procesada. Se inactivó la tripsina añadiendo la misma cantidad de medio DMEM, suplementado al 10% v/v de FBS, que de tripsina empleada y se centrifugaron los tubos a 400 g durante 10 minutos. Se resuspendieron los *pellets* en medio para endotelio con la siguiente composición: medio L-15, Leibovitz, FBS 15% v/v, ácido ascórbico (Sigma, A8960) 86.86 ng/mL, 10 ng/mL de EGF (Gibco, PHG0314) y 1% v/v de penicilina/estreptomicina. Las células se sembraron en placas de diferente tamaño para diferentes experimentos, con una relación de 1 córnea / 0.5 cm² y alcanzaron confluencia a los 10 días. Se utilizaron en pase 2 y pase 3.
- R28. La línea R28 es una línea de precursores de retina obtenidos de la neurorretina de una rata postnatal en día 6 e inmortalizados con el adenovirus 12SE1A. Se adquirieron de forma comercial (Kerafast®, EUR201). Se cultivaron en medio DMEM alto en glucosa (Gibco, 41966) suplementado con bicarbonato de sodio 7.5% p/v (Gibco, 25080) a una concentración final de 3.3% v/v, 10% v/v FBS, 1% v/v de aminoácidos no esenciales MEM (Gibco, 11140), 1% v/v de vitaminas MEM (Gibco, 11120), 1% v/v de L-glutamina (Gibco, 25030) y como antibiótico, un 1% v/v de gentamicina (Gibco, 15710).
- ARPE-19. Las células de la línea ARPE-19 tienen como origen el epitelio pigmentario humano de un donante varón y fueron adquiridas comercialmente (ATCC® CRL-2302™). No es una línea inmortalizada, y se puede utilizar hasta 30 pases sin que pierdan sus características diferenciales. Se cultivaron en medio DMEM-F12 (Gibco, 31330) suplementado con FBS al 10% v/v y como antibiótico, un 2% v/v de penicilina/estreptomicina.

Los cultivos fueron tratados con diferentes reactivos, que se enumeran en la siguiente lista (Sigma-Aldrich):

- Rotenona, inhibidor de la respiración en el complejo I mitocondrial (R8875)
- 3NP, inhibidor de la respiración en el complejo II mitocondrial (N5636)
- Antimicina, inhibidor de la respiración en el complejo III mitocondrial (A8674)

- Azida sódica, inhibidor de la respiración en el complejo IV mitocondrial (S2002)
- Oligomicina, inhibidor de la fosforilación mitocondrial en la ATP-sintasa (75351)
- CCCP, inhibidor del complejo IV mitocondrial y agente desacoplador (C2759)
- Cloruro de cobalto, simulador de anoxia (C8661)
- Glutamato, excitotoxicidad (49621)
- Butionina sulfoximina, inhibidor de la enzima γ -glutamylcisteína sintetasa (B2515)

c. Medida de la proliferación y viabilidad celular.

Ensayo de bromuro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio (MTT).

Para la determinación de la viabilidad/proliferación celular se utilizó el ensayo basado en el bromuro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio (MTT) (Sigma, M2128)¹³⁶. En este ensayo, el MTT es reducido por la acción enzimática principalmente de deshidrogenasas mitocondriales, y otras enzimas citosólicas, dando como producto de la reacción la sal formazán. Ésta, es una sal insoluble en agua que cristaliza con color morado.

Para realizar el ensayo, el MTT se disolvió en el medio de cultivo oportuno para tener una concentración final en las células de 0.5 mg/mL y se incubó durante 75 minutos en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y oscuridad. Posteriormente, se retiró el medio y se disolvió el formazán cristalizado con DMSO en agitación durante 10 minutos. Se leyó la absorbancia de la solución en un lector automático de placas a una longitud de onda de 570 nm.

Ensayo de ioduro de propidio (PI).

El ioduro de propidio es un compuesto capaz de penetrar en las células cuyas membranas celulares no están intactas (necrosis y apoptosis tardía), llegando hasta el núcleo celular e intercalándose en el ADN. Se detecta por la emisión de fluorescencia roja ya que en solución acuosa presenta picos de excitación/emisión en 493/636 nm.

Para la realización de la tinción, los cultivos se incubaron en diferentes placas, y se realizaron los tratamientos oportunos. Posteriormente, se cambió el medio a una solución del medio de cultivo específico en la que se añadió PI para obtener una concentración final de 6 μ g/mL. Tras 40 minutos de incubación en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y oscuridad, se retiró el medio y se

hicieron dos lavados con PBS pH 7.4 estéril atemperado. Se realizaron las fotos oportunas en microscopio invertido.

d. Medida de la actividad mitocondrial y estado de oxidación.

Estado de actividad mitocondrial.

Para medir la actividad mitocondrial se utilizó el ensayo JC-1 (ThermoFisher, T3168)¹³⁷. Este ensayo consiste en la utilización de una carbocianina catiónica, excitable a 515 nm, que en su forma monomérica es permeable y se acumula en el citoplasma celular, presentando fluorescencia verde con un pico de emisión a 529 nm. Por su naturaleza molecular, tiene alta afinidad mitocondrial y es incorporada al interior de este orgánulo. Dentro de las mitocondrias activas, se acumula en altas concentraciones, lo cual hace que polimerice y su fluorescencia cambia a rojo, con el pico de emisión en 590 nm.

Para la realización del ensayo en cultivos, las células se sembraron en las placas oportunas, generalmente placas de 48 pocillos, y tras los tratamientos adecuados, se retiró el medio de los pocillos y se sustituyó por el mismo medio indicado para cada tipo celular, conteniendo una concentración final de JC-1 entre 1 y 2 µg/mL, dependiendo del tipo celular. La incubación se llevó a cabo en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y oscuridad durante 30 minutos. Se retiró el medio y se realizaron dos lavados con PBS estéril. Las células fueron analizadas tanto por microscopía como por emisión de fluorescencia en lector de placas.

En el caso de los tejidos, se midió la actividad mitocondrial de endotelio corneal. Para ello, tras el sacrificio del animal, las corneas fueron extraídas y colocadas en medio de cultivo directamente. El medio empleado fue el ya descrito para el cultivo de endotelio corneal, mezcla de L-15, FBS, ácido ascórbico, EGF y penicilina/estreptomicina, conteniendo además una concentración de 1 µg/mL de JC-1. Se incubaron las corneas en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y oscuridad, durante 30 minutos y posteriormente se procesaron para ser colocadas sobre un portaobjetos. Se utilizó un cubreobjetos para aplanar las córneas, y se observaron a microscopio.

Determinación de EROs.

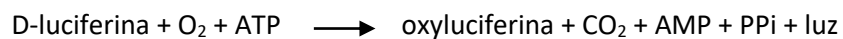
La determinación de EROs se realizó con dihidroetidio (DHE) (ThermoFischer, D1168). Esta molécula es un indicador de la presencia de EROs ya que, en presencia de éstas, se oxida, siendo

entonces capaz de migrar al núcleo celular e intercalarse en la cromatina. Cuando el DHE se encuentra en el citoplasma, presenta fluorescencia azul (excitación a 370 nm y emisión a 420 nm) mientras que en su estado oxidado presenta fluorescencia roja en el núcleo celular (excitación a 535 nm y emisión a 610 nm).

Los cultivos en los que se midió la producción de EROs tras diferentes tratamientos, fueron sembrados en placas generalmente de 48 pocillos y, llegado el momento de realizar el ensayo, se retiró el medio para sustituirlo por el medio del tipo celular del ensayo, con DHE a una concentración de 40 μ M. Se incubaron las placas en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y oscuridad, durante 20 minutos. Las células se observaron directamente bajo el microscopio y fueron también analizadas con un lector de placas.

Determinación de la producción de ATP.

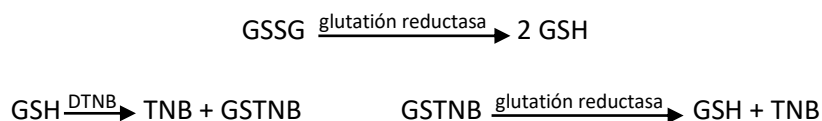
La cuantificación de ATP tanto en células en cultivo como en tejidos, se realizó con el kit ATP *Bioluminescence Assay Kit CLS II* (Roche, 11699695001), siguiendo las instrucciones del mismo. Este kit, preparado para detectar cantidades de ATP en el rango de 10⁻⁶ a 10⁻¹¹ M, se basa en la reacción catalizada por la enzima luciferasa que emite bioluminiscencia como uno de sus productos:



Para los ensayos en cultivos, se sembraron las células en placas de 6 ó 12 pocillos, y se realizaron los correspondientes tratamientos. Posteriormente se levantaron las células del plástico empleando un *scraper* o descamador (Sarstedt, 83.1830) y se centrifugaron (500 g, 5 minutos). Se añadió un tampón de lisis (50mM fosfato, pH 6,5) con EDTA 1mM, previamente calentado a 100°C y se y tras una incubación de 2 minutos a esa temperatura, se centrifugaron las muestras de nuevo (1000 g, 1 minuto). En sobrenadante se destinó tanto a la cuantificación de ATP como a la de proteína. Paralelamente se prepararon las muestras con el estándar de ATP para realizar la muestra patrón, y se añadió tanto a las muestras de concentración conocida como a las muestras de estudio la cantidad de luciferasa especificada en el protocolo del kit. La bioluminiscencia se leyó en un lector de placas y la medida final fue la integrada obtenida con la lectura de 10 segundos. Los valores obtenidos en M se analizaron frente a la cantidad de proteína obtenida por muestra y se expresaron finalmente en nmol / g de proteína.

Cuantificación absoluta y relativa de glutatión.

Se midieron los niveles de glutatión total, así como los parciales de su forma oxidada (GSSG) y reducida (GSH) con el uso del kit comercial *Glutathione Assay kit* (Cayman, 703002) que utiliza la actividad de la enzima glutatión reductasa. El grupo sulfhidrilo del GSH reacciona con el ácido 5,5'-ditio-bis-2-nitrobenzoico (DTNB) transformándolo en ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) de color amarillento. El disulfuro mezcla, (entre GSH y TNB) que se produce de forma concomitante, se reduce mediante la enzima glutatión reductasa, reciclando nuevamente el GSH y produciendo más TNB. La tasa de producción de TNB es directamente proporcional a esta reacción de reciclaje que a su vez es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra. La medición de la absorbancia de TNB a 405 nm proporciona una estimación precisa de GSH en la muestra. El GSH se oxida fácilmente a GSSG. Debido al uso de la glutatión reductasa en el kit de análisis, se miden tanto GSH como GSSG y el análisis refleja el glutatión total, pero con el uso de un protocolo alternativo se pueden obtener también los valores de GSSG, y matemáticamente los de GSH por sustracción del valor de GSSG al valor total de glutatión obtenido. En ese protocolo alternativo se emplea 2-vinilpiridina (2-VP) para derivatizar el GSH. En todos los casos es necesario desproteinizar la muestra.



Para el ensayo en tejidos, se extrajeron las neuroretinas de los ojos de las ratas sacrificadas y previamente sometidas a los diferentes tratamientos. Se introdujeron en buffer de lisis y se homogeneizó el tejido mecánicamente. Se sometieron a un baño de ultrasonidos (3 ciclos de 2 minutos en hielo). De nuevo se centrifugaron las muestras (10000 g, 15 minutos, 4°C) y se desproteinizaron con trietanolamina (Sigma-Aldrich, T58300).

Una vez desproteinizadas las muestras, se dividieron para los dos ensayos, el de glutatión total y el de GSSG. Para estas últimas se añadió la 2-VP con que se incubó durante 60 minutos. Se prepararon las rectas patrón correspondientes y se añadieron los reactivos oportunos según el protocolo del kit. Se leyeron las placas en un lector de placas a 405 nm.

Determinación del nivel de peroxidación lipídica.

La medida de este parámetro se realizó con el kit *Lipid Peroxidation (MDA + HNE) Assay* (BQCkit, KB03002). La peroxidación lipídica genera, entre otros subproductos tóxicos, el malondialdehído

(MDA) y el 4-hidroxiacetaldehído (4-HNE). Por lo tanto, la cuantificación de los mismos se corresponde con el índice de peroxidación lipídica. El kit empleado mide las concentraciones de MDA y 4-HNE como un índice de la peroxidación lipídica. En este ensayo, un indol reacciona con el MDA y el 4-HNE produciéndose un diindolilalcano con una absorbancia máxima a 586 nm.

Para el estudio del nivel de peroxidación lipídica en cultivos tratados, se obtuvieron las células por descamación y se centrifugaron (500 g, 10 minutos, 4°C). El *pellet* se resuspendió en tampón de lisis (Tris 20 mM, pH 7.4) a 4°C. Las retinas se diseccionaron una vez sacrificados los animales, y se homogeneizaron en el mismo tampón de lisis con la ayuda de un pistilo. Las muestras ya procesadas se centrifugaron (2000 g, 10 minutos, 4°C). Se preparó la curva de calibración siguiendo las instrucciones del kit, y se trataron las muestras con los diferentes reactivos con los que se incubaron (40 minutos, 4°C). Se pipetearon 200 µL del sobrenadante en pocillos de una placa de 96 y se midió la absorbancia a 585 nm en un lector de placas.

e. Ensayos moleculares.

e.1. Análisis de expresión proteica por *Western blot*.

Los análisis por *Western blot* (WB) se dividen en una primera fase en la que se realiza la obtención del tejido o la recolección de las muestras y su procesamiento para la obtención de proteína y cuantificación de la misma y una segunda parte que incluye la separación por electroforesis y la inmunodetección de la proteína de estudio.

La extracción de proteína se realizó tras los tratamientos oportunos. En el caso de los cultivos celulares, las células fueron obtenidas mediante descamación o tripsinizado, centrifugadas (400 g, 5 minutos) y resuspendidas en un tampón de lisis. Los tejidos, una vez sacrificado el animal, se diseccionaron y se colocaron también en tampón de lisis donde se procedió a su homogeneización mecánica (en el caso de las neuroretinas mediante un pistilo y en el caso de las córneas con el uso de un homogeneizador eléctrico). Se añadieron aproximadamente 0.1 mL/mg de *pellet*. La extracción para la obtención de proteínas se diferenció según la localización de las mismas:

- citosólicas: la composición del tampón de lisis fue 150mM de cloruro de sodio, 1% TRITON X-100 (proteínas citosólicas) o NP-40 (proteínas de membrana), 50mM TRIS-base y se ajustó a pH 8. Incluyó inhibidores de proteasas (Sigma, P8340) y de fosfatasa

(Sigma, P0044) 2 µg/mL. Las muestras en tampón de lisis se sometieron a tres ciclos de congelación / descongelación y se llevaron a un baño de ultrasonidos a 4°C (tres ciclos de dos minutos) y posteriormente se centrifugaron (15700 g, 30 minutos, 4°C). Se recuperó el sobrenadante como la fracción citosólica de proteínas.

- nucleares: se resuspendió el pellet anterior en tampón nuclear (20 mM Hepes pH 7.9, 1.5 mM MgCl₂, 10% glicerol, 350 mM NaCl, 0.2 mM EDTA pH 8, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF e inhibidores de proteasas y fosfatasas 2 µg/mL). Se incubó 30 minutos a 4°C agitando cada 5 minutos la suspensión y se centrifugaron nuevamente las muestras (9000 g, 10 minutos). Se recuperó el sobrenadante como fracción proteica nuclear.

La concentración proteica se determinó utilizando un kit basado en el ácido bicinónico, el *QuantiPro™* BCA Assay Kit (Sigma, QPBCA-1KT). Se prepararon las muestras para la electroforesis empleando iguales cantidades de proteína en las mismas según la cuantificación. De manera habitual se cargaron 20 µg de proteína por muestra, aunque en el caso de proteínas cuya detección fue más tenue, se ajustó el protocolo para cargar hasta 50 µg de las mismas. Para su preparación se utilizó un tampón (2M Tris/HCl, 8% SDS, 40% glicerol, 8% mercaptoetanol, 0.002% bromofenol, pH 6.8) y agua destilada para el ajuste al mismo volumen final. Algunas muestras se pretrataron con calor, según las indicaciones del anticuerpo a utilizar (95°C, 5 minutos). Se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida con 0.1% de SDS a diferentes concentraciones (10, 12 ó 16%), dejando una calle de los geles para la carga de 8 µL de marcador

molecular *Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder* (ThermoFisher, 26634). Las proteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (0.22 o 0.4 μm).

Anticuerpo primario	Técnica	Uso	Especie	Casa comercial	Referencia
Anti actina	WB	1:4000	Ratón	Millipore	MAB1501
Anti AIF	WB	1:500	Cabra	Santa Cruz Biotech	sc-9716
Anti Brn3a	WB / IF	1:500/1:100	Cabra	Santa Cruz Biotech	sc-31984
Anti calbindina	IF	1:2000	Ratón	Swant	300
Anti calretinina	IF	1:2000	Conejo	Swant	7697
Anti citoqueratina	IF	1:500	Ratón	Dako	M063029-2
Anti COX IV	WB	1:1000	Conejo	Abcam	16056
Anti ERK	WB	1:1000	Conejo	Cell Signaling	#9102
Anti ERK fosforilado	WB	1:1000	Conejo	Cell Signaling	#9101
Anti GFAP	IF	1:500	Conejo	Dako	Z0334
Anti HO-1	WB / IF	1:1000/1:500	Conejo	Enzo LS	ADI-SPA895
Anti I β 4 (conjugado)	IF	1:1000	-	Invitrogen	I21413
Anti Na ⁺ /K ⁺ ATPasa	IF	1:100	Ratón	Millipore	05-369
Anti p-38	WB	1:1000	Ratón	Abcam	ab31828
Anti p-38 fosforilado	WB	1:1000	Ratón	Abcam	ab45381
Anti sinaptofisina	WB	1:50	Ratón	Santa Cruz Biotech	sc-9116
Anti TOMM20	IF	1:100	Conejo	Abcam	ab78547
Anti ZO1	IF	1:500/1:200	Conejo	Thermo Fischer	61-7300

Tabla m.1. Listado de anticuerpos primarios empleados en los estudios.

Una vez en las membranas, se procedió a la inmunodetección mediante el bloqueo de las mismas durante 60 minutos con el suero indicado y la posterior incubación toda la noche con el anticuerpo primario oportuno (tabla m.1). Durante toda la inmunodetección se empleó como tampón una solución salina de TRIS, con un 0.1% v/v de Tween-20 (TBS-T). La detección del anticuerpo primario se realizó mediante la incubación con anticuerpos secundarios biotinilados (tabla m.2). Para la revelación de los anticuerpos secundarios se empleó una solución con peróxido de hidrógeno (0.016% p/v 3-amino-9-etilcarbazol en acetato de sodio 50 mM, pH 5, con un 0.05% v/v de Tween-20 y un 0.03% v/v de peróxido de hidrógeno). La reacción colorimétrica se frenó con TBS-T con azida sódica al 0.05%. Las membranas se fotografiaron y se cuantificaron las bandas correspondientes a cada proteína.

e.2. Análisis de expresión génica por RT-PCR.

En análisis por RT-PCR se llevó a cabo en dos partes. En un primer proceso, tras la finalización de los tratamientos, se procedió a la extracción y cuantificación del ARNm. Posteriormente, se llevó a cabo la transcripción de ARNm a ADN, en cual se amplificó y se cuantificó en la PCR.

Las muestras empleadas fueron córneas que se diseccionaron y, siguiendo las instrucciones del *PureLink™ RNA Mini kit* (ThermoFisher, 12183020), se extrajo en ARN total mediante disección y homogenización mecánica de las mismas con ayuda de un homogeneizador eléctrico. La concentración y pureza de las muestras se determinó mediante el uso de un espectrofotómetro (Picodrop, Applied Biosystems). La pureza se determinó con la ratio de absorbancia a 260/280 nm, descartándose las muestras con valores inferiores a 1.8.

Tabla m.2. Listado de anticuerpos secundarios empleados en los estudios.

Anticuerpo secundario	Técnica	Concentración	Especie	Casa comercial	Referencia
Alexa Fluor 488	IF	1:300 – 1:500	Ratón	Invitrogen	A11029
Alexa Fluor 488	IF	1:300 – 1:500	Conejo	Invitrogen	A11034
Alexa Fluor 594	IF	1:300 – 1:500	Ratón	Invitrogen	A11032
Alexa Fluor 594	IF	1:300 – 1:500	Conejo	Invitrogen	A11037
Alexa Fluor 488	IF	1:300 – 1:500	Cabra	Invitrogen	A11055
Biotinilado	WB	1:300	Ratón	Vector Laboratories	BA9200
Biotinilado	WB	1:300	Conejo	Vector Laboratories	BA1000
Biotinilado	WB	1:300	Cabra	Vector Laboratories	BA5000

Una vez purificado el ARN, se tomaron 0.5 µg de las muestras para hacer una conversión lineal a ADNc, utilizando la solución comercial High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Applied

Gen	Referencia RefSeq	Secuencia 5'-3'	Secuencia 3'-5'
GAPDH	NM_017008	GCTCACTGAGGACCAGGTTG	TGCTCTAAAAGTCAGGTTCC
HO-1	NM_012580	CAGCCCCAAATCTGCAACAGA	CAACATGGACGCCACTACCAA
Vimentina	NM_031140	CTGCTGGAAGGGGAGGAGAG	GGTCATCTGGTGTGCTGAGAAG

Tabla m.3. Información de los genes analizados por qPCR y los oligonucleótidos empleados.

Biosystems, 4390778). Para la PCR cuantitativa se utilizó la mezcla *Power SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, 4367659) que contiene la enzima Taq polimerasa, dNTPs, el colorante SYBR Green I, la referencia pasiva y el resto de componentes de la solución tampón optimizados para la reacción. Los oligonucleótidos se diseñaron utilizando la aplicación PrimerBLAST (NIH) y se obtuvieron de forma comercial (Sigma-Aldrich) (tabla m.3). Las muestras se analizaron por triplicado, y la cuantificación relativa se llevó a cabo con el método $\Delta\Delta Ct$.

f. Inmunocitoquímica e inmunohistoquímica.

Para la detección de proteínas y su observación por microscopía de fluorescencia, tanto en tejidos como en células se siguieron protocolos similares. En el caso de los cultivos celulares, tras los tratamientos oportunos, se realizó un lavado con PBS y se procedió a su fijación con

paraformaldehído al 4% durante 12 minutos o con metanol durante 10 minutos a 4°C. Para los tejidos, los ojos fueron enucleados tras el sacrificio de los animales, y fijados con paraformaldehído al 4% durante 90 minutos. En algunos casos, se diseccionaron únicamente las córneas o los polos posteriores, y en ese caso, el tiempo de fijación fue de 30 minutos para las córneas y 50 minutos para las denominadas copas o polo posterior. En algunos casos, por indicación de los fabricantes de ciertos anticuerpos primarios, las córneas fueron fijadas con metanol durante 30 minutos (principalmente para la detección de la proteína ZO-1). Los ojos enteros fueron incubados en gradiente de sacarosa (10% dos horas, 20% dos horas, 30% toda la noche, a 4°C) para su inclusión en *Tissue-Tek*® O.C.T. *Compound*, Sakura® (VWR, 25608-930) y posterior procesamiento en criostato. Se realizaron secciones de 8 µm sobre las que se ensayaron los diferentes anticuerpos. Las córneas y neurorretinas fueron incubadas enteras y posteriormente procesadas como *flats*.

El protocolo que se siguió para todas las detecciones por inmunofluorescencia fue el mismo, con modificaciones según la proteína, el anticuerpo primario o secundario. Tras la fijación de las muestras, o la obtención de los cortes, se realizaron tres lavados con PBS. En los casos en los que fue necesario, se reveló el antígeno mediante la incubación en una solución tamponada de urea (100 mM TRIS, 5% p/v urea, pH 9.5) a 95°C durante 10 minutos, seguida de tres lavados con PBS. A continuación, se realizó la permeabilización con el detergente oportuno, Triton X-100 o saponina. Tras varios lavados con PBS, se bloquearon las muestras con el mismo suero en el que se encontraban los anticuerpos secundarios a utilizar, durante 60 minutos. Tras un lavado con PBS, se incubaron las muestras durante la noche a 4°C en una solución de PBS con un 1% v/v de del suero de bloqueo y la concentración indicada de anticuerpo primario. En el caso de las neurorretinas completas, se realizó un paso previo al comienzo del proceso para minimizar la autofluorescencia del tejido, con borohidruro de sodio 0.05% p/v. La incubación con el anticuerpo primario fue de 72 horas en las mismas condiciones. Una vez finalizada la incubación con el anticuerpo primario, y tras varios lavados con PBS, las muestras se incubaron con el anticuerpo secundario fluorescente oportuno. En el caso en que fue necesario, se tiñeron los núcleos con un intercalante nuclear, DAPI. Los resultados se observaron por microscopía de fluorescencia.

g. Citometría de flujo.

El análisis de la distribución de células según su etapa del ciclo celular se realizó mediante citometría de flujo en el Servicio de citometría de la Universidad de Oviedo. Para ello, se utilizó

una solución de yoduro de propidio FxCycle™ PI/RNase Staining Solution (Invitrogen, F10797), con la que se tiñeron las células y se analizaron en el citómetro de flujo *Cytomics FC500* (Beckman Coulter).

Para la preparación de las células, se sembraron para que en el momento de la recogida tras los tratamientos hubiera alrededor de 10^6 células por muestra. La siembra se realizó en placas de 6 pocillos y se utilizó un pocillo por muestra. Se recogieron con ayuda de un descamador y se centrifugaron (300 g, 5 minutos, RT). Se lavó el *pellet* con PBS y de nuevo se centrifugaron (300 g, 5 minutos, RT). Las células se fijaron resuspendiendo el *pellet* vigorosamente en 700 μ L etanol al 70% que fue previamente almacenado a -20°C . Se incubaron las células hasta su lectura (siempre más de 45 minutos), momento en el que se centrifugaron de nuevo (1000 g, 5 minutos, RT) y se lavaron con PBS. Se volvieron a centrifugar (1000 g, 5 minutos, RT) y se resuspendió el *pellet* obtenido en 500 μ L de reactivo. Se incubaron en oscuridad 30 minutos y se procedió a su lectura, usando una excitación de 488 nm y recogiendo la emisión con un filtro de banda de 623 nm. El resultado fue analizado con el software MODFIT 5.2, representándose mediante una gráfica con la distribución por fases, además de una cuantificación relativa de la cantidad de células en cada una.

h. Electroensayos.

h.1. Valoración de la resistencia transepitelial de membrana.

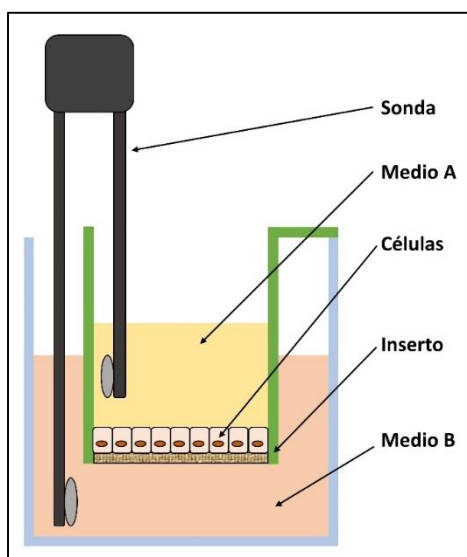


Figura m.3. Esquema de una medida de TER en células sembradas en inserto. En este diagrama se observa la posición en la que se deben colocar los electrodos para efectuar la medida.

Mediante técnicas electrofisiológicas, podemos comprobar un parámetro eléctrico de gran importancia al definir un epitelio: la resistencia transepitelial (TER). Esta medida está

directamente determinada por las propiedades de las uniones estrechas que regulan el paso de fluidos y sustancias entre las células que componen el epitelio, la llamada ruta de transporte paracelular (bib). La resistencia de los distintos epitelios es enormemente variable y está relacionada con su función. El en caso del desarrollo de esta tesis, se empleó esta metodología para el estudio del modelo celular *in vitro* de epitelio pigmentario de retina, la línea celular ARPE19. Los valores obtenidos sirvieron como marcador de la integridad de la monocapa celular tras los diferentes tratamientos.

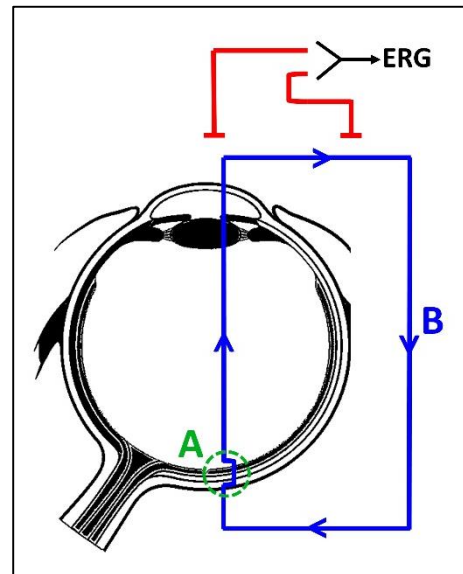
Para poder realizar los estudios, las células fueron sembradas en insertos de policarbonato de 6.5 mm con un tamaño de poro de 0.4 μm (Corning, 3413) colocados en una placa de 24 pocillos (figura m.3). Los insertos permiten que las células polarizadas se alimenten basolateralmente y, por lo tanto, realicen actividades metabólicas de una manera similar a la fisiológica. Las células se mantuvieron en cultivo durante más de 80 días. Los primeros 7 días tras la siembra, las células fueron sembradas y crecieron en el medio de cultivo ya descrito, con un 10% v/v de FBS. A partir del día 8, se redujo en el medio la cantidad de FBS a un 1%. Se utilizó como blanco para las medidas un inserto en el que no se sembraron células y se mantuvo igual que los sembrados. Las células alcanzaron la confluencia aproximadamente a los 3 días de ser sembradas en los insertos. Los tratamientos comenzaron tras dos semanas de cultivo. Los cambios de medios para el mantenimiento de los cultivos se realizaron dos veces por semana. Para la medida de la TER se empleó un micro-polímetro EVOM (Millipore, MERS00002) en el que se acopló la sonda STX2. Las medidas de la TER se realizaron dos veces por semana, y cada valor obtenido fue la media de tres medidas realizadas con 20 minutos de diferencia. Los resultados se expresan en $\Omega\cdot\text{cm}^2$.

h.2. Electrorretinograma focal.

La respuesta de la retina a la exposición breve a luz se denomina electroretinograma (ERG) y se utiliza de forma habitual para analizar la función de la retina *in vivo*. El globo ocular se comporta como un dipolo eléctrico, con una diferencia de potencial entre la córnea y el polo posterior. Las capas externas de la retina son electronegativas en relación con las capas más internas, electropositivas. Ello permite que se puedan detectar diferencias de potencial cuando se aplica el estímulo luminoso, y así recoger el comportamiento eléctrico de este sistema (figura m.4). El resultado del registro se utiliza en clínica para el diagnóstico de degeneraciones generalizadas de la retina, estudio de degeneraciones retinianas hereditarias en pacientes candidatos, evaluar

la pérdida de función visual... (bib Clinical Ophthalmology A systemic Approach Jack.J.Kanski 5th edition text book).

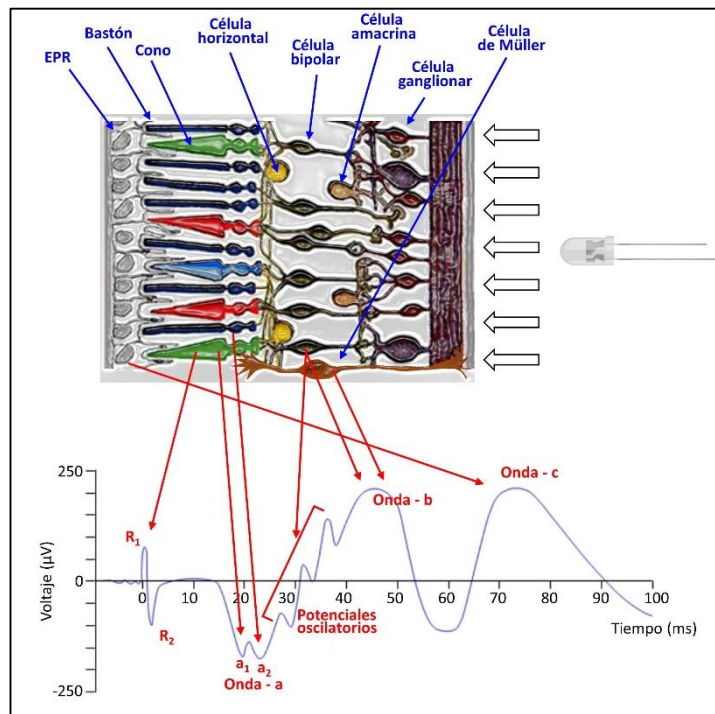
Figura m.4. Relación de los diferentes tipos celulares de la retina con las ondas recogidas en el ERG. Como se observa en el diagrama, tras un estímulo luminoso, las diferentes respuestas de los tipos celulares de la retina se corresponden con distintos componentes de la onda recogida en el electroretinograma.



Los componentes del registro se relacionan con diferentes los diferentes tipos celulares de la retina (figura m.5). En análisis de los resultados, la onda a, negativa, se relaciona con la respuesta al estímulo de los cuerpos celulares de los fotorreceptores, principalmente conos. La onda b, positiva, se corresponde con la respuesta de las células bipolares y de Müller. La amplitud desde el valle de la onda a hasta el pico de la onda b, expresada en μv , mide la respuesta global de la retina en proporción al área de retina funcional. El tiempo implícito, desde la emisión del estímulo hasta el pico de la onda b, es un valor que se ve incrementado en varias condiciones hereditarias. Los potenciales oscilatorios en la onda b ascendente se generan en las capas intermedias de la retina y se relacionan con las células amacrinas. La onda c, que se recoge a los 2-4 segundos, se relaciona con la actividad del EPR.

En esta tesis doctoral, se utilizó el estudio por electrofisiología ERG para analizar el estado de las retinas sometidas a procesos isquémicos en diferentes condiciones. Para ello, se empleó el sistema RETIAAnimal (Roland Consulting). Los animales anestesiados con ketamina/xilacina según se describió previamente, se colocaron en el dispositivo. Tras aplicar una capa de Goniotal® en ambas córneas, se colocaron los electrodos, situando la toma de tierra en la base de la cola, los electrodos de referencia uno en cada omóplato y los electrodos activos uno en cada córnea. El estímulo luminoso fue un destello de luz emitido por un LED blanco (-30 dB, 0.003 cd/m^2 , 0.125 Hz). Las medidas se llevaron a cabo en condiciones escotópicas y los animales fueron adaptados a oscuridad durante 12 horas.

Figura m.5. Esquema de los circuitos eléctricos formados en el globo ocular con la percepción del estímulo luminoso. En este esquema se observan los dos circuitos formados, el A, intrarretiniano, y el B, gracias al cual se puede llevar a cabo la medida por electroretinografía.



i. Microbiología

Los estudios microbiológicos se llevaron a cabo en el área de Microbiología, dentro del departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. En este laboratorio cuentan con una colección de bacterias proporcionadas por el Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Las cepas empleadas fueron las siguientes:

- *Staphylococcus aureus* (16491464)
- *Staphylococcus epidermidis* (16546925)
- *Streptococcus pneumoniae* (16589956)
- *Pseudomonas aeruginosa* (16531445)
- *Micrococcus luteus* (16583077)
- *Escherichia coli* (16553780)

Para la evaluación del efecto de distintas longitudes de onda en el crecimiento de diferentes microorganismos, se prepararon cultivos a una densidad óptica inicial, medida a 600 nm (DO_{600}), de 0.05. Los microorganismos empleados se cultivaron en caldo de infusión cerebro-corazón

(BHI), y se sembraron 100 μL por cuadruplicado en pocillos de placas de 96. Una de las placas se utilizó para hacer la medida de DO_{600} a tiempo 0. Se incubaron bajo diferentes condiciones de luz en una estufa a 37°C. Posteriormente, se cuantificó en efecto de las diferentes incubaciones con dos técnicas:

- Análisis de la DO_{600} : para ello se realizaron diluciones entre 10^{-5} y 10^{-7} y se midieron nuevamente las DO.
- Recuento de unidades formadoras de colonias (UFCs): una de las réplicas diluida se sembró por triplicado en agar-BHI. Las placas de agar se incubaron durante 24 horas y se hizo un recuento de UFCs.

j. Lámparas, filtros y medidas ópticas.

La construcción de las lámparas o dispositivos emisores de luz se realizó adquiriendo los bulbos de LED de 5 mm y diferentes picos de emisión (ElectroDH, azul: 12.675/5/AZ/C/SL, rojo: 12.675/5/R/C/SL, UV: 12.675/5/AZ/C/SL). Se crearon diferentes circuitos (figura m.6) que se ensamblaron en una base, y se conectaron a la corriente mediante el uso de alimentadores a diferentes potencias.

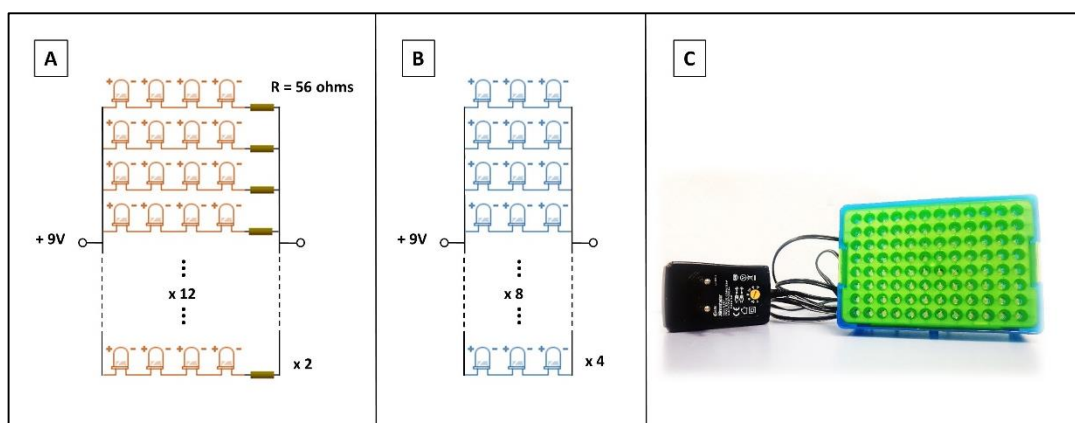


Figura m.6. Esquema de los dispositivos LED. Distribución de los componentes eléctricos de los dispositivos LED rojos (A) y azules (B). En la imagen C se puede ver el modelo de los dispositivos finales empleados en los experimentos.

La elaboración de estos filtros se realizó en el Instituto Tecnológico de Materiales de Asturias (ITMA). Como especies luminiscentes se eligieron moléculas orgánicas, debido a su alto rendimiento cuántico (definido como el número de fotones emitidos con respecto al número de fotones absorbidos). Se incorporaron en una matriz de polímero con alta transparencia óptica,

polimetilmetacrilato (PMMA). Este sistema compuesto por la matriz polimérica y las especies luminiscentes se depositó sobre vidrio en forma de película delgada.

Se utilizaron dos especies luminiscentes diferentes:

- una molécula con espectro de absorción / emisión de luz en la zona azul-UV del espectro (Lumogen Blau) - el donante
- y otra molécula con absorción / emisión en la parte roja infrarroja del espectro (Lumogen Red) - el aceptor.

La combinación adecuada de ambas especies es la que permite la conversión espectral deseada de luz azul UV a roja casi infrarroja por medio del proceso de transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET).

Técnicas de fabricación de los filtros:

Se utilizaron dos procedimientos diferentes para permitir que las especies luminiscentes seleccionadas trabajasen juntas:

- Dispositivo de una sola capa. En un primer enfoque, se incorporaron varias especies luminiscentes en la misma capa. Dentro de esta misma capa se llevan a cabo todos los procesos de transferencia. La capa luminiscente revistió una lente oftálmica.
- Dispositivo multicapa. En otro procedimiento, cada especie luminiscente se depositó en una capa diferente. El sistema constó, por lo tanto, de tres capas luminiscentes. Dos capas con moléculas de Lumogen Blau se depositaron en la cara superior de la lente oftálmica absorbiendo en la zona del azul-UV. Se realizaron dos revestimientos ya que un único revestimiento no contenía la cantidad necesaria de moléculas para la correcta absorción de un alto porcentaje de energía en esa fracción del EMM. La radiación es emitida y absorbida por una tercera capa luminiscente, que se depositó en la parte inferior de la lente y se emite nuevamente como luz de longitud de onda larga. El dispositivo resultante mostró una mayor luminiscencia que el dispositivo de monocapa.

Ambos filtros luminiscentes (monocapa y multicapa) utilizan PMMA como matriz huésped. En un mismo vial se añadieron PMMA y tolueno a una concentración de 150 mg / ml. Los viales se calentaron a 70 ° C y se agitaron hasta la total disolución del PMMA. Posteriormente, se agregaron diferentes cantidades de los colorantes fluorescentes a las soluciones de PMMA / tolueno anteriores:

En la configuración de monocapa, ambas especies fluorescentes se agregaron a la misma solución de PMMA / tolueno. Lumogen Blau se agregó hasta obtener una concentración de 9 mg / mL (igual a un contenido de peso sólido del 6%) y Lumogen Red para obtener una concentración de 6 mg / mL (igual a un contenido de peso sólido de 4%). Esta formulación se denominó PMMA Lumogen Blau 6% Lumogen Red 4%. Se probaron también otras formulaciones diferentes, como PMMA Lumogen Blau 6% Lumogen Red 6% y PMMA Lumogen Blau 6% Lumogen Red 8%. Una vez que todos los componentes estuvieron disueltos, la solución se filtró y se moldeó por rotación en un sustrato de vidrio limpio. En todos los casos, la luminiscencia del vidrio luminiscente resultante fue bastante baja, probablemente debido a la formación de ciertos agregados.

En la configuración multicapa, se agrega Lumogen Blau para obtener una concentración de 9 mg por ml (igual a un contenido de peso sólido del 6%). En una solución diferente de PMMA / tolueno, se agrega Lumogen Red para obtener una concentración de 6 mg por ml (igual a un contenido de peso sólido del 4%). Una vez que todos los componentes están bien disueltos, las soluciones se filtran y se moldean por centrifugación en un sustrato de vidrio limpio. Las formulaciones de las diferentes capas son: PMMA Lumogen Blau 6% (capa 1), PMMA Lumogen Blau 6% (capa 2) y PMMA Lumogen Red 4% (capa 3). Se observa una fuerte luminiscencia.

Para realizar las medidas descriptivas espectrofotométricas de las diferentes fuentes luz, previa y posteriormente a sus modificaciones, se empleó el dispositivo: CRI Illuminance Meter (Konica Minolta CL-70F). También se empleó un fotorradiómetro con sondas independientes para medidas en UV y en visible (HD2102.1, Delta OHM).

k. Análisis de imágenes y datos.

Microscopía: las imágenes fueron obtenidas con un microscopio de fluorescencia Leica DM6000 B o microscopio invertido Leica DMI6000 B (Leica Microsystems). Las fotos de contraste de fases se realizaron con esos mismos modelos o con el microscopio Leica DM IL LED.

Lector de placas: se empleó el lector de microplacas multidetectores VICTOR™ X5 (PerkinElmer).

Imágenes: la cuantificación o el procesamiento de las mismas, cuando fue necesario, se hizo con FIJI, ImageJ Software (NIH, USA)

PCR-RT: Los datos se analizaron con el programa SDS 1.4 del equipo 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Estadística: Todos los estudios estadísticos se llevaron a cabo con el programa GraphPad Prism versión 6.01 para Windows (GraphPad Software)

Capítulo I

Capítulo I: Biología molecular de la luz: el papel de la mitocondria.

c1. Introducción.

La interacción de las células con la luz tiene distintos efectos dependiendo de la composición e intensidad de la misma. El espectro visible de la radiación electromagnética es el rango capaz de producir percepción en las estructuras oculares¹³⁸, y las diferentes longitudes de onda que se incluyen en él se pueden agrupar o diferenciar según su cromaticidad (tabla c1.1). Las radiaciones percibidas como azules o rojas, se encuentran muy distantes en dicho rango del espectro, presentando características muy diferentes. Dentro del EEM visible, mientras que las longitudes con cromaticidad en el azul son radiaciones de frecuencias altas y transportan cantidades elevadas de energía, las longitudes de onda de cromaticidad en el rojo son ondas de frecuencia baja cuya energía es bastante menor⁶⁶. Esto hace que los efectos que causan en las células, por su interacción con diversas moléculas, sea muy diferente.








Cromaticidad	Rango λ (nm)	λ (nm) media	Coordenadas RGB	Representación
Violeta	390-435	412	123,0, 226	
Azul	435-480	457	0,108, 255	
Azul-verdoso	480-490	485	0,234, 255	
Verde-azulado	490-500	495	0,255, 203	
Verde	500-560	530	94,255, 0	
Verde-amarillento	560-580	570	225,255, 0	
Amarillo-anaranjado	580-595	587	255,233, 0	
Rojo-anaranjado	595-620	608	255,162, 0	
Rojo	620-760	685	255,0, 0	

Tabla c1.1.1. Listado de los colores que componen el EEM de la luz visible.

La interacción entre luz visible y tejidos se debe a la capacidad de ciertas moléculas que componen las células, denominadas cromóforos, de interactuar con esa luz. Más en concreto, la interacción se produce con ciertos grupos químicos presentes en esas moléculas, gracias a cuya estructura son capaces de absorber la energía de ciertas zonas del EEM. Esos grupos cromóforos son grupos funcionales compuestos, principalmente, por dobles y triples enlaces carbono-carbono, sistemas aromáticos, grupos carbonilo, imino (C=N), diazo (N=N), nitro y enlaces C-Y (siendo Y un átomo con pares libres). Además de los grupos cromóforos, es también

interesante la presencia en las moléculas de grupos auxocromos (metilo, halógenos, hidroxilo, alcoxi, amino), capaces de modificar las características (longitud de onda, λ , y absorptividad, ϵ) con las que los cromóforos absorben luz, produciendo fenómenos como¹³⁹⁻¹⁴²:

- Desplazamiento batocrómico: la absorción del cromóforo se desplaza hacia mayores longitudes de onda.
- Desplazamiento hipsocrómico: la absorción del cromóforo se desplaza hacia menores longitudes de onda.
- Efecto hipsocrómico: aumenta ϵ_{\max} , presentando la banda mayor intensidad.
- Efecto hipocrómico: disminuye ϵ_{\max} , disminuyendo la intensidad de absorción.

La forma por la que la luz es absorbida por las moléculas orgánicas en las células es la denominada transición electrónica. Dichas transiciones son relativamente energéticas y, por lo tanto, están asociadas con la absorción de longitudes de onda ultravioleta, visible e infrarroja cercana. Las moléculas generalmente tienen una cadena de dobles enlaces cuyos electrones de orbitales π actúan de manera similar a los electrones en un metal en el sentido de que se comportan colectivamente como una pequeña antena que puede recibir la onda electromagnética de un fotón que pasa. Si la resonancia de la estructura orbital π coincide con la longitud de onda del fotón, entonces es posible la absorción del fotón. Ello quiere decir que no todas las longitudes de onda son absorbidas por el mismo tipo de grupos cromóforos, existe la absorción selectiva^{141,142}. Dentro de estos grupos cromóforos, destacan las porfirinas, citocromos, ficobiliproteínas, carotenoides, ferredoxinas, flavinas, melaninas... Un ejemplo importante es la molécula de pirrol, que es un cromóforo que puede absorber luz alrededor de 420 nm. La combinación de cuatro pirroles en un anillo de tetrapirrol, la llamada porfirina, es un cromóforo muy eficiente para recoger fotones solares. La porfirina se puede encontrar en proteínas tan importantes como la hemoglobina, en la vitamina B12, en el citocromo C y el P450, algunas de ellas constituyentes de las mitocondrias¹⁴³.

Las mitocondrias se encargan de producir la energía celular de forma eficiente y regular, y, entre otras reacciones, participan en cascadas relacionadas con diferentes mecanismos de muerte celular²⁹. Son el pilar del metabolismo energético y tienen especial importancia en ciertos tipos celulares que presentan altas tasas de gasto energético. Entre sus múltiples componentes, destaca la existencia de cromóforos porfirinas, flavonoides y piridinas, entre otros (tabla c1.1.2.). Muchos de estos cromóforos llevan a cabo importantes reacciones dentro de la cadena de transporte de electrones encargada de la síntesis de ATP^{16,22}. Normalmente las mitocondrias celulares, no se encuentran expuestas a la luz visible, y las que sí lo están (células de la piel),

cuentan con la ayuda de pigmentos que absorben gran parte de la energía del EEM al que están expuestas¹⁴². En el caso del sistema visual, la existencia de fotopigmentos se circunscribe al EPR y al iris³. Ello quiere decir que estructuras como la córnea, tienen sus tejidos expuestos a la radiación del EEM sin ningún tipo de protección pigmentaria, y tejidos como la retina, aunque cuentan con algo de protección del EPR, conforman el único tejido perteneciente al SNC expuesto directamente a la radiación del EEM. Tanto en la córnea como en la retina encontramos tipos celulares con necesidades energéticas especiales, destacando las neuronas que conforman el tejido retiniano, especialmente las neuronas de la capa de CGR.

Molécula	Tipo de cromóforo	λ_{max} (nm) forma reducida	λ_{max} (nm) forma oxidada
NAD(P)	Nucleótido de piridina	260-340	260
FAD	Nucleótido de flavina	-	264 / 375 / 450
FMN	Nucleótido de flavina	250-295	266 / 373 / 445
Coenzima Q	Quinona	-	290
Citocromo b	Tetrapirrol	428 / 531 / 561	297 / 414
Citocromo c ₁	Tetrapirrol	418 / 524 / 554	413 / 535
Citocromo c	Tetrapirrol	415 / 520 / 550	408 / 530 / 565
Citocromo a	Tetrapirrol	444 / 604	426 / 595
Citocromo a ₃	Tetrapirrol	442 / 565 / 602	414 / 560 / 600

Tabla c1.1.2. Tipos de cromóforos con sus características de absorción de energía en sus formas oxidada y reducida.

c1.1. Efecto de la exposición a diferentes tipos de longitudes de onda del espectro electromagnético de la luz visible en modelos de cultivos celulares *in vitro*.

Durante los experimentos desarrollados en este primer capítulo, se pretenden establecer las características bioquímicas y moleculares de los cambios celulares ocasionados por la exposición a diferentes radiaciones de un modelo celular *in vitro*, y su relación con la función mitocondrial.

c1.1.1. Diseño experimental.

Los primeros experimentos son los corresponden con los análisis para la descripción de las líneas celulares, evaluando sus niveles de actividad mitocondrial y afectación por luz azul y roja. Posteriormente, se analizó el comportamiento de las células BJhTERT ante diferentes daños mitocondriales mediante la incubación con inhibidores de los distintos complejos, analizando el tipo de muerte celular desencadenado, comprobando su actividad mitocondrial, así como el nivel de estrés oxidativo. Por último, se analiza la capacidad de la luz roja de revertir ciertos daños.

Los experimentos fueron llevados a cabo en un tipo celular, la línea BJhTERT, y su derivada transformada, Rho0. La línea BJhTERT es una línea de fibroblastos procedentes de prepucio humano, que se modificaron para conseguir la depleción del ADN mitocondrial, dando lugar a la línea Rho0. Ambas fueron caracterizadas en los estudios llevados a cabo en este capítulo, pudiendo realizar comparaciones de la respuesta de una y otra línea a diferentes estímulos. El medio empleado para el mantenimiento de la línea Rho0 necesita en su composición ciertas cantidades de uridina y de piruvato de sodio, por ello se emplearon diferentes medios que contenían concentraciones distintas de ambas moléculas y se analizó la viabilidad:

- Medio normal: sin suplemento de uridina ni piruvato de sodio.
- Medio +: 1 mM de uridina y 10 mM de piruvato de sodio
- Medio +++: 10 mM de uridina y 100 mM de piruvato de sodio

También se analizó la viabilidad en presencia y ausencia de diferentes inhibidores de la función mitocondrial (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV), analizando las variaciones en presencia de inhibidores de caspasas de amplio espectro y de necroptosis (Z-VAD-fmk (SantaCruz Biotech, CAS 187389-52-2) 20 mM y Necrostatin-1 (Abcam, ab141053) 20 mM respectivamente). Para estos estudios, las células se sembraron y, tras incubarlas durante la noche, se realizaron los diferentes tratamientos a los diferentes tiempos. Posteriormente se llevó a cabo en ensayo de MTT.

Se analizaron también las distribuciones de las distintas fases de ciclo celular de ambas líneas, tras ser cultivadas bajo diferentes tratamientos, mediante citometría de flujo.

Para comprobar la disfunción mitocondrial de las células Rho0, se realizaron estudios de inmunocitoquímica con marcadores mitocondriales, se analizó la actividad mitocondrial y la producción de ATP. También se evaluó la cantidad total de glutatión y la ratio entre GSH/GSSG.

Para todos estos análisis, las células se sembraron 0.1, 0.25 y 1.5 mL en placas de 96, 24 y 6 pocillos respectivamente, desde una dilución inicial con 80.000 cels/mL. Tras dejar las células en incubación en condiciones normales una noche, se procedió a realizar los diferentes experimentos con exposición a inhibidores enzimáticos y/o a distintas radiaciones lumínicas.

También se evaluó mediante ensayos de viabilidad la capacidad de un inhibidor de la necrosis y un inhibidor de la apoptosis de preservar la viabilidad celular tras exponer a las células a diferentes tratamientos.

Por lo general, las fuentes de luz artificiales tienen un rango amplio de longitudes de onda de emisión, por ello, para el desarrollo de los experimentos incluidos en esta tesis doctoral, se

utilizaron dispositivos de tipo LED, cuyo rango es bastante estrecho. De esta manera, podemos decir que los diferentes componentes de la luz se pueden evaluar de manera independiente agrupados según su cromaticidad. Los dispositivos emisores presentan picos de longitud de onda de emisión en azul ($\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm) y en rojo ($\lambda_{\text{máx}}$ 630 nm) cuyo rango se extiende en decenas de nanómetros alrededor. Cada uno de ellos, de manera independiente, fueron evaluados para encontrar la irradiación oportuna de uso, que en este caso fue de 1000 lux para la luz roja, 7.5 W/m², frente a 250 lux para la luz azul, 8.9 W/m².

c1.1.2. Resultados y discusión.

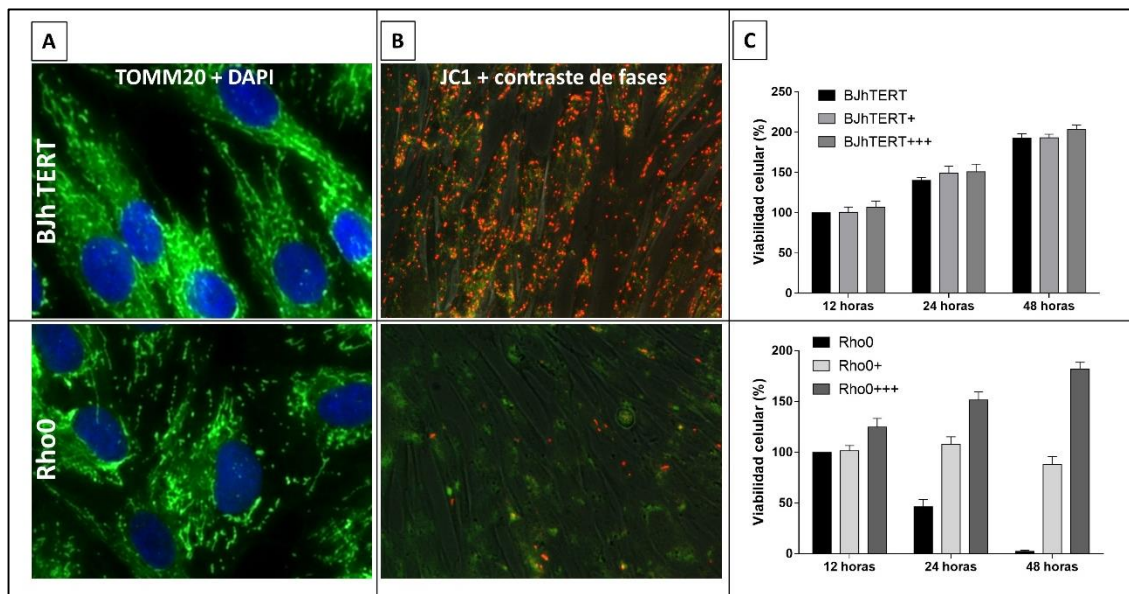


Figura c1.1.1. A) Inmunolocalización de la expresión de la proteína mitocondrial TOMM20 (verde) en composición con el marcador nuclear DAPI (azul) en los cultivos de células BJhTERT y Rho0. 40x. n=3. B) Tinción en dichos cultivos con el reactivo para evaluar la actividad mitocondrial, JC-1 en composición con contraste de fases. 20x. n=4. C) Viabilidad celular relativa expresada en porcentaje (ensayo MTT) de los cultivos de células BJhTERT y Rho0 con el medio base o con el medio con diferente suplementación de piruvato de sodio y uridina (+) 1 mM de uridina y 10 mM de piruvato de sodio; +++) 10mM de uridina y 100mM de piruvato de sodio a lo largo de 48 horas de cultivo. Los resultados de n=7 se expresan como promedio \pm SEM.

En la figura c1.1.1 se muestran los resultados de la inmunocitlocalización de la proteína TOMM20 mitocondrial en verde (figura c1.1.1A) frente al estudio de la actividad mitocondrial de las mismas con el reactivo JC-1 (figura c1.1.1B). En ellas se observa como la tinción de mitocondrias es similar en ambos cultivos, pero en el cultivo de las células Rho0 se observa una mínima actividad mitocondrial residual, comparada con la actividad en los cultivos de fibroblastos control. Esta falta de actividad mitocondrial se refleja en las gráficas de viabilidad (figura c1.1.1C). En el caso de estas células Rho0, según indicaciones de los autores, es necesario

suplementar el medio con uridina y de piruvato de sodio¹⁴⁴, por lo que se realizaron ensayos de cómo afectó a la viabilidad del cultivo el uso de medios con diferentes cantidades de suplemento. Cuando los fibroblastos BJhTERT fueron incubados con los distintos suplementos, no se observó diferencia en la viabilidad a diferentes tiempos, 12, 24 y 48 horas. En cambio, las células Rho0 mostraron ser dependientes de estas moléculas, ya que, en el caso de la incubación sin el suplemento, los cultivos vieron su viabilidad muy reducida a las 24 horas y a las 48 horas no quedaban células vivas. Cuando el suplemento fue intermedio (+) la viabilidad disminuyó, en menor medida que sin suplemento y, únicamente en el caso de la suplementación alta (+++) se consiguió observar un aumento de la viabilidad tanto a las 24 como a las 48 horas. Por lo tanto, debido a su falta de actividad mitocondrial, estas células son dependientes para el mantenimiento de su estado metabólico de uridina y piruvato de sodio.

En la figura c1.1.2 se analizan los resultados obtenidos de analizar la distribución del ciclo celular.

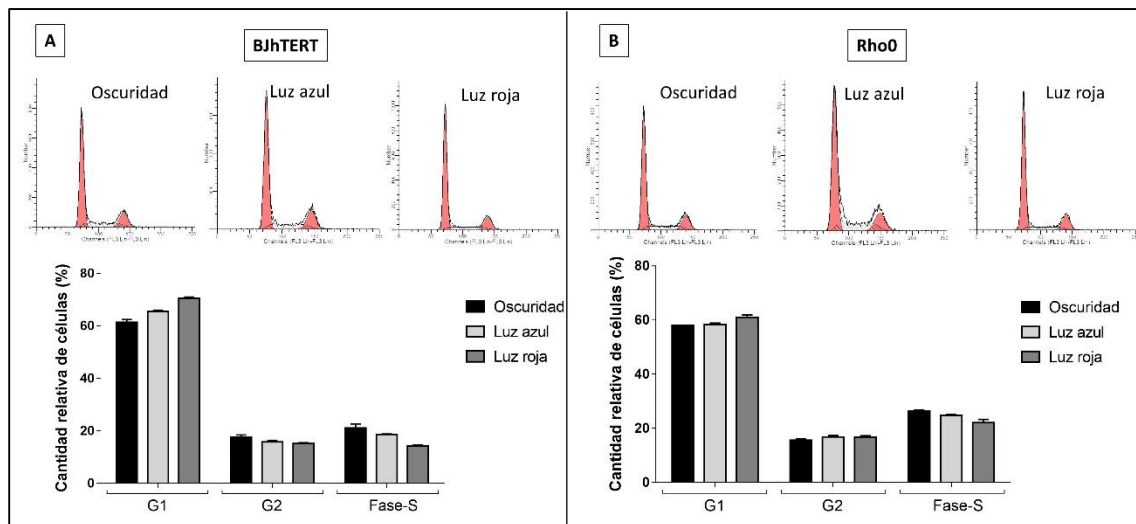


Figura c1.1.2. Análisis de la distribución por ciclo celular de los cultivos bajo diferentes condiciones de radiación (luz roja 7.5 W/m² o luz azul 8.9 W/m²) o en oscuridad durante 24 horas. La representación del análisis en la parte inferior se refiere a la cantidad relativa expresada en porcentaje de células en las diferentes fases para los cultivos de BJhTERT (A) o Rho0(B). Los resultados de n=8 se expresan como promedio ±SEM.

La medida del contenido en DNA permite el estudio de poblaciones celulares en diferentes fases del ciclo celular, así como posibles poliploidías. En una población dada, las células se distribuirán entre tres fases mayoritarias: G0/G1, S y G2¹⁴⁵.

- Fase G0/G1: es una etapa de crecimiento celular y de duplicación de los orgánulos y estructuras citoplasmáticas. En la fase G1, como en el resto de la interfase, se produce la transcripción y la traducción (síntesis de proteínas). Es el periodo más variable del ciclo celular. Durante la fase G1 algunas células se bloquean, dejan de dividirse y entran en la fase G0, en la que tienen una serie de transformaciones que le llevan a la

diferenciación celular. La célula se especializa y expresa los genes que le permiten desarrollar su actividad en un tejido. Las células que están en la fase G0 para toda su vida, están en un estado de reposo o quiescencia. Existe un punto de restricción (punto R) o punto sin retorno, al final de G1, en el cual la célula tiene que seguir las fases S, G2 y M. Si la célula tiene un tamaño adecuado, dispone de nutrientes y es necesaria la reproducción.

- Fase S (S de síntesis de ADN): en esta fase, la célula duplica su material genético y se produce la síntesis de proteínas histonas y de otras proteínas cromosómicas, que se unen al ADN recién formado.
- Fase G2: empieza cuando termina la síntesis de ADN (Fase S) y termina cuando se condensan el ADN y aparecen los cromosomas. Se transcribe y traduce el ARN necesario para sintetizar las proteínas que intervienen en la mitosis, como la tubulina del huso mitótico. En esta fase, la célula se termina de preparar para la mitosis y tiene el doble de ADN que en la fase G1, por lo que está lista para dividirse.

Como las células que están en la fase G1 tienen la mitad de ADN que las que están en la fase G2, podemos saber en qué fase se encuentra la célula, con sólo saber la cantidad de ADN. En el caso

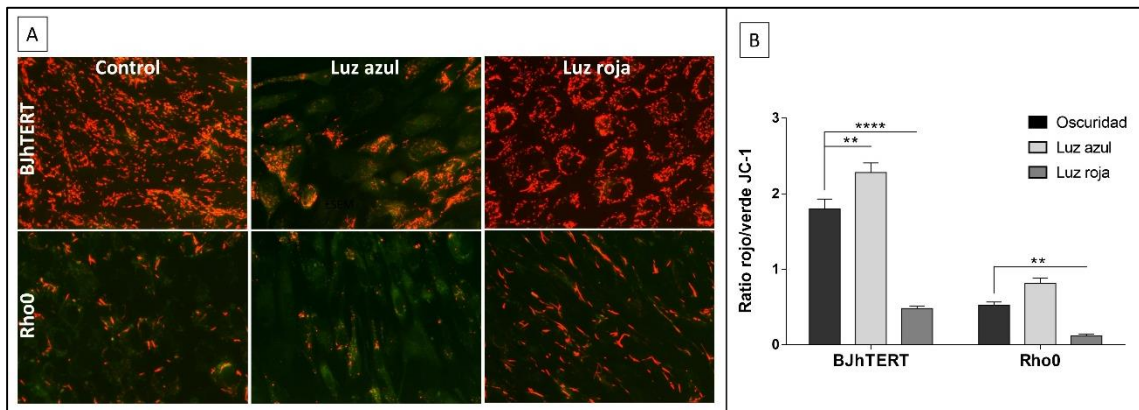


Figura c1.1.3. Análisis de la actividad mitocondrial con JC-1 en cultivos de células BJhTERT y Rho0 incubadas 12 horas bajo diferentes condiciones de luz (luz roja 7.5 W/m² o luz azul 8.9 W/m²) u oscuridad. A) fotografías de la tinción con fluorescencia en verde citoplasmática y roja de los agregados intramitocondriales. 20x. B) Análisis cuantitativo del nivel de fluorescencia expresado como ratio de fluorescencia roja sobre fluorescencia verde. Los resultados de n=4 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

de los cultivos tanto de BJhTERT como de Rho0, la distribución celular en condiciones de oscuridad responde a los parámetros normales, encontrándose un porcentaje mayoritario de células en fase G1 (alrededor de un 60%) y siendo el porcentaje de células en fases G2 y S similar

(sobre un 20%). Se observó, además, que la distribución del ciclo celular no presentó cambios significativos cuando los cultivos fueron tratados con luz azul o con luz roja (figura c1.1.2).

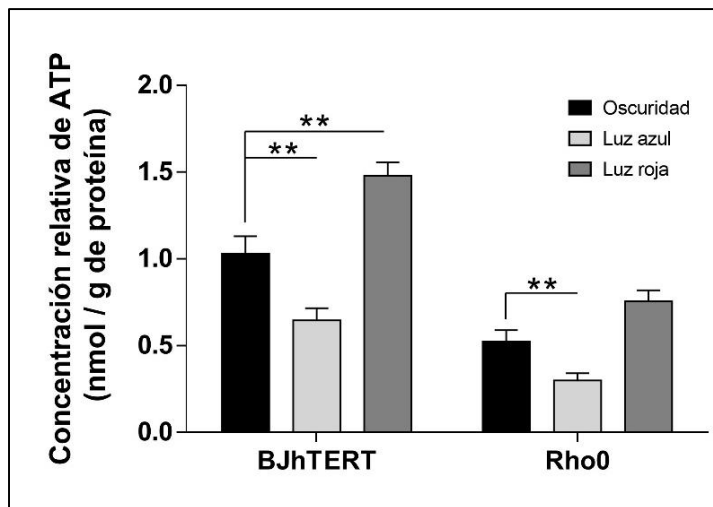


Figura c1.1.4. Cuantificación de la producción de ATP (nmol/g de proteína) en cultivos de células BJhTERT y Rho0 incubadas 12 horas bajo diferentes condiciones de luz (luz roja 7.5 W/m² o luz azul 8.9 W/m²) u oscuridad. Los resultados de n=5 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un Two-way ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Sidak para comparaciones múltiples, (** p < 0.01).

El análisis de la actividad mitocondrial muestra que las células Rho0 tienen afectada dicha función, ya que tanto los resultados de la incubación con JC-1 (figura c1.1.3) como el análisis de la cantidad de ATP producido (figura c1.1.4) lo confirman. En el caso de la incubación con el reactivo JC-1, se observó cómo las BJhTERT mostraron alta fluorescencia roja que se incrementó cuando se incubaron bajo condiciones de luz roja y disminuyó drásticamente con la incubación con luz azul. Las Rho0 presentaron un nivel muy bajo de fluorescencia roja, que pareció incrementarse ligeramente en el caso de la exposición a luz roja y disminuir casi por completo con la luz azul. La cuantificación de la fluorescencia roja y su expresión en relación a la cantidad de fluorescencia verde citoplasmática (figura c1.1.3B) parece indicar como en el caso de las BJhTERT y también de las Rho0, la exposición a luz roja aumenta la actividad mitocondrial y la exposición a luz azul la disminuye. La cuantificación del nivel de ATP en estos cultivos, confirmó estos resultados (figura c1.1.4) y se observó cómo los cultivos de células Rho0 en oscuridad presentaron un nivel energético muy inferior (50% menor) al de las células BJhTERT. En ambos casos, la exposición a luz roja aumentó significativamente la producción de ATP y la exposición a luz azul la redujo. Es interesante que, en el caso de las BJhTERT, la exposición a luz azul disminuyó los niveles de ATP hasta prácticamente el valor de las células Rho0 en condiciones normales de incubación, y que la exposición de éstas últimas a la radiación, tanto azul como roja, no tuvo efectos tan drásticos. Por lo tanto, las células Rho0 parecen ser menos sensibles a los efectos de la radiación, como ya se evidenció en otros estudios¹⁴⁴.

El análisis del nivel de estrés oxidativo (figura c1.1.5) mostró cómo los cultivos de las células Rho0 tenían un nivel basal muy bajo de EROs, comparable al de las células control BJhTERT. Cuando la incubación se realizó bajo radiación de longitud de onda larga, no se observaron cambios en la cantidad de EROs, al contrario que con la incubación bajo luz de longitud de onda corta. La luz azul produjo un aumento en el nivel de estrés oxidativo celular, que se observó por el incremento de fluorescencia roja, en el caso de las células BJhTERT. Este incremento no se detectó en los cultivos con las mitocondrias inactivas Rho0, lo que indica que la luz azul tiene especial incidencia en estos orgánulos, a través de los cuales produce el incremento de EROs (ref) El resultado en términos de viabilidad de la inhibición de los diferentes complejos enzimáticos mitocondriales en cultivos de BJhTERT se muestra en la figura c1.1.6 (control).

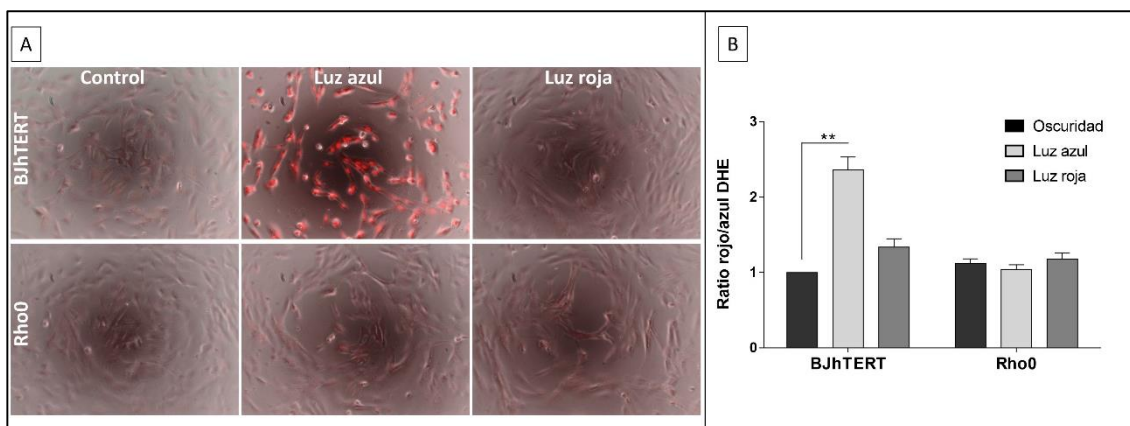


Figura c1.1.5. Análisis de la producción de EROs en cultivos de células BJhTERT y Rho0 mantenidos en condiciones de oscuridad o incubadas bajo radiación de luz roja 7.5 W/m² o luz azul 8.9 W/m² durante 12 horas. A) fotografías conjuntas de contraste de fases y fluorescencia roja del reactivo DHE. 20x. B) Análisis cuantitativo del nivel de fluorescencia de DHE expresado como ratio de fluorescencia roja intercalada en el núcleo frente a fluorescencia azul citoplasmática. Los resultados de n=4 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (** p < 0.01).

Cuando además los cultivos se incubaron en presencia de inhibidores de diferentes tipos de muerte celular (z-VAD-fmk y necrostatin-1), se vio en algunos casos un incremento de la viabilidad celular, lo que indica el tipo de muerte celular que se puede estar desencadenando por el bloqueo de los diferentes complejos enzimáticos. De esta forma, en el caso de la incubación con rotenona (inhibición complejo I) y con 3NP (inhibición complejo II), la viabilidad celular fue mayor cuando se incubaron los cultivos en presencia de inhibidores de necroptosis, al contrario que el bloqueo de los complejos III y IV con antimicina y azida sódica respectivamente, cuya viabilidad fue mayor en presencia de inhibidores de la apoptosis. La incubación de las BJhTERT, en las condiciones ya descritas de radiación con luz azul, produjo una disminución de la viabilidad de aproximadamente un 40%, que en el caso de la co-incubación con necrostatin-1 fue de

aproximadamente un 20%, mientras que la co-incubación con el inhibidor de caspasas no produjo ninguna diferencia. En la figura c1.1.7 se observan los núcleos celulares teñidos con DAPI de los diferentes tratamientos anteriores y los cambios en la cromatina debidos a los diferentes tipos de muerte celular. Los resultados se correspondieron con la cuantificación de la viabilidad y las fotografías en las que se muestran rupturas o condensaciones de la cromatina,

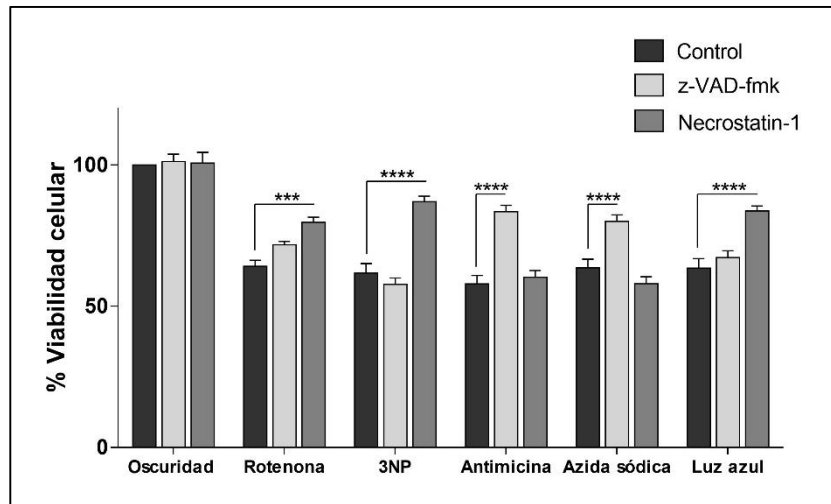


Figura c1.1.6. Representación de la viabilidad celular analizada con el reactivo MTT en cultivos BJhTERT, tratados durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) o expuestos a luz azul (8.9 W/m²). Además, se muestran los resultados de la co-incubación con los inhibidores de diferentes tipos de muerte celular) z-VAD-fmk 20 nM (inhibidor de caspasas) o necrostatin-1 20 mM (inhibidor de necroptosis). Los resultados de n=4 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

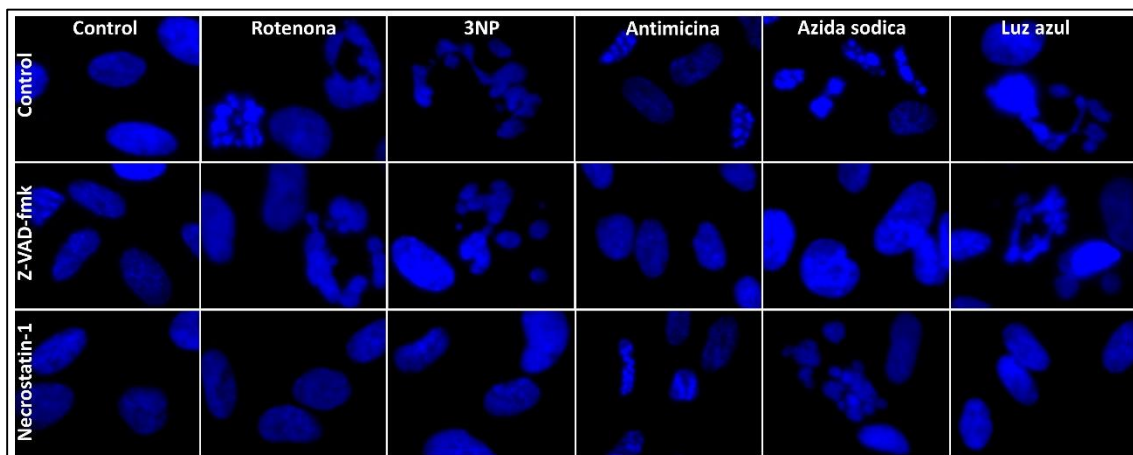


Figura c1.1.7. Tinción con el marcador intercalante nuclear DAPI en cultivos BJhTERT, tratados durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) o expuestos a luz azul (8.9 W/m²). Además, se muestran los resultados de la co-incubación con los inhibidores de diferentes tipos de muerte celular) z-VAD-fmk 20 mM (inhibidor de caspasas) o necrostatin-1 20 mM (inhibidor de necroptosis). 40x. n=4.

relacionadas con procesos de muerte celular, son las de los tratamientos con viabilidades celulares más bajas.

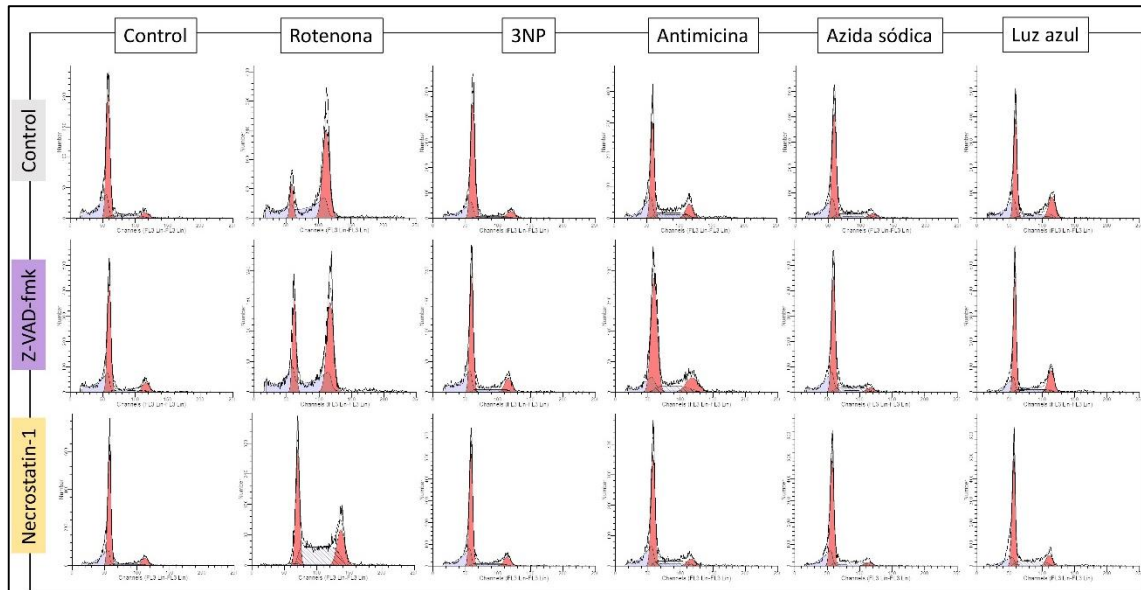


Figura c1.1.8. Distribución de las células según la fase del ciclo celular en cultivos BJhTERT, tratados durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) o expuestos a luz azul (8.9 W/m²). Además, se muestran los resultados de la co-incubación con los inhibidores de diferentes tipos de muerte celular) z-VAD-fmk 20 mM (inhibidor de caspasas) o necrostatin-1 20 mM (inhibidor de necroptosis). n=8.

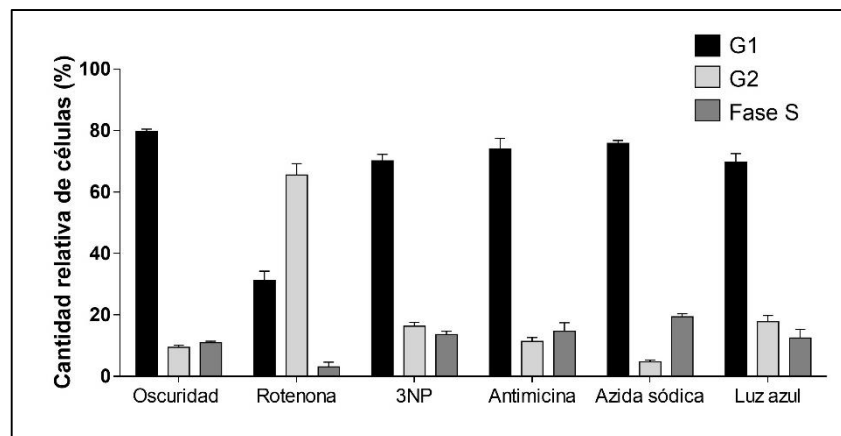


Figura c1.1.9. Análisis de la distribución de las células según la fase del ciclo celular en cultivos BJhTERT, tratados durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) o expuestos a luz azul (8.9 W/m²). Además, se muestran los resultados de la co-incubación con los inhibidores de diferentes tipos de muerte celular) z-VAD-fmk 20 mM (inhibidor de caspasas) o necrostatin-1 20 mM (inhibidor de necroptosis). Los resultados de n=8 se expresan como promedio \pm SEM.

En el análisis de la distribución del ciclo celular en las figuras 1.1.8 y 1.1.9 se observa que, de todos los inhibidores enzimáticos, únicamente la rotenona produjo un cambio significativo en la cantidad de células por fase, existiendo una acumulación muy elevada de células paradas en fase G2. Esta acumulación no ocurre cuando las células se incuban bajo luz azul, lo que podría sugerir que esta y la rotenona desencadenan diferentes respuestas celulares y tienen diferentes vías de actuación, entendiendo que la inhibición del complejo I por la rotenona es altamente específica¹⁴⁶.

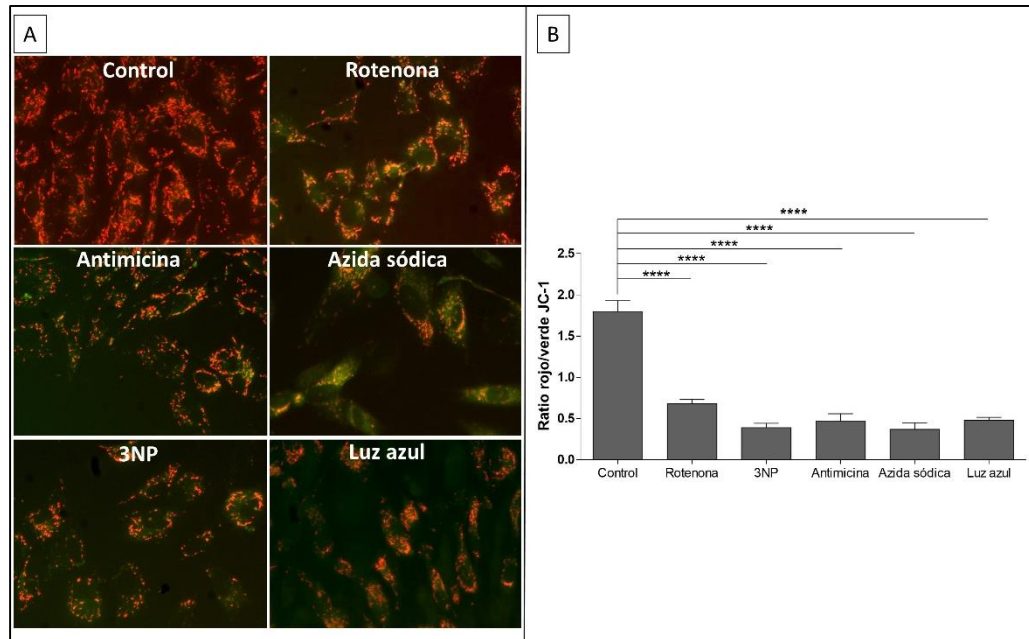


Figura c1.1.10. Análisis de la actividad mitocondrial de las células BJhTERT en cultivo con el reactivo JC-1, tratadas durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) expuestas a luz azul (8.9 W/m²). A) Fotografías de la fluorescencia verde citoplasmática en composición con la fluorescencia roja intramitocondrial. 20x. B) Análisis cuantitativo de la actividad mitocondrial expresada como la ratio de fluorescencia roja frente a fluorescencia verde. Los resultados de n=4 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** $p < 0.0001$).

En las figuras 1.1.10 y 1.1.11 se muestran los resultados de la evaluación de la actividad mitocondrial tras la inhibición de los diferentes complejos. Se observó cómo las mitocondrias tuvieron una gran disminución de actividad en todos los casos, comparable a la disminución producida por la luz azul. Además, la cuantificación del ATP producido disminuyó en todos los casos, en concordancia con la disminución de actividad mitocondrial (figura c1.1.11), al contrario que el nivel de estrés oxidativo que aumentó a causa de la inhibición de los complejos mitocondriales (figuras 1.1.12 y 1.1.13). La incubación con el reactivo DHE (figura c1.1.12) produjo un incremento en la fluorescencia roja en los cultivos de las células BJhTERT que fueron

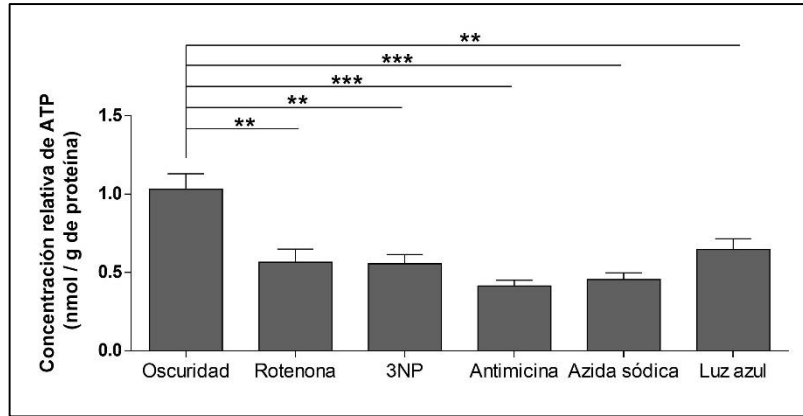


Figura c1.1.11. Análisis cuantitativo de la producción de ATP (nmol/g de proteína) de las células BJhTERT en cultivo, tratadas durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) o expuestos a luz azul (8.9 W/m²). Los resultados de n=5 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

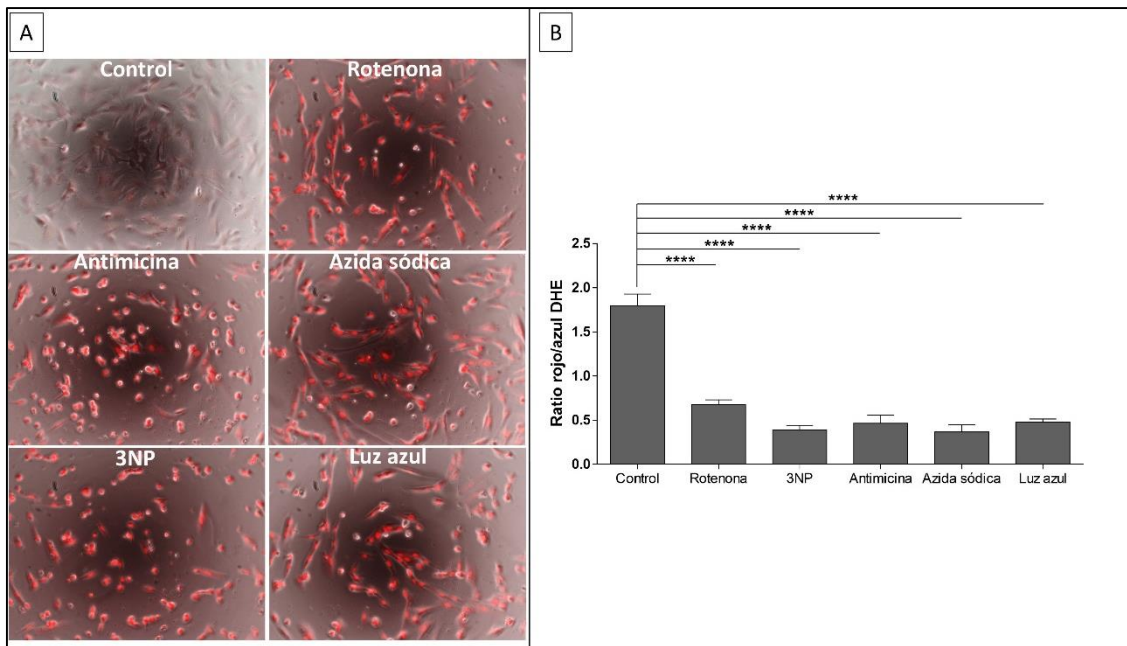


Figura c1.1.12. Análisis de la producción de EROs de las células BJhTERT en cultivo con el reactivo DHE, tratadas durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) o expuestos a luz azul (8.9 W/m²). A) fotografías de la fluorescencia roja nuclear en composición con con fotografías de contraste de fases. 20x. B) Análisis cuantitativo de la actividad mitocondrial expresada como la ratio de fluorescencia roja frente a fluorescencia verde. Los resultados de n=4 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

cultivadas en presencia de los inhibidores y también bajo radiación de longitud de onda corta. Al analizar el nivel de peroxidación lipídica de dichos cultivos (figura c1.1.12) se comprobó que

en todos los casos se produjo un incremento del mismo, incluyendo la incubación con luz azul. Es interesante destacar que, al igual que en la medición del estado oxidativo general con DHE, la antimicina (inhibición del complejo III) produjo un menos grado de oxidación, a pesar de que al igual que todos los tratamientos produjo el mismo valor de disminución de viabilidad celular (figura c1.1.6).

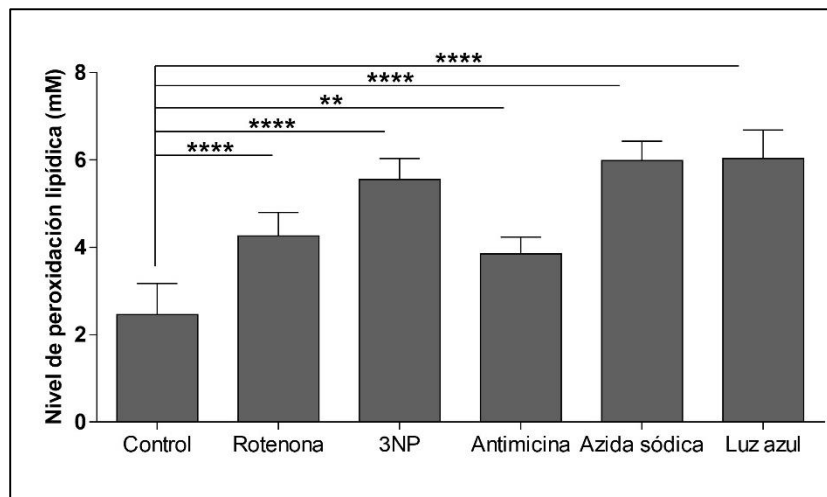


Figura c1.1.13. Análisis cuantitativo del nivel de peroxidación lipídica (mM) de las células BJhTERT en cultivo, tratadas durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μ M, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μ M, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) o expuestas a luz azul (8.9 W/m²). Los resultados de n=7 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

Según todos estos resultados, los tipos de muerte celular que se producen por la inhibición selectiva de los diferentes complejos enzimáticos mitocondriales y la exposición a la luz azul tienen ciertas características diferenciales. La exposición a luz azul en las condiciones empleadas produce una disminución en la viabilidad celular, junto con un bloqueo de la actividad mitocondrial y su consecuente disminución en la producción de ATP, así como un aumento general del nivel de estrés oxidativo celular, sin causar cambios en el desarrollo normal del ciclo celular. La exposición de los cultivos a inhibidores de la necroptosis mantuvo valores más altos de viabilidad celular, de manera que la necroptosis parece ser el tipo de muerte celular que desencadenaron las condiciones de los experimentos. Comparte esta característica con la rotenona y con el 3NP, inhibidores de los complejos I y II respectivamente, que, al contrario que la inhibición de los complejos III y IV, también mejoran su viabilidad cuando se incuban en presencia de Necrostatin-1. A diferencia de la rotenona, la exposición a 3NP o a luz azul no produce modificaciones en la distribución del ciclo celular. De esta manera, se podría decir que en estos cultivos y en las condiciones descritas, el daño que produce la exposición a luz azul

comparte características bioquímicas con el daño que se produce al inhibirse la actividad del complejo II, la succinato deshidrogenasa.

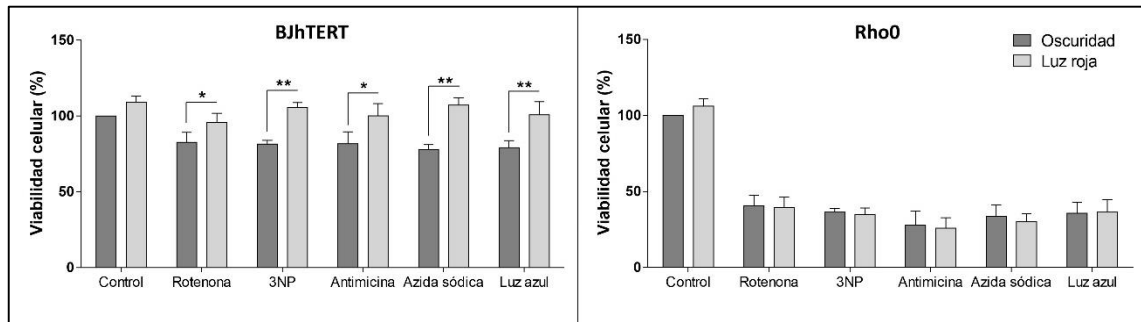


Figura c1.1.14. Análisis cuantitativo de la viabilidad celular de cultivos de células BJhTERT (izquierda) y Rho0 (derecha) mediante el reactivo MTT, tratados durante 12 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 1 μM, complejo I; 3NP 10 mM, complejo II; antimicina 100 μM, complejo III; azida sódica 15 mM, complejo IV) o expuestos a luz azul (8.9 W/m²), y posteriormente mantenidos en oscuridad 12 horas o expuestos a luz roja (7.7 W/m²). Los resultados de n=8 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un One-way ANOVA, α=0.05, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (** p < 0.01).

En la figura c1.1.14 se analizó la respuesta en términos de viabilidad de los cultivos expuestos a luz roja tras la incubación en presencia de los diferentes inhibidores mitocondriales. En las gráficas se observa cómo la incubación con la misma concentración de inhibidor enzimático en las células BJhTERT y en las células Rho0, produjo una disminución de la viabilidad mucho mayor en estas últimas, posiblemente debido a que el poco ATP generado en las Rho0 se debe, además de las rutas metabólicas minoritarias¹⁶ a la actividad residual de las pocas mitocondrias activas que se mantienen en estas células y que se observó en la tinción JC-1 en la figuras c1.1.1, c1.1.3 y c1.1.4. De hecho, al entender que la luz azul afecta principalmente a la actividad mitocondrial, se puede concluir que en la figura c1.1.4, la diferencia de producción de ATP entre las células Rho0 en oscuridad y en condiciones de luz azul (aproximadamente 0.2 nmol/g de proteína) se debe al bloqueo de esa poca actividad mitocondrial residual. En el caso de las BJhTERT, la exposición a luz roja mejoró los datos de viabilidad celular disminuida por el bloqueo de los diferentes complejos, o por la exposición previa a luz azul, mientras que las células Rho0 no presentaron mejoría por esa exposición, probablemente porque la actividad mitocondrial residual es tan pequeña que el incremento en la actividad mitocondrial no es suficiente para contrarrestar el efecto previo de la inhibición de la actividad selectiva de los complejos mitocondriales.

c1.2. Efecto de la exposición a diferentes longitudes de onda de neuronas *in vitro*.

Las neuronas son uno de los tipos celulares más diferenciados del cuerpo humano, presentes tanto en córnea como en retina y cuya pérdida produce diferentes enfermedades. Debido al alto grado de diferenciación que presentan, la posibilidad de trabajar con ellas en cultivos es limitada, pero necesaria. Las neuronas son un tipo celular muy dependiente de la actividad mitocondrial, que, como ya se ha mencionado, únicamente están expuestas de manera directa a la radiación visual del EEM en el sistema visual. Por ello, la posibilidad de mantenerlas en cultivo durante un período de tiempo que nos permita analizar cómo les afecta la exposición a diferentes radiaciones es indispensable para el desarrollo posterior de los estudios de esta tesis doctoral.

c1.2.1. Diseño experimental.

Los experimentos se llevaron a cabo en cultivos primarios de neuronas del ganglio trigémino. Por el método de extracción utilizado, los cultivos contuvieron no sólo neuronas, sino otros tipos celulares como células de Schwann y células satélite provenientes del propio ganglio, así como fibroblastos y también otros tipos celulares provenientes de la posible contaminación celular a la hora de la extracción del tejido. Para evitar la proliferación excesiva de dichos tipos celulares, se añadieron al medio de cultivo FdU (inhibidor de la timidilato sintetasa) junto con uridina, bloqueando así el ciclo celular de las células capaces de dividirse en el cultivo. Las neuronas fueron fácilmente reconocibles por su morfología, y diferenciadas del resto de células.

Los cultivos se mantuvieron durante 4 días. El primer día se llevó a cabo la extracción y la siembra en placas de 48 pocillos pretratadas. El segundo día se llevó a cabo el cambio de medio de cultivo y, tras la incubación durante 24 horas, algunos pocillos se fijaron con paraformaldehído para estudios por inmunocitoquímica, mientras que a otros pocillos se añadieron los diferentes tratamientos que se mantuvieron 24 horas más. En este caso, la radiación que se empleó se mantuvo durante 18 horas y fue radiación de baja intensidad (2.09 W/m^2 de luz azul y 6.5 W/m^2 de luz roja). Además de tratamientos con luz, los cultivos se expusieron a diferentes tóxicos: rotenona, 3NP, antimicina, azida sódica, oligomicina, CCCP, CoCl_2 , glutamato y BSO, añadidos 1 hora antes del tratamiento con luz. Posteriormente ciertos pocillos se analizaron, una vez fijadas las células, por inmunocitoquímica y en vivo se midió la actividad mitocondrial. Además, se realizaron recuentos manuales una vez fijadas, tanto del número total de núcleos por pocillo, como del número de neuronas en el mismo.

c1.2.2. Resultados y discusión.

En la figura c1.2.1 se observa la tinción de una neurona en cultivo con el anticuerpo anti TUJ-1 (figura c1.2.1C) en rojo, TOMM20 (figura c1.2.1B) en verde y la tinción nuclear por DAPI en azul (figura c1.2.1A). TUJ-1 es una β -tubulina de clase III específica de las neuronas, que nos permite diferenciarlas inmunocitoquímicamente del resto de células del cultivo, mientras que TOMM20 es una proteína que nos permite localizar las mitocondrias. La figura c1.2.1D es el resultado de la combinación de los tres canales, y en ella se puede observar como en el cuerpo neuronal existe una altísima concentración de mitocondrias, que además se localizaron agrupadas también en los puntos en los que se produjeron las ramificaciones de las prolongaciones (figura c1.2.2E)

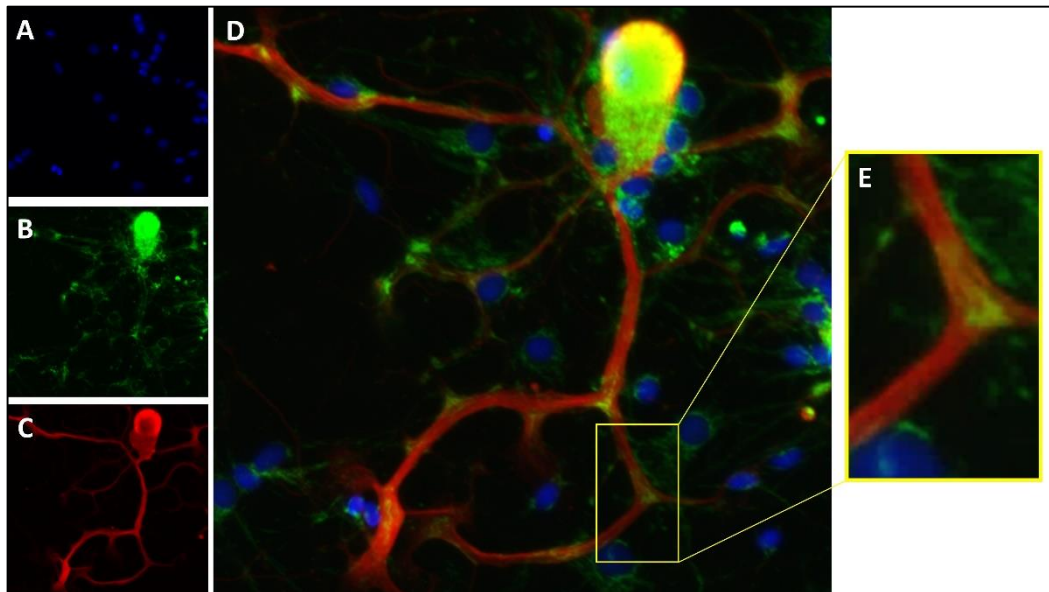


Figura c1.2.1. Fotografías de neurona procedente del ganglio trigémino en cultivo, con células accesorias asociadas a sus prolongaciones. A) Tinción nuclear con DAPI. 20x. B) Inmunofluorescencia de la proteína mitocondrial TOMM20. 20x. C) Inmunofluorescencia de la proteína neuronal TUJ1. 20x. D) composición de las fluorescencias anteriores. E) Ampliación de una zona de división de una de las prolongaciones neuronales en la que se observa la acumulación de tinción de TOMM20. n=9.

La exposición a concentraciones seriadas de azida sódica produjo una disminución del número de células en el cultivo dependiente de la concentración empleada, como se observa en las imágenes de la figura c1.2.2A, especialmente en las de la segunda columna donde los pocillos fueron incubados con DAPI. Además, se observa en la tinción para la TUJ1 cómo en los cultivos más deteriorados que, se corresponden a las concentraciones más altas de azida sódica, se produce una interrupción de la tinción, indicando degeneración de las prolongaciones. El análisis

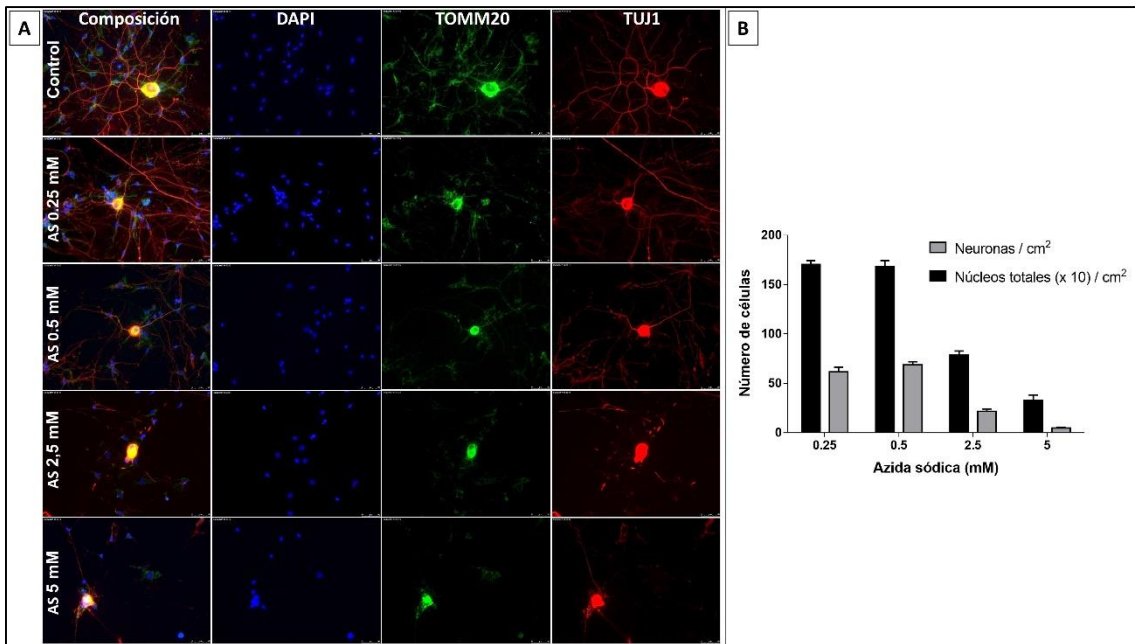


Figura c1.2.2. A) Inmunofluorescencia de los cultivos de neuronas procedentes de ganglio trigémino de rata en las que se observa la tinción nuclear con DAPI en azul, la localización de la proteína mitocondrial TOMM20 en verde y la proteína TUJ1 neuronal en rojo, junto con la composición de todos los canales, en presencia de concentraciones crecientes de azida sódica, inhibidor del complejo IV mitocondrial. 20x. B) Análisis cuantitativo del recuento de núcleos por cm² frente a diferentes concentraciones de azida sódica. Los resultados de n=8 se expresan como promedio ±SEM.

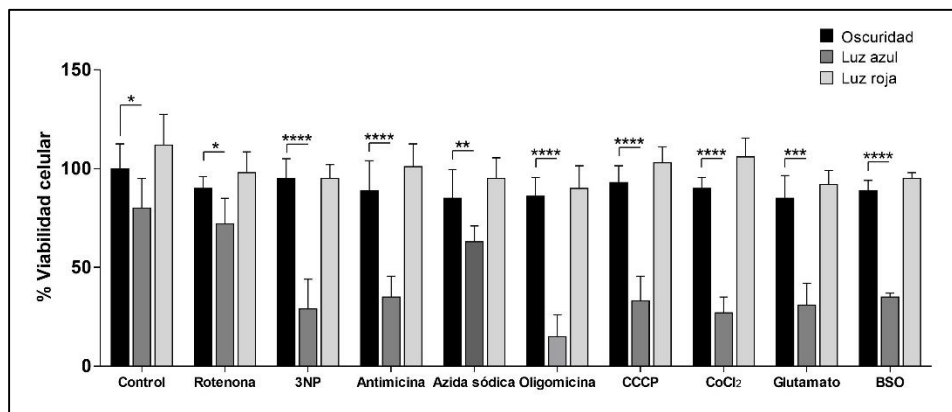


Figura c1.2.3. Representación de la viabilidad celular analizada con el reactivo MTT en cultivos neuronales de ganglio trigémino, tratados durante 24 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona 0.4 μM, 3NP 0.6 mM, antimicina 3 μM, azida sódica 0.5 mM), daños a la ATP-sintasa (oligomicina 0.4 μM, CCCP 0.1 μM), simuladores de hipoxia (CoCl₂ 30 μM), excitotóxicos (glutamato 0.5 mM) e inhibidores de la síntesis de glutatión (BSO 0.5 mM). Los resultados de n=8 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, α=0.05, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

cuantitativo de los recuentos de los núcleos en general y únicamente de los correspondientes a las neuronas en la figura c1.2.2B muestra como la concentración creciente de azida sódica

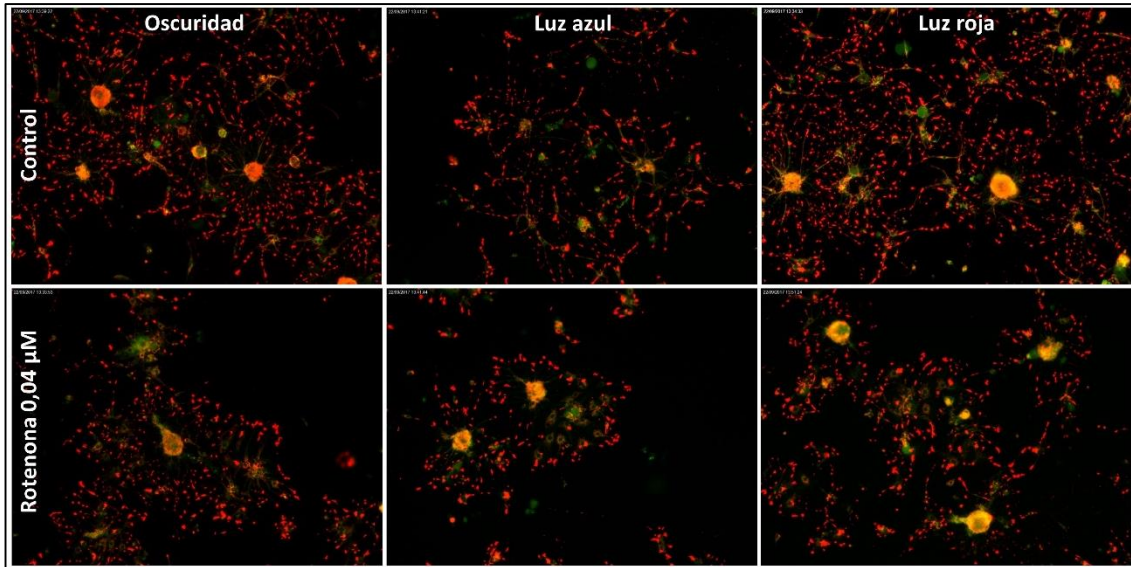


Figura c1.2.4. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con rotenona en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m^2 de luz azul y 6.5 W/m^2 de luz roja). 10x. n=5.

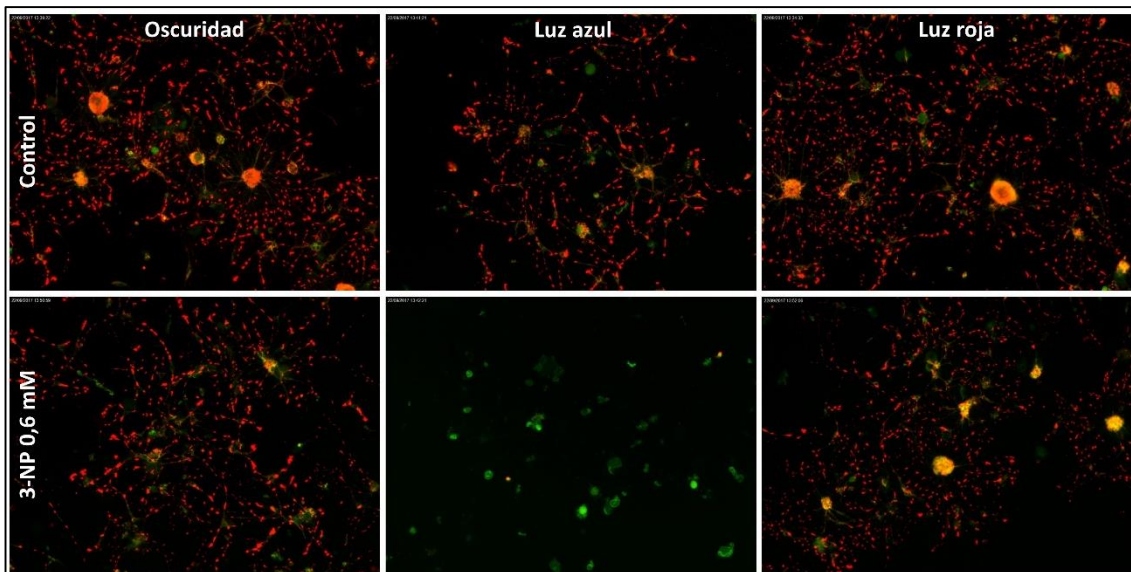


Figura c1.2.5. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con 3NP en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m^2 de luz azul y 6.5 W/m^2 de luz roja). 10x. n=5.

produjo disminución en el número de células totales y en el número de neuronas en los cultivos. Tomando como referencia la concentración de azida sódica elegida para estos estudios, se disminuyó en igual porcentaje la del resto de inhibidores selectivos de las enzimas mitocondriales empleadas en los siguientes experimentos.

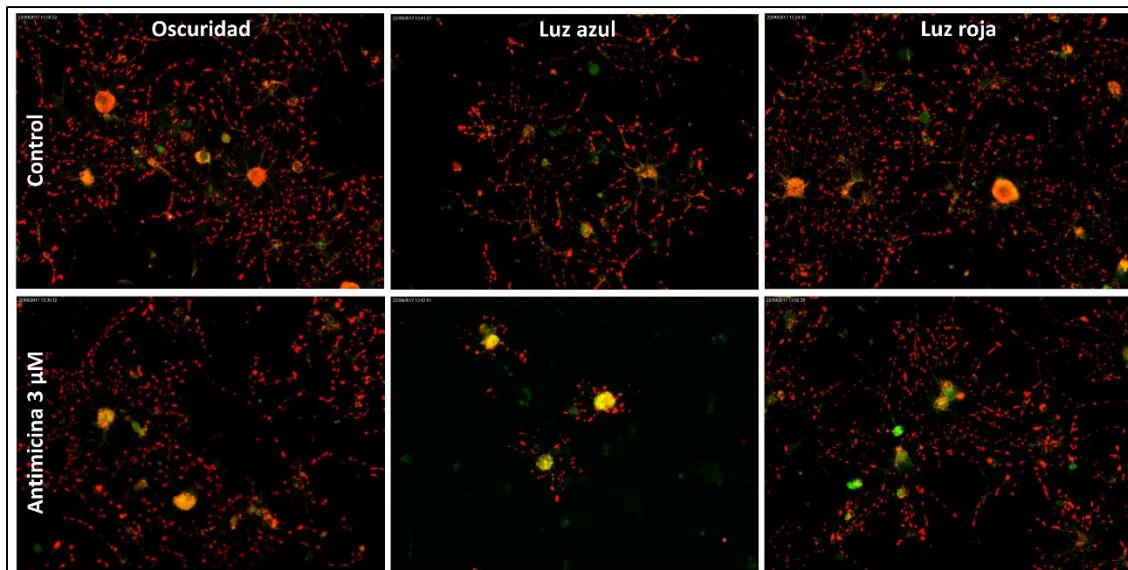


Figura c1.2.6. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con antimicina en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m^2 de luz azul y 6.5 W/m^2 de luz roja). 10x. n=5.

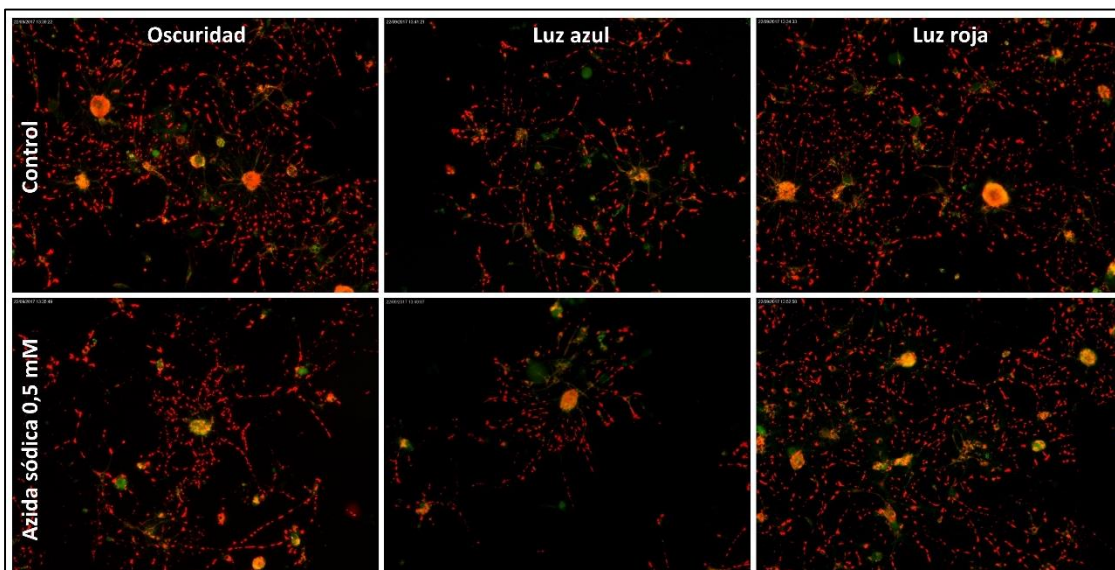


Figura c1.2.7. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con azida sódica en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m^2 de luz azul y 6.5 W/m^2 de luz roja). 10x. n=5.

El análisis de la viabilidad celular de los cultivos reveló que todos los tóxicos empleados redujeron la viabilidad cuando se incubaron en oscuridad en un porcentaje entre el 10-15% (figura c1.2.3). Se utilizaron concentraciones bajas de tóxicos para que la incubación bajo diferentes radiaciones diera lugar a un resultado cuantificable. De esta manera, cuando los

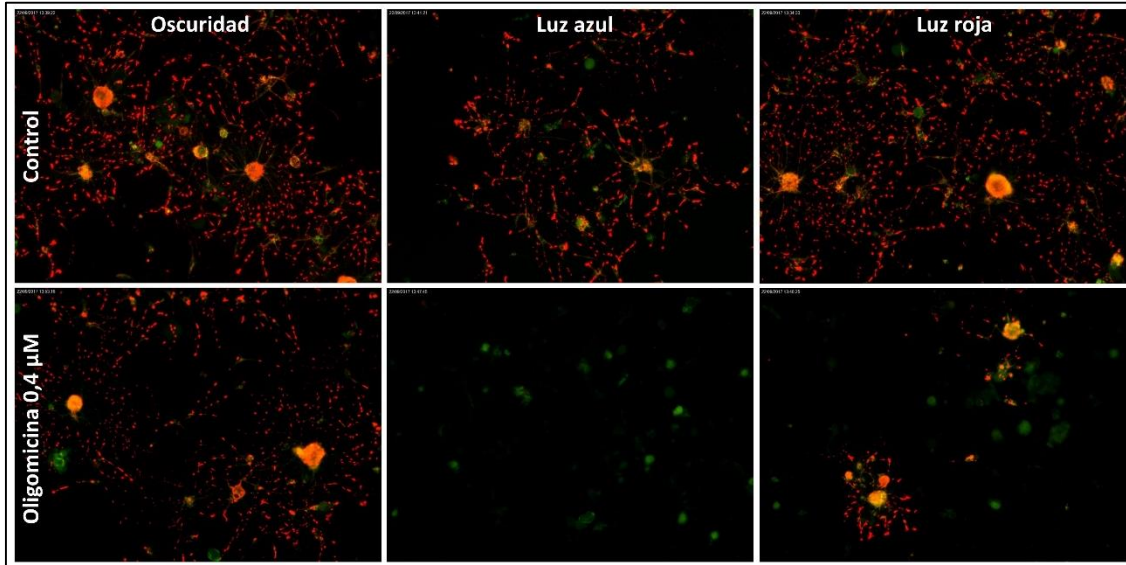


Figura c1.2.8. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con oligomicina en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m^2 de luz azul y 6.5 W/m^2 de luz roja). 10x. n=5.

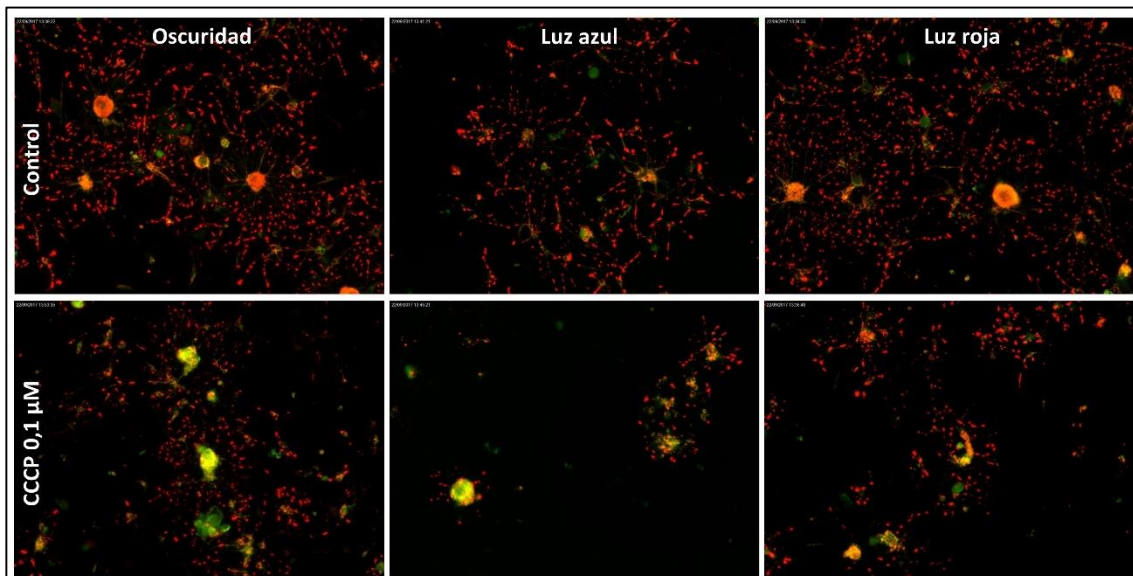


Figura c1.2.9. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con CCCP en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m^2 de luz azul y 6.5 W/m^2 de luz roja). 10x. n=5.

cultivos se expusieron a luz azul, que por sí sola causó alrededor de un 20% de daño, se vio que la viabilidad disminuyó en todos los casos, pero no en igual medida. En el caso de la coincubación con rotenona y con azida sódica, los valores de viabilidad se redujeron en porcentajes inferiores al 10%, mientras que, en el caso de la oligomicina, así como el resto de tóxicos, los valores de

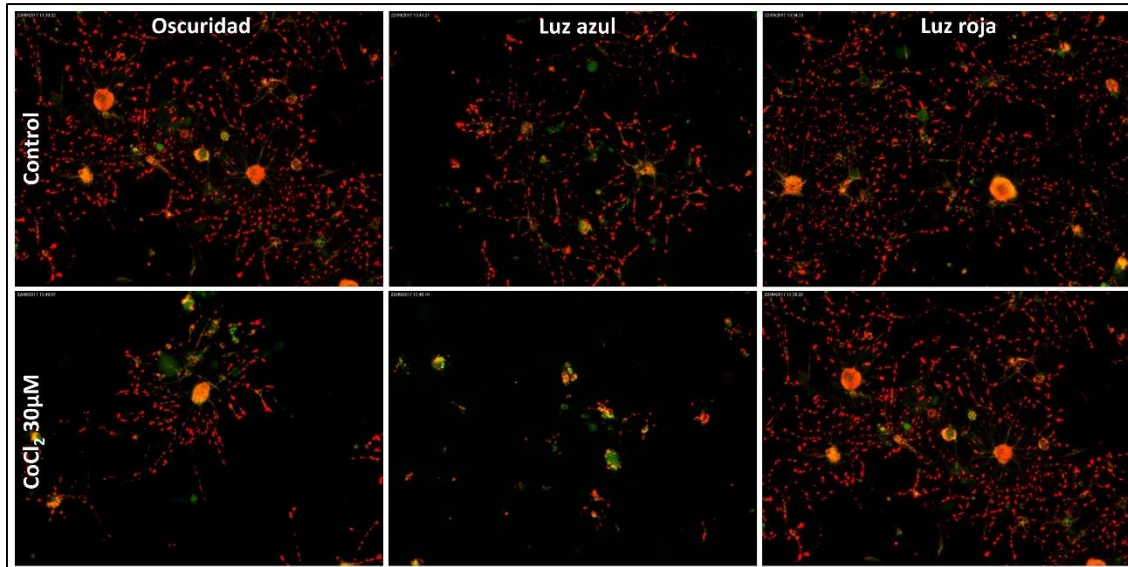


Figura c1.2.10. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con CoCl₂ en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m² de luz azul y 6.5 W/m² de luz roja). 10x. n=5.

viabilidad no superaron el 40%. En el caso de la incubación con luz roja, no se encontraron diferencias significativas comparada con la incubación en oscuridad, y la viabilidad de los cultivos coincubados con los tóxicos mejoró en todos los casos.

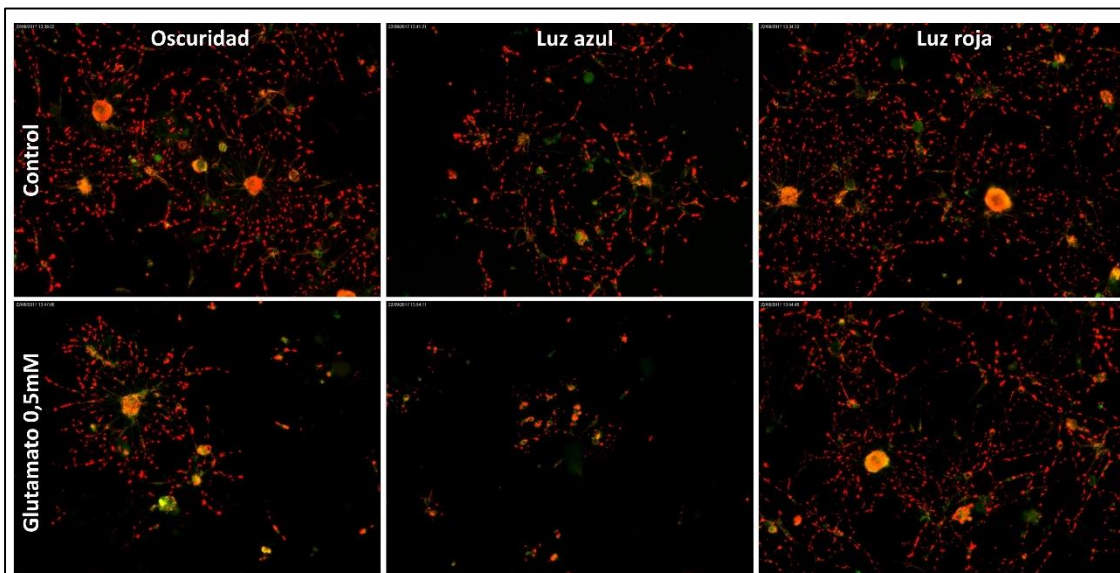


Figura c1.2.11. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con glutamato en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m² de luz azul y 6.5 W/m² de luz roja). 10x. n=5.

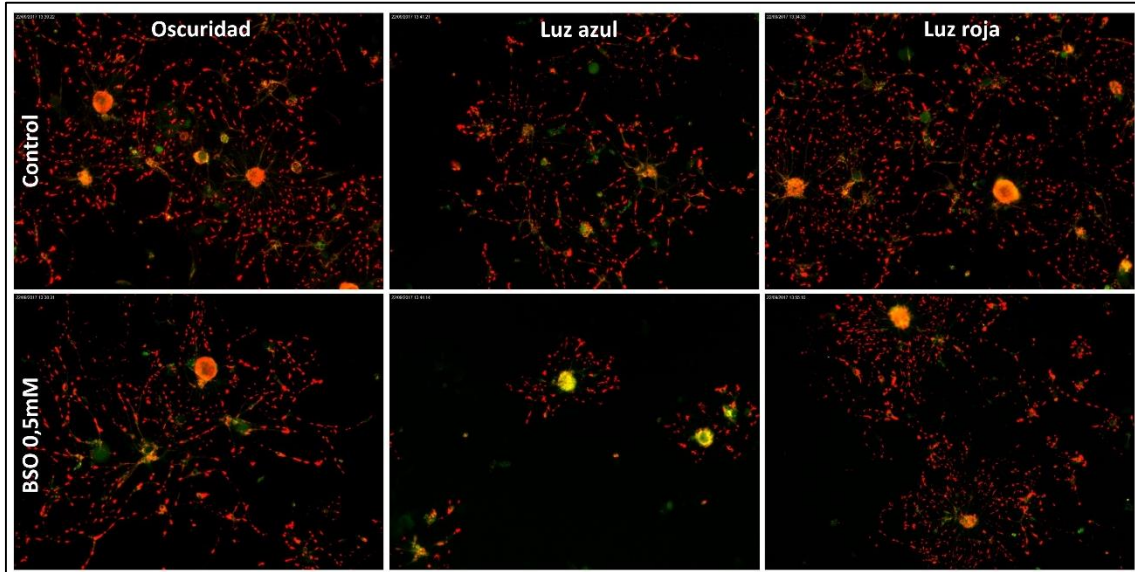


Figura c1.2.12. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células obtenidas en el cultivo de los ganglios trigéminos con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con BSO en oscuridad o bajo radiación de baja intensidad (2.09 W/m^2 de luz azul y 6.5 W/m^2 de luz roja). 10x. n=5.

Cuando los cultivos *in vivo* se incubaron con el reactivo JC-1 para evaluar la actividad mitocondrial (figuras 1.2.4 a 1.2.12) tras los tratamientos anteriores, se observó que en los casos de exposición a 3NP y oligomicina no se registró fluorescencia roja, por lo que se concluye que en ellos no había ninguna actividad mitocondrial. En el resto de las coincubaciones la actividad

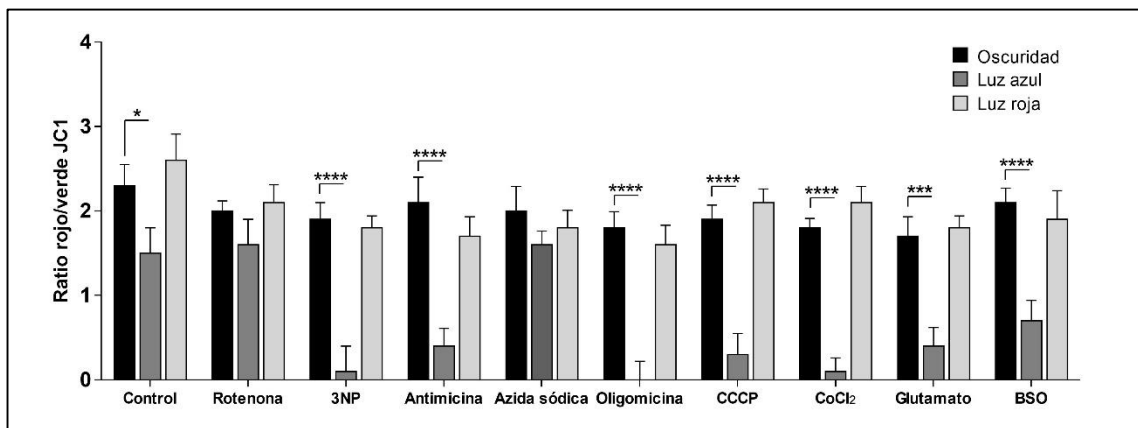


Figura c1.2.13. Análisis cuantitativo de la actividad mitocondrial expresada como la ratio de fluorescencia roja frente a fluorescencia verde en cultivos neuronales de ganglio trigémino, tratados durante 24 horas con diferentes inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales (rotenona $0.4 \mu\text{M}$, 3NP 0.6 mM , antimicina $3 \mu\text{M}$, azida sódica 0.5 mM), daños a la ATP-sintasa (oligomicina $0.4 \mu\text{M}$, CCCP $0.1 \mu\text{M}$), simuladores de hipoxia (CoCl_2 $30 \mu\text{M}$), excitotóxicos (glutamato 0.5 mM) e inhibidores de la síntesis de glutatión (BSO 0.5 mM). Los resultados de n=8 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way ANOVA*, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** $p < 0.0001$).

mitocondrial fue baja, como se observa en la cuantificación en la figura c1.2.13. Cuando la incubación se realizó en luz roja,

Estos resultados indican que en un cultivo de neuronas *in vitro*, la exposición a radiación azul de baja intensidad tiene un efecto negativo (figura c1.2.3), mientras que la exposición directa de neuronas a luz de longitud de onda larga no tiene efecto negativo en las mismas. Además, cuando se provocó que las mitocondrias no estuvieran en estado óptimo, sino que presentasen algún tipo de disfunción, con el uso de diferentes tóxicos, la coincubación con radiación de onda corta disminuyó drásticamente la viabilidad de los cultivos, así como su actividad mitocondrial. Ocurrió en los casos de inhibición de los diferentes complejos (figuras 1.2.4 a 1.2.7), en disfunciones de la síntesis de ATP o generación del gradiente de protones (figura c1.2.8 y 1.2.9), al simular en los cultivos condiciones de hipoxia (figura c1.2.10), al exponerlos a un daño por excitotoxicidad (figura c1.2.11) y al inhibir la síntesis de glutatión (figura c1.2.12). La relación entre la luz azul y la rotenona o el 3NP requerirían estudios más detallados para entender la diferencia de la coexposición cuando se encuentra bloqueado un complejo u otro. En todos estos casos, la luz de longitud de onda larga no solo no empeoró el daño causado por los tóxicos, sino que mantuvo unos mejores valores de actividad mitocondrial, indicando a las intensidades empleadas, su aplicación directa es beneficiosa para la supervivencia neuronal.

Capítulo II

Capítulo II: Luz y superficie ocular I. Incremento de la supervivencia, proliferación y migración de las células de epitelio corneal *in vitro* expuestas a longitudes de onda largas del espectro electromagnético de la luz. Relevancia en procesos de cicatrización corneal.

c2.1. Introducción.

El epitelio corneal, como barrera mecánica más externa del ojo humano, está expuesto a daños de diverso tipo. Todos ellos pueden acabar produciendo rupturas de la capa epitelial externa lo que conlleva la expresión por parte de las células epiteliales de respuestas de regeneración que implican moléculas mediadoras de inflamación, factores de crecimiento y citoquinas. Así se activan las diferentes vías celulares relacionadas con la proliferación, migración, adhesión y diferenciación de las células epiteliales que se incluyen dentro de dichos procesos de cicatrización corneal¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Un proceso de cicatrización corneal rápido y, especialmente, la reconstrucción de la membrana basal dañada, son necesarios para la restauración de la función corneal normal. La reparación rápida de las funciones previene que factores de crecimiento epiteliales como el TGF- β o el PDGF se filtren y penetren en el estroma, causando depósitos anormales de colágeno y opacidades corneales¹⁴⁸. Se han descrito numerosas sustancias capaces de modificar la velocidad con la que sucede este proceso de cicatrización¹⁵⁰, entre ellas, donadores de óxido nítrico¹⁵¹⁻¹⁵³.

La córnea está expuesta de manera natural a la luz solar, pero responde de diferente manera según sea la longitud de onda de la radiación que recibe. Se sabe que las longitudes de onda cortas del espectro visible, así como las longitudes UV, son especialmente dañinas^{144,154,155}, mientras que los fotones correspondientes a las longitudes de onda largas, que no llevan asociado un incremento de temperatura del tejido durante su exposición, pueden ser absorbidos por las mitocondrias. Esta absorción se traduce en actividad biológica, que ha resultado ser beneficiosa en procesos patológicos, produciendo alivio de dolor y disminución de la inflamación¹⁵⁶⁻¹⁵⁹, relacionados con la cicatrización corneal. El lugar concreto de actuación de esta luz roja en las mitocondrias se relaciona con la enzima citocromo C oxidasa (COX)^{155,160}, interacción que desencadena una estimulación en la cadena respiratoria mitocondrial y, consecuentemente, la activación de diversas rutas de señalización. El nivel de óxido nítrico se eleva de manera significativa, lo cual, en tejidos vascularizados, produce entre otros efectos un incremento del flujo sanguíneo y una reducción de la inflamación^{161,162}. El espectro de absorción

obtenido para la COX en diferentes estados de oxidación es similar al espectro de acción obtenido para las mismas respuestas biológicas tras la exposición a luz roja¹⁵⁵, ello implica que la absorción de la energía luminosa provoca una foto-disociación del óxido nítrico de la COX¹⁶³. Esta foto-disociación permite un incremento de actividad enzimática de la COX¹²⁰, así como un incremento en el transporte de electrones, consumo de oxígeno, tasa de respiración mitocondrial y producción de ATP¹⁶⁴. Por lo tanto, la luz roja afecta al estado de reducción-oxidación (REDOX) celular o mitocondrial, activando así diferentes rutas intracelulares de señalización, y modificando la afinidad de los factores de transcripción relacionados con procesos de migración celular, proliferación, supervivencia y regeneración tisular¹⁵⁵.

La aplicación de luz roja produce beneficios en varios tipos de dolencias. A este tipo de terapia se le denomina fotobiomodulación celular, fototerapia o terapia con láser de baja intensidad. Estos procedimientos, al ser no invasivos, presentan una opción muy adecuada para el tratamiento de córneas dañadas cuya reparación involucre procesos de proliferación, migración, adhesión, diferenciación y muerte celular¹⁴⁷⁻¹⁴⁹, independientemente de cuál sea la causa. Para la aplicación de la luz, pueden usarse fuentes coherentes de luz, tipo láser, o fuentes no coherentes tipo LED.

c2.2. Diseño experimental.

Durante el desarrollo de estos experimentos se evaluaron parámetros que permitieron establecer las características del proceso de cicatrización, tales como viabilidad y proliferación celular en cultivos in vitro de una línea celular de epitelio corneal.

- Para los estudios de proliferación y migración, las células se sembraron en placas de 48 pocillos. Se realizó una descamación circular (tamaño medio de $1.317 \pm 0.116 \text{ mm}^2$, $n=15$) y se incubaron las diferentes placas bajo los diferentes regímenes de exposición lumínica: luz azul (λ_{max} 470 nm, 10.5W/m^2 o 5.7W/m^2) y luz roja (λ_{max} 630 nm, 7.32W/m^2), analizando cada 8 horas la evolución de la herida hasta el cierre total de la misma. Para el registro se utilizó un microscopio de contraste de fases (con un aumento de 5x) para captar las imágenes que se analizaron posteriormente utilizando Adobe Photoshop CS6 y el *software* ImageJ. Además, se evaluó el nivel de producción de EROs en los diferentes cultivos, así como su actividad mitocondrial, y los cambios en la expresión de diferentes proteínas a las 8 horas de haberse producido el daño.
- Estudios en cultivos celulares sin descamación. Para estos experimentos, las células se sembraron en placas de 96 pocillos (para estudios de viabilidad), 6 pocillos (para

estudios de WB) o 48 pocillos (estudios de inmunocitoquímica, actividad mitocondrial y análisis de EROS). Se utilizaron 0.1, 1.5 y 0.25 μL de células de una solución que contenía 150.000 cels/mL. Se incubaron en diferentes condiciones de luz, luz azul (10.5 W/m^2 , 18 horas) o roja (7.32 W/m^2 , 12 horas), en ocasiones en ausencia o presencia de azida sódica. Se analizó la viabilidad celular, la actividad mitocondrial y la producción de EROS. Además, algunos de los pocillos fueron fijados para estudios de expresión proteica por inmunocitoquímica o recogidas para el análisis por WB, así como para el análisis por qPCR.

c2.3. Resultados.

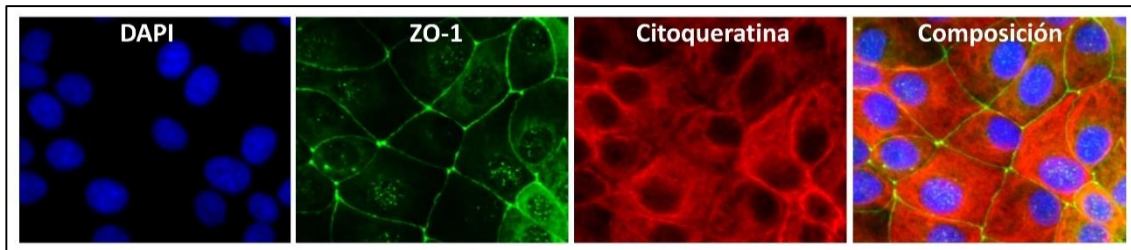


Figura c2.1. Imágenes de cultivos confluentes de la línea celular HCE-2 teñidas para la Inmunolocalización de las proteínas ZO-1 (verde), citoqueratina (rojo) y marcaje nuclear con DAPI (azul). 20x. n=3.

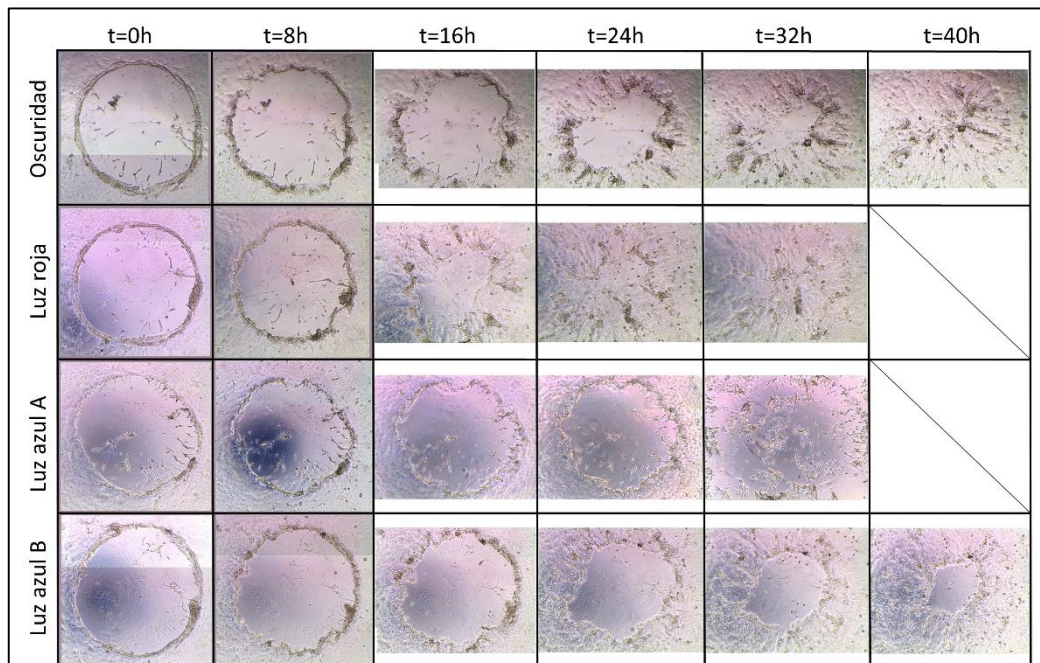


Figura c2.2. Cultivos de HCE-2 en los que se reanuda la desambladura en cuadros fotográficos a diferentes tiempos, incubados bajo distintos regímenes de radiación: oscuridad, luz roja (7.32 W/m^2), luz azul A (10.5 W/m^2) y luz azul B (5.7 W/m^2) durante un máximo de 40 horas hasta el cierre del control en oscuridad. 5x. n=5.

Como se muestra en la figura c2.1, las células HCE-2 vecinas en cultivos confluentes son positivas para la inmunocitocalización de la proteína ZO-1. Además, los cultivos son positivos para la expresión de la proteína citoqueratina, que se localiza en el citoplasma de las células HCE-2, como se ve en las imágenes en las que además los núcleos están teñidos con DAPI. La expresión de ambas proteínas, especialmente la ZO-1, indica la idoneidad de estas células en cultivo para como modelo para evaluar daños en las uniones estrechas.

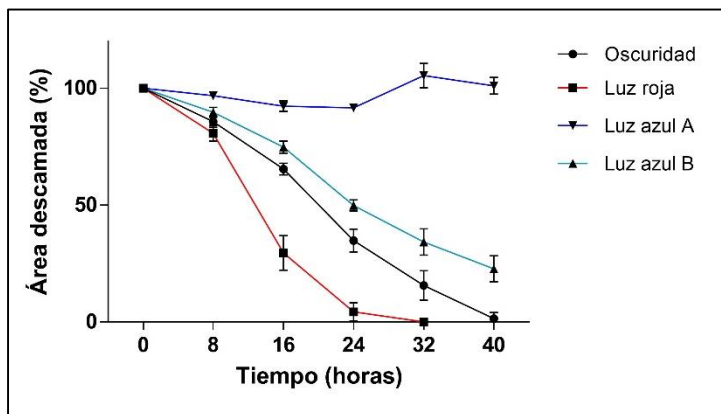


Figura c2.3. Resultado del análisis cuantitativo de la evolución de la medida del área descamada a lo largo de 40 horas en cultivos de HCE-2 en los que se realizaron descamaciones circulares y se incubaron bajo distintos regímenes de radiación: oscuridad, luz roja (7.32 W/m^2), luz azul A (10.5 W/m^2) y luz azul B (5.7 W/m^2). Los resultados de $n=5$ se expresan como promedio \pm SEM.

En las figuras c2.2 y c2.3 se muestran los resultados de los cultivos confluentes de las células HCE-2 en los que se realizó la descamación de forma circular ($1.317 \pm 0.116 \text{ mm}^2$, $n = 15$) previa al mantenimiento de los mismos en condiciones de oscuridad o exposición a luz roja o azul durante 40 horas. Las áreas sin células se midieron (figura c2.3) y se fotografiaron a diferentes tiempos (figura c2.2).

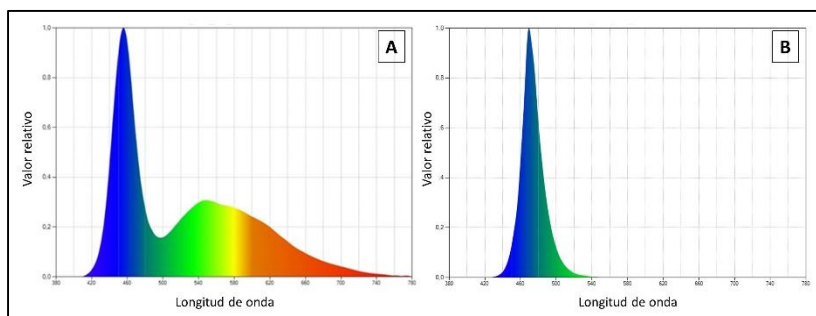


Figura c2.4. Espectros de emisión de una pantalla de ordenador (A) y del dispositivo emisor construido con diodos LEDs azules (B).

Los cultivos mantenidos en la oscuridad mostraron una repoblación gradual de células en el área descamada, llegando al recubrimiento completo de la misma a las 40 horas. La tasa de repoblación en presencia de luz roja (7.32 W/m^2) fue más rápida, comparada con la de las células mantenidas en oscuridad. En el caso de la luz azul más intensa (10.5 W/m^2), tras las primeras 16 horas en las que no pareció haber diferencias significativas, se observó cómo las células comenzaban a desprenderse de la placa, hasta acabar muriendo. La incubación bajo luz azul de

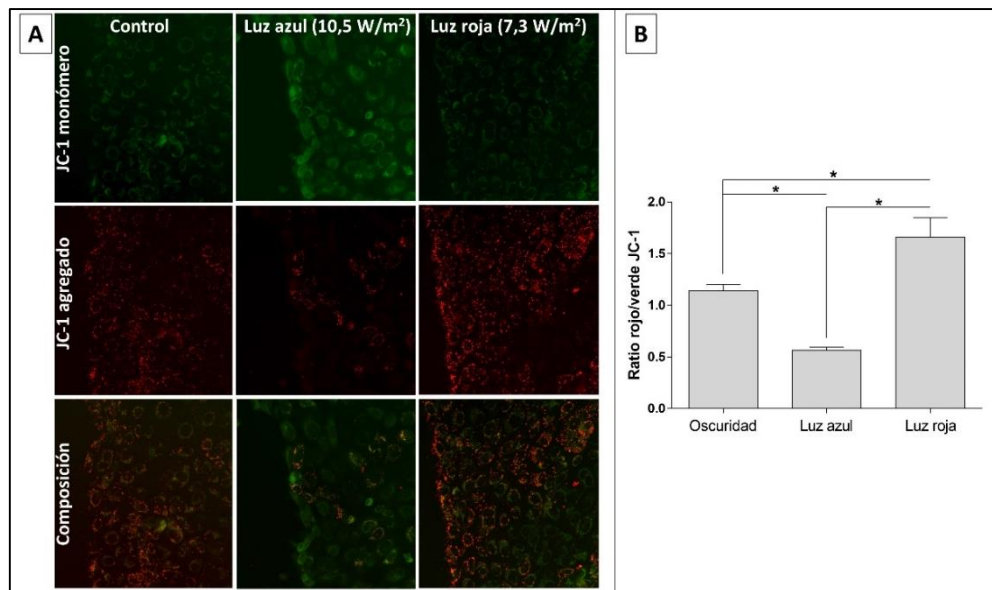


Figura c2.5. Análisis de la actividad mitocondrial de las células HCE-2 en cultivo con el reactivo JC-1, tratadas durante 8 horas bajo distintos regímenes de radiación: oscuridad, luz roja (7.32 W/m²), luz azul A (10.5 W/m²) y luz azul B (5.7 W/m²). A) Fotografías de la fluorescencia verde citoplasmática, los agregados intramitocondriales rojos y la composición de ambas fluorescencias, en las células del cultivo colindantes a la zona de la descamación. 20x. n=4. B) Análisis cuantitativo de la actividad mitocondrial expresada como la ratio de fluorescencia roja frente a fluorescencia verde. Los resultados de n=4 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Mann-Whitney*, (* p < 0.0286).

menor intensidad (5.7 W/m²), intensidad comparable a la emitida por una pantalla de ordenador (figura c2.4), no causó toxicidad celular, pero provocó que las células cerrasen más lentamente el área descamada, de manera que, tras 40 horas de incubación, el tamaño de la misma se redujo en aproximadamente un 80% comparado con los pocillos de las células en oscuridad.

En la figura c2.5A se puede ver el resultado de la incubación con el reactivo JC-1 de los pocillos tras 8 horas de incubación bajo las diferentes condiciones de luz u oscuridad. El reactivo, incorporado al citoplasma celular en forma de monómero, es procesado en las mitocondrias con actividad, formando agregados dentro de las mismas con fluorescencia en color rojo. En el caso de los cultivos expuestos a luz azul de mayor intensidad (10.5 W/m²), la fluorescencia observada fue principalmente verde, mientras que, en el caso de los pocillos incubados en oscuridad, considerados control, existe un equilibrio entre las fluorescencias roja y verde. En el caso de la incubación bajo luz roja (7.32 W/m²) se incrementa la cantidad de fluorescencia roja. En la figura c2.5B se muestra la cuantificación de la fluorescencia expresada como la ratio entre fluorescencia roja y fluorescencia verde, y se observa cómo ésta es mayor en el caso de las células expuestas a la luz roja comparada con las células en oscuridad, mientras que las células expuestas a luz azul muestran claramente una disminución de la ratio debida a la falta de fluorescencia roja.

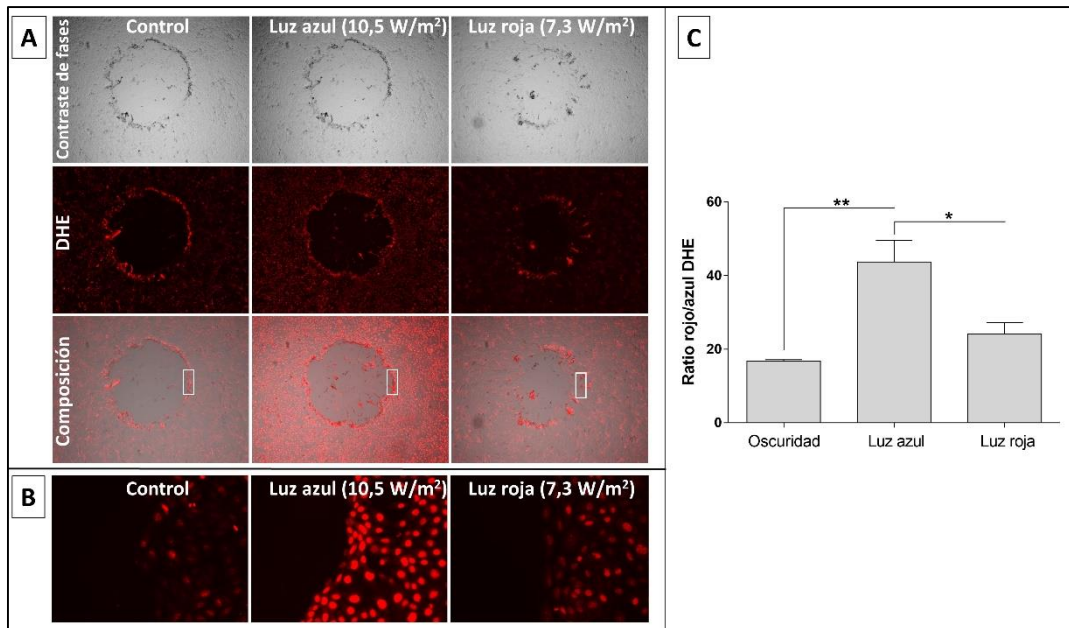


Figura c2.6. Análisis de la producción de EROs de las células HCE-2 en cultivo con el reactivo DHE, tratadas durante 8 horas bajo distintos regímenes de radiación: oscuridad, luz roja (7.32 W/m²), luz azul A (10.5 W/m²) y luz azul B (5.7 W/m²). A) Fotografías de la fluorescencia roja nuclear y de contraste de fases, así como la composición de ambas. 5x. n=4. B) Fotografías de la fluorescencia roja en las células del cultivo colindantes a la zona de la descamación. 20x. n=4. C) Análisis cuantitativo de la producción de EROs expresada como la ratio de fluorescencia roja frente a fluorescencia verde. Los resultados de n=4 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Mann-Whitney*, (* $p < 0.0286$).

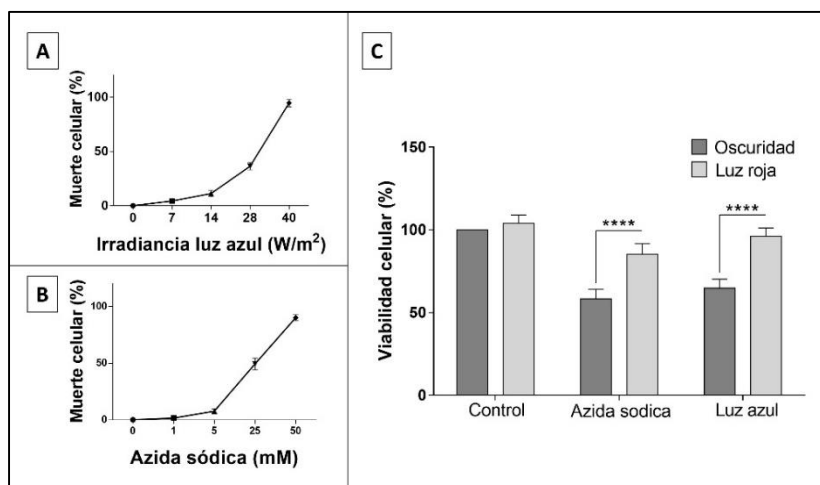


Figura c2.7. Análisis cuantitativo de la viabilidad celular de cultivos de células HCE-2 mediante el reactivo MTT, tratados durante 18 horas con diferentes intensidades de luz azul (A) o diferentes concentraciones de azida sódica (B). La figura C muestra los resultados en términos de viabilidad celular de la exposición de las células HCE-2 a diferentes tratamientos: oscuridad durante 30 horas, 18 horas de oscuridad seguidas de 12 horas de luz roja (7.32 W/m²), 18 horas de azida sódica (20 mM) seguidas de 12 horas de oscuridad o de luz roja, y 18 horas de luz azul (16.8 W/m²) seguidas de oscuridad o de luz roja. Los resultados de n=6 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way ANOVA*, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (*** $p < 0.001$).

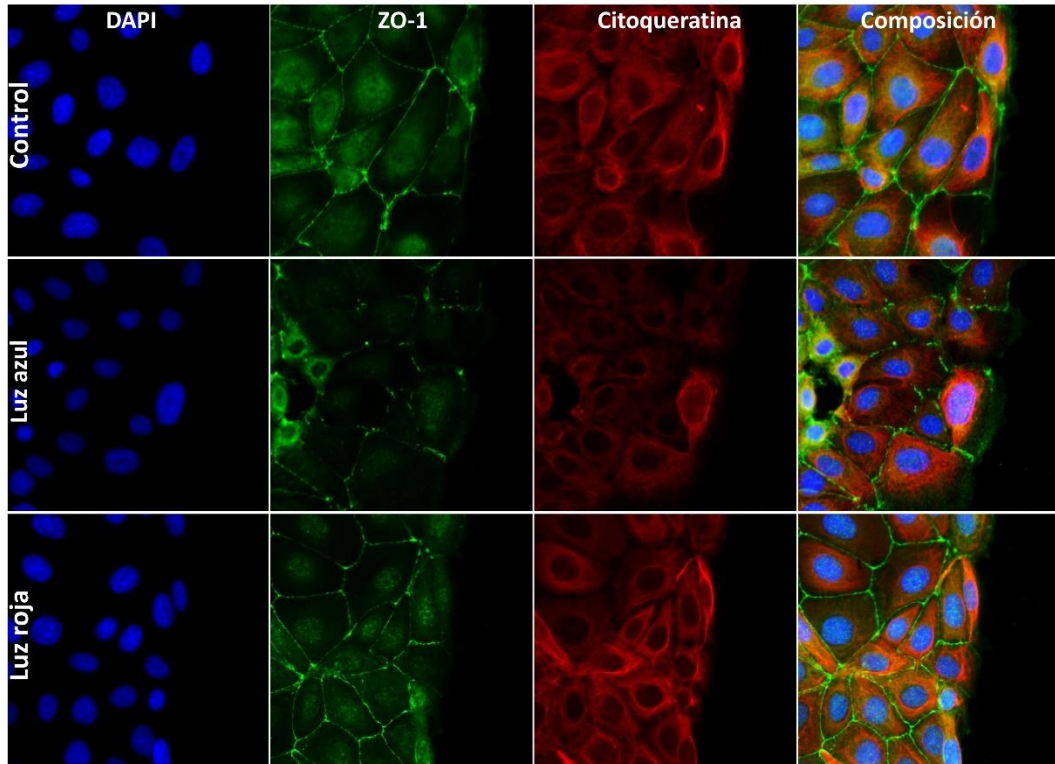


Figura c2.8. Imágenes de cultivos confluentes de la línea celular HCE-2 teñidas para la inmunolocalización de las proteínas ZO-1 (verde), citoqueratina (rojo) y marcaje nuclear con DAPI (azul) mantenidos durante 24 horas en oscuridad (control), luz azul (10.5 W/m^2) o luz roja (7.3 W/m^2). 20x. n=4.

las diferentes condiciones utilizando el indicador DHE (figura c2.6). Se observa claramente que, tras 8 horas de exposición a luz azul, existe un incremento de la fluorescencia roja producida por

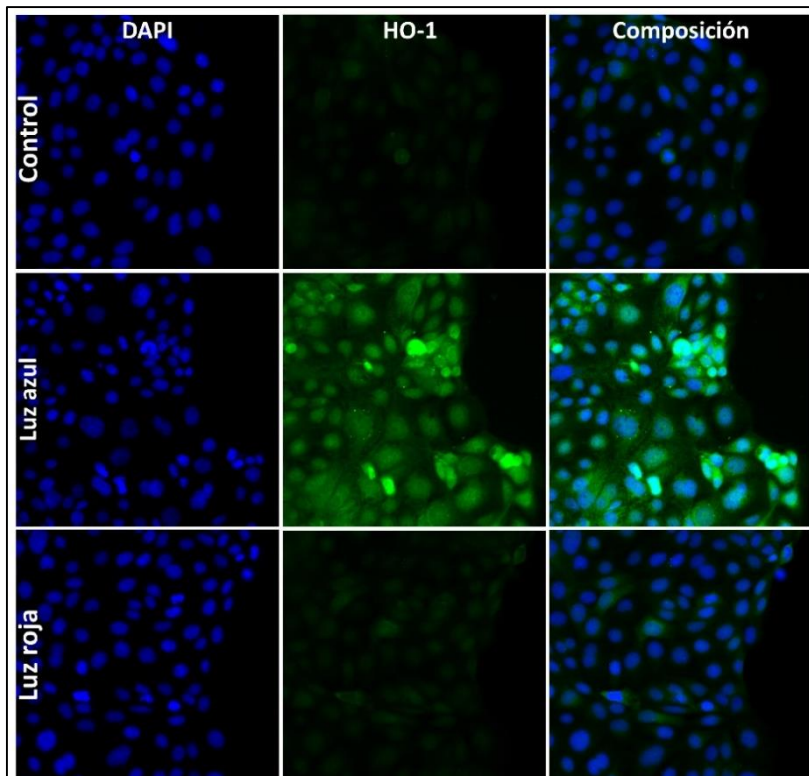


Figura c2.9. Imágenes de cultivos confluentes de la línea celular HCE-2 teñidas para la inmunolocalización de la proteína HO-1 (verde) y marcaje nuclear con DAPI (azul) mantenidos durante 24 horas en oscuridad (control), luz azul (10.5 W/m^2) o luz roja (7.3 W/m^2). 20x. n=4.

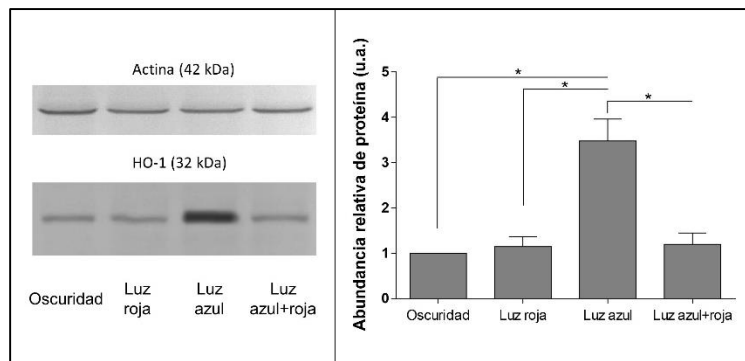


Figura c2.10. Análisis por WB de la expresión de la proteína HO-1 (32 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en cultivos de células HCE-2 incubados en oscuridad durante 30 horas, 18 horas de oscuridad seguidas de 12 horas de luz roja (7.3 W/m^2), 18 horas de luz azul (5.7 W/m^2) seguidas de 12 horas de luz roja y 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de luz roja. A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa de la HO-1 en los diferentes tratamientos. Los resultados de $n=3$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *RM-one-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (* $p < 0.1$).

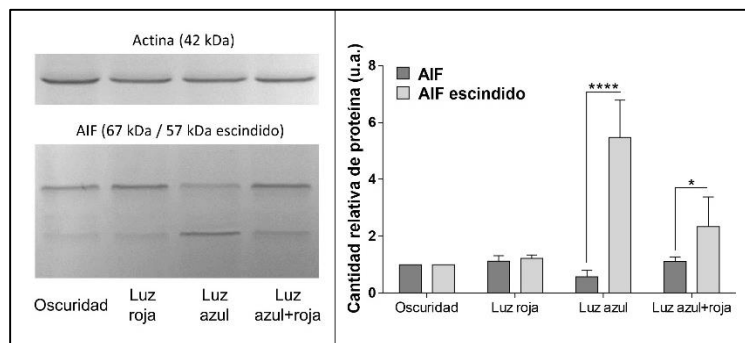


Figura c2.11. Análisis por WB de la expresión de la proteína AIF (67 kDa) y su subproducto procedente de su escisión (57 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en cultivos de células HCE-2 incubados en oscuridad durante 30 horas, 18 horas de oscuridad seguidas de 12 horas de luz roja (7.3 W/m^2), 18 horas de luz azul (5.7 W/m^2) seguidas de 12 horas de luz roja y 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de luz roja. A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa del AIF y su subproducto en los diferentes tratamientos. Los resultados de $n=3$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *RM-one-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (* $p < 0.1$).

la tinción con DHE, comparada con los pocillos tanto control como aquellos expuestos a la luz roja (figura c2.6A). Las células situadas en el borde de la zona en la que se ha producido la descamación tienen un nivel más alto de fluorescencia en todos los casos (figura c2.6B), en contraste con las células confluentes del resto del cultivo, cuya fluorescencia varía según las condiciones lumínicas de la incubación. En la figura c2.6C se ve el resultado del análisis cuantitativo de la fluorescencia general de los pocillos, comparando la cantidad de fluorescencia azul frente a la roja, observándose como en el caso de la incubación con luz azul, el aumento del nivel de EROs es muy elevado.

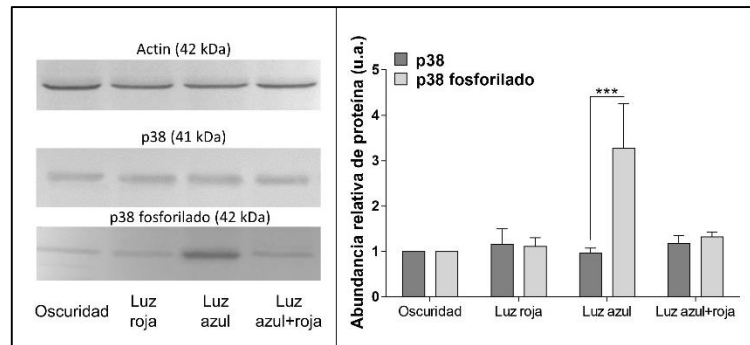


Figura c2.12. Análisis por WB de la expresión de la proteína p38 (41 kDa) y su forma fosforilada (42 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en cultivos de células HCE-2 incubados en oscuridad durante 30 horas, 18 horas de oscuridad seguidas de 12 horas de luz roja (7.3 W/m²), 18 horas de luz azul (5.7 W/m²) seguidas de 12 horas de luz roja y 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de luz roja. A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa de p38 y su forma fosforilada en los diferentes tratamientos. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (* p < 0.1).

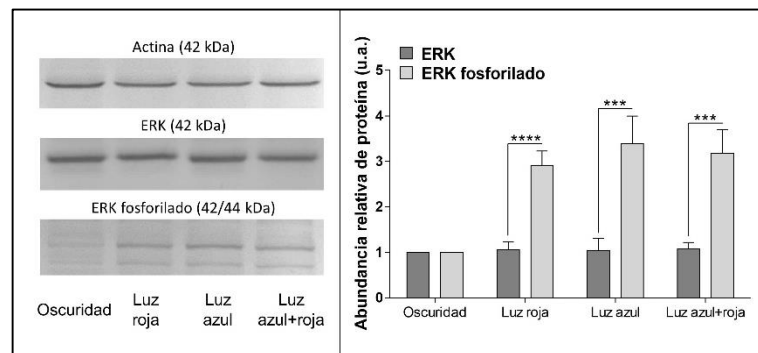


Figura c2.13. Análisis por WB de la expresión de la proteína ERK (42 kDa) y su forma fosforilada (42/44 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en cultivos de células HCE-2 incubados en oscuridad durante 30 horas, 18 horas de oscuridad seguidas de 12 horas de luz roja (7.3 W/m²), 18 horas de luz azul (5.7 W/m²) seguidas de 12 horas de luz roja y 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de luz roja. A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa de ERK y su forma fosforilada en los diferentes tratamientos. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *RM-one-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (* p < 0.1).

La capacidad de la luz roja de tener un efecto positivo en cultivos de células HCE-2 incubados con el inhibidor del complejo IV mitocondrial, azida sódica, se muestra en la figura c2.7, en la que se analizan los resultados del ensayo MTT. En las figuras 2.7A y 2.7B se observa cómo la exposición a diferentes intensidades de radiación de luz azul o diferentes concentraciones de azida sódica, durante 12 horas, sigue un patrón dependiente de la dosis. La pérdida de viabilidad celular del 40% (D₄₀) se sitúa en una intensidad de 16.80 W/m² para la luz azul y una concentración de 20 mM para la azida sódica. La luz roja (7.3 W/m²) aplicada durante 12 horas tras los daños causados por la incubación inicial con luz azul o azida sódica, contrarrestó los

efectos de los mismos, mejorando los datos de viabilidad obtenidos cuando la incubación se realizó en oscuridad (figura c2.7C). Los efectos de la luz azul que se traducen en una disminución de la viabilidad se observan también en la integridad del marcaje inmunocitoquímico para la detección de la proteína ZO-1, como se observa en la figura c2.8 donde se ve claramente la ruptura del marcaje para ZO-1. Además, la luz azul produce un incremento en la expresión de la proteína HO-1 como se observa tanto en la figura c2.9 mediante el análisis por microscopía de fluorescencia y en la figura c2.10 por el análisis mediante WB. También se observa un ligero incremento de la expresión de HO-1 en el caso de la exposición a luz roja en algunas células (figura c2.9), incremento no significativo tras el análisis cuantitativo por WB. Además, se ve cómo después de la exposición a luz azul, la incubación bajo radiación de luz roja disminuye la expresión de la HO-1 (figura c2.10).

La exposición de las células HCE-2 a la luz azul también causa una fragmentación de la proteína AIF dando lugar a un producto de 57 kDa (figura c2.11), así como un incremento en la fosforilación de la quinasa p38-MAPK (figura c2.12). Tanto el grado de fragmentación de AIF y como el incremento de la expresión de la fosfo-p38-MAPK están atenuados cuando se realiza la incubación en condiciones de la luz roja, la cual no tiene ninguna influencia por sí misma. Es interesante el resultado obtenido para la proteína ERK (figura c2.13) cuya expresión en su forma fosforilada se ve influenciada por la exposición a ambas radiaciones, la azul y la roja, incrementando su valor.

c2.4. Discusión.

En el presente estudio utilizamos cultivos celulares de la línea HCE-2 como modelo *in vitro* del epitelio corneal humano para proporcionar evidencia de la influencia beneficiosa de la luz roja de baja intensidad (administrada por LED) en el tratamiento de erosiones, abrasiones o heridas epiteliales de la córnea. Numerosos estudios describen cómo en la córnea se pueden producir reacciones de proliferación, muerte, migración, adhesión y diferenciación de las células epiteliales debido a lesiones y heridas¹⁴⁷⁻¹⁴⁹. Las células HCE-2, que crecen hasta la confluencia, desarrollan uniones estrechas (demarcación continua de la tinción de ZO-1 entre las células) y se tiñen positivamente para la proteína citoqueratina (figura c2.1), como el epitelio *in situ*. Demostramos que tanto la proliferación como la muerte y la migración de las células HCE-2 se ven afectadas por la exposición luz azul de onda corta (λ_{\max} 470 nm) pero no por la exposición a luz roja de onda larga (λ_{\max} 630 nm). Además, la incubación con luz roja posterior a la exposición a la luz azul, revierte los efectos negativos de la misma.

Actualmente, en diversos trabajos se describe la afectación directa de los constituyentes flavina y citocromo de las mitocondrias (complejos I, II y IV) por exposición a luz azul (400–480 nm), dando lugar a una disminución en la síntesis de ATP y estimulando la producción de EROs, induciendo así el estado de estrés oxidativo y la consecuente disfunción celular^{144,154–156,160,165,166}. Por su parte, la luz roja (650–800 nm) actúa sobre el complejo mitocondrial IV causando una disociación del óxido nítrico y cambios en el estado REDOX, un aumento en la tasa de formación de ATP y EROs y la eventual activación de numerosos factores de señalización y transcripción intracelular que resultan en una mejora de la condición celular^{120,155,159,161,162,167}. La evidencia del efecto negativo de la luz azul (λ_{max} 470 nm, 10.5 W/m²) en cultivos de células HCE-2 se demuestra claramente en nuestros estudios. Por ejemplo, la luz azul causa que se interrumpan las uniones (positivas por inmunocitoquímica para ZO-1) entre las células vecinas en cultivos confluentes (figura c2.8) y que la producción de EROs aumente el nivel de estrés oxidativo (sonda DHE) (figura c2.6). Además, la luz azul causa una disminución de la viabilidad celular (figura c2.7) que es dependiente de la intensidad (figura c2.7A). Como consecuencia, una baja intensidad de azul (λ_{max} 470 nm, 5.7 W/m²), emitida por una pantalla de ordenador (figura c2.4) no tiene un efecto negativo en la supervivencia o proliferación de las células HCE-2 (figuras c2.2 y c2.3) según se observó en los experimentos llevados a cabo en el modelo de herida *in vitro* y la exposición de la misma a diferentes regímenes de luz. Cuando la incubación se llevó a cabo en condiciones de oscuridad, se redujo gradualmente el tamaño del espacio libre de células en aproximadamente 40 horas, debido a la proliferación celular desde el borde de la herida. Cuando la incubación se realizó exponiendo a las células a luz azul de mayor intensidad (10.5 W/m²) el espacio sin células no cambió de tamaño a lo largo del tiempo, es más, las células colindantes con la herida parecieron morir después de 16 horas (figuras c2.2 y c2.3). Sin embargo, cuando la exposición se realizó a la luz de igual rango de longitud de onda, pero a menor intensidad (5.7 W/m²), el tamaño de la herida disminuyó gradualmente con el tiempo, reduciéndose después de 40 horas a aproximadamente el 30% de su tamaño original. Concluimos de dichos estudios que es probable que las intensidades altas de luz azul sean perjudiciales para la supervivencia de las células epiteliales de la córnea, pero se pueden tolerar bajas intensidades (como las emitidas por la pantalla de un ordenador). Sin embargo, existe la posibilidad de que la exposición a esas bajas intensidades de luz azul puedan ser un riesgo para las células epiteliales de la córnea cuando ya están en un estado comprometido, como podría ser el caso de los pacientes con ojo seco. Se sabe que los pacientes con ojo seco con frecuencia presentan una fotosensibilidad exacerbada y tienen un mayor malestar cuando se exponen a la luz de fuentes concretas^{168,169}.

A diferencia de la luz azul, la luz roja tuvo efectos positivos en las tasas de supervivencia y proliferación de las células HCE-2 en cultivo. Por ejemplo, la velocidad de cierre de la herida en los experimentos que se muestran en las figuras c2.2 y c2.3 se aceleró con luz roja (λ_{\max} 630, 7.32 W/m²) entre 24-32 horas, en comparación con las 40 horas necesarias para las incubadas en condiciones de oscuridad (figura c2.2 y c2.3). Además, la aplicación de luz roja durante 12 horas después de un daño por luz azul a las células HCE-2, redujo significativamente la influencia negativa de la luz azul, comparada con la incubación en oscuridad durante el mismo período de tiempo (figura c2.7). La función mitocondrial también mejora en las células HCE-2 expuestas a la luz roja en comparación con la de las células mantenidas en la oscuridad o expuestas a la luz azul (figura c2.5) como se observa en los resultados de la incubación con el reactivo JC-1. La fluorescencia roja (590 nm), se debe al acúmulo de reactivo en la mitocondria que, al estar activa, lo incorpora desde el citoplasma¹³⁷. En los resultados obtenidos se observa que la incubación bajo condiciones de luz azul produce una pérdida de la función mitocondrial, ya que no hay casi fluorescencia roja y, por lo tanto, se incrementan los niveles de fluorescencia verde (530 nm) (figura c2.5). En el caso de la incubación con luz roja, la ratio entre fluorescencia roja/fluorescencia verde aumenta cuando se compara incluso con las células incubadas en oscuridad. Por lo tanto, los estudios combinados sugieren que aumentar la cantidad de luz roja diaria que llega a la córnea puede mejorar la estabilización de las células epiteliales a través de un incremento en su actividad mitocondrial y, consecuentemente, hacerlas más resistentes frente al daño causado por agresiones ambientales como, entre otras, la luz azul. Además, los efectos beneficiosos de la luz roja también pueden actuar sobre otros posibles daños al epitelio corneal, por ejemplo, los causados por azida sódica. La azida sódica es una molécula tóxica descrita como inhibidor del complejo IV de la cadena mitocondrial de transporte de electrones^{170,171} que, además, puede estimular la producción de óxido nítrico¹⁷² y tiene influencia sobre los canales de potasio¹⁷³ y de calcio¹⁷⁴. En los experimentos demostramos que un daño químico en los cultivos de células HCE-2 causado por la azida sódica, puede ser atenuado por la incubación con luz roja (figura c2.7).

Al igual que en los estudios llevados a cabo en otros tipos celulares^{116,117,144,156,175,176}, los daños causados por la exposición a luz azul de las células HCE-2 producen un incremento de la expresión de la HO-1 y la escisión de la proteína AIF (figuras c2.9, c2.10 y c2.11). El incremento de la expresión de la HO-1 refleja su papel como neuroprotector endógeno, ya que es una proteína que responde a diferentes tipos de estrés y desempeña una función vital en el mantenimiento de la homeostasis celular. La magnitud de la estimulación de la proteína HO-1 podría ser importante en la defensa celular frente a daños mediados por el estrés oxidativo entre

otros factores^{177,178}. La expresión del gen HO-1 se puede inducir de diferentes maneras, una es la vía Nrf2-ARE que participa en la reducción de varias formas de estrés¹⁷⁹⁻¹⁸¹. En este caso, la luz roja no induce un incremento significativo de la expresión de la proteína HO-1 (figura c2.11) lo cual hace pensar que el mecanismo por el que la luz roja tienen un efecto beneficioso en los cultivos de las células HCE-2 no está relacionado con una acción directa sobre la vía Nrf2-ARE, si no que parecen ocurrir por su acción sobre la COX.

AIF es una proteína intermembrana mitocondrial, una flavina-adenina dinucleótido oxidoreductasa, implicada en el mantenimiento de la función de la cadena de transporte de electrones, la regulación de ROS y la muerte celular¹⁸²⁻¹⁸⁴. Cuando se induce su escisión en las mitocondrias, se da lugar a un subproducto de 57 kDa de peso molecular, que migra al núcleo celular y causa alquilación, dañando al ADN y desencadenando la muerte celular independiente de caspasas, denominada necroptosis^{183,185,186}. Es por lo tanto de gran importancia destacar que la luz roja, que estimula el complejo mitocondrial IV o COX^{120,155,157,163,187} atenúa la inducción de la escisión AIF producida por la luz azul (figura c2.11) y, como consecuencia, mejora la viabilidad celular (figura c2.7). Estos resultados muestran que los daños en las estructuras que contienen flavina dentro de las mitocondrias (como los producidos por luz azul) se pueden atenuar mediante la estimulación de la COX¹⁶³.

Los resultados de estudios actuales indican que las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluidas las quinasas c-Jun N-terminal (JNK), las reguladas por señal extracelular (ERK) y las p38-MAPK, están relacionadas con una amplia gama de actividades biológicas, incluida la regulación celular^{188,189}. La activación de las ERK contribuye habitualmente a la diferenciación celular, la proliferación y la supervivencia de las células. La incubación de las células en condiciones de luz azul, produjo la fosforilación de ERK, pero, para nuestra sorpresa, obtuvimos el mismo resultado cuando la incubación se llevó a cabo con luz roja, al igual que en los tratamientos combinados de ambas. Por ello, relacionamos la fosforilación de la ERK con la exposición a radiación lumínica tanto de onda corta como de onda larga, por lo que serían necesarios estudios más profundos para determinar la implicación de ERK en respuesta a estos y otros estímulos.

Al contrario que las quinasas ERK, las JNK y p38-MAPK se activan generalmente como respuesta a citoquinas proinflamatorias y al estrés ambiental (como la radiación UV y el estrés osmótico)¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Los estudios llevados a cabo durante este trabajo muestran que la exposición de las células HCE-2 a luz azul produjeron la aparición de la forma fosforilada de las p38-MAPK (figura c2.12). Existen estudios en los que se ha visto que esa misma estimulación de la

fosforilación se produce en fotorreceptores expuestos a luz azul¹⁹¹, células derivadas de retina¹¹⁶ y células ARPE¹⁷⁵).

Por lo tanto, parece que una característica común asociada al daño por luz azul involucra la activación de p38-MAPK mediante su fosforilación y que la muerte celular asociada a esa exposición ocurra por necroptosis. Es importante destacar que los procesos desencadenados por la radiación de luz azul en las células HCE-2 se mitigan mediante el uso de luz roja, que se correlaciona con la supervivencia celular.

En conclusión, los datos derivados de estudios sobre células HCE-2 en cultivo soportan la idea de que la exposición de la superficie ocular a luz roja adicional proporciona protección al epitelio corneal. En contraste, la luz azul puede tener influencias perjudiciales para dicho epitelio, particularmente a intensidades elevadas. Además, los estudios experimentales sugieren que las intensidades elevadas de la luz roja se pueden usar terapéuticamente para atenuar las lesiones del epitelio corneal de diferente índole.

Capítulo III

Capítulo III: Luz y superficie ocular II. Capacidad de la luz roja de atenuar la disfunción del endotelio corneal in vitro e in vivo.

c3.1. Introducción.

Las células que conforman la monocapa del endotelio corneal son células ricas en mitocondrias. Como se ha comentado anteriormente, raramente se dividen, pero sí tienen la capacidad de agrandar su tamaño y migrar para solventar pequeños defectos en la capa endotelial, preservando así la función de esta estructura¹⁹²⁻¹⁹⁴.

El número de células de esta capa disminuye con la edad y también en algunas patologías o tras ciertas intervenciones quirúrgicas. Ha sido descrito que tras la implantación de dispositivos que ayudan al drenaje del humor acuoso en pacientes con ciertos tipos de glaucoma¹⁹⁵, se producen en diferente nivel, dependiendo del material del dispositivo, una serie de daños endoteliales de diversa consideración. Del mismo modo, posteriormente a la queratoplastia lamelar anterior profunda¹⁹⁶, la facoemulsificación de cataratas^{197,198} o a la inserción de lentes intraoculares¹⁹⁹, se han descrito daños en la capa endotelial, que aparecen también durante el desarrollo del glaucoma agudo de ángulo cerrado que presenta un aumento en la PIO²⁰⁰⁻²⁰². Cuando el número de células disminuye por debajo de un umbral crítico, las funciones endoteliales no se pueden mantener, lo cual acaba afectando a la integridad corneal, provocando un incorrecto mantenimiento homeostático de la misma y su edematización, lo que podría finalmente derivar en queratopatía bullosa e incluso hacer necesario un trasplante corneal.

Se han desarrollado algunas metodologías para prevenir estos daños, por ejemplo, el uso de hialuronato en la cirugía de facoemulsificación, durante la que se puede producir un incremento de la permeabilidad endotelial, del grosor corneal medio y de la actividad de la función de bomba²⁰³. También se han desarrollado dispositivos viscoelásticos y viscodispersivos que protegen al endotelio corneal durante la cirugía de cataratas²⁰⁴. En conejos, un incremento de la concentración de ácido ascórbico en la solución irrigante durante la facoemulsificación ha demostrado reducir hasta el 70% la cantidad de células perdidas en esta cirugía²⁰⁵. También existen estudios recientes prometedores sobre el uso de los inhibidores de ROCK, capaces de promover la proliferación de las células del endotelio corneal^{206,207}, formulados en colirios y también junto con terapias celulares que incrementan la adhesión del trasplante en el tratamiento de disfunciones endoteliales corneales^{208,209}.

Durante los experimentos llevado a cabo en este capítulo, se trató de demostrar el posible uso de la luz roja como tratamiento no invasivo para la reducción del daño en endotelio corneal.

c3.2. Diseño experimental.

Se llevaron a cabo diversos estudios para evaluar la respuesta de células endoteliales a la exposición de diferentes longitudes de onda y comparar su respuesta en los casos en los que fueron sometidas a un daño previo. Para ello, se llevaron a cabo estudios:

- En un modelo *in vivo*, donde un total de 52 animales fueron sometidos o no a un proceso de elevación de la PIO, en presencia o ausencia de luz roja. Se evaluó la actividad mitocondrial de las células endoteliales a tiempo cero tras la elevación de la presión, mediante la incubación de las córneas diseccionadas con el reactivo JC-1. Además, en algunos casos las córneas se fijaron y se realizaron estudios inmunohistoquímicos para evaluar la presencia de la proteína ZO-1, tanto en córneas enteras como en secciones, a diferentes tiempos de reperfusión. Se analizó el nivel de expresión de la proteína COX IV mediante WB. Mediante técnicas de qPCR se analizaron también los niveles de expresión de los ARNm de ciertas proteínas, a diferentes tiempos.
- Se estableció un modelo de cultivo primario de células corneales endoteliales en el que se analizó la viabilidad celular y la proliferación de las mismas sometidas a diferentes tratamientos en presencia o ausencia de luz roja (λ_{max} 630 nm), y con un modelo de daño por descamación. Además, se comprobó la actividad mitocondrial tras los diferentes tratamientos mediante la incubación con JC-1, y en algunos casos, los cultivos fueron fijados y procesados para la localización de las proteínas ZO-1 y Na⁺/K⁺ ATPasa.

c3.4. Resultados.

Las células endoteliales *in situ* mostraron una apariencia de mosaico en las córneas de rata montadas enteras en plano (figura c3.1). En ellas, se observó tinción positiva para las proteínas ZO-1, localizada en las uniones intercelulares, y vimentina, citoplasmática. La expresión de ZO-1 no se vio afectada por la aplicación de la anestesia en los ojos tomados como control, no sometidos a ningún daño y mantenidos en oscuridad (iluminación inferior a 10 lux) (figura c3.2). En el caso de los ojos sometidos al proceso isquémico por elevación de la PIO, tras tres días de reperfusión se observó como la tinción con ZO-1 se observa interrumpida y en algunos casos incluso es inexistente, dejando espacios que parecen corresponderse con agujeros vacíos de

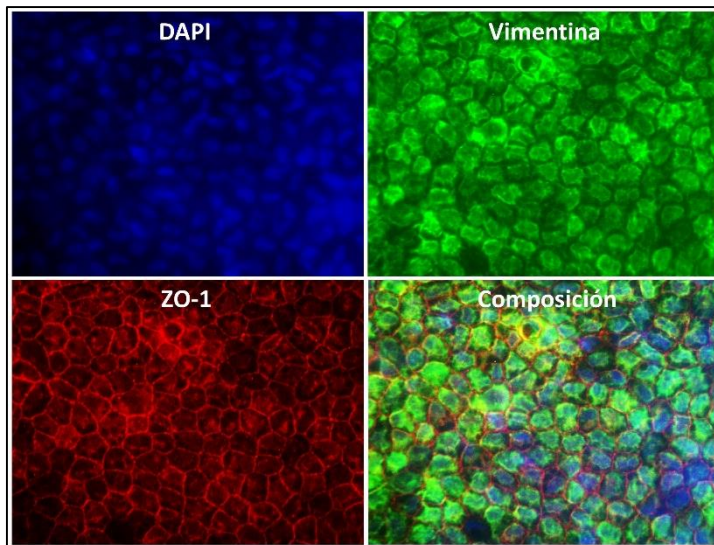
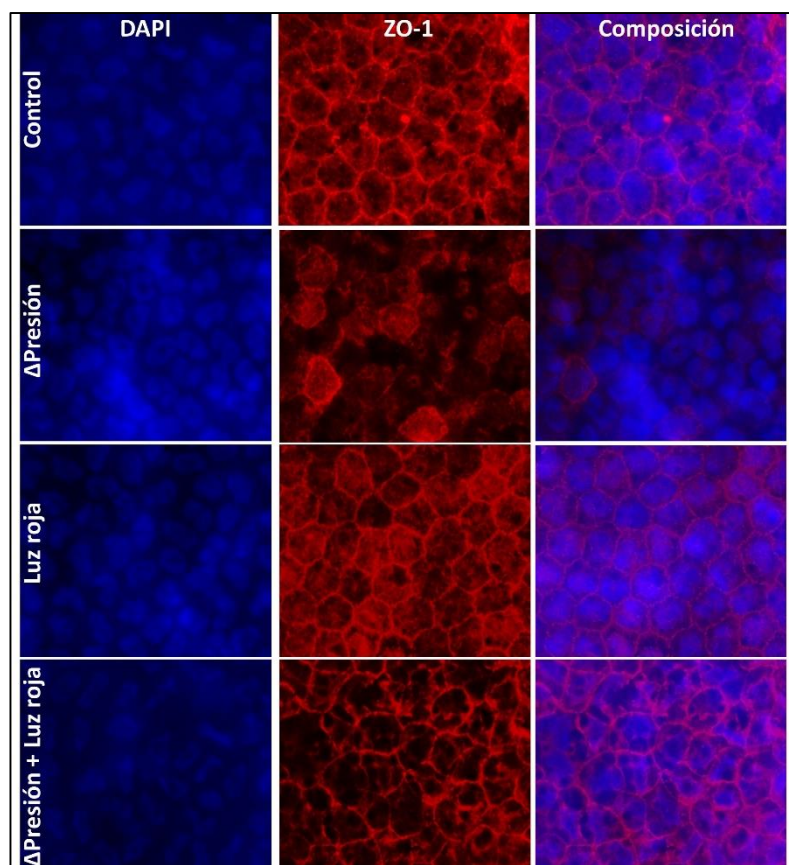


Figura c3.1. Imágenes de montajes de córneas de rata fijadas en plano para la Inmunolocalización de las proteínas ZO-1 (rojo), vimentina (verde) y marcaje nuclear con DAPI (azul). 20x. n=3.

células (figura c3.1). De la misma manera, esa pérdida de células se observa en las secciones de las córneas, donde la inmunorreactividad contra la proteína ZO-1 es discontinua en el caso de los ojos sometidos a daño, frente a los ojos control donde se observa una línea clara y continua (figura c3.2). Estos cambios histológicos se ven atenuados cuando las córneas se incubaron bajo la exposición a luz roja (figuras c3.2 y c3.3).

Para cuantificar el efecto citoprotector de la luz roja por el que se reduce el daño corneal observado tres días después del incremento de la PIO, se fotografiaron diferentes campos del centro corneal siguiendo el mismo patrón para todos los tratamientos, analizando un campo de

Figura c3.2. Imágenes de montajes de córneas de rata fijadas en plano para la Inmunolocalización de la proteína ZO-1 (rojo) y marcaje nuclear con DAPI (azul), sometidas a diferentes tratamientos: control (ojo sin tratamiento), Δ Presión (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos), luz roja (ojo expuesto a radiación roja (16.5 W/m²) o Δ Presión + luz roja (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos en presencia de luz roja). 20x. n=3.



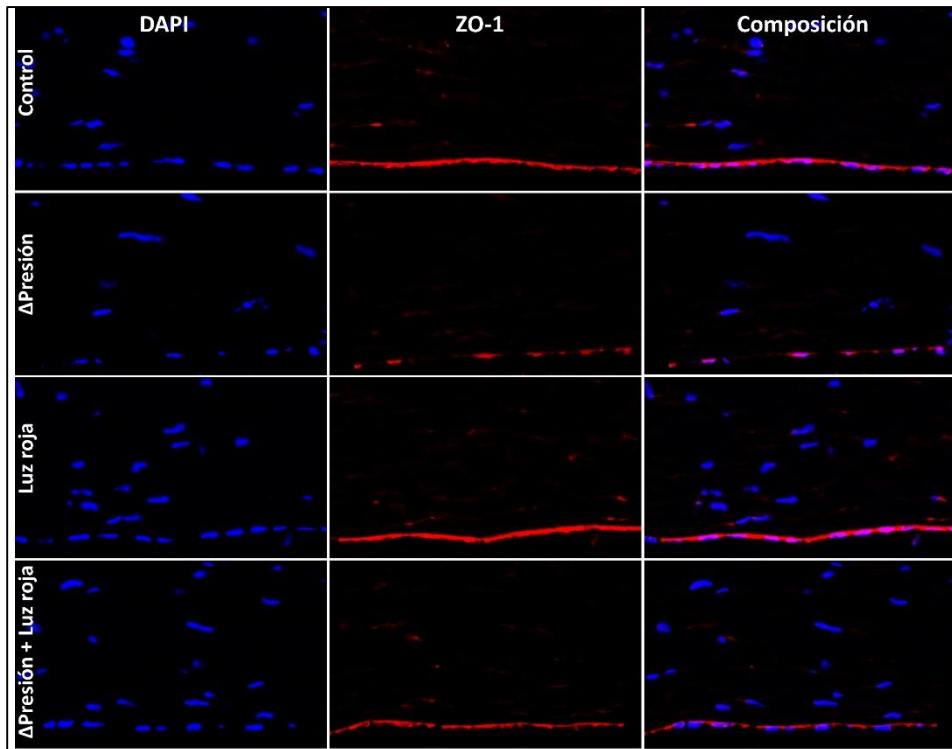


Figura c3.3. Inmunofluorescencia de secciones de córneas de rata para la localización de la proteína ZO-1 (rojo) y marcaje nuclear con DAPI (azul), sometidas a diferentes tratamientos: control (ojo sin tratamiento), Δ Presión (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos), luz roja (ojo expuesto a radiación roja (16.5 W/m^2) o Δ Presión + luz roja (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos en presencia de luz roja). 20x. n=3.

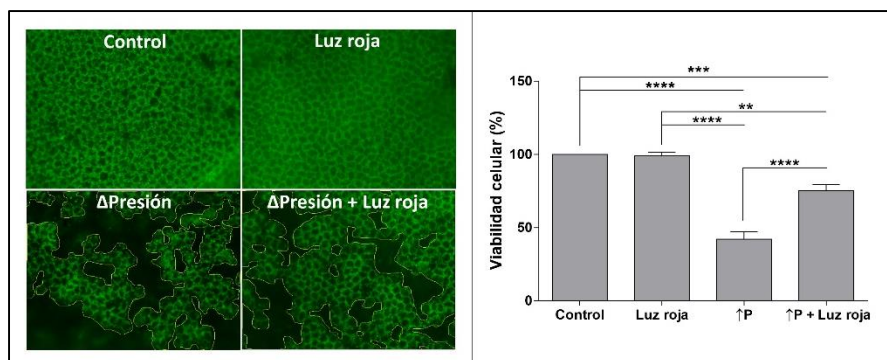


Figura c3.4. Análisis de la integridad del endotelio corneal de ratas sometidas a los diferentes tratamientos: control (ojo sin tratamiento), Δ Presión (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos), luz roja (ojo expuesto a radiación roja (16.5 W/m^2) o Δ Presión + luz roja (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos en presencia de luz roja). A la izquierda, fotografías del endotelio corneal. 10x. A la derecha, análisis cuantitativo de la viabilidad celular expresada en porcentaje y entendida como área con células (frente al área considerada vacía). Los resultados de n=5 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way ANOVA*, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

2.25 mm² mediante diferentes herramientas del software ImageJ (figura c3.4). El análisis de las córneas (n=5) mostró como el aumento de la PIO causó una pérdida significativa de células endoteliales que fue atenuada cuando el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de luz

roja (figura c3.4). Además, histológicamente se observó que, bajo estas condiciones de luz, la conservación de estructura en forma de mosaico se mantuvo más estable.

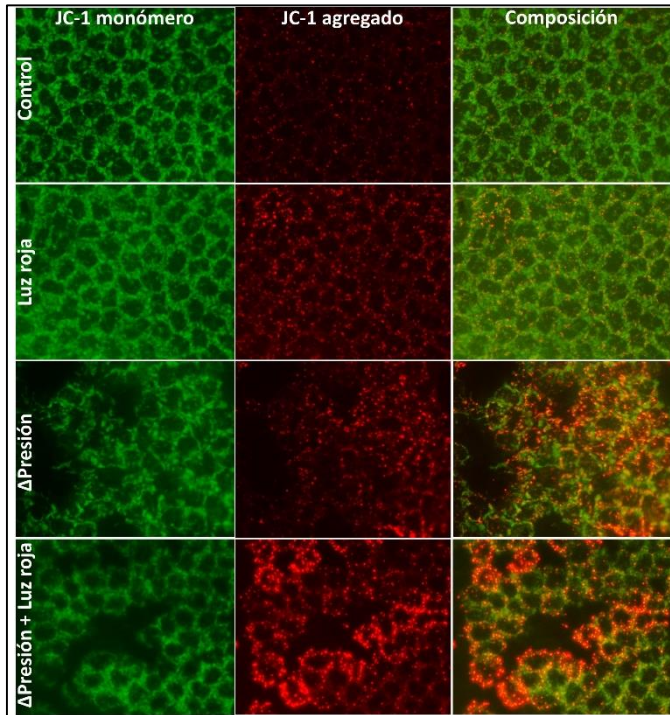


Figura c3.5. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial con el reactivo JC-1 de los endotelios de las córneas de rata en montaje plano tras la aplicación (tiempo de reperfusión 0 minutos) de los diferentes tratamientos: control (ojo sin tratamiento), ΔPresión (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos), luz roja (ojo expuesto a radiación roja (16.5 W/m²) o ΔPresión + luz roja (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos en presencia de luz roja). 20x. n=5.

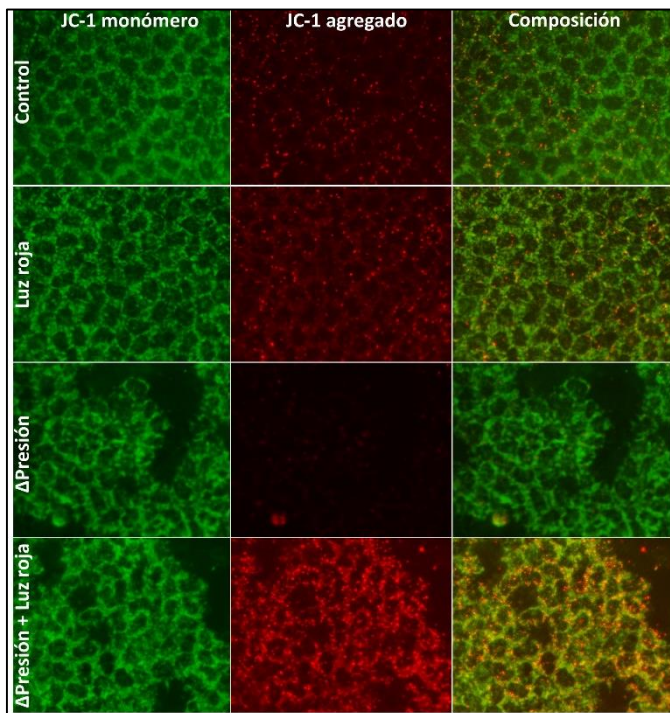


Figura c3.6. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial con el reactivo JC-1 de los endotelios de córneas de rata en montaje plano un tiempo después de la aplicación (tiempo de reperfusión 90 minutos) de los diferentes tratamientos: control (ojo sin tratamiento), ΔPresión (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos), luz roja (ojo expuesto a radiación roja (16.5 W/m²) o ΔPresión + luz roja (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos en presencia de luz roja). 20x. n=5.

La tinción con el marcador de actividad mitocondrial JC-1, mostró cómo el aumento de la PIO, afectó también a las células que seguían ancladas al estroma. En las figuras c3.4 y c3.5 se muestran las imágenes de la tinción con JC-1 a tiempo 0 tras el incremento de la PIO (figura c3.5) y 90 minutos después de la misma (figura c3.6). En las imágenes de la izquierda en ambas figuras

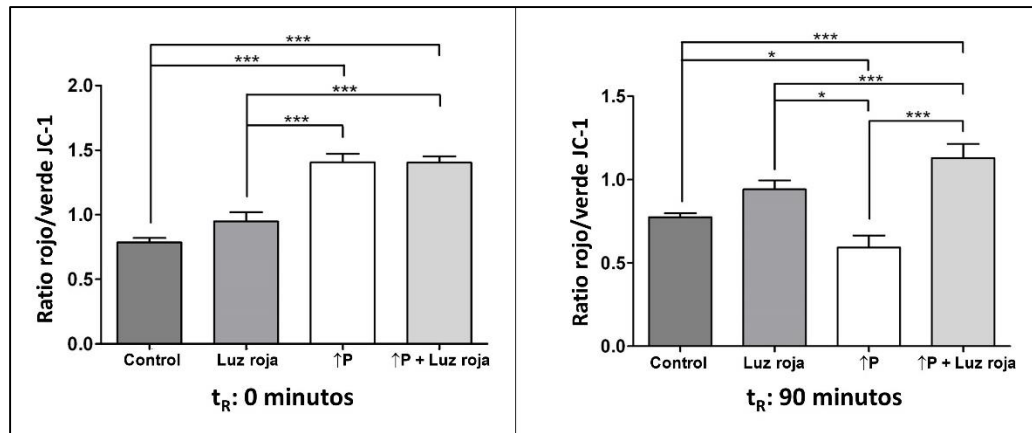


Figura c3.7. Análisis cuantitativo de la actividad mitocondrial expresada como la ratio de fluorescencia roja frente a fluorescencia verde en endotelios de córneas de rata sometidas a diferentes tratamientos (control (ojo sin tratamiento), Δ Presión (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos), luz roja (ojo expuesto a radiación roja (16.5 W/m^2) o Δ Presión + luz roja (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos en presencia de luz roja)) con distintos tiempos de reperusión (t_R): 0 (izquierda) o 90 (derecha) minutos. Los resultados de $n=5$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way ANOVA*, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (***) $p < 0.001$).

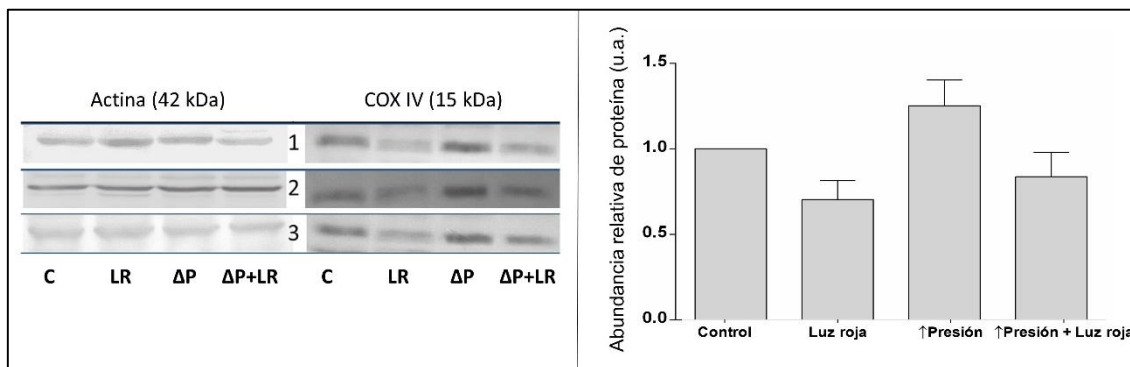


Figura c3.8. Análisis por WB de la expresión de la proteína COX IV (15 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en córneas de rata sometidas a diferentes tratamientos: control (ojo sin tratamiento), Δ Presión (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos), luz roja (ojo expuesto a radiación roja (16.5 W/m^2) o Δ Presión + luz roja (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos en presencia de luz roja). A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa de COX IV en los diferentes tratamientos. Los resultados de $n=3$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *RM-one-way ANOVA*, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (*) $p < 0.1$).

se muestra el resultado de la fluorescencia a 590 nm (rojo), las imágenes centrales corresponden a la fluorescencia a 530 nm (verde) y las imágenes de la derecha son la composición creada por la superposición de ambos. En el momento posterior a la elevación de la PIO, se observa como algunas de las células aún pegadas al estroma incrementan su actividad mitocondrial, especialmente en el caso de los cultivos expuestos a luz roja (figura c3.5). En el caso de los controles donde no se produjo aumento de la PIO, se observó que, al exponerse a luz roja,

también se incrementaba ligeramente la actividad mitocondrial. El análisis de las córneas transcurridos 90 minutos desde el fin del daño, se observó cómo disminuía la fluorescencia roja, aunque de manera significativa, se mantuvo en aquellas córneas de los ojos sometidos al aumento de la PIO en presencia de luz roja (figura c3.6). La figura c3.7 muestra el análisis semicuantitativo de la ratio de las intensidades relativas de la fluorescencia roja y verde. Los resultados en conjunto, muestran cómo se produjo un aumento de la actividad mitocondrial justo tras el aumento de la PIO, tanto en condiciones de incubación en oscuridad como bajo luz roja (figura c3.7). Transcurridos 90 minutos desde el fin del insulto, los resultados varían, obteniéndose los altos niveles de actividad en las córneas en las que se aumentó la PIO en presencia de luz roja (figura c3.7), de manera que la activación mitocondrial se mantuvo más tiempo en las córneas tratadas con luz roja.

En la figura c3.8 se muestran los niveles de COX en relación a la proteína actina de córneas de ratas sometidas a los diferentes tratamientos, a tiempo 0 tras el daño. Se observa como la expresión de COX aumenta simplemente con la exposición a luz roja en el caso de los controles. Además, el aumento de la PIO causó una disminución de los niveles de COX que fue atenuada cuando el daño se produjo en presencia de luz roja.

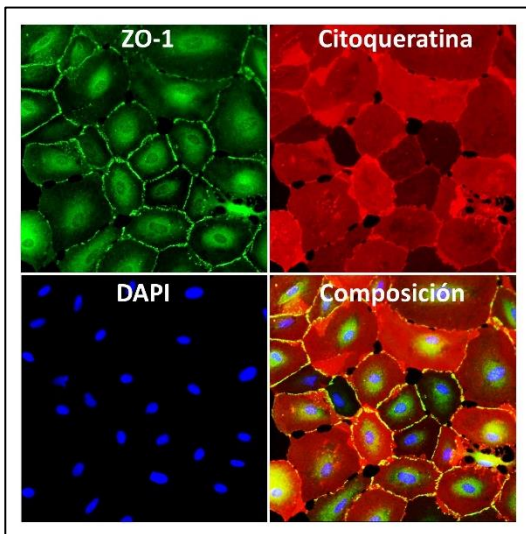


Figura c3.9. Fotografías de la Inmunolocalización de las proteínas ZO-1 (verde), citoqueratina (rojo) y marcaje nuclear con DAPI (azul) de cultivos primarios de células de endotelio corneal de rata (CECs). 20x. n=3.

Los cultivos primarios obtenidos de células de endotelio corneal de rata, CECs, expresaron, una vez en confluencia, la proteína ZO-1, dando lugar a una apariencia de mosaico similar a la observada *in vivo* (figura c3.9). También fueron positivas para la tinción con el anticuerpo contra la Na^+/K^+ ATPasa, proteína que tiene una función principal en estas células *in vivo*. Cuando los cultivos fueron expuestos a luz roja ($\lambda_{\text{máx}}$ 630 nm, 60 minutos, 16.5 W/m^2) se aumentó rápidamente su actividad mitocondrial, observada con el reactivo JC-1 (figura c3.10). Por el contrario, las células que se mantuvieron en oscuridad no mostraron el incremento en fluorescencia roja, permaneciendo con una baja actividad mitocondrial (figura c3.10).

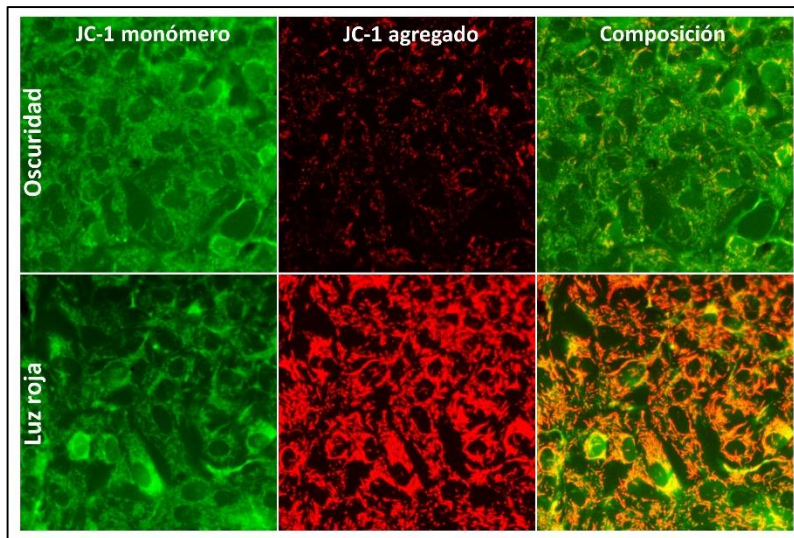
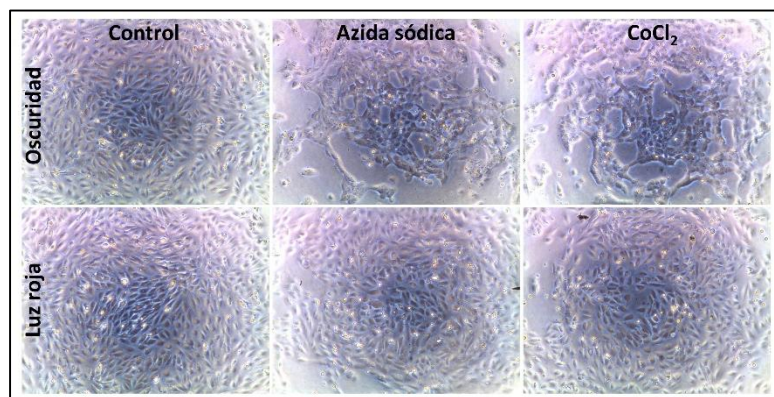


Figura c3.10. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial con el reactivo JC-1 de los cultivos primarios de endotelio de córnea de rata (CECs) incubados en oscuridad (control) o bajo radiación de luz roja (16.5 W/m^2). 20x. n=5.

Figura c3.11. Fotografías de contraste de fases de cultivos primarios de endotelio de córnea (CECs) de rata incubados en oscuridad (control) o bajo radiación de luz roja (16.5 W/m^2) y expuestos a azida sódica (10 mM) o cloruro de cobalto ($250 \mu\text{M}$). 20x. n=5.



Las figuras c3.11 y c3.12 analizan la respuesta de las células CECs en términos de proliferación y viabilidad cuando son expuestas a luz roja en estados subconfluentes. En estos casos, las células que fueron pretratadas durante 60 minutos con luz roja (4.4 W/m^2) y expuestas posteriormente a azida sódica (10 mM) o cloruro de cobalto ($250 \mu\text{M}$) tuvieron mayor viabilidad que las incubadas con los mismos tóxicos en oscuridad, tanto histológica (figura c3.11) como cuantitativamente (figura c3.12).

Mediante el análisis con MTT en la figura c3.13, se puede ver cómo la exposición de los cultivos a luz roja ($\lambda_{\text{máx}} 630 \text{ nm}$, 18 horas, 4.4 W/m^2) incrementa los valores de proliferación al compararlos con los obtenidos en los controles incubados en oscuridad. Este efecto positivo en la proliferación se observó visualmente en los resultados de la figura c3.14. En ellos, se ve que los pocillos en los que se realizó una descamación estando ya en confluencia y se incubaron en presencia de luz roja, el área fue repoblada por las CECs con mayor velocidad que en caso de la incubación en oscuridad.

El análisis por PCR de la expresión génica para la proteína HO-1 neuroprotector endógeno, determinó que en condiciones de daño se produjo un aumento de la expresión de dicha proteína a un tiempo de reperfusión de 3 días, que se vio disminuida cuando durante el daño hubo

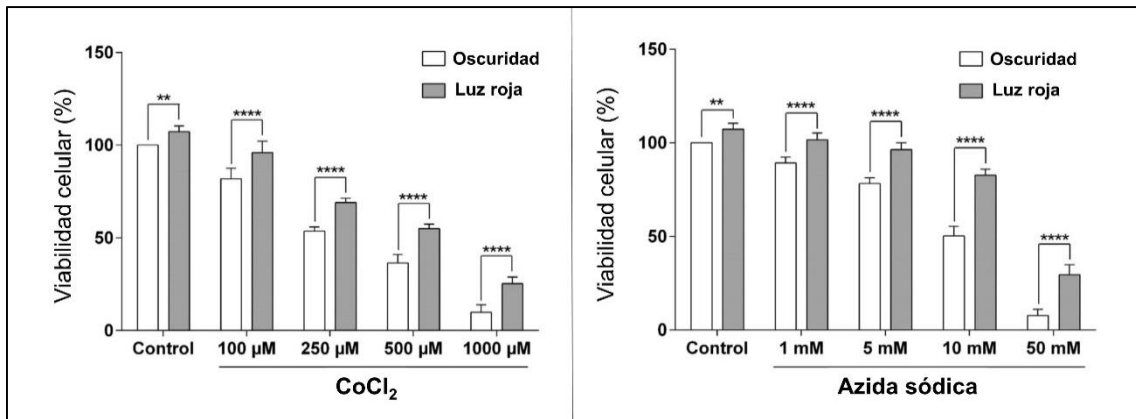


Figura c3.12. Análisis de la viabilidad celular de los cultivos primarios de células endoteliales corneales (CECs) con el reactivo MTT, expuestas durante 18 horas a diferentes concentraciones de cloruro de cobalto (μM) (izquierda) y de azida sódica (mM) (derecha) en condiciones de oscuridad o de luz roja (16.5 W/m^2). Los resultados de $n=5$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Sidak para comparaciones múltiples. (**** $p < 0.0001$).

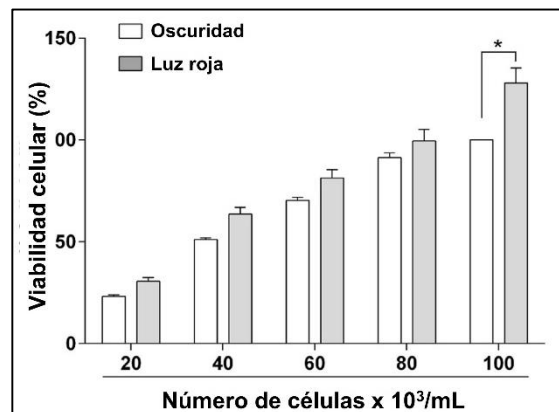


Figura c3.13. Análisis de la viabilidad celular de los cultivos primarios de células endoteliales corneales (CECs) con el reactivo MTT, expuestas durante 24 horas a condiciones de oscuridad o de luz roja (16.5 W/m^2). Los resultados de $n=3$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Sidak para comparaciones múltiples, (* $p < 0.05$).

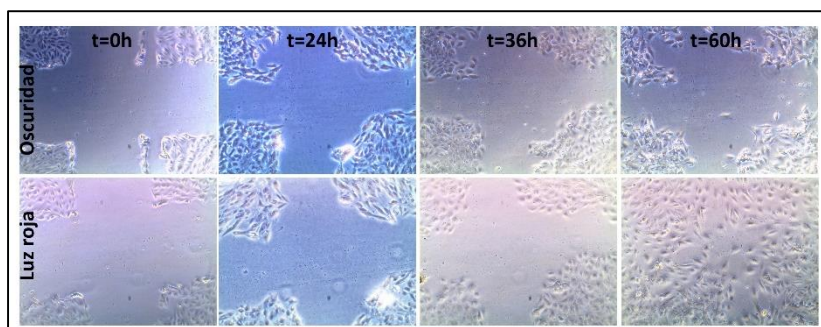


Figura c3.14. Fotografías de contraste de fases de cultivos primarios de endotelio de córnea (CECs) de rata a diferentes tiempos, incubados en oscuridad (control) o bajo radiación de luz roja (16.5 W/m^2), en los que se realizó una descamación central. 5x. $n=5$.

exposición a la radiación roja (figura c3.15). Por otro lado, el análisis del ARNm de la proteína

vimentina, mostró que tras un tiempo de reperfusión de 7 días, la tendencia fue la normalización de su valor en todos los casos menos en los que las córneas fueron sometidas únicamente a daño por PIO, aunque las diferencias encontradas no fueron significativas.

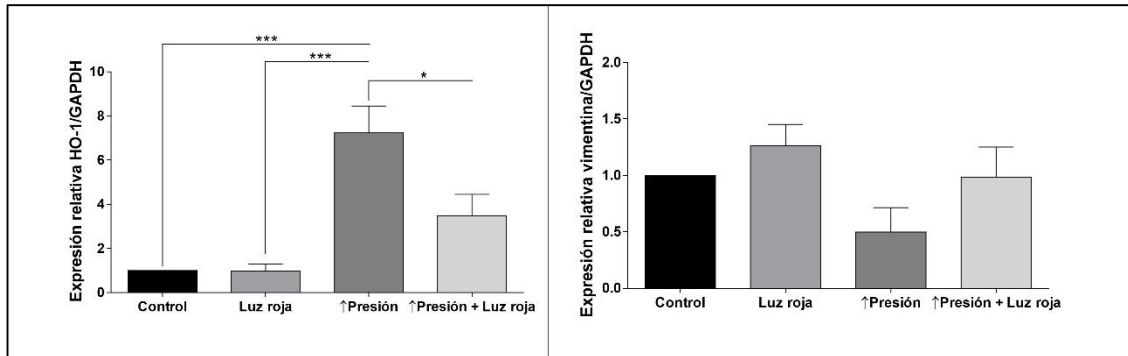


Figura c3.15. Análisis cuantitativo de la expresión relativa del ARNm de las proteínas HO-1 (3 días de reperfusión) (izquierda) y vimentina (7 días de reperfusión) (derecha) en corneas de ratas sometidas a diferentes tratamientos: control (ojo sin tratamiento), ΔPresión (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos), luz roja (ojo expuesto a radiación roja (16.5 W/m²) o ΔPresión + luz roja (ojo sometido a incremento de presión en cámara anterior durante 60 minutos en presencia de luz roja). Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, α=0.05, con post-test Sidak para comparaciones múltiples, (***) p < 0.001).

c.3.4. Discusión.

El daño que se produce en el endotelio corneal por un incremento de la PIO, por inflamación, daños penetrantes o envejecimiento, puede acabar dando lugar a una opacificación corneal que afecte a la función visual^{210,211}. Las células del endotelio corneal poseen abundantes mitocondrias²¹²⁻²¹⁴ y en el presente estudio mostramos, mediante el uso del reactivo JC-1, que la luz roja activa tales mitocondrias tanto en cultivo como *in situ* (figuras c3.5, c3.6 y c3.10). Ello quiere decir que la luz roja tiene un efecto activador y preservador de la actividad mitocondrial en las células endoteliales, que deriva en una citoprotección que se puede inducir mediante la exposición a estas radiaciones. Esta luz es capaz de contrarrestar el efecto de los daños en el endotelio corneal tanto *in situ* (causado por la elevación de la PIO) como en cultivos celulares, causados por sustancias químicas tóxicas como la azida sódica y el cloruro de cobalto.

Múltiples publicaciones demuestran que las exposiciones a longitudes de onda larga (> 670 nm), como la luz roja, tienen la capacidad de, por ejemplo, estimular la cicatrización de heridas, activar el sistema de complemento, reducir el estrés oxidativo y la inflamación y atenuar la muerte celular^{120,121,215}. Específicamente, en el ojo la luz roja protege contra la muerte de los fotorreceptores^{124-127,216}, mejora la retinopatía diabética^{128,129}, reduce la dendropatía¹³⁰, atenúa

la degeneración inducida por oxígeno¹³¹ y mitiga los cambios histopatológicos en la retina inducidos por una variedad de daños^{120,124–127,131,157,217}. También existen estudios que demuestran cómo la luz roja puede mejorar lesiones cerebrales y de la médula espinal en animales^{132–135,218}.

La tinción de la proteína ZO-1 hace que el tejido presente una apariencia de mosaico regular formado por la distribución regular de las células endoteliales en la córnea intacta (figuras c3.2 y c3.3). Sin embargo, después de la elevación de la PIO, la tinción con ZO-1 presenta una apariencia irregular, con algunas células claramente desplazadas y desprendidas del estroma corneal (figuras c3.2 y c3.3). Esta desorganización de la ZO-1 y la frecuencia y el tamaño de los huecos asociados con el endotelio corneal fue menos evidente cuando la PIO se elevó en presencia de luz roja. Mediante la cuantificación de las áreas vacías en relación con las áreas de endotelio que permanecieron unidas al estroma, se pudo concluir que la cantidad de células endoteliales perdidas debido al aumento de la PIO en la oscuridad es significativamente mayor que cuando se realiza en presencia de luz roja.

La activación de la COX mitocondrial por la exposición a luz roja se describió en importantes trabajos^{120,157,219,220} y resulta a su vez en un aumento de la síntesis de ATP y óxido nítrico^{157,221–223} y en la inducción de vías de señalización intracelular específicas y diversos factores de transcripción^{120,157,219,220}. En un intento de proporcionar evidencia de que la luz roja estimula la COX mitocondrial en el endotelio corneal, se realizó un análisis por WB. Los resultados muestran que la COX se sobreexpresa en córneas expuestas a luz roja, tanto en las córneas control como en aquellas en las que se elevó la PIO (figura c3.8).

Los resultados obtenidos en estos estudios muestran claramente cómo, tras un incremento de la PIO, las mitocondrias de las células endoteliales se activan frente al daño, y se hiperpolarizan tanto en presencia como en ausencia de luz roja (figuras c3.5 y c3.7). Sin embargo, cuando transcurrieron 90 minutos desde el final de la elevación de la PIO hasta la evaluación de la actividad mitocondrial con JC-1, el resultado fue distinto (figuras c3.6 y c3.7). En este caso, las mitocondrias parecían no estar estimuladas en las córneas mantenidas en oscuridad, pero sí en presencia de luz. Además, las mitocondrias de las células endoteliales control presentaron un mayor nivel de activación cuando fueron incubadas con la luz roja que cuando estaba en la oscuridad. De estos resultados se interpreta que el aumento de la PIO causa la muerte de las células endoteliales y además una activación inicial de la función mitocondrial observable con el reactivo JC-1 en respuesta a ese daño. Las mitocondrias endoteliales también se activan con luz

roja, pero de una manera más sostenida en el tiempo. Además, tal activación conduce a la supervivencia celular en lugar de desencadenar vías de muerte celular.

Los estudios realizados en cultivos primarios subconfluentes de células CECs de rata mostraron que la luz roja puede contrarrestar ciertos daños y estimular la proliferación (figuras c3.11 a c3.14). Aunque en general se acepta que las células endoteliales de la córnea no proliferan *in situ*, los estudios en animales sugieren que esta proliferación podría ocurrir en un grado limitado en algunas situaciones^{224,225}. Existe la posibilidad, por lo tanto, de que parte del efecto citoprotector de la luz roja frente al daño del endotelio corneal en rata causado por un aumento de la PIO se debe a una mayor tasa de proliferación celular, lo cual está respaldado por los resultados obtenidos en los cultivos celulares primarios que se muestran en las figuras c3.11 y c3.12. Sin embargo, es importante tener en cuenta que estos resultados fueron obtenidos en cultivos primarios que, aunque exhibieron características del endotelio corneal *in vivo*, por ejemplo, la expresión de ZO-1, Na⁺/K⁺ ATPasa (figura c3.8) y la similitud histológica, son un modelo *in vitro* cuyos resultados han de interpretarse con precaución. Aun así, los datos derivados del uso de cultivos de CECs subconfluentes (figuras c3.11 a c3.14) proporcionan información útil sobre el efecto citoprotector de la luz roja. Se ha demostrado claramente que la luz roja puede contrarrestar las lesiones causadas por sustancias químicas tóxicas como la azida de sodio o el cloruro de cobalto (figuras c3.11 y c3.12) y también estimular la proliferación celular (figuras c3.13 y c3.14).

Por lo tanto, se concluye de estos estudios que la luz roja tiene capacidad de atenuar daños en el endotelio corneal, aunque es importante tener en cuenta factores como la naturaleza de la fuente de irradiación, el modo de administración y la longitud de onda de estimulación, así como la velocidad, la duración y la frecuencia de los tratamientos utilizados.

Capítulo IV

Capítulo IV: Luz y retina I. Efecto de la exposición a diferentes radiaciones lumínicas durante el proceso isquémico.

c4.1. Introducción.

La supervivencia de las CGR es fundamental para diversos procesos biológicos, entre ellos el procesamiento visual y la percepción, ya que transfieren información del entorno visual al cerebro^{226,227}. Sin embargo, enfermedades agudas como la neuropatía óptica isquémica y la neuritis óptica, o enfermedades crónicas como el glaucoma ponen en peligro su supervivencia^{228–231}. En el caso de la interrupción del flujo sanguíneo a la retina, como ocurre en la isquemia retiniana y la oclusión de la arteria o vena retiniana, se puede dar lugar a daños en dicha capa, especialmente a la altura de la cabeza del nervio óptico. Mejorar la viabilidad de las CGR para mantener su función es uno de los principales objetivos de la investigación básica y traslacional, intentando encontrar las claves para mantener las funciones visuales en las mejores condiciones durante el mayor tiempo posible. Los enfoques actuales se centran en el desarrollo de medicamentos para reducir la pérdida de CGR y prolongar la visión en enfermedades como el glaucoma^{232–234}. En consecuencia, se han identificado fármacos candidatos a partir de estudios que utilizan modelos de glaucoma en animales y varios sistemas de cultivo celular^{234–236}. Aunque se ha generado información valiosa, aún no se ha logrado la neuroprotección prevista, y la determinación de los sitios objetivo y la administración adecuada de medicamentos para el tratamiento de las enfermedades crónicas de la retina sigue siendo un desafío.

Como todas las neuronas del sistema nervioso central, las CGR dependen del ATP generado por las mitocondrias para sobrevivir^{235,237,238}. Multitud de estudios sugieren que la disfunción mitocondrial de CGR explica su susceptibilidad al daño que finalmente resulta en la pérdida de visión en el glaucoma^{113,239–243}. Esta disfunción puede provocarse *in vitro* mediante la inhibición de procesos enzimáticos que afectan a la fosforilación oxidativa, produciendo una disminución de la síntesis de ATP y un aumento del estrés oxidativo, lo que finalmente provoca la muerte celular^{235,244–246}. Estudios experimentales también han demostrado que la luz de diferentes longitudes de onda puede afectar directamente la fosforilación oxidativa cuando es absorbida por los cromóforos mitocondriales^{103,105,106,109,247–249}. Este hecho podría ser clave para la supervivencia de las CGR debido a su alto número de mitocondrias^{250–252} y la exposición continuada de las mismas a la luz visual (400–900nm). Dentro de esa luz, hay que tener en

cuenta que la exposición a luz de longitud de onda corta, azul (400–480 nm), produce una disminución en la producción de ATP, lo que indica su potencial para dañar a las CGR *in situ*, como puede ocurrir en sujetos con glaucoma^{113,160,228,235,241}. Además, numerosos estudios han descrito cómo la luz roja (680-900nm) es absorbida por la COX y mejora la función mitocondrial, reduciendo así el daño causado por una variedad de condiciones^{120,130,131,157,219,221,253–255}. Por lo tanto, el aumento de los niveles normales de luz roja para alcanzar la retina ofrece un enfoque no invasivo para mejorar las funciones mitocondriales en el tratamiento de pacientes con glaucoma en los que las mitocondrias de las CGR están comprometidas.

c4.2. Diseño experimental.

Se llevaron a cabo en un modelo *in vitro* así como en el modelo animal:

- Estudios en cultivos celulares: se utilizó la línea celular R28. De una suspensión de células R28 cultivadas (80,000 células / ml), se sembraron 0,1, 0,2 o 1,5 mL en placas de 96, 48 o 6 pocillos respectivamente y se dejaron reposar durante 24 horas antes de someterlas a diversos regímenes de tratamiento. Se expusieron a concentraciones definidas de las toxinas mitocondriales rotenona, 3-NP, antimicina, azida sódica, CCCP, cloruro de cobalto o glutamato. Fueron expuestas también a diferentes tiempos de luz roja o azul, y se evaluó su efecto en relación a la viabilidad celular, actividad mitocondrial y producción de EROs. En ocasiones, las células fueron fijadas y se realizaron estudios inmunocitoquímicos.
- Estudios en animales: a un total de 81 ratas se les produjo una isquemia ocular durante 60 minutos en condiciones de oscuridad (menos de 20 lux de luz de la sala), en presencia de luz azul ($\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm, 26.3 W/m²) o roja ($\lambda_{\text{máx}}$ 630 nm, 16.5 W/m²). Para calcular la intensidad de luz a emplear, se midió la cantidad de luz que traspasa las diferentes estructuras oculares en ojo de cerdo y vaca *post mortem*. Posteriormente a la isquemia, se realizó un recuento del número de CGR a las dos semanas de reperusión, se analizó la expresión de diversas proteínas por WB e inmunohistoquímica a diferentes tiempos y se determinaron los niveles de ATP en las retinas justo tras el daño isquémico. Se analizó también la producción de glutatión total y reducido una hora después de la isquemia. Además, se evaluó el estado general de la retina *in vivo* mediante la realización de electrorretinogramas a diferentes tiempos.

c4.3. Resultados.

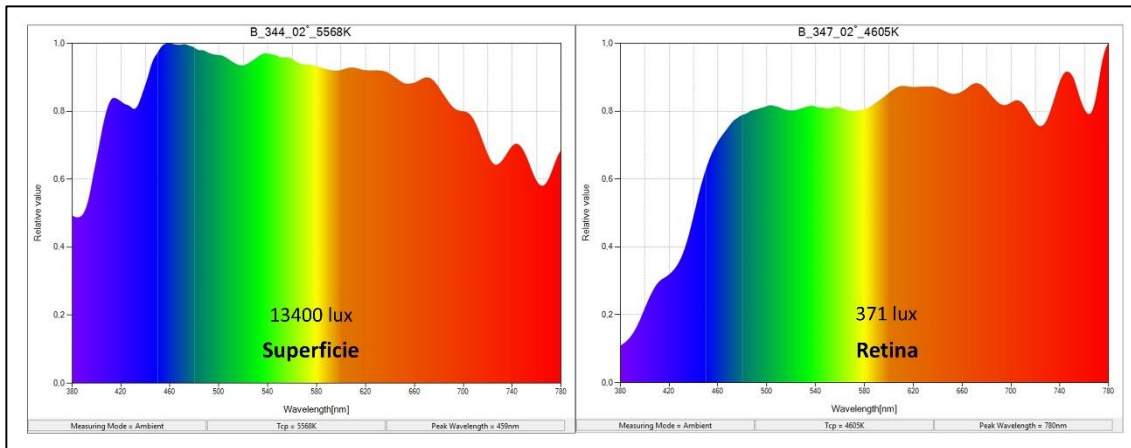


Figura c4.1. Distribución del espectro de la luz solar (expresado en unidades relativas a la longitud de onda más abundante) que alcanza la superficie de un ojo (izquierda), frente al espectro modificado por las diferentes estructuras oculares de un ojo de cerdo medido a nivel de la retina (derecha).

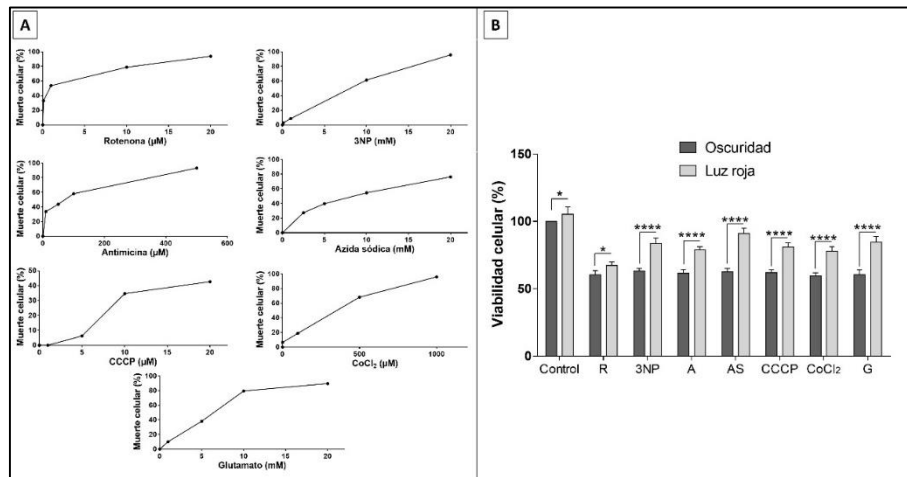


Figura c4.2. A) Curvas de dosis-respuesta para la incubación con rotenona, 3NP, antimicina, azida sódica, CCCP, cloruro de cobalto y glutamato de cultivos de células R28 durante 24 horas, realizadas con la incubación con el reactivo MTT. B) Análisis cuantitativo de la viabilidad celular de las células R28 frente a la dosis D_{40} de rotenona ($0.5 \mu\text{M}$), 3NP (7 mM), antimicina ($35 \mu\text{M}$), azida sódica (5 mM), CCCP ($15 \mu\text{M}$), cloruro de cobalto ($270 \mu\text{M}$) y glutamato (5 mM) incubadas en condiciones de oscuridad o de luz roja (6.5 W/m^2) durante 24 horas. Los resultados de $n=8$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Sidak para comparaciones múltiples, ($**** p < 0.0001$).

Durante los estudios *in vitro* en las células R28, se constató como todos inhibidores de alguna función mitocondrial, así como el resto de tóxicos empleados, causaron una reducción en la viabilidad celular a una concentración definida (figura c4.1A). La irradiación con luz azul causó un aumento de la muerte celular a intensidades específicas, mientras que la luz roja no tuvo un efecto significativo sobre la viabilidad a las intensidades probadas (figura c4.2A). La concentración de cada una de las sustancias químicas que se requirió para reducir la viabilidad

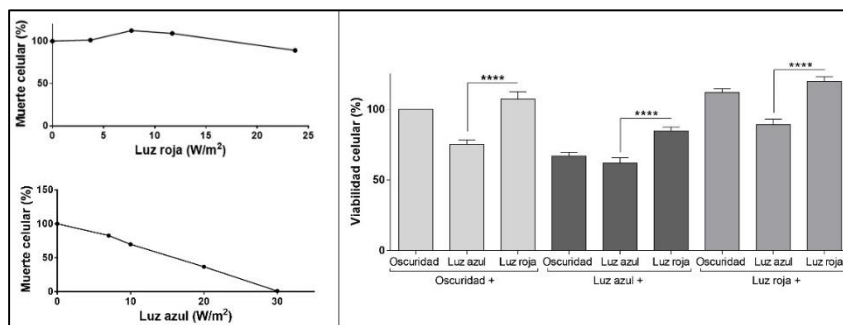


Figura c4.3. Curvas de dosis-respuesta para cultivos de células R28 incubados bajo radiación de luz azul o roja (izquierda) durante 24 horas, realizadas con la incubación con el reactivo MTT. En la gráfica de la derecha se puede observar el análisis cuantitativo de la viabilidad celular de los cultivos de R28 incubados (de izquierda a derecha) 24 horas en oscuridad, 12 horas en oscuridad + 12 horas con luz azul (12.08 W/m²), 12 horas en oscuridad + 12 horas con luz roja (6.5 W/m²), 12 horas con luz azul + 12 horas en oscuridad, 24 horas con luz azul, 12 horas con luz azul + 12 horas con luz roja, 12 horas con luz roja + 12 horas en oscuridad, 12 horas con luz roja + 12 horas con luz azul, 24 horas con luz roja. Los resultados de n=8 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** $p < 0.0001$).

celular en un 30–35% después de 24 horas fue significativamente menor cuando las células se incubaron en condiciones de luz roja a 6,5 W/m² en comparación con las condiciones de oscuridad (figura c4.1). La disminución de la viabilidad celular causada por la luz azul aplicada a 12.08 W/m² se atenuó por la exposición a la luz roja, tanto antes como después de la radiación con luz azul (figura c4.2). Estos resultados se observaron cuando las células se mantuvieron alternando ciclos de oscuridad de 12 horas y luz roja o azul durante 24 horas (figura c4.2). A su vez, se observa en los resultados que la luz roja tuvo la capacidad de aumentar la tasa de proliferación de las células R28, aumentando así la cantidad de células viables después de 12 y 24 horas en comparación con las condiciones incubación en oscuridad.

Se analizó la actividad mitocondrial de las células en cultivo expuestas a los diferentes regímenes de condiciones de luz (figura c4.2) con el reactivo JC-1 (figura c4.3), así como el nivel de estrés oxidativo con el reactivo DHE (figura c4.4). Después de 24 horas de exposición a la luz azul, escasas células permanecieron pegadas a las placas de cultivo, presentando una fuerte fluorescencia verde para el JC-1, con poca actividad mitocondrial. En cambio, las mitocondrias en las células R28 que habían estado expuestas únicamente a la luz roja durante 12 o 24 horas no se vieron afectadas, exhibiendo fluorescencia roja por acúmulo del reactivo en las mitocondrias activas, que también se observó para las células mantenidas en la oscuridad (figura c4.3). La toxicidad inducida por la luz azul causó un aumento de la producción de EROs. Por el contrario, la luz roja no causó aumento en el nivel de EROs y contrarrestó el efecto de la luz azul, tanto antes como después del daño (figura c4.4).

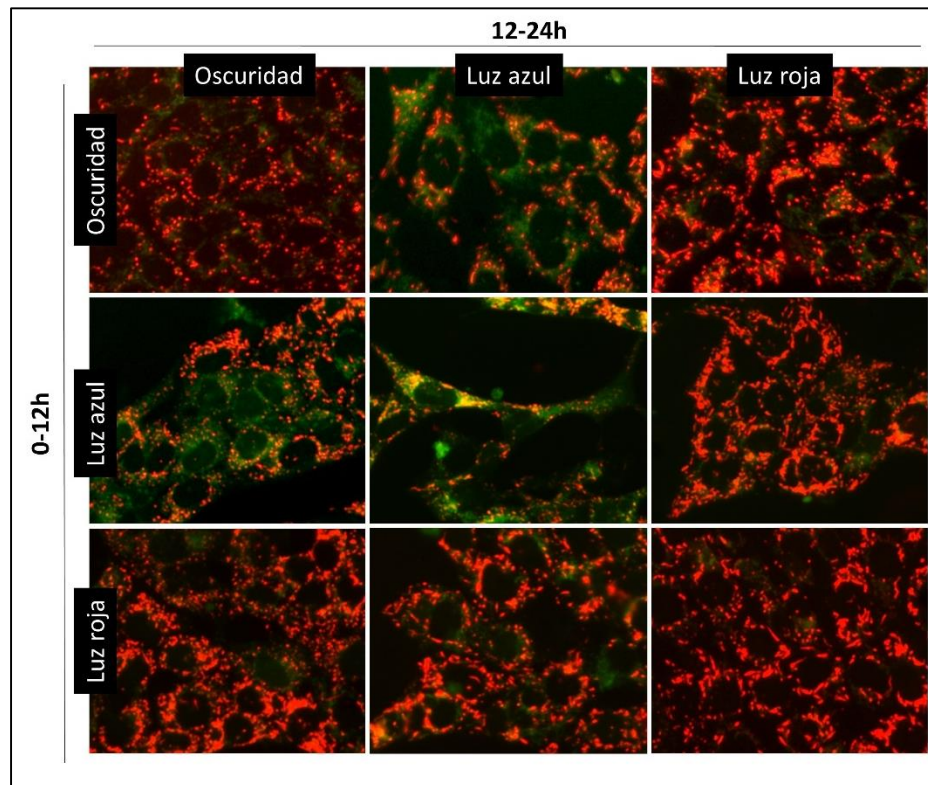


Figura c4.4. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial con el reactivo JC-1 de los cultivos de células R28 cultivadas bajo diferentes condiciones de radiación, de izquierda a derecha y de arriba abajo: 24 horas en oscuridad, 12 horas en oscuridad + 12 horas con luz azul (12.08 W/m²), 12 horas en oscuridad + 12 horas con luz roja (6.5 W/m²), 12 horas con luz azul + 12 horas en oscuridad, 24 horas con luz azul, 12 horas con luz azul + 12 horas con luz roja, 12 horas con luz roja + 12 horas en oscuridad, 12 horas con luz roja + 12 horas con luz azul, 24 horas con luz roja. Se muestra la composición de la fluorescencia verde citoplasmática y la fluorescencia roja intramitocondrial. 20x. n=5.

Se evaluó el nivel de expresión de la proteína HO-1 en las células expuestas a los regímenes anteriormente citados de luz (figura c4.2) y se observó un claro aumento de expresión de la misma en los casos de exposición a luz azul, que no apreciaba en las células mantenidas en condiciones de oscuridad o de luz roja. La exposición a la luz roja redujo los niveles de expresión de HO-1 cuando se aplicó antes o después de la radiación con luz azul (figura c4.5).

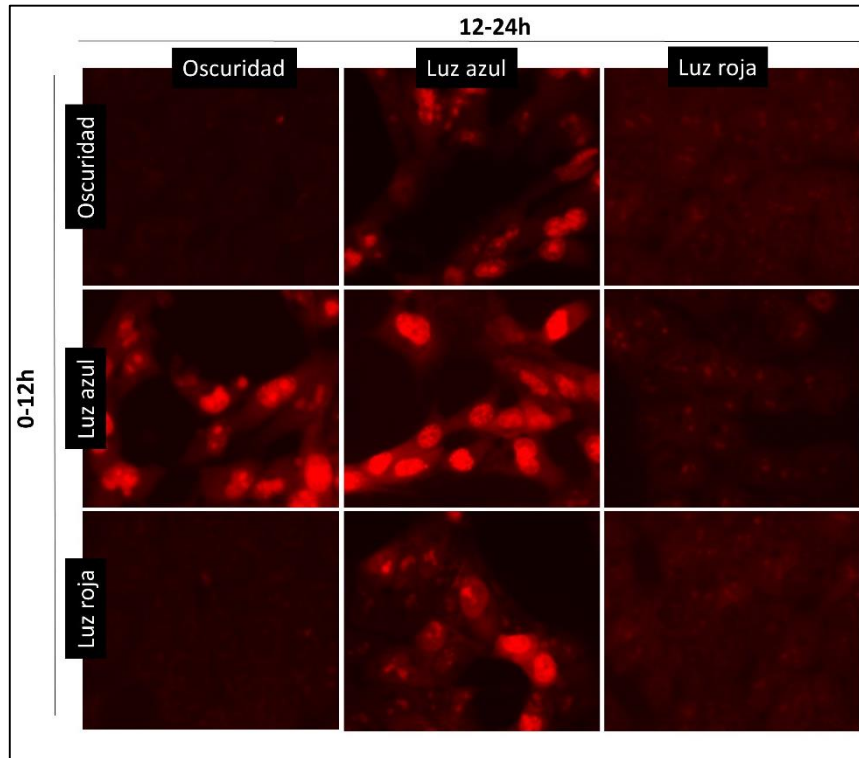


Figura c4.5. Fotografías de la expresión de EROs de los cultivos de células R28 cultivadas bajo diferentes condiciones de radiación, de izquierda a derecha y de arriba abajo: 24 horas en oscuridad, 12 horas en oscuridad + 12 horas con luz azul (12.08 W/m^2), 12 horas en oscuridad + 12 horas con luz roja (6.5 W/m^2), 12 horas con luz azul + 12 horas en oscuridad, 24 horas con luz azul, 12 horas con luz azul + 12 horas con luz roja, 12 horas con luz roja + 12 horas en oscuridad, 12 horas con luz roja + 12 horas con luz azul, 24 horas con luz roja. 20x. n=5.

En el caso de los estudios *in vivo*, al analizar la cantidad de luz que traspasa las estructuras oculares hasta llegar a la retina en un ojo de cerdo, se observó cómo la distribución del espectro que alcanza las estructuras del polo posterior es rica en longitudes de onda largas y se disminuye notablemente la cantidad de luz en el espectro del azul, disminuyendo también la intensidad de la radiación (figura c4.6).

Se observó cómo la inducción de isquemia en condiciones de oscuridad, evaluada con 5 minutos de reperfusión, causó una disminución significativa en el contenido de ATP neuroretiniano en comparación con el nivel de las retinas de los ojos control (figura c4.7). Estos niveles disminuyeron aún más cuando durante la isquemia se aplicó irradiación con luz azul, y aumentaron cuando se irradiaron dichas retinas con luz roja. Además, las retinas control de ratas expuestas a la luz azul en comparación con las mantenidas en oscuridad (ambas con las pupilas

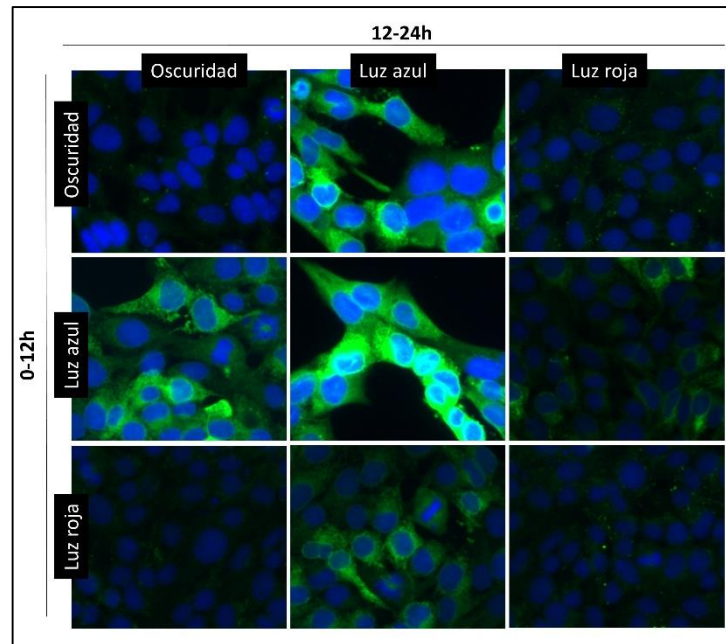


Figura c4.6. Fotografías de la expresión de la proteína HO-1 en los cultivos de células R28 cultivadas bajo diferentes condiciones de radiación, de izquierda a derecha y de arriba abajo: 24 horas en oscuridad, 12 horas en oscuridad + 12 horas con luz azul (12.08 W/m^2), 12 horas en oscuridad + 12 horas con luz roja (6.5 W/m^2), 12 horas con luz azul + 12 horas en oscuridad, 24 horas con luz azul, 12 horas con luz azul + 12 horas con luz roja, 12 horas con luz roja + 12 horas en oscuridad, 12 horas con luz roja + 12 horas con luz azul, 24 horas con luz roja. Se muestra la composición de la fluorescencia verde citoplasmática (HO-1) y la fluorescencia azul nuclear (DAPI). 20x. n=5.

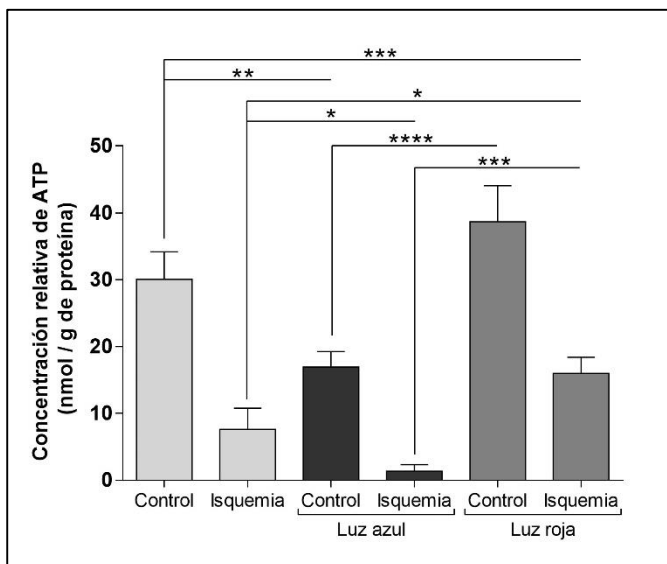


Figura c4.7. Cuantificación de la producción de ATP (nmol/g de proteína) en retinas de ratas sometidas a isquemia durante 60 minutos en condiciones de oscuridad, luz azul (26.3 W/m^2) o luz roja (16.5 W/m^2) con un tiempo mínimo de reperusión. Los resultados de n=4 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

dilatadas), mostraron igualmente una disminución en los niveles de ATP. Por el contrario, la luz roja elevó ligeramente el nivel de ATP registrado, comparado con el de las retinas mantenidas en condiciones de oscuridad (figura c4.7).

En la figura c4.8 se muestran imágenes representativas de la distribución de células positivas para el anticuerpo anti-Brn3a en retinas de rata de excentricidades similares (con referencia a

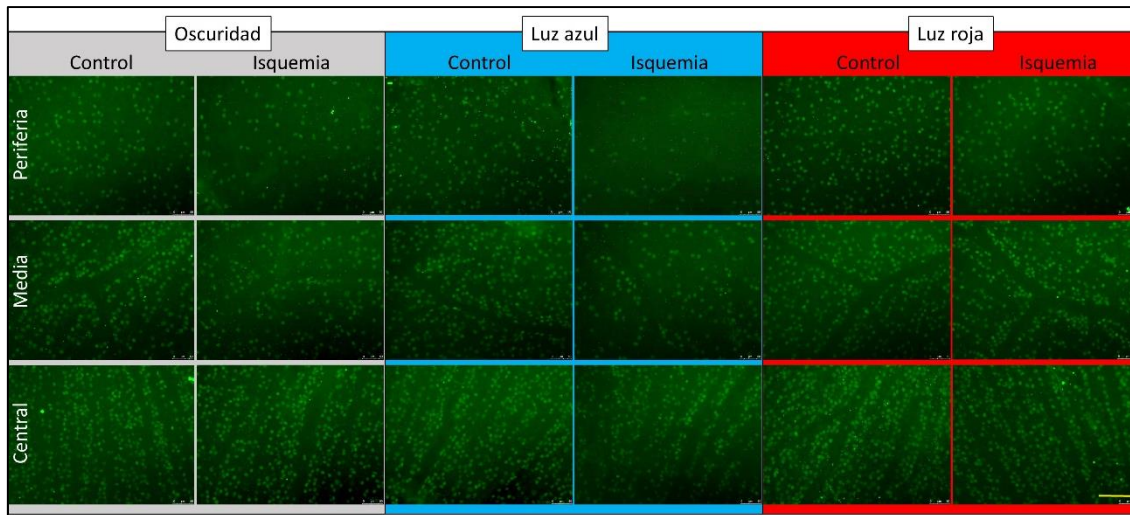


Figura c4.8. Fotografías de retinas de ratas para la Inmunolocalización (verde) de la proteína nuclear Brn3a para el marcaje de células ganglionares. Las fotografías son representativas de las diferentes partes, central, media y periférica, de las retinas sometidas al proceso isquémico de 60 minutos en oscuridad o en condiciones de luz azul (26.3 W/m²) o de luz roja (16.5 W/m²) tras 14 días de reperusión. 20x. Barra de escala: 100 μM. n=5.

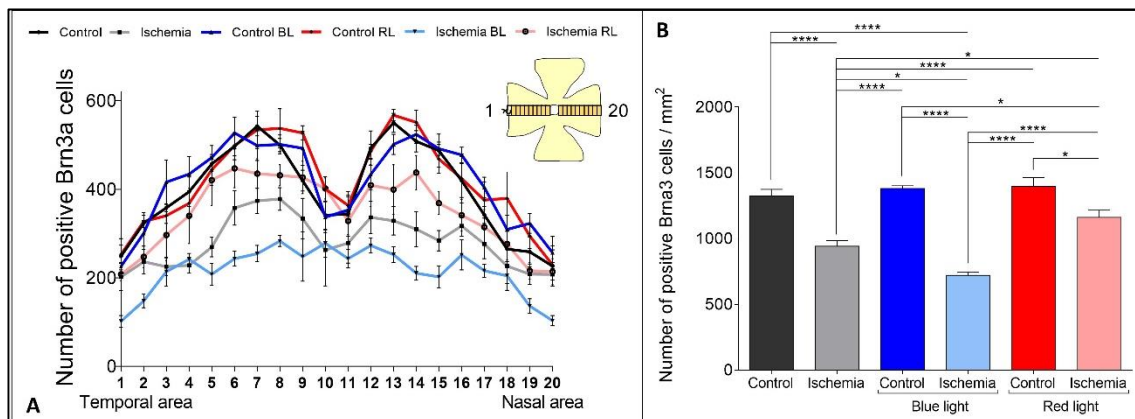


Figura c4.9. A) Análisis cuantitativo del número de células positivas para Brn3a a lo largo de 20 áreas retinianas consecutivas de 0.3 mm², 6 mm orientados desde la región nasal hasta la temporal pasando por el nervio óptico. B) Análisis cuantitativo del número total de células positivas para Brn3a en las retinas sometidas a los diferentes tratamientos, tras 14 días de reperusión. Los resultados de n=5 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

vasos sanguíneos definidos) de ojos que se sometieron a procesos de isquemia en oscuridad, luz azul o roja con reperusión durante 15 días. La densidad media de células positivas para Brn3a en la retina periférica fue menor que la observada en las partes medial y central. La cuantificación de células Brn3a positivas en áreas retinianas de 0,3 mm², 6 mm a lo largo de la dirección temporal/nasal (y a través de la región del nervio óptico) (figura c4.9) puso de manifiesto que la isquemia/reperusión causó una disminución en el número de células ganglionares en todas las áreas de la retina en comparación con las retinas control. Estos

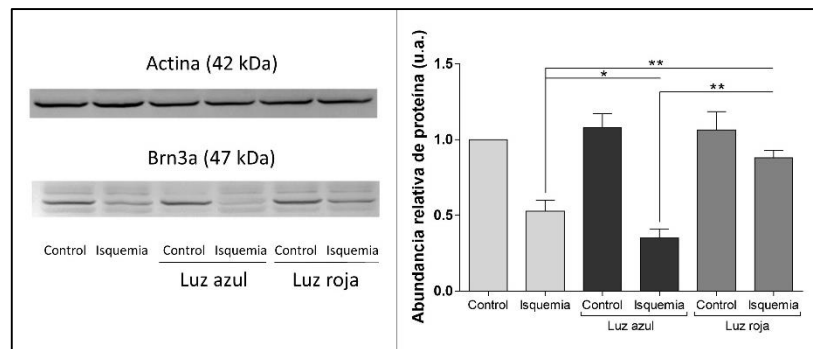


Figura c4.10. Análisis por WB de la expresión de la proteína Brn3a (47 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en retinas de rata sometidas al proceso isquémico de 60 minutos en oscuridad o en condiciones de luz azul (26.3 W/m^2) o de luz roja (16.5 W/m^2) tras 14 días de reperusión. A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa de Brn3a en los diferentes tratamientos. Los resultados de $n=3$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *RM-one-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (** $p < 0.01$).

números disminuyeron aún más en todas las áreas de la retina cuando la isquemia se realizó bajo la irradiación por luz azul, mientras que aumentaron en el caso de la irradiación con luz roja. En el análisis cuantitativo de las áreas de $0,3 \text{ mm}^2$ desde la parte temporal a la nasal (figura c4.9) se calculó que la isquemia/reperusión causó una pérdida de aproximadamente 30% de las células ganglionares. Esta pérdida fue significativamente menor cuando se aplicó luz roja durante la isquemia, pero aumentó cuando se aplicó luz azul. Estos resultados fueron confirmados por el análisis de WB de las retinas individuales (figura c4.10), que reveló que la cantidad relativa de proteína Brn3a en la retina disminuyó después de la isquemia en la oscuridad, empeoró cuando se usó la luz azul y mejoró cuando la isquemia se llevó a cabo en presencia de luz roja.

El resultado del estudio por inmunohistoquímica de la expresión de las proteínas GFAP e isolectina IB4 en retinas procesadas en plano de ratas sometidas a isquemia bajo las diferentes condiciones lumínicas se muestra en la figura c4.11. La inmunorreactividad con isolectina IB4 proporciona la visualización de la vasculatura retiniana²⁵⁶. En comparación con las condiciones en oscuridad de control, la luz azul produjo un aumento general de la inmunorreactividad de GFAP en la glía retiniana (células de Müller, astrocitos y microglia). La expresión de GFAP no se vio afectada en gran medida por la luz roja, aunque se apreció un ligero aumento cerca de los vasos sanguíneos. Curiosamente, la isquemia en presencia de luz azul dio lugar a la aparición de áreas vacías sin inmunorreactividad para la GFAP.

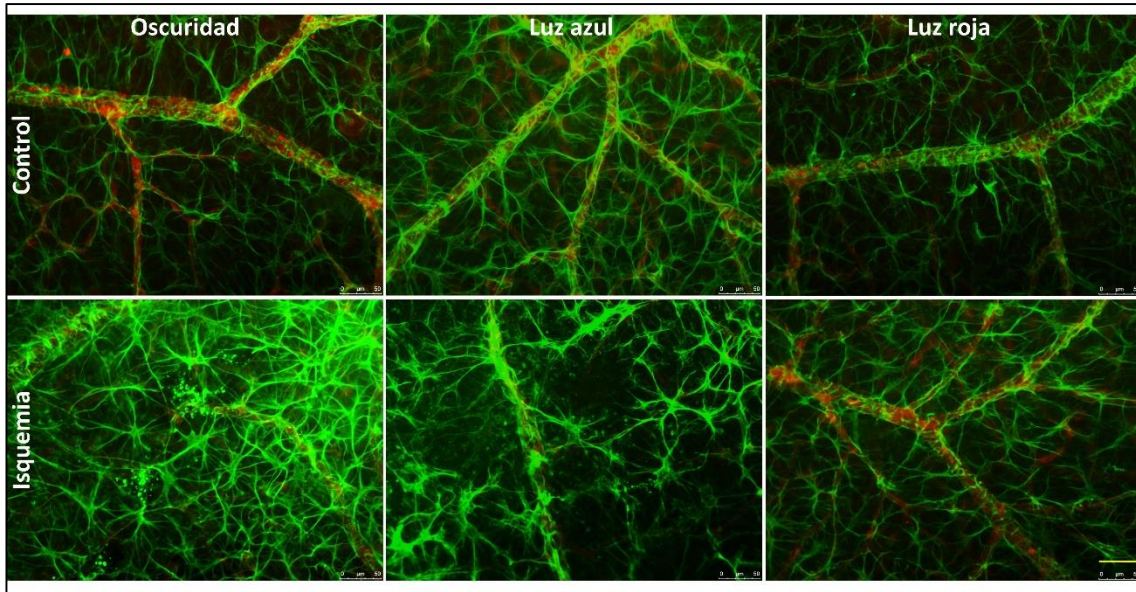


Figura c4.11. Fotografías para la Inmunolocalización de la proteína GFAP (verde) y la proteína Ib-4 (rojo), como marcador de los vasos sanguíneos, de retinas de ratas sometidas al proceso isquémico de 60 minutos en oscuridad o en condiciones de luz azul (26.3 W/m^2) o de luz roja (16.5 W/m^2) tras 14 días de reperusión. 20x. Barra de escala: $50 \mu\text{m}$. $n=5$.

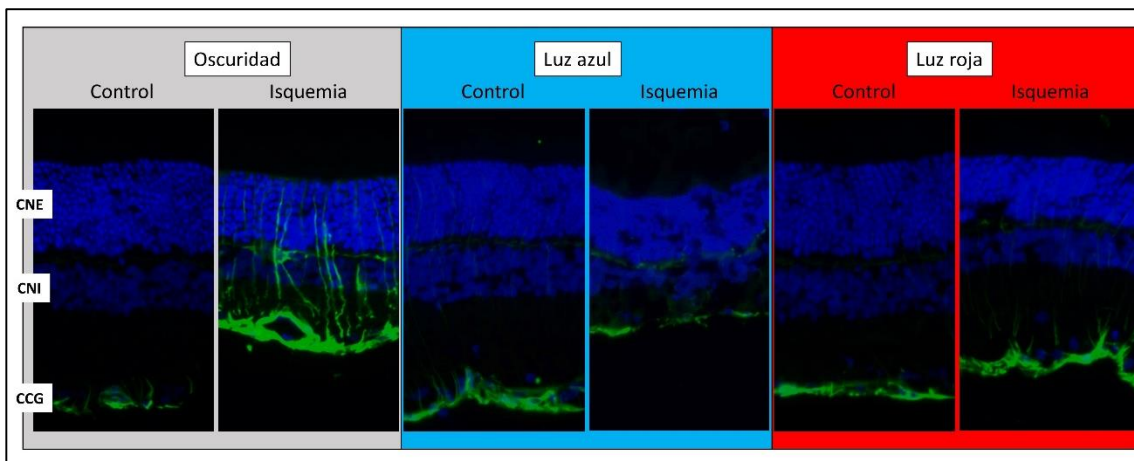


Figura c4.12. Fotografías de secciones de retina teñidas para la Inmunolocalización de la proteína GFAP (verde) junto con DAPI (azul), de retinas de ratas sometidas al proceso isquémico de 60 minutos en oscuridad o en condiciones de luz azul (26.3 W/m^2) o de luz roja (16.5 W/m^2) tras 7 días de reperusión. 20x. Barra de escala: $50 \mu\text{m}$. $n=5$.

Los niveles de glutatión total (figura c4.12) se incrementaron tras los procesos de isquemia en oscuridad y en luz roja, mientras que, en el caso de la isquemia en presencia de luz azul, el incremento no fue significativo. El análisis de la proporción de GSSG frente a GSH (figura c4.12) muestra cómo tras los procesos isquémicos, la mayor parte del glutatión se encuentra oxidado, contrastando con la ratio de las incubaciones en luz y oscuridad sin daño por isquemia.

En la figura c4.13 se puede ver la evolución del estado de las retinas *in vivo* tras los diferentes tratamientos mediante electroretinograma. Las retinas en las que no se realizó isquemia

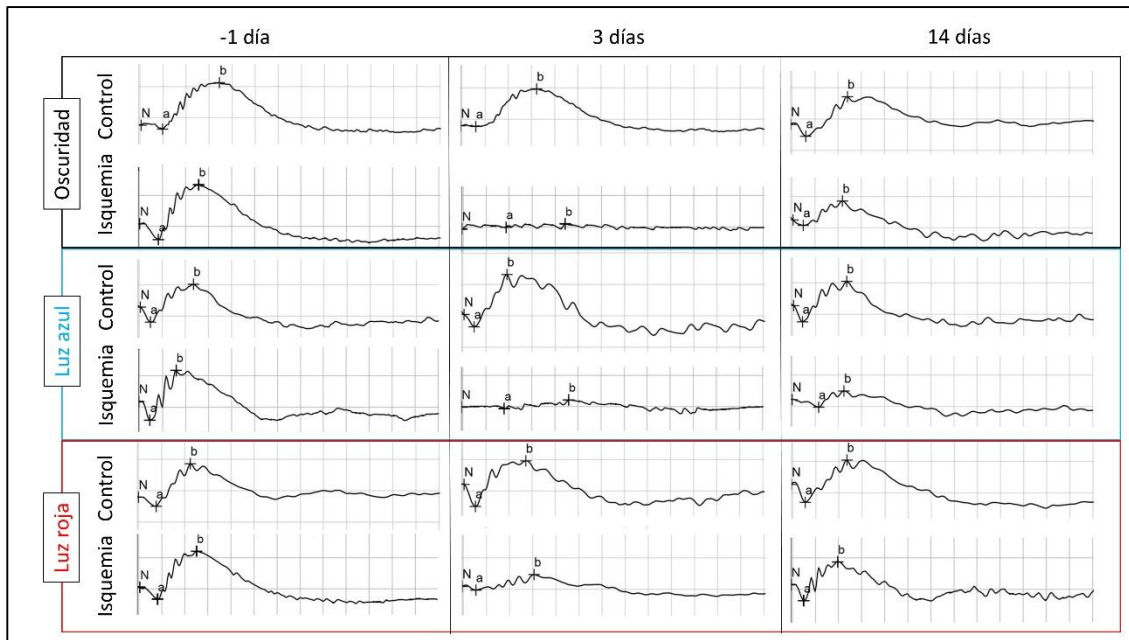


Figura c4.13. Resultado de los electrorretinogramas realizados a diferentes tiempos (1 día previo a la isquemia, 3 días o 14 días después) a retinas de ratas sometidas a un proceso isquémico ocular de 60 minutos en oscuridad o en condiciones de luz azul (26.3 W/m^2) o de luz roja (16.5 W/m^2). Cada división vertical se corresponde con $100 \mu\text{V}$ y cada división horizontal con 25 ms . La luz empleada para el estímulo provino de una fuente artificial blanca tipo LED a 0.003 cd/m^2 . $n=7$.

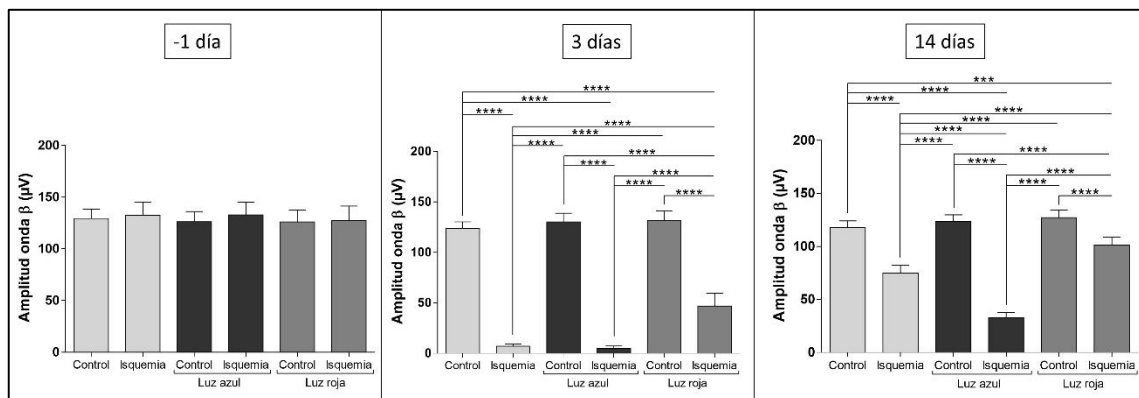


Figura c4.14. Análisis cuantitativo del resultado de los electrorretinogramas realizados a diferentes tiempos (1 día previo a la isquemia, 3 días o 14 días después) a retinas de ratas sometidas a un proceso isquémico ocular de 60 minutos en oscuridad o en condiciones de luz azul (26.3 W/m^2) o de luz roja (16.5 W/m^2). La luz empleada para el estímulo provino de una fuente artificial blanca tipo LED a 0.003 cd/m^2 . Los resultados de $n=7$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** $p < 0.0001$).

presentan una respuesta igual a los tres días del procedimiento, hayan sido incubadas en oscuridad, luz azul o luz roja. En los casos en los que se realizó una isquemia, a los tres días se recogió una señal plana en respuesta al estímulo lumínico en el caso de oscuridad e incubación con luz azul, y una ligera respuesta en las retinas bajo la influencia de la radiación roja.

Transcurridos quince días, las retinas sometidas a isquemia en condiciones de oscuridad presentaron una ligera respuesta al estímulo, que se convertía en una respuesta casi normal para los casos de las retinas que durante la isquemia estuvieron expuestas a luz roja. En el caso de las isquemias en presencia de luz azul, la respuesta fue muy escasa. En la figura c4.14 se cuantifican las diferencias de respuesta en el electroretinograma mediante la comparación de la amplitud de las ondas b de los diferentes tratamientos. Se observa a los tres días como en las retinas isquémicas incubadas bajo luz roja, la respuesta es de una amplitud significativamente mayor que la de las incubadas en oscuridad o luz roja, donde prácticamente la respuesta es nula. Transcurridos quince días, las respuestas de las retinas incubadas en oscuridad y en luz roja son de amplitud moderada, comparadas con los controles, siendo significativamente mayor la de la luz roja, mientras que las retinas isquémicas expuestas a luz azul en el proceso, presentan una respuesta de onda de poca amplitud.

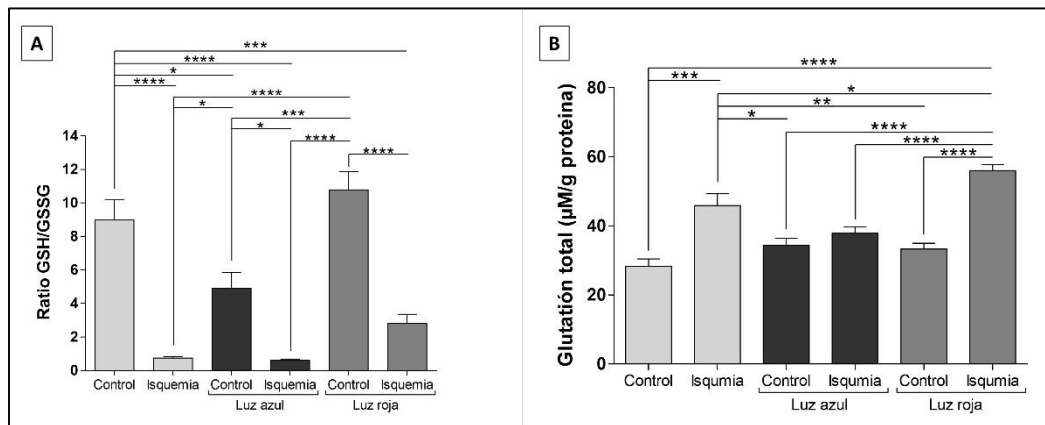


Figura c4.15. A) Análisis cuantitativo de la ratio de GSH frente a GSSG en retinas de ratas sometidas a isquemia durante 60 minutos en condiciones de oscuridad, luz azul (26.3 W/m²) o luz roja (16.5 W/m²) con un tiempo mínimo de reperusión. B) Cuantificación del glutatión total (µM/g de proteína) de los diferentes tratamientos. Los resultados de n=5 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, α=0.05, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

c4.4. Discusión

Los estudios para la descripción de los comienzos del glaucoma (especialmente el glaucoma primario de ángulo agudo) exponen cómo se ven afectadas las mitocondrias de las CGR y cómo por diversas razones acaban perdiendo su funcionalidad, dando explicación a la pérdida gradual de las mismas en diferentes momentos del desarrollo de dicha enfermedad^{113,160,241,257-261}. Uno de los objetivos de este estudio fue resaltar el posible efecto negativo de la exposición a luz azul visual y su interacción con la progresión del glaucoma, así como proporcionar evidencia de que

un aumento del nivel de luz roja del EEM que llega a la retina, podría ser beneficioso para los pacientes con esta enfermedad.

Las funciones mitocondriales son extremadamente importantes para la viabilidad celular, como el mantenimiento de la homeostasis y ciertas funciones metabólicas, entre las que se incluye el metabolismo de la energía oxidativa, el control de los niveles de calcio intracelular y la regulación de la excitabilidad neuronal y la transmisión sináptica^{237,238,262–264}. Una causa probable que puede producir la disfunción mitocondrial en las CGR durante el glaucoma es la regulación alterada del flujo sanguíneo de la cabeza del nervio óptico. Ejemplos de estas alteraciones son: el incremento de la PIO, fluctuaciones diurnas en la misma, hipertensión arterial, baja presión de perfusión sistólica, baja presión de perfusión diastólica, reducción de la presión arterial en pacientes hipertensos, enfermedades cardiovasculares, migrañas, trastornos vasoespásticos, arteriosclerosis o esclerosis cerebral, cambios en la presión del líquido espinal^{113,160,241,265–267}. Cualquiera de los casos anteriores provocará un suministro de sangre comprometido, lo que causará isquemias en la retina y, en consecuencia, afectará a la función mitocondrial de las CGR del nervio óptico^{250,251,268}.

Estudios recientes, como se ha mencionado con anterioridad, han demostrado que la función mitocondrial puede ser modulada por la luz^{103,106,249}. En la retina, estas afirmaciones tienen especial importancia ya que, especialmente la zona central, está directamente expuesta a la luz visual (400–900nm). Se sabe que la luz azul (400–480 nm) puede afectar a la flavina mitocondrial y los constituyentes del citocromo de la cadena de transporte de electrones reduciendo la síntesis de ATP, aumentando el estrés oxidativo y pudiendo desencadenar mecanismos de muerte celular^{113,228,235,241,269}. Consecuentemente, no solo la luz azul procedente de la energía solar, sino también por dispositivos artificiales, entre los que se incluyen diferentes pantallas y dispositivos de LED, podría impactar en las mitocondrias de las CGR y tener relevancia en el progreso del glaucoma. Por el contrario, la luz roja (650–900 nm) actúa sobre el complejo mitocondrial IV (o citocromo c oxidasa) estimulando la producción de ATP y de óxido nítrico, y mejorando la supervivencia celular²²¹. Por ello, el aumento de la cantidad de luz roja que alcanza a la retina puede ser un enfoque terapéutico para el tratamiento de las disfunciones mitocondriales.

En este estudio, se observó que la luz azul, al igual que varias toxinas mitocondriales (rotenona, 3-NP, antimicina y azida sódica) reduce la supervivencia de las células *in vitro* (figuras c4.1 y c4.2) de manera dependiente de la intensidad. Aunque la luz roja no tuvo efecto significativo en la viabilidad de las células R28 a ninguna intensidad probada (figura c4.2), sí atenuó

significativamente las influencias negativas de las toxinas mitocondriales y la luz azul (figuras c4.1 y c4.2). Estos resultados apoyan la hipótesis de que la luz azul afecta negativamente a la función mitocondrial y que ese efecto negativo puede atenuarse mediante el uso de cantidades apropiadas de luz roja. El mecanismo por el cual la luz azul afecta negativamente la supervivencia de las células R28 implica la pérdida de actividad mitocondrial y la inducción del estado de estrés oxidativo, lo que incrementa la expresión de la proteína HO-1 (figuras c4.3 a c4.5) que se sobreexpresó en situaciones de disfunciones celulares relacionadas con cambios en el estado REDOX^{270,271}. Por ello, el nivel de expresión de HO-1 es importante en los sistemas antioxidantes de defensa de los organismos^{177,178}.

En un estudio anterior, se demostró que la isquemia/reperfusión de la retina de rata causa una reducción significativa del número de células ganglionares en toda la retina y que la luz roja administrada de forma frontal, a través de la pupila dilatada, atenúa esta pérdida²⁵³. El presente estudio fue diseñado para investigar si la luz azul podría potenciar la pérdida de las CGR durante un proceso de isquemia. Se utilizó un anticuerpo contra la proteína Brn3a, un factor de transcripción específicamente presente en los núcleos de gran porcentaje de las CGR, para cuantificar las células ganglionares y determinar la distribución de las mismas²⁷²⁻²⁷⁴. Con los resultados del recuento, se confirmaron los resultados de otros estudios en los que se describe como la densidad de las CGR varía a lo largo de la retina, siendo más baja en las regiones periféricas^{253,273,275} (figuras c4.7 y c4.8). En el análisis cuantitativo de los números de CGR se restringió el análisis de células Brn3a positivas a una región de 6 mm² que abarca desde la región temporal a la nasal de la retina, a través del nervio óptico. La isquemia/reperfusión causó una disminución estadísticamente significativa en los números de CGR en todas las regiones que se analizaron (figuras c4.7 y c4.8). La aplicación de luz azul exacerbó esta pérdida, mientras que la incubación con luz roja la atenuó, resultados que se confirmaron mediante la cuantificación de Brn3a en retinas completas analizadas por WB (figura c4.9). Por lo tanto, los resultados respaldan la hipótesis de que la luz azul puede influir negativamente en la tasa de progresión del glaucoma^{113,235} que la exposición de la retina a niveles definidos de luz roja puede ser beneficiosa para la supervivencia de las CGR^{160,253}.

El incremento del nivel de la PIO por encima del valor de la presión arterial sistólica (como se utilizó en este estudio) provoca una pérdida casi completa del suministro de sangre a la retina. Dependiendo de la duración de la intensidad y duración de la isquemia, así como del modo y tiempo de reperfusión, la retina se ve afectada en mayor o menor medida, siendo la retina externa el área más susceptible al daño²⁷⁶⁻²⁸⁰. Aunque existan zonas más susceptibles al daño, el análisis de retinas enteras sometidas a isquemia en oscuridad durante 60 minutos

(reperfusión de 5 minutos) dio como resultado que los niveles de ATP generales disminuyeron a aproximadamente el 25% de la cantidad normal y siendo esta disminución aún mayor cuando el proceso se realizó bajo condiciones de luz azul. Sin embargo, cuando las condiciones lumínicas fueron de radiación en la zona roja del espectro, la cantidad de ATP se mantuvo más elevada (figura c4.7). Estos cambios en los niveles de ATP están en concordancia con estudios que muestran cómo la luz azul y la roja afectan a la función mitocondrial de maneras opuestas, la primera reduciendo su actividad funcional y la roja promoviendo la formación de ATP²²¹. Los datos que se muestran en la figura c4.6 también sugieren que la luz roja eleva los niveles de ATP en los tejidos, lo que podría proporcionar un precondicionamiento frente a diversos daños^{120,130,131,157,219,221,253-255}, datos coherentes con los resultados obtenidos en el modelo *in vitro* con las células R28 en el que la exposición a luz roja, tanto antes como después de la incubación con luz azul, contrarrestó el daño provocado por ésta última (figura c4.2B). La reducción de los niveles normales de ATP por la exposición a luz azul (figura c4.7) demuestra como la exposición a ciertas intensidades de luz azul durante solo 60 minutos pueden tener consecuencias negativas en el tejido retiniano. Por ello, se entiende que, en los casos de exposición a la luz azul de manera continuada, aunque a intensidades más bajas, las células CGR sanas son capaces de contrarrestar dichos efectos negativos, pero en el caso de células con disfunciones mitocondriales, como en el glaucoma, esta exposición se convierte en un importante factor de riesgo que afecta a la viabilidad celular.

Los efectos opuestos de la luz roja y azul en la glía retiniana (células de Müller, astrocitos y microglia) se analizaron con respecto a la localización y expresión de la proteína GFAP (figura c4.10). La isquemia y, en menor medida, la exposición a luz, azul causaron un importante aumento de la expresión de la GFAP. En el caso de las retinas sometidas al proceso isquémico en condiciones de radiación azul, se produce un daño severo en el tejido, dando lugar a la aparición de áreas vacías debidas a la muerte de ciertos tipos celulares, lo que se refleja en una tinción irregular del tejido. Además, la medida de los niveles de ATP en estas condiciones fue apenas detectable (figura c4.6). En el caso de la isquemia en condiciones de luz roja, si bien se redujo el nivel de expresión de GFAP causado por la isquemia, también pareció estimular ligeramente la activación de GFAP asociada con microglia / astrocitos localizados cerca de los tejidos vasculares. Se sabe que los astrocitos / microglia tienen una asociación compleja con los vasos sanguíneos, tanto morfológicamente como funcionalmente^{269,281-283}. Esta observación es de interés, ya que ciertos estudios confirman que condiciones concretas de exposición a luz roja estimulan el flujo sanguíneo ocular^{284,285}, hecho relacionado con la capacidad de la luz roja de influir en la producción de óxido nítrico^{120,130,157,219,254,255}, vasodilatador del sistema circulatorio.

La síntesis de glutatión, agente importante en los mecanismos de neuroprotección, consume energía celular. Por los resultados de la figura c4.12, parece que la inducción de daño isquémico provoca un incremento de la cantidad total de glutatión, al igual que han descrito otros autores^{286,287}, que no es significativa cuando la luz azul está presente, pero sí en el caso de la luz roja. Puede que la disminución en la síntesis de ATP afecte a la producción *de novo* de esta molécula, motivo por el cual al analizar la cantidad de ella en estado oxidado GSSG se vio cómo la proporción en las retinas isquémicas se correspondía casi totalmente a esta forma citoprotectora frente al estrés oxidativo²⁸⁸.

La respuesta de las retinas *in vivo*, medidas mediante electroretinograma (figuras c4.13 y c4.14), reflejan la capacidad funcional de los diferentes tipos celulares de la retina, y de forma genérica, cuál es el estado fisiológico del tejido y su integridad. Las retinas en las que no se realizó isquemia y se mantuvieron en oscuridad, presentaron una respuesta que se consideró patrón para comparar con el resto de tratamientos. El análisis de los resultados muestra cómo la exposición a luz roja o luz azul (bajo las condiciones del experimento) de los ojos de los animales, no tuvo influencia alguna en la funcionalidad del tejido en el caso de los ojos no sometidos a proceso isquémico a lo largo del tiempo. Por el contrario, en el caso de los ojos sometidos a procesos isquémicos, se puede ver cómo la funcionalidad de las retinas se ve comprometida tras tres días de reperusión en aquellos mantenidos en oscuridad o en luz azul, mientras que en aquellos bajo condiciones de luz roja la integridad del tejido era significativamente mejor. Transcurridos quince días desde la isquemia, se observa claramente la influencia negativa de la exposición a luz azul en la funcionalidad de las mismas, dando lugar a unas respuestas de amplitud de onda mucho menores que en el caso de las retinas incubadas en oscuridad. En el caso de la incubación con luz roja, las amplitudes obtenidas, y por lo tanto la funcionalidad de las retinas, fueron mayores que en los casos de los ojos mantenidos en condiciones de oscuridad. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en el resto de experimentos en los que se analizaron los tejidos por diferentes técnicas tras el sacrificio de los animales.

Los resultados obtenidos indican, por lo tanto, la inconveniencia de la exposición a luz azul en los casos en los que las retinas se encuentran comprometidas por otros daños, así como el beneficio que produce en este tejido la exposición a luz roja. En el caso de enfermedades como el glaucoma, el enfoque alternativo del uso de agentes farmacológicos se ha considerado durante muchos años, pero persisten las dificultades asociadas con el suministro y la toxicidad de los mismos²³⁴⁻²³⁶. La elaboración de procedimientos y dispositivos que permitan modificar la cantidad y el espectro de la luz que alcanza a las CGR y su posible aplicación en enfermedades

crónicas como el glaucoma^{243,289} aún no se ha establecido. Por ello, una idea potencial es la creación de filtros para lentes oculares que conviertan ciertas longitudes de onda potencialmente perjudiciales del EEM en otras longitudes beneficiosas para la retina y su funcionalidad⁷¹.

Capítulo V

Capítulo V: Luz y retina II. La luz roja y su capacidad para contrarrestar el daño de la luz azul en un modelo in vitro de epitelio pigmentario de la retina: ARPE19.

c5.1. Introducción.

La teoría mitocondrial del envejecimiento sostiene que la acumulación progresiva de mutaciones, así como las influencias ambientales en las mitocondrias, dan como resultado una reducción de los niveles de producción de ATP, la generación de EROs provocando el estrés oxidativo, procesos de inflamación e incluso activa mecanismos de muerte celular^{235,246}. Variedad de estudios apuntan a esta teoría como una de las posibles que afecta en el desarrollo de enfermedades como la DMAE, en la que se produce una lesión retiniana por la exposición crónica a la luz y las consecuencias del estrés oxidativo generado pueden jugar un papel crucial²⁹⁰⁻²⁹². En este sentido multitud de estudios muestran cómo las longitudes de onda cortas son particularmente dañinas, según se ha descrito ya en otros tipos celulares de la retina^{293,294}, y especialmente para los fotorreceptores y el EPR²⁹⁵⁻²⁹⁹. La intensidad de luz necesaria para causar daño en las retinas de animales nocturnos es solo dos o tres veces superior a la de la iluminación normal de una habitación^{298,300,301} e históricamente ha sido relacionados con la etiología de afecciones oculares debilitantes de fotorreceptores y causantes de la disfunción del EPR, como la DMAE^{290,302-304}. En el caso del EPR, los cromóforos de los pigmentos visuales, como la proteína 11-cis-retiniana, absorben ciertos tipos de luz a lo largo del EEM. La selectividad de la interacción se debe a los diferentes componentes moleculares que se encuentran en los bastones y los tres tipos diferentes de conos en la retina humana. La rodopsina es, sin duda, el cromóforo responsable del daño en los fotorreceptores de roedores nocturnos, pero puede que no lo sea en primates³⁰⁵. En algunas especies, el fotoblanqueamiento de rodopsina y / u otros pigmentos visuales pueden ser la causa de la formación de productos fototóxicos que inducen daños los en la retina. La forma trans-retinal, un subproducto de la rodopsina fotoblanqueada, presente en abundancia en el tejido en la retina, es particularmente activo en el espectro de absorción de la luz azul³⁰⁶. Además, la cantidad de otros cromóforos retinianos, como los complejos de melanina y la lipofuscina localizados en las células del EPR³⁰⁶, aumenta con la edad³⁰⁷ y generan varios tipos de EROs cuando se irradian con determinados tipos de luz, causando muerte celular en el EPR³⁰⁸⁻³¹⁰.

Las células del EPR y los fotorreceptores son ricos en mitocondrias, pero para los estudios llevados a cabo hay que tener en cuenta que también presentan altas cantidades de diferentes pigmentos, ya que aunque los estudios llevados a cabo en células que carecen de pigmento muestran que las funciones mitocondriales se ven afectadas negativamente por la exposición a luz de longitud de onda corta^{110,112,114,311-314} y positivamente por la exposición a longitudes de onda largas^{120,157,254,315}, la absorción por parte de los pigmentos podría afectar a los resultados.

Los experimentos actuales implican el uso de células de la línea ARPE19 que están desprovistas de pigmentos tales como complejos de melanina o lipofuscina. El objetivo de los mismos fue comprender más sobre la manera en la que la luz azul afecta negativamente a las mitocondrias y evaluar la capacidad de la luz roja de tener el efecto contrario, teniendo en cuenta que la disfunción mitocondrial causada por el envejecimiento junto con la exposición a longitudes de onda corta pueden ser las causantes de la pérdida de células en el EPR en la DMAE. Además, se trató de evaluar la aplicación de longitudes de onda larga como una forma no invasiva de contrarrestar el desarrollo de este proceso^{219,316,317}.

c5.2. Diseño experimental.

Se sembraron 0.1 mL, 0.3 mL o 1,5 mL de cultivos de células ARPE19 desde una solución inicial a una concentración de 100000 cels/mL en placas de 96, 48 o 6 pocillos respectivamente. Tras dejar que se asentasen durante la noche, los cultivos fueron sometidos a los diferentes regímenes de tratamiento:

- 30 horas en oscuridad,
- 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de oscuridad,
- 18 horas de oscuridad seguidas de 12 de luz roja,
- 18 horas de luz azul seguido de 12 de luz roja,
- 18 horas de oscuridad seguidas de 12 horas de incubación en presencia de curcumina
- 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de incubación en medio conteniendo curcumina.

Se analizó la viabilidad celular de los mismos tras los tratamientos con el reactivo MTT, así como la actividad mitocondrial con el uso del JC-1 y la producción de EROs mediante la incubación con DHE. Además, se extrajeron proteínas para los estudios por WB, y en otras ocasiones las células se fijaron para la realización de estudios por inmunocitoquímica. Los

LED empleados para la radiación fueron azules ($\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm, 26 W/m²) y rojos ($\lambda_{\text{máx}}$ 360 nm, 6.5 W/m²).

Por otro lado, se sembraron sobre insertos de 6,5 mm (para placa de 24 pocillos) con membrana de policarbonato, 200 μ l de células desde una solución inicial a una concentración de 100000 cels/mL. Las células ARPE19 cultivadas en los insertos desarrollan uniones estrechas generando una superficie que separa dos compartimentos (el superior y el inferior a la membrana donde se sustentan las células) entre los que se puede medir la resistencia de la misma al paso de una corriente, o resistencia transepitelial (TER)^{318,319}. Los cultivos se mantuvieron hasta 80 días. En los primeros 7 días, el medio de cultivo contuvo un 10% de FBS y se incubaron en oscuridad. A partir de esa primera semana, el medio de cultivo solo contuvo un 1% de FBS y a partir de la segunda semana, se expusieron las placas a los diferentes regímenes de luz:

- oscuridad
- luz azul 12 horas seguida de 36 horas en oscuridad
- 12 horas de luz roja seguida de 36 horas de oscuridad
- 12 horas de luz azul seguida de 12 horas de oscuridad, seguida de 12 horas de luz roja y 12 horas de oscuridad.

Las intensidades empleadas fueron en el caso de la luz azul, 13.6 W/m², y en el de la luz roja, 6.5 W/m². Se registraron los valores TER dos veces por semana y cada valor fue el promedio de tres medidas con 20 minutos de diferencia.

c5.3. Resultados.

Inicialmente, se determinó la concentración de las toxinas mitocondriales: rotenona, 3-NP, actinomicina y la azida sódica, así como la intensidad de luz requerida para causar una pérdida del 30-35% de la viabilidad celular de las células ARPE19 durante un período de 12 horas (figura c5.1). Cuando las células se expusieron a estos daños, y posteriormente se incubaron en

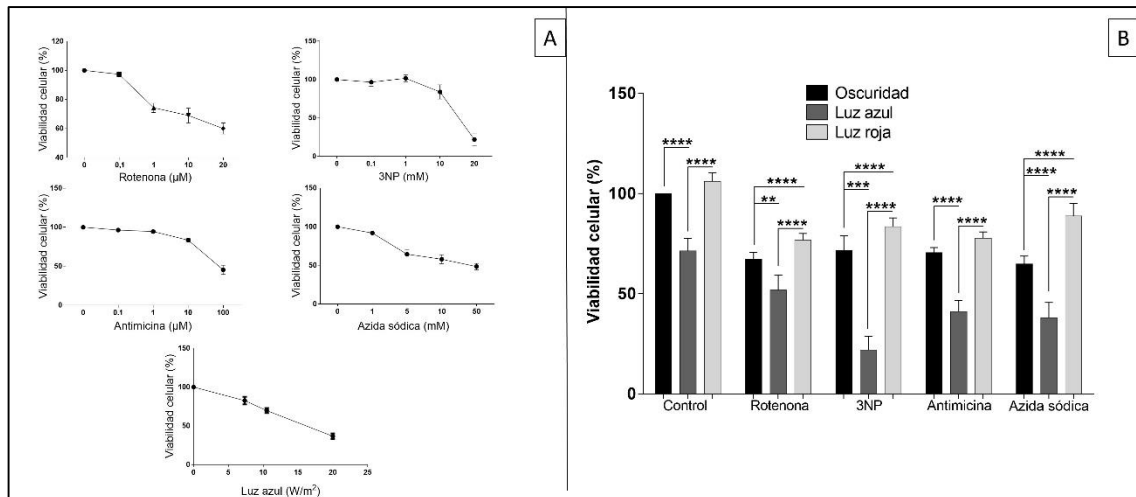


Figura c5.1. A) Curvas de dosis-respuesta para la incubación con rotenona, 3NP, antimicina, azida sódica y luz azul de cultivos de células ARPE19 durante 18 horas, realizadas con la incubación con el reactivo MTT. B) Análisis cuantitativo de la viabilidad celular de las células ARPE19 frente a la dosis D₄₀ de rotenona (10 µM), 3NP (15 mM), antimicina (50 µM) y azida sódica (5 mM) incubadas en condiciones de oscuridad, luz azul (15 W/m²) o de luz roja (6.5 W/m²) durante 18 horas. Los resultados de n=8 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, α=0.05, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

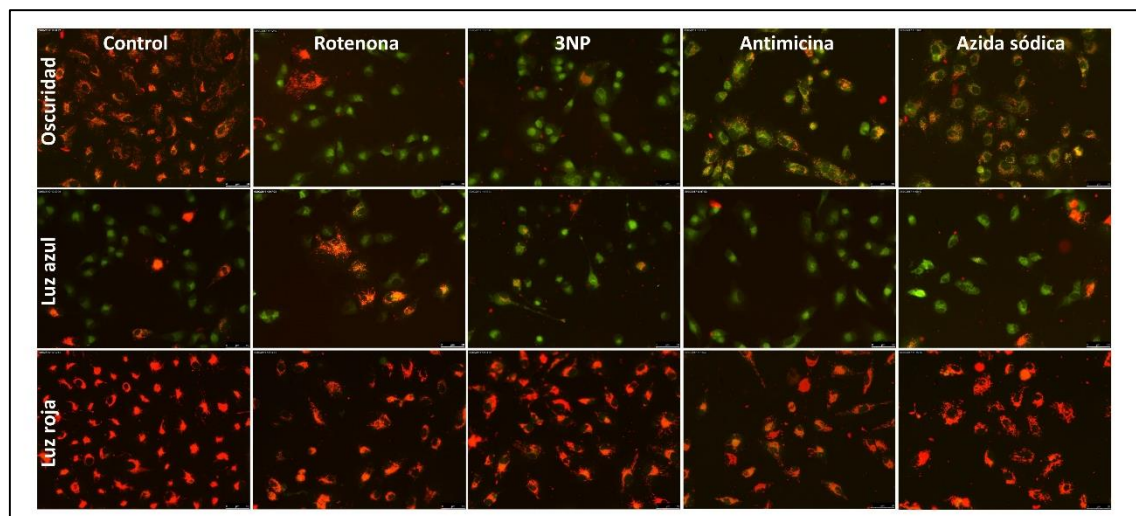


Figura c5.2. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células ARPE19 con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 6 horas sin tratar (control) o en presencia de los inhibidores de complejos enzimáticos mitocondriales selectivos: rotenona (10 µM), 3NP (15 mM), antimicina (50 µM) y azida sódica (5 mM) en condiciones de oscuridad o en presencia de luz azul (26 W/m²) o de luz roja (6.5 W/m²). 20x. n=4.

condiciones de luz azul, se observó, por los resultados del ensayo con MTT, cómo la viabilidad celular disminuyó en todos los casos, en mayor o menor medida. En el caso de la luz roja, que no tuvo influencia significativa en la viabilidad por sí misma, la incubación tras los diferentes daños atenuó el daño producido por las diferentes toxinas (figura c5.1).

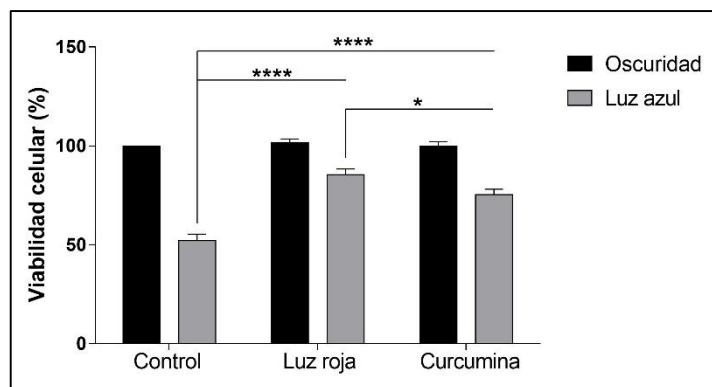


Figura c5.3. Análisis de la viabilidad celular de los cultivos de ARPE19 con el reactivo MTT tras 18 horas mantenidos en oscuridad o expuestos a luz azul (26 W/m²). Estos cultivos fueron expuestos posteriormente 12 horas a luz roja a (6.5 W/m²) o a curcumina (1 μM). Los resultados de n=8 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *Two-way* ANOVA, α=0.05, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

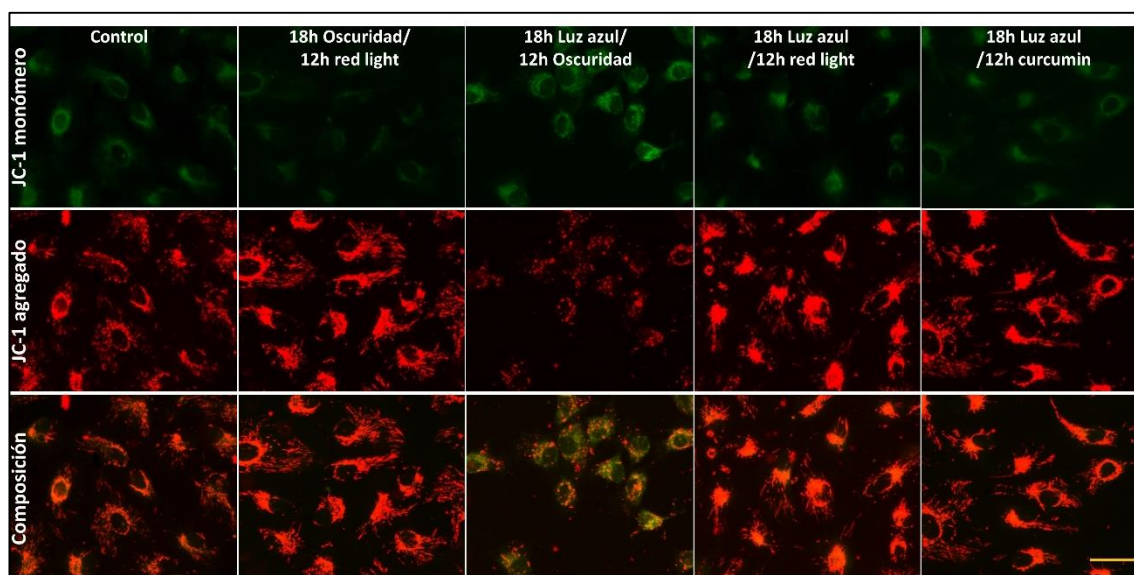


Figura c5.4. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células ARPE19 con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 30 horas sin tratar (control) o 18 horas en oscuridad seguidas de 12 horas bajo luz roja (65 W/m²), 18 horas en luz azul seguidas de 12 horas en oscuridad, 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de luz roja o 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de curcumina (1 μM). 20x. Barra de escala: 50 μm. n=4.

El análisis de la actividad mitocondrial con el reactivo JC-1 (figura c5.2) reveló que la exposición de las células tanto a luz azul como a los diferentes tóxicos resultó en una acumulación de reactivo sin procesar en el citoplasma, con la consecuente fluorescencia en verde, comparada con las células control que sí muestran tinción procesada con fluorescencia en rojo. Además, las células incubadas con luz roja en vez de en oscuridad tras los tratamientos, conservan fluorescencia roja. En la figura c5.3 se observa la viabilidad de las células ARPE19 sometidas a diferentes regímenes de luz: luz azul durante 18 horas seguida de incubación en oscuridad o en

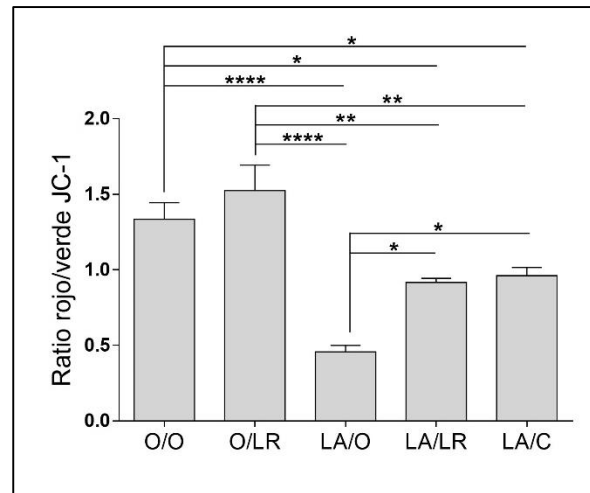


Figura c5.5. Análisis cuantitativo de la actividad mitocondrial con el reactivo JC-1 en cultivos de células ARPE19. Los cultivos se mantuvieron durante 30 horas sin tratar (O/O) o 18 horas en oscuridad seguidas de 12 horas bajo luz roja (65 W/m^2) (O/LR), 18 horas en luz azul seguidas de 12 horas en oscuridad (LA/O), 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de luz roja (LA/LR) o 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de curcumina ($1 \mu\text{M}$) (LA/C). Los resultados de $n=4$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Holm-Sidak para comparaciones múltiples, (**** $p < 0.0001$).

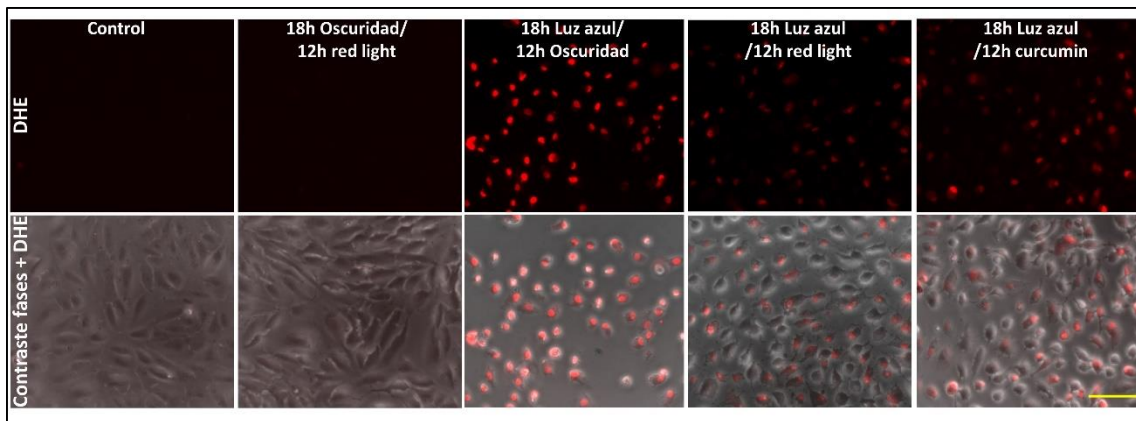


Figura c5.6. Fotografías del análisis de la producción de EROs en las células ARPE19 con el reactivo DHE. En rojo se observa la fluorescencia nuclear del DHE, y en la fila inferior se puede ver la composición de las imágenes de fluorescencia en composición con las fotografías de contraste de fases. Los cultivos se mantuvieron durante 30 horas sin tratar (control) o 18 horas en oscuridad seguidas de 12 horas bajo luz roja (65 W/m^2), 18 horas en luz azul seguidas de 12 horas en oscuridad, 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de luz roja o 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de curcumina ($1 \mu\text{M}$). 10x. Barra de escala: $10 \mu\text{m}$. $n=4$.

luz roja durante 12 horas más. En tales condiciones, la luz azul produce una pérdida de viabilidad del 50% que es atenuada en el caso de la incubación posterior con luz roja. De la misma forma, se observa que la incubación con curcumina ($1 \mu\text{M}$) tiene el mismo efecto, datos que se confirman con la incubación. En la figura c5.4 se ve la actividad mitocondrial medida con el JC-1 para los mismos tratamientos, en los que se observa como las células incubadas con luz azul,

seguidas de oscuridad, son las que presentan menos procesamiento del reactivo y menos fluorescencia roja. Estos resultados se constatan con la cuantificación de la tinción en la figura c5.5.

La generación de EROs realizada con el reactivo DHE se puede observar en la figura c5.6. La luz roja por si misma no produjo un nivel de EROs significativo y fue capaz de reducir la cantidad producida en las células previamente expuestas a luz azul. La curcumina tuvo el mismo efecto, prácticamente en igual medida, como se puede ver en la cuantificación de la cantidad de fluorescencia roja frente a fluorescencia azul de las células en el cultivo (figura c5.7).

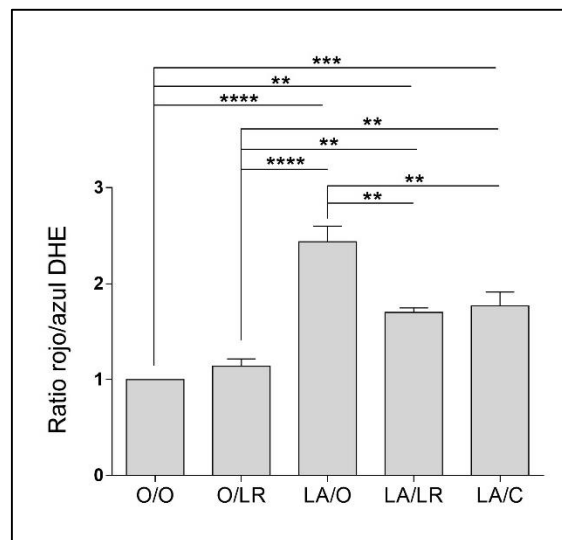


Figura c5.7. Análisis cuantitativo de la producción de EROs en las células ARPE19 con el reactivo DHE. Los cultivos se mantuvieron durante 30 horas sin tratar (O/O) o 18 horas en oscuridad seguidas de 12 horas bajo luz roja (65 W/m^2) (O/LR), 18 horas en luz azul seguidas de 12 horas en oscuridad (LA/O), 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de luz roja (LA/LR) o 18 horas de luz azul seguidas de 12 horas de curcumina ($1 \mu\text{M}$) (LA/C). Los resultados de $n=4$ se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Holm-Sidak para comparaciones múltiples, (**** $p < 0.0001$).

El análisis por WB de los extractos de proteínas derivados de células ARPE19 expuestas a luz azul con diferentes tratamientos y tiempos, seguidos por 12 horas de incubación en oscuridad o bajo condiciones de luz roja, se muestran en las figuras 5.8, 5.9 y 5.10. La exposición durante tres horas a luz azul no causó efecto significativo en la expresión de la proteína AIF (figura c5.8), aunque sí una ligera estimulación de la fosforilación de la p38-MAPK (figura c5.9) sin que se vea afectada la HO-1 (figura c5.10). Sin embargo, al aumentar la exposición a la luz azul, el AIF se fragmenta para originar un producto de 57 kDa, y se observa un incremento tanto en la fosforilación de la p38-MAPK y la HO-1. En el caso de que dicha exposición a luz azul se

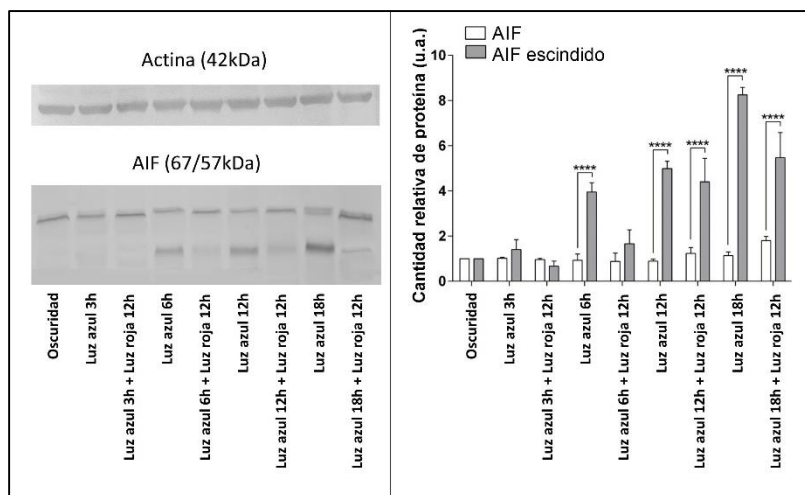


Figura c5.8. Análisis por WB de la expresión de la proteína AIF (67 kDa) y su subproducto procedente de su escisión (57 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en cultivos de células ARPE19 incubados 3, 6, 12 o 18 horas en condiciones de luz azul (26 W/m²), seguidas de 12 horas de oscuridad o de 12 horas de luz roja (6.5 W/m²). A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa del AIF y su subproducto en los diferentes tratamientos. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** $p < 0.0001$).

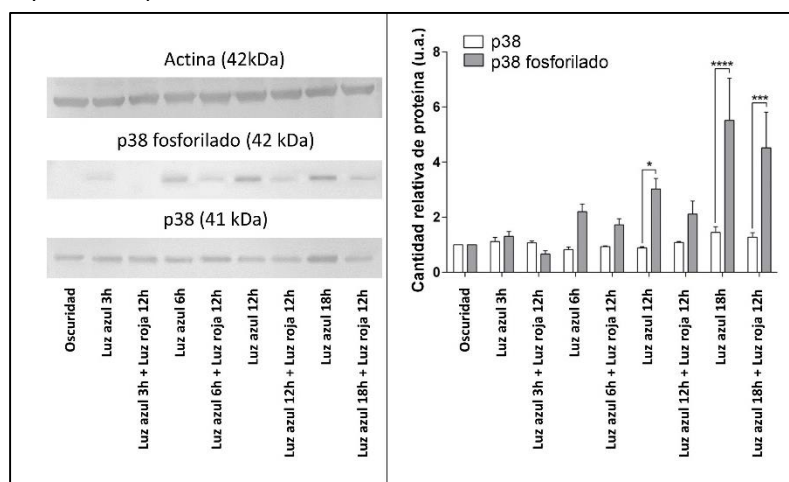


Figura c5.9. Análisis por WB de la expresión de la proteína p38 (41 kDa) y su forma fosforilada (42 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en cultivos de células ARPE19 incubados 3, 6, 12 o 18 horas en condiciones de luz azul (26 W/m²), seguidas de 12 horas de oscuridad o de 12 horas de luz roja (6.5 W/m²). A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa de p38 y su forma fosforilada en los diferentes tratamientos. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** $p < 0.0001$).

continuase con 12 horas de exposición a luz roja, estos valores de expresión se vieron reducidos. Histológicamente se puede observar esta reducción en la HO-1 (figura c5.11).

Como se muestra en figura c5.12, las células ARPE-19 confluentes en cultivo después de aproximadamente una semana son positivas para la localización del anticuerpo anti ZO-1. La

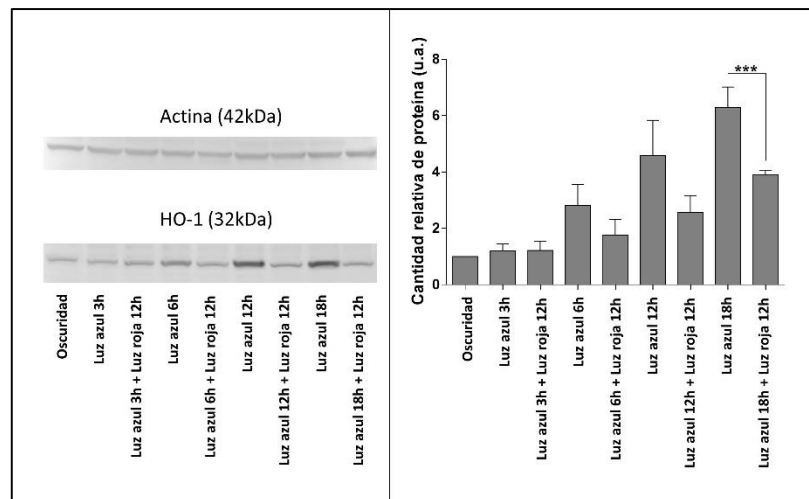


Figura c5.10. Análisis por WB de la expresión de la proteína HO-1 (32 kDa) en relación a la actina (42 kDa) en cultivos de células ARPE19 incubados 3, 6, 12 o 18 horas en condiciones de luz azul (26 W/m²), seguidas de 12 horas de oscuridad o de 12 horas de luz roja (6.5 W/m²). A la izquierda, fotografías de las membranas con las bandas de expresión de proteínas. A la derecha, análisis cuantitativo de la expresión relativa de la HO-1 en los diferentes tratamientos. Los resultados de n=3 se expresan como promedio \pm SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way* ANOVA, $\alpha=0.05$, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (***) $p < 0.001$).

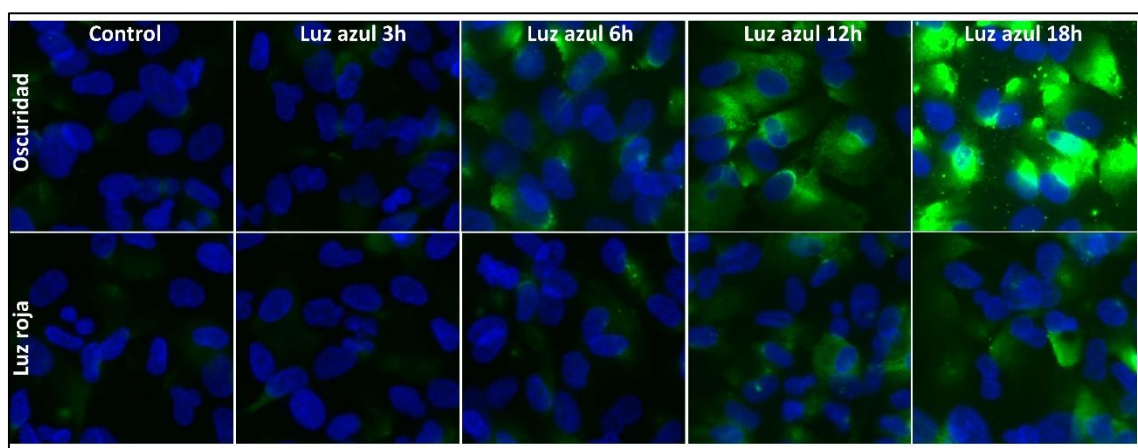


Figura c5.11. Imágenes de cultivos confluentes de la línea celular ARPE19 teñidas para la inmunolocalización de la proteína HO-1 (verde) y marcaje nuclear con DAPI (azul) incubados 3, 6, 12 o 18 horas en condiciones de luz azul (26 W/m²), seguidas de 12 horas de oscuridad o de 12 horas de luz roja (6.5 W/m²). 20x. n=4.

incubación con luz azul provoca una pérdida de la inmunoreactividad frente a esta proteína, dependiente de las horas de exposición. La incubación con luz roja mantiene la positividad de la tinción (figura c5.12).

Los cultivos de ARPE-19 cultivados en insertos de placas de 24 pocillos durante 80 días revelan un aumento en la medición de TER a lo largo del tiempo (figura c5.13). La resistencia fue en aumento para los cultivos bajo todos los regímenes hasta aproximadamente la quinta semana (día 36), a partir del cual comienzan a observarse diferencias, disminuyendo el valor del TER para

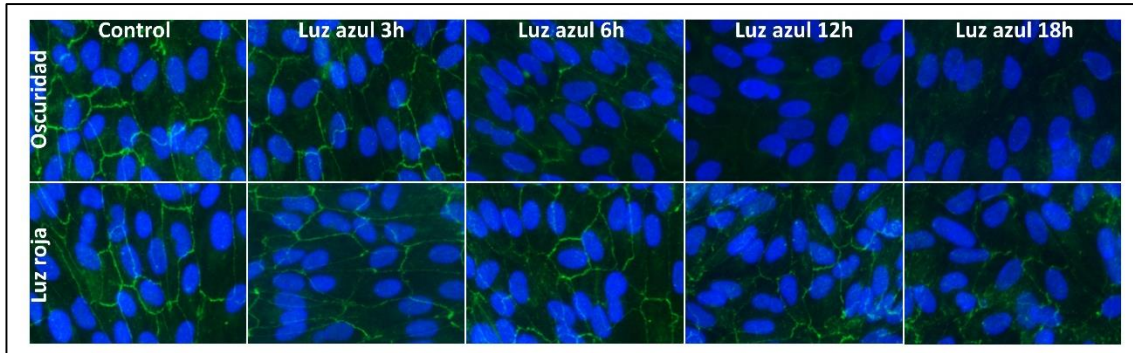


Figura c5.12. Imágenes de cultivos confluentes de la línea celular ARPE19 teñidas para la inmunolocalización de la proteína ZO-1 (verde) y marcaje nuclear con DAPI (azul) incubados 3, 6, 12 o 18 horas en condiciones de luz azul (26 W/m^2), seguidas de 12 horas de oscuridad o de 12 horas de luz roja (6.5 W/m^2). 20x. n=4.

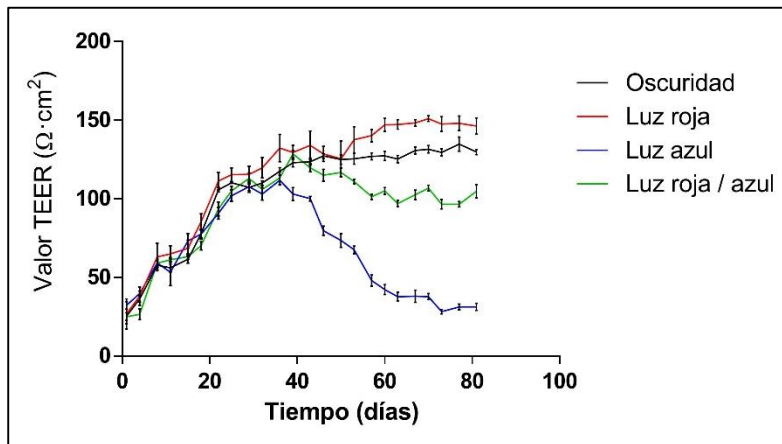


Figura c5.13. Análisis de los cambios en la resistencia transepitelial (TEER), medida en $\Omega \cdot \text{cm}^2$, de cultivos de células ARPE19 mantenidos durante más de 80 días en diferentes regímenes de radiación: oscuridad total, 12 horas de luz azul seguidas de 36 horas en oscuridad, 12 horas de luz roja seguidas de 36 horas de oscuridad o 12 horas de luz azul seguidas de 12 horas de oscuridad, seguidas de 12 horas de luz roja seguidas de 12 horas de oscuridad. La luz azul tuvo una intensidad de 13.6 W/m^2 y la luz roja de 6.5 W/m^2 .

aquellos cultivos que en su tratamiento tenían exposición a luz azul. Dentro de ellos, los cultivos en los que se alternó la luz azul con luz roja mantuvieron su TER significativamente más elevado que aquellos en los que la luz azul se alternó con oscuridad.

c5.4. Discusión.

Existen evidencias científicas consistentes que apoyan el papel de la disfunción mitocondrial especialmente durante el comienzo de la DMAE³²⁰⁻³²². El estrés oxidativo en la retina puede ser causado por exposición a luz azul^{314,323,324} dando lugar a la alteración de la bioenergética mitocondrial³²⁵ y a daños en el ADN mitocondrial en las células del EPR^{314,323,324}, ambas

características asociadas con la DMAE. Es importante destacar los resultados de diversos estudios en tejidos afectados por DMAE que muestran diversas variantes en los haplogrupos del ADN mitocondrial que codifican para proteínas que conforman la cadena de transporte de electrones mitocondrial^{326,327}, una disminución en el número de mitocondrias³²⁸ y daños significativos en su ADN mitocondrial³²⁹. Por ello, este estudio se centró en comprender más sobre los eventos bioquímicos relacionados con la toxicidad inducida por luz azul a las células del EPR, así como evaluar el efecto de la luz roja y la posibilidad de emplearla como un tratamiento no invasivo para el tratamiento de las disfunciones en las células del EPR causadas por la luz azul.

Las células ARPE19 son una línea celular inmortalizada carente de pigmentos como melanina o lipofuscina, localizados fuera de las mitocondrias³⁰⁶. Por ello, los resultados obtenidos en los estudios en esta línea celular, se relacionan con el efecto de la luz en las mitocondrias sin la interferencia que podrían causar estos pigmentos y su absorción de radiación. Este planteamiento sigue la línea de los estudios llevados a cabo en células del EPR libres de lipofuscina en las que la exposición a luz azul causa daño estructural e inicio de cascadas de muerte celular^{314,330}, así como la generación de EROs en mitocondrias aisladas de EPR³³¹. El efecto perjudicial directo de la luz azul sobre las mitocondrias ha sido demostrado en estudios con fibroblastos cuyo ADN mitocondrial se encontraba modificado y la síntesis de las enzimas de los complejos mitocondriales estaba afectada. En ellos, se mostró cómo al contrario que en los fibroblastos intactos, los fibroblastos con las mitocondrias afectadas respondían diferente y eran menos sensibles al daño por luz azul¹¹². De esta manera, se piensa que las ARPE19 son un buen modelo, utilizado por otros autores^{332,333}, en el que determinar cómo la luz afecta a los cromóforos mitocondriales en células del EPR *in situ*. Según se muestra en las figuras desde la 5.4 a la 5.7, la exposición a la luz azul de las ARPE19 causa en ellas una despolarización mitocondrial y un aumento en la expresión de EROs, factores relacionados con la muerte celular^{334,335}. Esta despolarización/disfunción se hizo patente con los resultados obtenidos con el reactivo JC-1, pero para determinar la afectación específica de los diferentes complejos mitocondriales, se inhibieron selectivamente con las toxinas específicas para cada uno de ellos en ausencia o presencia de luz azul (figura c5.2). En todos los casos, la muerte celular causada por ellos fue incrementada cuando se expusieron a luz azul, aunque en diferente medida. Por ello, de estos resultados se interpreta que la luz no afecta a la función de un único complejo mitocondrial, aunque parece afectar de manera más intensa a las células incubadas con el inhibidor del complejo II, 3-NP. Conclusiones similares se obtuvieron en estudios previos en los que se comparó bioquímicamente el tipo de muerte celular causada por la azida sódica con la

causada por la luz azul¹¹⁶. El estudio se basó en la idea de que la azida sódica es un inhibidor específico de la actividad del complejo IV^{171,336}, que puede absorber luz azul^{108,109}. La luz azul causó muerte celular por la activación de AIF, c-Jun, JNK y HO-1, sin influir en la α -fodrina ni en la caspasa-3, mientras que en la muerte celular causada por la azida sódica si se activaron la α -fodrina y la caspasa-3, pero no tuvo efecto en AIF, c-Jun, JNK o HO-1¹¹⁶. Tanto los estudios presentados en este capítulo, como los estudios anteriores, se basan en la especificidad de los inhibidores mitocondriales utilizados, a pesar de que en algunos casos no se trata de una inhibición selectiva total. Por ejemplo, se sabe que la azida sódica estimula la producción de óxido nítrico¹⁷², y afecta a las funciones de los canales de calcio¹⁷⁴ y de potasio¹⁷³.

De manera consistente con estudios llevados a cabo en otros tipos celulares^{116,117,119,144,156,176}, la toxicidad inducida por la luz azul en las células ARPE19 provoca un incremento en la expresión de la proteína HO-1 y la escisión de AIF (flavina-adenina dinucleótido) de una manera dependiente de la intensidad. Se sabe que la escisión de AIF da lugar a un subproducto de 57 kDa que sale de la mitocondria y migra al núcleo, desencadenando muerte celular por necroptosis^{183,185,186}. La luz roja, que estimula al complejo IV mitocondrial^{120,155,157,163,187}, es capaz de reducir dicha escisión de AIF (figura c5.9) y en consecuencia incrementa la viabilidad en los cultivos (figura c5.3). Estos resultados muestran cómo los daños causados en los nucleótidos de flavina mitocondriales (como el producido por la luz azul) pueden ser atenuados por la estimulación de COX¹⁶³.

El incremento en la expresión de la proteína HO-1 por la exposición a luz azul se debe a su rol como neuroprotector endógeno. La inducción de la expresión de esta proteína, que responde ante diversos estímulos de estrés y juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular, se relaciona con la ruta protectora Nrf2-ARE. Esta ruta puede ser activada por agentes farmacológicos como la curcumina, incrementando la expresión de la HO-1 y reduciendo así diferentes formas de estrés^{180,181,337}. El daño causado por la luz azul es atenuado tanto por curcumina como por luz roja (figura c5.3), pero como se observa en las figuras c5.10 y c5.11, la luz roja por sí sola no induce la expresión de la HO-1, por ello se interpreta que los resultados citoprotectores de la exposición a luz roja^{120,155,338} ocurren vía COX, sin que parezca estar involucrada la vía Nrf2-ARE, aunque harían falta estudios más enfocados a ello para aseverar de forma inequívoca estos indicios. En el caso de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), incluidas las quinasas reguladoras de las señales extracelulares (ERK), c-JUN, quinasas N-terminales (JNK) y la p38-MAPK, se relacionan con multitud de actividades biológicas y de regulación celular^{188,189}. La activación de ERK contribuye típicamente a la diferenciación celular, la proliferación y la supervivencia, mientras que JNK y p38-MAPK se activan por la acción

de las citoquinas proinflamatorias y el estrés ambiental (como la radiación UV y el estrés osmótico)¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. Los resultados de este trabajo muestran que la exposición de las células ARPE19 a la luz azul dio lugar a la aparición del producto fosforilado de p38-MAPK, que fue mayor cuanto más largo fue el tiempo de exposición a la luz azul (figura c5.9). La estimulación de esta fosforilación también se ha descrito en fotorreceptores¹⁹¹ y células derivadas de la retina¹¹⁶. Por lo tanto, parece que es una característica común asociada con un daño con luz azul la activación de p38-MAPK y la muerte celular producida por necroptosis. Es importante destacar que estos daños producidos por la exposición a luz azul en las células ARPE19 se atenúan mediante la exposición a luz roja. La luz roja disminuye la fosforilación de la p38-MAPK causada por la luz azul (figura c5.9), que se correlaciona con un aumento de la supervivencia celular (figura c5.2).

Las células del EPR están separadas entre sí por uniones estrechas que se pueden visualizar mediante la tinción para la localización de proteínas como ZO-1, claudina-19 y occludina. Este tipo de uniones estrechas hacen que las células creen una superficie intercomunicada selectiva para el paso paracelular de ciertas moléculas³³⁹ y probablemente se vean afectadas por procesos inflamatorios subclínicos en la DMAE³⁴⁰⁻³⁴². Tanto en nuestros estudios, como en los de otros autores^{318,319}, se demuestra que las células ARPE19 se pueden cultivar en insertos de placa de 24 pocillos y que gradualmente desarrollan uniones estrechas, permitiendo el registro de la resistencia transepitelial de la membrana (TER). En la figura c5.12 se muestra la inmunolocalización de la proteína ZO-1 que se expresa en cultivos ARPE19 y cómo la exposición a ciertas condiciones de luz azul produce una disminución de la misma. Estos resultados se ven reflejados en los valores de TER obtenidos en los insertos. En ellos (figura c5.13) se revelan que los valores máximos de TER que se obtuvieron a 40 días, aumentaron ligeramente en el caso de los cultivos expuestos a ciclos de oscuridad y luz roja, probablemente al pequeño incremento en la proliferación que produce la luz roja (figura c5.1B). Sin embargo, el mismo régimen lumínico pero aplicado con luz azul en vez de con luz roja, produce una clara disminución de los valores de la TER sugiriendo la posibilidad de que la luz azul afecte la función de unión estrecha de las células del EPR *in situ*, lo que puede conducir a una disfunción celular, o bien puede ser la disfunción celular causada por la exposición celular la que derive en una afectación de las uniones estrechas. Cuando los ciclos de luz azul se intercalaron con ciclos de luz roja, los valores de TER se mantuvieron mucho más elevados, por lo que la función celular de esas ARPE19 en cultivo estaba mucho más conservada y se mitigó la disfunción.

En conclusión, nuestros estudios muestran que la exposición de las mitocondrias de células ARPE19 a luz azul produce un mal funcionamiento mitocondrial y un aumento del estrés oxidativo, sugiriendo que tal influencia crónica está asociada con la patología de la DMAE. Se

muestra, con los resultados obtenidos, que la aplicación de luz roja es capaz de atenuar los efectos negativos de la luz azul, resultados coincidentes con los de multitud de estudios en los que se utiliza la terapia con luz roja o infrarroja en la llamada fotobiomodulación, procedimiento no invasivo para tratar la disfunción del EPR en la DMAE. Existen varios estudios preclínicos en los que se han demostrado la influencia positiva de la terapia con luz roja en diversas enfermedades oculares, incluida la DMAE^{316,343} (los ensayos TORPA (NCT00940407) y LIGHTSIGHT (NCT02725762)) y la retinopatía diabética³⁴⁴. Sin embargo, el uso de la luz roja como tratamiento de trastornos oculares humanos sigue sin establecerse en la medicina convencional^{218,317}. Puede que el motivo sea que los datos de los ensayos clínicos existentes son controvertidos y que el mecanismo bioquímico subyacente aún está por describir.

Capítulo VI

Capítulo VI: Principios para la aplicación clínica.

La finalidad de todos los estudios llevados a cabo durante el desarrollo de esta tesis doctoral ha sido profundizar en los mecanismos moleculares que se desencadenan en ciertas enfermedades oculares y cómo diferentes agentes externos los modificaban, especialmente los diferentes componentes de la luz visible. Todo ello ha tenido siempre un fuerte carácter traslacional, enfocado a la búsqueda y desarrollo de terapias avanzadas que puedan ser aplicadas en pacientes y en la población en general, para prevenir, retrasar o ayudar en el tratamiento de enfermedades oculares.

Desde hace mucho tiempo, se sabe que la luz es un factor importante en el desarrollo de ciertas afecciones oculares. Como ya se ha mencionado, además de los daños agudos por exposiciones a radiación de alta energía, hay numerosos estudios que muestran cómo la exposición a energías consideradas normales de luz solar puede agravar enfermedades de la retina como la DMAE^{292,345} y, aunque los avances en ciencia básica indican que este perjuicio se puede deber a su acción acumulativa³⁴⁶, no es sencillo evaluarlo. Aun así, desde la antigüedad se han empleado diferentes materiales modificadores de la luz que mejoran la calidad de la visión, bien por sus características físicas como por sus características ópticas. La reducción del deslumbramiento, el bloqueo total de ciertas longitudes de onda o la reducción parcial de la luz total transmitida, son algunas de las características de los artillugios desarrollados. A principios del siglo XX se introdujo el concepto de filtro con fines oftalmológicos. Se diseñaron una serie de gafas tintadas con diferentes elementos, entre ellos cerio, elemento capaz de filtrar el 100% de la luz UV y gran parte de la energía en el rango de los infrarrojos^{347,348}. Por ello, la evolución de los filtros, cuya aplicación oftalmológica no solo incluye su uso por la población en general como dispositivos protectores, se ha enfocado a mejorar la calidad de la visión de pacientes con diversas afecciones. Actualmente, Las lentes empleadas en gafas se clasifican en cinco categorías³⁴⁹ según el tipo de filtro empleado y por lo tanto la aplicación de las mismas. De esta manera, las de categoría 0 son gafas con lentes muy claras, capaz de absorber de 0% a 19% de luz, que se utilizan sobre todo en interiores, de noche y en exteriores en condiciones de alta nubosidad. Las gafas de categoría 1 tienen un filtro capaz de absorber entre un 20% y un 56% de la luz incidente y se utilizan sobre todo en condiciones de poca luminosidad, al contrario que las de categoría 2 cuyas lentes medianamente coloreadas son capaces de absorber entre el 57% al 81% de luz y se utilizan en condiciones de luz solar media. Las lentes de categoría 3 se utilizan en condiciones

de luminosidad bastante altas ya que son capaces de bloquear entre un 82% y un 92% de luz, son las empleadas habitualmente. La última categoría es la 4, lentes utilizadas en gafas indicadas para la exposición en zonas de alta montaña, esquí o actividades y deportes acuáticos, donde la incidencia del sol es muy alta y en la que además hay que tener en cuenta la gran reflexión lumínica de superficies como agua o nieve. Son capaces de absorber hasta el 98% de la luz.

Gracias a los resultados de los estudios llevados a cabo en los capítulos anteriores, se plantea en este capítulo:

- El análisis de LIOs y su capacidad de modificar diferentes tipos de radiación incidente sobre ellas para ayudar a definir los criterios de implantación de las mismas.
- El desarrollo de un filtro terapéutico avanzado con el que abordar en dos fases la transformación de la luz. Para ello, se pretende incluir en él el uso de nanopartículas capaces de modificar el EEM que incide sobre ellas, logrando un doble objetivo: bloquear las longitudes de onda perjudiciales y aumentar la exposición a longitudes de onda beneficiosas.
- El análisis de la exposición de microorganismos relacionados con la microbiota ocular a diferentes tipos de radiación.

c6.1. Diseño y elección de lentes oftálmicas.

Las LIOs son lentes artificiales fabricadas en silicona o acrílicas, la mayor parte convergentes, que se implantan quirúrgicamente dentro del ojo. Su finalidad es corregir o mejorar el enfoque afectado por una disfunción del cristalino, del sistema de acomodación o la forma de la córnea. Existen diferentes tipos según su:

- uso: se distinguen LIOs pseudofáquicas, que sustituyen al cristalino, o fáquicas, que lo complementan;
- tipo de inserción: que puede ser en cámara anterior, entre córnea e iris, o en cámara posterior, entre iris y cápsula posterior;
- enfoque: pudiendo ser lentes monofocales, con un solo punto de enfoque, multifocales, con varios puntos o tóricas, correctoras de errores de refracción.

Fueron inventadas por Sir Nicholas Harold Lloyd Ridley a principios del siglo XX, y desde entonces han ido evolucionando y adaptándose para aumentar la calidad de la visión de los pacientes en los que se implantan³⁵⁰. Uno de esos avances, se relaciona con el desarrollo de los filtros con función oftalmológica, que ya había sido empleado en la elaboración de lentes tintadas para gafas. Debido a las características del cristalino, de color amarillo pálido en individuos jóvenes que se va oscureciendo a tonos marrones con el paso de los años, parece tener sentido la idea de que una LIO imite la coloración de esta estructura ocular, pero los efectos de filtrar luz, especialmente en el rango del azul, son aún discutidos³⁵¹⁻³⁵⁴. Por ello, la prescripción de LIOs con filtros amarillos es aún controvertida. Existen multitud de estudios en los que se evalúa cómo estos filtros afectan a la percepción de los colores o a la calidad de la visión³⁵⁵⁻³⁵⁷, pero sin duda los estudios que tendrán más repercusión son los que se hagan evaluando en el tiempo el desarrollo de enfermedades relacionadas con la retina en pacientes en los que se haya implantado un tipo u otro de LIO.

Por los resultados obtenidos en los capítulos anteriores, la luz azul supone un factor de riesgo añadido en los ojos de los pacientes afectados por enfermedades de la retina, haciendo especial referencia a los resultados mostrados en la evolución de las retinas del modelo animal del capítulo IV. En él, se expusieron los ojos de animales sometidos o no a un daño isquémico a la radiación de diferentes longitudes de onda durante el mismo. Los resultados indican que, en los ojos no sometidos a isquemia, la radiación de longitud de onda corta no produce daño significativo en la retina, mientras que, en el caso de los ojos isquémicos, la radiación azul incrementa notablemente el daño en diversas estructuras retinianas.

Por este motivo, se plantea la evaluación de la distribución espectral de las diferentes LIOs bajo distintas fuentes de iluminación como un posible sistema de clasificación de las lentes candidatas a una implantación en pacientes con ciertas afecciones del polo posterior ocular.

c6.1.1. Diseño experimental.

Para el análisis de las lentes, se emplearon seis modelos diferentes, dos de ellos sin filtro para longitudes de onda cortas del EMM visible, y cuatro con filtro. Las tres LIOs con filtro son fácilmente diferenciables por su tonalidad amarillenta. En la tabla c6.1.1 se encuentra la clasificación y varias características de ellas, así como su casa comercial y referencia, y el número dado para los experimentos que se realizaron.







LIO						
Modelo	Acrysof IQ Natural (SN60WF)	Acrysof IQ ReSTOR (SV25T0)	Tecnis Symphony	Fine Vision (Micro F)	Acrysof Natural (MN60AC)	Acrysof acrylic (SA60AT)
Casa comercial	Alcon	Alcon	Johnson & Johnson	Physiol	Alcon	Alcon
Tipo de enfoque	Monofocal	Multifocal	Monofocal	Multifocal	Monofocal	Monofocal
Espectro de luz filtrada	UV + A	UV + A	UV	UV + A	UV + A	UV
Material	Acrílico					
Índice de refracción	1,55	1,55	1,47	1,46	1,55	1,55

Tabla c6.1.1. Lentes utilizadas en el estudio y sus principales características.

Las LIOs se montaron sobre una superficie negra que permitió el análisis estricto de la luz que atravesaba la estructura de las LIOs. Se construyó también un dispositivo opaco para que el sensor del espectrofotómetro empleado no recibiese más luz que la que traspasaba la lente. Se escogió para el estudio la colección de lentes mostrada en la tabla c6.1. En las gráficas de la distribución espectral se representa, en valor relativo, el pico de longitud de onda (eje X) dominante y el valor relativo del resto de longitudes de onda con respecto a ella (eje Y). Además, se realizaron medidas del denominado índice de reproducción cromática (IRC), una unidad que mide la capacidad de una fuente de luz para reproducir los colores de objetos de manera fiel en comparación a una fuente ideal de luz (se suele tomar como referencia la solar). El resultado se expresa en referencia a 15 colores prueba seleccionados, denominados de R1 a R15. El espectro de evaluación se encuentra entre los valores relativos +100 y -60. Cuanto más precisa es la

reproducción del color, mayor es el valor del IRC. El valor medio de los primeros 8 colores (R1 a R8) se resume en el índice de reproducción del color Ra. El valor medio Ra se divide en: moderadamente buena reproducción del color para Ra entre 70 - 80, buena reproducción del color para Ra entre 80 - 90 y muy buena reproducción del color para Ra entre 90 - 100. Los valores obtenidos para los colores de prueba de R9 a R15, facilitan información detallada sobre la reproducción de los colores saturados (R9 - R12), del color de la piel (R13), del verde hoja (R14) y del tono de color de piel asiático (R15).

c6.1.2. Resultados y discusión.

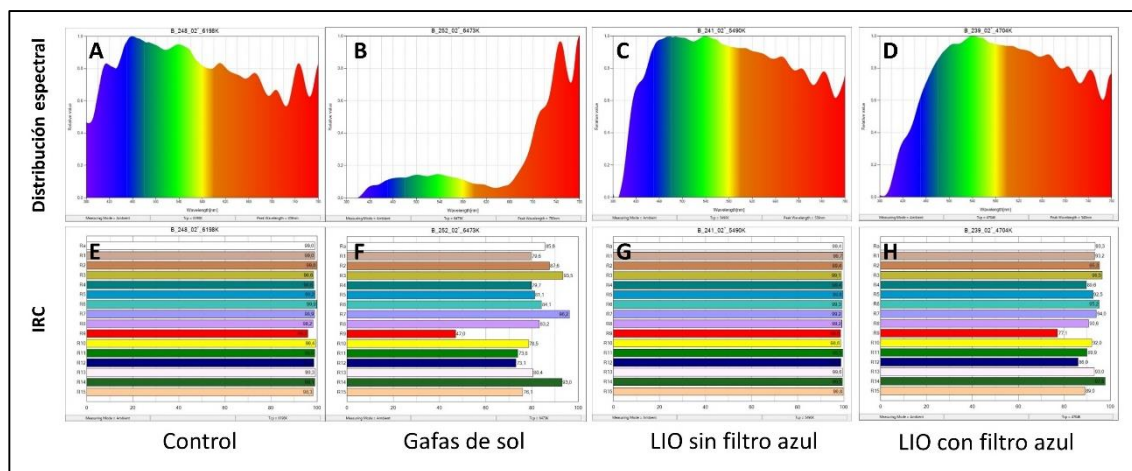


Figura c6.1.1. Gráficas de la distribución espectral en las que se representa el valor relativo en unidades arbitrarias frente a la longitud de onda (nm) (A-D) y representación del índice de reproducción cromática (E-H) de la exposición a la luz solar directa (A y E), o con el uso de unas gafas de sol de categoría III (B y F), de una lente intraocular sin filtro para el azul (C y G) o con filtro para el azul (D y H).

En la figura c6.1.1 se ven las distribuciones de los espectros (figuras c6.1.1A a c6.1.1D) y los IRCs (figuras c6.1.1E a c6.1.1H) obtenidos de la medida directa de la luz solar (figuras c6.1.1A y c6.1.1E), los obtenidos utilizando como filtro unas lentes de unas gafas de sol con cristal no polarizado de categoría 3 (figuras c6.1.1B y c6.1.1F), utilizando una LIO sin filtro azul (figuras c6.1.1C y c6.1.1G) y una LIO con filtro azul (figuras c6.1.1D y c6.1.1H). Se observa cómo en el caso de las gafas, la modificación del espectro fue total, siendo las longitudes de onda predominantes aquellas por encima de los 700 nm. Esta distribución espectral produjo cambios en la medida de percepción de los colores, como se observa en la gráfica del IRC, donde la reproducción cromática Ra fue moderadamente buena (85.6), al igual que la percepción de otros colores como el R14 verde hoja. En cambio, la percepción del rojo saturado R9 fue especialmente mala. Cuando se analizaron las LIOs, se vio que la distribución del EEM se

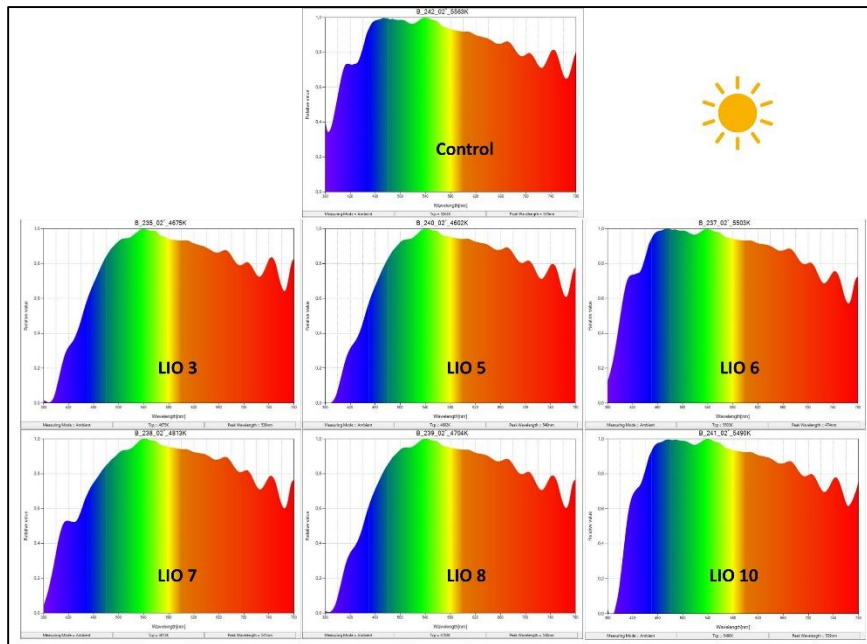


Figura c6.1.2. Gráficas de la distribución espectral en las que se representa el valor relativo en unidades arbitrarias de cada longitud de onda (nm) que muestran los cambios que producen en las mismas por las lentes señaladas cuando la radiación incidente es la de un día soleado.

modificó en ambos casos, la LIO sin filtro presentó absorción hasta los 390 nm, presentando una subida brusca de los valores relativos, mientras que en el caso de la LIO con filtro para longitudes de onda cortas del espectro visible, el filtrado de luz azul fue mucho mayor. Estos resultados se vieron reflejados en los valores de IRC, donde el Ra de la lente sin filtro azul fue de 99.4, mientras que la adición de filtro redujo este valor a 93.3. Nuevamente, los valores de percepción de los colores saturados (R9 a R12) se mantuvieron en condiciones óptimas en el caso de existir filtro, mientras que la disminución en la transmisión de luz azul produjo una percepción alterada, especialmente en R9, rojos.

De estos resultados se concluye que existen diferencias en la percepción de los colores cuando las LIOs incluyen filtro para longitudes de onda cortas, y que, aunque proporcionan una percepción general aceptable, para ciertos colores, especialmente los saturados de longitud de

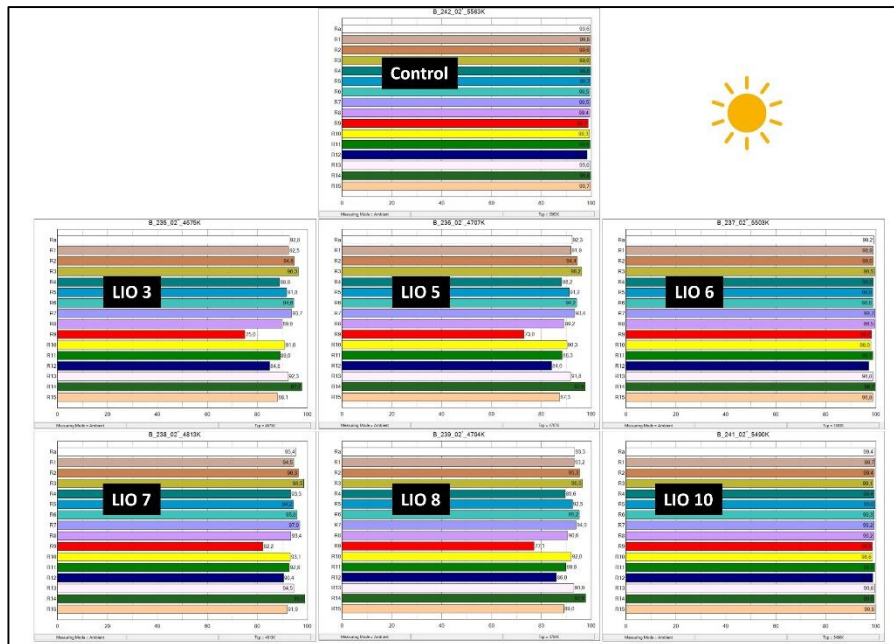


Figura c6.1.3. Gráficas del índice de reproducción cromática que muestran los cambios que producen en él por las lentes señaladas cuando la radiación incidente es la de un día soleado.

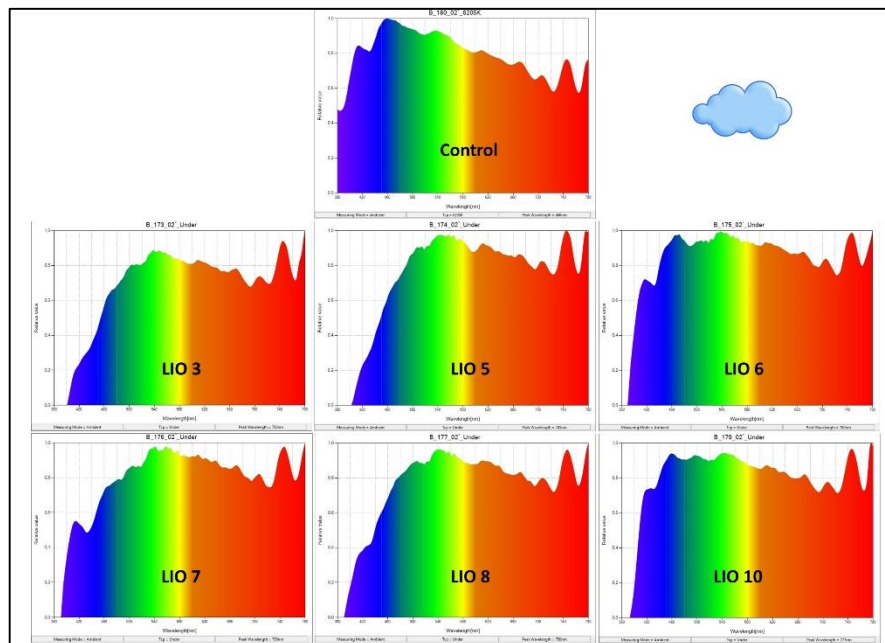


Figura c6.1.4. Gráficas de la distribución espectral en las que se representa el valor relativo en unidades arbitrarias de cada longitud de onda (nm) que muestran los cambios que producen en las mismas por las lentes señaladas cuando la radiación incidente es la de un día nublado.

onda larga, la diferencia es importante. Por ello, se realizó un estudio más detallado de la respuesta de las diferentes lentes a la exposición a varias fuentes habituales de luz. En la figura c6.1.3 se ve el cambio en la distribución espectral que causaron las diferentes LIOs frente al control (sin LIO) de la radiación en un día soleado. Se observó nuevamente como el filtrado de la luz UV fue alto, a excepción de las LIOs 6 y 7, sin y con filtro azul respectivamente, donde luz

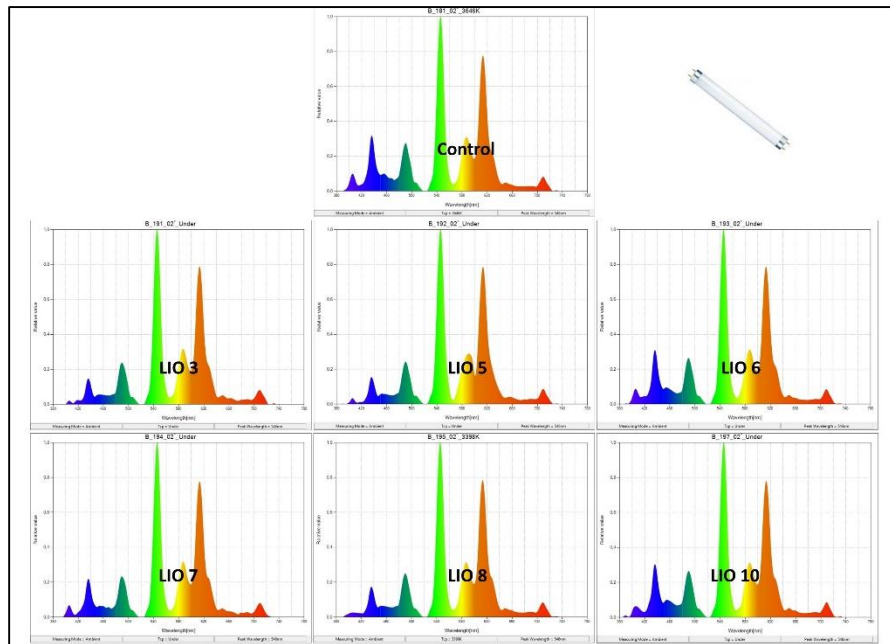


Figura c6.1.5. Gráficas de la distribución espectral en las que se representa el valor relativo en unidades arbitrarias de cada longitud de onda (nm) que muestran los cambios que producen en las mismas por las lentes señaladas cuando la radiación incidente es la producida por una fuente de luz artificial tipo fluorescente.

de 380 nm fue recogida por el sensor. En las LIOs 3, 5, 7 y 8 se observa que la cantidad relativa de longitudes de onda cortas en el azul es bastante menos que en las LIOs 6 y 10. De hecho, el $\lambda_{\text{máx}}$ en las LIOs con filtro de azul ronda los 540 nm, mientras que en las LIOs sin este filtro el valor es más cercano a los 470 nm. Al evaluar los IRCs en estas condiciones (figura c6.1.3), se observó que los valores de las LIOs sin filtro eran muy altos, con una capacidad de reproducción muy fiel a la de la luz solar, mientras que las LIOs con filtro para el azul (LIOs 3, 5, 7 y 8) reprodujeron los colores con menor fiabilidad, especialmente los saturados y dentro de ellos el rojo (R9).

La figura c6.1.4 muestra los valores de la distribución espectral recogidos en un día nublado. Como se puede observar, en el control de un día soleado, la distribución del espectro se modifica con respecto a un día soleado. En este caso, debido a la menor incidencia de luz de ciertas longitudes de onda, se observa como todas las LIOs filtraron longitudes de onda menores de 400 nm, y que en el caso de las que presentan filtro para el azul, la cantidad de la radiación recibida de longitudes de onda corta fue mucho menor, especialmente en el caso de las LIOs 3 y 5.

Tras los estudios realizados con el sol y la radiación ambiente, se llevó a cabo la medida de parámetros en condiciones de exposición lumínica artificial. Para ello se emplearon fuentes fluorescentes (figura c6.1.5) y fuentes de tipo LED (figuras c6.1.6 y c6.1.7). En el caso de la exposición a luz fluorescente, debido a la particular distribución espectral de la fuente, con picos definidos, consecutivos en diversas longitudes de onda, prácticamente no se observó diferencia en la distribución espectral entre el control y las LIOs. A pesar de que no se pudo hacer la medida del IRC debido a que los valores se hallaban por debajo del umbral de detección, se observa como la posible percepción del color no se va a ver afectada por la implantación de una u otra LIO, de hecho, los clásicos fluorescentes ofrecen una calidad muy pobre en cuanto a este parámetro, ofreciendo una percepción bastante apagada del color.

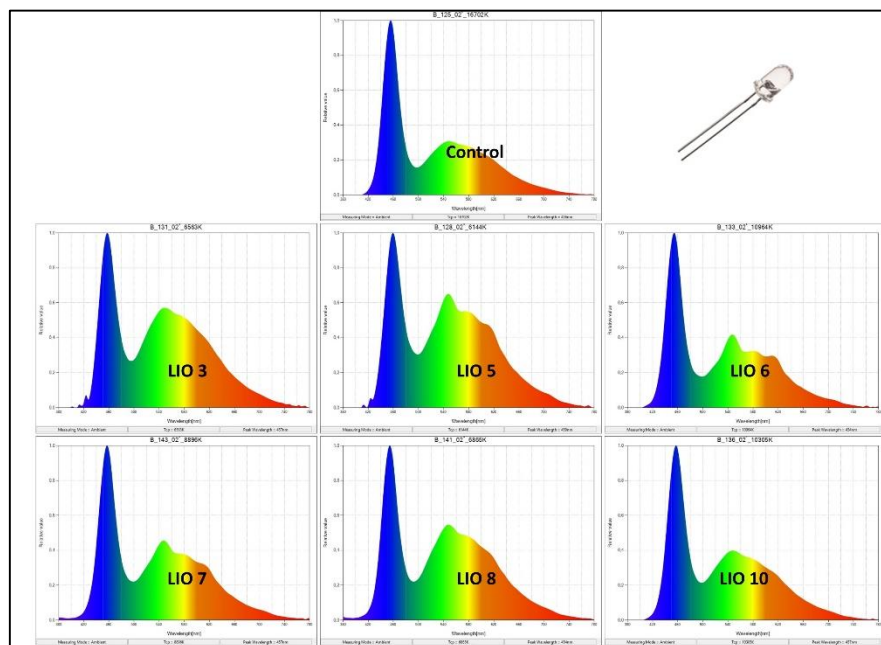


Figura c6.1.6. Gráficas de la distribución espectral en las que se representa el valor relativo en unidades arbitrarias de cada longitud de onda (nm) que muestran los cambios que producen en las mismas por las lentes señaladas cuando la radiación incidente es la producida por una fuente de luz artificial tipo LED blanco.

En la figura c6.1.6 se puede ver la modificación de la distribución espectral ofrecida por un LED blanco. Como se puede ver en la gráfica correspondiente al control, la distribución de los LED blancos es continua a lo largo del espectro, mostrando un gran pico en la zona del azul y unos valores relativos muy pequeños para las longitudes de onda largas. En este caso, las LIOs con filtro para el azul (3, 5, 7 y 8) revelaron valores relativos más elevados para la zona centras de la distribución, disminuyendo por lo tanto la cantidad relativa de luz azul. En el caso de la LIO 7, esta disminución no fue tan acusada, y su distribución es similar a la de las LIOs 6 y 10 sin filtro

para el azul. Aun así, en todos los casos, la $\lambda_{\text{máx}}$ ronda los 460 nm y es la dominante. La figura c6.1.7 muestra los valores del IRC frente a esta fuente de LED. Los resultados del control evidencian que las fuentes de tipo LED tienen un IRC moderadamente bueno, con un Ra de 85.8. En ningún caso el uso de las LIOs hizo bajar a este valor por debajo de 80, de modo que se puede considerar que todas mostraron una reproducción cromática bastante buena, pero nuevamente, al analizar los colores saturados, el R9 rojo volvió a ser el más afectado, en mayor

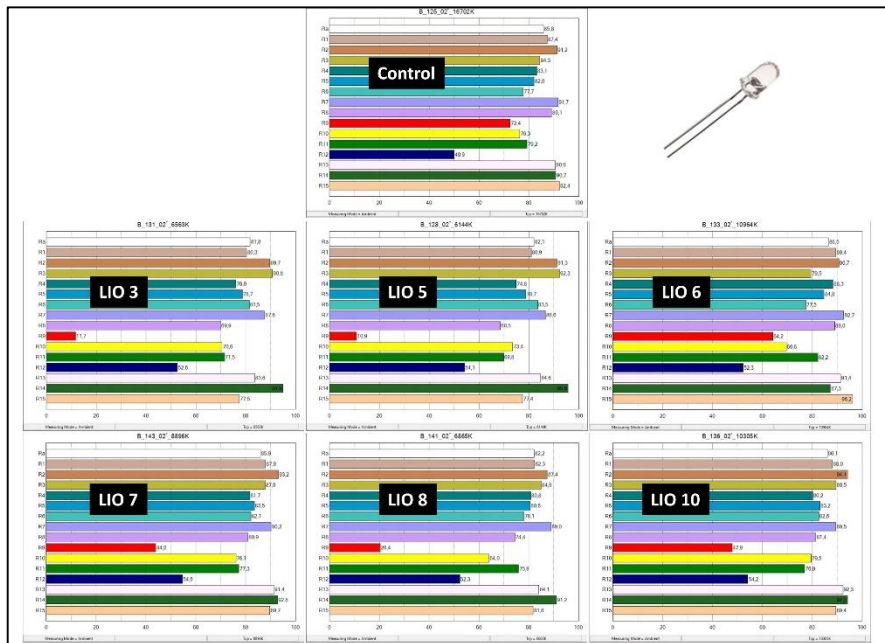


Figura c6.1.7. Gráficas del índice de reproducción cromática que muestran los cambios que producen en él por las lentes señaladas cuando la radiación incidente es la producida por una fuente de luz artificial tipo LED blanco.

medida en las LIOs con filtro azul.

El estudio conjunto de todos estos resultados nos permite describir las seis LIOs utilizadas en términos de distribución espectral y reproducción cromática. De forma general, se puede decir que no todas las LIOs con filtro azul se comportan igual. En este caso, las LIOs 6 y 10 presentaron mayores índices de reproducción cromática de forma general, manteniendo unas distribuciones espectrales más fieles a las emitidas por la fuente de luz. Las LIOs 3,5 y 8 con filtro amarillo modificaron la distribución del espectro causando alteraciones importantes en la percepción del color. La LIO 7, cuya observación a simple vista ya permite observar una tonalidad amarillenta muy suave comparada con la del resto de lentes con este tipo de filtro (3, 5 y 8), es una LIO cuyas características son intermedias entre las LIOs sin filtro y con filtro azul.

Atendiendo únicamente a estos aspectos de distribución espectral y reproducción del color para las fuentes naturales y artificiales más comunes de luz, se podría realizar una clasificación del tipo de lente más oportuna a emplear según varios criterios:

- para la implantación de las lentes fáquicas: en individuos tanto jóvenes como ancianos, al conservarse el cristalino, se habría de buscar una LIO con un alto IRC y una buena conservación de la distribución espectral: LIOs 6 y 10. En el caso de estar presenta alguna enfermedad de las descritas en capítulos anteriores (glaucoma, DMAE) sería interesante la utilización de una lente que aporte un mayor poder de reducción de las longitudes de onda cortas potencialmente dañinas, como la LIO 7.
- Para la implantación de lentes pseudofáquicas: excepto en los casos de individuos jóvenes, en los que el uso de LIOs (LIO 6 y 10) son filtro o con filtro suave (LIO 7) puede ser oportuno, según los criterios aquí desarrollados, sería necesario el uso de lentes con filtro para el azul, especialmente en el caso de aquellos pacientes que presenten enfermedades del polo posterior como glaucoma y DMAE en cuyo caso se habría que buscar la LIO con mayor poder filtrante.

c6.2. Estudios iniciales para el desarrollo de filtros nanoluminiscentes que modifican el espectro visible de la luz.

La conversión o modificación espectral es el proceso de alterar la distribución espectral de la luz. Durante muchos años, la modificación espectral ha sido un importante tema de estudio en la comunidad de la energía fotovoltaica. Debido a la naturaleza de banda ancha de la luz solar y al estrecho rango de sensibilidad espectral de las células solares, existe la oportunidad de manipular el espectro solar para aumentar la eficiencia de estos dispositivos fotovoltaicos. De esta manera, la conversión espectral proporciona una forma de abordar la mayor limitación para la mejora de la eficiencia de las células solares: el desajuste espectral entre la distribución de energía de la luz solar y la brecha de banda de un semiconductor específico³⁵⁸.

El problema de la transformación de la energía fotovoltaica a partir de la luz solar es que los fotones con energías mayores que el intervalo de banda del material semiconductor transportan el exceso de energía, que se disipa como calor, y, los fotones con frecuencias por debajo de la banda, no tienen suficiente energía para crear pares de electrones y no se absorben. La conversión espectral ofrece una forma de cambiar la distribución espectral de la luz solar para tener más fotones con la energía necesaria para que coincida con la brecha de banda de la célula solar³⁵⁹ aumentando notablemente su eficiencia. Diferentes dispositivos, como los concentradores solares luminiscentes (LSC), pueden realizar esta tarea. Los LSC proporcionan una forma de obtener una concentración geométrica luminosa, y además la conversión espectral necesaria para mejorar el rendimiento de las células solares unidas a ellos³⁶⁰⁻³⁶⁴.

Otro de los ámbitos en los que la modificación espectral también parece una tecnología prometedora es el de la mejora en el crecimiento de microalgas. Las microalgas son una fuente renovable y altamente eficiente de producción de biomasa como combustible³⁶⁵, así como de otros componentes bioquímicos de alto valor. La eficiencia de la fotosíntesis que llevan a cabo estos organismos depende de la superposición espectral entre la irradiación lumínica (solar en la naturaleza) y la absorción por parte de los cloroplastos. Los cloroplastos tienen picos de absorción en las regiones azul y roja del espectro y son poco eficientes en la absorción de luz verde (de ahí el color verde de las plantas). Además, se ha demostrado que los fotones de alta energía en la región UV causan daño fotosintético y fenómenos de fotoinhibición^{366,367}. Por lo tanto, hay un gran interés en la modificación del espectro, para convertir la luz externa a la región de radiación fotosintéticamente activa hacia aquellas longitudes de onda que puedan ser absorbidas por estos orgánulos, maximizando así el crecimiento de algas.

Viendo las aplicaciones de la tecnología de conversión espectral, se plantea que el campo de la oftalmología pueda beneficiarse de las técnicas de conversión espectral mediante el desarrollo de una lente oftálmica que absorba la radiación en el rango del UV - azul y la convierta espectralmente hacia longitudes de onda en el rango del rojo - infrarrojo cercano mediante el uso de sistemas moleculares luminiscentes. El objetivo de dicha lente oftálmica es el de actuar como un dispositivo neuroprotector (bloqueando la radiación dañina) y terapéutico (al aumentar las longitudes de onda beneficiosas). Dicha lente también permitirá la transmisión de una cantidad suficiente del EEM de luz visible (para preservar la calidad de la visión), así como la transmisión de una fracción definida de luz azul necesaria para no alterar funciones básicas reguladas por ella como los mecanismos moleculares que regulan los ritmos circadianos.

c6.2.1. Diseño experimental.

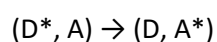
El diseño experimental consta de dos fases diferenciadas, una de ellas la del desarrollo y la construcción de los filtros nanoluminiscentes, llevados a cabo en el ITMA y la prueba en cultivos celulares del efecto de los mismos.

Construcción del filtro:

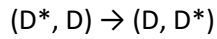
Se utilizaron dos especies luminiscentes (donante y aceptor) y una técnica de transferencia de energía de excitación para alcanzar la conversión espectral requerida de azul UV a rojo - infrarrojo cercano.

La clave para el desarrollo de los filtros nanoluminiscentes es la transferencia de energía de excitación. Este concepto se fundamenta en que la transferencia de energía de una molécula donante a un aceptor en estado en estado basal, es posible. Para funcionar, un requisito crítico es que el espectro de emisión del donante se solape parcialmente con el espectro de absorción del aceptor. La transferencia de energía de excitación se puede agrupar en homotransferencia o heterotransferencia, y en radiativa o no radiativa:

- Homotransferencia / heterotransferencia: la transferencia de energía de un donante excitado (D^*) a un aceptor en estado basal (A) químicamente diferente, se denomina heterotransferencia.



Si el donante y el aceptor son idénticos, entonces la transferencia de energía es homotransferencia.



En un proceso de homotransferencia, puede ocurrir la migración de energía. En tal caso, el proceso de transferencia de energía se repite de manera tal, que la excitación migra sobre varias moléculas, por lo que en ese caso es posible transferir energía entre moléculas, pero el desplazamiento de Stokes (diferencia entre los picos de excitación y emisión) disminuye demasiado. Por ello, este procedimiento no es muy adecuado para la conversión espectral requerida de longitudes de onda cortas a largas y se utilizará para la elaboración del filtro la heterotransferencia.

- Transferencia de energía radiativa o no radiativa: en un proceso de transferencia radiativa, un fotón emitido por el donante es absorbido por el aceptor, mientras que un proceso de transferencia no radiativa ocurre sin la emisión de fotones reales, sino que está mediada por los llamados fotones virtuales. La transferencia de energía radiativa corresponde a la absorción de un fotón por el aceptor, después de la emisión por el donante. Se observa cuando la distancia promedio entre el donante y el aceptor es mayor que la longitud de onda del fotón emitido. Dicha transferencia no requiere ninguna interacción entre los pares D-A, pero depende de la superposición espectral y la concentración de ambas especies (donante y aceptor). Los filtros luminiscentes multicapa se desarrollaron con este propósito.

Por otro lado, un proceso de transferencia de energía no radiativa ocurre a distancias de longitud de onda inferiores y sin la emisión de un fotón. Es el resultado de las interacciones entre pares D-A. La transferencia de energía no radiativa por la interacción dipolo-dipolo puede extenderse en distancias de hasta 20 nm. En términos clásicos, la transferencia de energía electrónica entre el donante y el aceptor se ve como la interacción de dos dipolos eléctricos oscilantes. El dipolo del donante está inicialmente en oscilación y el dipolo del aceptor está inicialmente en reposo. Debido a la condición de resonancia, la excitación se transfiere del primer dipolo al segundo. Muchas investigaciones se refieren a este proceso como transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET). El desarrollo de los filtros monocapa pretende promover este proceso.

Para los ensayos, se diseñaron diferentes prototipos de filtros, monocapa y multicapa, depositados sobre un vidrio de aproximadamente 120 x 80 x 3 mm. Esas medidas coinciden con las medidas de largo y ancho de las placas empleadas en el desarrollo de los experimentos.

Experimentos biológicos:

Para su realización, se emplearon células de la línea ARPE-19, sembradas como anteriormente se describió, en placas de 96 o 24 pocillos a una concentración de 100.000 células / mL (100 o 250 μ L) y que crecieron hasta confluencia. Posteriormente, se expusieron a una cantidad definida de luz UV (pico de emisión a 390 nm, 0,4 vatios / m^2) o la toxina CCCP (5 μ M), en ausencia o presencia del filtro luminiscente durante un período de 16 horas. Los cultivos se analizaron cuantitativamente para determinar el número de células vivas, utilizando el ensayo MTT, y se realizaron fotografías de las mismas. También se comprobó el estado de actividad mitocondrial con el reactivo JC-1, así como el nivel de producción de EROs mediante la incubación con DHE.

c6.2.3. Resultados y discusión.

A continuación, se describen algunos resultados preliminares que describen las propiedades ópticas de los filtros de conversión espectral y su validez en oftalmología.

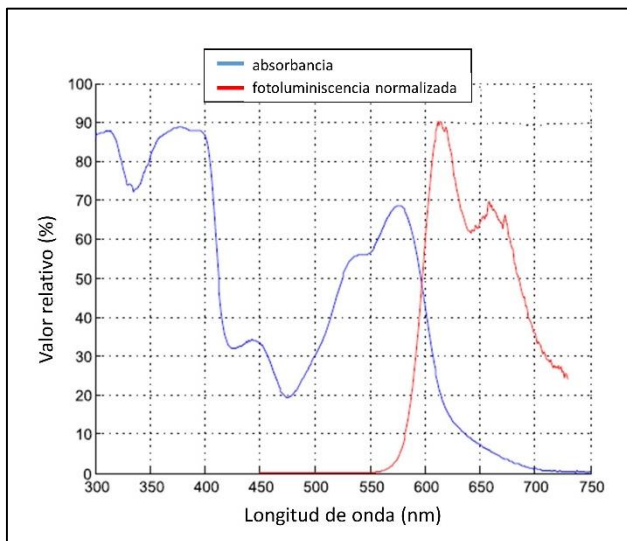


Figura c6.2.1. Espectro de absorción del filtro nanoluminiscente y espectro de la fotoluminiscencia del mismo normalizada al pico de absorción.

Los primeros filtros que se probaron fueron filtros monocapa. En ellos, la transferencia no tenía la intensidad adecuada y el manejo en el laboratorio era más complicado, ya que a los pocos usos se vio una degradación de la capa luminiscente muy marcada. Por ello, se decidió replantear el diseño y el prototipo con el que se llevaron a cabo el resto de experimentos fue uno multicapa.

- a) Propiedades ópticas de los filtros luminiscentes.

La figura c6.2.1 muestra los espectros de absorción y emisión del prototipo de filtro luminiscente (configuración multicapa) depositados sobre vidrio de índice de refractividad 1.5. La línea azul corresponde al espectro de absorción y la línea roja al espectro de emisión o fotoluminiscencia.

Se puede ver que en el rango espectral (350 - 400 nm) casi el 90% de la radiación incidente fue absorbida (línea azul), radiación que se convirtió en rojo - infrarrojo cercano (línea roja). También se puede observar que solo hubo una absorción parcial en azul, con un mínimo alrededor de 480 nm, para no interferir con los ritmos circadianos. Se observó, además, una banda de absorción no deseada en el rango de 500 a 600 nm, que deberá eliminarse en versiones más avanzadas del filtro luminiscente.

b) Resultados biológicos.

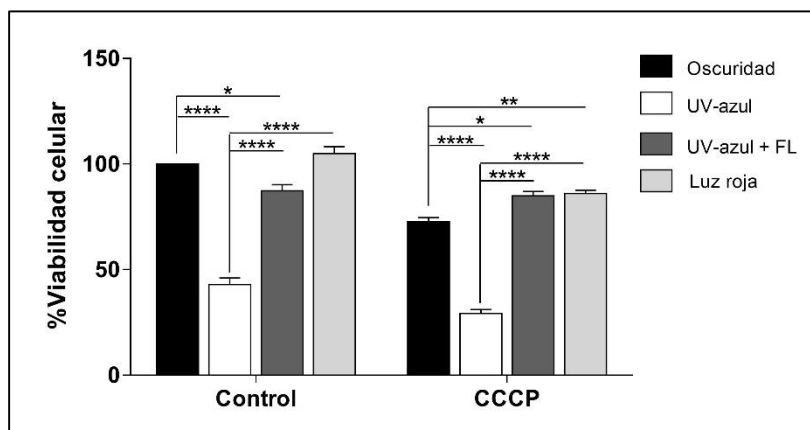


Figura c6.2.2. Análisis de la viabilidad celular de los cultivos de ARPE19 con el reactivo MTT tras 16 horas mantenidos en oscuridad o expuestos a diferentes condiciones de luz (UV-azul a 0.4 W/m², UV-azul a 0.4 W/m² con el filtro luminiscente (FL) y luz roja a 6.5 W/m²). Además, parte de los cultivos se expusieron al desacoplador mitocondrial CCCP (5 μM) en las mismas condiciones de luz. Los resultados de n=5 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way ANOVA*, α=0.05, con post-test Tukey para comparaciones múltiples, (**** p < 0.0001).

En las figuras 6.2.2, 6.2.3, 6.2.5 y 6.2.6 se observan los resultados de los diferentes tratamientos en ausencia o presencia de CCCP en los cultivos. La luz roja se empleó como control positivo por su capacidad para atenuar el daño producido por el CCCP en las células.

En la figura c6.2.2 se evidenció que la exposición a luz azul - UV y el CCCP causó disminución de viabilidad celular en aproximadamente un 57% y un 30% respectivamente. Sin embargo, en presencia del filtro luminiscente, la pérdida de viabilidad causada por la luz azul - UV se redujo a aproximadamente el 15%. La medición directa de la cantidad de luz UV a la que fueron expuestos los cultivos, varió de 0.4 W/m² a 0.02 W/m² con la colocación del filtro (figura c6.2.4) observándose el efecto de filtro de barrera para la mayor parte de la luz azul - UV. Aun así, existió una pequeña cantidad de luz azul - UV residual que incidió en las células en cultivo y que probablemente tenga una influencia negativa debido a la gran cantidad de energía de la longitud de onda de la fuente emisora.

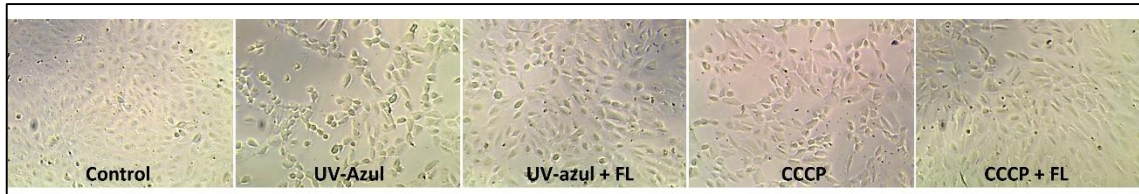


Figura c6.2.3. Fotografías de contraste de fases de los cultivos de ARPE19 tras 16 horas mantenidas en oscuridad, expuestas a diferentes condiciones de luz (UV-azul a 0.4 W/m^2 o UV-azul a 0.4 W/m^2 con el filtro luminiscente (FL)) o a CCCP ($5 \mu\text{M}$). 5x. n=5.

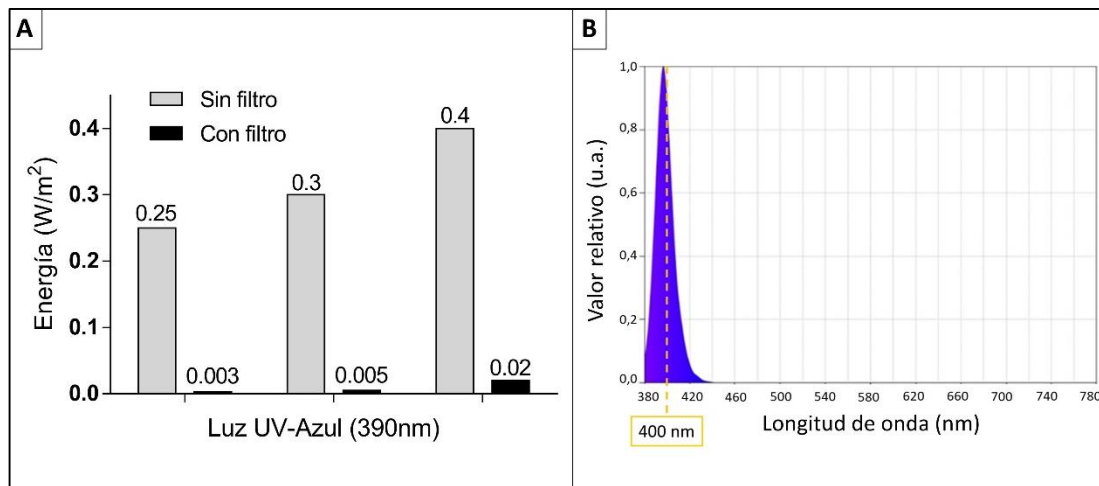


Figura c6.2.4. A) Medida cuantitativa de la irradiancia (W/m^2) del dispositivo emisor de luz UV-azul a diferentes intensidades en presencia o ausencia del filtro nanoluminiscente. B) Espectro de emisión del dispositivo emisor de luz UV-azul con pico en 390 nm.

También fue evidente que el efecto negativo de la CCCP en la viabilidad celular se ve claramente atenuado (12%) por el filtro luminiscente en presencia de luz azul - UV. Sin embargo, cuando se tiene en cuenta la influencia negativa adicional de la pequeña cantidad de luz azul - UV que traspasa el filtro luminiscente, la influencia citoprotectora real del filtro luminiscente causada por la emisión de luz roja (ver figura c6.2.1) es probablemente significativamente superior al 12%. Por lo tanto, los estudios proporcionan una clara evidencia de la transformación de luz UV en luz de longitudes de onda larga por el filtro luminiscente y es esta luz la que mitiga la pérdida de viabilidad celular causada por la CCCP.

Los datos cuantitativos para la viabilidad celular, figura c6.2.2, se correlacionan con las imágenes de microscopía en la figura c6.2.3, donde se ven los pocillos con células más o menos despegadas y con diferente morfología según su estado.

El análisis de la actividad mitocondrial en la figura c6.2.5 mostró cómo ésta se redujo en el caso de la exposición a CCCP o a luz azul UV y fue nula cuando la exposición fue conjunta. En presencia del filtro luminiscente la actividad mitocondrial se mantuvo. La figura c6.2.6 muestra los resultados de la producción de EROs, y en ella se ve cómo en todos los casos en los que los

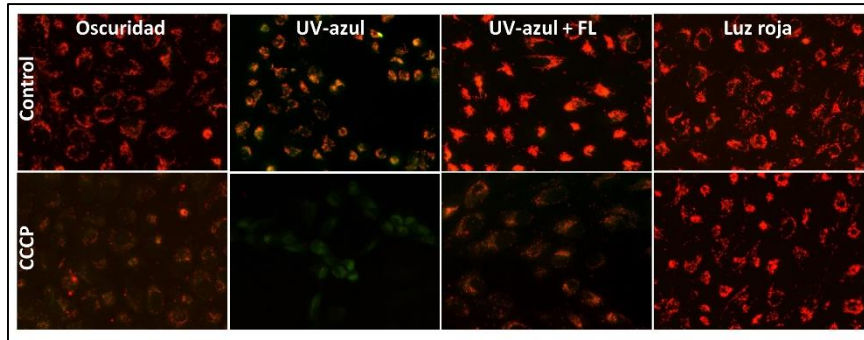


Figura c6.2.5. Fotografías del análisis de la actividad mitocondrial de las células ARPE19 con el reactivo JC-1. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con CCCP (5 μ M) en oscuridad o bajo diferentes radiaciones (UV-azul a 0.4 W/m² o UV-azul a 0.4 W/m² con el filtro luminiscente (FL)). 20x. n=5.

cultivos fueron expuestos a luz azul – UV, CCCP o ambas, con o sin filtro, se produjo un aumento en la generación de los mismos. Este aumento en algunos casos fue acompañado de la disminución drástica de actividad mitocondrial, y fue en esos casos en los que la viabilidad se redujo significativamente (figura c6.2.2).

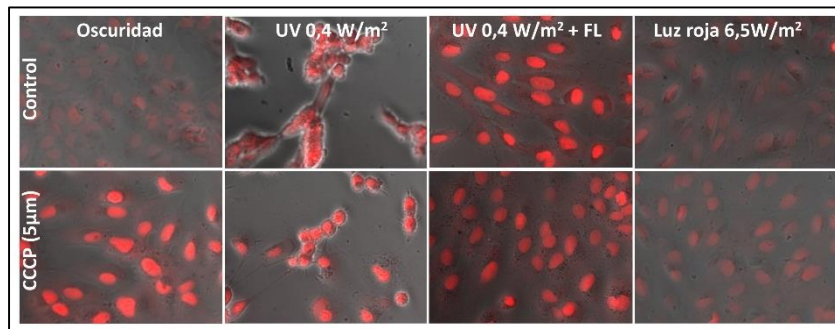


Figura c6.2.6. Fotografías de la producción de EROs en las células ARPE19 medida con el reactivo DHE. En verde se observa el reactivo citoplasmático y en rojo los agregados mitocondriales. Los cultivos se mantuvieron durante 18 horas sin tratar (control) o fueron tratados con CCCP (5 μ M) en oscuridad o bajo diferentes radiaciones (UV-azul a 0.4 W/m² o UV-azul a 0.4 W/m² con el filtro luminiscente (FL)). 20x. n=5.

Estos estudios iniciales, tal como se describen, proporcionan una aproximación a cómo parte de la luz UV que no llega a la retina se puede convertir parcialmente en luz roja / infrarroja cercana “extra”, de baja intensidad, mediante la aplicación de filtros nanoluminiscentes. Al mismo tiempo, los filtros reducen parte de la longitud de onda corta del UV - azul al convertirla espectralmente en luz roja. Por lo tanto, los filtros nanoluminiscentes proporcionan un medio para reducir y aumentar respectivamente la cantidad de luz UV - azul y rojo que incide en la retina. Estos resultados tienen el potencial de desencadenar efectos positivos en las mitocondrias con las posibles consecuencias positivas en diferentes tipos celulares de tejidos

sanos o no. Todos estos resultados sugieren que el filtro luminiscente prototipo utilizado en estos estudios tiene el potencial ser un posible procedimiento terapéutico para el tratamiento de disfunciones celulares en oftalmología.

c6.3. Microbiología ocular.

La creación de los filtros nanoluminiscentes, desarrollada en el capítulo anterior, y su posible aplicación en lentes oftálmicas, plantea una modificación de la radiación que alcanza no solo a las estructuras oculares internas, sino también a las externas. En condiciones normales, la exposición ocular a longitudes de onda larga de intensidades normales no presenta ningún tipo de riesgo, pero, tanto las estructuras del polo anterior como las glándulas palpebrales frecuentemente pierden su condición sana, presentándose infecciones. Las bacterias son, por detrás de los virus, las principales causantes de infecciones de la conjuntiva^{368,369}. Estas conjuntivitis bacterianas se clasifican en función de su gravedad como agudas, hiperagudas, crónicas y las causadas por *Chlamydia*. La infección aguda es la más frecuente, con sintomatología de menos de 3-4 semanas de evolución. Están implicados en su etiología *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Haemophilus influenzae* y en algunas ocasiones enterobacterias y otros bacilos gramnegativos. En las conjuntivitis crónicas se aíslan *S. aureus*, y *Moraxella lacunata*, aunque también se han observado bacilos gramnegativos y *Actinomyces* spp. Otro microorganismo a tener en cuenta por la relevancia de sus infecciones es el protozoo *Acanthamoeba*. A pesar de que las infecciones por este microorganismo no son tan frecuentes³⁷⁰, la gravedad y evolución de las mismas hacen importante su estudio^{371,372}.

La modificación del espectro por los filtros nanoluminiscentes implica, no sólo un aumento en la cantidad de luz roja emitida, sino también una disminución de la radiación UV que llega a la superficie ocular. Se ha de tener en cuenta que existen estudios en los que se describe la capacidad bactericida de esta luz UV³⁷³⁻³⁷⁵, algo importante en la evaluación del efecto del modelo de filtro presentado. En cuanto a la franja del espectro visible, las publicaciones relacionadas con bacterias se centran en otros tipos de fototerapia³⁷⁶⁻³⁷⁸, y en ninguno de ellos se utilizan las condiciones de luz empleadas en los estudios realizados en esta tesis doctoral. No se han encontrado referencias bibliográficas que describan la acción concreta sobre bacterias, de la flora ocular o patógenas oculares tipo, del modelo empleado de administración de EEM, por ello, la evaluación del efecto de una disminución de la cantidad de luz UV junto con un aumento de la cantidad de luz roja es necesaria para ahondar en el estudio de la dinámica de las infecciones oculares y su posible implicación clínica.

El posible efecto de la luz sobre diferentes microorganismos puede tener base, al igual que en caso de las células, en la capacidad de algunas moléculas con grupos químicos concretos que interactúan con ciertas longitudes de onda del EEM. Multitud de microorganismos tienen la

capacidad de generar moléculas que absorben luz de forma selectiva, pigmentos, que desarrollan funciones básicas de tipo metabólico (fotosíntesis: clorofilas, carotenoides)³⁷⁹, como mecanismos de defensa con actividad antibiótica³⁸⁰, para aumentar su virulencia³⁸¹ y bajo diferentes situaciones de estrés, entre ellas la protección frente a radiación UV³⁸². Debido a la existencia de esos pigmentos, existe la posibilidad de interacción entre diferentes radiaciones del EEM con ellos, con consecuencias aún por evaluar.

Durante este capítulo se analizarán los resultados de una serie de experimentos preliminares en los que se evaluará, mediante un sistema *in vitro*, el efecto sobre el crecimiento de determinadas cepas de bacterias oculares, patógenas o no, de su cultivo en diferentes condiciones de luz.

c6.3.1. Diseño experimental.

El desarrollo experimental de este capítulo se llevó a cabo en el Departamento de Microbiología del Área de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo.

Los cultivos se prepararon, desde cultivos base inoculados la noche anterior a los experimentos, por dilución hasta conseguir la densidad óptica oportuna, medida a 600 nm (DO_{600}). El medio empleado en los cultivos fue BHI, en el cual, tras las diluciones, fueron sembrados los diferentes microorganismos en placas de 96 pocillos, utilizando 100 μ L por pocillo. Los cultivos se expusieron a las diferentes radiaciones, utilizando los mismos dispositivos que se emplearon en los estudios *in vitro* celulares descritos en los capítulos anteriores de este trabajo. Los cultivos se expusieron durante diferentes tiempos a la luz, siendo las diluciones iniciales:

- a. 6 horas: 0.1 y 0.05
- b. 16 horas: 0.05

Se sembraron 3 placas que se cultivaron en un incubador a 37 °C en condiciones de oscuridad, luz roja (6.5 W/m^2) y luz azul (12 W/m^2). En cada ensayo, se sembraron 4 réplicas de cada tratamiento y microorganismo, de las cuales, tres fueron utilizadas para las medidas de las densidades ópticas y una para realizar la siembra en placa para el contaje de unidades formadoras de colonias (UFCs), tras el tiempo de exposición a la luz:

- Medida de la DO final: desde los pocillos sembrados se realizaron diluciones, debido a la cantidad de bacterias crecidas (se observó a simple vista la turbidez del medio en los pocillos). Las diluciones fueron entre 1:1 a 1:3, y se aceptaron valores de DO entre 0.5 y 0.05.

- Siembra en placa de las muestras: se hicieron diluciones seriadas en PBS y se sembraron en placas Petri (90 x 14 mm) de medio BHI - agar. De cada dilución, se utilizaron 50 µL que se extendieron por toda la superficie de la placa. Para densidades ópticas finales de aproximadamente 0.2 se utilizó la dilución 10⁻⁵ para la siembra en placa. Las placas se incubaron durante la noche y posteriormente se realizó el conteo de forma manual.

Se establecieron las condiciones generales de los cultivos con *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas aeruginosa* y posteriormente fue estudiado el comportamiento del resto de microorganismos elegidos: *Staphylococcus epidermidis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* y *Streptococcus pneumoniae* (tabla c6.3.1).

Microorganismo	Clasificación Gram	Descripción	Tipo
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	Coco, anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Bacilo, aerobia estricta	Patógeno
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	+	Coco (cadenas), microaerófila	Comensal
<i>Escherichia coli</i>	-	Bacilo, anaerobia facultativa	Patógeno
<i>Micrococcus luteus</i>	+	Coco (tétradas), aerobia estricta	Comensal
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	Coco (racimos), anaerobia facultativa	Comensal

Tabla c6.3.1. Microorganismos empleados en el desarrollo de los estudios.

c6.3.2. Resultados y discusión.

En la figura c6.3.1 se muestran los resultados obtenidos con la incubación de 6 horas. En ella, se ve como no hay diferencias significativas entre los diferentes tratamientos de luz en la medida de las densidades ópticas en el caso de ambas bacterias. Cuando se analiza el valor de UFCs (figura c6.3.1B) sí se observan diferencias significativas en ambos microorganismos. En el caso de *S. aureus* la incubación con luz azul parece disminuir el número de UFCs mientras que la luz roja parece aumentarlas. Al contrario, en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* parece crecer más en oscuridad, siendo significativamente mayor la diferencia tanto con el recuento de aquellos cultivos incubados en luz azul como los incubados bajo luz roja. Según estos resultados, se ve

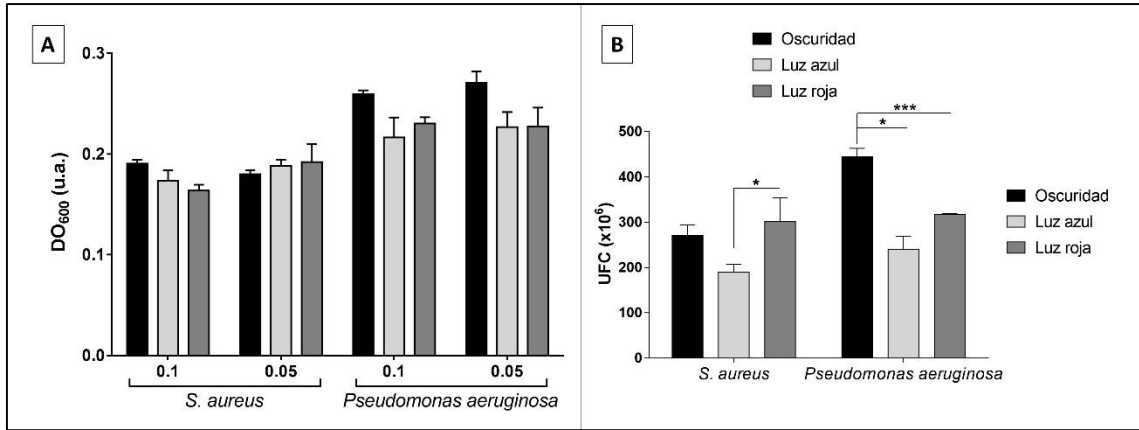


Figura c6.3.1. A) densidades ópticas finales de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* sembrados a densidades ópticas iniciales de 0.1 o 0.5 medidas a 600 nm, incubados en oscuridad o bajo diferentes condiciones de radiación (luz roja a 6.5 W/m² o luz azul a 12 W/m²). B) Recuentos de las unidades formadoras de colonias de los cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* incubados en oscuridad o bajo diferentes condiciones de radiación (luz roja a 6.5 W/m² o luz azul a 12 W/m²). Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM y se analizaron estadísticamente mediante un *One-way ANOVA*, $\alpha=0.05$, con post-test Sidak para comparaciones múltiples, (***) $p < 0.001$.

que la exposición a diferentes condiciones de luz en este estudio preliminar a pocas horas de exposición, tiene consecuencias significativas en el crecimiento microbiano de estas dos especies.

Tras el análisis de la exposición a tiempos cortos, se realizó un análisis más amplio a seis diferentes cepas, incluidas las dos anteriores, a 16 horas de exposición, tiempo máximo similar al que se podrían utilizar los filtros desarrollados en el capítulo anterior. Estos resultados se muestran en las figuras c6.3.2 a c6.3.7. En todas ellas, las imágenes A, B y C se corresponden con las fotografías tomadas a las placas en las que se llevó a cabo la siembra de la dilución oportuna para el recuento de las UFCs. La figura D se corresponde con el valor obtenido de DO tras los tratamientos y en la figura E se analizó el recuento de UFCs sembradas desde la correspondiente dilución.

La figura c6.3.2 muestra los resultados para las pruebas con *Staphylococcus aureus*, bacteria gram positiva patógena. Este microorganismo puede sintetizar, entre otros pigmentos, una gran

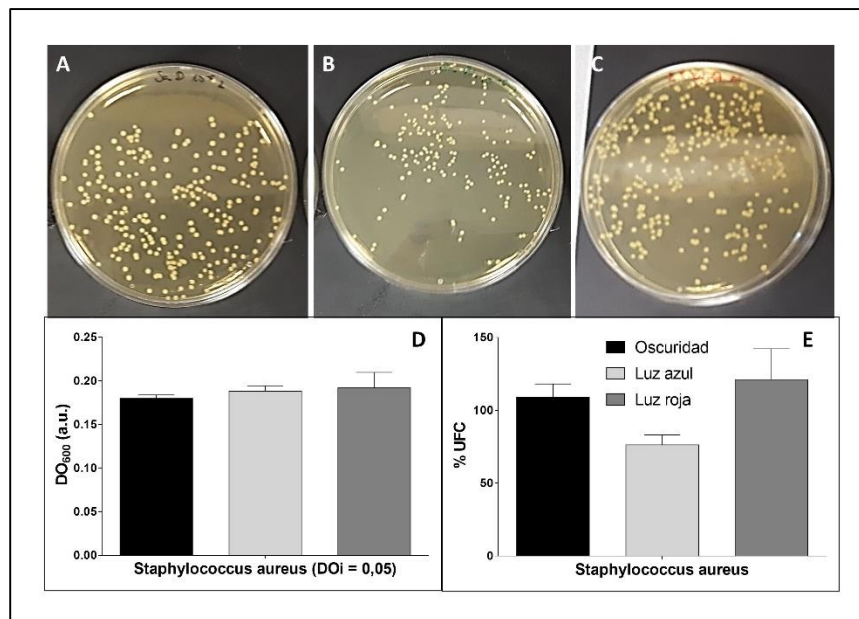


Figura c6.3.2. Resultados de la incubación de *Staphylococcus aureus* en condiciones de oscuridad o bajo radiación (luz roja a 6.5 W/m² o luz azul a 12 W/m²) durante 16 horas. A-C) fotografías de las unidades formadoras de colonias crecidas en medio sólido en oscuridad (A), luz azul (B) o luz roja (C). D) resultado de la medición de la densidad óptica del medio líquido tras las horas de incubación. E) Resultados del recuento de unidades formadoras de colonias expresado en porcentaje. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM.

variedad de carotenoides³⁸³ que le confieren la tonalidad amarillenta / dorada. Aunque los valores obtenidos al medir las DO tras las incubaciones parecen muy similares y no hay diferencias significativas (figura c6.3.2D), al analizar los recuentos de las UFCs se observa como la exposición a luz azul disminuye la tasa de crecimiento, comparada con las muestras incubadas en oscuridad o bajo condiciones de luz roja, las cuales no presentan diferencias significativas entre sí.

Pseudomonas aeruginosa, microorganismo gram negativo patógeno oportunista especialmente de individuos inmunocomprometidos³⁸⁴, sintetiza una gran cantidad de pigmentos. Uno de los más importantes es la piocianina (sideróforo), pigmento de gran importancia debida a sus propiedades REDOX capaces de generar daño por estrés oxidativo tanto en otros microorganismos como en células^{385,386}. Los cultivos fotografiados (figura c6.3.3A, B y C) muestran una clara tonalidad verde-azulada que indica la expresión de pigmento en esta cepa. En este caso, la medida de la DO es un poco mayor para los cultivos incubados en oscuridad, dato que se refuerza con los resultados obtenidos tras el recuento, en los que la exposición tanto a luz azul como a luz roja disminuye la cantidad de UFCs.

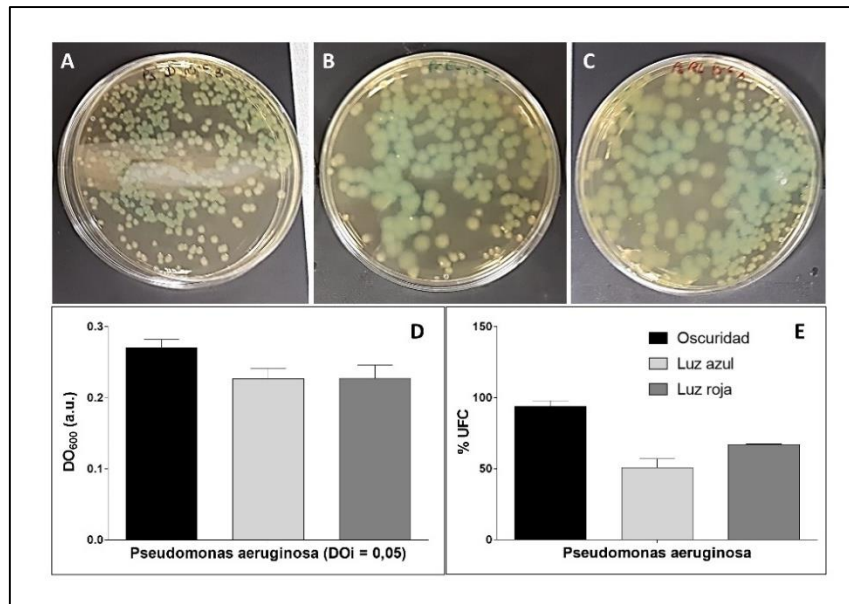


Figura c6.3.3. Resultados de la incubación de *Pseudomonas aeruginosa* en condiciones de oscuridad o bajo radiación (luz roja a 6.5 W/m² o luz azul a 12 W/m²) durante 16 horas. A-C) fotografías de las unidades formadoras de colonias crecidas en medio sólido en oscuridad (A), luz azul (B) o luz roja (C). D) resultado de la medición de la densidad óptica del medio líquido tras las horas de incubación. E) Resultados del recuento de unidades formadoras de colonias expresado en porcentaje. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM.

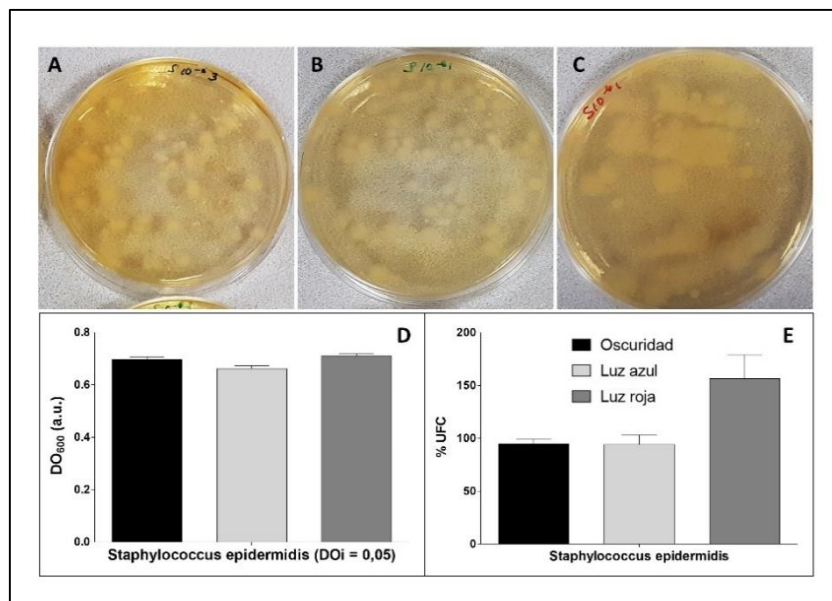


Figura c6.3.4. Resultados de la incubación de *Staphylococcus epidermidis* en condiciones de oscuridad o bajo radiación (luz roja a 6.5 W/m² o luz azul a 12 W/m²) durante 16 horas. A-C) fotografías de las unidades formadoras de colonias crecidas en medio sólido en oscuridad (A), luz azul (B) o luz roja (C). D) resultado de la medición de la densidad óptica del medio líquido tras las horas de incubación. E) Resultados del recuento de unidades formadoras de colonias expresado en porcentaje. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM.

En el caso de *Staphylococcus epidermidis*, las colonias no presentan coloración, y por lo general las cepas son no pigmentadas. Es una bacteria gram positiva comensal, que se encuentra en la

microbiota de la piel³⁸⁷. El análisis de las DO tras los tratamientos muestra unos valores similares para los tres tipos de incubación (figura c6.3.4D) pero como se observa en las imágenes (figura c6.3.4A, B y C) y en el análisis del recuento de las UFCs (figura c6.3.4E), la incubación bajo luz

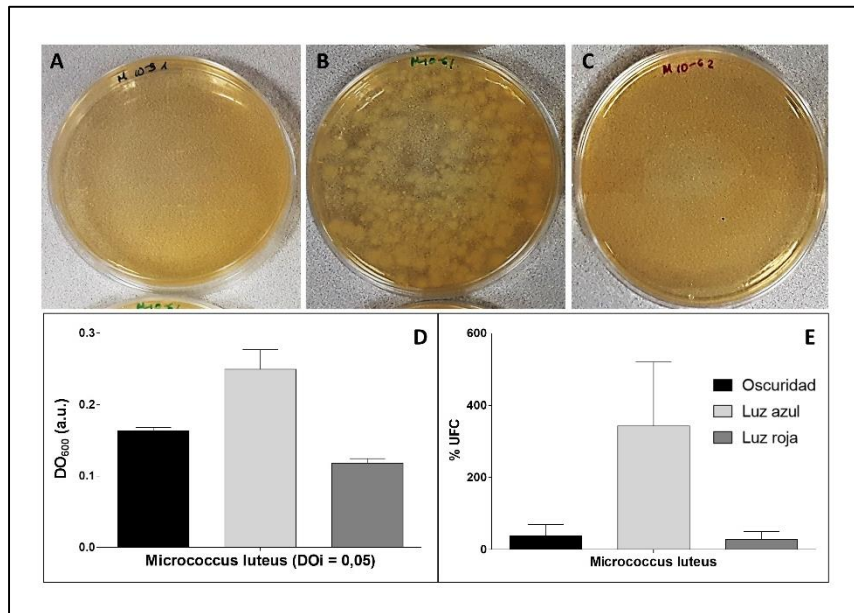


Figura c6.3.5. Resultados de la incubación de *Micrococcus luteus* en condiciones de oscuridad o bajo radiación (luz roja a 6.5 W/m² o luz azul a 12 W/m²) durante 16 horas. A-C) fotografías de las unidades formadoras de colonias crecidas en medio sólido en oscuridad (A), luz azul (B) o luz roja (C). D) resultado de la medición de la densidad óptica del medio líquido tras las horas de incubación. E) Resultados del recuento de unidades formadoras de colonias expresado en porcentaje. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM.

roja produjo un claro incremento del crecimiento bacteriano.

En la figura c6.3.5 se obtuvieron resultados distintos para *Micrococcus luteus*. Como se puede observar, la exposición a luz azul durante la incubación de los mismos, tanto por la medida de la DO como por el recuento de colonias, mostró una diferencia más que significativa con las muestras incubadas en oscuridad y en luz roja. *Micrococcus luteus* es un microorganismo gram positivo comensal, que podría convertirse en patógeno oportunista. Presenta una coloración amarillenta que se debe a la producción de riboflavina³⁸⁷. La riboflavina es una molécula con un espectro de absorción amplio en el UV y con picos en el espectro de luz visible en aproximadamente 370 y 440 nm (medido a pH 7)³⁸⁸. Es una molécula fotolábil, y su exposición a ciertas radiaciones lumínicas da lugar a la generación de distintos subproductos, por lo general en respuesta a la luz UV y sin actividad biológica³⁸⁹.

Escherichia coli es un patógeno gram negativo capaz de generar gran cantidad de diferentes pigmentos según la cepa empleada, el medio en el que se siembre o la temperatura de incubación, entre otras condiciones. En este caso, se observa un cierto tono amarillento en las

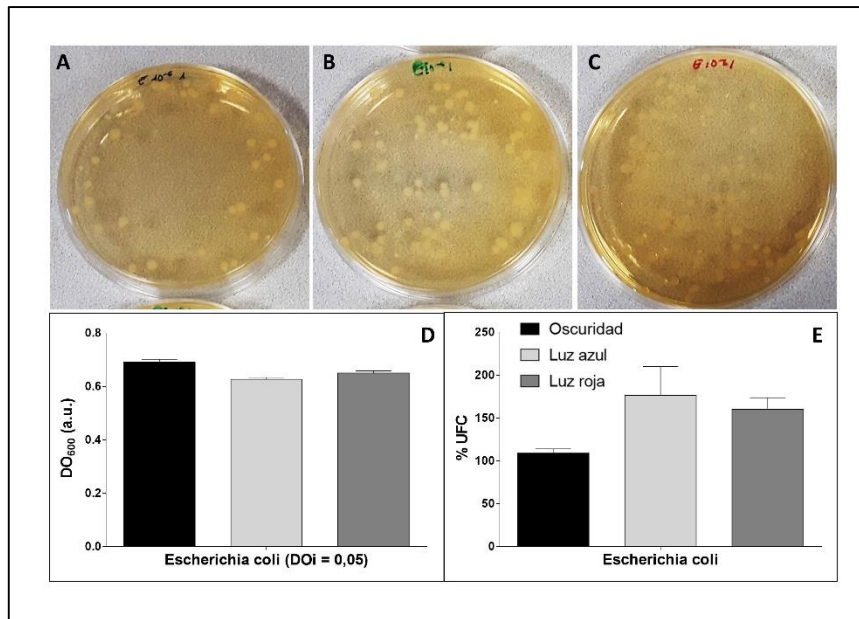


Figura c6.3.6. Resultados de la incubación de *Escherichia coli* en condiciones de oscuridad o bajo radiación (luz roja a 6.5 W/m^2 o luz azul a 12 W/m^2) durante 16 horas. A-C) fotografías de las unidades formadoras de colonias crecidas en medio sólido en oscuridad (A), luz azul (B) o luz roja (C). D) resultado de la medición de la densidad óptica del medio líquido tras las horas de incubación. E) Resultados del recuento de unidades formadoras de colonias expresado en porcentaje. Los resultados de $n=3$ se expresan como promedio \pm SEM.

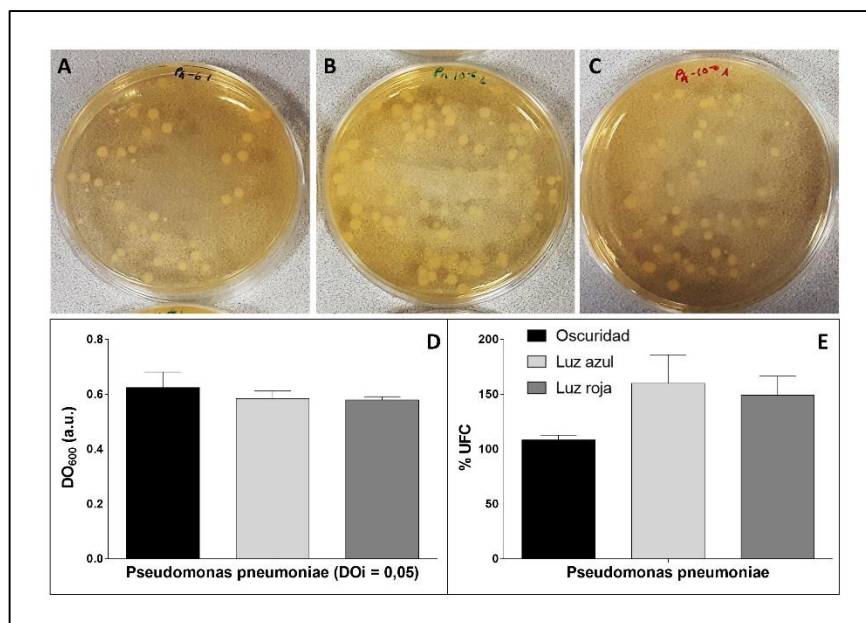


Figura c6.3.7. Resultados de la incubación de *Pseudomonas pneumoniae* en condiciones de oscuridad o bajo radiación (luz roja a 6.5 W/m^2 o luz azul a 12 W/m^2) durante 16 horas. A-C) fotografías de las unidades formadoras de colonias crecidas en medio sólido en oscuridad (A), luz azul (B) o luz roja (C). D) resultado de la medición de la densidad óptica del medio líquido tras las horas de incubación. E) Resultados del recuento de unidades formadoras de colonias. Los resultados de $n=3$ se expresan como promedio \pm SEM.

colonias, y aunque la medida de las DO es similar para los tres tratamientos, se observa un

incremento en el recuento de UFCs cuando los microorganismos se incubaron bajo luz roja que fue incluso mayor en el caso de la incubación bajo luz azul (figura c6.3.6).

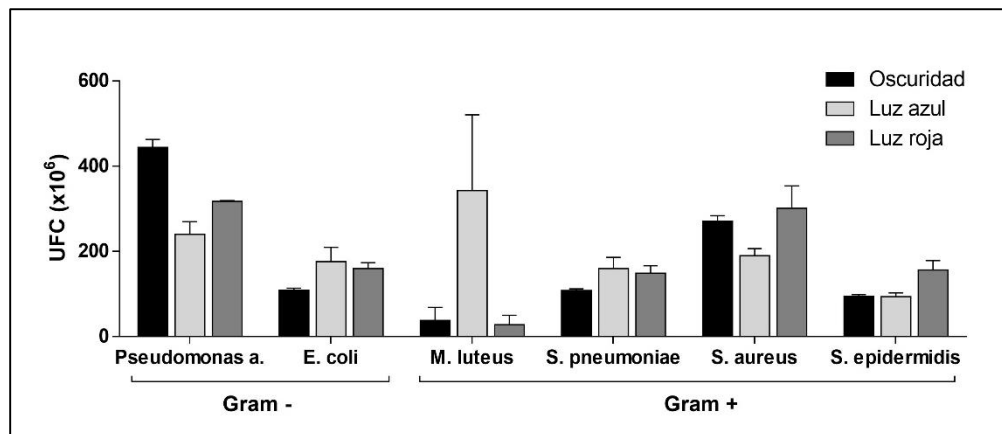


Figura c6.3.8. Comparativa de los recuentos de unidades formadoras de colonias de las diferentes bacterias cultivadas durante 16 horas en condiciones de oscuridad, luz roja (6.5 W/m²) o luz azul (12 W/m²) divididas según las características de su pared celular en Gram + o Gram -. Los resultados de n=3 se expresan como promedio ±SEM.

En el caso de *Streptococcus pneumoniae* los resultados son similares a los obtenidos con *E. coli*. Igual que en el caso anterior, las diferencias entre las DO no fueron significativas, pero el recuento de UFCs reveló un mayor número de colonias en las expuestas a luz roja y luz azul comparadas con el número de UFCs en oscuridad (figura c6.3.7). *Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria ubicua, especialmente presente como comensal en la nasofaringe humana³⁹⁰ que no presenta una especial síntesis de pigmentos.

Las medidas de las DO en muchos casos mostraron resultados diferentes a los obtenidos en los recuentos de las UFCs. Por lo general, en esos casos las medidas de las densidades eran iguales en los tres tratamientos. Según las curvas de crecimiento microbiano, encontramos una serie de fases en el mismo que se pueden dividir en una fase de latencia inicial, seguida de una fase de crecimiento exponencial, una fase estacionaria, y finalmente un descenso por una fase de muerte microbiana. Los cultivos fueron sembrados en fase de crecimiento exponencial a una concentración muy baja. Tras 16 horas de incubación con los diferentes tratamientos, en algunas ocasiones se saturó el cultivo, es decir, los microorganismos crecieron hasta entrar en la fase estacionaria y por ello, al no hacerse distinción entre microorganismos vivos o muertos, las diferencias entre tratamientos no fueron visibles mediante la medida de la DO. Éste fue el caso de ambas cepas de *Staphylococcus aureus* y *epidermidis*, *E. coli* y *S. pneumoniae*, en los que el análisis de las UFCs fue el que reveló el efecto real en los cultivos de las diferentes incubaciones. En el caso en que las DO mostraron diferencias, éstas fueron consistentes con el resultado obtenido al realizar el recuento de las UFCs. La figura c6.3.8 muestra una comparativa de todos

los recuentos en todas las cepas empleadas tras los diferentes tratamientos, y en ella se observa que la incubación bajo diferentes tipos de radiación tiene efecto en todas las cepas, pero no el mismo, independientemente de su clasificación Gram, su ausencia o no de pigmento. Incluso dentro del mismo género, *Staphylococcus*, dos especies diferentes responden de distinta manera a la incubación bajo luz azul o roja.

En algunos casos, la exposición a luz azul produce un incremento de la formación de UFCs, por lo tanto, del crecimiento microbiano. Este es especialmente el caso de *M. luteus*, microbio comensal que puede convertirse en patógeno oportunista³⁹¹. La relación entre el crecimiento excesivo del mismo, y la presencia de riboflavina, susceptible de ser afectada por la luz azul empleada, da lugar a un resultado sorprendente cuyo estudio en profundidad sería necesario, ya que una disminución de la exposición a luz azul podría ser beneficiosa para controlar el crecimiento excesivo de este microorganismo. Además de *M. luteus*, también se aumentó el crecimiento por exposición a luz azul en *E.coli* y *S. pneumoniae*. La exposición a luz roja también incrementó significativamente el crecimiento microbiano, en las bacterias *S. epidermidis*, comensal no pigmentada, *S. pneumoniae*, comensal, y en *E. coli*, patógena. Por otro lado, la exposición a luz azul también causó una disminución de crecimiento, como fue el caso de *Pseudomonas a.* y de *S. aureus*, ambos microorganismos patógenos. La exposición a luz roja únicamente disminuyó la tasa de crecimiento en el caso de *Pseudomonas a.*

Estos resultados preliminares nos permiten concluir que la modificación del espectro de luz que incide sobre la superficie ocular podría tener consecuencias para la flora microbiana del ojo, tanto en individuos sanos como en individuos que presenten infecciones. Por ello, harán falta estudios más profundos para saber la idoneidad en ámbito microbiológico de la conveniencia del uso de filtros nanoluminiscentes y la posología de los mismos según las condiciones del tejido, teniendo en cuenta la complejidad de la microbiota ocular y sus interrelaciones.

Discusión

Discusión

Las diferentes estructuras oculares están formadas por diversos tipos celulares, cada uno con sus características propias⁶, y todos ellos necesarios para el desarrollo de la función visual correcta. A lo largo de esta tesis doctoral, se ha trabajado con líneas celulares transformadas de tipo epitelial, corneales y retinianas (HCE-2 y ARPE19), con líneas transformadas derivadas de fibroblastos, otras provenientes de precursores retinianos, con cultivos primarios neuronales de ganglio trigémino y de células de endotelio corneal, así como con ojos de rata completos. Todos estos tipos celulares comparten la necesidad de generar energía metabólica en forma de ATP para mantener su viabilidad y su funcionalidad, y lo hacen a través del metabolismo mitocondrial^{16,22}. Como ya se ha mencionado, este metabolismo es el más eficaz en la generación de ATP por molécula de glucosa mediante las reacciones catalizadas en las mitocondrias por las enzimas que conforman la denominada cadena respiratoria (o cadena de transporte de electrones), los cuatro complejos enzimáticos mitocondriales más la ATP-sintasa. La inhibición individual de los complejos, así como el bloqueo de la ATP-sintasa, y otros daños, pueden disminuir la producción de ATP celular por su acción directa en las enzimas mitocondriales. Cuando la síntesis de ATP se ve comprometida, los tipos celulares estudiados se debilitan, llegando incluso a ver afectada su viabilidad.

Por su composición molecular, las mitocondrias son capaces de absorber energía de diferentes longitudes de onda, y el efecto de éstas puede ser determinante en el caso de ciertas situaciones de estrés metabólico. El estudio individual de las longitudes de onda cortas (azul, pico en 470 nm) en fibroblastos, reveló que la exposición a la misma desencadena una serie de mecanismos moleculares concretos: se produce una disminución de la actividad mitocondrial (figuras c1.1.1B, c1.1.3, c4.4, c6.5), con la consecuente caída en la producción de ATP (figura c1.1.4), un incremento en la producción de EROs (figura c1.1.5, c4.5, c6.6) y en el nivel de peroxidación lipídica (figura c1.1.13), una disminución de la viabilidad celular (figuras c1.1.1, c1.1.6, c1.1.14) y la afectación del material nuclear sin modificación del ciclo celular (figura c1.1.2). La diferencia de respuesta obtenida al utilizar fibroblastos cuya función mitocondrial está inhibida (Rho0) parece indicar que las longitudes de onda cortas a 470 nm podrían ejercer su acción principalmente en las mitocondrias (figuras c1.1.1, c1.1.3, c1.1.4, c1.1.5). La respuesta celular al bloqueo selectivo de los diferentes complejos enzimáticos mitocondriales es muy similar a la causada por la luz azul, de hecho, el bloqueo con 3NP (molécula inhibidora del complejo II) tiene

los mismos efectos que la luz azul para las características estudiadas, ya que en ambas parece ser la necroptosis (figura c1.1.6) el tipo de muerte celular desencadenado en este tipo celular a la concentración e irradiancia empleadas respectivamente para el 3NP y la luz azul.

A lo largo del resto de capítulos, se observó cómo la exposición a luz azul mostró una relación dosis-dependiente (figuras c2.7A, c4.3, c5.1,) y en todos los casos indujo los procesos metabólicos anteriormente descritos. Además, el estudio molecular desveló que la luz empleada a diferentes irradiancias para producir un porcentaje de muerte celular en los cultivos de aproximadamente un 40 %, produjo un incremento en la expresión de la proteína HO-1, isoforma de la proteína hemoxigenasa que responde a estímulos de estrés y se relaciona con la citoprotección endógena³⁹². Por lo tanto, se respalda que la exposición a luz azul de cierta intensidad es reconocida por la célula como una situación de estrés, a la que responde con la expresión de HO-1, que incrementa su expresión intracelular. Esta sobreexpresión se encontró en todos los tipos celulares analizados, tanto por inmunocitoquímica como por WB (figuras: c2.9, c2.10, c4.6, c5.10, c5.11). Asimismo, la exposición a luz azul desveló que produce también la escisión de AIF (figuras c2.11, c5.8), que da lugar a un subproducto activo que podría mediar en la muerte celular por necroptosis independiente de caspasas. Además, dicha exposición a luz azul produjo la fosforilación tanto de la proteína p38 (c2.12, c5.9) como de ERK (c2.13). Ambas fosforilaciones están relacionadas con la activación de rutas MAPK^{393,188} (ref) y podrían ser indicativas de rutas a través de las cuales la luz podría ejercer su efecto perjudicial, resultando interesantes como dianas terapéuticas.

Todos estos resultados son de especial importancia cuando el daño por luz azul se produce en células altamente diferenciadas como las neuronas, o muy especializadas, como las de endotelio corneal, donde la afectación de la viabilidad tiene consecuencias directas en la función visual. La exposición de neuronas a luz azul se llevó a cabo en experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* en los capítulos I y IV respectivamente. Nuevamente, los cultivos de neuronas vieron afectada su viabilidad por la exposición a luz, la cual, combinada con los inhibidores selectivos de los complejos enzimáticos mitocondriales, u otros tipos de daño (hipoxia, excitotoxicidad, síntesis de glutatión), multiplico su efecto dañino ampliamente (figura c1.2.3). A través de este resultado se pudo concluir que la acción de la luz azul sobre neuronas cuya actividad mitocondrial está afectada, o se encuentran debilitadas por otros tipos de daño, es perjudicial incluso en exposiciones de bajo nivel de radiación. Estos resultados se confirmaron con el estudio de la actividad mitocondrial de dichas neuronas *in vitro* (c1.2.4-12, c1.2.13). A partir de estos resultados, es más sencillo entender cómo las retinas de ratas sometidas a daño isquémico ocular durante 60 minutos (capítulo IV), se dañaron en mayor medida, de forma casi irreversible,

al realizar el procedimiento en condiciones de radiación azul, comparadas con las retinas mantenidas en oscuridad. En este caso, la exposición a luz azul disminuyó la concentración de ATP (c4.7), afectó a los niveles de glutatión (c4.15) y a la función retinal normal (c4.13, c4.14), nuevamente. Produjo un estado de estrés en la retina superior al de la isquemia llevada a cabo en oscuridad, y ello desencadenó un incremento en la expresión de GFAP (c4.11, c4.12) y una pérdida masiva de células ganglionares (positivas para Brn3a (c4.8, c4.9, c4.10)). La luz azul aplicada sin daño isquémico paralelo, no produjo pérdida de células y mantuvo valores normales de expresión de proteínas de estrés y de funcionalidad del tejido.

Por otro lado, cuando los mismos experimentos se realizaron con radiación de longitud de onda larga, los resultados obtenidos fueron completamente distintos. Lo único que parecen tener en común la luz roja y la luz azul empleadas es que ninguna de las dos produce cambios a nivel de ciclo celular en los experimentos llevados a cabo (c1.1.2). La exposición a luz roja (pico en 635 nm) produjo de forma general un aumento en la actividad mitocondrial (c1.1.3, c1.2.4-12, c3.5, c3.6, c3.11, c4.4, c5.2, c5.4, c5.5) con un consecuente aumento en la concentración de ATP (c1.1.4). No se produjo en ninguno de los estudios un aumento significativo en la producción de EROs (c1.1.5, c2.6, c5.6, c5.7) y pareció tener un efecto positivo en la viabilidad celular de los cultivos (c1.1.14, c3.13, c3.14, c5.1, c5.3). El efecto molecular de la exposición a luz roja fue comparable al de las células control en cuanto a expresión de proteínas de respuesta a estrés celular o mediadoras de mecanismos de muerte celular. Los estudios con neuronas *in vitro* (capítulo 1.2) revelaron que el efecto en la viabilidad de los cultivos expuestos a diferentes daños era el opuesto al de la luz azul. Los resultados obtenidos en los experimentos *in vivo* fueron aún más interesantes, ya que la exposición a luz roja durante el proceso de isquemia ocular incrementó la concentración de ATP (c4.7) en las retinas isquémicas (comparadas con el proceso en oscuridad), elevó los niveles de glutatión (c4.15), aumentando el nivel endógeno de mecanismos antioxidantes, y mejoró significativamente la función retinal de los ojos dañados (c4.13, c4.14). Por todo ello, la pérdida de células ganglionares (positivas para Brn3a (c4.8, c4.9, c4.10)) se vio atenuada, con la consecuente mejora de estado general de la retina y un mayor mantenimiento de la función visual.

El análisis global de todos estos datos hace suponer que la luz, tanto de longitud de onda corta como larga (concretas y a las irradiancias empleadas), tiene una serie de efectos celulares que ligados a situaciones de estrés, pueden desencadenar rutas que lleven a la muerte celular o a la supervivencia. Ello quiere decir, que la luz se convierte en un factor de riesgo añadido en personas que padezcan ya ciertas enfermedades oculares, en las que sus células se encuentren bajo situaciones de estrés y/o las mitocondrias de las mismas estén afectadas. Por ejemplo, la

luz de longitud de onda corta es capaz de ralentizar el cierre de heridas en el epitelio corneal (capítulo 2), hasta incluso impedirlo por completo, en modelos *in vitro*, o de incrementar la pérdida de células ganglionares en situaciones de hipoxia o de falta de nutrientes en la retina (isquemia), con las nefastas consecuencias que ello conlleva para el correcto funcionamiento del sistema visual. Por el contrario, la luz roja tiene el efecto opuesto, acelerando la velocidad de cierre de heridas en el epitelio corneal (en modelos *in vitro*, capítulo 2) e incrementando la supervivencia de células ganglionares de retina (capítulo IV) y la viabilidad y función de las células del endotelio corneal (capítulo III) durante un daño agudo.

El estudio de la radiación a la que estamos sometidos en nuestro día a día, especialmente por los cambios en los hábitos lumínicos que se han producido en las últimas décadas, indica que la luz procedente de fuentes artificiales tiene un elevado componente de longitudes de onda cortas, y, además, una composición muy escasa de longitudes de onda largas. Esta combinación es la típica de los dispositivos tipo LED, cuyo uso en los dispositivos electrónicos y en la iluminación ambiental es relativamente reciente⁷⁹ por ser una tecnología de reciente creación que apenas lleva dos décadas instalada en el mercado. Las bombillas incandescentes o halógenas presentan un contenido en longitudes de onda largas elevado, frente a los fluorescentes o los LED (figura i.10), pero su uso se vio limitado e incluso dejaron de fabricarse por motivos de economía energética. En concreto, los estados de la Unión Europea dejaron de fabricar bombillas incandescentes el 1 de septiembre de 2012. La transición energética que supuso el cambio de iluminación artificial se llevó a cabo en España a través del Ministerio de Industria, Turismo y Comercio. Este Ministerio desarrolló un Plan de Ahorro y Eficiencia Energética entre cuyas medidas se encontró el reparto de más de 20 millones de bombillas de bajo consumo gratuitas en toda España a través de la campaña 'Con tu ahorro ganamos todos'¹³⁹⁴. El objetivo de dicha medida fue recortar un 0,7% el consumo eléctrico del país y la campaña contó con un presupuesto de 137 millones de euros gestionados por el Instituto para la Diversificación y el Ahorro Energético. La implicación biológica de dicho cambio no fue tenida en cuenta, probablemente porque los estudios sobre radiación del EEM visible y la salud no estaban tan desarrollados como en la actualidad. Al considerar que la luz azul es un factor de riesgo añadido en ciertas enfermedades, y sabiendo que la exposición a luz roja es beneficiosa, se puede plantear la creación de un filtro con tecnología nanoluminiscente, capaz de disminuir la cantidad de luz azul incidente a la vez que incrementa la cantidad de luz roja emitida.

Teniendo en cuenta las particularidades actuales de la radiación, y sabiendo sus posibles efectos biológicos en las estructuras oculares, parece lógico que en diversos procesos oftalmológicos se tengan en cuenta dichas características. Por ejemplo, la elección de las lentes intraoculares,

especialmente cuando son pseudofáquicas, debería inclinarse hacia aquellas que tienen un filtro que impida el paso de longitudes de onda cortas. De la misma manera, deberían elegirse en el caso de pacientes con ciertas enfermedades en el polo posterior, como glaucoma o DMAE. Su análisis físico mostró cómo cuando la fuente de luz es de espectro continuo (por ejemplo, luz solar) la diferencia de la distribución espectral entre lentes con y sin filtro se hace patente (figuras c6.1.3, c6.1.5). Pero cuando la fuente de luz es artificial (figuras c6.1.6, c6.1.7) esas diferencias son prácticamente insignificantes, ya que los espectros en la zona del azul para estas fuentes comienzan en longitudes de onda más largas, aun dentro del espectro azul. Es decir, los filtros de las LIOs son eficaces hasta longitudes de onda máximas de aproximadamente 430 nm, mientras que el pico de emisión azul de los LED blancos se encuentra rondando los 460 nm. Teniendo en cuenta que actualmente la principal radiación a la que estamos sometidos durante más horas al día, especialmente en invierno, es artificial, su efecto no es suficiente.

La particularidad de las moléculas nanoluminiscentes es que permiten hacer una selección discreta de las longitudes de onda tanto de absorción como de emisión. Se puede diseñar un filtro con absorción en 460 nm y emisión en 635 nm, o incluso uno que absorba en la región UV del espectro y emita en el infrarrojo. De momento, los estudios se encuentran en fases iniciales y por ello las absorbancias de las moléculas nanoluminiscentes son demasiado amplias en el espectro (figura c6.2.1), pero los estudios llevados a cabo son prometedores, ya que, en células, el uso del filtro redujo la cantidad de luz UV-azul nociva incidente, y pareció incrementar la cantidad de luz roja emitida con el consiguiente efecto beneficioso para las mismas en términos de viabilidad (figuras c6.2.2, c6.2.3), incremento de la actividad mitocondrial (figura 6.2.5) y producción de EROs (figura c6,2,6).

Existen varios estudios de investigación preclínicos sobre la influencia beneficiosa de la terapia con luz roja en enfermedades oculares como la degeneración macular relacionada con la edad y la retinopatía diabética^{129,316,343}, incluidos los ensayos TORPA (NCT00940407) y LIGHTSIGHT (NCT02725762). La luz roja, igual que la luz azul, parece tener una respuesta dosis dependiente ya que, dosis bajas no ejercen ningún efecto, pero dosis de elevada energía son nocivas y causan pérdida de la viabilidad celular (datos no mostrados). Por lo tanto, aunque un incremento de la cantidad de luz roja que llega a las estructuras oculares podría ser beneficioso, será importante establecer los parámetros con anterioridad para el desarrollo completo del filtro.

De igual manera, habrá que tener en cuenta que la superficie ocular tiene una microbiota que también interactúa con la luz. Se sabe que ciertas longitudes de onda cortas tienen efectos bactericidas, por lo que cambios en la luz incidente puede que afecten al equilibrio de los

microorganismos en condiciones normales. Además, en condiciones de enfermedad, esta modificación de la radiación incidente puede tener efectos importantes. Dentro de los microorganismos evaluados (tabla c6.3.1), existen algunos que parecen verse afectados negativamente por la luz azul o por la roja en comparación con su incubación en oscuridad, pero también parece que otros ven su desarrollo favorecido por ciertas radiaciones (c6.3.9). No parece existir ningún patrón atendiendo a su clasificación como patógenos o comensales o a la estructura de su pared celular, de modo que serán necesarios estudios posteriores cuando el desarrollo del filtro sea definitivo, para poder evaluar la seguridad de su uso en el aspecto microbiológico.

Conclusiones

Conclusiones

De los resultados de los experimentos anteriores se concluye que:

- 1) La luz azul ($\lambda_{\text{máx}}$ 470 nm, a determinados niveles de irradiancias) produce daño celular en los tejidos oculares por los siguientes mecanismos:
 - a) disminución de la actividad mitocondrial normal que conlleva una disminución de la producción de ATP,
 - b) incremento en el nivel de estrés oxidativo general, incluyendo el nivel de peroxidación lipídica,
 - c) activación de rutas MAPK por la fosforilación de p38 y de ERK,
 - d) y alteración de rutas celulares mediante la escisión de la proteína AIF, desencadenando el proceso de necroptosis.

 - 2) Cuando esta luz azul se aplica sobre células o tejidos lesionados, se produce un incremento significativo del daño celular, incluso con irradiancias no perjudiciales en condiciones normales. Este incremento de daño se manifiesta, entre otros, por:
 - a) un retraso el tiempo de cicatrización del epitelio corneal en modelos *in vitro*,
 - b) y un incremento de la pérdida de células ganglionares de la neurorretina durante el proceso isquémico.
- Por ello, se podría inferir que la exposición a luz azul de irradiancia no perjudicial para ojos en condiciones normales, podría ser un factor de riesgo en ojos no sanos.
- 3) Se ha demostrado un efecto citoprotector de la luz roja ($\lambda_{\text{máx}}$ 630 nm, a determinadas irradiancias) sobre las células y tejidos oculares estudiados, con las siguientes características:
 - a) un aumento de la actividad mitocondrial,
 - b) un incremento en la producción de ATP
 - c) y un incremento de la viabilidad en condiciones de daño.

Este efecto citoprotector se comprobó en epitelio corneal, endotelio corneal, neuroretina y epitelio pigmentario.

- 4) Como aplicación práctica de las conclusiones anteriores, el daño por luz azul se puede tener en cuenta en el diseño de lentes intraoculares. Los dispositivos evaluados emiten longitudes de onda corta que pueden afectar negativamente a la viabilidad celular y las lentes intraoculares ensayadas no bloquean gran parte de la radiación potencialmente perjudicial. Esto podría ser de mayor relevancia clínica en los ojos más vulnerables.
- 5) Se ha comprobado en un modelo *in vitro* la eficacia de conversores espectrales nanoluminiscentes que transforman longitudes de onda corta en larga, demostrando su efecto citoprotector.
- 6) La microbiota puede ser modulada por exposición a diferentes longitudes de onda con posibles aplicaciones prácticas en microbiología ocular.

Bibliografía

Bibliografía

1. Pastor Jimeno J, ed. *Guines de Oftalmología*. McGraw-Hil.; 1999.
2. Ophthalmology AS of, ed. *Fundamentals and Principles of Ophthalmology. Section2*.; 2001.
3. H S, C L, H O, G R. *Anatomía e Histología Del Ojo*. Masson SA. (Masson, ed.); 1985.
4. Eye Anatomy – Terrace Eye Centre. <https://terraceeyecentre.com.au/eye-anatomy/>. Accessed November 20, 2018.
5. Eye Anatomy – Terrace Eye Centre. <https://terraceeyecentre.com.au/eye-anatomy/>. Accessed June 7, 2019.
6. P S, H D, C G. *Biophthalmologie*. Masson.; 1992.
7. Ruiz-Mesa Ramón, Pedro T-R. *Óptica Para El Cirujano Faco-Refractivo*. (Elsevier, ed.); 2011.
8. Casadessus O, Georges G, Lamoine LS, Deumié C, Hoffart L. Light scattering from edematous human corneal grafts' microstructure: experimental study and electromagnetic modelization. *Biomed Opt Express*. 2012;3(8):1793. doi:10.1364/BOE.3.001793
9. Kolb H. *Photoreceptors*.; 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413383>. Accessed September 19, 2018.
10. Kolb H. *Simple Anatomy of the Retina*.; 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413391>. Accessed September 19, 2018.
11. Kolb H. *Gross Anatomy of the Eye*.; 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413392>. Accessed September 19, 2018.
12. Kolb H. *Glial Cells of the Retina*.; 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413380>. Accessed September 19, 2018.
13. Kolb H. *Outer Plexiform Layer*.; 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413381>. Accessed September 19, 2018.
14. Kolb H. *Inner Plexiform Layer*.; 1995. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413394>. Accessed September 19, 2018.
15. Wong-Riley MTT. Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain*. 2010;2:99-116. doi:10.2147/EB.S9078
16. Learn Science at Scitable. Mitochondria, Cell Energy, ATP Synthase | Learn Science at Scitable. <https://www.nature.com/scitable/topicpage/mitochondria-14053590>. Accessed May 28, 2019.
17. DUANE TD. METABOLISM OF THE CORNEA. *Arch Ophthalmol*. 1949;41(6):736-749. doi:10.1001/archopht.1949.00900040757009

18. Thies RS, Mandel LJ. Role of glucose in corneal metabolism. *Am J Physiol Physiol*. 1985;249(5):C409-C416. doi:10.1152/ajpcell.1985.249.5.C409
19. Country MW. Retinal metabolism: A comparative look at energetics in the retina. *Brain Res*. 2017;1672:50-57. doi:10.1016/J.BRAINRES.2017.07.025
20. Alberts B, Wilson J, Hunt T. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science; 2008.
21. Friedman JR, Nunnari J. Mitochondrial form and function. *Nature*. 2014;505(7483):335-343. doi:10.1038/nature12985
22. Cooper GM. Mitochondria. 2000. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9896/>. Accessed May 28, 2019.
23. Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release. *Physiol Rev*. 2014;94(3):909-950. doi:10.1152/physrev.00026.2013
24. Nickel A, Kohlhaas M, Maack C. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *J Mol Cell Cardiol*. 2014;73:26-33. doi:10.1016/j.yjmcc.2014.03.011
25. Murphy MP. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem J*. 2009;417(Pt 1):1. doi:10.1042/BJ20081386
26. Scott I, Youle RJ. Mitochondrial fission and fusion. *Essays Biochem*. 2010;47:85-98. doi:10.1042/bse0470085
27. Youle RJ, van der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. 2012;337(6098):1062-1065. doi:10.1126/science.1219855
28. Tait SWG, Green DR. Mitochondrial regulation of cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2013;5(9). doi:10.1101/cshperspect.a008706
29. Parsons MJ, Green DR. Mitochondria in cell death. *Essays Biochem*. 2010;47:99-114. doi:10.1042/bse0470099
30. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ*. 2018;25(3):486-541. doi:10.1038/s41418-017-0012-4
31. Kroemer G, Galluzzi L, Vandenabeele P, et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell Death Differ*. 2009;16(1):3-11. doi:10.1038/cdd.2008.150
32. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*. 2007;35(4):495-516. doi:10.1080/01926230701320337
33. Nieminen A-L. Apoptosis and necrosis in health and disease: role of mitochondria. *Int Rev Cytol*. 2003;224:29-55. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12722948>. Accessed May 28, 2019.
34. Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet*. 2009;43:95-118. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134850
35. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem*. 1998;252(1):1-15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9523706>. Accessed May 28, 2019.
36. Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci*. 2007;32(1):37-43. doi:10.1016/J.TIBS.2006.11.001

37. Yonekawa T, Thorburn A. Autophagy and cell death. *Essays Biochem.* 2013;55:105-117. doi:10.1042/bse0550105
38. David KK, Andrabi SA, Dawson TM, Dawson VL. Parthanatos, a messenger of death. *Front Biosci (Landmark Ed.)* 2009;14:1116-1128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273119>. Accessed May 28, 2019.
39. Broker LE, Kruyt FAE, Giaccone G. Cell Death Independent of Caspases: A Review. *Clin Cancer Res.* 2005;11(9):3155-3162. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2223
40. Hockenbery DM. *Mitochondria and Cell Death.*
41. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, Victor VM. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016;2016:1245049. doi:10.1155/2016/1245049
42. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol.* 2015;4:180-183. doi:10.1016/j.redox.2015.01.002
43. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
44. Kaltschmidt B, Sparna T, Kaltschmidt C. Activation of NF- κ B by Reactive Oxygen Intermediates in the Nervous System. *Antioxid Redox Signal.* 1999;1(2):129-144. doi:10.1089/ars.1999.1.2-129
45. Shackelford RE, Kaufmann WK, Paules RS. Oxidative stress and cell cycle checkpoint function. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(9):1387-1404. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10924858>. Accessed May 28, 2019.
46. Wolin MS. Interactions of oxidants with vascular signaling systems. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(6):1430-1442. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10845855>. Accessed May 28, 2019.
47. Roos G, Messens J. Protein sulfenic acid formation: From cellular damage to redox regulation. *Free Radic Biol Med.* 2011;51(2):314-326. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2011.04.031
48. Migliaccio E, Giorgio M, Mele S, et al. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals. *Nature.* 1999;402(6759):309-313. doi:10.1038/46311
49. and NRJ, Mishra* PC. Mechanisms of Formation of 8-Oxoguanine Due To Reactions of One and Two OH• Radicals and the H₂O₂ Molecule with Guanine: A Quantum Computational Study. 2005. doi:10.1021/JP050646J
50. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. *In Vivo.* 13(3):295-309. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10459507>. Accessed August 20, 2018.
51. Di Meo S, Iossa S, Venditti P. Improvement of obesity-linked skeletal muscle insulin resistance by strength and endurance training. *J Endocrinol.* 2017;234(3):R159-R181. doi:10.1530/JOE-17-0186
52. Li Y, Huang T-T, Carlson EJ, et al. Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat Genet.* 1995;11(4):376-381. doi:10.1038/ng1295-376

53. Zhang Y, Zhang H-M, Shi Y, et al. Loss of manganese superoxide dismutase leads to abnormal growth and signal transduction in mouse embryonic fibroblasts. *Free Radic Biol Med*. 2010;49(8):1255-1262. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2010.07.006
54. Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO J*. 2012;5(January):9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613
55. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, Filesi C, Giovannini C. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem*. 2005;16(10):577-586. doi:10.1016/j.jnutbio.2005.05.013
56. Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, et al. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol*. 2015;6:183-197. doi:10.1016/j.redox.2015.07.008
57. Loboda A, Jazwa A, Grochot-Przeczek A, et al. Heme Oxygenase-1 and the Vascular Bed: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxid Redox Signal*. 2008;10(10):1767-1812. doi:10.1089/ars.2008.2043
58. Reidy JJ, Paulus MP, Gona S. Recurrent erosions of the cornea: epidemiology and treatment. *Cornea*. 2000;19(6):767-771. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11095047>. Accessed May 28, 2019.
59. Laibson PR. Recurrent Corneal Erosions and Epithelial Basement Membrane Dystrophy. *Eye Contact Lens Sci Clin Pract*. 2010;36(5):315-317. doi:10.1097/ICL.0b013e3181f18ff7
60. Jones NP, Hayward JM, Khaw PT, Claoue CM, Elkington AR. Function of an ophthalmic "accident and emergency" department: results of a six month survey. *BMJ*. 1986;292(6514):188-190. doi:10.1136/bmj.292.6514.188
61. Jackson H. Effect of Eye-pads on Healing of Simple Corneal Abrasions. *BMJ*. 1960;2(5200):713-713. doi:10.1136/bmj.2.5200.713
62. Kanski J, Bowling B. *Clinical ophthalmology: a systematic approach*. 2011. https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=MQXjTT5HIMUC&oi=fnd&pg=PP1&dq=Clinical+Ophthalmology+A+systematic+Approach+Jack.J.Kanski+5th+edition+text+book&ots=0iRde5d3Nf&sig=_YcLUni69SAqSJweq2729SM4rrU. Accessed May 28, 2019.
63. Niemz MH. *Light and Matter*.; 2007. doi:10.1007/978-3-540-72192-5_2
64. Peatross J, Michael W. Physics of Light and Optics. *Phys Light and Optics*. 2008:342. doi:10.1364/FIO.2010.JWA64
65. Gabàs Masip J, Masip JG. Maxwell: la teoría electromagnética de la luz. *Arbor*. 2015;191(775):a265. doi:10.3989/arbor.2015.775n5004
66. Tipler PA. *Physics*. Cuarta edi. (Worth Publishers Inc. US, ed.); 1998.
67. Sung C-H, Chuang J-Z. The cell biology of vision. *J Cell Biol*. 2010;190(6):953-963. doi:10.1083/jcb.201006020
68. Chen L, Zhang X-W. Which lamp will be optimum to eye? Incandescent, fluorescent or LED etc. *Int J Ophthalmol*. 2014;7(1):163-168. doi:10.3980/j.issn.2222-3959.2014.01.30
69. Forbes MDE. What We Talk About When We Talk About Light. *ACS Cent Sci*. 2015;1(7):354-363. doi:10.1021/acscentsci.5b00261
70. Elvidge CD, Keith DM, Tuttle BT, Baugh KE. Spectral Identification of Lighting Type and

- Character. *Sensors (Basel)*. 2010;10(4):3961. doi:10.3390/S100403961
71. Menéndez-Velázquez A, Núñez-Álvarez C, Olmo-Aguado SD, et al. Potential application of photoluminescent filters for use in ophthalmology. *Opt Mater (Amst)*. 2018;in press. doi:10.1016/j.optmat.2018.07.065
 72. ScienceDirect Topics. Nuclear Fusion Reaction - an overview. <https://www.sciencedirect.com/topics/engineering/nuclear-fusion-reaction>. Accessed May 29, 2019.
 73. ScienceDirect Topics. Solar Radiation - an overview. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/solar-radiation>. Accessed May 29, 2019.
 74. Nahar SN. Solar Irradiance of the Earth's Atmosphere. *Clim Chang Food Secur South Asia*. 2010:31-42. doi:10.1007/978-90-481-9516-9_3
 75. Laura A, Peña P, Baró R, Jimenez Guerrero P. Estudio del efecto directo de los aerosoles atmosféricos sobre Europa. 2014:8-13.
 76. Wittenberg S. Solar radiation and the eye: a review of knowledge relevant to eye care. *Am J Optom Physiol Opt*. 1986;63(8):676-689. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3532811>. Accessed May 29, 2019.
 77. Summary S, Criteria EH, Radiation U. Health and Environmental Effects of Ultraviolet Radiation. 2006;95(16). <http://www.who.int/uv/publications/UVEHeffects.pdf>.
 78. AEMET. La radiación solar.
 79. Chepesiuk R. Missing the dark: health effects of light pollution. *Environ Health Perspect*. 2009;117(1):A20-7. doi:10.1289/ehp.117-a20
 80. Falchi F, Cinzano P, Duriscoe D, et al. The new world atlas of artificial night sky brightness. *Sci Adv*. 2016;2(6):e1600377. doi:10.1126/sciadv.1600377
 81. Rich C, Longcore T. *Ecological Consequences of Artificial Night Lighting*. Island Press; 2006.
 82. Boettner EA, Wolter JR. Transmission of the Ocular Media. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1962;1(6):776-783. doi:10.1017/S0025315406014421
 83. Beems EM, Van Best JA. Light transmission of the cornea in whole human eyes. *Exp Eye Res*. 1990;50(4):393-395. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2338122>. Accessed October 9, 2018.
 84. Douth JJ, Quantock AJ, Joyce NC, Meek KM. Ultraviolet light transmission through the human corneal stroma is reduced in the periphery. *Biophys J*. 2012;102(6):1258-1264. doi:10.1016/j.bpj.2012.02.023
 85. Douth J, Quantock AJ, Smith VA, Meek KM. Light Transmission in the Human Cornea as a Function of Position across the Ocular Surface: Theoretical and Experimental Aspects. *Biophys J*. 2008;95(11):5092-5099. doi:10.1529/biophysj.108.132316
 86. Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye*. 1997;11(4):465-471. doi:10.1038/eye.1997.127
 87. Yust BG, Mimun LC, Sardar DK. Optical absorption and scattering of bovine cornea, lens, and retina in the near-infrared region. *Lasers Med Sci*. 2012;27(2):413-422. doi:10.1007/s10103-011-0927-9

88. Kolozsvári L, Nógrádi A, Hopp B, Bor Z. UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2002;43(7):2165-2168. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12091412>. Accessed October 9, 2018.
89. Douth J, Quantock AJ, Smith VA, Meek KM. Light transmission in the human cornea as a function of position across the ocular surface: theoretical and experimental aspects. *Biophys J.* 2008;95(11):5092-5099. doi:10.1529/biophysj.108.132316
90. Osborne NN, Núñez-Álvarez C, del Olmo-Aguado S, Merrayo-Lloves J. Visual light effects on mitochondria: The potential implications in relation to glaucoma. *Mitochondrion.* 2017;36. doi:10.1016/j.mito.2016.11.009
91. Osborne NN, Kamalden TA, Majid ASA, Del Olmo-Aguado S, Manso AG, Ji D. Light effects on mitochondrial photosensitizers in relation to retinal degeneration. *Neurochem Res.* 2010;35(12):2027-2034. doi:10.1007/s11064-010-0273-5
92. Kolb Helga. How the retina works. *Am Sci.* 2003;91:28-35. <http://webvision.med.utah.edu/wp-content/uploads/2011/01/2003-01Kolb.pdf>.
93. Rodieck RW. *The First Steps in Seeing*. Sinauer Associates; 1998. <https://global.oup.com/ushe/product/the-first-steps-in-seeing-9780878937578?cc=us&lang=en&>. Accessed May 29, 2019.
94. Berson DM, Dunn FA, Takao M. Phototransduction by Retinal Ganglion Cells That Set the Circadian Clock. *Science (80-)*. 2002;295(5557):1070-1073. doi:10.1126/science.1067262
95. Yoshimoto S, Garcia J, Jiang F, Wilkins AJ, Takeuchi T, Webster MA. Visual discomfort and flicker. *Vision Res.* 2017;138:18-28. doi:10.1016/j.visres.2017.05.015
96. Wilkins A, Veitch J, Lehman B. LED lighting flicker and potential health concerns: IEEE standard PAR1789 update. In: *2010 IEEE Energy Conversion Congress and Exposition*. IEEE; 2010:171-178. doi:10.1109/ECCE.2010.5618050
97. Jin X, Wu L, Zheng H, Mishima S. [Retinal light damage: I. The influences of light intensity and exposure duration at moderate and low intensities of cyclic light]. *Yan ke xue bao = Eye Sci.* 1998;14(4):215-219. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12579740>. Accessed October 25, 2018.
98. Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. *Eye (Lond)*. 2011;25(1):1-14. doi:10.1038/eye.2010.149
99. Okudan ZV, Özkara Ç. Reflex epilepsy: triggers and management strategies. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2018;14:327. doi:10.2147/NDT.S107669
100. Holick MF. Biological Effects of Sunlight, Ultraviolet Radiation, Visible Light, Infrared Radiation and Vitamin D for Health. *Anticancer Res.* 2016;36(3):1345-1356. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26977036>.
101. Slominski A, Pawelek J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin Dermatol.* 1998;16(4):503-515. doi:10.1016/S0738-081X(98)00023-6
102. Hoel DG, Berwick M, de Gruijl FR, Holick MF. The risks and benefits of sun exposure 2016. *Dermatoendocrinol.* 2016;8(1):e1248325. doi:10.1080/19381980.2016.1248325
103. Mellerio J. Light effects on the retina. In: *Principles and Practice of Ophthalmology: Basic Sciences*. Saunders, Philadelphia: Saunders, Philadelphia; 1994:1326-1345.

104. Bonnett R, Charlambides AA, Land EJ, Sinclair RS, Tait D, Truscott TG. Triplet states of porphyrin esters. *J Chem Soc Faraday Trans 1 Phys Chem Condens Phases*. 1980;76(0):852. doi:10.1039/f19807600852
105. Gorgidze LA, Oshemkova SA, Vorobjev IA. Blue light inhibits mitosis in tissue culture cells. *Biosci Rep*. 1998;18(4):215-224. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9877234>. Accessed February 9, 2018.
106. Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE, et al. Blue Light Differentially Modulates Cell Survival and Growth. *J Dent Res*. 2004;83(2):104-108. doi:10.1177/154405910408300204
107. Ortiz de Montellano PR. The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos*. 1995;23(11):1181-1187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8591716>. Accessed May 29, 2019.
108. García-Silva MT, Ribes A, Campos Y, Garavaglia B, Arenas J. Syndrome of encephalopathy, petechiae, and ethylmalonic aciduria. *Pediatr Neurol*. 1997;17(2):165-170. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9367300>. Accessed February 9, 2018.
109. Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, et al. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(May):6255-6260. doi:10.1073/pnas.96.11.6255
110. Knels L, Valtink M, Roehlecke C, et al. Blue light stress in retinal neuronal (R28) cells is dependent on wavelength range and irradiance. *Eur J Neurosci*. 2011;34(4):548-558. doi:10.1111/j.1460-9568.2011.07790.x
111. Lascaratos G, Ji D, Wood JPM, Osborne NN. Visible light affects mitochondrial function and induces neuronal death in retinal cell cultures. *Vision Res*. 2007;47(9):1191-1201. doi:10.1016/j.visres.2006.12.014
112. Osborne NN. Pathogenesis of ganglion “cell death” in glaucoma and neuroprotection: focus on ganglion cell axonal mitochondria. In: ; 2008:339-352. doi:10.1016/S0079-6123(08)01124-2
113. Osborne NN, Lascaratos G, Bron AJ, Chidlow G, Wood JPMM. A hypothesis to suggest that light is a risk factor in glaucoma and the mitochondrial optic neuropathies. *Br J Ophthalmol*. 2006;90(2):237-241. doi:10.1136/bjo.2005.082230
114. Wood JPM, Lascaratos G, Bron AJ, Osborne NN. The influence of visible light exposure on cultured RGC-5 cells. *Mol Vis*. 2008;14(February):334-344. doi:v14/a42 [pii]
115. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. THE MITOCHONDRIAL DEATH/LIFE REGULATOR IN APOPTOSIS AND NECROSIS. *Annu Rev Physiol*. 1998;60(1):619-642. doi:10.1146/annurev.physiol.60.1.619
116. Ji D, Kamalden TA, del Olmo-Aguado S, Osborne NN. Light- and sodium azide-induced death of RGC-5 cells in culture occurs via different mechanisms. *Apoptosis*. 2011;16(4):425-437. doi:10.1007/s10495-011-0574-4
117. Li G-YY, Osborne NN. Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose)polymerase and apoptosis-inducing factor. *Brain Res*. 2008;1188(1):35-43. doi:10.1016/j.brainres.2007.10.073
118. Liang HL, Whelan HT, Eells JT, et al. Photobiomodulation partially rescues visual cortical

- neurons from cyanide-induced apoptosis. *Neuroscience*. 2006;139(2):639-649. doi:10.1016/j.neuroscience.2005.12.047
119. Del Olmo-Aguado S, Manso AG, Osborne NN. Light might directly affect retinal ganglion cell mitochondria to potentially influence function. *Photochem Photobiol*. 2012;88(6):1346-1355. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01120.x
120. Wong-Riley MTTT, Liang HL, Eells JT, et al. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: Role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4761-4771. doi:10.1074/jbc.M409650200
121. Ying R, Liang HL, Whelan HT, Eells JT, Wong-Riley MT. Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP+-induced neurotoxicity. *Brain Res*. 2008;1243:167-173. doi:10.1016/j.brainres.2008.09.057
122. Oron U, Yaakobi T, Oron A, et al. Low-energy laser irradiation reduces formation of scar tissue after myocardial infarction in rats and dogs. *Circulation*. 2001;103(2):296-301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208692>. Accessed May 27, 2019.
123. SIMUNOVIC Z, IVANKOVICH AD, DEPOLO A. Wound Healing of Animal and Human Body Sport and Traffic Accident Injuries Using Low-Level Laser Therapy Treatment: A Randomized Clinical Study of Seventy-Four Patients with Control Group. *J Clin Laser Med Surg*. 2000;18(2):67-73. doi:10.1089/clm.2000.18.67
124. Albarracin R, Eells J, Valter K. Photobiomodulation protects the retina from light-induced photoreceptor degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(6):3582-3592. doi:10.1167/iovs.10-6664
125. Albarracin R, Valter K. 670 nm red light preconditioning supports Müller cell function: Evidence from the white light-induced damage model in the rat retina. *Photochem Photobiol*. 2012;88(6):1418-1427. doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01130.x
126. Rojas JC, Lee J, John JM, Gonzalez-Lima F. Neuroprotective Effects of Near-Infrared Light in an In Vivo Model of Mitochondrial Optic Neuropathy. *J Neurosci*. 2008;28(50):13511-13521. doi:10.1523/JNEUROSCI.3457-08.2008
127. Natoli R, Zhu Y, Valter K, Bisti S, Eells J, Stone J. Gene and noncoding RNA regulation underlying photoreceptor protection: microarray study of dietary antioxidant saffron and photobiomodulation in rat retina. *Mol Vis*. 2010;16:1801-1822. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844572>. Accessed May 27, 2019.
128. Saliba A, Du Y, Liu H, et al. Photobiomodulation mitigates diabetes-induced retinopathy by direct and indirect mechanisms: Evidence from intervention studies in pigmented mice. *PLoS One*. 2015;10(10):1-14. doi:10.1371/journal.pone.0139003
129. Tang J, Du Y, Lee CA, Talahalli R, Eells JT, Kern TS. Low-intensity far-red light inhibits early lesions that contribute to diabetic retinopathy: in vivo and in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2013;54(5):3681-3690. doi:10.1167/iovs.12-11018.P
130. Beirne K, Rozanowska M, Votruba M. No Title. *Mitochondrion*. 2017;36:85-95. doi:10.1016/j.mito.2017.05.002
131. Albarracin R, Natoli R, Rutar M, Valter K, Provis J. 670 nm light mitigates oxygen-induced degeneration in C57BL/6J mouse retina. *BMC Neurosci*. 2013;14(1):125. doi:10.1186/1471-2202-14-125

132. Wu Q, Xuan W, Ando T, et al. Low-Level Laser Therapy for Closed-Head Traumatic Brain Injury in Mice: Effect of Different Wavelengths. *Lasers Surg Med.* 2012;44(3):218-226. doi:10.1002/lsm.22003
133. Ishiguro M, Ikeda K, Tomita K. Effect of near-infrared light-emitting diodes on nerve regeneration. *J Orthop Sci.* 2010;15(2):233-239. doi:10.1007/s00776-009-1438-4
134. Moro C, Torres N, El Massri N, et al. Photobiomodulation preserves behaviour and midbrain dopaminergic cells from MPTP toxicity: evidence from two mouse strains. *BMC Neurosci.* 2013;14(1):40. doi:10.1186/1471-2202-14-40
135. Peoples C, Shaw VE, Stone J, Jeffery G, Baker GE, Mitrofanis J. Survival of Dopaminergic Amacrine Cells after Near-Infrared Light Treatment in MPTP-Treated Mice. *ISRN Neurol.* 2012;2012:850150. doi:10.5402/2012/850150
136. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983;65(1-2):55-63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6606682>. Accessed March 5, 2018.
137. Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H, Tzur A. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* 2012;3(11):e430. doi:10.1038/cddis.2012.171
138. Sliney DH. What is light? The visible spectrum and beyond. *Eye (Lond).* 2016;30(2):222-229. doi:10.1038/eye.2015.252
139. Langhals H. Color Chemistry. Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments. 3rd revised edition. By Heinrich Zollinger. *Angew Chemie Int Ed.* 2004;43(40):5291-5292. doi:10.1002/anie.200385122
140. Nassau K. *The Physics and Chemistry of Color : The Fifteen Causes of Color.* Wiley; 2001. <https://www.wiley.com/en-us/The+Physics+and+Chemistry+of+Color%3A+The+Fifteen+Causes+of+Color%2C+2nd+Edition-p-9780471391067>. Accessed May 29, 2019.
141. Nilapwar SM, Nardelli M, Westerhoff H V., Verma M. Absorption Spectroscopy. In: *Methods in Enzymology.* Vol 500. ; 2011:59-75. doi:10.1016/B978-0-12-385118-5.00004-9
142. ScienceDirect Topics. Light Absorption - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/biochemistry-genetics-and-molecular-biology/light-absorption>. Accessed May 29, 2019.
143. ScienceDirect Topics. Porphyrin - an overview. <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/porphyrin>. Accessed May 29, 2019.
144. Osborne NN, Li G-YY, Ji D, Mortiboys HJ, Jackson S. Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies. *J Neurochem.* 2008;105(5):2013-2028. doi:10.1111/j.1471-4159.2008.05320.x
145. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. An Overview of the Cell Cycle. 2002. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26869/>. Accessed May 29, 2019.
146. Li N, Ragheb K, Lawler G, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem.* 2003;278(10):8516-8525. doi:10.1074/jbc.M210432200

147. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio R, Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res.* 2001;20(5):625-637. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470453>. Accessed August 27, 2018.
148. Torricelli AAM, Santhanam A, Wu J, Singh V, Wilson SE. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Exp Eye Res.* 2016;142:110-118. doi:10.1016/j.exer.2014.09.012
149. Ljubimov A V., Saghizadeh M. No Title. 2015;49:17-45. doi:10.1016/j.preteyeres.2015.07.002
150. Dua HS, Gomes JA, Singh A. Corneal epithelial wound healing. *Br J Ophthalmol.* 1994;78(5):401-408. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8025077>. Accessed August 23, 2018.
151. Bonfiglio V, Camillieri G, Avitabile T, Leggio GM, Drago F. Effects of the COOH-terminal tripeptide alpha-MSH(11-13) on corneal epithelial wound healing: role of nitric oxide. *Exp Eye Res.* 2006;83(6):1366-1372. doi:10.1016/j.exer.2006.07.014
152. Park GS, Kwon NS, Kim YM, Kim JC. The role of nitric oxide in ocular surface diseases. *Korean J Ophthalmol.* 2001;15(2):59. doi:10.3341/kjo.2001.15.2.59
153. Park E-J, Chae J-B, Lyu J, et al. Ambient fine particulate matters induce cell death and inflammatory response by influencing mitochondria function in human corneal epithelial cells. *Environ Res.* 2017;159:595-605. doi:10.1016/j.envres.2017.08.044
154. Tosini G, Ferguson I, Tsubota K. Effects of blue light on the circadian system and eye physiology. *Mol Vis.* 2016;22:61-72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26900325>. Accessed August 23, 2018.
155. Karu TI, Kolyakov SF. Exact Action Spectra for Cellular Responses Relevant to Phototherapy. *Photomed Laser Surg.* 2005;23(4):355-361. doi:10.1089/pho.2005.23.355
156. Osborne NNN, Núñez-Álvarez C, del Olmo-Aguado S. The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglions cells. *Exp Eye Res.* 2014;128:8-14. doi:10.1016/j.exer.2014.08.012
157. Begum R, Powner MB, Hudson N, Hogg C, Jeffery G. Treatment with 670 nm Light Up Regulates Cytochrome C Oxidase Expression and Reduces Inflammation in an Age-Related Macular Degeneration Model. Lewin A, ed. *PLoS One.* 2013;8(2):e57828. doi:10.1371/journal.pone.0057828
158. Kokkinopoulos I, Colman A, Hogg C, Heckenlively J, Jeffery G. Age-related retinal inflammation is reduced by 670 nm light via increased mitochondrial membrane potential. *Neurobiol Aging.* 2013;34(2):602-609. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2012.04.014
159. Eells JT, Gopalakrishnan S, Valter K. Near-Infrared Photobiomodulation in Retinal Injury and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2016;854:437-441. doi:10.1007/978-3-319-17121-0_58
160. Osborne NN, Núñez-Álvarez C, Del Olmo-Aguado S, Merrayo-Lloves J. No Title. *Mitochondrion.* 2017;36:29-35. doi:10.1016/j.mito.2016.11.009
161. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochem Photobiol.* 2018;94(2):199-212. doi:10.1111/php.12864

162. Keszler A, Brandal G, Baumgardt S, et al. Far red/near infrared light-induced protection against cardiac ischemia and reperfusion injury remains intact under diabetic conditions and is independent of nitric oxide synthase. *Front Physiol.* 2014;5:305. doi:10.3389/fphys.2014.00305
163. Lane N. Cell biology: power games. *Nature.* 2006;443(7114):901-903. doi:10.1038/443901a
164. Pastore D, Greco M, Petragallo VA, Passarella S. Increase in. *Biochem Mol Biol Int.* 1994;34(4):817-826. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7866309>. Accessed August 23, 2018.
165. Lee J-B, Kim S-H, Lee S-C, et al. Blue light-induced oxidative stress in human corneal epithelial cells: protective effects of ethanol extracts of various medicinal plant mixtures. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2014;55(7):4119-4127. doi:10.1167/iovs.13-13441
166. Marek V, Mélik-Parsadaniantz S, Villette T, et al. Blue light phototoxicity toward human corneal and conjunctival epithelial cells in basal and hyperosmolar conditions. *Free Radic Biol Med.* 2018;126:27-40. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.012
167. Kokkinopoulos I. 670nm LED ameliorates inflammation in the CFH^{-/-} mouse neural retina. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2013;122:24-31. doi:10.1016/j.jphotobiol.2013.03.003
168. Stapleton F, Alves M, Bunya VY, et al. TFOS DEWS II Epidemiology Report. *Ocul Surf.* 2017;15(3):334-365. doi:10.1016/j.jtos.2017.05.003
169. Wade M. Symptoms of Dry Eye Disease. Discovery Eye Foundation. <https://discoveryeye.org/symptoms-of-dry-eye-disease/>. Published 2015. Accessed August 27, 2018.
170. Safiulina D, Veksler V, Zharkovsky A, Kaasik A. Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *J Cell Physiol.* 2006;206(2):347-353. doi:10.1002/jcp.20476
171. Leary SC, Hill BC, Lyons CN, et al. Chronic Treatment with Azide *in Situ* Leads to an Irreversible Loss of Cytochrome cOxidase Activity via Holoenzyme Dissociation. *J Biol Chem.* 2002;277(13):11321-11328. doi:10.1074/jbc.M112303200
172. Bennett MC, Mlady GW, Kwon YH, Rose GM. Chronic *in vivo* sodium azide infusion induces selective and stable inhibition of cytochrome c oxidase. *J Neurochem.* 1996;66(6):2606-2611. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8632188>. Accessed August 28, 2018.
173. Qamirani E, Razavi HM, Wu X, Davis MJ, Kuo L, Hein TW. Sodium azide dilates coronary arterioles via activation of inward rectifier K⁺ channels and Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2006;290(4):H1617--23. doi:10.1152/ajpheart.00746.2005
174. Marino S, Marani L, Nazzaro C, Beani L, Siniscalchi A. Mechanisms of sodium azide-induced changes in intracellular calcium concentration in rat primary cortical neurons. *Neurotoxicology.* 2007;28(3):622-629. doi:10.1016/j.neuro.2007.01.005
175. Núñez-Álvarez C, Del Olmo-Aguado S, Merayo-Llodes J, Osborne NN. Near infra-red light attenuates corneal endothelial cell dysfunction *in situ* and *in vitro*. *Exp Eye Res.* 2017;161:106-115. doi:10.1016/j.exer.2017.06.008
176. del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Osborne NNN. Blue Light Action on Mitochondria

- Leads to Cell Death by Necroptosis. *Neurochem Res.* 2016;41(9):2324-2335. doi:10.1007/s11064-016-1946-5
177. Amersi F, Buelow R, Kato H, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest.* 1999;104(11):1631-1639. doi:10.1172/JCI7903
178. Ursu ON, Sauter M, Ettischer N, Kandolf R, Klingel K. Heme oxygenase-1 mediates oxidative stress and apoptosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Cell Physiol Biochem.* 2014;33(1):52-66. doi:10.1159/000356649
179. Balogun E, Hoque M, Gong P, et al. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J.* 2003;371(Pt 3):887-895. doi:10.1042/BJ20021619
180. Dai C, Li B, Zhou Y, et al. Curcumin attenuates quinocetone induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF-kB pathway in human hepatocyte L02 cells. *Food Chem Toxicol.* 2016;95:52-63. doi:10.1016/j.fct.2016.06.025
181. He M, Pan H, Chang RC-C, So K-F, Brecha NC, Pu M. Activation of the Nrf2/HO-1 Antioxidant Pathway Contributes to the Protective Effects of Lycium Barbarum Polysaccharides in the Rodent Retina after Ischemia-Reperfusion-Induced Damage. Gallyas Jr. F, ed. *PLoS One.* 2014;9(1):e84800. doi:10.1371/journal.pone.0084800
182. Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, Lorenzo HK, Susin SA. AIF-mediated caspase-independent necroptosis: A new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life.* 2011;63(4):221-232. doi:10.1002/iub.432
183. Polster BM. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a “complex” problem. *Neurochem Int.* 2013;62(5):695-702. doi:10.1016/j.neuint.2012.12.002
184. Sosna J, Voigt S, Mathieu S, et al. TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci.* 2014;71(2):331-348. doi:10.1007/s00018-013-1381-6
185. Artus C, Boujrad H, Bouharrou AA, et al. AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J.* 2010;29(9):1585-1599. doi:10.1038/emboj.2010.43
186. Hanus J, Anderson C, Wang S. RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. *Ageing Res Rev.* 2015;24(Pt B):286-298. doi:10.1016/j.arr.2015.09.002
187. Karu TI, Pyatibrat L V., Afanasyeva NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol.* 2004;80(2):366-372. doi:10.1562/2004-03-25-RA-123
188. Cuadrado A, Nebreda AR. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010;429(3):403-417. doi:10.1042/BJ20100323
189. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal.* 2000;12(1):1-13. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676842>.
190. Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J.* 2000;351(Pt 1):95-105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10998351>.
191. Kuse Y, Ogawa K, Tsuruma K, Shimazawa M, Hara H. Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci Rep.*

- 2015;4(1):5223. doi:10.1038/srep05223
192. Joyce NC. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp Eye Res.* 2005;81(6):629-638. doi:10.1016/J.EXER.2005.06.012
193. Senoo T, Joyce NC. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(3):660-667. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10711678>. Accessed May 27, 2019.
194. Wilson SE, Walker JW, Chwang EL, He YG. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1993;34(8):2544-2561. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392040>. Accessed May 27, 2019.
195. Lim KS. Corneal endothelial cell damage from glaucoma drainage device materials. *Cornea.* 2003;22(4):352-354. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12792479>. Accessed May 27, 2019.
196. Liu T, Zhang J, Sun D, et al. Comparative study of corneal endothelial cell damage after femtosecond laser assisted deep stromal dissection. *Biomed Res Int.* 2014;2014:731565. doi:10.1155/2014/731565
197. Murano N, Ishizaki M, Sato S, Fukuda Y, Takahashi H. Corneal Endothelial Cell Damage by Free Radicals Associated With Ultrasound Oscillation. *Arch Ophthalmol.* 2008;126(6):816. doi:10.1001/archophth.126.6.816
198. Hayashi K, Hayashi H, Nakao F, Hayashi F. Risk factors for corneal endothelial injury during phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* 1996;22(8):1079-1084. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8915805>. Accessed May 27, 2019.
199. Kaufman E, Katz JI. Endothelial damage from intraocular lens insertion. *Invest Ophthalmol.* 1976;15(12):996-1000. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/992965>. Accessed May 27, 2019.
200. Bigar F, Witmer R. Corneal endothelial changes in primary acute angle-closure glaucoma. *Ophthalmology.* 1982;89(6):596-599. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7122040>. Accessed May 27, 2019.
201. Setälä K. Corneal endothelial cell density after an attack of acute glaucoma. *Acta Ophthalmol.* 1979;57(6):1004-1013. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/545996>. Accessed May 27, 2019.
202. Ytteborg J, Dohlman CH. Corneal edema and intraocular pressure. II. Clinical results. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960).* 1965;74(4):477-484. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5294510>. Accessed May 27, 2019.
203. Ravalico G, Tognetto D, Palomba MA, Lovisato A, Baccara F. Corneal endothelial function after extracapsular cataract extraction and phacoemulsification. *J Cataract Refract Surg.* 1997;23(7):1000-1005. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9379368>. Accessed May 27, 2019.
204. Ho JW, Afshari NA. Advances in cataract surgery. *Curr Opin Ophthalmol.* 2015;26(1):22-27. doi:10.1097/ICU.000000000000121
205. Rubowitz A, Assia EI, Rosner M, Topaz M. Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2003;44(5):1866-1870. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12714617>. Accessed

- May 27, 2019.
206. Okumura N, Koizumi N, Kay EP, et al. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2013;54(4):2493-2502. doi:10.1167/iovs.12-11320
207. Koizumi N, Okumura N, Ueno M, Nakagawa H, Hamuro J, Kinoshita S. Rho-Associated Kinase Inhibitor Eye Drop Treatment as a Possible Medical Treatment for Fuchs Corneal Dystrophy. *Cornea.* 2013;32(8):1167-1170. doi:10.1097/ICO.0b013e318285475d
208. Okumura N, Koizumi N, Ueno M, et al. ROCK Inhibitor Converts Corneal Endothelial Cells into a Phenotype Capable of Regenerating In Vivo Endothelial Tissue. *Am J Pathol.* 2012;181(1):268-277. doi:10.1016/j.ajpath.2012.03.033
209. Okumura N, Okazaki Y, Inoue R, et al. Effect of the Rho-Associated Kinase Inhibitor Eye Drop (Ripasudil) on Corneal Endothelial Wound Healing. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2016;57(3):1284. doi:10.1167/iovs.15-18586
210. Mimura T, Yamagami S, Amano S. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. *Prog Retin Eye Res.* 2013;35:1-17. doi:10.1016/j.preteyeres.2013.01.003
211. Edelhauser HF. The Balance between Corneal Transparency and Edema The Proctor Lecture. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2006;47(5):1755. doi:10.1167/iovs.05-1139
212. Greiner MA, Burckart KA, Wagoner MD, et al. Regional Assessment of Energy-Producing Metabolic Activity in the Endothelium of Donor Corneas. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2015;56(5):2803. doi:10.1167/iovs.15-16442
213. Jurkunas U V., Bitar MS, Funaki T, Azizi B. Evidence of Oxidative Stress in the Pathogenesis of Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy. *Am J Pathol.* 2010;177(5):2278-2289. doi:10.2353/ajpath.2010.100279
214. Ramey NA, Park CY, Gehlbach PL, Chuck RS. Imaging Mitochondria in Living Corneal Endothelial Cells Using Autofluorescence Microscopy. *Photochem Photobiol.* 2007;83(6):1325-1329. doi:10.1111/j.1751-1097.2007.00162.x
215. del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Osborne NN. Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death in situ. *Acta Ophthalmol.* 2016;94(6). doi:10.1111/aos.12996
216. Osborne NN, Núñez-Álvarez C, Joglar B, del Olmo-Aguado S. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur J Pharmacol.* 2016;787. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.032
217. Eells JT, Wong-Riley MTT, VerHoeve J, et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion.* 2004;4(5-6 SPEC. ISS.):559-567. doi:10.1016/j.mito.2004.07.033
218. Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M, Hamblin MR. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med.* 2013;44(6):490-499. doi:10.1002/lsm.22045.Type
219. Eells JT, Henry MM, Summerfelt P, et al. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(6):3439-3444. doi:10.1073/pnas.0534746100
220. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation on

- cells, J. *Photochem Photobiol B Biol.* 1999;49:1-17. doi:10.1016/S1011-1344(98)00219-X
221. Gkotsi D, Begum R, Salt T, et al. Recharging mitochondrial batteries in old eyes. Near infra-red increases ATP. *Exp Eye Res.* 2014;122:50-53. doi:10.1016/j.exer.2014.02.023
222. Lim W, Kim J-H, Gook E, et al. Inhibition of mitochondria-dependent apoptosis by 635-nm irradiation in sodium nitroprusside-treated SH-SY5Y cells. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(6):850-857. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.023
223. Poyton RO, Ball KA. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discov Med.* 2011;11(57):154-159. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21356170>. Accessed May 27, 2019.
224. Schwartzkopff J, Bredow L, Mahlenbrey S, Boehringer D, Reinhard T. Regeneration of corneal endothelium following complete endothelial cell loss in rat keratoplasty. *Mol Vis.* 2010;16:2368-2375. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21139971>. Accessed May 27, 2019.
225. Bredow L, Schwartzkopff J, Reinhard T. Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy. *Mol Vis.* 2014;20:683-690. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24883013>. Accessed May 27, 2019.
226. Dhande OS, Huberman AD. Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing. *Curr Opin Neurobiol.* 2014;24(1):133-142. doi:10.1016/j.conb.2013.08.006
227. Martersteck EM, Hirokawa KE, Evarts M, et al. Diverse Central Projection Patterns of Retinal Ganglion Cells. *Cell Rep.* 2017;18(8):2058-2072. doi:10.1016/j.celrep.2017.01.075
228. Osborne NN, Melena J, Chidlow G, Wood JP. A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma. *Br J Ophthalmol.* 2001;85(10):1252-1259. doi:10.1136/bjo.85.10.1252
229. Quigley HA. Understanding Glaucomatous Optic Neuropathy: The Synergy Between Clinical Observation and Investigation. *Annu Rev Vis Sci.* 2016;2(1):235-254. doi:10.1146/annurev-vision-111815-114417
230. Sharif N. Glaucomatous optic neuropathy treatment options: the promise of novel therapeutics, techniques and tools to help preserve vision. *Neural Regen Res.* 2018;13(7):1145. doi:10.4103/1673-5374.235017
231. Vidal-Sanz M, Salinas-Navarro M, Nadal-Nicolás FM, et al. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog Retin Eye Res.* 2012;31(1):1-27. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.08.001
232. Chidlow G, Wood JPMM, Casson RJ. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs.* 2007;67(5):725-759. doi:10.2165/00003495-200767050-00006
233. Doozandeh A, Yazdani S. Neuroprotection in glaucoma. *J Ophthalmic Vis Res.* 2016;11(2):209-220. doi:10.4103/2008-322X.183923
234. Hanumunthadu D, Dehabadi MH, Cordeiro MF. Neuroprotection in glaucoma: current and emerging approaches. *Expert Rev Ophthalmol.* 2014;9(2):109-123. doi:10.1586/17469899.2014.892415
235. Osborne NN, Álvarez CN, del Olmo Aguado S. Targeting mitochondrial dysfunction as in

- aging and glaucoma. *Drug Discov Today*. 2014;19(10):1613-1622.
doi:10.1016/j.drudis.2014.05.010
236. Sena DF, Lindsley K. Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults. *Cochrane Database Syst Rev*. 2017;1:CD006539. doi:10.1002/14651858.CD006539.pub4
237. Chan DC. No Title. *Cell*. 2006;125(7). doi:10.1016/j.cell.2006.06.010
238. Schon EA, Manfredi G. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J Clin Invest*. 2003;111(3):303-312. doi:10.1172/JCI200317741.Over
239. Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Crowston JG, Goldberg I. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2012;40(4):341-349. doi:10.1111/j.1442-9071.2012.02773.x
240. Flammer J, Org S, Costa VP, et al. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog Retin Eye Res*. 2002;21(4):359-393. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150988>. Accessed October 23, 2018.
241. Osborne NN. No Title. 2010;90(6). doi:10.1016/j.exer.2010.03.008
242. Pache M, Flammer J. A Sick Eye in a Sick Body? Systemic Findings in Patients with Primary Open-angle Glaucoma. *Surv Ophthalmol*. 2006;51(3):179-212. doi:10.1016/j.survophthal.2006.02.008
243. Weinreb RN, Khaw PT. Primary open-angle glaucoma. *Lancet*. 2004;363(9422):1711-1720. doi:10.1016/S0140-6736(04)16257-0
244. Boveris A, Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life*. 2008;60(5):308-314. doi:10.1002/iub.46
245. Dietrich MO, Horvath TL. The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflügers Arch - Eur J Physiol*. 2010;459(2):269-275. doi:10.1007/s00424-009-0729-0
246. Harman D. The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(11):7124-7128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6947277>. Accessed February 9, 2018.
247. Bell J, Hall C. Hemoproteins. In: *Spectroscopy in Biochemistry*. Boca Raton, FL: CRC Press,; 1981:42-46.
248. García J, Silva E. Flavin-sensitized photooxidation of amino acids present in a parenteral nutrition infusate: Protection by ascorbic acid. *J Nutr Biochem*. 1997;8(6):341-345. doi:10.1016/S0955-2863(97)00024-7
249. Ortiz de Montellano PR. The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450. *Drug Metab Dispos*. 1995;23(11):1181-1187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8591716>. Accessed October 23, 2018.
250. Bristow EA, Griffiths PG, Andrews RM, Johnson M a, Turnbull DM. The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch Ophthalmol*. 2002;120(6):791-796. doi:10.1001/archopht.120.6.791
251. Carelli V, Ross-Cisneros FN, Sadun AA. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(1):53-89. doi:10.1016/j.preteyeres.2003.10.003
252. Wang L, Dong J, Cull G, Fortune B, Cioffi GA. Varicosities of intraretinal ganglion cell axons in human and nonhuman primates. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(1):2-9. doi:10.1167/iovs.02-0333

253. del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Osborne NNN. Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death in situ. *Acta Ophthalmol.* 2016;94(6):e481-e491. doi:10.1111/aos.12996
254. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1999;49(1):1-17. doi:10.1016/S1011-1344(98)00219-X
255. Osborne NNN, Núñez-Álvarez C, Joglar B, del Olmo-Aguado S. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur J Pharmacol.* 2016;787:127-133. doi:10.1016/j.ejphar.2016.04.032
256. Ernst C, Christie BR. Isolectin-IB4 as a vascular stain for the study of adult neurogenesis. *J Neurosci Methods.* 2006;150(1):138-142. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.06.018
257. Gueven N, Nadikudi M, Daniel A, Chhetri J. Targeting mitochondrial function to treat optic neuropathy. *Mitochondrion.* 2017;36:7-14. doi:10.1016/j.mito.2016.07.013
258. Hondur G, Göktas E, Yang X, et al. Oxidative Stress-Related Molecular Biomarker Candidates for Glaucoma. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2017;58(10):4078. doi:10.1167/iovs.17-22242
259. Kamel K, Farrell M, O'Brien C. Mitochondrial dysfunction in ocular disease: Focus on glaucoma. *Mitochondrion.* 2017;35:44-53. doi:10.1016/j.mito.2017.05.004
260. Lee MJ, Chien WL, Lee TR, Hung SY, Kang KH, Fu WM. Impairment of oxidative stress-induced heme oxygenase-1 expression by the defect of Parkinson-related gene of PINK1. *J Neurochem.* 2011;117(4):643-653. doi:10.1111/j.1471-4159.2011.07229.x
261. Lee S, Sheck L, Crowston JG, et al. Impaired complex-I-Linked respiration and ATP synthesis in primary open-angle glaucoma patient lymphoblasts. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2012;53(4):2431-2437. doi:10.1167/iovs.12-9596
262. Moreira PI, Santos MS, Oliveira CR. Alzheimer's Disease: A Lesson from Mitochondrial Dysfunction. *Antioxid Redox Signal.* 2007;9(10):1621-1630. doi:10.1089/ars.2007.1703
263. Moreira PI, Zhu X, Wang X, et al. Mitochondria: A therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis.* 2010;1802(1):212-220. doi:10.1016/j.bbadis.2009.10.007
264. Albers DS, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *J Neural Transm Suppl.* 2000;59:133-154. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961426>. Accessed October 29, 2018.
265. Caprioli J, Coleman AL, Blood Flow in Glaucoma Discussion. Blood Pressure, Perfusion Pressure, and Glaucoma. *Am J Ophthalmol.* 2010;149(5):704-712. doi:10.1016/j.ajo.2010.01.018
266. Hayreh SS. Blood flow in the optic nerve head and factors that may influence it. *Prog Retin Eye Res.* 2001;20(5):595-624. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11470452>. Accessed October 29, 2018.
267. Leske MC, Wu S-Y, Hennis A, Honkanen R, Nemesure B, BESs Study Group. Risk Factors for Incident Open-angle Glaucoma. *Ophthalmology.* 2008;115(1):85-93. doi:10.1016/j.ophtha.2007.03.017
268. Andrews RM, Griffiths PG, Johnson MA, Turnbull DM. Histochemical localisation of mitochondrial enzyme activity in human optic nerve and retina. *Br J Ophthalmol.*

- 1999;83(2):231-235. doi:10.1136/bjo.83.2.231
269. O'Sullivan ML, Puñal VM, Kerstein PC, et al. Astrocytes follow ganglion cell axons to establish an angiogenic template during retinal development. *Glia*. 2017;65(10):1697-1716. doi:10.1002/glia.23189
270. Himori N, Maruyama K, Yamamoto K, et al. Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res*. 2014;92(9):1134-1142. doi:10.1002/jnr.23398
271. Schipper HM, Chertkow H, Mehindate K, Frankel D, Melmed C, Bergman H. Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD. *Neurology*. 2000;54(6):1297-1304. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10746601>.
272. Iwamoto K, Birkholz P, Schipper A, Mata D, Linn DM, Linn CL. A Nicotinic Acetylcholine Receptor Agonist Prevents Loss of Retinal Ganglion Cells in a Glaucoma Model. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2014;55(2):1078. doi:10.1167/iovs.13-12688
273. Lee D, Shim MS, Kim K-Y, et al. Coenzyme Q10 Inhibits Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress–Mediated Mitochondrial Alteration in a Mouse Model of Glaucoma. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2014;55(2):993. doi:10.1167/iovs.13-12564
274. Nadal-Nicola's FM, Jimenez-Lo'pez M, Sobrado-Calvo P, et al. Brn3a as a Marker of Retinal Ganglion Cells: Qualitative and Quantitative Time Course Studies in Naïve and Optic Nerve–Injured Retinas. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2009;50(8):3860. doi:10.1167/iovs.08-3267
275. Danias J, Shen F, Goldblum D, et al. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2002;43(3):587-594. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11867571>.
276. Chidlow G, Ebnetter A, Wood JPM, Casson RJ. The optic nerve head is the site of axonal transport disruption, axonal cytoskeleton damage and putative axonal regeneration failure in a rat model of glaucoma. *Acta Neuropathol*. 2011;121(6):737-751. doi:10.1007/s00401-011-0807-1
277. Hernandez M, Rodriguez FD, Sharma SC, Vecino E. Immunohistochemical changes in rat retinas at various time periods of elevated intraocular pressure. *Mol Vis*. 2009;15(November 2008):2696-2709. doi:286 [pii]
278. Osborne NN, Casson RJ, Wood JPM, Chidlow G, Graham M, Melena J. Retinal ischemia: Mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(1):91-147. doi:10.1016/j.preteyeres.2003.12.001
279. Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JPM, Casson RJ, Melena J. Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye*. 2004;18(11):1075-1084. doi:10.1038/sj.eye.6701588
280. Osborne NN, Larsen AK. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem Int*. 1996;29(3):263-270. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8885285>. Accessed October 29, 2018.
281. Checchin D, Sennlaub F, Levavasseur E, Leduc M, Chemtob S. Potential Role of Microglia in Retinal Blood Vessel Formation. *Investig Ophthalmology Vis Sci*. 2006;47(8):3595. doi:10.1167/iovs.05-1522
282. Gariano RF, Sage EH, Kaplan HJ, Hendrickson AE. Development of astrocytes and their

- relation to blood vessels in fetal monkey retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1996;37(12):2367-2375. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8933753>. Accessed October 29, 2018.
283. Zhao X, Eyo UB, Murugan M, Wu L-J. Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology. *Dev Neurobiol*. 2018;78(6):604-617. doi:10.1002/dneu.22576
284. Garhöfer G, Zawinka C, Resch H, Huemer KH, Dorner GT, Schmetterer L. Diffuse luminance flicker increases blood flow in major retinal arteries and veins. *Vision Res*. 2004;44(8):833-838. doi:10.1016/j.visres.2003.11.013
285. Noonan JE, Lamoureux EL, Sarossy M. Neuronal activity-dependent regulation of retinal blood flow. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2015;43(7):673-682. doi:10.1111/ceo.12530
286. Huster D, Reichenbach A, Reichelt W. The glutathione content of retinal Müller (glial) cells: effect of pathological conditions. *Neurochem Int*. 2000;36(4-5):461-469. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10733014>. Accessed May 28, 2019.
287. Schütte M, Werner P. Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett*. 1998;246(1):53-56. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9622206>. Accessed May 28, 2019.
288. Schulz JB, Lindenau J, Seyfried J, Dichgans J. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration. *Eur J Biochem*. 2000;267(16):4904-4911. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10931172>. Accessed May 28, 2019.
289. Kern TS, Barber AJ. Retinal ganglion cells in diabetes. *J Physiol*. 2008;586(Pt 18):4401. doi:10.1113/JPHYSIOL.2008.156695
290. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol*. 45(2):115-134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11033038>. Accessed February 9, 2018.
291. Klein BEK, Klein R. Lifestyle Exposures and Eye Diseases in Adults. *Am J Ophthalmol*. 2007;144(6):961-969.e1. doi:10.1016/j.ajo.2007.08.016
292. Sui G-Y, Liu G-C, Liu G-Y, et al. Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol*. 2013;97(4):389-394. doi:10.1136/bjophthalmol-2012-302281
293. Algvere P V, Marshall J, Seregard S. Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol Scand*. 2006;84(1):4-15. doi:10.1111/j.1600-0420.2005.00627.x
294. Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, et al. Light history and age-related changes in retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1998;39(7):1107-1116. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9620069>. Accessed February 9, 2018.
295. Gorn RA, Kuwabara T. Retinal damage by visible light. A physiologic study. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1967;77(1):115-118. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6015707>. Accessed February 9, 2018.
296. Grignolo A, Orzalesi N, Castellazzo R, Vittone P. Retinal Damage by Visible Light in Albino Rats. *Ophthalmologica*. 1969;157(1):43-59. doi:10.1159/000305619
297. Kuwabara T, Gorn RA. Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)*. 1968;79(1):69-78.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5635094>. Accessed February 9, 2018.
298. Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S. Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol*. 1966;5(5):450-473. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5929286>. Accessed February 9, 2018.
299. O'Steen WK, Anderson K V. Photoreceptor degeneration after exposure of rats to incandescent illumination. *Z Zellforsch Mikrosk Anat*. 1972;127(3):306-313. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5029819>. Accessed February 9, 2018.
300. Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res*. 2010;29(2):113-134. doi:10.1016/j.preteyeres.2009.11.004
301. Noell WK. Effects of environmental lighting and dietary vitamin A on the vulnerability of the retina to light damage. *Photochem Photobiol*. 1979;29(4):717-723. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/451011>. Accessed March 6, 2018.
302. Andley UP, Chylack LT. Recent studies on photodamage to the eye with special reference to clinical phototherapeutic procedures. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 1990;7(3):98-105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2081122>. Accessed March 6, 2018.
303. Feigl B. Age-related maculopathy - Linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis. *Prog Retin Eye Res*. 2009;28(1):63-86. doi:10.1016/j.preteyeres.2008.11.004
304. Sliney DH. Ocular injury due to light toxicity. *Int Ophthalmol Clin*. 1988;28(3):246-250. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3042660>. Accessed February 9, 2018.
305. Rózanowska M, Sarna T. Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited. *Photochem Photobiol*. 81(6):1305-1330. doi:10.1562/2004-11-13-IR-371
306. Boulton M, Docchio F, Dayhaw-Barker P, Ramponi R, Cubeddu R. Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. *Vision Res*. 1990;30(9):1291-1303. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2219746>. Accessed February 9, 2018.
307. Feeney-Burns L, Hilderbrand ES, Eldridge S. Aging human RPE: Morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1984;25(2):195-200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6698741>. Accessed February 9, 2018.
308. Boulton M, Rózanowska M, Rózanowski B. Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol B*. 2001;64(2-3):144-161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11744401>. Accessed February 9, 2018.
309. Margrain TH, Boulton M, Marshall J, Sliney DH. Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Prog Retin Eye Res*. 2004;23(5):523-531. doi:10.1016/j.preteyeres.2004.05.001
310. Sarna T. Properties and function of the ocular melanin--a photobiophysical view. *J Photochem Photobiol B*. 1992;12(3):215-258. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1635010>. Accessed February 9, 2018.
311. Chen Q, Chai Y-C, Mazumder S, et al. The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ*. 2003;10(3):323-334.

doi:10.1038/sj.cdd.4401148

312. Egorov SY, Krasnovsky AA, Bashtanov MY, Mironov EA, Ludnikova TA, Kritsky MS. Photosensitization of singlet oxygen formation by pterins and flavins. Time-resolved studies of oxygen phosphorescence under laser excitation. *Biochemistry (Mosc)*. 1999;64(10):1117-1121. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10561557>. Accessed February 15, 2018.
313. Jung DW, Apel L, Brierley GP. Matrix free Mg²⁺ changes with metabolic state in isolated heart mitochondria. *Biochemistry*. 1990;29(17):4121-4128. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2361136>. Accessed February 15, 2018.
314. King A, Gottlieb E, Brooks DG, Murphy MP, Dunaief JL. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol*. 2004;79(5):470-475. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15191057>. Accessed February 15, 2018.
315. Karu T. Is It Time to Consider Photobiomodulation As a Drug Equivalent? *Photomed Laser Surg*. 2013;31(5):189-191. doi:10.1089/pho.2013.3510
316. Merry GF, Munk MR, Dotson RS, Walker MG, Devenyi RG. Photobiomodulation reduces drusen volume and improves visual acuity and contrast sensitivity in dry age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol*. 2017;95(4):e270--e277. doi:10.1111/aos.13354
317. Fitzgerald M, Hodgetts S, Van Den Heuvel C, et al. Red/near-infrared irradiation therapy for treatment of central nervous system injuries and disorders. *Rev Neurosci*. 2013;24(2):205-226. doi:10.1515/revneuro-2012-0086
318. Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR, Hjelmeland LM. ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res*. 1996;62(2):155-169. doi:10.1006/exer.1996.0020
319. Qin S, Rodrigues GA. Differential roles of AMPK α 1 and AMPK α 2 in regulating 4-HNE-induced RPE cell death and permeability. *Exp Eye Res*. 2010;91(6):818-824. doi:10.1016/j.exer.2010.10.007
320. Beckman KB, Ames BN. Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci*. 1998;854:118-127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9928425>.
321. Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res*. 2017;60:201-218. doi:10.1016/j.preteyeres.2017.03.002
322. Gouras P, Ivert L, Neuringer M, Nagasaki T. No Title. 2016;254(6). doi:10.1007/s00417-016-3342-x
323. Lin H, Xu H, Liang F-Q, et al. Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52(6):3521-3529. doi:10.1167/iovs.10-6163
324. Yacout SM, Gaillard ER. The Anthocyanins, Oenin and Callistephin, Protect RPE Cells Against Oxidative Stress. *Photochem Photobiol*. 2017;93(2):590-599. doi:10.1111/php.12683
325. Jarrett SG, Boulton ME. Poly(ADP-ribose) polymerase offers protection against oxidative and alkylation damage to the nuclear and mitochondrial genomes of the retinal

- pigment epithelium. *Ophthalmic Res.* 2007;39(4):213-223. doi:10.1159/000104683
326. SanGiovanni JP, Arking DE, Iyengar SK, et al. Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration. Batzer MA, ed. *PLoS One.* 2009;4(5):e5508. doi:10.1371/journal.pone.0005508
327. Canter JA, Haas DW, Kallianpur AR, et al. The mitochondrial pharmacogenomics of haplogroup T: MTND2*LHON4917G and antiretroviral therapy-associated peripheral neuropathy. *Pharmacogenomics J.* 2008;8(1):71-77. doi:10.1038/sj.tpj.6500470
328. Feher J, Kovacs I, Artico M, Cavallotti C, Papale A, Balacco Gabrieli C. Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiol Aging.* 2006;27(7):983-993. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.012
329. Karunadharma PP, Nordgaard CL, Olsen TW, Ferrington DA. Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for age-related macular degeneration. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2010;51(11):5470-5479. doi:10.1167/iovs.10-5429
330. Pang J, Seko Y, Tokoro T, Ichinose S, Yamamoto H. Observation of ultrastructural changes in cultured retinal pigment epithelium following exposure to blue light. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 1998;236(9):696-701. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9782431>.
331. Chen XY, Xiong YQ, Lipson ED. Action spectrum for subliminal light control of adaptation in *Phycomyces* phototropism. *Photochem Photobiol.* 1993;58(3):425-431. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8234478>.
332. Roehlecke C, Schaller A, Knels L, Funk RHW. The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells. *Mol Vis.* 2009;15:1929-1938. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19784391>.
333. Youn H-Y, Chou BR, Cullen AP, Sivak JG. Effects of 400 nm, 420 nm, and 435.8 nm radiations on cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Photochem Photobiol B.* 2009;95(1):64-70. doi:10.1016/j.jphotobiol.2009.01.001
334. Heiskanen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma J, Nieminen AL. Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem.* 1999;274(9):5654-5658. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10026183>.
335. Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2007;47:143-183. doi:10.1146/annurev.pharmtox.47.120505.105122
336. Safiulina D, Peet N, Seppet E, Zharkovsky A, Kaasik A. Dehydroepiandrosterone inhibits complex I of the mitochondrial respiratory chain and is neurotoxic in vitro and in vivo at high concentrations. *Toxicol Sci.* 2006;93(2):348-356. doi:10.1093/toxsci/kfl064
337. Balogun E, Foresti R, Green CJ, Motterlini R. Changes in temperature modulate heme oxygenase-1 induction by curcumin in renal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;308(4):950-955. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12927811>.
338. Karu TI, Pyatibrat L V, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* 2004;3(2):211-216. doi:10.1039/b306126d
339. Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y, Xiao W. Integration of tight junctions and claudins with the

- barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 2011;30(5):296-323. doi:10.1016/j.preteyeres.2011.06.002
340. Peng S, Gan G, Rao VS, Adelman RA, Rizzolo LJ. Effects of Proinflammatory Cytokines on the Claudin-19 Rich Tight Junctions of Human Retinal Pigment Epithelium. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2012;53(8):5016. doi:10.1167/iovs.11-8311
341. Perez VL, Caspi RR. Immune mechanisms in inflammatory and degenerative eye disease. *Trends Immunol.* 2015;36(6):354-363. doi:10.1016/j.it.2015.04.003
342. Yang P, Peairs JJ, Tano R, Zhang N, Tyrell J, Jaffe GJ. Caspase-8–Mediated Apoptosis in Human RPE Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2007;48(7):3341. doi:10.1167/iovs.06-1340
343. Ivandic BT, Ivandic T. Low-Level Laser Therapy Improves Vision in Patients with Age-Related Macular Degeneration. *Photomed Laser Surg.* 2008;26(3):241-245. doi:10.1089/pho.2007.2132
344. Tang Z-H, Wang L, Zeng F, Zhang K. Human genetics of diabetic retinopathy. *J Endocrinol Invest.* 2014;37(12):1165-1174. doi:10.1007/s40618-014-0172-8
345. Klein R, Lee KE, Maynard JD, Meuer SM, Gangnon RE, Klein BEK. Skin Intrinsic Fluorescence and Age-Related Macular Degeneration: The Beaver Dam Eye Study. *Investig Ophthalmology Vis Sci.* 2017;58(14):6328. doi:10.1167/iovs.17-22382
346. Sliney D. Exposure Geometry and Spectral Environment Determine Photobiological Effects on the Human Eye. *Photochem Photobiol.* 2005;81(3):483-489. doi:10.1562/2005-02-14-RA-439
347. The College of Optometrists. Sir William Crookes Anti-Glare Glass Co Ltd; Melson Wingate Ltd. http://museyeum.org/detail.php?name_title=Crookes&module=objects&type=advance&kv=7151&record=18. Accessed May 28, 2019.
348. The College of Optometrists. The Ultra-Violet Limit of Chance's "Crookes" Glasses Compared with White Spectacle Glass and Some Common Tinted Glasses. http://museyeum.org/detail.php?name_title=Crookes&module=objects&type=advance&kv=20397&record=21. Accessed May 28, 2019.
349. Colegio de Optometristas de Andalucía. Categoría de los filtros o lentes solares. <https://www.tuoptometrista.com/proteccion-solar/requisitos-que-deben-cumplir-unas-gafas-de-sol/>. Accessed May 28, 2019.
350. Knoll HA. A brief history of ophthalmic lenses. *J Am Optom Assoc.* 1967;38(11):946-948. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6063671>. Accessed February 12, 2019.
351. Tanito M, Kaidzu S, Anderson RE. Protective effects of soft acrylic yellow filter against blue light-induced retinal damage in rats. *Exp Eye Res.* 2006;83(6):1493-1504. doi:10.1016/j.exer.2006.08.006
352. Wohlfart C, Tschuschnig K, Fellner P, et al. Visuelle Funktion mit Blaulichtfilter-IOL. *Klin Monbl Augenheilkd.* 2007;224(1):23-27. doi:10.1055/s-2006-927275
353. Ichikawa K, CHUKYO study investigators. Changes in blood pressure and sleep duration in patients with blue light-blocking/yellow-tinted intraocular lens (CHUKYO study). *Hypertens Res.* 2014;37(7):659-664. doi:10.1038/hr.2014.50
354. Pescosolido N, Barbato A, Giannotti R, Komaiha C, Lenarduzzi F. Age-related changes in

- the kinetics of human lenses: prevention of the cataract. *Int J Ophthalmol*. 2016;9(10):1506-1517. doi:10.18240/ijo.2016.10.23
355. Kara-Junior N, Espindola RF, Gomes BAF, Ventura B, Smadja D, Santhiago MR. Effects of blue light-filtering intraocular lenses on the macula, contrast sensitivity, and color vision after a long-term follow-up. *J Cataract Refract Surg*. 2011;37(12):2115-2119. doi:10.1016/j.jcrs.2011.06.024
356. Díez-Ajenjo M, García-Domene M, Peris-Martínez C, Artigas J, Felipe A. Effect of the color of the intraocular lens on optical and visual quality. *Indian J Ophthalmol*. 2014;62(11):1064. doi:10.4103/0301-4738.146741
357. Schmidinger G, Menapace R, Pieh S. Intraindividual comparison of color contrast sensitivity in patients with clear and blue-light-filtering intraocular lenses. *J Cataract Refract Surg*. 2008;34(5):769-773. doi:10.1016/j.jcrs.2007.12.034
358. Huang X, Han S, Huang W, Liu X. Enhancing solar cell efficiency: the search for luminescent materials as spectral converters. *Chem Soc Rev*. 2013;42(1):173-201. doi:10.1039/C2CS35288E
359. Klampaftis E, Ross D, McIntosh KR, Richards BS. Enhancing the performance of solar cells via luminescent down-shifting of the incident spectrum: A review. *Sol Energy Mater Sol Cells*. 2009;93(8):1182-1194. doi:10.1016/J.SOLMAT.2009.02.020
360. Weber WH, Lambe J. Luminescent greenhouse collector for solar radiation. *Appl Opt*. 1976;15(10):2299. doi:10.1364/AO.15.002299
361. Menéndez-Velázquez A, Mulder CL, Thompson NJ, et al. Light-recycling within electronic displays using deep red and near infrared photoluminescent polarizers. *Energy Environ Sci*. 2013;6(1):72-75. doi:10.1039/C2EE23265K
362. Mulder CL, Reuswig PD, Velázquez AM, Kim H, Rotschild C, Baldo MA. Dye alignment in luminescent solar concentrators: I Vertical alignment for improved waveguide coupling. *Opt Express*. 2010;18(S1):A79. doi:10.1364/OE.18.000A79
363. Mulder CL, Reuswig PD, Beyler AP, Kim H, Rotschild C, Baldo MA. Dye alignment in luminescent solar concentrators: II Horizontal alignment for energy harvesting in linear polarizers. *Opt Express*. 2010;18(S1):A91. doi:10.1364/OE.18.000A91
364. Currie MJ, Mapel JK, Heidel TD, Goffri S, Baldo MA. High-Efficiency Organic Solar Concentrators for Photovoltaics. *Science (80-)*. 2008;321(5886):226-228. doi:10.1126/science.1158342
365. Chen C-Y, Yeh K-L, Aisyah R, Lee D-J, Chang J-S. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. *Bioresour Technol*. 2011;102(1):71-81. doi:10.1016/j.biortech.2010.06.159
366. Nielsen T, Björn LO, Ekelund NGA. Impact of natural and artificial UVB radiation on motility and growth rate of marine dinoflagellates. *J Photochem Photobiol B Biol*. 1995;27(1):73-79. doi:10.1016/1011-1344(94)07059-W
367. Dring MJ, Wagner A, Luning K. Contribution of the UV component of natural sunlight to photoinhibition of photosynthesis in six species of subtidal brown and red seaweeds. *Plant, Cell Environ*. 2001;24(11):1153-1164. doi:10.1046/j.1365-3040.2001.00765.x
368. López-Cerero L, Etxebarria J, Mensa J. Microbiological diagnosis of ocular infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(9):531-535. doi:10.1016/j.eimc.2009.01.006

369. Boga BA, Andreu LM. Diagnóstico microbiológico de las infecciones por. 2011. doi:10.1016/S0213-005X(15)30013-6
370. Jiang C, Sun X, Wang Z, Zhang Y. Acanthamoeba Keratitis: Clinical Characteristics and Management. *Ocul Surf*. 2015;13(2):164-168. doi:10.1016/j.jtos.2015.01.002
371. Carnt N, Stapleton F. Strategies for the prevention of contact lens-related *Acanthamoeba* keratitis: a review. *Ophthalmic Physiol Opt*. 2016;36(2):77-92. doi:10.1111/opo.12271
372. Cristina S, Cristina V, Mihaela P. Acanthamoeba keratitis challenges a case report. *Rom J Ophthalmol*. 60(1):40-42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27220232>. Accessed February 5, 2018.
373. Oguma K, Kanazawa K, Kasuga I, Takizawa S. Effects of UV Irradiation by Light Emitting Diodes on Heterotrophic Bacteria in Tap Water. *Photochem Photobiol*. 2018;94(3):570-576. doi:10.1111/php.12891
374. Weigel KM, Nguyen FK, Kearney MR, Meschke JS, Cangelosi GA. Molecular Viability Testing of UV-Inactivated Bacteria. Björkroth J, ed. *Appl Environ Microbiol*. 2017;83(10). doi:10.1128/AEM.00331-17
375. Li X, Cai M, Wang L, Niu F, Yang D, Zhang G. Evaluation survey of microbial disinfection methods in UV-LED water treatment systems. *Sci Total Environ*. 2019;659:1415-1427. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.12.344
376. Ahmed I, Fang Y, Lu M, et al. Recent Patents on Light-Based Anti-Infective Approaches. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. November 2017. doi:10.2174/1872213X11666171108104104
377. Mandal P, Khan MA, Shah S. Drugs – Do we need them? Applications of non-pharmaceutical therapy in anterior eye disease: A review. *Contact Lens Anterior Eye*. 2017;40(6):360-366. doi:10.1016/j.clae.2017.09.001
378. Shen J, Liang Q, Su G, et al. Effect of Ultraviolet Light Irradiation Combined with Riboflavin on Different Bacterial Pathogens from Ocular Surface Infection. *J Biophys*. 2017;2017:1-7. doi:10.1155/2017/3057329
379. ScienceDirect Topics. Photosynthetic Bacteria - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/photosynthetic-bacteria>. Accessed May 28, 2019.
380. Narsing Rao MP, Xiao M, Li W-J. Fungal and Bacterial Pigments: Secondary Metabolites with Wide Applications. *Front Microbiol*. 2017;8:1113. doi:10.3389/fmicb.2017.01113
381. Liu GY, Nizet V. Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends Microbiol*. 2009;17(9):406-413. doi:10.1016/j.tim.2009.06.006
382. Tong Y, Lighthart B. Solar Radiation Is Shown to Select for Pigmented Bacteria in the Ambient Outdoor Atmosphere. *Photochem Photobiol*. 1997;65(1):103-106. doi:10.1111/j.1751-1097.1997.tb01884.x
383. Marshall JH, Wilmoth GJ. Pigments of *Staphylococcus aureus*, a series of triterpenoid carotenoids. *J Bacteriol*. 1981;147(3):900. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC216126/>. Accessed April 10, 2019.
384. Cobo MArtínez F, Bermúdez Ruiz P, Manchado Mañas P. Situación actual de la resistencia de *Pseudomonas aeruginosa* a los antimicrobianos. *Rev esp Quim*. 2003:450-

452. <http://pesquisa.bvs.br/brasil/resource/es/ibc-29345>. Accessed May 28, 2019.
385. Rada B, Lekstrom K, Damian S, Dupuy C, Leto TL. The Pseudomonas toxin pyocyanin inhibits the dual oxidase-based antimicrobial system as it imposes oxidative stress on airway epithelial cells. *J Immunol*. 2008;181(7):4883-4893. doi:10.4049/jimmunol.181.7.4883
386. Muller M. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. *Free Radic Biol Med*. 2002;33(11):1527-1533. doi:10.1016/S0891-5849(02)01087-0
387. ScienceDirect Topics. Staphylococcus Epidermidis - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/staphylococcus-epidermidis>. Accessed May 28, 2019.
388. Estabilización de disoluciones acuosas de riboflavina por solapamiento espectral. http://bvs.sld.cu/revistas/far/vol45_4_11/far06411.htm. Accessed April 11, 2019.
389. Ahmad I, Fasihullah Q, Vaid FHM. Effect of light intensity and wavelengths on photodegradation reactions of riboflavin in aqueous solution. *J Photochem Photobiol B Biol*. 2006;82(1):21-27. doi:10.1016/j.jphotobiol.2005.08.004
390. ScienceDirect Topics. Pseudomonas - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/pseudomonas>. Accessed May 28, 2019.
391. ScienceDirect Topics. Micrococcus - an overview | ScienceDirect Topics. <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/micrococcus>. Accessed May 28, 2019.
392. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 2010;50(1):323-354. doi:10.1146/annurev.pharmtox.010909.105600
393. Obitsu S, Sakata K, Teshima R, Kondo K. Eleostearic acid induces RIP1-mediated atypical apoptosis in a kinase-independent manner via ERK phosphorylation, ROS generation and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Dis*. 2013;4(6):1-13. doi:10.1038/cddis.2013.188
394. El Mundo. Cómo la prohibición de las bombillas halógenas te ayudará en la factura en un 15% | Ahorro y Consumo. <https://www.elmundo.es/economia/ahorro-y-consumo/2018/08/29/5b856434e2704ea72f8b4622.html>. Accessed May 28, 2019.

Divulgación científica

Divulgación científica

Publicaciones en revistas.

- *Blue light exacerbates and red light counteracts negative insults to retinal ganglion cells in situ and R28 cells in vitro.* Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. *Neurochemistry International*. 125, pp. 187 - 196. Elsevier, 01/05/2019.
- *Enhancement of corneal epithelium cell survival, proliferation and migration by red light: Relevance to corneal wound healing.* Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. *Experimental Eye Research*. 180, pp. 231 - 241. Elsevier, 01/03/2019.
- *Potential application of photoluminescent filters for use in ophthalmology.* Amador Menéndez Velázquez; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Manuel Merayo Lloves; Andrés Fernández-Vega Cueto-Felgueroso; Neville Osborne. *Optical materials*. 86, pp. 505 - 511. Elsevier, 01/12/2018.
- *Blue light negatively affects the survival of ARPE19 cells through an action on their mitochondria and blunted by red light.* Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Neville Osborne. *Experimental Eye Research*. 29/09/2018.
- *Near infra-red light attenuates corneal endothelial cell dysfunction in situ and in vitro.* Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Neville Osborne. *Experimental Eye Research*. 16/08/2017.

Divulgación científica.

- *Red light attenuates corneal and retinal damage: relevance in relation to glaucoma.* Neville Osborne; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves; Claudia Núñez Álvarez. ARVO2015. Denver, Colorado.
- *Red light has the capacity to blunt corneal endothelial cell damage in situ.* Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves; Neville Naresh Osborne. ARVO2015. Denver, Colorado.
- *Rapamycin down-regulates REDD1 to blunt cell death: a potential way to maintain retinal ganglion cell function as in glaucoma.* Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. EVER 2014 CONGRESS. 01/10/2014. Niza, Francia.

- *Red light has the capacity to blunt corneal endothelial cell damage in situ.* Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves. EVER 2014 CONGRESS. 01/10/2014. Niza, Francia.
- *RTP801 in the mammalian retinal ganglion cells.* Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguada; Neville Osborne. 15º Congreso Nacional de la SENC. Oviedo 25/09/2013.

Patentes.

El presente trabajo de tesis doctoral generó el registro de la patente “Lente oftálmica para conversión espectral de la luz y método para fabricarla” por parte del Instituto Oftalmológico Fernández-Vega en la Oficina Española de Patentes y Marcas con fecha de solicitud a 19 de septiembre de 2018, número de referencia P2017/87847.

Otras publicaciones durante el período de formación.

- *Visual light effects on mitochondria: The potential implications in relation to glaucoma.* Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Belén Joglar Santos; Susana del Olmo Aguado. Mitochondrion. 01/09/2017.
- *Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis.* Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. Neurochemical Research. 23/05/2016.
- *Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection.* Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Belén Joglar Santos; Susana del Olmo Aguado. European Journal of Pharmacology. 14/04/2016.
- *Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death in situ.* Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. Acta Ophthalmologica. 29/02/2016.
- *The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglions cells.* Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado. Experimental Eye Research. 128, pp. 8 - 14. 01/11/2014.
- *Targeting mitochondrial dysfunction as in aging and glaucoma.* Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado. Drug Discovery Today. 19 - 10, pp. 1613 - 1622. 01/10/2014.

Financiación

Financiación

El presente trabajo se realizó en la Fundación de Investigación Oftalmológica, perteneciente al Instituto Universitario Fernández.Vega.

Parte de los estudios llevados a cabo tuvieron la siguiente financiación pública:

- **Proyecto RETINETA:** Desarrollo de nanomateriales luminiscentes para la neuroprotección y nanoterapia de patologías oculares en un modelo experimental de daño retiniano por luz. Retos de la Sociedad 2014. MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD. REFERENCIA: RTC-2014-3055-1 DURACIÓN: junio de 2014 - marzo de 2017.



MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD

SECRETARÍA DE ESTADO DE INVESTIGACIÓN, DESARROLLO E INNOVACIÓN



- **Proyecto EYECARELENS:** Lentes oftálmicas con películas luminiscentes en la neuroprotección de superficie ocular, córnea y retina: la gafa terapéutica. Retos de la Sociedad 2016. MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD. REFERENCIA: RTC-2016-4964-1. DURACIÓN: enero de 2016 - mayo 2018.



MINISTERIO DE ECONOMÍA Y COMPETITIVIDAD



UNION EUROPEA
FONDO EUROPEO DE
DESARROLLO REGIONAL
"Una manera de hacer Europa"



AGENCIA ESTATAL DE INVESTIGACIÓN

Anexos



Enhancement of corneal epithelium cell survival, proliferation and migration by red light: Relevance to corneal wound healing

Claudia Núñez-Álvarez, Neville N. Osborne*

Fundación de Investigación Oftalmológica, Avda. Doctores Fernández-Vega 34, E-33012, Oviedo, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Corneal epithelial cells
Mitochondria –red light
Neuroprotection

ABSTRACT

The aim of the present study was to analyse how short wave blue and long wave red light differentially affect corneal epithelial (HCE-2) cells in culture. The corneal epithelium *in situ* is exposed to more blue light than in the past because of Light Emitting Diodes (LEDs) used for indoor lighting and computer, television and phone screens. Compared with cultures maintained in the dark, low intensity blue light, such as that emitted from computer screens, reduced the proliferation rate of HCE-2 cells and caused cell death at greater intensities in a dose-dependent manner. In contrast, red light at high intensity slightly enhanced the proliferation rates of HCE-2 cells and importantly blunted the negative influence of blue light on cell survival when delivered after the insult. The toxic influence of blue light on HCE-2 cells involves mitochondrial dysfunction and the activation of AIF, p38-MAPK and HO-1. Importantly, red light blocks the effects caused by blue light and enhances mitochondrial function when delivered independently. The mechanism of action of red light is to directly stimulate mitochondrial function, suggested by staining with JC-1, which results in the activation of multiple biochemical mechanisms and the ability to blunt a variety of death pathways. As a consequence, even sodium azide-induced toxicity to HCE-2 cells in culture is blunted by red light. We interpret our studies on HCE-2 cell cultures to suggest that red light can be used prophylactically to protect the corneal epithelium *in situ* and is also able to counteract a variety of potential environmental insults to the tissue that includes blue light. This might be of particular significance when the cornea is already affected as, for example, in dry eye.

1. Introduction

The corneal epithelium is the outermost mechanical barrier of the human eye and is potentially subjected to various environmental factors like short-wave length blue/ultraviolet (UV) light and various mechanical insults. It has been reported that blue light is damaging to corneal epithelial cells (Lee et al., 2014; Marek et al., 2018). Such insults to the cornea, results in epithelial damage and break-down, with inflammatory mediators like proteinases, growth factors and cytokines being up-regulated. The resulting cross talk of the different signalling pathways related to the proliferation, migration, adhesion and differentiation of epithelial cells has therefore received much attention to provide mechanisms for the treatment of corneal wounds (Ljubimov and Saghizadeh, 2015; Torricelli et al., 2016; Wilson et al., 2001). Rapid healing of damaged corneal epithelium and the return of an intact basement membrane appears to be essential to restore the eye's normal barriers as this prevents epithelium-derived growth factors like transforming growth factor- β and/or platelet-derived growth factor from leaking into the stroma. In doing so, abnormal collagen deposition

and the development of corneal stromal opacity is reduced (Torricelli et al., 2016). The repair process of a disrupted corneal epithelium is therefore intricately related to the migration, death, proliferation, and adhesion of corneal epithelial cells (Zagon et al., 1999; Kruse, 1994). Several substances have been reported to modify the rate of corneal epithelial healing (Dua et al., 1994) including the use of nitric oxide donors (Bonfiglio et al., 2006; Park et al., 2001, 2017).

The cornea is naturally exposed to solar light, but responds differentially to the different wave-lengths, with short-wave length blue or UV light being potentially the most harmful (Tosini et al., 2016; Osborne et al., 2008, 2014; Karu et al., 2005). Photons of long wave-length red light have non-thermal irradiance and can be absorbed by the mitochondria to affect biological activity to relieve the pain and inflammation (Osborne et al., 2014; Begum et al., 2013; Kokkinopoulos et al., 2013; Eells et al., 2016) known to be associated with corneal wound healing. The biological mechanism behind this effect of red/near-infra red light relates to its absorption by the mitochondrial chromophore cytochrome c oxidase (Karu and Kolyakov, 2005; Osborne et al., 2017) which leads to a stimulation of the mitochondrial

* Corresponding author.

E-mail address: Neville.osborne@eye.ox.ac.uk (N.N. Osborne).

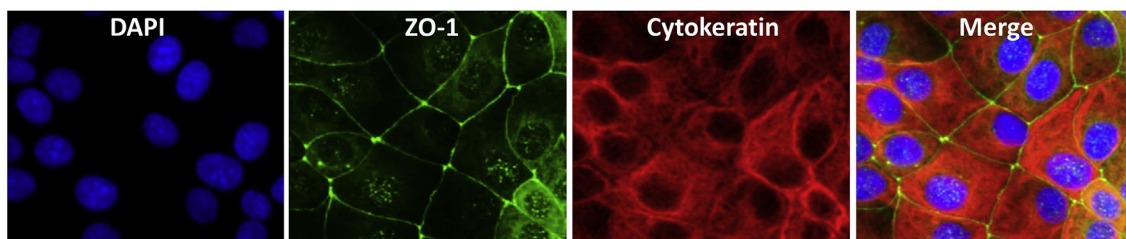


Fig. 1. Images of confluent cultures of HCE-2 cells stained for the localisation of cell nuclei (DAPI, blue), the gap-junction protein ZO-1 (green) and the cytoskeletal protein cytokeratin (red). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

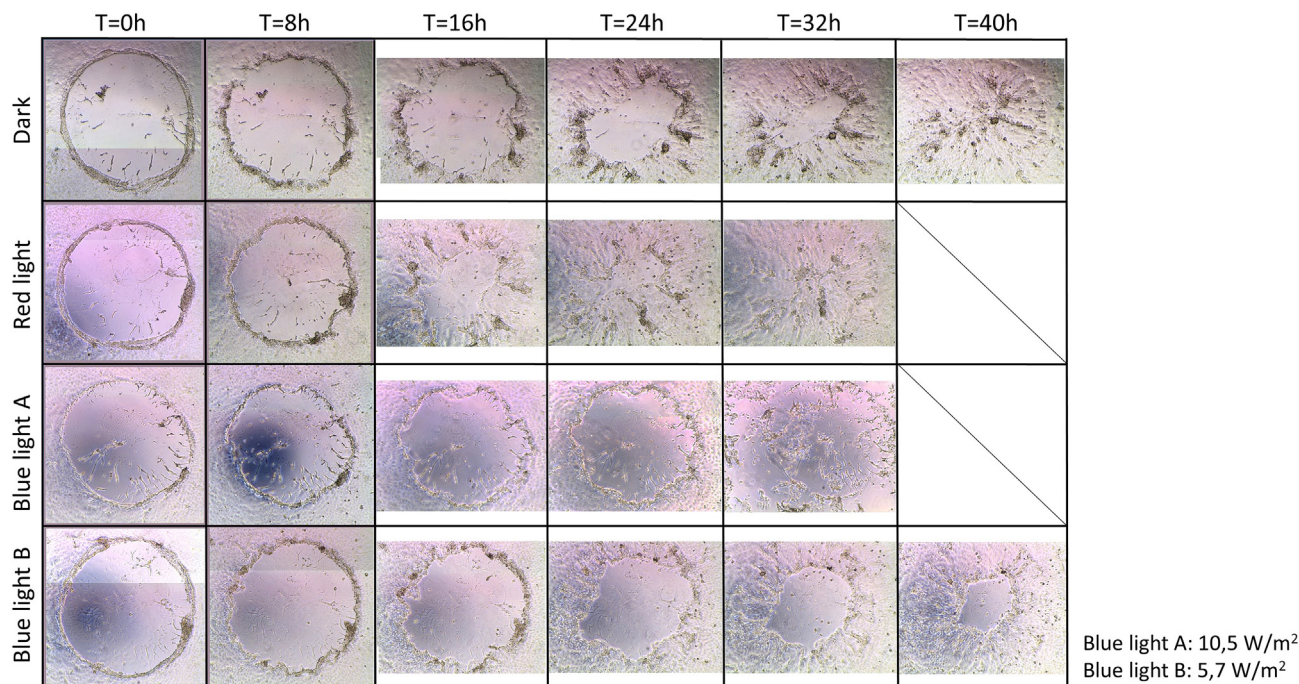


Fig. 2. This figure shows some typical results where a circular area of cells of similar dimensions was removed from confluent HCE-2 cultures ($T = 0$ h) and maintained in dark, red light (7.32 W/m^2), blue light A (10.5 W/m^2) or low blue light B (5.7 W/m^2) for up to 40 h (40 h). In dark, the circular free area of cells gradually becomes repopulated with cells and is completed around 40 h. This process is speeded up when exposed to red light with the area almost repopulated with cells after 24 h. The cells became slightly overgrown at 32 h and this was more extensive at 40 h (not shown). Blue light (10.5 W/m^2) causes cells to die so that the repopulation of the area free of cells does not occur. Cells in other parts of the culture clearly die at 32 h, indicated by reduced number remaining attached to the culture well. At time 40 h few cell remained attached to the culture wells (not shown). In contrast, low amounts of blue light (5.7 W/m^2) slows-down the rate of repopulation of the area free of cells so that so that after 40 h a small area free of cells is still apparent. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

respiratory chain and the activation of many diverse signalling pathways. Significantly, nitric oxide is also elevated, causing the stimulation of blood flow and a reduction of inflammation (Hamblin, 2018; Keszler et al., 2014). The absorption spectra obtained for cytochrome *c* oxidase in different oxidation states are similar to the action spectra for biological responses to red light (Karu and Kolyakov, 2005), implying that the absorption of light energy causes photo-dissociation of the inhibitory nitric oxide from cytochrome *c* oxidase (Lane, 2006). This leads in turn to an enhancement of enzyme activity (Wong-Riley et al., 2005) and an increase in electron transport, oxygen consumption, mitochondrial respiration, and ATP production (Pastore et al., 1994). Thus red light alters the mitochondrial or cellular redox state, inducing the activation of numerous intracellular signalling pathways and altering the affinity of transcription factors concerned with cellular migration, proliferation, survival, tissue repair, and regeneration (Karu and Kolyakov, 2005).

The recognised positive action of red light therapy for various ailments is known, either in the form of cellular photobiomodulation, phototherapy or low-level laser (light) therapy. These procedures are non-invasive and ideal for treating the wounded cornea and involve

using either coherent light sources like lasers or non-coherent light sources consisting of filter lamps or light-emitting diodes (LEDs). The purpose of the present study is to use a cell culture model system of corneal epithelial cells to provide proof of principle to suggest that the viability and proliferation of corneal epithelial cells *in situ* can be negatively affected by exposure to blue light and that this process can be blunted by treatment with red light. The possible non-invasive use of red light might potentially find a place in the treatment of corneal wounds where it is generally acknowledged that the proliferation, death, migration, adhesion, and differentiation of epithelial cells can occur to the cornea because of a delivered wound-like insult (Ljubimov and Saghizadeh, 2015; Torricelli et al., 2016; Wilson et al., 2001).

2. Methods

Human corneal epithelium cells (HCE-2 cells obtained from ATCC® CRL-11135™) were grown in a culture medium that consisted of DMEM-F12 solution (Gibco, 31330), supplemented with 10% FBS, 10 ng/ml epidermal growth factor (Gibco, PHG0314), 5 µg/ml insulin (Sigma, 10908) and 2% penicillin/streptomycin (Gibco, 15140) in a humidified

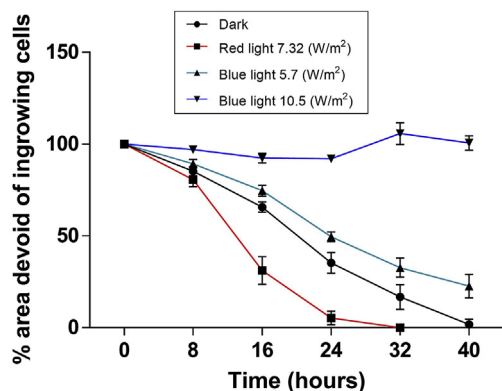


Fig. 3. Quantitative analysis of the rate of closure of the areas in confluent HCE-2 devoid of cells that occur after exposure to different regimes of light ($n = 5$, \pm SEM). It can be seen the area of cells devoid from cells remained unchanged over a period of 40 h when exposed to blue light (5.7 W/m^2) but becomes gradually repopulated by ingrowing cells in the dark and completed after 40 h. This process is speeded up in the presence of red light (7.32 W/m^2) where repopulation was completed after 24–32 h but slowed-down when in low amounts of blue light (5.7 W/m^2) where the repopulation of the area free of cells was incomplete after 40 h. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

atmosphere of 5% CO_2 , at 37°C .

2.1. Studies related to migration

In these studies, $200 \mu\text{l}$ of a suspension of cells ($150,000 \text{ cells/ml}$) were seeded into 48-well plates and grown to confluence, which was reached after 48 h. A circular “wound” of approximately $1.317 \pm 0.116 \text{ mm}^2$ ($n = 15$) was introduced into cultures; the media was rapidly removed, rinsed with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and replaced with culture media low in FBS (culture medium already described but 1% FBS). Thereafter, cells were either kept in the dark or in the presence of blue (465–475 nm, 10.5 W/m^2 or 5.7 W/m^2) or red (625–635 nm, 7.32 W/m^2) light for up to 40 h. During this period, a phase contrast microscope (with a $5\times$ magnification) was used to record images of the individual “wounds” every 8 h. Images were then analysed for size using Adobe Photoshop CS6 (Adobe Systems Inc., California, USA) and ImageJ Software (U.S. National Institutes of Health, Maryland, USA) and related in individual cultures to $t = 0 \text{ h}$.

2.2. Cell culture studies

In these studies, cells in 96-well (for viability studies), 6-well (for western blot studies) or 48-well (immunocytochemistry, JC-1 and reactive oxygen species (ROS) determinations) plates were subjected to various regimes of treatment before analysis. In some cases, HCE-2 cells were maintained in darkness, or exposed to blue (10.5 W/m^2 , 18 h) or red (7.32 W/m^2 , 12 h) light. In other instances, the cells were first treated with blue light (18 h) or sodium azide (18 h) and thereafter treated with red light (12 h) or no light (12 h) before analyses of cell viability. In yet other cases, cells were treated with various amounts of blue light for 18 hours or different concentrations of sodium azide for 12 hours before analysis. In addition, cells were exposed to blue or red light for 8 (JC-1 and ROS studies) or 24 (immunocytochemistry) hours prior to analysis.

2.3. Analysis of cell viability

This was assessed by the MTT reduction assay, modified from that of Mosmann (1983). After initially subjecting $100 \mu\text{l}$ of cells (approximately 15000 cells) in 96-well plates to defined treatments, MTT solution was added at a final concentration of 0.5 mg/ml for 75 min at 37°C . Medium was then removed and reduced MTT (blue formazan crystals) was solubilised by adding $100 \mu\text{l}$ of DMSO to each well. After agitation of the plates for 10 min, the optical density of the solubilised crystals was measured using an automated microplate reader at 570 nm wavelength.

2.4. Analysis of mitochondrial status

Cells were exposed to either blue (5.7 W/m^2) light, red (7.32 W/m^2) light or to no light (control) for 8 hours and then incubated with JC-1 dye ($2 \mu\text{g/ml}$) for 30 min directly after various treatments. JC-1 accumulates in mitochondria to appear as a red/orange fluorescence (590 nm) in healthy organelles and, when depolarised, green in fluorescence (530 nm). Fluorescence images of cells were recorded and the relative levels of the intensities of green/red JC-1 fluorescence were quantified using ImageJ Software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA); statistical analysis was carried out by the use of GraphPad Prism version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla California, USA).

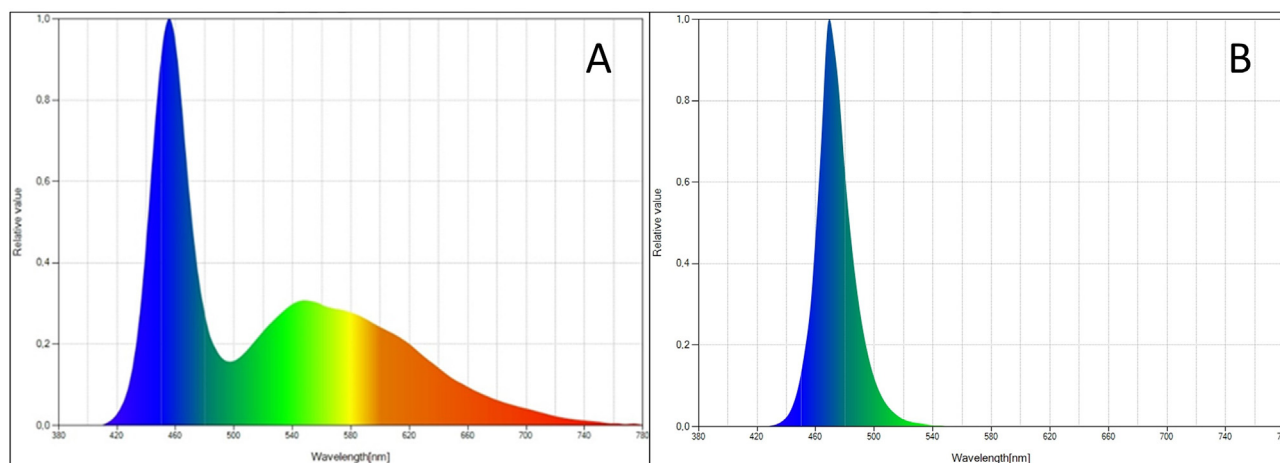


Fig. 4. Emission spectra from a computer screen (A) and from blue light LED (B) used in the experimental studies. The intensity of blue light emitted from the computer screen was determined by use of a CL-70F CRI Illuminance Meter and shown to be 5.7 W/m^2 . (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

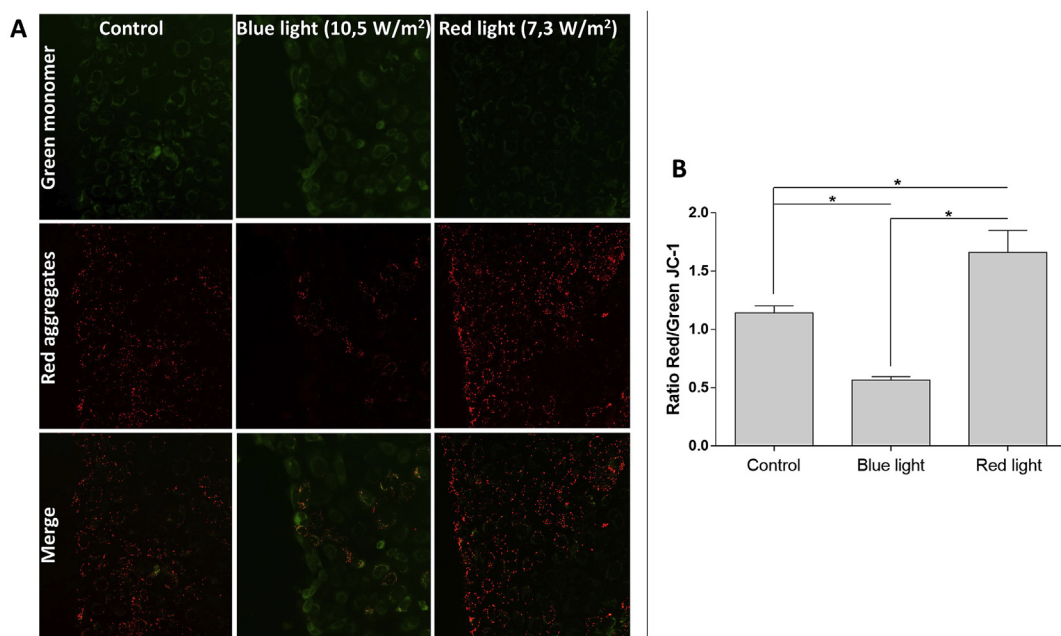


Fig. 5. JC-1 staining of confluent HCE-2 cultures adjacent to the area of cells that were removed and then being exposed to either blue (5.7 W/m²) light, red (7.32 W/m²) light or to no light (control) for 8 h. JC-1 accumulates in mitochondria to appear as a red/orange fluorescence (590 nm) in healthy organelles and when depolarised, green in fluorescence (530 nm). It can be seen from the merged images that the green monomer is more apparent in cells exposed to blue light when compared with control cells or cells in red light. Quantitative analysis of the ratio of red/green fluorescence is shown in Fig. 5B where it is clear that the red aggregates are elevated by red light when compared with control cells (n = 4, ± SEM). Significance *p = 0.0286 by Mann-Whitney test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

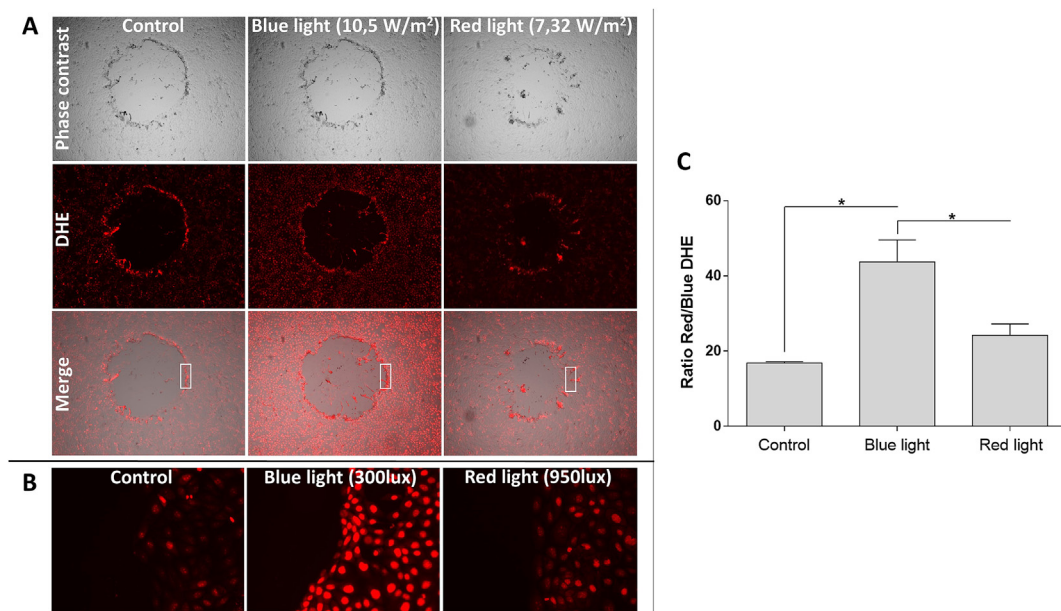


Fig. 6. Staining of confluent HCE-2 cultures for DHE or ROS generation adjacent to the removal of an area of cells that has then been exposed to blue (5.7 W/m²) or red (7.32 W/m²) light or no light (control) for 8 h (Fig. 6A). ROS formation is determined by comparing the ratio of blue fluorescence in the cytoplasm of living cells with that of the red fluorescence located to the nucleus in living cells. It can be seen from the images that the intensity of red nuclear DHE staining is elevated after exposure to blue light when compared with control cells or cells in red light. Interestingly the staining of DHE in cells immediately adjacent to those that have been removed was elevated in all cultures and more so for where cells were exposed to blue light (Fig. 6B). Quantitative analysis of the ratio of red/blue fluorescence is shown in Fig. 6C where it is clear that the red nuclear DHE staining is elevated by blue light when compared with control cells or cells in red light (n = 4, ± SEM). Significance *p = 0.0286 by Mann-Whitney test. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2.5. Analysis of ROS

Cells were exposed to either blue (5.7 W/m²) light, red (7.32 W/m²) light or to no light (control) for 8 hours and then incubated with

dihydroethidium (40 μM) for 20 min, the medium was removed and the cells washed twice with fresh medium. Images of the cultures were immediately recorded using phase fluorescence/contrast microscopy. ROS formation was determined by measurement of the ratio

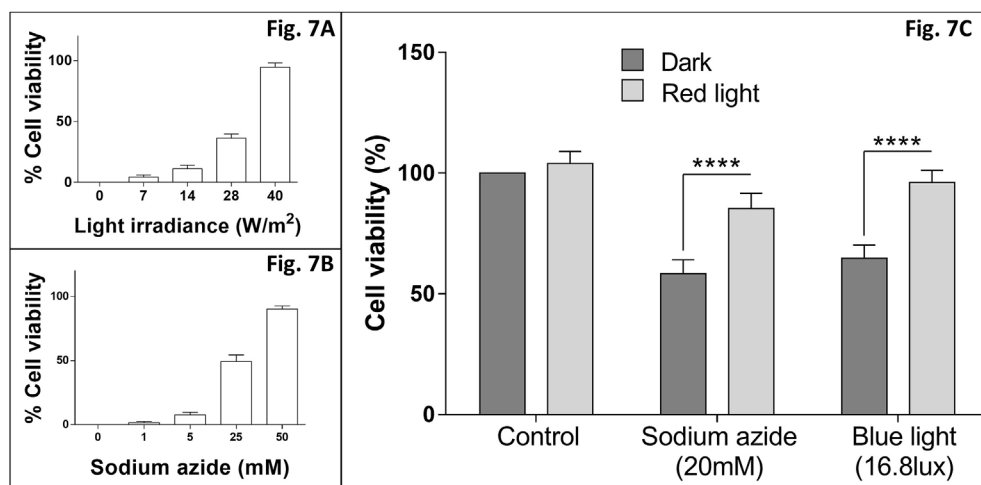


Fig. 7. This figure shows that HCE-2 cell viability over an 18 h period is dependent respectively on the irradiance (intensity) of blue light (Fig. 7A) and the concentration of sodium azide (Fig. 7B). In Fig. 7C, cells were either exposed to either continuous darkness, darkness for 18 h followed by 12 h red (7.32 W/m²) light, 18 h to sodium azide followed by 12 h darkness, 18 h sodium azide followed by 12 h red light, 18 h in blue (5.7 W/m²) light followed by 12 h in darkness or 18 h in blue light followed by 12 h of red light before analysis. It can be seen that red light attenuated significantly reduction in cell viability induced by either sodium azide or blue light. Results are mean \pm SEM where $n = 6$, significance $***p < 0.001$ by Two-way ANOVA, Turkey's multiple comparison test.

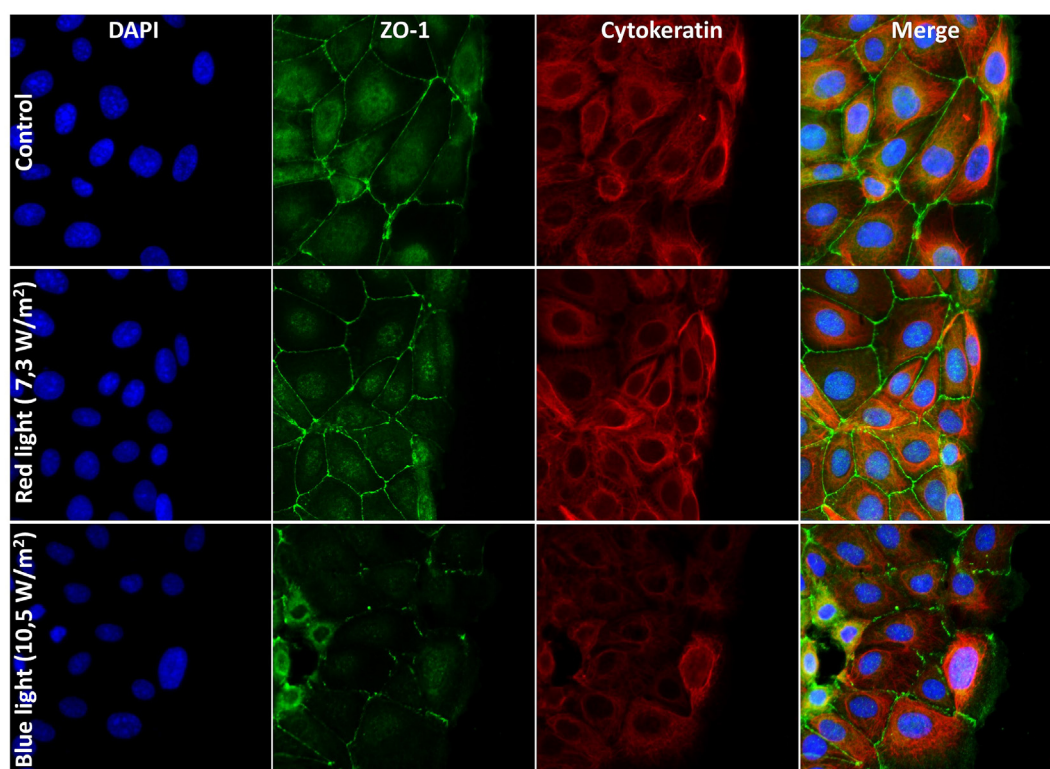


Fig. 8. Images of confluent cultures of HCE-2 cells stained adjacent to where cells had been removed 24 h after exposure to different regimes of light and processed for the localisation of cell nuclei (DAPI, blue), the gap-junction protein ZO-1 (green) and the cytoskeletal protein. The figure clearly shows that blue light causes a disruption of the gap junction protein ZO-1 but this was not the case for control cultures or where red light was used. It also appears as if blue light, unlike red light causes a reduction cytokeratin immunoreactivity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

fluorescence at 370–420 nm (for cytoplasm of living cells in blue) with that of 535–610 nm (for chromatin of living cells in red) and analysed for significance using GraphPad Prism version 7.00 for Windows.

2.6. Immunocytochemistry

HCE-2 cell cultures were fixed in cold methanol or 4% paraformaldehyde for 10 min followed by washing in phosphate buffer. After incubation in goat serum (10% in phosphate buffer or PBS) for 60 min and washed in PBS, cultures were then exposed overnight to one of the following antibodies, anti-Cytokeratin (Dako Ref. M063029-2) 1:500, anti-ZO1 (Thermo Fischer Ref. 61–7300) 1:200 or anti-HO1 (Enzo LS,

Ref. ADI-SPA895) 1:500. After rinsing with PBS, cultures were then exposed for 2 h to appropriate secondary antibody conjugated either to Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (1:300), washed in buffer. In some cases, DAPI (0.2 μ g/ml) was added to a wash solution. Images were obtained using a Leica DMI6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems).

2.7. Western blot analysis

HCE-2 cells were collected by scraping them from culture wells, followed by centrifugation and re-suspension in a cocktail lysis buffer (approximately 0.1 ml/mg pellet) that contained phosphatase and

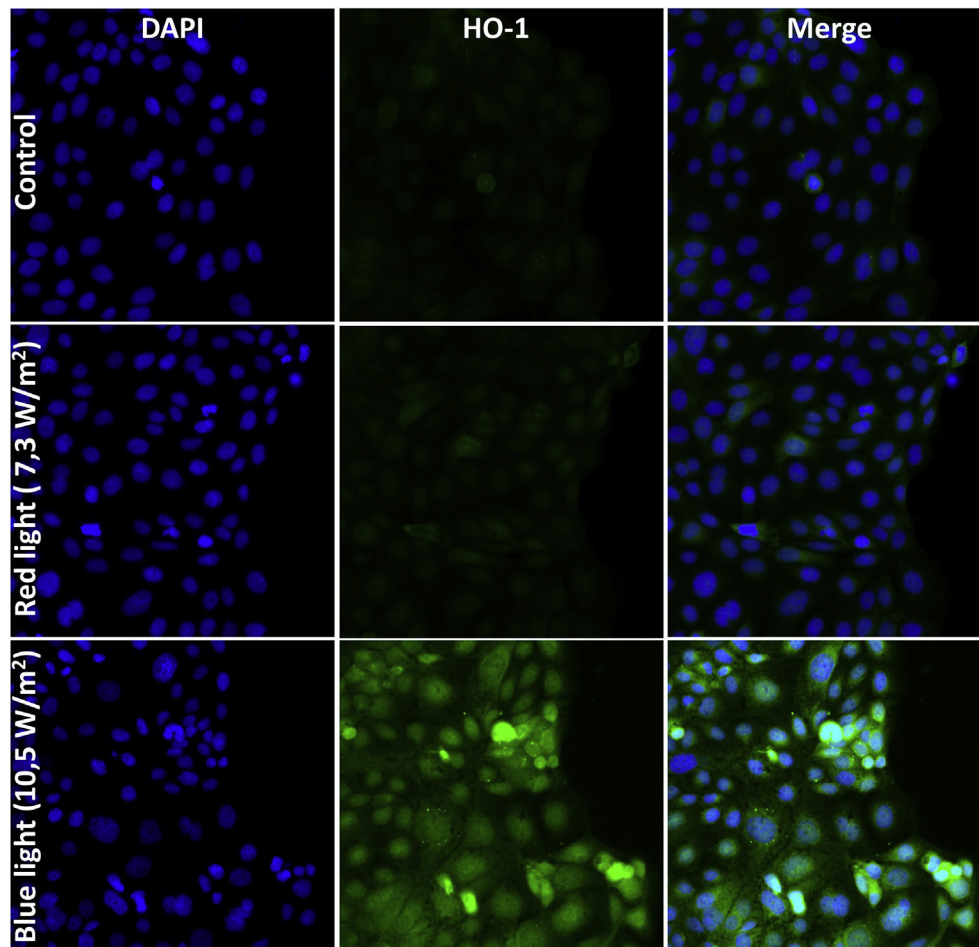


Fig. 9. Images of confluent cultures of HCE-2 cells stained adjacent to where cells have been removed 24 h after exposure to different regimes of light and processed for the localisation of cell nuclei (DAPI, blue), and cytoplasmic HO-1 green immunoreactivity. The figure clearly shows that red light causes very little up-regulation of HO-1 immunoreactivity when compared with controls. In contrast, blue light elicited a significant elevation of cytoplasm HO-1 immunoreactivity. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

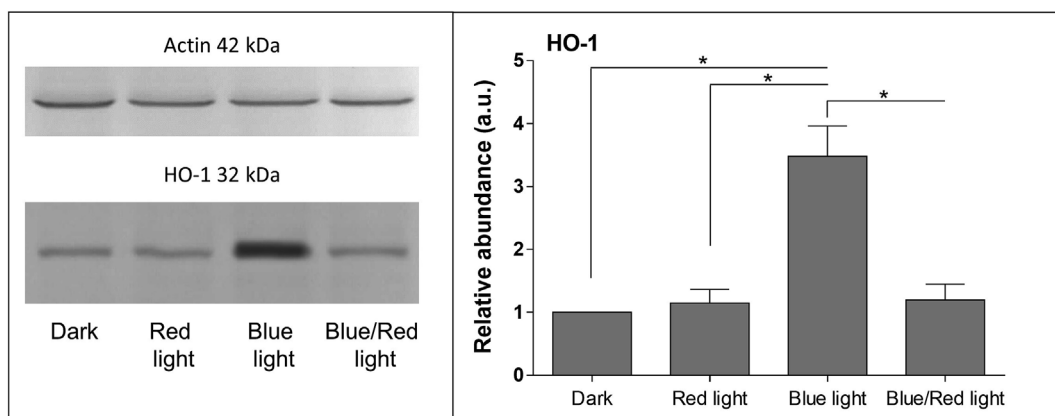


Fig. 10. HCE-2 cells cultures were exposed to either continuous darkness, darkness for 18 h followed by 12 h red (7.32 W/m^2) light, 18 h in blue (5.7 W/m^2) light followed by 12 h in darkness or 18 h in blue light followed by 12 h of red light before analysis. Western blot analyses of equivalent amounts of extracts from HCE-2 cells were analysed to detect HO-1 and actin proteins (Fig. 10A). The amount of HO-1 protein (32 kDa) increases in cultures exposed to blue light and blunted by red light (6.5 W/m^2). Fig. 10B is a quantitative analysis ($\pm \text{SEM}$, $n = 4$) of the ratio of intensities of HO-1 (32 kDa) and relative to actin, derived from three experiments where it can be seen that red light blocks the increase of HO-1 caused by blue light at all time intervals. Significant differences were determined using a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test (** $p = 0.0006$).

protease inhibitors (Sigma, Aldrich). After freezing and thawing in combination with sonication, the protein content was determined using a biocinchoninic acid protein kit (Sigma-Aldrich). Defined amounts of protein and sample buffer (2M Tris/HCl, pH 6.8, containing 8% SDS,

40% glycerol, 8% mercaptoethanol, and 0.002% bromophenol blue) were then mixed together and immediately heated for 5 min at 95°C . Equal amounts of proteins were fractionated by electrophoresis using 10% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS. Proteins were

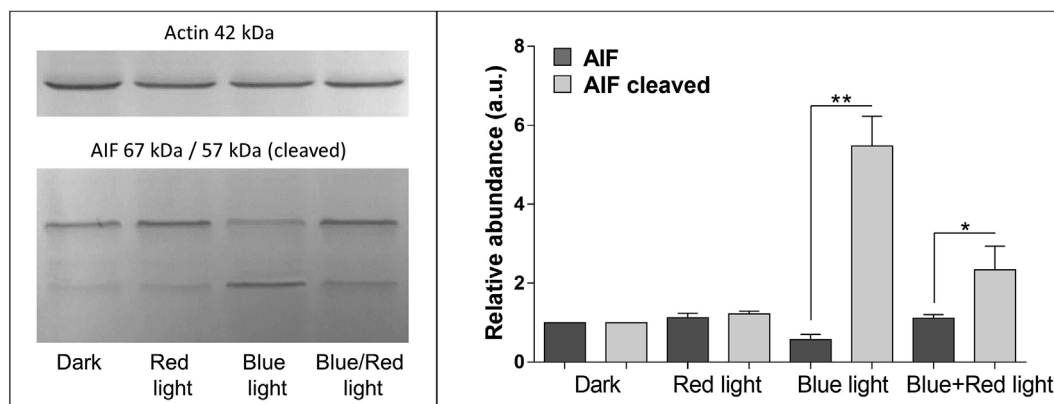


Fig. 11. Cells were exposed to either continuous darkness, darkness for 18 h followed by 12 h red (7.32 W/m^2) light, 18 h in blue (5.7 W/m^2) light followed by 12 h in darkness or 18 h in blue light followed by 12 h of red light before analysis. Western blot analyses of equivalent amounts of extracts from HCE-2 cells cultured under different conditions were fractionated and samples processed to detect HO-1 and actin proteins (Fig. 11A). AIF appears as a single band with a molecular weight of 67 kDa in control cultures (Dark). Exposure of such cultures to blue light but not red light produces a 57 kDa species. The cleavage of AIF is completely blocked by 12 h of red light delivered after the blue light insult. Fig. 11B shows the quantitative analysis of the ratio of intensities of the 57 kDa and 67 kDa bands for AIF relative to actin, derived from three experiments as shown in Fig. 11A, \pm SEM. Significant differences were determined using a Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test (** $p = 0.0044$).

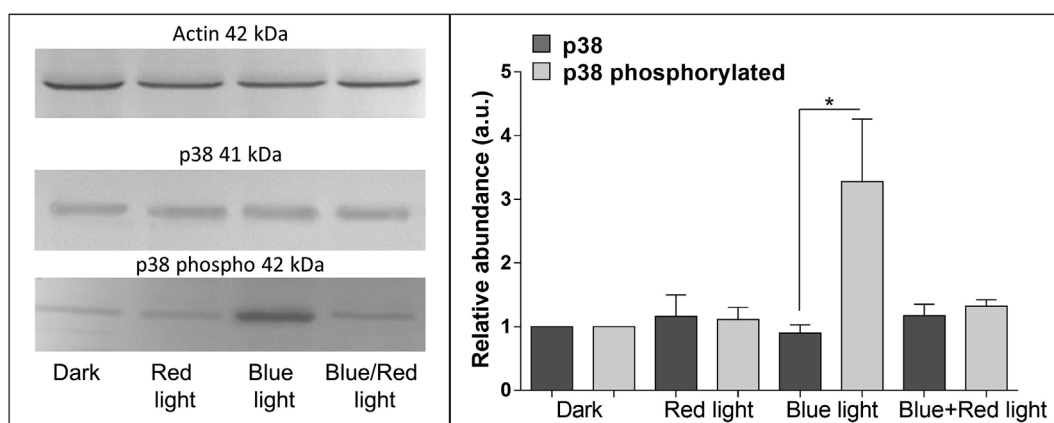


Fig. 12. Cells were exposed to either continuous darkness, darkness for 18 h followed by 12 h red (7.32 W/m^2) light, 18 h in blue (5.7 W/m^2) light followed by 12 h in darkness or 18 h in blue light followed by 12 h of red light before analysis. Western blot analyses of equivalent amounts of extracts from HCE-2 cells cultured under different conditions were fractionated and samples processed to for the detection of p38, phosphorylated p38 phosphorylated and actin proteins (Fig. 12A). The amount of phosphorylated p38 increases in cultures exposed to blue light and blunted by red light (6.5 W/m^2). But p38 protein is unaffected by red or blue light. Fig. 12B is a quantitative analysis (\pm SEM, $n = 3$) of the ratio of intensities of phosphorylated p38 phosphorylated (42 kDa) and relative p38 (42 kDa) protein, derived from three experiments where it can be seen that red light blocks the increase of phosphorylated p38 phosphorylated caused by blue light at all time intervals. Significant differences were determined using a Mann-Whitney test (* $p = 0.1$).

transferred to $0.22 \mu\text{m}$ nitrocellulose membranes and incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: anti-actin (MAB1501, Millipore) 1:4000, anti-p38 (ab31828, Abcam) 1:1000, anti-p38 phosphorylated (ab45381, Abcam) 1:1000, anti-ERK (#9102, Cell Signalling) 1:1000, anti-ERK phosphorylated (#9101, Cell Signalling) 1:1000, anti-AIF (sc-9716, Santa Cruz Biotech), 1:500 or anti-HO-1 (ADI-SPA895, Enzo LS), 1:1000. Detection was then performed with appropriate biotinylated secondary antibodies. The final nitrocellulose blots were developed with a 0.016% w/v solution of 3-amino-9-ethylcarbazole in 50 mM sodium acetate (pH 5.0) containing 0.05% (v/v) Tween-20 and 0.03% (v/v) H_2O_2 . The colorimetric reaction was stopped with 0.05% sodium azide/PBST solution and the density of the individual bands quantified using ImageJ software.

3. Results

As shown in Fig. 1, neighbouring HCE-2 cells in confluent cultures stain for the localisation of the tight junction zonula occluden protein (ZO-1). In contrast, the intracytoplasmic protein cyokeratin is located

in the cytoplasm of HCE-2 cells and not specifically within tight junctions. This is particularly striking when merging the images for ZO-1 and cyokeratin immunoreactivities with the staining of cell nuclei with DAPI. These findings show that confluent cultures of HCE-2 cells are a good model preparation to simulate the situation in the cornea where tight junctions occur between neighbouring epithelial cells.

Figs. 2 and 3 show results where a “wound” was introduced into confluent HCE-2 cultures by removing circular areas of cells ($1.317 \pm 0.116 \text{ mm}^2$, $n = 15$) before exposure to red, blue or no light for periods of up to 40 h. The areas of the cultures devoid of cells because of the “wound” were measured (Fig. 2) and photographed at different time points (Fig. 3). Cultures maintained in the dark showed a gradual repopulation of cells in the devoid area of cells so that the area was completely repopulated after 40 h. The rate of the repopulation of cells in the area devoid of cells was accelerated in time (between 24 and 32 h) in the presence of red light (7.32 W/m^2). In contrast, blue light (10.5 W/m^2) had no obvious influence on the areas devoid of cells for the first 16 h, but thereafter the cultures deteriorated in health so that all cells in the whole culture appeared to have died after 32 h.

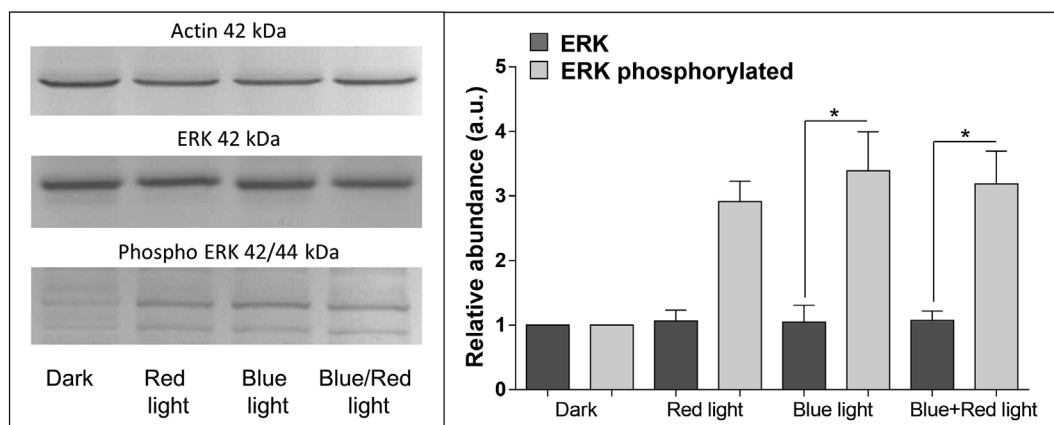


Fig. 13. Cells were exposed to either continuous darkness, darkness for 18 h followed by 12 h red (7.32 W/m^2) light, 18 h in blue (5.7 W/m^2) light followed by 12 h in darkness or 18 h in blue light followed by 12 h of red light before analysis. Western blot analyses of equivalent amounts of extracts from HCE-2 cells cultured under different conditions were fractionated and samples processed to for the detection of ERK and phosphorylated ERK and actin proteins (Fig. 13A). The amount of phosphorylated ERK increases in cultures exposed to both blue and red light. Fig. 13B is a quantitative analysis (\pm SEM) of the ratio of intensities of phosphorylated ERK phosphorylated (42/44 kDa) and ERK (42/44 kDa) protein are similar in cells not only exposed to red or blue light but also when in combination. Results derived from derived from three experiments \pm SEM where significance Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparison test (* $p = 0.0164$).

Significantly lower amounts of blue light (5.7 W/m^2), similar to that emitted from computer screens (determined using a CL-70F CRI Illuminance Meter, obtained from Konica Minolta, Tokyo, Japan) (Fig. 4), did not cause cell toxicity but rather caused a slow closure of the devoid area of cells so that the size was reduced by approximately 80% after 40 h.

Fig. 5A shows areas in confluent HCE-2 cell cultures where cells were removed and stained after 8 hours of exposure to red, blue or no light with the mitochondrial dye JC-1 (Fig. 5A). JC-1 is taken up by mitochondria and appears red in colour (by forming aggregates) in healthy energised mitochondria and green in mitochondria (as a monomer) which are de-energised or negatively affected. JC-1 staining in cultures exposed to blue light (10.5 W/m^2) was mostly green in colour, suggesting a degree of toxicity to mitochondria. In contrast, JC-1 staining in healthy mitochondria (cells in the dark) is red in colour; this redness appears elevated when cells are exposed to red light (7.32 W/m^2). Quantification of the degree of monomer (green) and aggregates (red) in the cells adjacent to where cells were removed is shown in Fig. 5B. Red light clearly elevates the energy state of the mitochondria when compared with cells in the dark, while blue light significantly de-energises healthy mitochondria.

Oxidative stress was also measured in the various cultures after 8 h of exposure to the different conditions using the superoxide indicator stain dihydroethidium (DHE) (Fig. 6). This stain exhibits a blue-fluorescence in the cytosol of healthy cells but, when oxidised, intercalates with DNA to appear as a bright red fluorescent nuclear stain. It is clearly seen in low power magnification that the whole culture around the circular area devoid of cells, which exhibits greater oxidative stress (red fluorescence) when exposed to blue light as opposed to no light or red light after an 8 h period (Fig. 6A). Moreover, the cells immediately adjacent to the area devoid of cells appear particularly under oxidative stress in cultures exposed to blue light and also in intermittent areas when in red light. This is more evident in higher power micrographs (Fig. 6B). Quantification of the degree of blue to red fluorescence associated with the cultures shows that blue light clearly causes oxidative stress and also that red light elevates oxidative stress when compared with cultures in the dark (Fig. 6C).

Evidence for red light having the capacity to attenuate a negative effect of an insult of either blue light or sodium azide on HCE-2 cell cultures is shown in Fig. 7. Using an MTT viability assay, it can be seen that different intensities of blue light over a period of 20 h (Fig. 7A) or various concentrations of sodium azide over a period of 12 h (Fig. 7B) cause a loss of cell viability in a dose-dependent manner, with half-

maximum effects being 500 lux and 20 mM, respectively. Significantly, red light (7.32 W/m^2) over 12 h clearly counteracted an initial insult of blue light as well as an initial insult of sodium azide (20 mM). The negative effect of blue light on confluent HCE-2 cultures is seen in Figs. 8 and 9. Blue light disrupted the continuous demarcation of the gap junction protein ZO-1 between cells while red light did not. Moreover, the hemoxygenase-1 (HO-1) protein is up-regulated by blue light revealed by immunohistochemistry (Fig. 9) and western blot analysis (Fig. 10). HO-1 immunoreactivity is also slightly elevated by red light in some cells (Fig. 9), but this was not found to be significant by western blot analysis (Fig. 10). Significantly, the elevation of HO-1 protein caused by blue light is blunted by red light (Fig. 10).

Exposure of HCE-2 cells to blue light also causes a fragmentation of the apoptosis inducing factor (AIF) protein to produce a 57 kDa product (Fig. 11) and an up-regulation of phospho-p-38-MAPK (Fig. 12). Significantly, the degree of fragmentation of AIF and the up-regulation of phospho-p-38-Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) are attenuated by red light which does not have any influence on its own. In contrast, phosphorylated ERK (as opposed to ERK), which is detected as two bands with a molecular weight between 42 and 44 kDa, is elevated both by red and blue light (Fig. 13).

4. Discussion

In the present study, we used cultures of HCE-2 cells as a surrogate for the human corneal epithelium to provide evidence for the beneficial influence of low intensity red light (delivered from LEDs) in the treatment corneal epithelial erosions, abrasions or wounds. HCE-2 cells grown to confluence develop tight junctions (continuous demarcation of ZO-1 staining between cells) and stain positively for cytokeratin (Fig. 1), as the epithelium *in situ*. We demonstrate that the proliferation, death, and migration of HCE-2 cells are affected by short wavelength blue light (465–475 nm) but not by long wavelength red light (625–635 nm). Instead, red light is able to counteract the influence of blue light. It is generally acknowledged that the proliferation, death, migration, adhesion, and differentiation of epithelial cells can occur to the cornea because of a delivered wound-like insult (Ljubimov and Saghizadeh, 2015; Torricelli et al., 2016; Wilson et al., 2001).

Current evidence favours the view that blue light (400–480 nm) directly affects flavin and cytochrome constituents of cell mitochondria (complexes I, II and IV) to decrease ATP synthesis and stimulate ROS production, thereby inducing oxidative stress and cell dysfunction (Tosini et al., 2016; Osborne et al. 2008, 2014, 2017; Karu et al., 2005;

Lee et al., 2014; Marek et al., 2018). In contrast, red light (650–800 nm) acts on mitochondrial complex IV causing a dissociation of nitric oxide and redox state changes, an increase in the rate of formation of ATP and ROS and the eventual activation of numerous intracellular signalling and transcription factors, resulting in numerous beneficial influences to the cell (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567724916302586?via%3Dihub>, Wong-Riley et al., 2005; Karu and Kolyakov, 2005; Hamblin, 2018; Keszler et al., 2014; Osborne et al., 2014; Begum et al., 2013; Kokkinopoulos et al., 2013; Eells et al., 2016).

The negative effect of blue light (465–475 nm, 10.5 W/m²) on cultures of HCE-2 cells is clearly demonstrated in our studies. For example, blue light causes the gap junctions (stained for ZO-1 immunoreactivity) between neighbouring cells in confluent cultures to be disrupted (Fig. 8) and increases in ROS production to cause oxidative stress suggested by the use of dihydroethidium (Fig. 6). Moreover, blue light causes a decrease of cell viability (Fig. 7) but is intensity-dependent (Fig. 7A) demonstrating the biological nature of the insult. As a consequence, a low intensity of blue light blue (465–475 nm, 5.7 W/m²), as emitted from computer screens (Fig. 4), does not produce a clear negative influence on HCE-2 cell survival/proliferation (Figs. 2 and 3), but instead suggests possible beneficial influences. This was seen in studies where a circular compartment or “wound” free of cells was introduced into confluent HCE-2 cultures before exposure to different regimes of light. When in darkness, the compartment free of cells gradually reduced in size over time because of cell proliferation from outside the “wound” and closed completely after about 40 h. This was not the case when exposed to high intensity blue light (10.5 W/m²) where the compartment free of cells remained unchanged in size and cells outside the “wound” area appeared to die after 16 h (Figs. 2 and 3). However, this was not the case when the intensity of blue light was low (5.7 W/m²). Here, the circular compartment free of cells gradually lessened with time so that it was reduced to about 30% of its original size after about 40 h. We conclude from such studies that high intensities of blue light are likely to be detrimental to corneal epithelial cell survival but low intensities (as from computer screen) can be tolerated. However, low intensities of blue light might be a risk to corneal epithelial cells when in an already compromised state, as will likely be the case for dry eye patients. Patients with dry eye frequently complain about exacerbated photosensitivity and have increased discomfort when exposed to light from various sources (Stapleton et al., 2017; Wade, 2015).

Unlike blue light, red light only had positive effects on the survival and proliferation rates of HCE-2 cells in culture. For example, the closure rate of the compartment free of cells in experiments shown in Figs. 2 and 3 was sped up by red light (7.32 W/m²) to between 24 and 32 h, as compared with 40 h in the darkness (Figs. 2 and 3). Moreover, red light, when provided for 12 h after an insult of blue light to HCE-2 cells, blunted the negative influence of blue light significantly when compared with darkness for the same period of time (Fig. 7). In addition, mitochondrial function is enhanced in HCE-2 cells exposed to red light compared with cells kept in darkness or when exposed to blue light (Fig. 5). This was revealed in studies where cells were immediately stained with JC-1 after various regimes of light treatment. It is known that JC-1 accumulates in mitochondria, appearing red in fluorescence (590 nm) in healthy activated organelles and green in fluorescence (530 nm) in depolarised negatively affected mitochondria (Perelman et al., 2012). Our results show that the red/green ratio is elevated by red light but reduced by exposure to blue light when compared with cells in darkness (Fig. 5). The combined studies therefore suggest that increasing the amount of daily red light reaching the cornea can enhance stabilisation of the epithelium cells and so resist damage from potential environmental insults like blue light. However, the beneficial effects for red light can also act upon other potential insults to the corneal epithelium. For example, we show here that a chemical insult to HCE-2 cells caused by sodium azide can be blunted by red light. The

primary cause of the toxicity of sodium azide is thought to be because of it being an inhibitor of mitochondrial complex IV (Leary et al., 2002; Safulina et al., 2006). However, the cause of its toxicity is probably more complex because it can also stimulate nitric oxide production (Bennett et al., 1996) and has complex influences on potassium (Qamirani et al., 2006) and calcium (Marino et al., 2007) channels.

Consistent with studies of other cell-types (Núñez-Álvarez et al., 2017; Del Olmo-Aguado et al., 2016; Ji et al., 2011; Li and Osborne, 2008; Osborne et al., 2014; Osborne et al., 2008), blue light-induced toxicity to HCE-2 cells causes the up-regulation of HO-1 and the cleavage of AIF (Figs. 9–11). The up-regulation of the HO-1 protein reflects its role in endogenous neuroprotection. HO-1 is a stress-response protein that plays a vital function in maintaining cellular homeostasis. The magnitude of HO-1 induction might be important in the defence of organisms against oxidative stress-mediated injuries and other diverse factors (Amersi et al., 1999; Ursu et al., 2014). HO-1 gene expression can be induced in different ways, one being the Nrf2 and antioxidant-responsive-element or Nrf2-ARE pathway that participates in a reduction of various forms of stress (Balogun et al., 2003; Dai et al., 2016; He et al., 2014). Since red light does not blunt the up-regulation of HO-1 protein elicited by blue light or induce HO-1 on (Fig. 11), it is concluded that the “protective action” of red light is not due to a direct action on the Nrf2-ARE pathway. The beneficial findings associated with red light on HCE-2 cells (Begum et al., 2013; Karu and Kolyakov, 2005; Karu et al., 2004; Wong-Riley et al., 2005) therefore appears to occur via the action on cytochrome oxidase (COX) with no evidence for involvement of the Nrf2-ARE pathway.

AIF is a flavin-binding mitochondrial inter-membrane protein that has been implicated in maintenance of the electron transport chain function, ROS regulation and cell death (Delavallée et al., 2011; Polster, 2013; Sosna et al., 2014). When AIF is induced to be cleaved within mitochondria, the 57 kDa product migrates to the nucleus to cause alkylation and DNA damage, resulting in a caspase-independent cell death, termed necroptosis (Artus et al., 2010; Hanus et al., 2015; Polster, 2013). Importantly, red light, which stimulates mitochondrial complex IV or COX (Begum et al., 2013; Karu and Kolyakov, 2005; Karu et al., 2004; Lane, 2006; Wong-Riley et al., 2005), attenuates blue light-induced AIF cleavage (Fig. 11) and enhances cell viability as a consequence (Fig. 7). These results show that negative actions on flavin-containing nucleotides within mitochondria (as might be caused by blue light) can be blunted through the stimulation of COX (Lane, 2006).

Current evidence suggests that mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal regulators kinase (ERK), c-Jun, N-terminal kinase (JNK) and p38-MAPK, are linked to a diverse range of biological activities including cell regulation (Cuadrado and Nebreda, 2010; Ono and Han, 2000). The activation of ERKs typically contributes to cell differentiation, proliferation and the survival of cells. The fact that blue light stimulated ERK phosphorylation is consistent with this view; however, to our surprise, red light also induced the same amount of phosphorylated ERK either on its own or in conjunction with blue light. This is clearly a surprising consistent finding in the present studies which require further detailed studies.

In contrast to ERKs, JNK and p38-MAPK are typically activated by pro-inflammatory cytokines and environmental stress (such as UV radiation and osmotic stress) (Cuadrado and Nebreda, 2010; Davies et al., 2000; Ono and Han, 2000). The present studies show that the exposure of HCE-2 cells to blue light resulted in the occurrence of the phosphorylated product of p38-MAPK (Fig. 12). Stimulation of the formation of phospho-p38-MAPK by blue light has also been reported to occur in photoreceptors (Kuse et al., 2015), retinal-derived cells (Ji et al., 2011) and ARPE cells (Núñez-Álvarez et al., 2017). Thus, it appears that a common feature associated with a blue light insult involves the activation of p38-MAPK and for cell death to occur by necroptosis. Importantly, these negative influences of blue light on HCE-2 cells are attenuated by the use of red light which correlates with cell survival.

In conclusion, the corneal epithelium is exposed to increasing

amounts of blue light because of new artificial lighting laws and the constant use of smartphones and computers. Like ultraviolet light (Coroneo et al., 2011; Rogers et al., 2004), blue light causes oxidative stress that is known to be associated with corneal epithelial defects (Taylor et al., 1989). Our data derived from studies on HCE-2 cells argue for the idea that if the ocular surface is exposed to more than normal levels of red light it would provide protection to the corneal epithelium not only from increasing levels of visible blue light but also be able to blunt injuries to the corneal epithelium generally where oxidative stress is induced. We suggest that elevated higher intensities of red light should be used during corneal surgeries and to blunt injuries to corneal wounds generally. There is no reason to doubt that red light would not benefit all the processes (cell death, migration, proliferation, differentiation, and extracellular matrix remodeling) involved in corneal wound healing.

Disclosure

All authors have approved this final article as being true in representation of the experimental findings.

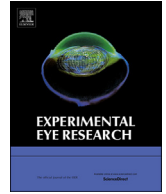
Acknowledgements

We are grateful to Enol Arttime, Joanna Serrano and Carlota Suárez-Barrio for their technical help and the financial from the Fundación BBVA. NNO and is holds a Cátedra de Biomedicina (Chair in Biomedicine).

References

- Amersi, F., Buelow, R., Kato, H., Ke, B., Coito, A.J., Shen, X.D., Zhao, D., Zaky, J., Melinek, J., Lassman, C.R., Kolls, J.K., Alam, J., Ritter, T., Volk, H.D., Farmer, D.G., Ghobrial, R.M., Busuttill, R.W., Kupiec-Wegliniski, J.W., 1999. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 104, 1631–1639. <https://doi.org/10.1172/JCI7903>.
- Artus, C., Boujrad, H., Bouharrou, A.A., Brunelle, M.-N.N., Hoos, S., Yuste, V.J., Lenormand, P., Rousselle, J.-C.C., Namane, A., England, P., Lorenzo, H.K., Susin, S.A., 2010. AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J.* 29, 1585–1599. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.43>.
- Balogun, E., Hoque, M., Gong, P., Killeen, E., Green, C.J., Foresti, R., Alam, J., Motterlini, R., 2003. Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem. J.* 371, 887–895. <https://doi.org/10.1042/BJ20021619>.
- Begum, R., Powner, M.B., Hudson, N., Hogg, C., Jeffery, G., 2013. Treatment with 670 nm Light Up Regulates Cytochrome C Oxidase Expression and Reduces Inflammation in an Age-Related Macular Degeneration Model. *PLoS One* 8, e57828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057828>.
- Bennett, M.C., Mlady, G.W., Kwon, Y.H., Rose, G.M., 1996. Chronic in vivo sodium azide infusion induces selective and stable inhibition of cytochrome c oxidase. *J. Neurochem.* 66, 2606–2611.
- Bonfiglio, V., Camillieri, G., Avitabile, T., Leggio, G.M., Drago, F., 2006. Effects of the COOH-terminal tripeptide alpha-MSH(11-13) on corneal epithelial wound healing: role of nitric oxide. *Exp. Eye Res.* 83, 1366–1372. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2006.07.014>.
- Coroneo, M., 2011. Ultraviolet radiation and the anterior eye. *Eye Contact Lens* 37, 214–224.
- Cuadrado, A., Nebreda, A.R., 2010. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem. J.* 429, 403–417. <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>.
- Dai, C., Li, B., Zhou, Y., Li, D., Zhang, S., Li, H., Xiao, X., Tang, S., 2016. Curcumin attenuates quercetin-induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF-  b pathway in human hepatocyte L02 cells. *Food Chem. Toxicol.* 95, 52–63. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2016.06.025>.
- Davies, S.P., Reddy, H., Caivano, M., Cohen, P., 2000. Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem. J.* 351, 95–105.
- Del Olmo-Aguado, S., N  n  ez-Álvarez, C., Osborne, N.N., 2016. Blue light action on mitochondria leads to cell death by necroptosis. *Neurochem. Res.* 41, 2324–2335. <https://doi.org/10.1007/s11064-016-1946-5>.
- Delavallée, L., Cabon, L., Galán-Malo, P., Lorenzo, H.K., Susin, S.A., 2011. AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* 63, 221–232. <https://doi.org/10.1002/iub.432>.
- Dua, H.S., Gomes, J.A., Singh, A., 1994. Corneal epithelial wound healing. *Br. J. Ophthalmol.* 78, 401–408.
- Eells, J.T., Gopalakrishnan, S., Valter, K., 2016. Near-Infrared photobiomodulation in retinal injury and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 854, 437–441. https://doi.org/10.1007/978-3-319-17121-0_58.
- Hamblin, M.R., 2018. Mechanisms and mitochondrial redox signaling in photobiomodulation. *Photochem. Photobiol.* 94, 199–212. <https://doi.org/10.1111/php.12864>.
- Hanus, J., Anderson, C., Wang, S., 2015. RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. *Ageing Res. Rev.* 24, 286–298. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2015.09.002>.
- He, M., Pan, H., Chang, R.C.-C., So, K.-F., Brecha, N.C., Pu, M., 2014. Activation of the Nrf2/HO-1 Antioxidant Pathway Contributes to the Protective Effects of Lycium Barbarum Polysaccharides in the Rodent Retina after Ischemia-Reperfusion-Induced Damage. *PLoS One* 9, e84800. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084800>.
- Ji, D., Kamalden, T.A., del Olmo-Aguado, S., Osborne, N.N., 2011. Light- and sodium azide-induced death of RGC-5 cells in culture occurs via different mechanisms. *Apoptosis* 16, 425–437. <https://doi.org/10.1007/s10495-011-0574-4>.
- Karu, T.I., Kolyakov, S.F., 2005. Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed. Laser Surg.* 23, 355–361. <https://doi.org/10.1089/pho.2005.23.355>.
- Karu, T.I., Pyatibrat, L.V., Afanasyeva, N.I., 2004. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem. Photobiol.* 80, 366–372. <https://doi.org/10.1562/2004-03-25-RA-123>.
- Keszler, A., Brandal, G., Baumgardt, S., Ge, Z.-D., Pratt, P.F., Riess, M.L., Bienengraeber, M., 2014. Far red/near infrared light-induced protection against cardiac ischemia and reperfusion injury remains intact under diabetic conditions and is independent of nitric oxide synthase. *Front. Physiol.* 5, 305. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00305>.
- Kokkinopoulos, I., Colman, A., Hogg, C., Heckenlively, J., Jeffery, G., 2013. Age-related retinal inflammation is reduced by 670 nm light via increased mitochondrial membrane potential. *Neurobiol. Aging* 34, 602–609. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.04.014>.
- Kruse, F.E., 1994. Stem cells and corneal epithelial regeneration. *Eye* 8, 170–183. <https://doi.org/10.1038/eye.1994.42>.
- Kuse, Y., Ogawa, K., Tsuruma, K., Shimazawa, M., Hara, H., 2015. Damage of photo-receptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci. Rep.* 4, 5223. <https://doi.org/10.1038/srep05223>.
- Lane, N., 2006. Cell biology: power games. *Nature* 443, 901–903. <https://doi.org/10.1038/443901a>.
- Leary, S.C., Hill, B.C., Lyons, C.N., Carlson, C.G., Michaud, D., Kraft, C.S., Ko, K., Glerum, D.M., Moyes, C.D., 2002. Chronic treatment with azide *in Situ* Leads to an irreversible loss of cytochrome c Oxidase activity via holoenzyme dissociation. *J. Biol. Chem.* 277, 11321–11328. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112303200>.
- Lee, J.-B., Kim, S.-H., Lee, S.-C., Kim, H.-G., Ahn, H.-G., Li, Z., Yoon, K.C., 2014. Blue light-induced oxidative stress in human corneal epithelial cells: protective effects of ethanol extracts of various medicinal plant mixtures. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 55, 4119–4127. <https://doi.org/10.1167/iov.13.13441>.
- Li, G.-Y.Y., Osborne, N.N., 2008. Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose) polymerase and apoptosis-inducing factor. *Brain Res.* 1188, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2007.10.073>.
- Ljubimov, A.V., Saghizadeh, M., 2015. Progress in corneal wound healing. *Prog. Retin. Eye Res.* 49, 17–45. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2015.07.002>.
- Marek, V., M  lik-Parsadaniantz, S., Villette, T., Montoya, F., Baudouin, C., Brignole-Baudouin, F., Denoyer, A., 2018. Blue light phototoxicity toward human corneal and conjunctival epithelial cells in basal and hyperosmolar conditions. *Free Radic. Biol. Med.* 126, 27–40. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.07.012>.
- Marino, S., Marani, L., Nazzaro, C., Beani, L., Siniscalchi, A., 2007. Mechanisms of sodium azide-induced changes in intracellular calcium concentration in rat primary cortical neurons. *Neurotoxicology* 28, 622–629. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.01.005>.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- N  n  ez-Álvarez, C., Del Olmo-Aguado, S., Merayo-Lloves, J., Osborne, N.N., 2017. Near infra-red light attenuates corneal endothelial cell dysfunction in situ and in vitro. *Exp. Eye Res.* 161, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2017.06.008>.
- Ono, K., Han, J., 2000. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell. Signal.* 12, 1–13.
- Osborne, N.N., Li, G.-Y.Y., Ji, D., Mortiboys, H.J., Jackson, S., 2008. Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies. *J. Neurochem.* 105, 2013–2028. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05320.x>.
- Osborne, N.N., N  n  ez-Álvarez, C., del Olmo-Aguado, S., 2014. The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglion cells. *Exp. Eye Res.* 128, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.08.012>.
- Osborne, N.N., N  n  ez-Álvarez, C., Del Olmo-Aguado, S., Merayo-Lloves, J., 2017. Visual light effects on mitochondria: the potential implications in relation to glaucoma. *Mitochondrion* 36, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.11.009>.
- Park, E.-J., Chae, J.-B., Lyu, J., Yoon, C., Kim, S., Yeom, C., Kim, Y., Chang, J., 2017. Ambient fine particulate matters induce cell death and inflammatory response by influencing mitochondria function in human corneal epithelial cells. *Environ. Res.* 159, 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.08.044>.
- Park, G.S., Kwon, N.S., Kim, Y.M., Kim, J.C., 2001. The role of nitric oxide in ocular surface diseases. *Kor. J. Ophthalmol.* 15, 59. <https://doi.org/10.3341/kjo.2001.15.2.59>.
- Pastore, D., Greco, M., Petragallo, V.A., Passarella, S., 1994. Increase in. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 34, 817–826.
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., Tzur, A., 2012. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* 3, e430. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.171>.

- Polster, B.M., 2013. AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a “complex” problem. *Neurochem. Int.* 62, 695–702. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2012.12.002>.
- Qamirani, E., Razavi, H.M., Wu, X., Davis, M.J., Kuo, L., Hein, T.W., 2006. Sodium azide dilates coronary arterioles via activation of inward rectifier K⁺ channels and Na⁺-K⁺-ATPase. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290, H1617–H1623. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00746.2005>.
- Rogers, C.S., Chan, L.M., Sims, Y.S., Byrd, K.D., Hinton, D.L., Twining, S.S., 2004. The effects of sub-solar levels of UV-A and UV-B on rabbit corneal and lens epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 78, 1007–1014.
- Safilulina, D., Veksler, V., Zharkovsky, A., Kaasik, A., 2006. Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *J. Cell. Physiol.* 206, 347–353. <https://doi.org/10.1002/jcp.20476>.
- Sosna, J., Voigt, S., Mathieu, S., Lange, A., Thon, L., Davarnia, P., Herdegen, T., Linkermann, A., Rittger, A., Chan, F.K.M., Kabelitz, D., Schütze, S., Adam, D., 2014. TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 331–348. <https://doi.org/10.1007/s00018-013-1381-6>.
- Stapleton, F., Alves, M., Bunya, V.Y., Jalbert, I., Lekhanont, K., Malet, F., Na, K.-S., Schaumberg, D., Uchino, M., Vehof, J., Viso, E., Vitale, S., Jones, L., 2017. TFOS DEWS II epidemiology report. *Ocul. Surf.* 15, 334–365. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.05.003>.
- Taylor, H.R., West, S.K., Rosenthal, F.S., Munoz, B., Newland, H.S., Emmett, E.A., 1989. Corneal changes associated with chronic UV irradiation. *Arch. Ophthalmol.* 1481–1484.
- Torricelli, A.A.M., Santhanam, A., Wu, J., Singh, V., Wilson, S.E., 2016. The corneal fibrosis response to epithelial-stromal injury. *Exp. Eye Res.* 142, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.09.012>.
- Tosini, G., Ferguson, I., Tsubota, K., 2016. Effects of blue light on the circadian system and eye physiology. *Mol. Vis.* 22, 61–72.
- Ursu, O.N., Sauter, M., Ettischer, N., Kandolf, R., Klingel, K., 2014. Heme oxygenase-1 mediates oxidative stress and apoptosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Cell. Physiol. Biochem.* 33, 52–66. <https://doi.org/10.1159/000356649>.
- Wade, M., 2015. Symptoms of dry eye disease [WWW document]. *Discov. Eye Found* (accessed 8.27.18). <https://discoveryeye.org/symptoms-of-dry-eye-disease/>.
- Wilson, S.E., Mohan, R.R., Mohan, R.R., Ambrósio, R., Hong, J., Lee, J., 2001. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 625–637.
- Wong-Riley, M.T.T.T., Liang, H.L., Eells, J.T., Chance, B., Henry, M.M., Buchmann, E., Kane, M., Whelan, H.T., 2005. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 280, 4761–4771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409650200>.
- Zagon, I.S., Sassani, J.W., McLaughlin, P.J., 1999. Cellular dynamics of corneal wound re-epithelialization in the rat. I. Fate of ocular surface epithelial cells synthesizing DNA prior to wounding. *Brain Res.* 822, 149–163.



Near infra-red light attenuates corneal endothelial cell dysfunction *in situ* and *in vitro*



Claudia Núñez-Álvarez, Susana del Olmo-Aguado, Jesús Merayo-Llodes, Neville N. Osborne*

Fundación de Investigación Oftalmológica, Avda. Doctores Fernández-Vega 34, E-33012 Oviedo, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 February 2017

Accepted in revised form 11 June 2017

Available online 13 June 2017

Keywords:

Red light

Mitochondria

Cytochrome c oxidase

Protection

Corneal endothelial cells

ABSTRACT

In the present study mechanical damage to the corneal endothelium was induced by elevation of intraocular pressure (IOP, 140 mmHg, 60 min) to one eye of rats, delivered either in complete darkness or in the presence of red light (16.5 W/m², 3000 lx, 625–635 nm). IOP raised in the dark revealed the endothelium to be damaged as staining for the gap junction protein ZO-1 was irregular in appearance with some cells displaced in position or lost to leave gaps or holes. This damage was clearly attenuated when red light was focused through the pupil during the insult of raised IOP. Moreover, staining of endothelium with JC-1 dye showed mitochondria to be activated by both elevated IOP and red light but the activation of mitochondria persisted longer for red light. We interpret this finding to suggest that raised IOP causes apoptosis of endothelial cells and that their mitochondria are activated in the initial stages of the process. In contrast, red light activates mitochondria to induce a protective mechanism to counteract the negative influence of raised IOP on endothelial cells. Evidence is provided to support this notion by the finding that red light stimulates mitochondrial cytochrome oxidase IV (COX IV). Moreover, mitochondria in corneal endothelial cell cultures are activated by red light, revealed by staining with JC-1, that results in an increased rate of proliferation and are also able to counteract toxic insults (sodium azide or cobalt chloride) to the cultures.

The present studies therefore show that a non-toxic level of red light attenuates damage to the corneal endothelium both *in situ* and *in vitro* through action on COX IV located in mitochondria that results in an enhancement of a cell's survival mechanisms. The study provides proof of principle for the non-invasive use of red-light therapy to attenuate any dysfunctions associated with the corneal endothelium and so preserve maximum visual acuity.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The corneal endothelium consists of specialised, flattened, mitochondria-rich cells, lining the posterior surface of the cornea to face the anterior chamber of the eye and being exposed to the aqueous humour. A major role of the corneal endothelium is to maintain corneal clarity. Human endothelial cells *in situ* rarely divide physiologically but have the ability to migrate and enlarge to compensate for small defects in the endothelial cell layer (Joyce, 2005; Senoo and Joyce, 2000; Wilson et al., 1993).

Corneal endothelial cell numbers decline for different reasons and decline has been described to occur following glaucoma

drainage device implantation (Lim, 2003), laser-assisted deep stromal dissection (Liu et al., 2014), phacoemulsification (Hayashi et al., 1996; Murano et al., 2008), intraocular lens insertion (Kaufman and Katz, 1976) and in acute angle-closure glaucoma because of elevated intraocular pressure (IOP) (Bigar and Witmer, 1982; Setala, 1979; Ytteborg and Dohlman, 1965). Should the corneal endothelial cell density fall below a critical threshold, the barrier and pump function of the endothelium cannot be maintained and the cornea becomes oedematous and can present as bullous keratopathy or even for corneal transplantation.

Corneal endothelium changes, as occur during phacoemulsification surgery, can be attenuated by use of hyaluronate. An increase in mean corneal thickness, endothelial permeability and active pump function can occur as a consequence of phacoemulsification surgery (Ravalico et al., 1997). Viscous dispersive and viscoelastic devices have also proved to offer protection to the corneal

* Corresponding author.

E-mail address: Neville.osborne@eye.ox.ac.uk (N.N. Osborne).

endothelium during cataract surgery (Ho and Afshari, 2015). In rabbits an elevation of ascorbic acid in the irrigation solution significantly reduces the amount of endothelial cell loss during phacoemulsification by approximately 70% (Rubowitz et al., 2003). Exciting recent reports show that ROCK inhibitors can be used as eye drops to promote corneal endothelial cell proliferation (Koizumi et al., 2013; Okumura et al., 2013) and also as adjunct drugs for cell-based therapy to enhance engraftment when treating corneal endothelial dysfunction (Okumura et al., 2012, 2016).

The aim of the present study is to demonstrate the use of near infra-red light as a potential non-invasive procedure for reducing corneal endothelium damage. A vast body of evidence exists which shows the beneficial effects of high-intensity red light at wavelengths between the far red and near infra-red spectrum of light (from 600 to 1000 nm). For example, photobiomodulation or near infra-red phototherapy has been shown to reduce inflammation and promote wound healing (Begum et al., 2013; Eells et al., 2004; Kokkinopoulos, 2013), cause complement propagation (Rutar et al., 2012), attenuate cell death in various types of cell cultures (Del Olmo-Aguado et al., 2012; Liang et al., 2006; Wong-Riley et al., 2005; Ying et al., 2008), improve recovery rates of soft tissue injuries and myocardial infarction (Oron et al., 2001; Simunovic et al., 2000) and blunt neuronal death (Albarracin et al., 2011; Del Olmo-Aguado et al., 2016; Johnstone et al., 2015; Peoples et al., 2012). The underlying mechanism behind the positive effects of near infra-red therapy is that it acts on mitochondrial cytochrome c oxidase (COX IV, also known as Complex IV) (Begum et al., 2013; Eells et al., 2003; Karu, 1999; Osborne et al., 2016a, 2016b; Wong-Riley et al., 2005), enhancing ATP formation and mitochondrial function so as to elicit beneficial effects that include reducing oxidative stress, inflammation and cell death. Long wavelength red light has the ability to penetrate through soft tissues, and at high intensities can ameliorate traumatic brain injury (Johnstone et al., 2015; Wu et al., 2012). In the case of the eye, long wavelength red light has been shown to protect against photoreceptor death *in situ* (Albarracin et al., 2011; Albarracin and Valter, 2012) as well as mitigate various induced retinal degenerations (Albarracin et al., 2013; Del Olmo-Aguado et al., 2016; Eells et al., 2003; Gkotsi et al., 2014). The possible non-invasive therapeutic use of near infra-red treatment in this way on ocular tissues during surgery or multiple times to the eye *in situ* therefore provides a potential to counteract damage to, for example, corneal endothelium cells through action on their mitochondria.

In the present study corneal endothelium cells *in situ* were damaged by raising the IOP in rats either in the presence or absence of red light with the goal of determining the beneficial influence of red light. Moreover, cultures of corneal endothelial cells were exposed to different chemical insults to provide support for the notion that red light has an action on mitochondria to enable its 'protective effect' to be elicited.

2. Materials and methods

Animal experiments conformed to the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research. The methods used for anaesthesia and to induce euthanasia (overdose injection of sodium pentobarbital) were approved by the regional animal oversight committee (Principado de Asturias, Spain). Rats were maintained on a 12 h dark–light cycle where humidity and temperature were controlled and allowed free access to food and water *ad libitum*.

2.1. Studies related to the rat cornea

Damage to male Wistar rat (approximately 300 g) corneal

endothelial cells *in situ* was implemented by elevation of IOP. Rats were anaesthetised with ketamine/xylazine and then placed in a stereotaxic frame. A commercial mixture of Gonioftal (Alcon) was applied to the cornea to reduce drying. One eye served as a control and a 30-gauge needle was inserted into the anterior chamber of the other eye, connected to a raised 5% glucose/saline reservoir to cause the IOP to increase to 120 mmHg. This was maintained for 60 min either in darkness (less than 20 lx room light) or where 16.5 W/m² (3000 lx) of red light (625–635 nm) was directed through the pupil and above the cornea. Rats were sacrificed either directly after elevation of IOP or 90 min and 3 days thereafter.

In some instances corneas were immediately dissected and transferred to a culture medium. This consisted of a mixture of L-15 Leibovitz (Sigma)/foetal bovine serum (Gibco) (85: 15 v/v) media, ascorbate (Sigma, 87 ng/ml), epithelial growth factor (Sigma, 10 ng/ml) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco). After addition of JC-1 (1 µg/ml) for 10 min corneas were flat mounted and microscopically observed, endothelium cells face up. JC-1 is a monomeric complex and accumulates in living healthy mitochondria to appear green in colour in the cytoplasm of cells. When mitochondria become active and polarised above their resting level JC-1 is converted to a polymeric complex and then is red in colour. Images of the central corneal endothelium were produced by using a × 20 lens with the appropriate filters to distinguish between the monomeric (green) and polymeric (red) complexes of JC-1.

ImageJ software was used to quantify relative levels of intensities of green/red JC-1 fluorescence as well as loss of endothelial cells in the central corneal endothelium (approximately 2.25 mm²) by analysis of a number of images of approximate area 0.38 mm².

Whole eyes or dissected corneas were also immediately fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate buffer solution (PBS) for 2 h and 45 min, respectively, followed by three washes in PBS. Whole eyes were cryopreserved in sucrose before sectioning to produce frozen cross sections of cornea and, together with whole fixed corneas, were then processed for the localisation of the tight junction protein ZO-1. Tissues were first incubated in 10% goat serum/PBS for 60 min followed by incubation overnight in anti-ZO-1 antibody (Abcam, 1: 500/PBS) and then developed with a secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (1: 300/PBS) for 2 h followed by a wash in PBS and mounted in Dako. In some instances, DAPI (0.2 g/ml) was added to the wash solution of PBS.

Rat corneas were also subjected to Western blot analysis for COX IV. Extraction of proteins from the cornea was carried out by homogenisation followed by freeze/thawing and sonication in cocktail lysis buffer (1 ml/10 mg tissue) that contained phosphatase and protease inhibitors (Sigma, Aldrich). Defined amounts of protein extract (determined using a bicinchoninic acid protein kit) and sample buffer (2 M Tris/HCl, pH 6.8, containing 8% SDS, 40% glycerol, 8% mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue) were then mixed together and heated for 5 min at 95 °C. Following electrophoresis with 12.5% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS, proteins were transferred to a sheet of 0.22 µm nitrocellulose and incubated overnight at 4 °C with antibodies that recognise either actin (Millipore, 1: 4000/PBS) or COX IV (Abcam, 10 µg/ml PBS), followed by development with biotinylated secondary antibodies. Nitrocellulose blots were then placed in a 0.016% w/v solution of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) in 50 mM sodium acetate (pH 5.0) containing 0.05% (v/v) Tween-20 and 0.03% (v/v) H₂O₂ to detect proteins and terminated by use of 0.05% sodium azide/PBST solution. The density of the individual protein bands was quantified by means of ImageJ software.

2.2. Cell culture studies

Corneas dissected from immediately killed adult Wistar male rats (overdose of sodium pentobarbital), were incubated overnight in L15 Leibovitz (Sigma) medium containing 1% penicillin/streptomycin (Gibco). Using fine forceps, endothelium layers were peeled from corneas and placed in 0.25% trypsin (Gibco) for 30 min. Following neutralisation with an equal amount of culture medium and centrifugation (10 min, $400 \times g$), pellets (derived from 16 corneas) were re-suspended in culture medium and seeded in a six-well plate. After a period of 10–15 days in culture, cell confluency was generally reached.

In order to carry out viability assays, confluent cultures were passaged and 100 μ l of suspended cells in culture medium (concentration of 100,000 cells/ml) transferred to 96-well plates for 48 h before being subjected to various treatment regimes. To assay for cell viability, MTT was added at a final concentration of 0.5 mg/ml to wells for 1 h at 37 °C. Medium was then removed and reduced MTT (blue formazan crystals) was solubilised by adding 100 μ l DMSO to each well. After agitation of the plates for 15 min, the optical density of the solubilised crystals was measured using an automated microplate reader at 570 nm wavelength.

In some instances confluent cultured endothelial cells were treated with JC-1 as described for the intact cornea. In other cases the cultures were fixed in 4% paraformaldehyde and processed for

the localisation of ZO-1 and Na^+/K^+ -ATPase using anti- Na^+/K^+ -ATPase (Sigma, 1: 100) as described for the cornea.

3. Results

3.1. Studies on the rat cornea

Endothelial cells *in situ* displayed a mosaic appearance in flat mounted rat corneas with their gap junctions staining regularly for the protein ZO-1. This was also the case in control anaesthetised rats where red or no light was directed through their pupils for 60 min (Figs. 1 and 2). However, 3 days after an insult of elevated IOP a disruption of the corneal epithelium occurred with the staining for ZO-1 appearing irregular in distribution, suggesting that some cells had been displaced or lost to leave gaps or holes (Fig. 1). A loss of endothelium cells caused by the insult was also suggested in corneal sections, where ZO-1 immunoreactivity was discontinuous rather than the continuous staining of the endothelium in control corneas (Fig. 2). These histological changes to the corneal endothelium caused by elevation of IOP appeared to be attenuated when exposed to red light (see Figs. 1 and 2).

To quantify the 'protective effect' of red light at reducing damage to the corneal endothelium 3 days after elevation of IOP, areas of gaps and endothelial cells attached to the stroma in three microscopic fields (2.25 mm^2) in the central cornea were measured by a

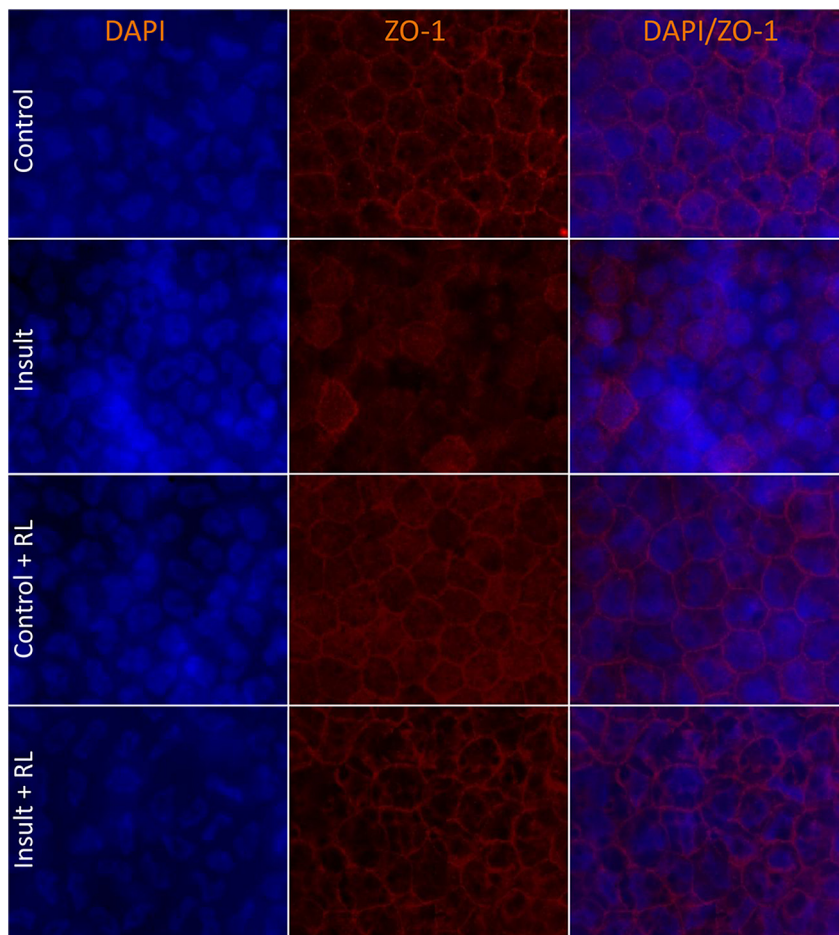


Fig. 1. Localisation of ZO-1 immunoreactivity in flat mounts of rat corneal endothelium 60 min after being in darkness (control) or red light (control + RL). Also shown are images of the corneal endothelium 3 days after an insult of raised IOP for 60 min either in darkness (insult) or red light (insult + RL). DAPI was used to localise individual endothelial cells. From the staining for ZO-1 and DAPI (and the merged images for ZO-1/DAPI) it is clear that elevated IOP causes damage to the corneal endothelium, revealed by an irregular appearance of ZO-1 staining and with some endothelial cells lost or displaced in position to leave gaps or holes. These negative effects of raised IOP on the corneal endothelium were most severe when the insult took place in darkness rather than in the presence of red light.

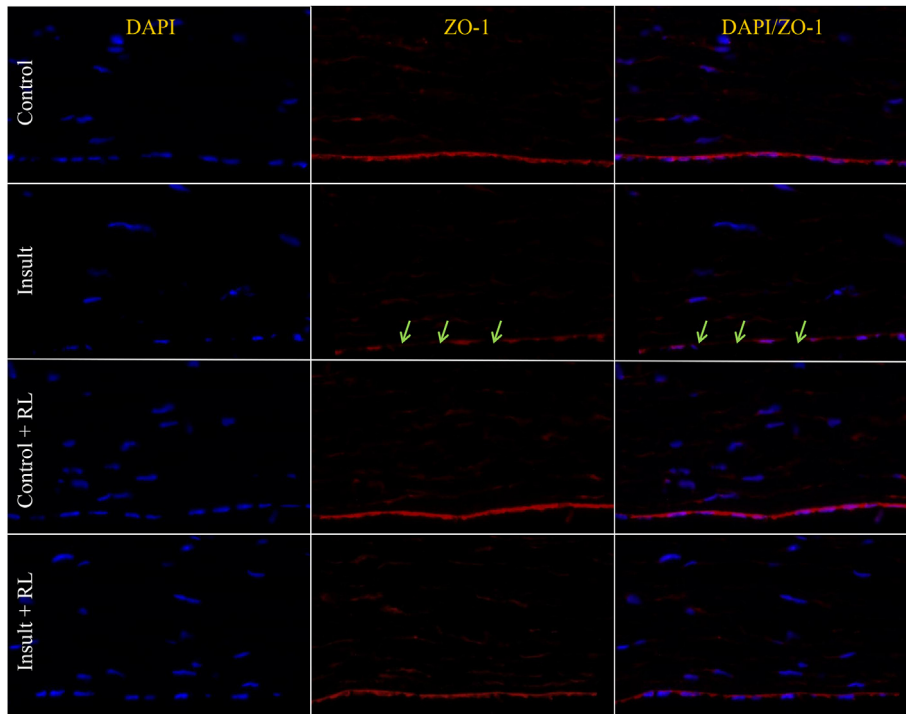


Fig. 2. Localisation of ZO-1 immunoreactivity in sections of rat corneal endothelium 60 min after being in darkness (control) or red light (control + RL). Also shown are images of representative corneal sections 3 days after an insult of raised IOP for 60 min either in darkness (insult) or red light (insult + RL). DAPI was used to localise individual endothelial cells. From the staining for ZO-1 and DAPI (and the merged images for ZO-1/DAPI) it is clear that elevated IOP causes a loss of some endothelial cells, leaving gaps in the endothelium indicated by the arrows. This negative effect of raised IOP to cause a loss of corneal endothelial cells was most severe when the insult took place in darkness rather than in the presence of red light.

computer-assisted procedure (Fig. 3). Analysis of corneas from five animals showed that raised IOP caused a clear loss of endothelial cells and that this loss was significantly reduced when red light was present (Fig. 3). It also appeared from histology that the mosaic appearance of the endothelial cell layer in control corneas was

better preserved by exposure to red light.

JC-1 staining of the cornea also showed that raised IOP affected some mitochondria of endothelial cells that remained attached to the stroma. JC-1 accumulates in mitochondria, appearing green in fluorescence (530 nm) and red/orange in fluorescence (590 nm)

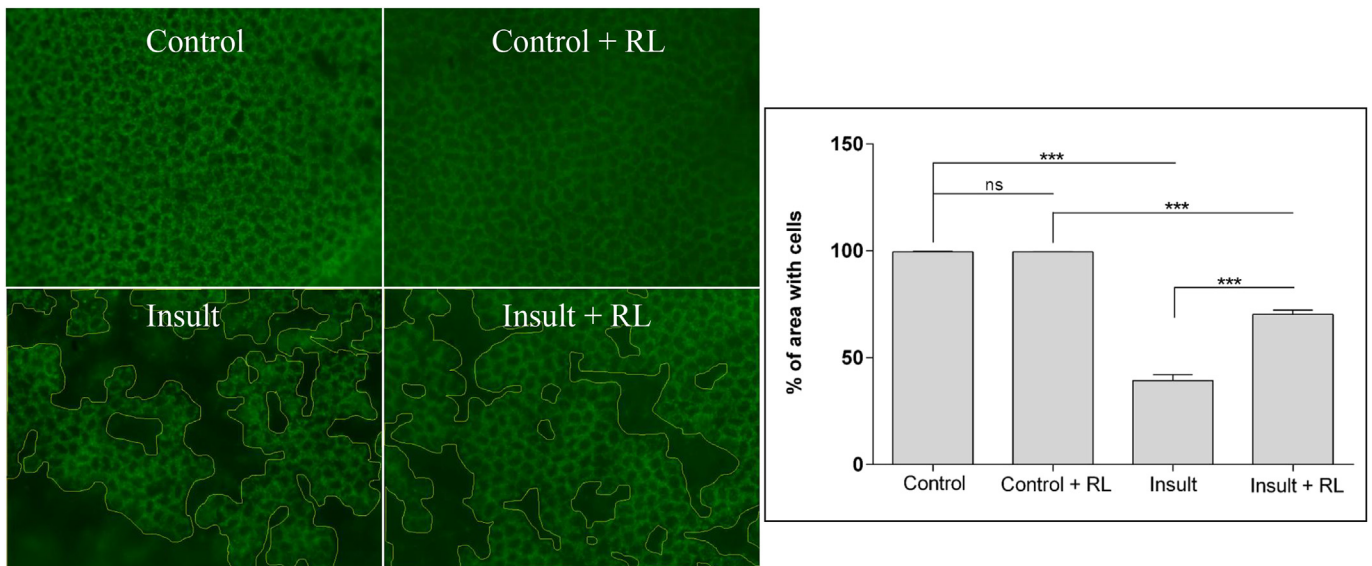


Fig. 3. Representative pictures of rat corneal endothelium 3 days following an insult of raised IOP in darkness (insult) or red light (insult + RL). Raised IOP resulted in areas of corneal endothelium devoid of cells. Areas devoid of cells and areas of endothelial cells that remained attached to the stroma in three microscopic fields (2.25 mm²) in the central cornea were measured by a computer-assisted procedure. Analysis of corneas from five animals showed that raised IOP caused a significant loss (***) of endothelial cells and that this loss was significantly reduced when red light was present. It also appeared from histology that the mosaic appearance of the endothelial cell layer in control corneas is better preserved by exposure to red light. Results are expressed as a mean value ± SEM where N = 5.

when the organelles are activated. Figs. 4 and 5 show a number of images of endothelium stained with JC-1 directly (Fig. 4) and 90 min (Fig. 5) after removal of the cornea from rats where IOP was elevated. The filter used to photograph the images in the left hand panels in Figs. 4 and 5 reveals JC-1 staining at 590 nm (red). The panels on the right hand side of the figures show merged images of JC-1 staining at 590 nm (red) and 530 nm (green). Directly after elevation of IOP some surviving attached endothelial cells had increased aggregation of JC-1 thus appearing red in colour and it was similarly elevated when red light was present (Fig. 4). In control corneas where IOP was not elevated, JC-1 appeared primarily to be green in colour although a hint of red staining was evident when exposed to red light. Analysis of merged images of corneas stained with JC-1 90 min after elevated IOP showed low intensities of JC-1 red staining in their endothelium as in the absence of elevation of IOP; significantly, rats that receive both elevated IOP and red light exhibited a greater amount of JC-1 red staining (Fig. 5). Fig. 6 shows semi-quantitative analysis of the relative intensities of red

(590 nm) and green (530 nm) JC-1 fluorescence in microscope fields from the central cornea. The combined results reveal that directly after elevation of IOP a significant increase of activated mitochondria (red fluorescence) occurred both in the absence and presence of red light (Fig. 6a). However, this was not the case when analysis was undertaken 90 min after elevation of IOP (Fig. 6b). We interpret the overall findings to show that the mitochondrial membrane potentials are activated in corneal endothelial cells by both an insult of raised IOP and red light and the red light effect persists for a greater period.

Fig. 7 shows the level of COX IV in relation to actin in corneas from rats directly after being subjected to elevated IOP in the absence or presence of red light (Fig. 7). It can be seen that relative to actin, COX IV was upregulated in corneas exposed to red light when compared with the dark. Moreover, raised IOP caused a decrease in the level of COX IV and this reduction was less in the presence of red light.

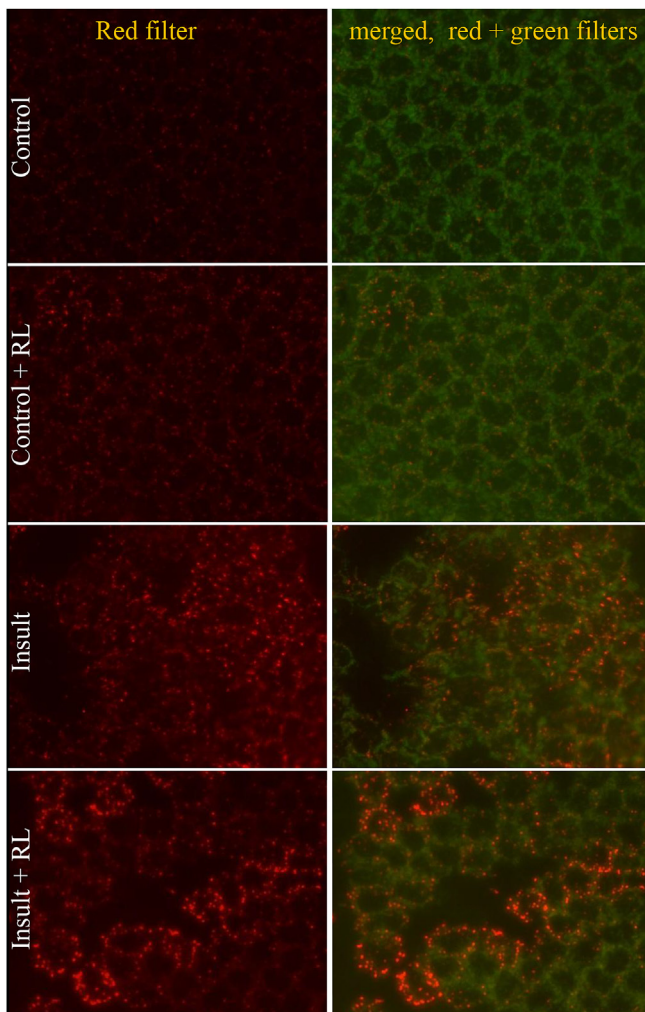


Fig. 4. Representative photographs of rat corneal endothelium stained with JC-1 directly after an insult of raised IOP. The filter used to photograph the images in the left hand panels reveals JC-1 staining at 590 nm (red filter). The panels on the right hand side of the figures show merged images of JC-1 staining at 590 nm (red filter) and 530 nm (green filter). It can be seen that directly after elevation of IOP (insult) some surviving attached endothelial cells had increased aggregation of JC-1 thus appearing red in colour and aggregation was similarly elevated when red light (insult + RL) was present. Control tissue hardly stained red with JC-1, and when exposed to red light (control + RL) the red staining appeared slightly enhanced.

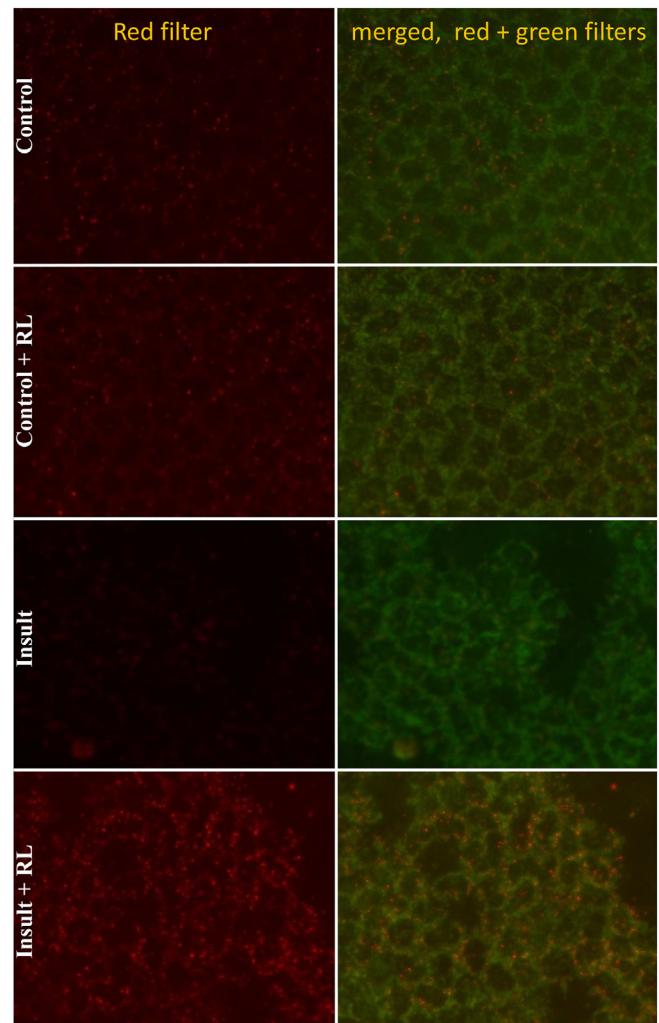


Fig. 5. Representative photographs of rat corneal endothelium stained with JC-1 90 min after an insult of raised IOP. The filter used to photograph the images in the left hand panels reveals JC-1 staining at 590 nm (red filter). The panels on the right hand side of the figures show merged images of JC-1 staining at 590 nm (red filter) and 530 nm (green filter). The images of corneas stained with JC-1 90 min after elevated IOP showed similar low intensities of JC-1 red staining as associated with the endothelium (insult) in tissue where IOP was not elevated (control) or exposed to red light (control + RL). However, rats that received both an elevation of IOP and red light (insult + RL) clearly exhibited a greater amount of JC-1 red staining (Fig. 5).

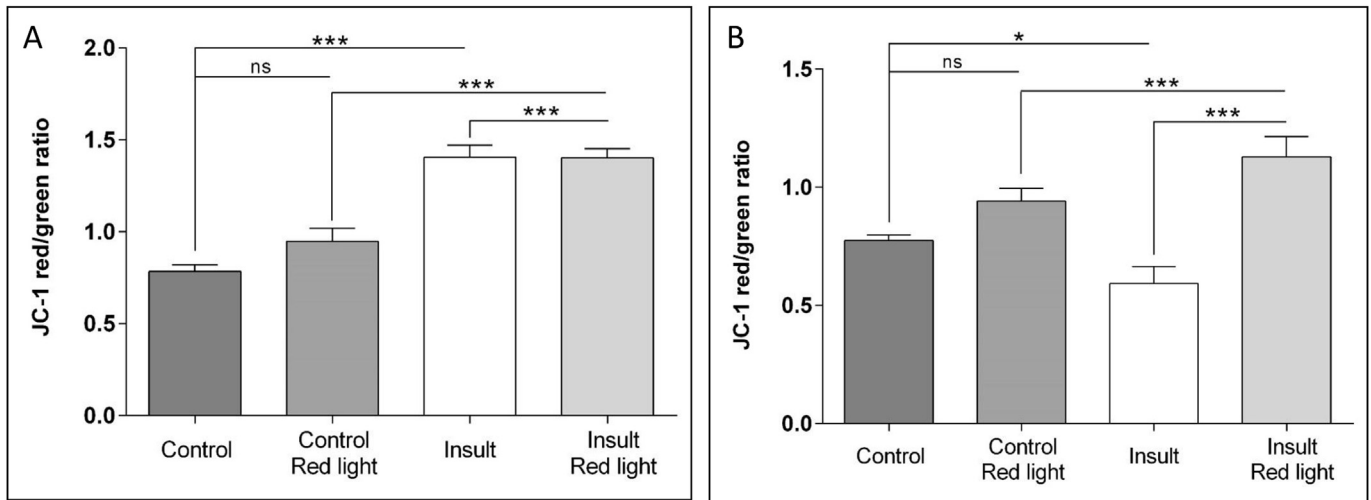


Fig. 6. Quantitative analysis of the merged images of JC-1 staining at 590 nm (red filter) and 530 nm (green filter) as shown in the right hand panels in Fig. 5 and 6. The analysis suggests that directly after elevation of IOP a significant increase of activated mitochondria (red fluorescence) occurs both in the absence and presence of red light (a). However, this was not the case when analysis was undertaken 90 min after elevation of IOP (b). We interpret the overall findings to show that the mitochondrial membrane potentials are activated in corneal endothelial cells by both an insult of raised IOP and red light and the red light effect persists for a greater period. Results are expressed as a mean value \pm SEM where N = 5 (***) $<$ 0.001 or * $<$ 0.05; one-way ANOVA with post-hoc Tukey's multiple comparison test).

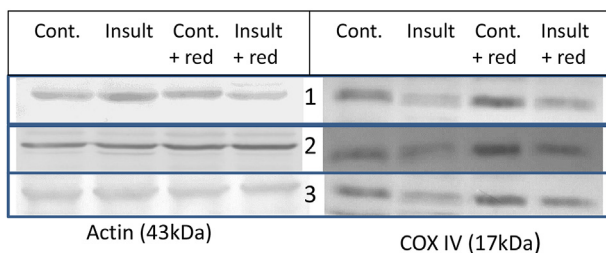
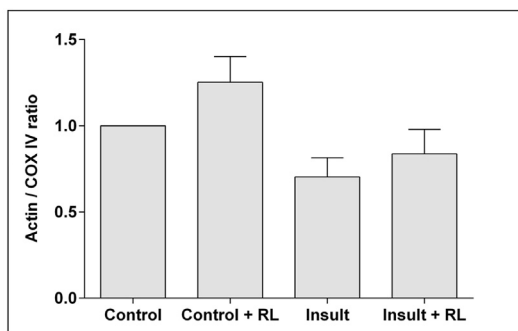


Fig. 7. Level of cytochrome c oxidase or Complex IV in relation to actin in corneas from rats directly after being subjected to elevated IOP in the absence (insult) or presence of red light (insult + RL). It can be seen that relative to actin (N = 3), Complex IV is upregulated in corneas exposed to red light (RL) when compared with the dark (control). Moreover, raised IOP causes a decrease in the level of Complex IV and this reduction is less in the presence of red light.

3.2. Studies on cultures of endothelial cells

Confluent cultures of rat endothelial cells expressed the gap junction protein ZO-1 to provide a mosaic appearance similar to that in the intact cornea (Fig. 8). Moreover, the cells stained positively for Na^+/K^+ -ATPase which is known to play a crucial part in the pump functions of corneal endothelial cells *in situ*. Importantly, when confluent cultures are exposed to red light (3000 lx or 16.5 W/m^2 for 60 min) their mitochondria rapidly accumulate JC-1 to exhibit a red fluorescence (Fig. 9), suggesting their stimulation. In contrast, mitochondria in cells not exposed to red light are unstimulated and as a consequence accumulated JC-1 appears

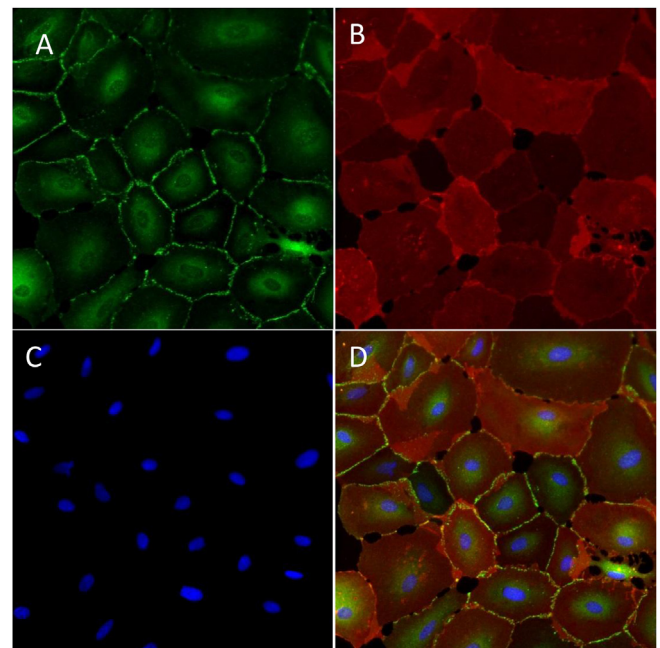


Fig. 8. Confluent culture of primary rat endothelial cells stained for the gap junction protein ZO-1 (a), Na^+/K^+ -ATPase (b) and DAPI (c). (c) is a merged image of the staining. It can be seen that the cultures show characteristics as for endothelial cells *in situ* where a typical mosaic appearance for the ZO-1 separating cells from each other is apparent and cells show the presence of Na^+/K^+ -ATPase that is known to play a crucial part in the pump functions of endothelial cells.

green in fluorescence (Fig. 9).

Figs. 10 and 11 provide evidence that red light enhances cell viability in sub-confluent endothelial cultures. In these studies, cultures were pre-treated for 1 h with red light (800 lx or 4.4 W/m^2) and exposed thereafter for a further 18 h to red light but in the presence of the toxins sodium azide (10 mM) or cobalt chloride ($250 \mu\text{M}$). Other cultures were treated in the same way but not exposed to red light. Histologically (Fig. 10) and quantitatively (Fig. 11), the negative influence of sodium azide and cobalt chloride on cell numbers is clearly seen to be attenuated by red light.

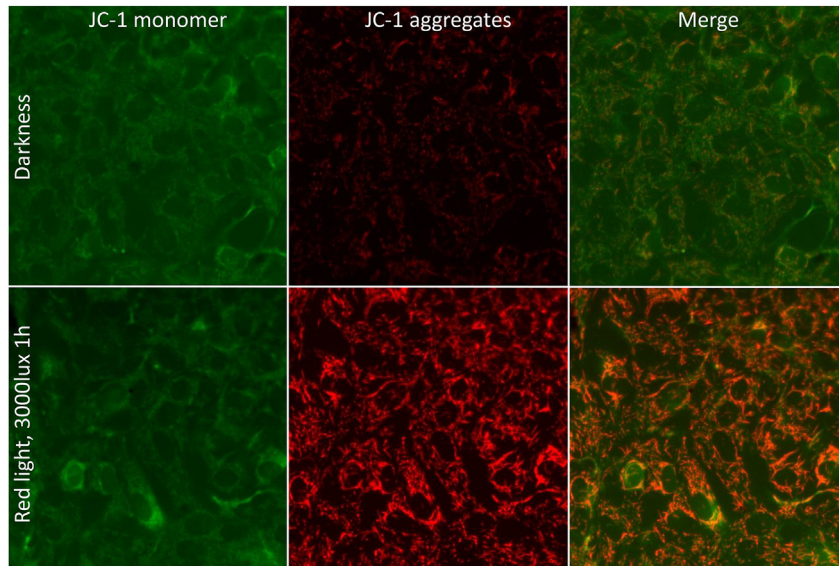


Fig. 9. Confluent cultures of primary rat endothelial cells stained for JC-1 that were either exposed to red light for 60 min or maintained in the dark. It can be seen that following exposure to red light, their mitochondria rapidly accumulate JC-1 to exhibit a red fluorescence (JC-1 aggregates) suggesting their stimulation. In contrast, cells not exposed to red light and maintained in the dark accumulated little JC-1 appearing as a green fluorescence (JC-1 monomer). The panels on the right hand side show merged images of JC-1 staining at 590 nm (red filter) and 530 nm (green filter).

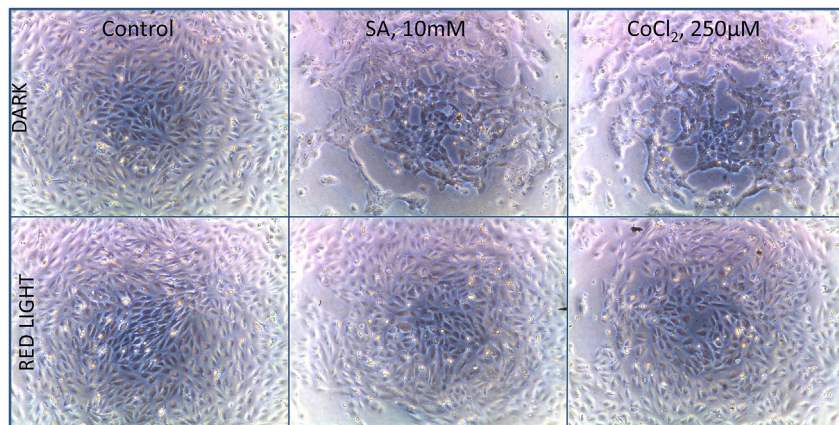


Fig. 10. Images of passaged cultures from primary endothelial cells maintained in the dark or exposed to red light in the presence of sodium azide (SA) or cobalt chloride (CoCl_2). It can be seen that control cultures exposed to red light appear more confluent than when in the dark. Moreover, cultures exposed to the toxins SA or CoCl_2 are negatively affected more in the dark than in the presence of red light.

It is logical to assume that the proliferation rate of cells in cultures is stimulated by red light because of the activation of their mitochondria, as suggested by the use of JC-1 (see Fig. 9). Fig. 12 shows this to be the case where it can be seen by use of the MTT assay that cell proliferation is enhanced by red light (18 h exposure to 4.4 W/m^2) when compared to darkness. The positive effect of red light on cell proliferation was visually observed in the studies shown in Fig. 13. In these studies a defined area of cells in culture was scraped away 48 h after plating (at a concentration of 100,000 cells/ml) and then either maintained in darkness or in red light. It can be seen that over time the scraped area became repopulated with cells faster in the presence of red light compared with the dark.

4. Discussion

Damage to the corneal endothelium caused by trauma because of elevated IOP, inflammation, penetrating injuries and ageing can

result in the transparency of the cornea being impaired and affect visual acuity (Edelhauser, 2006; Mimura et al., 2013). Corneal endothelial cells have an abundance of mitochondria (Greiner et al., 2015; Jurkunas et al., 2010; Ramey et al., 2007) and in the present study we showed, through the use of the dye JC-1, that red light activates such corneal endothelial mitochondria both in culture and *in situ* (Figs. 4, 5 and 9). JC-1 allows indication of the functional status of cell mitochondria and red light induces hyperpolarisation (Perelman et al., 2012). We therefore conclude that such an effect of red light on endothelium mitochondria results in a 'protective' effect being elicited that can result in counteraction of injury to the corneal endothelium both *in situ* (caused by elevation of IOP) or in cell cultures, caused by toxic chemicals such as sodium azide and cobalt chloride.

An abundance of evidence exists to show that long wavelength (>670 nm) red light has the capacity to, for example, stimulate wound healing, activate complement, blunt oxidative stress and inflammation and attenuate cell death (Del Olmo-Aguado et al.,

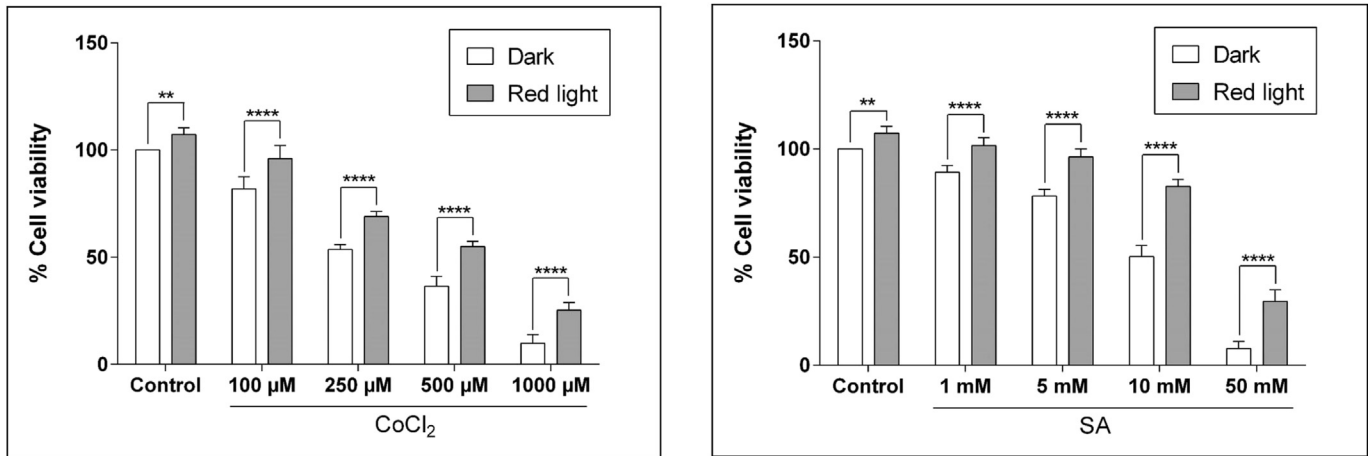


Fig. 11. MTT viability analysis of passed cultures from primary endothelial cells exposed to different amounts of sodium azide or cobalt chloride in the presence and absence of red light. The data show a dose–response relationship for the toxicity of sodium azide and cobalt chloride to cultures of corneal endothelial cells. Moreover, they reveal that in the presence of red light the negative effects of cobalt chloride and sodium azide are significantly attenuated by red light. Results are expressed as a mean value \pm SEM where $N = 6$ ($**** < 0.001$ or $** < 0.01$; Anova plus Šidák test).

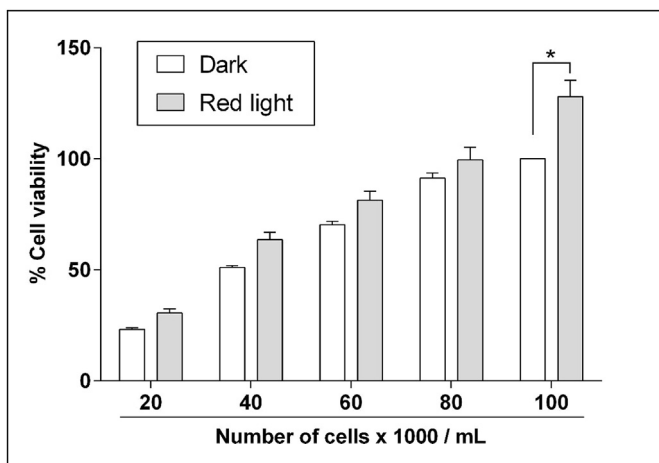


Fig. 12. MTT viability analysis showing that cell proliferation is enhanced by red light (18 h exposure to 4.4 W/m^2) when compared to darkness but that this is only evident when the number of cells in the cultures is appropriate. Results are expressed as a mean value \pm SEM where $N = 3$ ($* < 0.05$; Anova plus Šidák test).

2016; Liang et al., 2006; Wong-Riley et al., 2005; Ying et al., 2008). Specifically in the eye, red light protects against photoreceptor death (Albarracín et al., 2011; Albarracín and Valter, 2012; Natoli et al., 2010; Osborne et al., 2016a, 2016b; Rojas et al., 2008), ameliorates diabetic retinopathy (Saliba et al., 2015; Tang et al., 2013), reduces dendropathy (Beirne et al., 2016), mitigates oxygen-induced degeneration (Albarracín et al., 2013) and attenuates histopathological changes in the retina induced by a variety of insults (Albarracín et al., 2011, 2013; Albarracín and Valter, 2012; Begum et al., 2013; Eells et al., 2004; Natoli et al., 2010; Rojas et al., 2008; Wong-Riley et al., 2005). It has also been reported that red light can ameliorate injury to the brain and spinal cord (Huang et al., 2012; Ishiguro et al., 2010; Moro et al., 2013; Peoples et al., 2012; Wu et al., 2012) in animals. We are unaware of any studies to date that have demonstrated that red light can preserve the corneal endothelium *in situ*.

Staining of the gap junction protein ZO-1 provides a regular mosaic appearance of endothelial cells in the intact cornea (Figs. 1 and 2). However, after raising IOP, ZO-1 staining is irregular in appearance, with some cells clearly dislodged and stripped from

the corneal stroma (Figs. 1 and 2). This disorganisation of ZO-1 staining and the frequency and size of gaps associated with the corneal endothelium was less obvious when IOP was raised in the presence of red light. Through the use of a computer-assisted procedure (Fig. 3) to quantify the gap areas in relation to areas of endothelium that remained attached to the stroma it could be concluded that the number of cells lost from the endothelium because of raised IOP in the dark is significantly greater than when red light is present.

Strong experimental evidence shows that red light activates mitochondrial COX IV (Begum et al., 2013; Eells et al., 2003; Karu, 1999; Wong-Riley et al., 2005) resulting in an increase in the synthesis of ATP and nitric oxide (Begum et al., 2013; Gkotsi et al., 2014; Lim et al., 2009; Poyton and Ball, 2011) and the induction of specific intracellular signalling pathways and their transcription factors (Begum et al., 2013; Eells et al., 2003; Karu, 1999; Wong-Riley et al., 2005). In an attempt to provide evidence that red light stimulates mitochondrial COX IV in the corneal endothelium, Western blot analysis of whole corneas was undertaken. The results support the view that COX IV is upregulated in the cornea following exposure to red light in both control corneas and after elevation of IOP (Fig. 7).

Our studies show also that immediately after an insult of raised IOP corneal endothelial cell mitochondria are activated, becoming more hyperpolarised (more red in colour) both in the presence and absence of red light (Figs. 4 and 6). An increase in the activation of endothelial cell mitochondria also occurs when exposed to red light. However, staining of corneas with JC-1 90 min after elevation of IOP (Figs. 5 and 6) revealed a slightly different picture. In this case mitochondria appeared to be unstimulated by raised IOP but nevertheless were activated (increase in red fluorescence) when red light was present. Control corneal endothelial cell mitochondria were activated slightly more by red light than when in the dark. We interpret these findings to suggest that raised IOP causes death of endothelial cells and that their mitochondria are activated in the initial stages of apoptosis and as a consequence this activation is observed with JC-1 if the staining takes place immediately after the insult. Endothelial mitochondria are also activated by red light but in a more sustained manner to allow for detection with JC-1 at different times. Moreover, such an activation of mitochondria leads to cell survival rather than death.

Studies carried out on sub-confluent cultures of rat corneal endothelial cells showed that red light can blunt injury to such cells as well as stimulate proliferation (Figs. 10–13). While it is generally

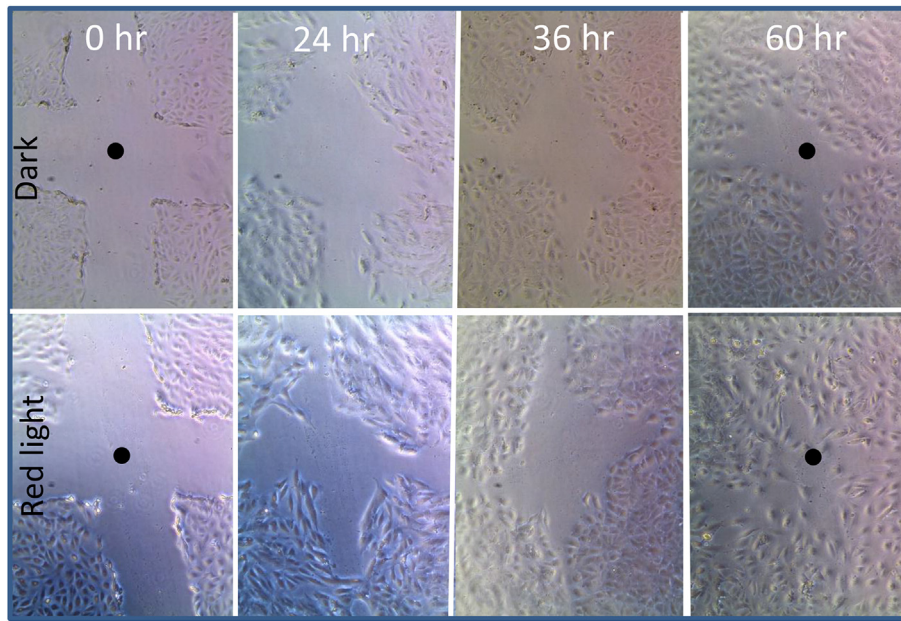


Fig. 13. The positive effect of red light on cell proliferation is visually observed in studies on corneal endothelial cell cultures. In these studies a defined area of cells in culture was scraped away 48 h after plating (at a concentration of 100,000 cells/ml) and then either maintained in darkness or in red light. It can be seen (reference to the dark spot) that over time the scraped area becomes re-populated with cells faster in the presence of red light compared with the dark.

accepted that corneal endothelial cells do not proliferate *in situ*, studies on animals suggest that this might occur to a limited degree in some situations (Bredow et al., 2014; Schwartzkopff et al., 2010). The possibility exists, therefore, that part of the protective effect of red light on the rat corneal endothelium caused by elevated IOP is due to an increased rate of cell proliferation and this is supported by the cell culture results shown in Figs. 10 and 11. However, it is important to note that to generate the data shown in Figs. 10 and 11 sub-confluent passaged corneal endothelial cultures were used. These cultures were derived from primary confluent corneal endothelial cultures that have features similar to the corneal endothelium *in situ* in that they do not proliferate any further and express the gap junction protein ZO-1 and also contain Na^+/K^+ -ATPase (Fig. 8). Results obtained from the use of sub-confluent proliferating cultures must be therefore be viewed with caution as they do not equate with endothelial cells in the cornea or primary confluent corneal endothelial cell cultures. However, data derived from the use of sub-confluent corneal endothelial cell cultures (Figs. 10–13) are useful as they provide insight into the consequences of red light. Red light is clearly shown to be able to counteract injury caused by toxic chemicals like sodium azide or cobalt chloride (Figs. 10 and 11) and to also stimulate cell proliferation (Figs. 12 and 13), the latter being most clearly observed when cell numbers are plated appropriately.

The present studies show that red light delivered through the rat pupil attenuates damage caused to the corneal endothelium because of raised IOP. Precisely the same regime of treatment to rats also results in the protection of the retina (Del Olmo-Aguado et al., 2016). These studies involved the use of a specific amount of red light (625–635 nm, 16.5 W/m^2 or 3000 lx) known to have no detrimental influence on cell cultures (Del Olmo-Aguado et al., 2016). However, it would not be naïve to suggest that alternative treatment strategies with red light might need to be designed to clinically treat dysfunctions of the human cornea or retina. Basic science studies show the possible beneficial influence of red-light therapy for human ocular disorders although it is essential to identify optimum conditions for the treatment of a defined ocular defect. It is therefore important to consider factors such as, the

nature of the irradiation source (laser or light-emitting diode), the mode of delivery (pulsed or continuous) and stimulation wavelength, as well as the rate, duration and frequency of treatments used need establishing in each case.

Disclosure

All authors have approved this final article as being true in representation of the experimental findings.

Acknowledgements

Financial support is gratefully acknowledged from the Fundación BBVA and the Fundación Endesa.

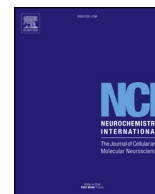
NNO and is a Cátedra de Biomedicina (Chair in Biomedicine).

The technical support from Enol Artime and Manuel Chacón are gratefully acknowledged.

References

- Albarracin, R., Eells, J., Valter, K., 2011. Photobiomodulation protects the retina from light-induced photoreceptor degeneration. *Investigative Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 3582–3592.
- Albarracin, R., Natoli, R., Rutar, M., Valter, K., Provis, J., 2013. 670 nm light mitigates oxygen-induced degeneration in C57BL/6 J mouse retina. *BMC Neurosci.* 14, 125.
- Albarracin, R., Valter, K., 2012. 670 nm red light preconditioning supports Muller cell function: evidence from the white light-induced damage model in the rat retina. *Photochem Photobiol.* 88, 1418–1427.
- Begum, R., Powner, M.B., Hudson, N., Hogg, C., Jeffery, G., 2013. Treatment with 670 nm light up regulates cytochrome C oxidase expression and reduces inflammation in an age-related macular degeneration model. *PLoS One* 8, e57828.
- Beirne, K., Rozanowska, M., Votruba, M., 2016. Red light treatment in an axotomy model of neurodegeneration. *Photochem. Photobiol.* 92, 624–631.
- Bigar, F., Witmer, R., 1982. Corneal endothelial changes in primary acute angle-closure glaucoma. *Ophthalmology* 89, 596–599.
- Bredow, L., Schwartzkopff, J., Reinhard, T., 2014. Regeneration of corneal endothelial cells following keratoplasty in rats with bullous keratopathy. *Mol. Vis.* 20, 683–690.
- Del Olmo-Aguado, S., Manso, A.G., Osborne, N.N., 2012. Light might directly affect retinal ganglion cell mitochondria to potentially influence function. *Photochem Photobiol.* 88, 1346–1355.
- Del Olmo-Aguado, S., Núñez-Álvarez, C., Osborne, N.N., 2016 Sep. Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death

- in situ. *Acta Ophthalmol.* 94 (6), e481–e491.
- Edelhauser, H.F., 2006. The balance between corneal transparency and edema: the proctor lecture. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 1754–1767.
- Eells, J.T., Henry, M.M., Summerfelt, P., Wong-Riley, M.T., Buchmann, E.V., Kane, M., Whelan, N.T., Whelan, H.T., 2003. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 3439–3444.
- Eells, J.T., Wong-Riley, M.T., VerHoeve, J., Henry, M., Buchman, E.V., Kane, M.P., Gould, L.J., Das, R., Jett, M., Hodgson, B.D., Margolis, D., Whelan, H.T., 2004. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion* 4, 559–567.
- Gkotsi, D., Begum, R., Salt, T., Lascaratos, G., Hogg, C., Chau, K.-Y., Schapira, A.H.V., Jeffery, G., 2014. Recharging mitochondrial batteries in old eyes. near infra-red increases ATP. *Exp. Eye Res.* 122, 50–53.
- Greiner, M.A., Burckart, K.A., Wagoner, M.D., Schmidt, G.A., Reed, C.R., Liaboe, C.A., Flamme-Wiese, M.J., Zimmerman, M.B., Mullins, R.F., Kardon, R.H., Goins, K.M., Aldrich, B.T., 2015. Regional assessment of energy-producing metabolic activity in the endothelium of donor corneas. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 2803–2810.
- Hayashi, K., Hayashi, H., Nakao, F., Hayashi, F., 1996. Risk factors for corneal endothelial injury during phacoemulsification. *J. Cataract. Refract. Surg.* 22, 1079–1084.
- Ho, J.W., Afshari, N.A., 2015. Advances in cataract surgery: preserving the corneal endothelium. *Curr. Opin. Ophthalmol.* 26, 22–27.
- Huang, L., Xuan, Y., Koide, Y., Zhiyentayev, T., Tanaka, M., Hamblin, M.R., 2012. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg. Med.* 44, 490–499.
- Ishiguro, M., Ikeda, K., Tomita, K., 2010. Effect of near-infrared light-emitting diodes on nerve regeneration. *J. Orthop. Sci.* 15, 233–239.
- Johnstone, D.M., Moro, C., Stone, J., Benabid, A.L., Mitrofanis, J., 2015. Turning on lights to stop neurodegeneration: the potential of near infrared light therapy in alzheimer's and Parkinson's disease. *Front. Neurosci.* 9, 500.
- Joyce, N.C., 2005. Cell cycle status in human corneal endothelium. *Exp. Eye Res.* 81, 629–638.
- Jurkunas, U.V., Bitar, M.S., Funaki, T., Azizi, B., 2010. Evidence of oxidative stress in the pathogenesis of fuchs endothelial corneal dystrophy. *Am. J. Pathol.* 177, 2278–2289.
- Karu, T., 1999. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem Photobiol. B* 49, 1–17.
- Kaufman, E., Katz, J.L., 1976. Endothelial damage from intraocular lens insertion. *Invest. Ophthalmol.* 15, 996–1000.
- Koizumi, N., Okumura, N., Ueno, M., Nakagawa, H., Hamuro, J., Kinoshita, S., 2013. Rho-associated kinase inhibitor eye drop treatment as a possible medical treatment for Fuchs corneal dystrophy. *Cornea* 32, 1167–1170.
- Kokkinopoulos, I., 2013. 670 nm LED ameliorates inflammation in the CFH(-/-) mouse neural retina. *J. Photochem Photobiol. B* 122, 24–31.
- Liang, H.L., Whelan, H.T., Eells, J.T., Meng, H., Buchmann, E., Lerch-Gaggl, A., Wong-Riley, M., 2006. Photobiomodulation partially rescues visual cortical neurons from cyanide-induced apoptosis. *Neuroscience* 139, 639–649.
- Lim, K.S., 2003. Corneal endothelial cell damage from glaucoma drainage device materials. *Cornea* 22, 352–354.
- Lim, W., Kim, J.H., Gook, E., Kim, J., Ko, Y., Kim, I., Kwon, H., Lim, H., Jung, B., Yang, K., Choi, N., Kim, M., Kim, S., Choi, H., Kim, O., 2009. Inhibition of mitochondria-dependent apoptosis by 635-nm irradiation in sodium nitroprusside-treated SH-SY5Y cells. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 850–857.
- Liu, T., Zhang, J., Sun, D., Sui, W., Zhang, Y., Li, D., Chen, Z., Gao, H., 2014. Comparative study of corneal endothelial cell damage after femtosecond laser assisted deep stromal dissection. *Biomed. Res. Int.* 2014, 731565.
- Mimura, T., Yamagami, S., Amano, S., 2013. Corneal endothelial regeneration and tissue engineering. *Prog. Retin Eye Res.* 35, 1–17.
- Moro, C., Torres, N., El Massri, N., Ratel, D., Johnstone, D.M., Stone, J., Mitrofanis, J., Benabid, A.L., 2013. Photobiomodulation preserves behaviour and midbrain dopaminergic cells from MPTP toxicity: evidence from two mouse strains. *BMC Neurosci.* 14, 40.
- Murano, N., Ishizaki, M., Sato, S., Fukuda, Y., Takahashi, H., 2008. Corneal endothelial cell damage by free radicals associated with ultrasound oscillation. *Arch. Ophthalmol.* 126, 816–821.
- Natoli, R., Zhu, Y., Valter, K., Bisti, S., Eells, J., Stone, J., 2010. Gene and noncoding RNA regulation underlying photoreceptor protection: microarray study of dietary antioxidant saffron and photobiomodulation in rat retina. *Mol. Vis.* 16, 1801–1822.
- Okumura, N., Koizumi, N., Kay, E.P., Ueno, M., Sakamoto, Y., Nakamura, S., Hamuro, J., Kinoshita, S., 2013. The ROCK inhibitor eye drop accelerates corneal endothelium wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 2493–2502.
- Okumura, N., Koizumi, N., Ueno, M., Sakamoto, Y., Takahashi, H., Tsuchiya, H., Hamuro, J., Kinoshita, S., 2012. ROCK inhibitor converts corneal endothelial cells into a phenotype capable of regenerating in vivo endothelial tissue. *Am. J. Pathol.* 181, 268–277.
- Okumura, N., Okazaki, Y., Inoue, R., Kakutani, K., Nakano, S., Kinoshita, S., Koizumi, N., 2016. Effect of the rho-associated kinase inhibitor eye drop (ripasudil) on corneal endothelial wound healing. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 57, 1284–1292.
- Oron, U., Yaakobi, T., Oron, A., Mordechovitz, D., Shofti, R., Hayam, G., Dror, U., Gepstein, L., Wolf, T., Haudenschild, C., Haim, S.B., 2001. Low-energy laser irradiation reduces formation of scar tissue after myocardial infarction in rats and dogs. *Circulation* 103, 296–301.
- Osborne, N.N., Nunez-Alvarez, C., Del Olmo-Aguado, S., Merrayo-Lloves, J., 2016a. Visual light effects on mitochondria: the potential implications in relation to glaucoma. *Mitochondrion*.
- Osborne, N.N., Núñez-Álvarez, C., Joglar, B., Del Olmo-Aguado, S., 2016b. Glaucoma: focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur. J. Pharmacol.*
- Peoples, C., Shaw, V.E., Stone, J., Jeffery, G., Baker, G.E., Mitrofanis, J., 2012. Survival of dopaminergic amacrine cells after near-infrared light treatment in MPTP-treated mice. *ISRN Neurol.* 2012, 850150.
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., Tzur, A., 2012. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis.* 3, e430.
- Poyton, R.O., Ball, K.A., 2011. Therapeutic photobiomodulation: nitric oxide and a novel function of mitochondrial cytochrome c oxidase. *Discov. Med.* 11, 154–159.
- Ramey, N.A., Park, C.Y., Gehlbach, P.L., Chuck, R.S., 2007. Imaging mitochondria in living corneal endothelial cells using autofluorescence microscopy. *Photochem Photobiol.* 83, 1325–1329.
- Ravalico, G., Tognetto, D., Palomba, M.A., Lovisato, A., Baccara, F., 1997. Corneal endothelial function after extracapsular cataract extraction and phacoemulsification. *J. Cataract. Refract. Surg.* 23, 1000–1005.
- Rojas, J.C., Lee, J., John, J.M., Gonzalez-Lima, F., 2008. Neuroprotective effects of near-infrared light in an in vivo model of mitochondrial optic neuropathy. *J. Neurosci.* 28, 13511–13521.
- Rubowitz, A., Assia, E.I., Rosner, M., Topaz, M., 2003. Antioxidant protection against corneal damage by free radicals during phacoemulsification. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 1866–1870.
- Rutar, M., Natoli, R., Albarracin, R., Valter, K., Provis, J., 2012. 670-nm light treatment reduces complement propagation following retinal degeneration. *J. Neuroinflammation* 9, 257.
- Saliba, A., Du, Y., Liu, H., Patel, S., Roberts, R., Berkowitz, B.A., Kern, T.S., 2015. Photobiomodulation mitigates diabetes-induced retinopathy by direct and indirect mechanisms: evidence from intervention studies in pigmented mice. *PLoS One* 10, e0139003.
- Schwartzkopff, J., Bredow, L., Mahlenbrey, S., Boehringer, D., Reinhard, T., 2010. Regeneration of corneal endothelium following complete endothelial cell loss in rat keratoplasty. *Mol. Vis.* 16, 2368–2375.
- Senoo, T., Joyce, N.C., 2000. Cell cycle kinetics in corneal endothelium from old and young donors. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 41, 660–667.
- Setala, K., 1979. Corneal endothelial cell density after an attack of acute glaucoma. *Acta Ophthalmol. (Copenh)* 57, 1004–1013.
- Simunovic, Z., Ivankovich, A.D., Depolo, A., 2000. Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group. *J. Clin. Laser Med. Surg.* 18, 67–73.
- Tang, J., Du, Y., Lee, C.A., Talahalli, R., Eells, J.T., Kern, T.S., 2013. Low-intensity far-red light inhibits early lesions that contribute to diabetic retinopathy: in vivo and in vitro. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 3681–3690.
- Wilson, S.E., Walker, J.W., Chwang, E.L., He, Y.G., 1993. Hepatocyte growth factor, keratinocyte growth factor, their receptors, fibroblast growth factor receptor-2, and the cells of the cornea. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 34, 2544–2561.
- Wong-Riley, M.T., Liang, H.L., Eells, J.T., Chance, B., Henry, M.M., Buchmann, E., Kane, M., Whelan, H.T., 2005. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 280, 4761–4771.
- Wu, Q., Xuan, W., Ando, T., Xu, T., Huang, L., Huang, Y.Y., Dai, T., Dhital, S., Sharma, S.K., Whalen, M.J., Hamblin, M.R., 2012. Low-level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths. *Lasers Surg. Med.* 44, 218–226.
- Ying, R., Liang, H.L., Whelan, H.T., Eells, J.T., Wong-Riley, M.T.T., 2008. Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP+ induced neurotoxicity. *Brain Res.* 1243, 167–173.
- Ytteborg, J., Dohlman, C.H., 1965. Corneal edema and intraocular pressure. II. clinical results. *Arch. Ophthalmol.* 74, 477–484.



Blue light exacerbates and red light counteracts negative insults to retinal ganglion cells *in situ* and R28 cells *in vitro*



C. Núñez-Álvarez, N.N. Osborne*

Fundación de Investigación Oftalmológica, Avda. Doctores Fernández-Vega 34, E-33012, Oviedo, Asturias, Spain

ARTICLE INFO

Keywords:

Ganglion cells: R28 cells
Mitochondria
Glaucoma
Visual light
Neuroprotection

ABSTRACT

Neurons are dependent on their mitochondria to produce the necessary amounts of ATP for survival. Retinal ganglion cells (RGCs) have a particularly large number of mitochondria which—unlike neurons in the brain—are exposed to visual light of 400–850 nm. Here we demonstrate that short wavelength visual blue light negatively affects mitochondrial function, causing oxidative stress and decreased cell survival. In contrast, long wavelength red light enhances mitochondrial function to increase survival of cultured R28 cells and reduce the effects of blue light. Induction of retinal ischemia for 60 min in dark conditions caused a reduction in ATP levels accompanied by decreased RGC numbers in all areas of the retina. These effects were diminished when ischemia was induced with concomitant delivery of red light, and exacerbated when blue light was used. We conclude that while the levels of blue light that reach the human retina will be a fraction of those used in the present study, the chronic nature might, on a theoretical basis, be detrimental to RGC mitochondria which are already affected by conditions such as glaucoma. Our findings also show that exposing the retina to red light may be a therapeutic approach to supporting healthy mitochondrial functions as part of the treatment for retinal diseases in which these organelles are affected.

1. Introduction

The survival of retinal ganglion cells (RGCs) is critical for visual processing, perception and other processes, as they transfer information of the visual environment to the brain (Dhande and Huberman, 2014; Martersteck et al., 2017). However, RGCs are susceptible to damage that can occur in the case of acute disease such as ischemic optic neuropathy and optic neuritis, or chronic diseases such as glaucoma (Osborne et al., 2001; Quigley, 2016; Sharif, 2018; Vidal-Sanz et al., 2012). Retinal ischemia and retinal artery or vein occlusions can cause damage to RGC cell bodies in the optic nerve head (ONH). Enhancing the viability of RGCs in order to maintain their function is a major goal of basic and translational research. Current approaches have focused on the development of drugs to reduce RGC loss and prolong vision in diseases such as glaucoma (Chidlow et al., 2007; Doozandeh and Yazdani, 2016; Hanumunthadu et al., 2014). Consequently, candidate drugs have been identified from studies using animal glaucoma models and various cell culture systems (Hanumunthadu et al., 2014; Osborne et al., 2014; Sena and Lindsley, 2017). Although valuable information has been generated, the intended neuroprotection is yet to be achieved, and determining target sites and appropriate delivery of drugs for the treatment of chronic retinal diseases remain a challenge.

Like all neurons of the central nervous system, RGCs depend on mitochondrial-generated ATP in order to survive (Chan, 2006; Osborne et al., 2014; Schon and Manfredi, 2003). It has been suggested that RGC mitochondrial dysfunction accounts for their susceptibility to damage that ultimately results in the loss of vision in glaucoma (Casson et al., 2012; Flammer et al., 2002; Osborne, 2010; Osborne et al., 2006; Pache and Flammer, 2006; Weinreb and Khaw, 2004). This dysfunction can be initiated *in vitro* by the inhibition of enzyme processes which affect oxidative phosphorylation, leading to reduced ATP formation and increased oxidative stress, to finally result in cell death (Boveris and Navarro, 2008; Dietrich and Horvath, 2010; Harman, 1981; Osborne et al., 2014). Experimental studies have also shown that light of different wavelengths can directly affect oxidative phosphorylation when it is absorbed by mitochondrial chromophores (Bell and Hall, 1981; García and Silva, 1997; Gorgidze et al., 1998; Hockberger et al., 1999; Mellerio, 1994; Ortiz de Montellano, 1995; Wataha et al., 2004). This could be key to the survival of RGCs because of their high numbers of mitochondria (Bristow et al., 2002; Carelli et al., 2004; Wang et al., 2003) and exposure to visual light (400–900 nm) where their mitochondrial proteins are directly affected by this light. Studies have shown that blue light (400–480 nm) causes reduced ATP formation, indicating its potential to further damage RGCs *in situ*, as is likely to be

* Corresponding author.

E-mail address: neville.osborne@eye.ox.ac.uk (N.N. Osborne).

the case in glaucoma subjects (Osborne, 2010; Osborne et al., 2017, 2014, 2006, 2001). In contrast, red light (680–900 nm) has been reported to be absorbed by cytochrome-c-oxidase (COX) and enhance mitochondrial function thereby reducing the damage caused by a variety of conditions (Albarracín et al., 2013; Begum et al., 2013; Beirne et al., 2017; del Olmo-Aguado et al., 2016; Eells et al., 2003; Gkotsi et al., 2014; Karu, 1999; Osborne et al., 2016; Wong-Riley et al., 2005). Thus, increasing normal energy levels of red light to reach the retina offers a non-invasive approach to enhance mitochondrial functions for treatment of glaucoma subjects where RGC mitochondria are compromised.

Here we report that visual blue light induces mitochondrial damage to RGCs and cells originating from an R28-derived retinal precursor cell line (Seigel, 2014). In contrast, visual red light mitigates the damage to mitochondria caused by blue light. Additionally, exposure of healthy tissues to red light, as opposed to being in the dark, elicits protective endogenous influences. We conclude that the rate of RGC loss in glaucoma might be slowed by reducing and elevating normal levels of visual blue and red light, respectively that normally impinges on the retina.

2. Methods

Cell culture: The R28 cells (Kerafast, Inc. Boston, MA, USA) were grown in high glucose and pyruvate Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, catalogue number: 41966) supplemented with 3.3% v/v sodium bicarbonate solution (Gibco, catalogue number: 25080), 10% FBS, 1% MEM non-essential amino acids (Gibco, catalogue number: 11140), 1% MEM vitamins (Gibco, catalogue number: 11120), 1% L-glutamine and 1% gentamicin, in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C.

From a suspension of cultured R28 cells (80,000 cells/ml), 0.1, 0.2 or 1.5 ml were placed in 96, 48 or 6-well plates respectively and allowed to settle for 24 h before subjecting the cells to various treatment regimes. For example, cells were exposed to defined concentrations of the mitochondrial toxins (all from Sigma-Aldrich) rotenone (inhibitor of complex I) (catalogue number: R8875), 3-nitropropionic acid (3-NP, inhibitor of complex II) (catalogue number: N5636), antimycin A (inhibitor of complex III) (catalogue number: A8674), sodium azide (inhibitor of complex IV) (catalogue number: S2002), carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP an inhibitor of oxidative phosphorylation) (catalogue number: C2759), cobalt chloride (to mimic experimental hypoxia) (catalogue number: C8661) or glutamate (to mimic oxidative stress) (catalogue number: 49621) for 24 h in either darkness or the presence of red light (range between 580–575 nm with a peak of 630 nm, 6.5 W/m²). In addition, cells exposed for 24 h to different intensities of red or blue light. Moreover, cells were incubated for 12 h in either darkness, blue light (range 410–530 nm with peak of 470 nm, 12.08 W/m²) or red light (630 nm, 6.5 W/m²) and then exposed to a further 12 h of darkness, blue light or red light. Red or blue light was delivered by LEDs (Electro DH SL, Barcelona, Spain) and the temperature maintained at 37 °C throughout. The intensity of light emitted from LEDs was checked by use of a spectrophotometer bought from Konica Minolta CL-70F.

Cell viability: Assessment of cell viability was carried out using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay (Mosmann, 1983) with some modifications. Briefly, cells in 96-well plates were subjected to the appropriate treatment and then MTT was added at a final concentration of 0.5 mg/ml and the cells incubated for 75 min at 37 °C. Medium was then removed and reduced MTT (blue formazan crystals) solubilised by adding 100 µl dimethyl sulfoxide (DMSO) to each well. After agitation of the plates for 10 min, the optical density of the solubilised crystals at 570 nm was measured using an automated microplate reader. The average absorbance of controls in each experiment was defined as 100% and related the average absorbance of cells subjected to various treatment regimes.

Mitochondrial depolarisation: Medium was removed from the cultures (96-well plates) and cells incubated cells with JC-1 dye (2 µg/ml) for 30 min to assess mitochondrial membrane depolarisation. The dye accumulates in mitochondria appearing as red/orange fluorescence (detected at 590 nm) in healthy organelles, or green (detected at 530 nm) when the membrane is depolarised (Perelman et al., 2012).

Production of ROS: Medium was removed from the cultures (96-well plates), washed twice with fresh medium, and then incubated with dihydroethidium (40 µM) for 20 min. The solution was removed, washed twice with fresh medium. Images were recorded immediately using phase fluorescence/contrast microscopy. The formation of ROS was assessed by the presence of red fluorescent chromatin in the nuclei.

Immunocytochemistry: The R28 cells were cultured in 6-well plates and fixed with paraformaldehyde followed by washing with phosphate buffer saline (PBS). After incubation with goat serum (10% in PBS) for 60 min and further washing with PBS, cultures were incubated with anti-HO-1 (ADI-SPA895 Enzo LS, 1:500) at 4 °C overnight. Cells were washed with PBS then exposed to a rabbit secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (1:300) for 3 h, followed by washing with PBS. Next, DAPI (0.2 µg/ml) was added to the wash solution. Images were obtained using a Leica DMI6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems).

Studies on rat retinas: Induction of ischemia in rats was carried out in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmology and Vision Research. The procedures used for anaesthesia and euthanasia (a blow to the head/neck region and decapitation) were approved by the regional animal oversight committee (University of Oviedo (Spain), Principado de Asturias, Spain) and are described elsewhere (del Olmo-Aguado et al., 2016). A total of 81 rats were given ischemia and maintained in the animal facility at constant humidity and temperature under a 12 h dark-light cycle. Access to food and water was allowed *ad libitum*. For the induction of experimental ischemia, rats (9–11-week-old male Wistar rats, approximately 300 g) were anaesthetised with ketamine/xylazine 80/10 mg/kg. A second injection of 1/3 of the initial anaesthetic solution was used to maintain rats slept for 60 min. Then, rats were and placed in a stereotaxic frame. Drops of a commercial mix of oxybuprocaine hydrochloride (4 mg/ml) and tetracaine hydrochloride (1 mg/ml) (Alcon, USA) were applied to both eyes causing mydriasis and reducing discomfort due to drying of the cornea. One eye of each animal was used as a control and the pupil of the other eye was cannulated with a 30-gauge needle and connected to a raised 5% glucose/saline reservoir, causing the intraocular pressure (IOP) to increase to 160 mmHg. The elevation of IOP was maintained for 60 min, and ischemia confirmed by whitening of the fundus. Ischemia was induced either in near darkness (less than 20 lux room light), in the presence of blue (range between 410–530 nm with peak of 470 nm) or in red (range between 580–575 nm with peak of 630 nm) light. The corneal intensities of blue and red light were 26.3 W/m² and 16.5 W/m², respectively. Previous studies have established that red light delivered to cells in culture at this intensity for 60 min caused no harmful effects (del Olmo-Aguado et al., 2016). Care was taken to maintain a normal body temperature during procedures. The analgesia included the use of buprenorphine at 0.05 mg/kg that was administered two days, once the same day of the ischemia and another injection 24 h later. Rats were monitored twice daily and none exhibited signs of discomfort or abnormal behaviour. Rats were sacrificed around 15 days after ischemia. Previous studies have shown that optimum measurable changes in RGC death can be observed at such a time (Sellés-Navarro et al., 1996).

Ganglion cell number analysis: Ganglion cells (Brn3a-positive cells) were determined in whole retinas dissected from ischemic and control fixed eyes (n = 8) where temporal regions were clearly marked. Fixed retinas were placed in 0.01% NaBH₄ for 2 min and washed in PBS. Retinas were incubated with 10% donkey serum to block non-specific binding for 1 h, then incubated with agitation in a solution of either antiserum for Brn3a (sc-31984 SantaCruz Biotech, 1:100), GFAP

(Z0334 Dako, 1:500) or isolectin IB4 (L2895 Sigma, 1:1000) containing 0.1% Triton-X and 1% donkey serum for 4 days at 4 °C. After washing with PBS, Brn3a- and GFAP-exposed retinas were exposed to secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 594 (1:300) for 24 h. The isolectin IB4 antibody (Sigma-Merck, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was purchased conjugated with FITC. Retinas were flat mounted, ganglion side up, in Dako mounting medium. Images were recorded using a Leica DM6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems) at 20× magnification, and Brn3a-positive cells in 0.3 mm² retinal areas at a distance of 335 μm from the temporal to nasal region were determined using ImageJ software (ImageJ 1.46r, NIH, Bethesda, MD, USA).

Western blot analysis: Retinas were placed in a lysis buffer (approximately 1 ml/10 mg tissue) containing phosphatase and protease inhibitors (Sigma-Aldrich). Extraction of proteins was carried out by homogenisation followed by freeze/thawing and homogenisation (in the case of ocular tissues) and sonication. The protein content was determined using a bicinchoninic acid protein kit (Sigma-Aldrich). Protein extracts were mixed with sample buffer (2 M Tris/HCl, pH 6.8, containing 8% SDS, 40% glycerol, 8% mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue) and immediately heated for 5 min at 95 °C. Proteins were fractionated by electrophoresis using 10% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS, as described by Laemmli (1970). Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and incubated overnight at 4 °C with anti-actin (MAB1501 Millipore, 1:4000), anti-Brn3a (1:500; Santa Cruz, Dallas, TX, USA) which was followed by detection with appropriate biotinylated secondary antibodies. Finally, nitrocellulose blots were developed using a 0.016% w/v solution of 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) in 50 mM sodium acetate (pH 5.0) containing 0.05% (v/v) Tween-20 and 0.03% (v/v) H₂O₂. The colorimetric reaction was stopped with 0.05% sodium azide/PBST solution and the density of the individual bands quantified using ImageJ software (NIH). N refers to the number of experimental animals subjected to western blot analysis. No pools or homogenate were done.

Analysis of ATP levels: Dissected whole retinas were assayed for ATP content using an assay kit (CLS II, Bioluminescence kit; Roche Applied Sciences) by precisely following the manufacturer's instructions.

3. Results

All chemicals applied to R28 cells caused a reduction in cell viability at a defined concentration (Fig. 1A). Irradiation with blue light caused increased cell death at specific intensities, while red light had no significant effect on viability at the tested intensities (Fig. 2A). The concentration of each chemical that was required to reduce cell viability by 30–35% after 24 h was significantly lower when cells were incubated in red light at 6.5 W/m² compared with dark conditions (Fig. 1B). The decreased cell viability caused by blue light at 12.08 W/m² was attenuated by exposure to red light either before or after irradiation with blue light (Fig. 2B). This observation was noted when cells were maintained in alternating 12 h cycles of darkness and red or blue light over 24 h (Fig. 2B). These conditions also revealed that red light led to increased cell proliferation after 12 and 24 h compared with dark conditions, thereby increasing the amount of viable cells.

Results derived from cells exposed to regimes of light conditions (Fig. 2) stained to reveal mitochondrial function with JC-1 (Fig. 3) or oxidative stress (using dihydroethidium or DHE; Fig. 4) paralleled each other. Green JC-1 dye indicates de-energised or unhealthy affected mitochondria (Fig. 3), while DHE appears as a bright red fluorescent nuclear stain when nuclei have been submitted to oxidative stress (Fig. 4). Following 24 h exposure to blue light few cells remained attached to the culture plates (cell death causes cell detachment) and their mitochondria appear green with JC-1 staining. Mitochondria in R28 cells that had been exposed solely to red light for 12 or 24 h were unaffected (JC-1 stain remains red in colour), which was also observed for cells maintained in the dark (Fig. 3). Blue light-induced toxicity caused increased production of ROS. In contrast, red light caused no

increase in ROS, and it counteracted the effect of blue light whether given before or after the insult (Fig. 4).

Cells exposed to similar regimes of light (Fig. 2) showed blue light to increase cytoplasmic levels of the stress protein HO-1. This was not observed in cells maintained in dark or red-light conditions, in which little staining for HO-1 was observed. Exposure to red light reduced the effects of blue light in terms of HO-1 expression when provided either before or after irradiation with blue light (Fig. 5).

Ischemia of the rat retina (induced in near-darkness and with 5 min reperfusion) caused a significant decrease in the ATP content compared with retinas from control eyes (Fig. 6). This decrease was greater when blue light was present during ischemia, but was reduced when red light was used. Moreover, retinas from rats exposed to blue light as compared to darkness (where their pupils were dilated as when given ischemia), showed a decrease in ATP levels. In contrast, red light slightly elevated the level of ATP compared with dark conditions (Fig. 6).

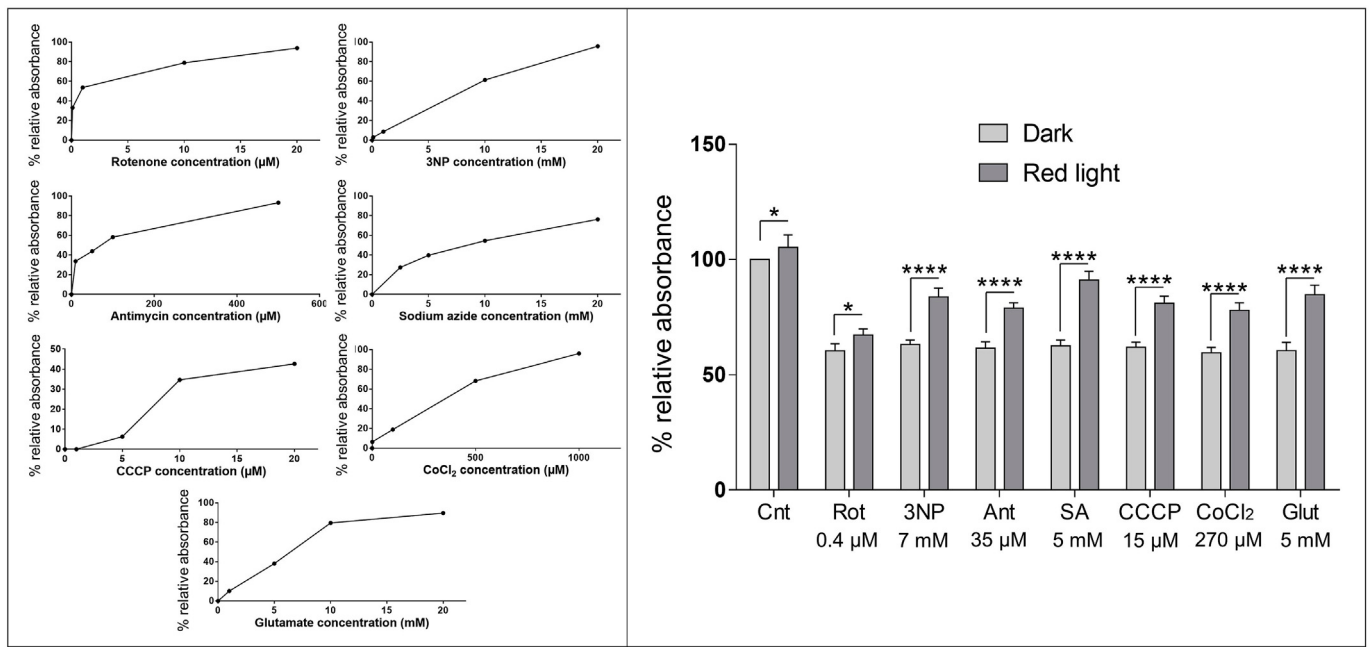
Representative images of the distribution of Brn3a-positive cells in rat retinas of similar eccentricities (with reference to defined blood vessels) from eyes that underwent ischemia/reperfusion for 15 days in darkness, blue or red light (n = 8) are shown in Fig. 7. The average density of Brn3a-positive cells in the peripheral retina was lower than that observed in the medial and central parts. Quantification of Brn3a-positive cells in retinal areas of 0.3 mm², 6 mm along the temporal/nasal direction (and through the optic nerve region) (Fig. 8) revealed that ischemia/reperfusion caused decreased numbers of ganglion cells in all retinal areas compared with control retinas. These numbers were further decreased in all retinal areas when blue light was applied through the pupil, but elevated when red light was used during ischemia. Quantitative analysis of 0.3 mm² areas from the peripheral to nasal parts (Fig. 8) revealed that ischemia/reperfusion caused an approximately 30% loss of ganglion cells. This loss was significantly reduced when red light was applied during ischemia, but increased when blue light was used. These results were confirmed by western blot analysis of retinal extracts (Fig. 9), which revealed that the relative amount of Brn3a protein in the retina decreased following ischemia in the dark, exacerbated when blue light was used and reduced when ischemia was in presence of red light.

Images processed for GFAP and isolectin IB4 immunoreactivities in flat mount retinas from rats where ischemia was delivered to the eyes in conditions of no light, red light or blue light are shown in Fig. 10. Isolectin IB4-immunoreactivity provides a means for viewing the retinal vasculature (Ernst and Christie, 2006). Compared with control dark conditions, blue light caused a general increase in GFAP immunoreactivity in retinal glia (Müller cells, astrocytes and microglia). GFAP was largely unaffected by red light but appeared slightly elevated with glia (astrocytes/microglia?) close to blood vessels. Ischemia (in the dark), significantly elevated GFAP immunoreactivity in all retinal areas but this did not occur when red light was used during ischemia. Interestingly, ischemia in the presence of blue light resulted in intense patchy areas of GFAP immunoreactivity.

4. Discussion

It is generally accepted that RGC mitochondria are affected in the initiation of glaucoma (primary open-angle glaucoma) and for various reasons lose function further, which explain why RGCs die at different times (Gueven et al., 2017; Hondur et al., 2017; Kamel et al., 2017; Lee et al., 2011, 2012; Osborne, 2010; Osborne et al., 2017, 2006). A goal of our study was to highlight the potential negative effect of visual blue light to enhance progression of glaucoma and to provide evidence that increasing the level of visual red light reaching the retina, will be of benefit to glaucoma subjects.

Mitochondria perform a number of tasks such as maintaining homeostasis and carrying out metabolic functions including oxidative energy metabolism, control of intracellular calcium levels and the



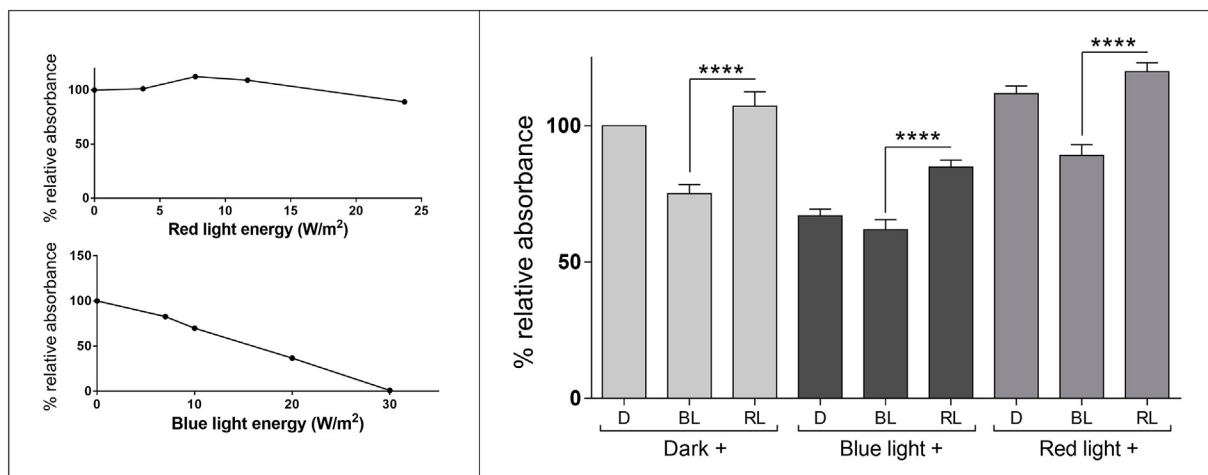
n=8. Two-way ANOVA. Sidak's multiple comparisons ****p<0,0001

Fig. 1. (A) Dose-response curves of different toxins over 24 h on the survival of R-28 cells in the dark. (B) Comparative negative effect of selected toxins that reduces relative absorbance (indexed as a measure of cell viability) of MTT by 30–35% in the present of darkness or red light (630 nm 6.5 W/m²). 3NP, 3- nitropropionic acid; Ant, Antimycin A; SA, sodium azide; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine; CoCl₂, cobalt chloride; Glut, glutamate. Data are mean values ± SEM, n = 8. ****p < 0.0001 Statistics was determined by a two-way ANOVA with Sidak's multiple comparisons test where.

regulation of neuronal excitability and synaptic transmission (Chan, 2006; Moreira et al., 2007, 2010; Schon and Manfredi, 2003; Albers and Beal, 2000). One likely cause for RGC mitochondrial dysfunction in glaucoma is impaired regulation of optic nerve head (ONH) blood flow. This can be caused by raised intraocular pressure (IOP), diurnal fluctuations in IOP, arterial hypertension, low systolic perfusion pressure, low diastolic perfusion pressure, reduced blood pressure in hypertensive patients, cardiovascular disease, migraines, vasospastic disorders, arteriosclerosis or cerebral spinal fluid pressure changes (Caprioli et al., 2010; Hayreh, 2001; Leske et al., 2008; Osborne, 2010; Osborne et al., 2017, 2006). Any compromised blood supply will cause ischemia

(defined as a reduction in the supply of nutrients and oxygen) and consequently affect the mitochondrial function of RGCs located within the ONH (Andrews et al., 1999; Bristow et al., 2002; Carelli et al., 2004).

Recent studies have shown that mitochondrial function can be modulated by light, as it affects chromophores that are associated with ATP synthesis (Bell and Hall, 1981; García and Silva, 1997; Gorgidze et al., 1998; Hockberger et al., 1999; Mellerio, 1994; Ortiz de Montellano, 1995; Wataha et al., 2004). This is of significance to retinal central nervous tissue because it is directly exposed to visual light (400–900 nm). For example, visual blue light (400–480 nm) can affect



n=8. One-way ANOVA. Tukey's multiple comparisons ****p<0,0001

Fig. 2. (A) Comparative effect of different intensities of red and blue light on R28 relative absorbance of MTT (indexed as a measure of cell viability) over 24 h. Results are mean values from eight independent experiments. (B) Effect of 12 h in darkness, blue light (470 nm, 12.08 W/m²) or red light (630 nm 6.5 W/m²) and then for 12 h in either darkness or blue light or red light, on R28 cell viability. It is clear that red light enhances the amount of viable cells (possibly because of increased proliferation) after 12 h and even more after a period of 24 h compared with dark conditions. Data are mean values ± SEM, n = 8, ****p < 0.0001. Statistics was determined by a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test where. D = dark, BL = blue light, RL = red light.

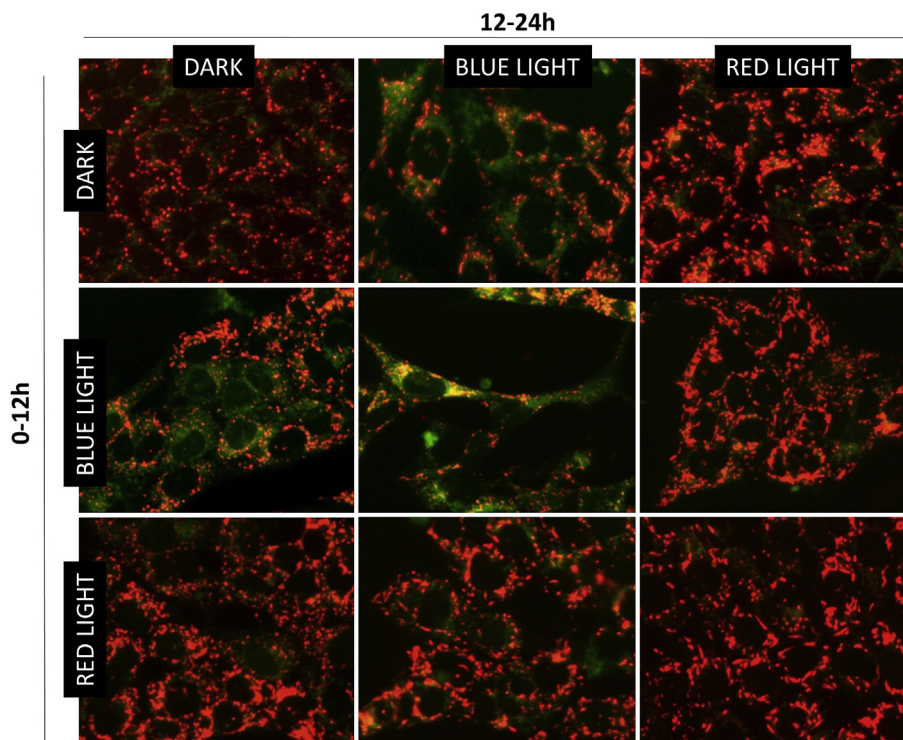


Fig. 3. Representative images of R28 cells stained with JC-1 dye following exposure to different combinations of 12 h of blue (12.08 W/m²) or red (6.5 W/m²) light. JC-1 located in mitochondria appears red in colour in healthy cells but green when in an unhealthy state.

mitochondrial flavin and cytochrome constituents of the electron transport chain to reduce ATP synthesis, increase oxidative stress to cause cell dysfunction and death (Osborne, 2010; Osborne et al., 2017, 2014, 2006, 2001). This leads us to question whether the blue light

emitted not only from solar energy but also from digital screens and LEDs could impact the RGC mitochondria and be of importance in glaucoma. In contrast, visual red light (650–900 nm) acts on mitochondrial complex IV (or cytochrome c oxidase) to stimulate ATP and

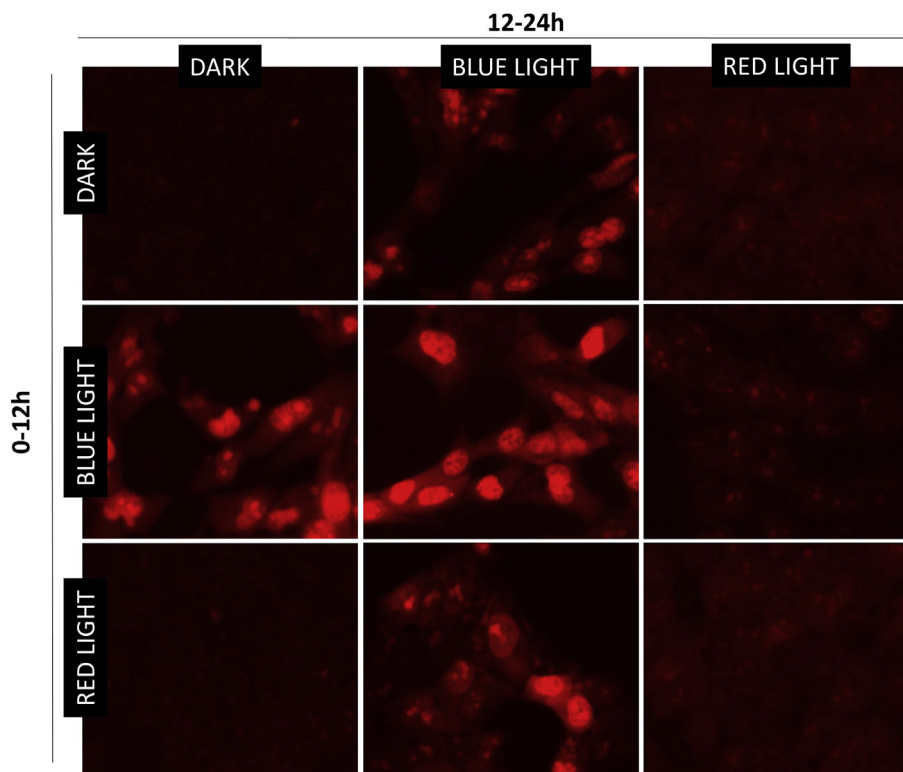


Fig. 4. Representative images of R28 cells stained with DHE following exposure to different combinations of 12 h of blue or red light. Only blue light stimulates ROS formation where the generated red product is translocated into the nucleus. It can be seen that the influence of blue light is counteracted by red light.

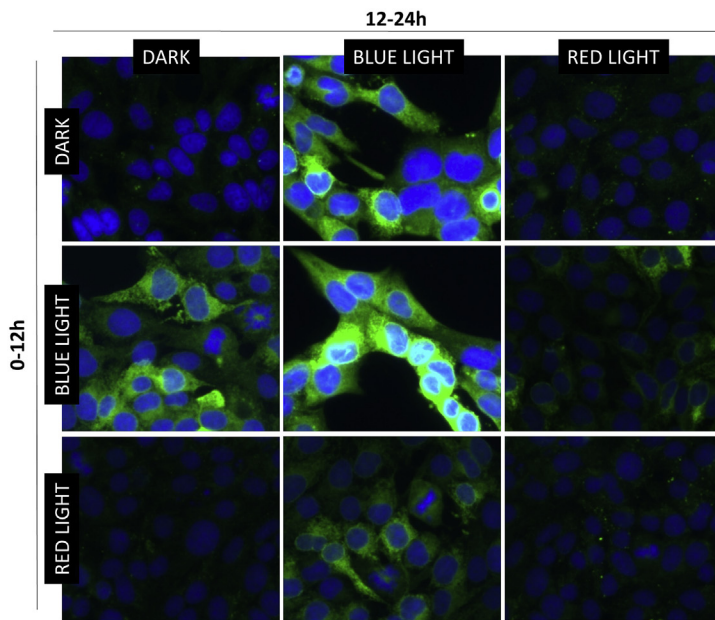


Fig. 5. Representative images of R28 cells stained for the localisation of cell nuclei (DAPI, blue) and cytoplasmic HO-1 (green) following exposure to different combinations of 12 h of blue or red light. Cells in the dark or red light, show little staining for HO-1 but is significantly up-regulation by blue light. Red light nullifies the increase in HO-1 immunoreactivity.

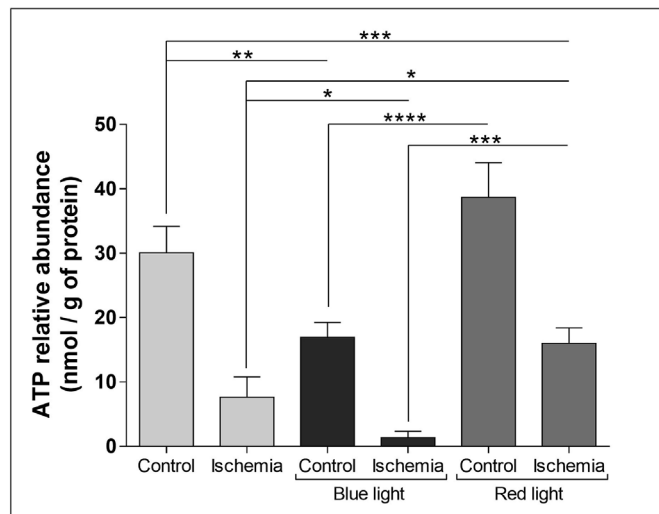


Fig. 6. Relative amount of ATP in rat retinas following ischemia in the dark or in either blue (26.3 W/m^2) or red (16.5 W/m^2) light. Ischemia in the dark causes a significant decrease in ATP compared with control retinas. This decrease in ATP was enhanced when the dilated pupil was exposure to blue light during ischemia but reduced when carried out in red light. Moreover, delivery of blue or red light into eyes not given ischemia, respectively, caused a significant decrease and increase of retinal ATP energy levels compared with from retinas from control eyes in the dark. Data are mean \pm SEM, $n = 4$, **** $p < 0.0001$. Statistics was determined by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test.

nitric oxide production positively, causing an induction of various beneficial factors to enhance cell survival (see, for example, (Gkotsi et al., 2014)). This indicates that delivery of extra visual red light to the retina may be a therapeutic approach for the treatment of mitochondrial dysfunctions as in glaucoma.

In this study we show that blue light, like various mitochondrial poisons (rotenone, 3-NP, antimycin A and sodium azide) dose-dependently reduces cell (R28 cells) survival (Figs. 1A and 2A). The R28 cell line is derived from an immortalised postnatal rat retinal culture, and often used to model retinal cells (Seigel, 2014). Although red light had no effect on R28 cell viability at any intensity tested (Fig. 2A), it significantly attenuates the negative influences of mitochondrial toxins

and of blue light (Figs. 1B and 2B). These results support the hypothesis that blue light negatively affects mitochondrial function and can be attenuated by use of appropriate amounts of red light. The intensity or irradiance of the blue light LEDs (range 410–530 nm with peak at 470 nm, 12.08 W/m^2) used to negatively affect cells in culture is low and approximately twice that emitted from a computer screen (range 380–740 nm with peak at 470 nm, 6 W/m^2). However, the intensity of solely the 470 nm wave length of blue light from the LEDs is 0.14 W/m^2 , only a fraction of the 470 nm of light emitted on an average sunny day (1.79 W/m^2). It is thus proposed that the gradual impact of blue light from the sun and also artificial lighting needs consideration in relation to the retina when neuronal mitochondria are already compromised as would be the case for individuals with glaucoma. The intensity of the red light LEDs (range between 580–575 nm with a peak of 630 nm, 6.5 W/m^2) used in the experimental studies is non-toxic and attenuates insults to cells by acting on their mitochondria. The irradiance of solely of the 630 nm wavelength of red light from the LEDs is 0.22 W/m^2 . The intensity of the same peak (630 nm) of red light from a computer screen or on a sunny day is respectively, 0.007 W/m^2 and 1.62 W/m^2 . This argues a case for suggesting that increasing the amount of red light impacting retina especially at night and in artificial environments would benefit the unhealthy retina.

The mechanism by which blue light negatively affects R28 cell survival involves loss of mitochondrial status, oxidative stress and HO-1 formation (Figs. 3–5). The protein HO-1 is a stress-response protein which plays a vital role in maintaining cellular homeostasis and is known to be overexpressed in conditions such as pathological iron deposition, oxidative stress and mitochondrial damage (Himori et al., 2014; Schipper et al., 2000). The level of HO-1 expression may therefore be important in the antioxidant defence systems of organisms (Amersi et al., 1999; Ursu et al., 2014).

In a previous study it was shown that ischemia/reperfusion of the rat retina causes decreased RGC numbers throughout the retina, and that red light delivered via the dilated pupil attenuates this loss (del Olmo-Aguado et al., 2016). The present study was designed to investigate whether blue light can potentiate the loss of RGCs during ischemia. Antibodies to Brn3a—a transcription factor specifically present in RGC nuclei—were used to quantify ganglion cells and determine the distribution of RGCs in flat mounts of the retina (Iwamoto et al., 2014; Lee et al., 2014; Nadal-Nicolás et al., 2009). We confirm other studies reporting RGC density to vary across the retina, becoming lowest in peripheral regions (Daniais et al., 2002; del Olmo-Aguado

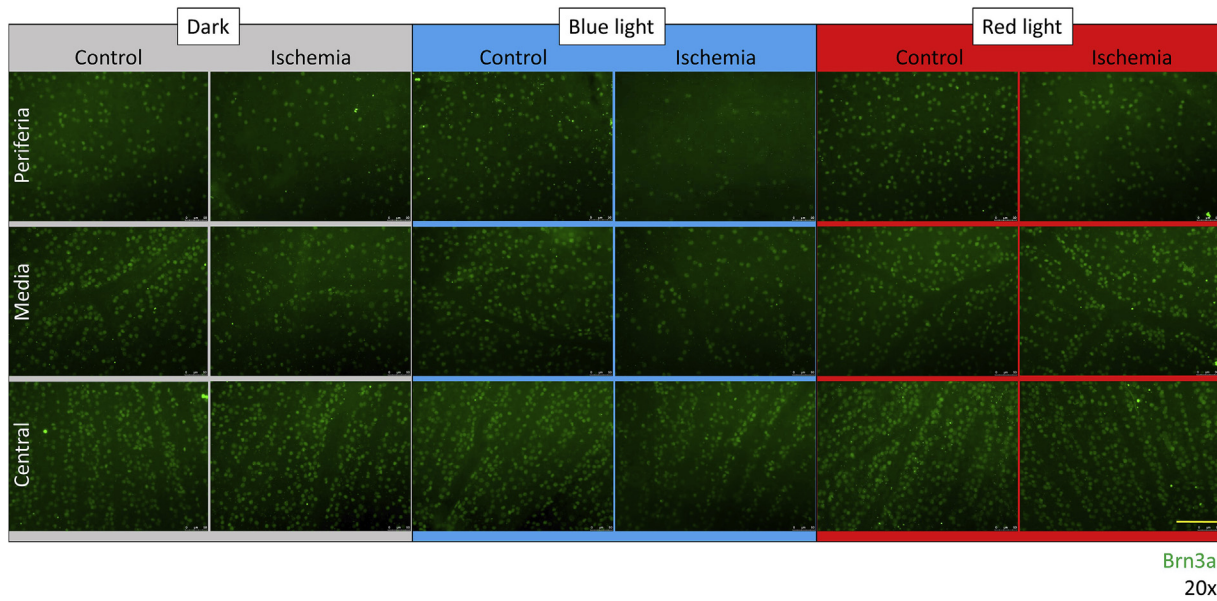


Fig. 7. Representative retinal fields of flat mount retinas stained for Brn3a in central, medial and peripheral parts of the retina. The density of RGCs is least in the peripheral and greatest in the central regions of the retina. Ischemia (in darkness) caused the numbers of Brn3a cells in all areas of the retina to be decreased, reduced even more in blue light (26.3 W/m^2) but blunted in red light (16.5 W/m^2). Scale bar = $100 \mu\text{m}$.

et al., 2016; Lee et al., 2014) (Figs. 7 and 8). When analysing RGC numbers, it is essential to either determine the total number of Brn3a-positive cells per retina or, for more practical reasons, restrict the analysis to a defined retinal region. In the present study, we restricted our analysis of Brn3a-positive cells to a 6 mm^2 region spanning from the temporal to the nasal region across the optic nerve. Ischemia/reperfusion caused a statistically significant decrease in RGC numbers in all regions that were analysed (Figs. 7 and 8). The application of blue light exacerbated this loss while red light attenuated the loss, which was confirmed by quantification of Brn3a in whole retinal extracts (Fig. 9). Our results therefore support our hypothesis that blue light may influence the progression rate of glaucoma negatively (Osborne et al., 2014, 2006) and that supplying the retina with defined energy levels of red light may reduce this effect (del Olmo-Aguado et al., 2016; Osborne et al., 2017).

Current evidence indicates that raising the IOP above the systolic blood pressure (as used in our studies) causes an almost complete loss of blood supply to the retina. Depending on the time of reperfusion, the whole of the retina may be affected, with the outer retina being most susceptible (Chidlow et al., 2011; Hernandez et al., 2009; Osborne et al., 2004a, 2004b; Osborne and Larsen, 1996). We demonstrate here that retinal ischemia in the dark for 60 min (5 min reperfusion) results in retinal ATP levels decreasing to about 25% of the normal amount, and decreasing further in blue light conditions. However, this decrease is significantly smaller when ischemia is given in red light (Fig. 6). These changes in ATP levels are in line with studies which show that blue and red light affect mitochondrial function in opposite ways, the former reducing and the latter promoting ATP formation (Gkotsi et al., 2014). The data shown in Fig. 6 also suggest that red light might elevate tissue ATP levels, which is consistent with the preconditioning nature of red light as reported (Albarracin et al., 2013; Begum et al., 2013; Beirne et al., 2017; del Olmo-Aguado et al., 2016; Eells et al., 2003; Gkotsi

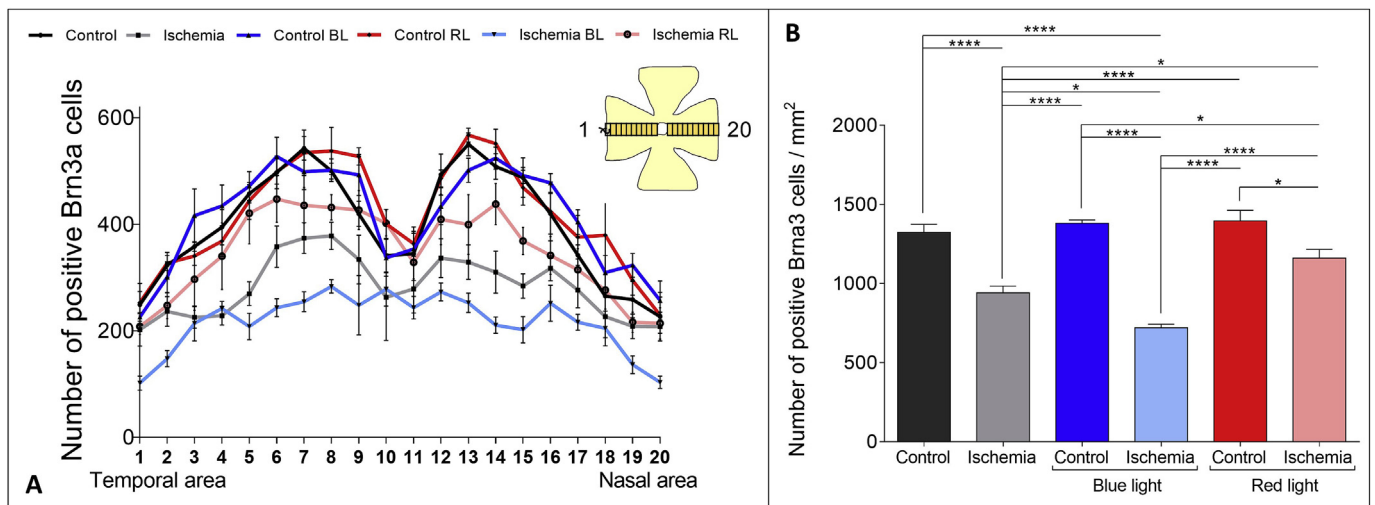


Fig. 8. Quantitative analysis of the number of Brn3a cells in (A) 20 retinal areas of 0.3 mm^2 , 6 mm along the temporal/nasal direction and through the optic nerve region, and (B) combined 0.3 mm^2 sectors from the temporal to nasal parts of the retina. The decrease in numbers of Brn3a cells following ischemia is clearly blunted by red light (RL), but significantly elevated by blue light (BL). Data are mean \pm SEM, $n = 5$, **** $p < 0.0001$. Statistics was determined by a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test.

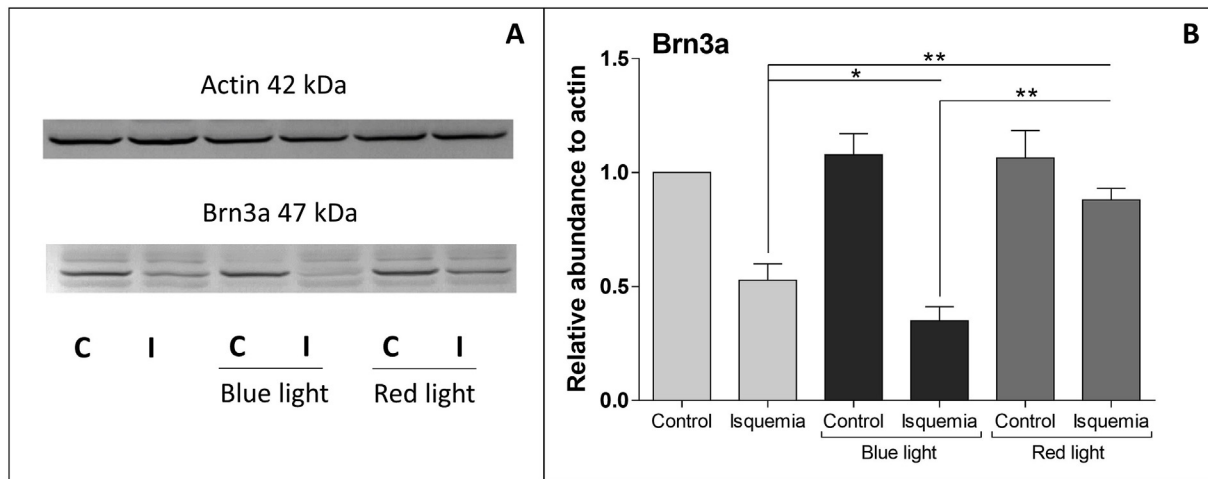


Fig. 9. Comparative ratios of Brn3a and actin proteins in retinal extracts obtained from control rat eyes (C) or where ischemia (I) was administered either in no light, blue light or red light. Western blots of extracts are shown in (A) and (B) the relative intensities of Brn3a related to actin. Data are mean \pm SEM, $n = 4$. Significant differences were determined using a Kruskal-Wallis combined with the Dunn's multiple comparison test, $\alpha = 0.1$.

et al., 2014; Karu, 1999; Osborne et al., 2016; Wong-Riley et al., 2005) and consistent with the finding that red light counteracted an insult of blue light to R28 cells whether given either before or after the insult (Fig. 2B). The finding that blue light reduced normal levels of ATP (Fig. 6) highlights the experimental conditions in which acute high levels of blue light can elicit a negative response after only 1hr of exposure. These studies provide proof of the principle that chronic low amounts of blue light reaching healthy retinal mitochondria will probably not be harmful, but when the organelles are affected negatively, as in glaucoma, it becomes a potential risk factor and exacerbates mitochondrial dysfunctions.

Opposing effects of red and blue light on retinal glia (Müller cells, astrocytes and microglia) were detected in regard to the localisation of GFAP (Fig. 10). Ischemia and to a lesser extent blue light caused a significant up-regulation of retinal GFAP. However, in combination activated GFAP appeared patchy in appearance. We suggest that this is due to loss of tissue cells caused by the combined insults of ischemia and blue light. The decrease in retinal ATP levels to barely detectable amounts following exposure to both insults is consistent with this notion (Fig. 6). While red light counteracted the up-regulation of GFAP caused by ischemia, it also appeared to slightly stimulate the activation of GFAP associated with vascular located microglia/astrocytes.

Astrocytes/microglia are known to have a complex association with blood vessels, both morphologically and functionally (Checchin et al., 2006; Gariano et al., 1996; O'Sullivan et al., 2017; Zhao et al., 2018). This observation is of interest as it has been reported that flickering red light stimulates ocular blood flow (Garhöfer et al., 2004; Noonan et al., 2015). Red light stimulates nitric oxide production (Begum et al., 2013; Beirne et al., 2017; Eells et al., 2003; Karu, 1999; Osborne et al., 2016; Wong-Riley et al., 2005) and nitric oxide is known to act as a vasodilator of blood vessels.

In the present study, the intensity of blue light was optimised to have a measurable experimental effect on RGC function when delivered for only 60 min. We do not expect that human retinas would be exposed to such acute amounts of blue light. It is more likely that only a fraction of the blue light used in the present study normally reaches the human retina. However, this blue light would reach RGC mitochondria in a chronic way over long periods of time and so contribute to mitochondrial dysfunction when the organelles are already compromised, as in glaucoma subjects. Importantly, while the intensity of the red light used in the rat studies had no negative influence on cells in culture, it clearly mitigated the effects of blue light. This indicates that use of appropriate amounts of red light may provide a potential non-invasive procedure to treat RGC mitochondrial dysfunctions. The alternative approach of

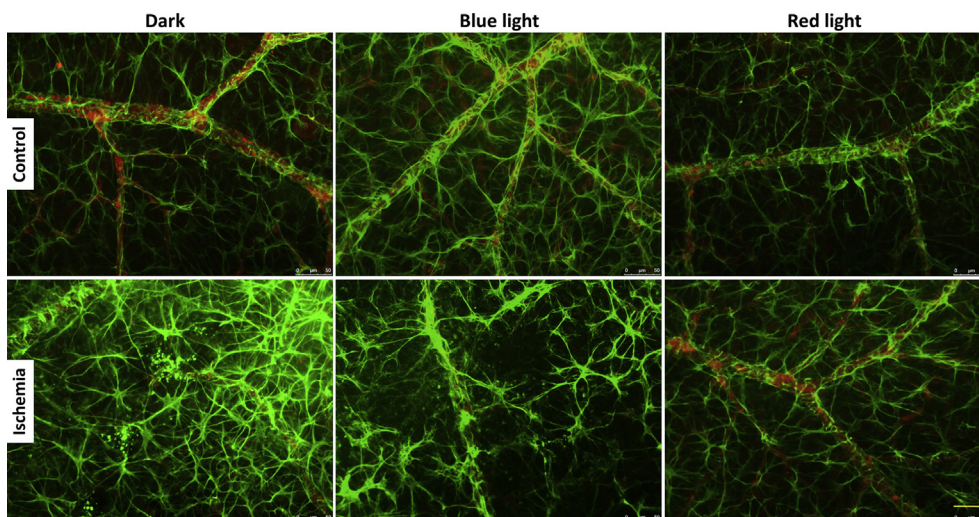


Fig. 10. Flat mount views of retinas processed for the co-localisation of green GFAP immunoreactivity located to Müller cells and astrocytes, the latter being highly associated with blood vessels that appear red using a conjugated antibody for isolectin-IB-4. Compared with control retinas (A), both ischemia (B) and blue light (C) causes a general increase in GFAP immunoreactivity throughout the tissue. Blue light and ischemia (D) enhances GFAP staining even further but it is patchy in appearance suggesting a loss of tissue. Red light also causes an increase in GFAP immunoreactivity that appears more to be associated with blood vessels (D) and this is enhanced when even further when combination with ischemia (E). Scale bar = 100 μ m.

GFAP / Ib-4. 20x. Middle retinas. 14 days reperfusion.

using pharmacological agents has been considered over many years, but difficulties associated with delivery and toxicity remain (Hanumunthadu et al., 2014; Osborne et al., 2014; Sena and Lindsley, 2017). Devising procedures for delivery of extra red light to protect RGCs in chronic diseases like glaucoma (Weinreb and Khaw, 2004; Kern and Barber, 2008) remains to be established. One potential idea is to produce fluorescent spectacle filters that convert solar UV light directly into extra visual red light (Menéndez-Velázquez et al., 2018).

A number of preclinical research trials have reported the beneficial influence of red-light therapy in ocular diseases such as age-related macular degeneration and diabetic retinopathy (Ivancic and Ivancic, 2008; Merry et al., 2017; Tang et al., 2014), including the TORPA (NCT00940407) and LIGHTSIGHT (NCT02725762) trials. Such trials rely on exposing individuals to specific environments of red light for defined periods. However, the applicability of red light for the treatment of eye/retinal disorders in mainstream medicine remains to be established (Fitzgerald et al., 2013; Huang et al., 2013) and, importantly, the underlying biochemical mechanism needs to be further clarified. The reported technical approaches of different groups vary considerably, and a biphasic dose-response has been reported, suggesting that optimum levels of light may be more effective than high levels (Karu, 2013; Passarella and Karu, 2014). Variations in the nature of the irradiation source (laser or light-emitting diode), mode of delivery (pulsed or continuous) and chosen wavelength as well as the rate, duration and frequency of treatments that were used are not always disclosed (Fitzgerald et al., 2013; Quirk and Whelan, 2011). In addition, little attention has been given to the potential negative effects of red-light therapy, especially when the treatment necessitates the use of very high intensities to penetrate tissues of different thicknesses and types.

Acknowledgements

We are grateful to Enol Artime, Joanna Serrano and Carlota Suárez-Barrío for their technical help and the financial from the Fundación BBVA. NNO and is a Cátedra de Biomedicina (Chair in Biomedicine).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2019.02.018>.

References

- Albarracín, R., Natoli, R., Rutar, M., Valter, K., Provis, J., 2013. 670 nm light mitigates oxygen-induced degeneration in C57BL/6J mouse retina. *BMC Neurosci.* 14, 125. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-125>.
- Albers, D.S., Beal, M.F., 2000. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in aging and neurodegenerative disease. *J. Neural. Transm. Suppl.* 59, 133–154.
- Amersi, F., Buelow, R., Kato, H., Ke, B., Coito, A.J., Shen, X.D., Zhao, D., Zaky, J., Melinek, J., Lassman, C.R., Kolls, J.K., Alam, J., Ritter, T., Volk, H.D., Farmer, D.G., Ghobrial, R.M., Busuttill, R.W., Kupiec-Weglinski, J.W., 1999. Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J. Clin. Invest.* 104, 1631–1639. <https://doi.org/10.1172/JCI7903>.
- Andrews, R.M., Griffiths, P.G., Johnson, M.A., Turnbull, D.M., 1999. Histochemical localisation of mitochondrial enzyme activity in human optic nerve and retina. *Br. J. Ophthalmol.* 83, 231–235. <https://doi.org/10.1136/bjo.83.2.231>.
- Begum, R., Powner, M.B., Hudson, N., Hogg, C., Jeffery, G., 2013. Treatment with 670 nm Light Up Regulates Cytochrome C Oxidase Expression and Reduces Inflammation in an Age-Related Macular Degeneration Model. *PLoS One* 8, e57828. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057828>.
- Beirne, K., Rozanowska, M., Votruba, M., 2017. No Title. *Mitochondrion* 36, 85–95. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.05.002>.
- Bell, J., Hall, C., 1981. Hemoproteins. In: *Spectroscopy in Biochemistry*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp. 42–46.
- Boveris, A., Navarro, A., 2008. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life* 60, 308–314. <https://doi.org/10.1002/iub.46>.
- Bristow, E.A., Griffiths, P.G., Andrews, R.M., Johnson, M. a, Turnbull, D.M., 2002. The distribution of mitochondrial activity in relation to optic nerve structure. *Arch. Ophthalmol.* 120, 791–796. <https://doi.org/10.1001/archophth.120.6.791>.
- Caprioli, J., Coleman, A.L., Blood Flow in Glaucoma Discussion, 2010. Blood pressure, perfusion pressure, and glaucoma. *Am. J. Ophthalmol.* 149, 704–712. <https://doi.org/10.1016/j.ajo.2010.01.018>.
- Carelli, V., Ross-Cisneros, F.N., Sadun, A.A., 2004. Mitochondrial dysfunction as a cause of optic neuropathies. *Prog. Retin. Eye Res.* 23, 53–89. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2003.10.003>.
- Casson, R.J., Chidlow, G., Wood, J.P., Crowston, J.G., Goldberg, I., 2012. Definition of glaucoma: clinical and experimental concepts. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 40, 341–349. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2012.02773.x>.
- Chan, D.C., 2006. No Title. *Cell* 125. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.010>.
- Checchin, D., Sennlaub, F., Levavasseur, E., Leduc, M., Chemtob, S., 2006. Potential role of microglia in retinal blood vessel formation. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 47, 3595. <https://doi.org/10.1167/iov.05-1522>.
- Chidlow, G., Wood, J.P.M.M., Casson, R.J., 2007. Pharmacological neuroprotection for glaucoma. *Drugs* 67, 725–759. <https://doi.org/10.2165/00003495-200767050-00006>.
- Chidlow, G., Ebneter, A., Wood, J.P.M., Casson, R.J., 2011. The optic nerve head is the site of axonal transport disruption, axonal cytoskeleton damage and putative axonal regeneration failure in a rat model of glaucoma. *Acta Neuropathol.* 121, 737–751. <https://doi.org/10.1007/s00401-011-0807-1>.
- Danias, J., Shen, F., Goldblum, D., Chen, B., Ramos-Esteban, J., Podos, S.M., Mittag, T., 2002. Cytoarchitecture of the retinal ganglion cells in the rat. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 43, 587–594.
- del Olmo-Aguado, S., Núñez-Álvarez, C., Osborne, N.N., 2016. Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death in situ. *Acta Ophthalmol.* 94, e481–e491. <https://doi.org/10.1111/aos.12996>.
- Dhande, O.S., Huberman, A.D., 2014. Retinal ganglion cell maps in the brain: implications for visual processing. *Curr. Opin. Neurobiol.* 24, 133–142. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2013.08.006>.
- Dietrich, M.O., Horvath, T.L., 2010. The role of mitochondrial uncoupling proteins in lifespan. *Pflügers Arch. - Eur. J. Physiol.* 459, 269–275. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0729-0>.
- Doozandeh, A., Yazdani, S., 2016. Neuroprotection in glaucoma. *J. Ophthalmic Vis. Res.* 11, 209–220. <https://doi.org/10.4103/2008-322X.183923>.
- Eells, J.T., Henry, M.M., Summerfelt, P., Wong-Riley, M.T.T., Buchmann, E.V., Kane, M., Whelan, N.T., Whelan, H.T., 2003. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 3439–3444. <https://doi.org/10.1073/pnas.0534746100>.
- Ernst, C., Christie, B.R., 2006. Isolectin-IB4 as a vascular stain for the study of adult neurogenesis. *J. Neurosci. Methods* 150, 138–142. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2005.06.018>.
- Fitzgerald, M., Hodgetts, S., Van Den Heuvel, C., Natoli, R., Hart, N.S., Valter, K., Harvey, A.R., Vink, R., Provis, J., Dunlop, S.A., 2013. Red/near-infrared irradiation therapy for treatment of central nervous system injuries and disorders. *Rev. Neurosci.* 24, 205–226. <https://doi.org/10.1515/revneuro-2012-0086>.
- Flammer, J., Org, S., Costa, V.P., Orzalesi, N., Serra, L.M., Renard, J., Stef, E., Orgül, S., Costa, V.P., Orzalesi, N., Kriegelstein, G.K., Serra, L.M., Renard, J., Stefánsson, E., 2002. The impact of ocular blood flow in glaucoma. *Prog. Retin. Eye Res.* 21, 359–393.
- García, J., Silva, E., 1997. Flavin-sensitized photooxidation of amino acids present in a parenteral nutrition infusate: Protection by ascorbic acid. *J. Nutr. Biochem.* 8, 341–345. [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(97\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(97)00024-7).
- Garhöfer, G., Zawinka, C., Resch, H., Huemer, K.H., Dörner, G.T., Schmetterer, L., 2004. Diffuse luminance flicker increases blood flow in major retinal arteries and veins. *Vis. Res.* 44, 833–838. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2003.11.013>.
- Gariano, R.F., Sage, E.H., Kaplan, H.J., Hendrickson, A.E., 1996. Development of astrocytes and their relation to blood vessels in fetal monkey retina. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2367–2375.
- Gkotsi, D., Begum, R., Salt, T., Lascaratos, G., Hogg, C., Chau, K.Y., Schapira, A.H.V., Jeffery, G., 2014. Recharging mitochondrial batteries in old eyes. Near infra-red increases ATP. *Exp. Eye Res.* 122, 50–53. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.02.023>.
- Gorgidze, L.A., Oshemkova, S.A., Vorobjev, I.A., 1998. Blue light inhibits mitosis in tissue culture cells. *Biosci. Rep.* 18, 215–224.
- Gueven, N., Nadikudi, M., Daniel, A., Chhetri, J., 2017. Targeting mitochondrial function to treat optic neuropathy. *Mitochondrion* 36, 7–14. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.013>.
- Hanumunthadu, D., Dehabadi, M.H., Cordeiro, M.F., 2014. Neuroprotection in glaucoma: current and emerging approaches. *Expert Rev. Ophthalmol.* 9, 109–123. <https://doi.org/10.1586/17469899.2014.892415>.
- Harman, D., 1981. The aging process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 78, 7124–7128.
- Hayreh, S.S., 2001. Blood flow in the optic nerve head and factors that may influence it. *Prog. Retin. Eye Res.* 20, 595–624.
- Hernandez, M., Rodriguez, F.D., Sharma, S.C., Vecino, E., 2009. Immunohistochemical changes in rat retinas at various time periods of elevated intraocular pressure. *Mol. Vis.* 15, 2696–2709. (pii). <https://doi.org/286>.
- Hiromi, N., Maruyama, K., Yamamoto, K., Yasuda, M., Ryu, M., Omodaka, K., Shiga, Y., Tanaka, Y., Nakazawa, T., 2014. Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J. Neurosci. Res.* 92, 1134–1142. <https://doi.org/10.1002/jnr.23398>.
- Hockberger, P.E., Skimina, T.A., Centonze, V.E., Lavin, C., Chu, S., Dadrás, S., Reddy, J.K., White, J.G., 1999. Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H2O2 in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96, 6255–6260. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.11.6255>.
- Hondur, G., Göktas, E., Yang, X., Al-Aswad, L., Auran, J.D., Blumberg, D.M., Cioffi, G.A., Liebmann, J.M., Suh, L.H., Trief, D., Tezel, G., 2017. Oxidative Stress-Related Molecular Biomarker Candidates for Glaucoma. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 58, 4078. <https://doi.org/10.1167/iov.17-22242>.
- Huang, L., Xuan, Y., Koide, Y., Zhiyentayev, T., Tanaka, M., Hamblin, M.R., 2013. Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on

- Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Laser Surg. Med.* 44, 490–499. <https://doi.org/10.1002/lsm.22045.Type>.
- Ivancic, B.T., Ivancic, T., 2008. Low-Level Laser Therapy Improves Vision in Patients with Age-Related Macular Degeneration. *Photomed. Laser Surg.* 26, 241–245. <https://doi.org/10.1089/pho.2007.2132>.
- Iwamoto, K., Birkholz, P., Schipper, A., Mata, D., Linn, D.M., Linn, C.L., 2014. A nicotinic acetylcholine receptor agonist prevents loss of retinal ganglion cells in a glaucoma model. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 55, 1078. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12688>.
- Kamel, K., Farrell, M., O'Brien, C., 2017. Mitochondrial dysfunction in ocular disease: Focus on glaucoma. *Mitochondrion* 35, 44–53. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.05.004>.
- Karu, T., 1999. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 49, 1–17. [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00219-X).
- Karu, T., 2013. Is It Time to Consider Photobiomodulation As a Drug Equivalent? *Photomed. Laser Surg.* 31, 189–191. <https://doi.org/10.1089/pho.2013.3510>.
- Kern, T.S., Barber, A.J., 2008 Sep 15. Retinal ganglion cells in diabetes. *J. Physiol.* 586, 4401–4408.
- Lee, M.J., Chien, W.L., Lee, T.R., Hung, S.Y., Kang, K.H., Fu, W.M., 2011. Impairment of oxidative stress-induced heme oxygenase-1 expression by the defect of Parkinson-related gene of PINK1. *J. Neurochem.* 117, 643–653. <https://doi.org/10.1111/j.1471-1459.2011.07229.x>.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lee, S., Sheek, L., Crowston, J.G., van Bergen, N.J., O'Neill, E.C., O'Hare, F., Kong, Y.X.G., Chrysostomou, V., Vincent, A.L., Trounce, I.A., 2012. Impaired complex-I-Linked respiration and ATP synthesis in primary open-angle glaucoma patient lymphoblasts. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 53, 2431–2437. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-9596>.
- Lee, D., Shim, M.S., Kim, K.-Y., Noh, Y.H., Kim, H., Kim, S.Y., Weinreb, R.N., Ju, W.-K., 2014. Coenzyme Q10 Inhibits Glutamate Excitotoxicity and Oxidative Stress-Mediated Mitochondrial Alteration in a Mouse Model of Glaucoma. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 55, 993. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-12564>.
- Leske, M.C., Wu, S.-Y., Hennis, A., Honkanen, R., Nemesure, B., BESS Study Group, 2008. Risk factors for incident open-angle glaucoma. *Ophthalmology* 115, 85–93. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2007.03.017>.
- Martersteck, E.M., Hirokawa, K.E., Everts, M., Bernard, A., Duan, X., Li, Y., Ng, L., Oh, S.W., Ouellette, B., Royall, J.J., Stoecklin, M., Wang, Q., Zeng, H., Sanes, J.R., Harris, J.A., 2017. Diverse central projection patterns of retinal ganglion cells. *Cell Rep.* 18, 2058–2072. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.075>.
- Mellero, J., 1994. Light effects on the retina. In: *Principles and Practice of Ophthalmology: Basic Sciences*. Saunders, Philadelphia, Saunders, Philadelphia, pp. 1326–1345.
- Menéndez-Velázquez, A., Núñez-Álvarez, C., del Olmo Aguado, S., Merayo-Llves, J., Fernández-Vega, A., Osborne, N.N., 2018. Potential application of photoluminescent filters for use in ophthalmology. *Opt. Mater.* (in press).
- Merry, G.F., Munk, M.R., Dotson, R.S., Walker, M.G., Devenyi, R.G., 2017. Photobiomodulation reduces drusen volume and improves visual acuity and contrast sensitivity in dry age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol.* 95, e270–e277. <https://doi.org/10.1111/aos.13354>.
- Moreira, P.I., Santos, M.S., Oliveira, C.R., 2007. Alzheimer's disease: A lesson from mitochondrial dysfunction. *Antioxidants Redox Signal.* 9, 1621–1630. <https://doi.org/10.1089/ars.2007.1703>.
- Moreira, P.I., Zhu, X., Wang, X., Lee, H., Nunomura, A., Petersen, R.B., Perry, G., Smith, M.A., 2010. Mitochondria: A therapeutic target in neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta (BBA) - Mol. Basis Dis.* 1802, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2009.10.007>.
- Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- Nadal-Nicolás, F.M., Jiménez-López, M., Sobrado-Calvo, P., Nieto-López, L., Cánovas-Martínez, I., Salinas-Navarro, M., Vidal-Sanz, M., Agudo, M., 2009. Brn3a as a Marker of Retinal Ganglion Cells: Qualitative and Quantitative Time Course Studies in Naïve and Optic Nerve-Injured Retinas. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 50, 3860. <https://doi.org/10.1167/iovs.08-3267>.
- Noonan, J.E., Lamoureux, E.L., Sarossy, M., 2015. Neuronal activity-dependent regulation of retinal blood flow. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 43, 673–682. <https://doi.org/10.1111/ceo.12530>.
- Ortiz de Montellano, P.R., 1995. The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450. *Drug Metab. Dispos.* 23, 1181–1187.
- Osborne, N.N., 2010. No Title 90. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2010.03.008>.
- Osborne, N.N., Larsen, A.K., 1996. Antigens associated with specific retinal cells are affected by ischaemia caused by raised intraocular pressure: effect of glutamate antagonists. *Neurochem. Int.* 29, 263–270.
- Osborne, N.N., Melena, J., Chidlow, G., Wood, J.P., 2001. A hypothesis to explain ganglion cell death caused by vascular insults at the optic nerve head: possible implication for the treatment of glaucoma. *Br. J. Ophthalmol.* 85, 1252–1259. <https://doi.org/10.1136/bjo.85.10.1252>.
- Osborne, N.N., Casson, R.J., Wood, J.P.M., Chidlow, G., Graham, M., Melena, J., 2004a. Retinal ischemia: Mechanisms of damage and potential therapeutic strategies. *Prog. Retin. Eye Res.* 23, 91–147. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2003.12.001>.
- Osborne, N.N., Chidlow, G., Layton, C.J., Wood, J.P.M., Casson, R.J., Melena, J., 2004b. Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye* 18, 1075–1084. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701588>.
- Osborne, N.N., Lascaratos, G., Bron, A.J., Chidlow, G., Wood, J.P.M.M., 2006. A hypothesis to suggest that light is a risk factor in glaucoma and the mitochondrial optic neuropathies. *Br. J. Ophthalmol.* 90, 237–241. <https://doi.org/10.1136/bjo.2005.082230>.
- Osborne, N.N., Álvarez, C.N., del Olmo Aguado, S., 2014. Targeting mitochondrial dysfunction as in aging and glaucoma. *Drug Discov. Today* 19, 1613–1622. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.05.010>.
- Osborne, N.N., Núñez-Álvarez, C., Joglar, B., del Olmo-Aguado, S., 2016. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur. J. Pharmacol.* 787, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.04.032>.
- Osborne, N.N., Núñez-Álvarez, C., Del Olmo-Aguado, S., Meryayo-Llves, J., 2017. No Title. *Mitochondrion* 36, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.11.009>.
- O'Sullivan, M.L., Puñal, V.M., Kerstein, P.C., Brzezinski, J.A., Glaser, T., Wright, K.M., Kay, J.N., 2017. Astrocytes follow ganglion cell axons to establish an angiogenic template during retinal development. *Glia* 65, 1697–1716. <https://doi.org/10.1002/glia.23189>.
- Pache, M., Flammer, J., 2006. A sick eye in a sick body? Systemic findings in patients with primary open-angle glaucoma. *Surv. Ophthalmol.* 51, 179–212. <https://doi.org/10.1016/j.survophthal.2006.02.008>.
- Passarella, S., Karu, T., 2014. Absorption of monochromatic and narrow band radiation in the visible and near IR by both mitochondrial and non-mitochondrial photoacceptors results in photobiomodulation. *J. Photochem. Photobiol., B* 140, 344–358. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2014.07.021>.
- Perelman, A., Wachtel, C., Cohen, M., Haupt, S., Shapiro, H., Tzur, A., 2012. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis* 3, e430. <https://doi.org/10.1038/cddis.2012.171>.
- Quigley, H.A., 2016. Understanding glaucomatous optic neuropathy: The synergy between clinical observation and investigation. *Annu. Rev. Vis. Sci.* 2, 235–254. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-111815-114417>.
- Quirk, B.J., Whelan, H.T., 2011. Near-infrared irradiation photobiomodulation: the need for basic science. *Photomed. Laser Surg.* 29, 143–144. <https://doi.org/10.1089/pho.2011.3014>.
- Schipper, H.M., Chertkow, H., Mehindate, K., Frankel, D., Melmed, C., Bergman, H., 2000. Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD. *Neurology* 54, 1297–1304.
- Schon, E.A., Manfredi, G., 2003. Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction. *J. Clin. Invest.* 111, 303–312. <https://doi.org/10.1172/JCI200317741.Over>.
- Seigel, G.M., 2014. Review: R28 retinal precursor cells: the first 20 years. *Mol. Vis.* 20, 301–306.
- Sellés-Navarro, I., Villegas-Pérez, M.P., Salvador-Silva, M., Ruiz-Gómez, J.M., Vidal-Sanz, M., 1996. Retinal ganglion cell death after different transient periods of pressure-induced ischemia and survival intervals. A quantitative in vivo study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 37, 2002–2014.
- Sena, D.F., Lindsay, K., 2017. Neuroprotection for treatment of glaucoma in adults. *Cochrane Database Syst. Rev.* 1, CD006539. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006539.pub4>.
- Sharif, N., 2018. Glaucomatous optic neuropathy treatment options: the promise of novel therapeutics, techniques and tools to help preserve vision. *Neural Regen. Res.* 13, 1145. <https://doi.org/10.4103/1673-5374.235017>.
- Tang, Z.-H., Wang, L., Zeng, F., Zhang, K., 2014. Human genetics of diabetic retinopathy. *J. Endocrinol. Invest.* 37, 1165–1174. <https://doi.org/10.1007/s40618-014-0172-8>.
- Ursu, O.N., Sauter, M., Ettischer, N., Kandolf, R., Klingel, K., 2014. Heme oxygenase-1 mediates oxidative stress and apoptosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Cell. Physiol. Biochem.* 33, 52–66. <https://doi.org/10.1159/000356649>.
- Vidal-Sanz, M., Salinas-Navarro, M., Nadal-Nicolás, F.M., Alarcón-Martínez, L., Valiente-Soriano, F.J., de Imperial, J.M., Avilés-Trigueros, M., Agudo-Barruioso, M., Villegas-Pérez, M.P., 2012. Understanding glaucomatous damage: anatomical and functional data from ocular hypertensive rodent retinas. *Prog. Retin. Eye Res.* 31, 1–27. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.08.001>.
- Wang, L., Dong, J., Cull, G., Fortune, B., Cioffi, G.A., 2003. Varicosities of intraretinal ganglion cell axons in human and nonhuman primates. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 44, 2–9. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0333>.
- Wataha, J.C., Lewis, J.B., Lockwood, P.E., Hsu, S., Messer, R.L., Rueggeberg, F.A., Bouillaguet, S., 2004. Blue Light differentially modulates cell survival and growth. *J. Dent. Res.* 83, 104–108. <https://doi.org/10.1177/154405910408300204>.
- Weinreb, R.N., Khaw, P.T., 2004. Primary open-angle glaucoma. *Lancet* 363, 1711–1720. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16257-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16257-0).
- Wong-Riley, M.T.T.T., Liang, H.L., Eells, J.T., Chance, B., Henry, M.M., Buchmann, E., Kane, M., Whelan, H.T., 2005. Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: Role of cytochrome c oxidase. *J. Biol. Chem.* 280, 4761–4771. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409650200>.
- Zhao, X., Eyo, U.B., Murugan, M., Wu, L.-J., 2018. Microglial interactions with the neurovascular system in physiology and pathology. *Dev. Neurobiol.* 78, 604–617. <https://doi.org/10.1002/dneu.22576>.

Blue light negatively affects the survival of ARPE19 cells through an action on their mitochondria and blunted by red light

Claudia Núñez-Álvarez, Carlota Suárez-Barrio, Susana del Olmo Aguado and Neville N. Osborne 

Ophthalmological Research Foundation, Oviedo, Asturias, Spain

ABSTRACT.

Purpose: To ascertain whether red light, known to enhance mitochondrial function, can blunt a blue light insult to ARPE19 cells in culture.

Methods: Semi-confluent ARPE19 cells cultured in 10% FBS were subjected to various regimes of treatment with blue (465–475 nm, 800 lux, 26 W/m²) and red (625–635 nm, 950 lux, 6.5 W/m²) light, as well as with toxins that inactivate specific enzymes associated with mitochondrial oxidative phosphorylation. Cultures were then analysed for cell viability (MTT assay), mitochondrial status (JC-1), ROS formation, immunocytochemistry and the activation of specific proteins by electrophoresis/Western blotting. In addition, ARPE19 cells were cultured in polycarbonate membrane inserts in culture medium containing 1% FBS. Such cultures were exposed to cycles of red, blue or a combination of red and blue light for up to 6 weeks. Culture medium was changed and the trans-epithelium membrane resistance (TER) of the inserts-containing cells was measured twice weekly.

Results: ARPE19 cells in culture are affected negatively when exposed to blue light. This is indicated by a loss of viability, a depolarization of their mitochondria and a stimulation of ROS. Moreover, blue light causes an up-regulation of HO-1 and phospho-p-38-MAPK and a cleavage of apoptosis inhibitory factor, proteins which are all known to be activated during cell death. All of these negative effects of blue light are significantly blunted by the red light administered after the blue light insult in each case. ARPE19 cell loss of viability and mitochondrial potential caused by toxins that inhibit specific mitochondrial enzyme complexes was additive to an insult delivered by blue light in each case. After a time, ARPE19 cells in culture express the tight junction protein ZO-1, which is affected by blue light. The development of tight junctions between ARPE19 cells grown in inserts reached a steady peak of resistance after about 40 days and then increased very slightly over the next 40 days when still in darkness. However, maximum resistance was significantly attenuated, when cultures were treated with cycles of blue light after the initial 40 days in the dark and counteracted significantly when the blue light cycle insult was combined with red light.

Conclusion: Blue light affects mitochondrial function and also the development tight junctions between ARPE19 cells, which results in a loss of cell viability. Importantly, red light delivered after a blue light insult is significantly blunted. These findings argue for the therapeutic use of red light as a noninvasive procedure to attenuate insults caused by blue light and other insults to retinal pigment epithelial cell mitochondria that are likely to occur in age-related macular degeneration.

Key words: ARPE19 cells – blue light toxicity – mitochondria – neuroprotection – red light – trans-epithelial membrane resistance

Acta Ophthalmol. 2019; 97: e103–e115

© 2018 Acta Ophthalmologica Scandinavica Foundation. Published by John Wiley & Sons Ltd

doi: 10.1111/aos.13812

Introduction

The mitochondrial theory of ageing argues that the progressive accumulation

of mutations or environmental influences on mitochondria or their DNA (mtDNA) results in a reduction in ATP output and an increase in ROS

production, thus driving oxidative stress, inflammation and cell loss (Harman 1981; Osborne et al. 2014). This is likely to be the case for age-related

macular degeneration (AMD), where retinal photic injury caused by chronic light exposure and the consequences of oxidative stress may play a part (Beatty et al. 2000; Klein & Klein 2007; Sui et al. 2013). Visible light (400–1000 nm) of defined wavelength might therefore be detrimental to the retina in certain situations over time. In this respect, laboratory studies show short wavelength blue/violet visual light to be particularly damaging to the retina (Organisciak et al. 1998; Algvere et al. 2006; Krigel et al. 2016) with photoreceptors and retinal pigment epithelial (RPE) being mostly affected (Noell et al. 1966; Gorn & Kuwabara 1967; Kuwabara & Gorn 1968; Grignolo et al. 1969; O'Steen & Anderson 1972). The calculated light intensity necessary to cause visual cell damage in nocturnal animals is only two or three times above that of room lighting (Noell et al. 1966; Noell 1979; Organisciak & Vaughan 2010). Such findings have historically been related to the aetiology of debilitating ocular conditions such as AMD, where photoreceptor and RPE dysfunction takes (Sloney 1988; Andley & Chylack 1990; Beatty et al. 2000; Feigl 2009).

Light damage to the retina relates mainly to short wavelength visual blue/violet light and involves the potential activation of a number of retinal chromophores. This inevitably results in the generation of ROS and the activation of a cascade of biochemical events resulting in mitochondrial DNA damage (Godley et al. 2005). Visual pigment chromophores like 11-cis-retinal-protein absorb light across the whole of the visible spectrum. Selectivity is achieved by the different light absorption characteristics of rods and the three different types of cones in the human retina. Rhodopsin is undoubtedly the chromophore responsible for photoreceptor damage in nocturnal rodents but this might not entirely be the case in primates (Rózanowska & Sarna 2005). In some species, photobleaching of rhodopsin and/or other visual pigments can be the cause of the formation of phototoxic products which induce photo-damage in the retina. The chromophore all-trans-retinal (vitamin A aldehyde) is one of the products of photo-bleached rhodopsin and is abundantly present in the retina; it is particularly sensitive to blue light absorbance for cell toxicity (Boulton

et al. 1990). Also, retinal chromophores like melanin complexes and lipofuscin in RPE cells (Boulton et al. 1990) increase in content with age (Feeney-Burns et al. 1984) and generate various types of ROS when irradiated with visual light, causing RPE death (Sarna 1992; Boulton et al. 2001; Margrain et al. 2004).

Mitochondria, abundant in photoreceptors and RPE, also absorb visual light. Flavin and cytochrome oxidases associated with mitochondria absorb visual light of different wavelengths in different ways. Proteins like the mitochondrial enzyme cytochrome *c* oxidase (COX), associated with mitochondrial complex IV, absorb blue light maximally at around 400–410 nm (Mellerio 1994). Flavins such as riboflavin (vitamin B2) and flavoprotein nucleotides are essential components of numerous cytosolic and mitochondrial enzyme systems. Absorption spectra of flavins are around 420–520 nm and induce the oxidation of several substances as well as the generation of hydrogen peroxide when activated (García-Silva et al. 1997; Hockberger et al. 1999). Porphyrins are also targets of blue light and exist in the mitochondrial inner membrane; therefore, they are potentially affected by blue light (Gorgidze et al. 1998; Wataha et al. 2004).

Experimental studies on cells that lack pigment show mitochondrial functions to be negatively affected by blue/violet (400–450 nm) light, reducing the formation of ATP and increasing the stimulation of ROS to result in damage to lipids, proteins and DNA (Jung et al. 1990; Egorov et al. 1999; Chen et al. 2003; King et al. 2004; Godley et al. 2005; Wood et al. 2007; Osborne et al. 2008, 2016; Knels et al. 2011). In contrast, long wavelength visual red light (600–1000 nm) has no negative influence on cells in culture and while also absorbed by mitochondrial COX (Karu et al. 2004; Karu & Kolyakov 2005; Wong-Riley et al. 2005; Begum et al. 2013), enhances ATP production, leading to a number of beneficial effects, including attenuating cell death. It is thought that photon absorption-stimulation of COX by red light might involve the photo-dissociation of inhibitory nitric oxide, which binds to the copper and heme centres of COX thus preventing oxygen from gaining access to the active sites (Lane 2006). As a

consequence, oxygen consumption and ATP production may increase, thereby raising the mitochondrial membrane potential (Passarella et al. 1984). Red light-induced enhancement of mitochondrial function can therefore result in a spectrum of beneficial effects that include attenuating oxidative stress, inflammation and cell death (Wong-Riley et al. 2005; Liang et al. 2006; Ying et al. 2008; del Olmo-Aguado et al. 2012; Núñez-Álvarez et al. 2017).

The current experiments involve the use of ARPE19 cells (spontaneously immortalized from human RPE) which are essentially devoid of pigments such as melanin complexes and lipofuscin. The aim of the present studies was to understand more about the manner in which blue light negatively affects mitochondria and to see whether red light can blunt the process. We hypothesize that RPE mitochondrial electron transport dysfunction caused by ageing and the influence of short wavelength blue light is a major cause of their demise in AMD and that long wavelength (red to infrared) light might be a potential noninvasive way to counteract this process (Fitzgerald et al. 2013; Eells et al. 2016; Merry et al. 2017).

Materials and Methods

Human ARPE19 cells (ATCC, Wesel, Germany) were grown in a culture medium that consisted of DMEM-F12 solution (Sigma, St Louis, MO, USA), supplemented with 2% antibiotic penicillin/streptomycin (Sigma) and 10% FBS and in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. Doubling growth time was approximately 60 hr. About 100 µl, 300 µl or 1.5 ml cultures of cells (approximately 10 × 10⁴ cells/ml) were placed in 96-, 48- or 6-well plates, respectively. In addition, 200 µl of cells was placed in 24-well plates, containing 6.5 mm, 0.4 µm pore polycarbonate membrane inserts (Corning Ref.3413).

After approximately 24 hr, to allow for the cells to settle in 96- or 48-well plates, cultures were generally subjected to one of the following regime treatments. Either, 30 hr in dark, 18 hr blue light followed by 12 hr dark, 18 hr dark followed by 12 red light, 18 hr in blue light followed by 12 red light, 18 hr dark followed by 12 hr curcumin and 18 hr blue light followed by 12 hr curcumin. Blue (465–475 nm, 800 lux, 26 W/m²) and red light (625–635 nm, 950 lux,

6.5 W/m²) LEDs (Electro DH SL, Barcelona, Spain) were used to deliver light to the cultures and temperature monitored to always be at 37°C.

Cell viability was assessed by the MTT reduction assay modified from that of (Mosmann 1983). Briefly, cells in 96-well plates were subjected to the appropriate treatment and then MTT was added at a final concentration of 0.5 mg/ml for 75 min at 37°C. Medium was then removed and reduced MTT (blue formazan crystals) was solubilized by adding 100 μ l DMSO to each well. After agitation of the plates for 10 min, the optical density of the solubilized crystals was measured using an automated microplate reader at 570 nm wavelength.

For analysis of mitochondrial status, cells were incubated with JC-1 dye (2 μ g/ml) for 30 min. JC-1 accumulates in mitochondria to appear as a red/orange fluorescence (590 nm) in healthy organelles and when depolarized, green in fluorescence (530 nm). Fluorescence images of cells were recorded and the relative levels of the intensities of green/red JC-1 fluorescence quantified using IMAGEJ Software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA); statistical analysis was carried out by use of GRAPHPAD PRISM version 6.01 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

For the analysis of ROS, culture medium was removed and cells incubated with dihydroethidium (40 μ M) for 20 min, the medium was removed and the cells washed twice with fresh medium. Images of the cultures were immediately recorded using phase fluorescence/contrast microscopy. ROS formation was determined by measurement of the ratio fluorescence at 370–420 nm (for cytoplasm of living cells in blue) with that of 535–610 nm (for chromatin of living cells in red) and analysed for significance using GRAPHPAD PRISM version 7.00 for Windows.

After approximately 24 hr to allow for cells to settle in 6-well plates, they were subjected to one of the following regime treatments. Either in darkness, 3 hr blue light followed by 12 hr red light, 6 hr blue light followed by 12 hr red light, 12 hr blue light followed by 12 hr red light, 18 hr blue light followed by 12 hr red light. Cell cultures were ultimately then subjected to analysis either by Western blotting or immunocytochemistry. For

immunocytochemistry, ARPE19 cell cultures were fixed in cold methanol or 4% paraformaldehyde for 10 min followed by washing in phosphate buffer. After incubation in goat serum (10% in phosphate buffer or PBS) for 60 min and washed in PBS, cultures were then exposed overnight at with either anti-ZO-1 (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA, 1:200) or anti-HO-1 (Enzo LS, Farmingdale, NY, USA, 1:500). After washing with PBS, cultures were then exposed for 2 hr to appropriate secondary antibody conjugated either to Alexa Fluor 488 or to Alexa Fluor 594 (1:300), washed in buffer. In some cases, DAPI (0.2 μ g/ml) was added to a wash solution. Images were obtained using a Leica DMI6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

For Western blot analysis, cells were collected by scraping them from culture wells, followed by centrifugation and resuspension in a cocktail lysis buffer (approximately 0.1 ml/mg pellet) that contained phosphatase and protease inhibitors (Sigma, Aldrich). After freezing and thawing in combination with sonication, protein content was determined using a bicinchoninic acid protein kit (Sigma-Aldrich). Defined amounts of protein and sample buffer (2 M Tris/HCl, pH 6.8, containing 8% SDS, 40% glycerol, 8% mercaptoethanol and 0.002% bromophenol blue) were then mixed together and immediately heated for 5 min at 95°C. Equal amounts of proteins were fractionated by electrophoresis using 10% polyacrylamide gels containing 0.1% SDS. Proteins were transferred to 0.22 μ m nitrocellulose membranes and were incubated overnight at 4°C with one of the following primary antibodies: anti-actin (MAB1501, Millipore, Burlington, MA, USA) 1:4000, anti-p38 (ab31828, Abcam, Cambridge, UK) 1:1000, anti-p38 phosphorylated (ab45381, Abcam) 1:1000, anti-apoptosis inhibitory factor (AIF) (sc-9716, Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA), 1:500 or Anti-HO-1 (ADI-SPA895, Enzo LS), 1:1000. Detection was then performed with appropriate biotinylated secondary antibodies. The final nitrocellulose blots were developed with a 0.016% w/v solution of 3-amino-9-ethylcarbazole in 50 mM sodium acetate (pH 5.0) containing 0.05% (v/v) Tween-20 and 0.03% (v/v) H₂O₂. The colour colorimetric reaction

was stopped with 0.05% sodium azide/PBST solution and the density of the individual bands quantified using IMAGEJ software.

ARPE19 cells grown in suitable inserts develop tight junctions and have a measured trans-epithelial membrane resistance (TER) potential (Dunn et al. 1996; Qin & Rodrigues 2010). ARPE19 cells were therefore grown in 6.5 mm, 0.4 μ m pore polycarbonate membrane inserts (Corning Ref.3413) in 24-well plates for up to 80 days. In the initial 7 days, the culture medium contained 10% FBS and maintained in the dark. Thereafter, the culture medium only contained 1% FBS. Treatment regime began after week 2 and continued for a total period of 80 days. At after week 2, cultures were either maintained in darkness or subjected to 48 hr cycles of light: (1) 12 hr blue light followed by 36 hr in darkness (2) 12 hr red light followed by 36 hr darkness or (3) 12 hr blue light followed by 12 hr darkness, followed by 12 hr red light and 12 hr darkness. Blue (465–475 nm, 400 lux, 13.6 W/m²) and red light (625–635 nm, 950 lux, 6.5 W/m²) LEDs were used to deliver light to the cultures and temperature monitored to always be at 37°C. Trans-epithelial membrane resistance (TER) measurements of ARPE19 cells grown in polycarbonate membrane inserts were made with the Volt-Ohm Meter (EVOM) from Millipore (MERS00002) using a STX2 probe. Trans-epithelial membrane resistance (TER) values were recorded twice a week, and each measurement was the average from three recordings 20 min apart. Trans-epithelial membrane resistance (TER) values for each well of cells were the media of the results in Ω ·cm².

Results

Initially, we determined the concentration of the mitochondrial toxins rotenone (inhibitor of complex I), 3-nitropropionic acid (3-NP or inhibitor of complex II), actinomycin A (inhibitor of complex III) and sodium azide (inhibitor of complex IV) required and the intensity of blue light necessary to cause 30–35% loss of ARPE19 cell viability over a period of 12 hr (Fig. 1). Surprisingly, when cells were first exposed to blue light and then immediately to the complex inhibitors, each for 12 hr, cell loss was more-or-less additive in all

cases (Fig. 1). However, when exposed to a defined intensity of red light that had no influence on its own, it significantly blunted the toxic effect of the various mitochondrial toxins (Fig. 1). Cell viability results were mirrored by the staining of cells with the mitochondrial dye JC-1 (Fig. 2). JC-1 is taken up by mitochondria and appears green in colour in cells exposed to blue light or mitochondria toxins that also reduce

cell viability (Figs 1 and 2). In contrast, JC-1 staining in healthy mitochondria is red in colour and this redness is elevated when cells are exposed to red light (Fig. 2). Moreover, and importantly, red light blunts the effects of blue light in terms of the conversion of JC-1 red stain into a green-coloured complex.

Figure 3 shows the viability of ARPE19 cells in culture subjected to an 18 hr insult with blue light followed

by exposure to no light or red light for a further period of 12 hr. In such conditions, blue light causes a 50% loss of cell viability and red light clearly attenuates this influence. The blunting of cell viability caused by blue light is not specific for red light but can also be attenuated by the use of curcumin (1 μM). Figures 4–7 show that the loss of cell viability caused by a blue light insult (Fig. 3) is associated with the

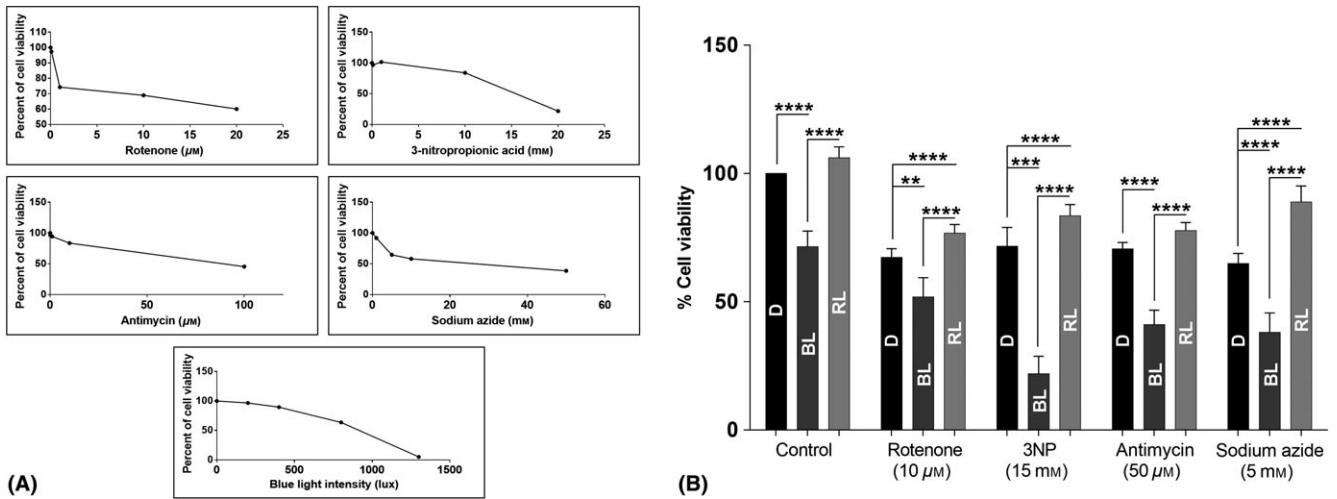


Fig. 1. Left panel shows the effect of various mitochondrial toxins and blue light on the viability of ARPE19 cell cultures. Each value is the mean from six independent experiments. Right panel shows the negative effect of specific amounts of mitochondrial toxins and blue light (BL) to cause a loss of approximately 30–35% ARPE19 cell viability compared with untreated control cells in the dark (D). Blue light in each case exacerbated cell death significantly while red light (RL) had the opposite influence. Results are expressed as mean \pm SEM where $n = 6$. Statistics was determined by a two-way ANOVA with Tukey’s multiple comparisons test where $***p < 0.001$, $**p < 0.01$.

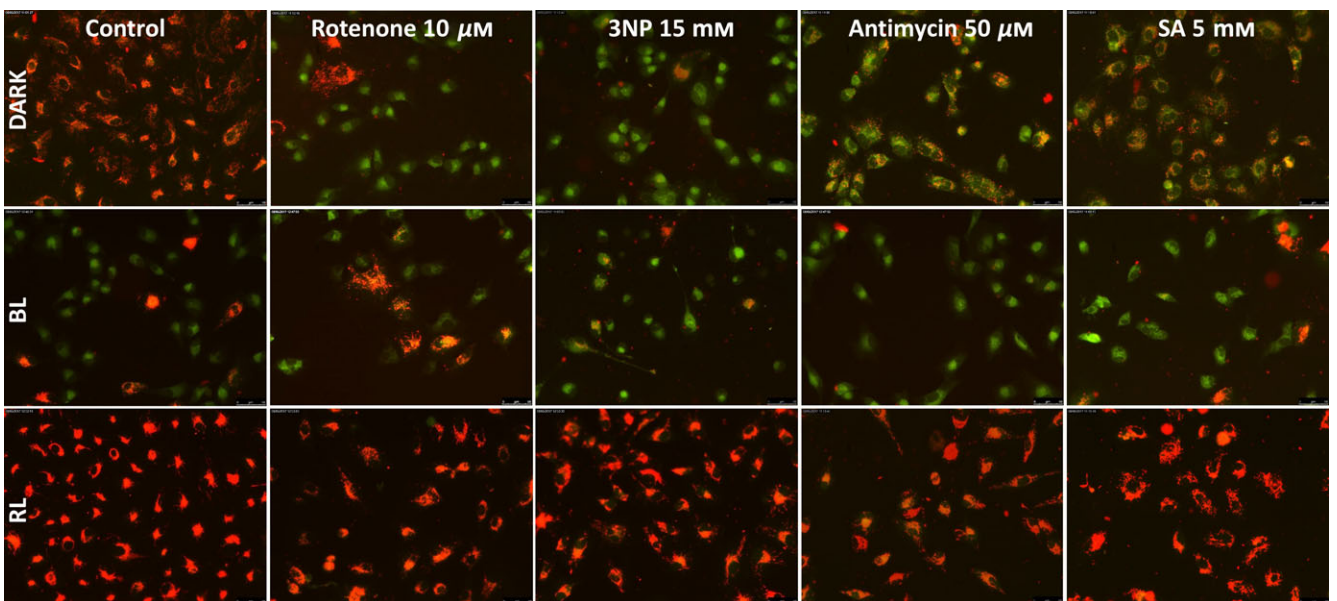


Fig. 2. ARPE19 cell cultures stained with JC-1 dye following exposure to different mitochondrial toxins in the dark or in the presence of blue (BL, 26 W/m^2) or red (RL, 6.5 W/m^2) light. The upper panels show that in comparison with the control cells (Dark), where mitochondria containing JC-1 appear red in fluorescence, they are green in fluorescence following their exposure to the toxins. Blue light also causes mitochondria to appear green and exacerbates the intensity of the green fluorescence in cells already exposed to toxins (middle panels). The bottom panels show that the negative effect of blue light or toxins on cell mitochondria is blunted by red light, where the dye appears as a red fluorescence.

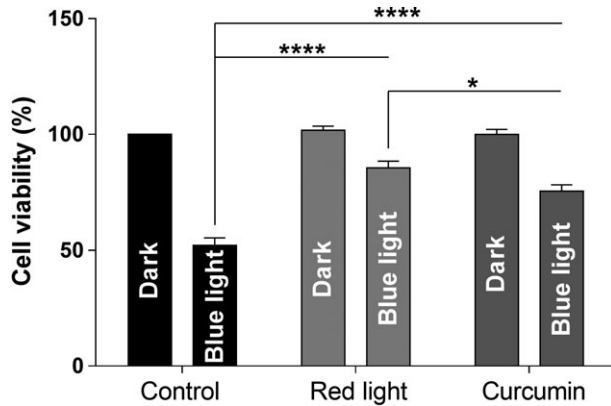


Fig. 3. This figure shows that the negative effect of a blue light (26 W/m², 18 hr) insult on the viability of ARPE19 cells compared with cells in the dark is blunted by subsequent exposure to either red light (6.5 W/m², 12 hr) or curcumin (1 μM, 12 hr). Neither red light nor curcumin caused loss of cell viability on their own. Results are expressed as mean ± SEM where n = 6. After two-way ANOVA statistical analyses, Sidak's multiple comparison test shows significant differences (****p < 0.001, *p < 0.1).

depolarization of mitochondria (Figs 4 and 5) and the generation of ROS (Figs 6 and 7). Thus, both visual and semi-quantitative analyses show that blue light causes the depolarization of mitochondria (Figs 5 and 7) and an elevation of ROS (Figs 6 and 7) which is significantly blunted by red light.

The analysis of Western blots of protein extracts derived from cells

exposed to blue light for various times followed by 12 hr of red light is shown in Fig. 8–10. Three hours of blue light caused no significant effect on AIF (Fig. 8) and a slight stimulation of phospho-p-38-MAPK production (Fig. 9) without HO-1 appearing to be affected (Fig. 10). However, with increasing exposure to blue light, AIF is fragmented to produce a 57 kDa

product and a greater up-regulation of phospho-p-38-MAPK and HO-1 occurs. Significantly, the degree of fragmentation of AIF and the up-regulation of phospho-p-38-MAPK and HO-1 when they occur are attenuated by red light. This can be demonstrated histologically for HO-1, where the elevated HO-1 immunoreactivity caused by blue light is blunted by red light (Fig. 11).

As shown in Fig. 12, confluent ARPE-19 cells in culture after about a week develop the clear staining of ZO-1 tight junction proteins between each other. Although we did not attempt to quantify the amount of ZO-1 immunoreactivity in confluent ZO-1 cultures, after 7 days, it was clearly evident that the exposure of such cells to blue light resulted in a loss of ZO-1 immunoreactivity (Fig. 12), as well as cell numbers (not quantified). Significantly, the loss of ZO-1 immunoreactivity caused by blue light (especially after 12 and 18 hr) administration was attenuated when red light (950 lux) was present (Fig. 12).

ARPE-19 cultures grown in 24-well plate inserts (Corning, Ref.3413) over 80 days show an increase in the

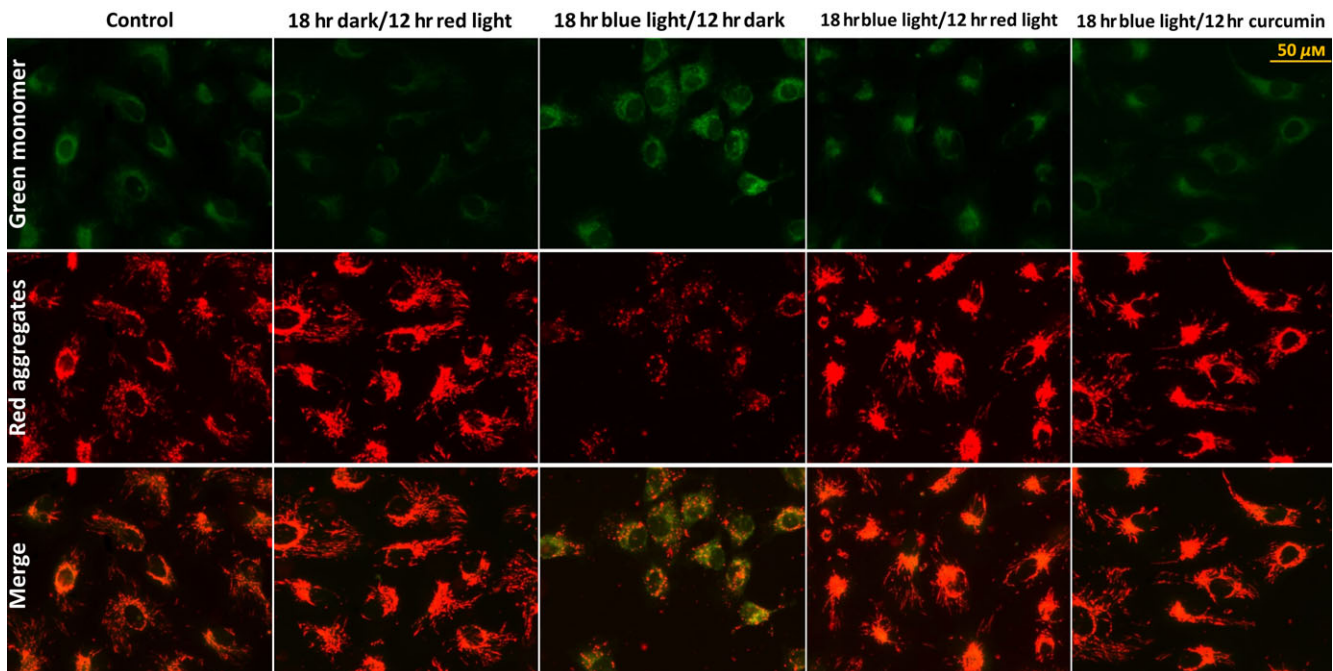


Fig. 4. Cultures of ARPE19 cells exposed for 12 hr to red light (6.5 W/m²) or curcumin (1 μM) alone or after a blue light (26 W/m²) insult (18 hr) and stained immediately thereafter with JC-1 dye. The upper two rows of panels show that mitochondria in control cells (dark) alone or exposed to red light exhibited intense red fluorescence JC-1 aggregates and low level green fluorescence JC-1 monomer suggesting their healthy status. In contrast, the negative influence of blue light caused an enhancement of green fluorescence JC-1 monomer and a reduction of red JC-1 aggregates. This effect caused by blue light is clearly reversed following exposure to red light or curcumin. The lower panels show merged images of green/red fluorescence of the JC-1 dye.

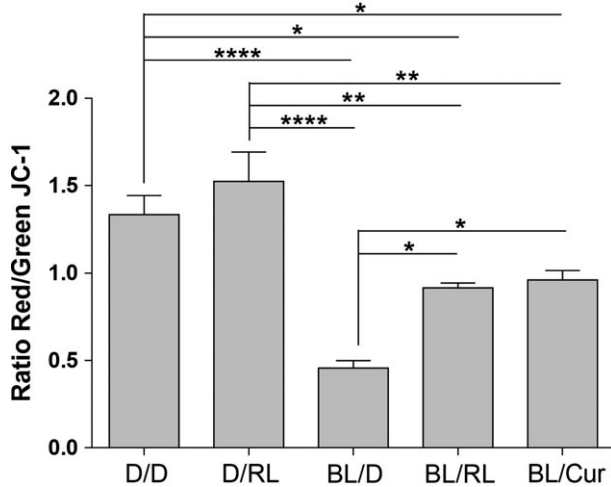


Fig. 5. Quantitative analysis of red (590 nm) and green (530 nm) fluorescence intensities in images as shown in Fig. 4. D/D, experiment in dark; D/RL, 18 hr in dark followed by 12 hr in red light; BL/D, 18 hr in blue light followed by 12 hr in dark; BL/RL, 18 hr in blue light followed by 12 hr in red light; BL/Cur, 18 hr in blue light followed by 12 hr in curcumin. The results show that a blue light insult (26 W/m²) has a negative effect on mitochondrial activity (ratio between red and green JC-1 is reduced compared with cells in the dark or exposed to red light) and blunted by a subsequent exposure to red light (6.5 W/m²) or curcumin (1 μM). Results are expressed as mean value ± SEM, n = 4; One-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparison test (***p < 0.001, **p < 0.01, *p < 0.1).

measurement of TER over time (Fig. 13), which reflects the continuous development of tight junction formation between cells. Such cells were either maintained in darkness or repeatedly exposed after 40 days to 48 hr cycles of light. Peak resistance of TER was more-or-less established to be approximately 130 Ωcm², (±SEM, n = 3) after 40 days and increased slightly thereafter over the next

40 days. This increase in TER was elevated clearly when cells were instead exposed to cycles of red light appearing to reach a peak resistance of 140 Ωcm² after 80 days. However, TER was significantly reduced in cells in cultures treated after day 40 with cycles of blue light (26 W/m²) and reached a low of 30–40 Ωcm² after day 80. Importantly, use of cycles of blue and red (6.5 W/m²) light ligated the negative influence

on TER elicited solely by blue light with the resistance after 80 days being around 100 Ωcm².

Discussion

Considerable evidence supports a role for mitochondrial dysfunction, oxidative stress and inflammation in the onset and development of AMD (Beckman & Ames 1998; Gouras et al. 2016; Datta et al. 2017). Oxidative stress to the retina can be caused by exposure to blue light (King et al. 2004; Lin et al. 2011; Yacout & Gaillard 2017) which results in altered mitochondrial bioenergetics (Jarrett & Boulton 2007) and RPE mtDNA damage (King et al. 2004; Lin et al. 2011; Yacout & Gaillard 2017) all of which are features associated with AMD. Importantly, studies on AMD tissue show specific mtDNA haplogroup variants occurring within the mitochondrial region that encodes for proteins of the electron transport chain (Canter et al. 2008; SanGiovanni et al. 2009), a decreased number of mitochondria (Feher et al. 2006) and greater damage to their mtDNA (Karunadharmar et al. 2010). The present study was therefore focused on understanding more about the biochemical events related to blue light mitochondrial-induced toxicity to RPE cells and to determine whether red light blunts this process. The overall aim of the study was to support the premise that red or infrared light can

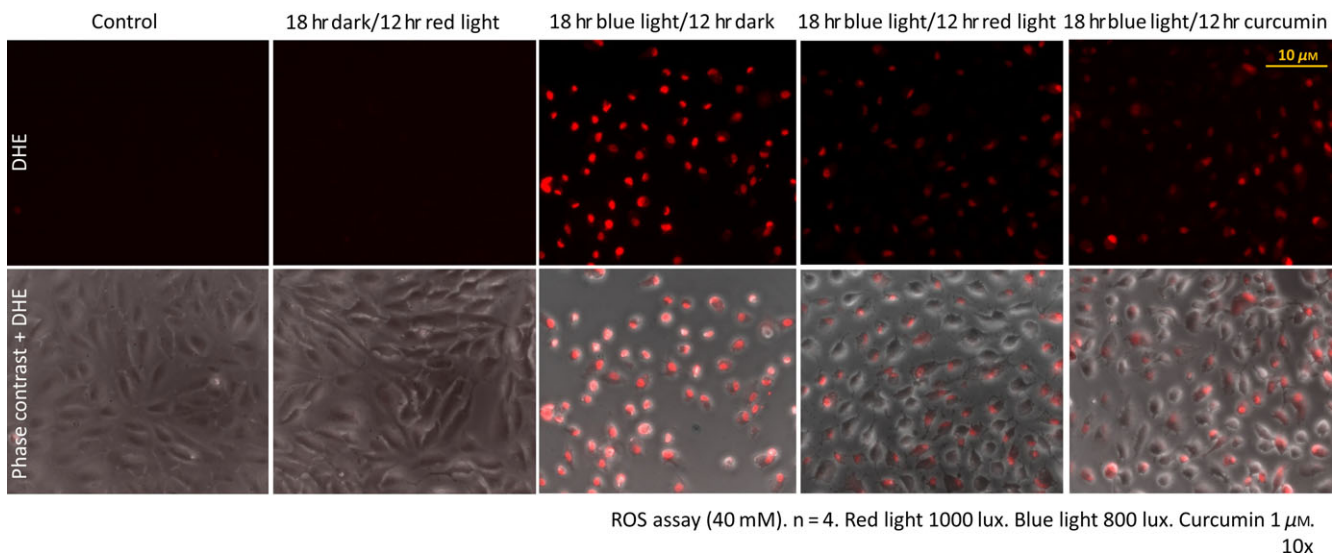


Fig. 6. Exposure of ARPE19 cells to blue light for 18 hr caused a strong stimulation of ROS, indicated by red DHE fluorescence, that was absent from cells in the dark (control) or following exposure to red light. The intensity of ROS production caused by blue light is clearly attenuated following a subsequent exposure to red light (6.5 W/m²) or curcumin (1 μM). The lower panels show the same fluorescent images as the upper panels but with addition of phase contrast microscopy.

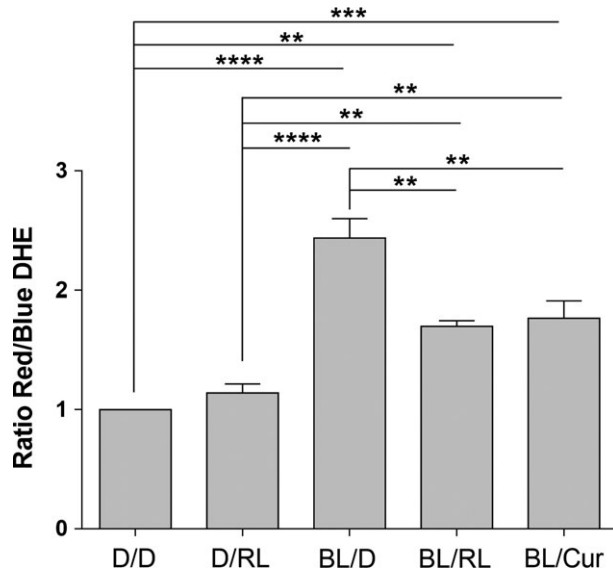


Fig. 7. Quantitative analysis of DHE fluorescence as shown in Fig. 6. Accumulated cytoplasmic DHE in healthy cells has a blue fluorescence (λ_{ex} 370 nm- λ_{em} 420 nm) and converted to a red fluorescence (λ_{ex} 535 nm- λ_{em} 610 nm) when ROS are induced. The ratio between red/blue fluorescence provides a measure for ROS generation. D/D, experiment in dark; D/RL, 18 hr in dark followed by 12 hr in red light; BL/D, 18 hr in blue light followed by 12 hr in dark; BL/RL, 18 hr in blue light followed by 12 hr in red light; BL/Cur, 18 hr in blue light followed by 12 hr in curcumin. The results clearly show that the blue light (26 W/m^2) causes an increase in ROS and blunted following exposure to red light (6.5 W/m^2) or curcumin ($1 \mu\text{M}$). Results are expressed as mean value \pm SEM, $n = 4$; One-way ANOVA with Holm-Sidak's multiple comparison test (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$).

be used as a noninvasive procedure to target dysfunctional RPE cells caused by blue light in AMD.

ARPE19 cells lack significant amounts of pigments like melanin and lipofuscin that are located outside the mitochondria (Boulton et al. 1990). Our studies on ARPE19 thus probably relate more to an action of blue light effects on mitochondrial pigments. This is in line with reports showing that blue light causes cell death and structural damage to lipofuscin-free RPE cells (Pang et al. 1998; King et al. 2004) and also causes the generation of ROS in isolated RPE mitochondria (Chen et al. 1993). A direct negative effect of blue light on mitochondrial enzyme complexes has been demonstrated in a study on fibroblasts devoid of mtDNA and unable to synthesize normal mitochondrial enzyme complexes. It was shown that unlike healthy fibroblasts, such fibroblasts were unaffected by light (Osborne et al. 2008). We therefore suggest that the present studies on ARPE19 cells, like that conducted by others (Roehlecke et al. 2009; Youn et al. 2009), provide a means to

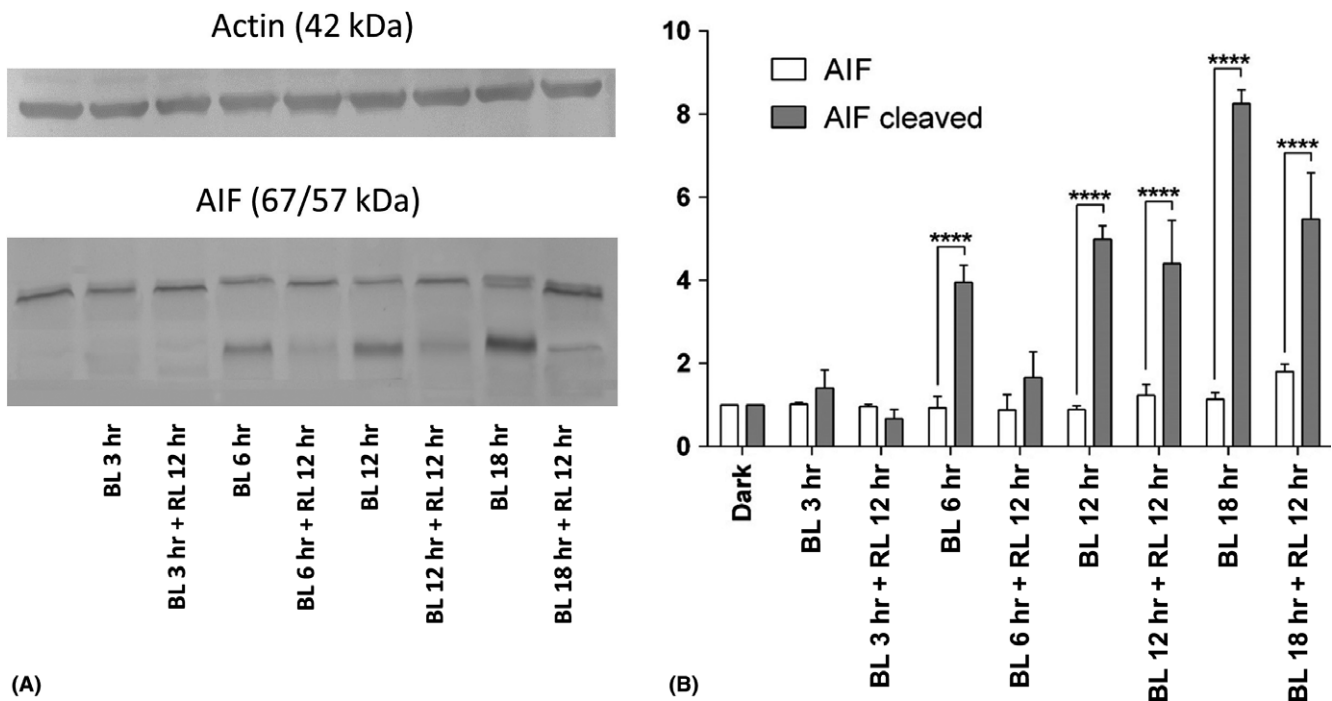


Fig. 8. Western blots where equivalent amounts of extracts from ARPE19 cells cultured under different conditions were fractionated and samples processed for the detection of apoptosis inhibitory factor (AIF) and actin proteins (A). AIF appears as a single band with a molecular weight of 67 kDa in control cultures (Dark). Exposure of such cultures to blue light (26 W/m^2) shows AIF to be gradually cleaved to produce a 57 kDa species in a time-dependent manner. The cleavage of AIF is completely blocked by 12 hr of red light (6.5 W/m^2) delivered after 6 hr of blue light but only partially when the blue light insult was for 12 or 18 hr. B shows the quantitative analysis of the ratio of intensities of the 57 kDa and 67 kDa bands for AIF relative to actin, derived from three experiments as shown in A, \pm SEM. Significant differences were determined using a two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test (*** $p < 0.001$).

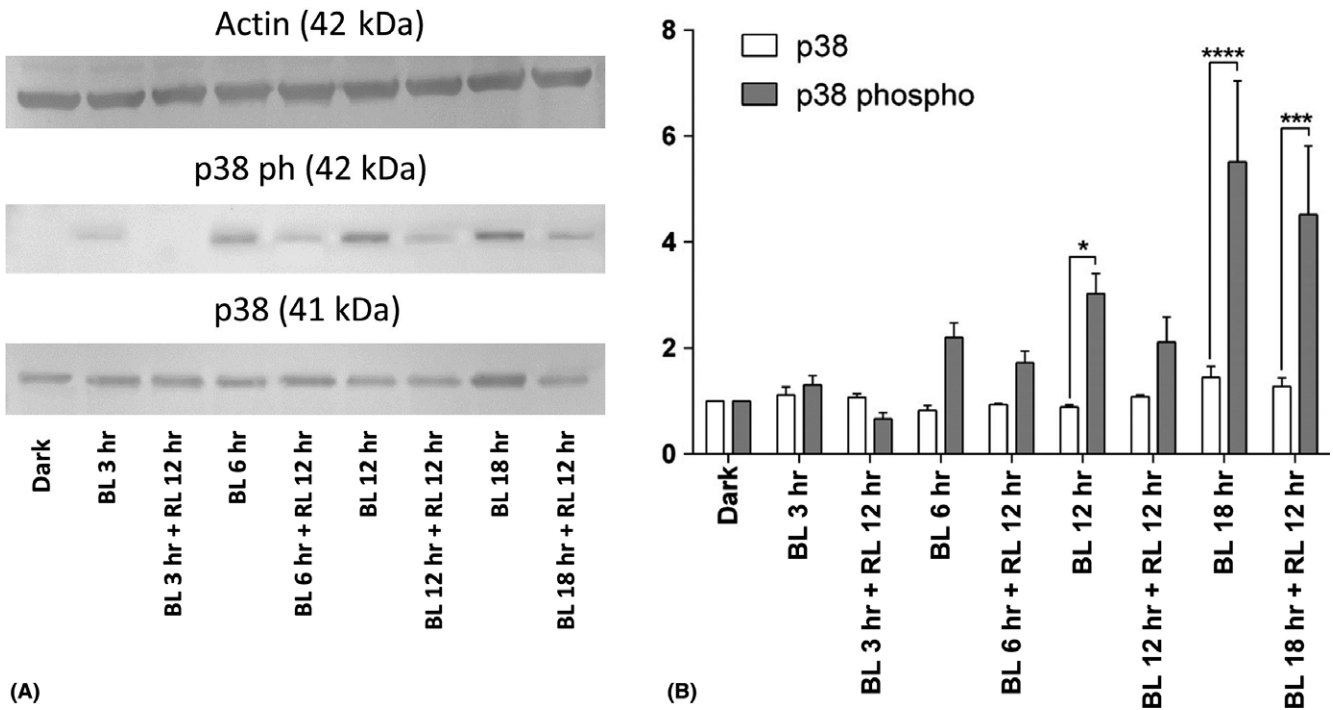


Fig. 9. Western blots where equivalent amounts of extracts from ARPE19 cells cultured under different conditions were fractionated and samples processed for the detection of p38, phosphorylated p38 (p38 ph) and actin proteins (A). Phosphorylated p38 (42 kDa) is not present in control (Dark) cultures but is gradually expressed following exposure of blue (26 W/m²) between 3 and 18 hr. In contrast, p38 protein (41 kDa) appears to be unaffected by blue light and being of similar amounts in untreated cultures in the dark. The gradual increase in phosphorylated p38 protein is clearly blunted by 12 hr of red light (6.5 W/m²) delivered after 6, 12 or 18 hr of blue light. B shows the quantitative analysis of the ratio of intensities of the p-38 (42 kDa) and phosphorylated p-38 (41 kDa) proteins relative to actin, derived from three experiments as shown in A, ±SEM. Significant differences were determined using a two-way ANOVA with Sidak's multiple comparison test (***p < 0.001).

determine how blue light affects mitochondrial chromophores in RPE cells *in situ*. As shown in Figs 4–7, the exposure of ARPE19 cells to blue light causes mitochondrial depolarization and an elevation of ROS, which are known to be linked to cell death (Heiskanen et al. 1999; Orrenius et al. 2007; Ott et al. 2007). Mitochondrial dysfunction/depolarization was demonstrated by use of the stain JC-1, which accumulates in mitochondria, appearing red/orange in fluorescence (590 nm) in healthy activated organelles and green in fluorescence (530 nm) when mitochondria are depolarized (Perelman et al. 2012).

To determine whether one or another of the mitochondrial enzyme complexes are specifically affected by blue light, we exposed ARPE19 cells to defined mitochondrial enzyme complex toxins – rotenone (inhibitor of complex I), 3-nitropropionic acid (3-NP or inhibitor of complex II), actinomycin A (inhibitor of complex III) and sodium azide (inhibitor of complex IV), in the presence or absence of blue light (Fig. 2). In each case, cell death

caused by blue light and toxins was more-or-less additive. These results therefore suggest that blue light toxicity might result from an effect on no single mitochondrial enzyme complex. A similar conclusion was reached in a study by Ji et al. (2011) who compared the biochemical modes of cell death induced by blue light with that of sodium azide. The study was based on the idea that mitochondrial complex IV is specifically affected by sodium azide (Leary et al. 2002; Safulina et al. 2006) and absorbed by blue light (García-Silva et al. 1997; Hockberger et al. 1999). Blue light-induced cell death activated AIF, c-Jun, JNK and HO-1 without influencing α -fodrin and caspase-3, and cell death caused by sodium azide resulted in the activation of α -fodrin and caspase-3 but had no effect on AIF, c-Jun, JNK or HO-1 (Ji et al. 2011). The studies by Ji et al. (2011) and our group argue for the view that blue light toxicity probably results from an effect on no single mitochondrial enzyme complex. However, both studies rely on assuming specificity for the mitochondrial

enzyme complex inhibitors used. This is certainly not the case. For example, sodium azide has been reported to stimulate nitric oxide production (Bennett et al. 1996) and affect the functions of potassium (Qamirani et al. 2006) and calcium (Marino et al. 2007) channels.

Consistent with studies of other cell-types (Li & Osborne 2008; Osborne et al. 2008, 2014; Ji et al. 2011; del Olmo-Aguado et al. 2012; Del Olmo-Aguado et al. 2016), blue light-induced toxicity to ARPE19 cells causes the up-regulation of HO-1 and the cleavage of AIF in a dose-dependent manner. Apoptosis inhibitory factor (AIF) is a flavin-binding mitochondrial intermembrane protein that has been implicated in maintenance of the electron transport chain function, ROS regulation and cell death (Delavallée et al. 2011; Polster 2013; Sosna et al. 2014). It has also been shown that when AIF is cleaved within mitochondria, the 57 kDa product migrates to the nucleus to cause alkylation and DNA damage, resulting in a caspase-independent cell death, termed necroptosis (Artus et al.

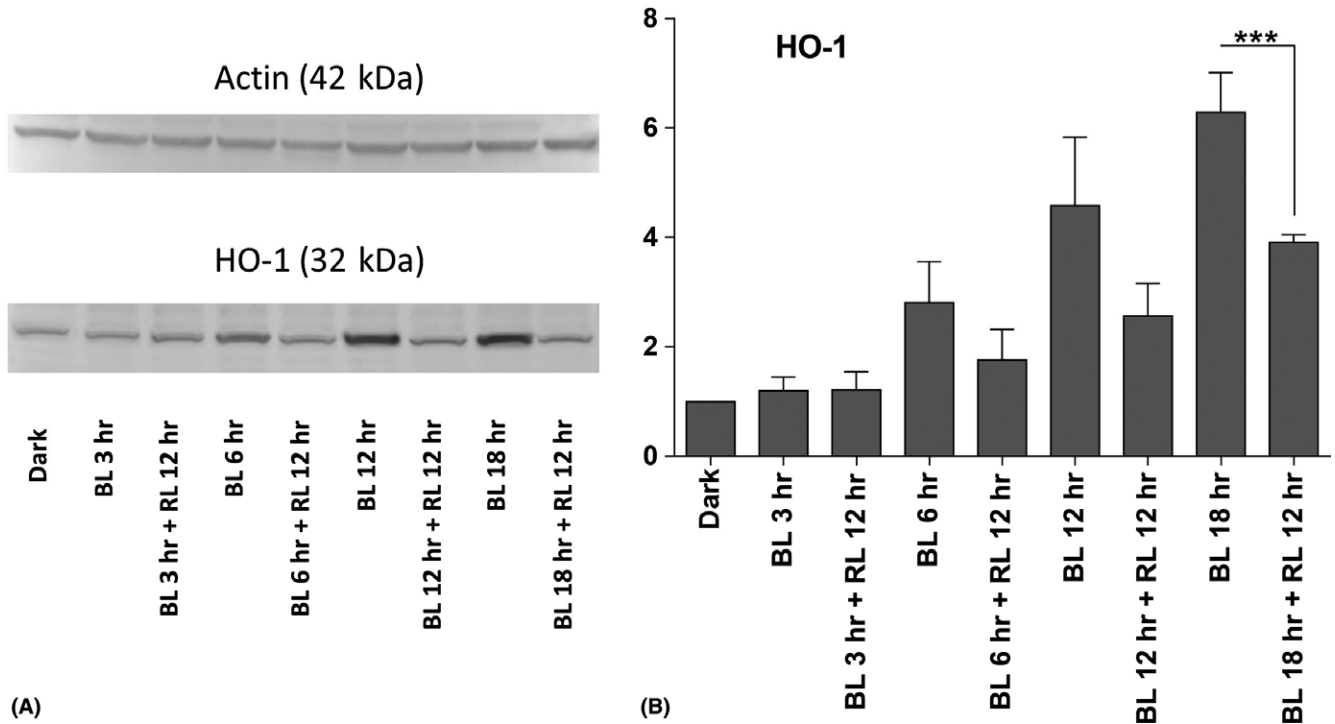


Fig. 10. Western blot analyses of equivalent amounts of extracts from ARPE19 cells cultured under different conditions were fractionated and samples processed to detect HO-1 and actin proteins. The amount of HO-1 protein (32 kDa) increases in cultures exposed to blue light (26 W/m²) in a time-dependent manner and blunted by red light (6.5 W/m²) delivered 12 hr after a blue light insult (A). B shows the quantitative analysis (±SEM) of the ratio of intensities of HO-1 (32 kDa) and relative to actin, derived from three experiments where it can be seen that red light blocks the increase in HO-1 caused by blue light at all time intervals. Significant differences were determined using a one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test (***) *p* < 0.0001).

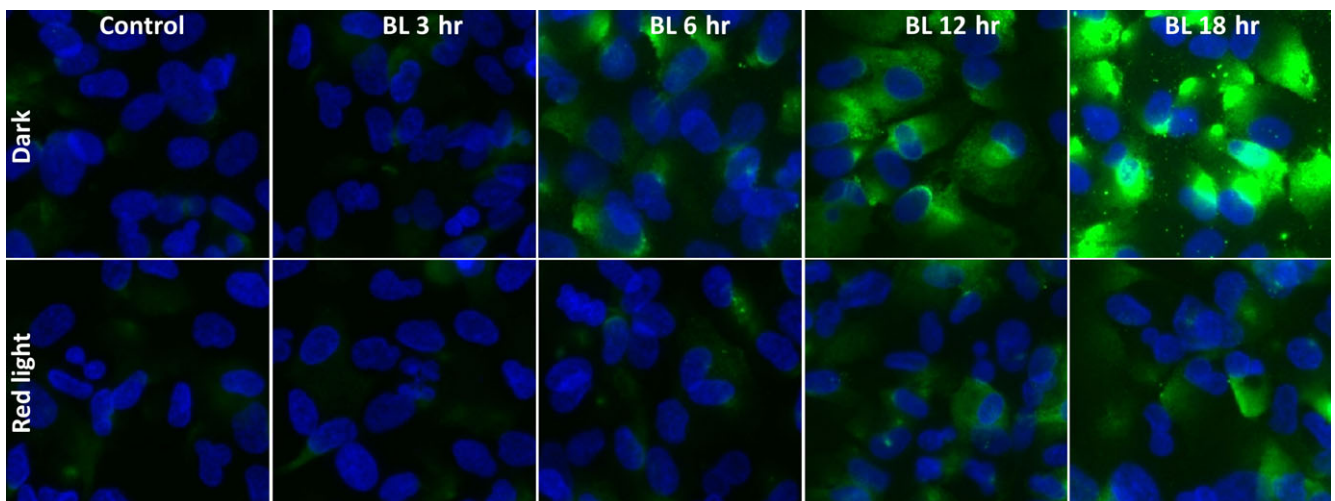


Fig. 11. HO-1 immunoreactivity in ARPE19 cell cultures exposed to different amounts of blue light (26 W/m²) followed by exposure of 12 hr of red light (6.5 W/m²). HO-1 immunoreactivity is absent in cultures maintained in the dark (Control) or when exposed to red light. It is clear that blue light delivered between 6 and 18 hr dose-dependently increased HO-1 immunoreactivity and that in each case, red light given thereafter blunted the stimulation of HO-1.

2010; Polster 2013; Hanus et al. 2015). Significantly, red light, which stimulates mitochondrial complex IV or COX (Karu et al. 2004; Karu & Kolyakov 2005; Wong-Riley et al. 2005; Lane 2006; Begum et al. 2013), attenuates blue light-induced AIF cleavage (Fig. 9)

and enhances cell viability as a consequence (Fig. 3). These results show that negative actions on flavin-containing nucleotides within mitochondria (as might be caused by blue light) can be blunted through the stimulation of COX (Lane 2006).

The up-regulation of HO-1 protein caused by blue light might reflect its role in endogenous neuroprotection. HO-1 is a stress-response protein that plays a vital function in maintaining cellular homeostasis and is known to be overexpressed in, for example,

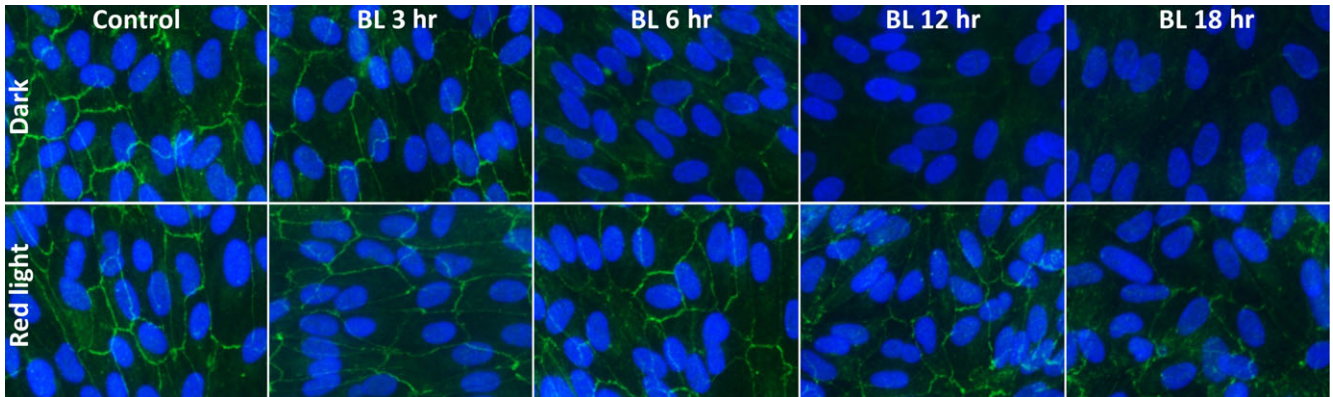


Fig. 12. This figure shows that confluent ARPE cell cultures in the dark (Control) develop tight junctions indexed by the staining for ZO-1 immunoreactivity and is unaffected by exposure to red light. However, with increasing amounts of exposure to blue light (26 W/m^2), tight junction formation is decreased being practically absent after 12–18 hr. Exposure of such cultures to 12 hr red light (6.5 W/m^2) showed enhancement of ZO-1 immunoreactivity now being evident in cultures that had been previously exposed to 12–18 hr of blue light.

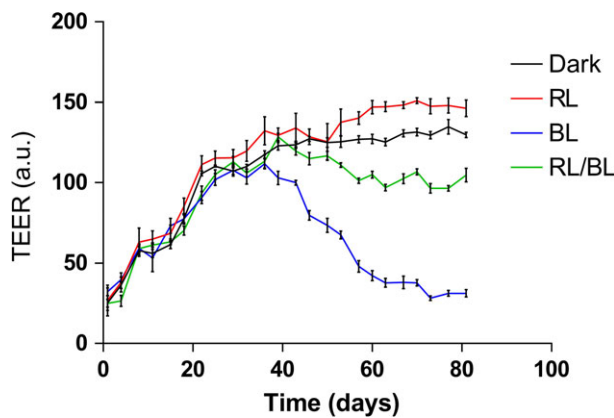


Fig. 13. ARPE-19 cultures grown in 24-well plate inserts gradually allow for an increase in the measurement of their trans-epithelial resistance or TER, which reflects the continuous development of tight junction formation between cells. Such cells were either maintained in darkness for 80 days or repeatedly exposed after 2 weeks to 48 hr cycles of light. Peak resistance of TER was more-or-less established to be approximately $130 \text{ } \Omega\text{cm}^2$, ($\pm\text{SEM}$, $n = 4$) after 40 days and increased slightly thereafter over the next 40 days. This increase in TER was elevated clearly when cells were instead exposed to cycles of red light appearing to reach a peak resistance of $140 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ after 80 days. However, TER was significantly reduced in cells in cultures treated after 2 weeks with cycles of blue light (26 W/m^2) and reached a low of $30\text{--}40 \text{ } \Omega\text{cm}^2$ after day 80. Importantly, use of cycles of blue and red (6.5 W/m^2) light ligated the negative influence on TER elicited solely by blue light with the resistance after 80 days being around $100 \text{ } \Omega\text{cm}^2$.

pathological iron deposition, oxidative stress and mitochondrial damage (Schipper et al. 2000; Himori et al. 2014). The magnitude of HO-1 induction therefore might be important in the defence of organisms against oxidative stress-mediated injuries and other diverse factors (Amersi et al. 1999; Ursu et al. 2014). HO-1 gene expression can be induced in different ways, one being the Nrf2 and antioxidant-responsive-element or Nrf2-ARE pathway. This pathway can be activated by pharmacological agents like curcumin to cause the up-regulation of HO-1, which participates in a reduction of

various forms of stress (Balogun et al. 2003; He et al. 2014; Dai et al. 2016). Significantly, blue light oxidative-induced toxicity to ARPE19 cells is blunted by both curcumin and red light (Fig. 3). However, red light, as shown in Figs. 10 and 11, seems to cause the down-regulation of the HO-1 protein. As a consequence, we interpret this observation as support for the notion that the beneficial findings associated with red light (Karu et al. 2004; Karu & Kolyakov 2005; Wong-Riley et al. 2005; Begum et al. 2013) occur via the action on COX and that the Nrf2-ARE pathway may not be involved.

However, more detailed studies are necessary to demonstrate this to be the case unequivocally. The present data also support the view that the blue light-induced up-regulation of HO-1 reflects an endogenous protective process to counteract injury caused by blue light.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), including extracellular signal regulators kinase (ERK), c-Jun, N-terminal kinase (JNK) and p38-MAPK, are linked with a diverse range of biological activities including the regulation of cell (Ono & Han 2000; Cuadrado & Nebreda 2010). Activation of ERKs typically contributes to cell differentiation, proliferation and survival, whereas JNK and p38-MAPK are typically activated by pro-inflammatory cytokines and environmental stress (such as UV radiation and osmotic stress; Cuadrado & Nebreda 2010; Davies et al. 2000; Ono & Han 2000). The present studies show that the exposure of ARPE19 cells to blue light resulted in the occurrence of the phosphorylated product of p38-MAPK which was increasingly elevated when the exposure time of blue light was increased (Fig. 9). Stimulation of the formation of phospho-p38-MAPK by blue light has also been reported to occur in photoreceptor (Kuse et al. 2015) and retinal-derived cells (Ji et al. 2011). Thus, it appears that a common feature associated with a blue light insult involves the activation of p38-MAPK and for cell death to occur by necroptosis. Importantly, these negative influences of blue light to ARPE19 cells are attenuated by the use of red

light. Red light decreases the up-regulation of phospho-p38-MAPK caused by blue light (Fig. 9), which is correlated with increased cell survival (Fig. 2).

Retinal pigment epithelial (RPE) cells are separated from each other by tight junctions *in situ* and can be visualized by staining for the localization of proteins like ZO-1, claudin-19 and occludin. Tight junctions retard the trans-epithelial diffusion of solutes via the spaces that lie between neighbouring cells (Rizzolo et al. 2011) and are probably affected by low grade, subclinical inflammatory processes in AMD (Yang et al. 2007; Peng et al. 2012; Perez & Caspi 2015). Our studies, and reports by others (Dunn et al. 1996; Qin & Rodrigues 2010), show that ARPE19 cells can be grown in 24-well plate inserts to gradually develop tight junctions to allow for a trans-epithelial membrane resistance (TER) to be recorded. As shown in Figure 12, the tight junction protein ZO-1 is gradually expressed in ARPE19 cultures. The TER results recorded for ARPE19 cells grown in 24-well plate inserts (Fig. 13) clearly reveal that the maximum TER values recorded for cultures maintained in the dark for 80 days and increased slightly when exposed to cycles of red light after an initial period in blue light. However, cycles of blue light given to cultures at day 40 steadily reduced TER values reached after 40 days in the dark but if the blue light cycle is combined with red light the TER values remained more-or-less constant. We interpret these findings to suggest the potential for blue light to affect the tight junction function of RPE cells *in situ*, which ultimately leads to cell dysfunction, and that red light can prevent this from happening.

In conclusion, our studies show that the exposure of RPE cell mitochondria to blue light causes mitochondrial malfunction and oxidative stress and suggest that such a chronic influence is associated with the pathogenesis of AMD. Importantly, we show that red light delivered after a negative effect of blue light attenuates this process, thereby supporting the mass of other experimental data for the use of red or infrared light therapy, also known as photomodulation, as a noninvasive procedure to target RPE dysfunction in AMD. Various preclinical research

studies have reported the beneficial influence of red light therapy in ocular diseases such as in AMD (Ivancic & Ivancic 2008; Merry et al. 2017; the TORPA (NCT00940407) and LIGHT-SIGHT (NCT02725762) trials) and for diabetic retinopathy (Tang et al. 2014). However, the use of red light in the treatment of human eye disorders remains to be established in mainstream medicine (Huang et al. 2012; Fitzgerald et al. 2013). This is because the data from existing randomized clinical trials are controversial and unequivocal details of the underlying biochemical mechanism remain to be established. Moreover, a biphasic dose-response has been observed and low levels of red light seem to have a better effect than higher levels. In addition, experimental results are often difficult to replicate, being hampered by the undisclosed nature of the irradiation source (laser or light-emitting diode), the mode of delivery (pulsed or continuous), stimulation wavelengths, as well as the rate, duration and frequency of treatments (Quirk & Whelan 2011; Fitzgerald et al. 2013). In addition, little attention has been paid to the potential negative effects of red light therapy which require detailed analysis.

References

- Algvere PV, Marshall J & Seregard S (2006): Age-related maculopathy and the impact of blue light hazard. *Acta Ophthalmol Scand* **84**: 4–15.
- Amers F, Buelow R, Kato H et al. (1999): Upregulation of heme oxygenase-1 protects genetically fat Zucker rat livers from ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* **104**: 1631–1639.
- Andley UP & Chylack LT (1990): Recent studies on photodamage to the eye with special reference to clinical phototherapeutic procedures. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* **7**: 98–105.
- Artus C, Boujrad H, Bouharrour A et al. (2010): AIF promotes chromatinolysis and caspase-independent programmed necrosis by interacting with histone H2AX. *EMBO J* **29**: 1585–1599.
- Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R, Alam J & Motterlini R (2003): Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* **371**: 887–895.
- Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D & Boulton M (2000): The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* **45**: 115–134.
- Beckman KB & Ames BN (1998): Mitochondrial aging: open questions. *Ann N Y Acad Sci* **854**: 118–127.
- Begum R, Powner MB, Hudson N, Hogg C & Jeffery G (2013): Treatment with 670 nm light up regulates cytochrome C oxidase expression and reduces inflammation in an age-related macular degeneration model. *PLoS One* **8**: e57828.
- Bennett MC, Mlady GW, Kwon YH & Rose GM (1996): Chronic *in vivo* sodium azide infusion induces selective and stable inhibition of cytochrome c oxidase. *J Neurochem* **66**: 2606–2611.
- Boulton M, Docchio F, Dayhaw-Barker P, Ramponi R & Cubeddu R (1990): Age-related changes in the morphology, absorption and fluorescence of melanosomes and lipofuscin granules of the retinal pigment epithelium. *Vision Res* **30**: 1291–1303.
- Boulton M, Rózanowska M & Rózanowski B (2001): Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol, B* **64**: 144–161.
- Canter JA, Haas DW, Kallianpur AR et al. (2008): The mitochondrial pharmacogenomics of haplogroup T: MTND2*LHON4917G and antiretroviral therapy-associated peripheral neuropathy. *Pharmacogenomics J* **8**: 71–77.
- Chen XY, Xiong YQ & Lipson ED (1993): Action spectrum for subliminal light control of adaptation in *Phycomyces* phototropism. *Photochem Photobiol* **58**: 425–431.
- Chen Q, Chai Y-C, Mazumder S, Jiang C, Macklis RM, Chisolm GM & Almasan A (2003): The late increase in intracellular free radical oxygen species during apoptosis is associated with cytochrome c release, caspase activation and mitochondrial dysfunction. *Cell Death Differ* **10**: 323–334.
- Cuadrado A & Nebreda AR (2010): Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J* **429**: 403–417.
- Dai C, Li B, Zhou Y, Li D, Zhang S, Li H, Xiao X & Tang S (2016): Curcumin attenuates quercetin induced apoptosis and inflammation via the opposite modulation of Nrf2/HO-1 and NF- κ B pathway in human hepatocyte L02 cells. *Food Chem Toxicol* **95**: 52–63.
- Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L & Handa JT (2017): The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res* **60**: 201–218.
- Davies SP, Reddy H, Caivano M & Cohen P (2000): Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *Biochem J* **351**: 95–105.
- Del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C & Osborne NN (2016): Blue light action on mitochondria leads to cell death by necroptosis. *Neurochem Res* **41**: 2324–2335.
- Delavallée L, Cabon L, Galán-Malo P, Lorenzo HK & Susin SA (2011): AIF-mediated caspase-independent necroptosis: a new

- chance for targeted therapeutics. *IUBMB Life* **63**: 221–232.
- Dunn KC, Aotaki-Keen AE, Putkey FR & Hjelmeland LM (1996): ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Exp Eye Res* **62**: 155–169.
- Eells JT, Gopalakrishnan S & Valter K (2016): Near-infrared photobiomodulation in retinal injury and disease. *Adv Exp Med Biol* **854**: 437–441.
- Egorov SY, Krasnovsky AA, Bashtanov MY, Mironov EA, Ludnikova TA & Kritsky MS (1999): Photosensitization of singlet oxygen formation by pterins and flavins. Time-resolved studies of oxygen phosphorescence under laser excitation. *Biochemistry (Mosc)* **64**: 1117–1121.
- Feeney-Burns L, Hilderbrand ES & Eldridge S (1984): Aging human RPE: morphometric analysis of macular, equatorial, and peripheral cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **25**: 195–200.
- Feher J, Kovacs I, Artico M, Cavallotti C, Papale A & Balacco Gabrieli C (2006): Mitochondrial alterations of retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Neurobiol Aging* **27**: 983–993.
- Feigl B (2009): Age-related maculopathy – linking aetiology and pathophysiological changes to the ischaemia hypothesis. *Prog Retin Eye Res* **28**: 63–86.
- Fitzgerald M, Hodgetts S, Van Den Heuvel C et al. (2013): Red/near-infrared irradiation therapy for treatment of central nervous system injuries and disorders. *Rev Neurosci* **24**: 205–226.
- García-Silva MT, Ribes A, Campos Y, Garavaglia B & Arenas J (1997): Syndrome of encephalopathy, petechiae, and ethylmalonic aciduria. *Pediatr Neurol* **17**: 165–170.
- Godley BF, Shamsi FA, Liang F-Q, Jarrett SG, Davies S & Boulton M (2005): Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem* **280**: 21061–21066.
- Gorgidze LA, Oshemkova SA & Vorobjev IA (1998): Blue light inhibits mitosis in tissue culture cells. *Biosci Rep* **18**: 215–224.
- Gorn RA & Kuwabara T (1967): Retinal damage by visible light. A physiologic study. *Arch Ophthalmol* **77**: 115–118.
- Gouras P, Ivert L, Neuringer M & Nagasaki T (2016): Mitochondrial elongation in the macular RPE of aging monkeys, evidence of metabolic stress. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **254**: 1221–1227.
- Grignolo A, Orzalesi N, Castellazzo R & Vittone P (1969): Retinal damage by visible light in albino rats. *Ophthalmologica* **157**: 43–59.
- Hanus J, Anderson C & Wang S (2015): RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. *Ageing Res Rev* **24**: 286–298.
- Harman D (1981): The aging process. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**: 7124–7128.
- He M, Pan H, Chang RC-C, So K-F, Brecha NC & Pu M (2014): Activation of the Nrf2/HO-1 antioxidant pathway contributes to the protective effects of lycium barbarum polysaccharides in the rodent retina after ischemia-reperfusion-induced damage. *PLoS One* **9**: e84800.
- Heiskanen KM, Bhat MB, Wang HW, Ma J & Nieminen AL (1999): Mitochondrial depolarization accompanies cytochrome c release during apoptosis in PC6 cells. *J Biol Chem* **274**: 5654–5658.
- Himori N, Maruyama K, Yamamoto K et al. (2014): Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res* **92**: 1134–1142.
- Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE, Lavin C, Chu S, Dadrás S, Reddy JK & White JG (1999): Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 6255–6260.
- Huang L, Xuan Y, Koide Y, Zhiyentayev T, Tanaka M & Hamblin MR (2012): Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. *Lasers Surg Med* **44**: 490–499.
- Ivancic BT & Ivancic T (2008): Low-level laser therapy improves vision in patients with age-related macular degeneration. *Photomed Laser Surg* **26**: 241–245.
- Jarrett SG & Boulton ME (2007): Poly(ADP-ribose) polymerase offers protection against oxidative and alkylation damage to the nuclear and mitochondrial genomes of the retinal pigment epithelium. *Ophthalmic Res* **39**: 213–223.
- Ji D, Kamalden TA, del Olmo-Aguado S & Osborne NN (2011): Light- and sodium azide-induced death of RGC-5 cells in culture occurs via different mechanisms. *Apoptosis* **16**: 425–437.
- Jung DW, Apel L & Brierley GP (1990): Matrix free Mg²⁺ changes with metabolic state in isolated heart mitochondria. *Biochemistry* **29**: 4121–4128.
- Karu TI & Kolyakov SF (2005): Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy. *Photomed Laser Surg* **23**: 355–361.
- Karu TI, Pyatibrat LV & Afanasyeva NI (2004): A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol* **80**: 366–372.
- Karunadharma PP, Nordgaard CL, Olsen TW & Ferrington DA (2010): Mitochondrial DNA damage as a potential mechanism for age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **51**: 5470.
- King A, Gottlieb E, Brooks DG, Murphy MP & Dunaief JL (2004): Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* **79**: 470–475.
- Klein BEK & Klein R (2007): Lifestyle exposures and eye diseases in adults. *Am J Ophthalmol* **144**: 961–969.
- Knels L, Valtink M, Roehlecke C, Lupp A, de la Vega J, Mehner M & Funk RHW (2011): Blue light stress in retinal neuronal (R28) cells is dependent on wavelength range and irradiance. *Eur J Neurosci* **34**: 548–558.
- Krigel A, Berdugo M, Picard E et al. (2016): Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals LED phototoxicity. *Neuroscience* **339**: 296–307.
- Kuse Y, Ogawa K, Tsuruma K, Shimazawa M & Hara H (2015): Damage of photoreceptor-derived cells in culture induced by light emitting diode-derived blue light. *Sci Rep* **4**: 5223.
- Kuwabara T & Gorn RA (1968): Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* **79**: 69–78.
- Lane N (2006): Cell biology: power games. *Nature* **443**: 901–903.
- Leary SC, Hill BC, Lyons CN et al. (2002): Chronic treatment with azide in situ leads to an irreversible loss of cytochrome c oxidase activity via holoenzyme dissociation. *J Biol Chem* **277**: 11321–11328.
- Li G-Y & Osborne NN (2008): Oxidative-induced apoptosis to an immortalized ganglion cell line is caspase independent but involves the activation of poly(ADP-ribose) polymerase and apoptosis-inducing factor. *Brain Res* **1188**: 35–43.
- Liang HL, Whelan HT, Eells JT, Meng H, Buchmann E, Lerch-Gaggli A & Wong-Riley M (2006): Photobiomodulation partially rescues visual cortical neurons from cyanide-induced apoptosis. *Neuroscience* **139**: 639–649.
- Lin H, Xu H, Liang F-Q, Liang H, Gupta P, Havey AN, Boulton ME & Godley BF (2011): Mitochondrial DNA damage and repair in RPE associated with aging and age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **52**: 3521–3529.
- Margrain TH, Boulton M, Marshall J & Sliney DH (2004): Do blue light filters confer protection against age-related macular degeneration? *Prog Retin Eye Res* **23**: 523–531.
- Marino S, Marani L, Nazzaro C, Beani L & Siniscalchi A (2007): Mechanisms of sodium azide-induced changes in intracellular calcium concentration in rat primary cortical neurons. *Neurotoxicology* **28**: 622–629.
- Mellerio J (1994): Light effects on the retina. *Princ Pract Ophthalmol Basic Sci* **116**: 1326–1345.
- Merry GF, Munk MR, Dotson RS, Walker MG & Devenyi RG (2017): Photobiomodulation reduces drusen volume and improves visual acuity and contrast sensitivity in dry age-related macular degeneration. *Acta Ophthalmol* **95**: e270–e277.
- Mosmann T (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**: 55–63.
- Noell WK (1979): Effects of environmental lighting and dietary vitamin A on the vulnerability of the retina to light damage. *Photochem Photobiol* **29**: 717–723.
- Noell WK, Walker VS, Kang BS & Berman S (1966): Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* **5**: 450–473.

- Núñez-Álvarez C, Del Olmo-Aguado S, Merayo-Lloves J & Osborne NN (2017): Near infra-red light attenuates corneal endothelial cell dysfunction in situ and in vitro. *Exp Eye Res* **161**: 106–115.
- del Olmo-Aguado S, Manso AG & Osborne NN (2012): Light might directly affect retinal ganglion cell mitochondria to potentially influence function. *Photochem Photobiol* **88**: 1346–1355.
- Ono K & Han J (2000): The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* **12**: 1–13.
- Organisciak DT & Vaughan DK (2010): Retinal light damage: mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res* **29**: 113–134.
- Organisciak DT, Darrow RM, Barsalou L, Darrow RA, Kutty RK, Kutty G & Wiggert B (1998): Light history and age-related changes in retinal light damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **39**: 1107–1116.
- Orrenius S, Gogvadze V & Zhivotovsky B (2007): Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **47**: 143–183.
- Osborne NN, Li G-Y, Ji D, Mortiboys HJ & Jackson S (2008): Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies. *J Neurochem* **105**: 2013–2028.
- Osborne NN, Álvarez CN & del Olmo Aguado S (2014): Targeting mitochondrial dysfunction as in aging and glaucoma. *Drug Discov Today* **19**: 1613–1622.
- Osborne NN, Núñez-Álvarez C, Jøglar B & del Olmo-Aguado S (2016): Glaucoma: focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *Eur J Pharmacol* **787**: 127–133.
- O'Steen WK & Anderson KV (1972): Photoreceptor degeneration after exposure of rats to incandescent illumination. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* **127**: 306–313.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S & Zhivotovsky B (2007): Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **12**: 913–922.
- Pang J, Seko Y, Tokoro T, Ichinose S & Yamamoto H (1998): Observation of ultrastructural changes in cultured retinal pigment epithelium following exposure to blue light. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **236**: 696–701.
- Passarella S, Casamassima E, Molinari S, Pastore D, Quagliariello E, Catalano IM & Cingolani A (1984): Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser. *FEBS Lett* **175**: 95–99.
- Peng S, Gan G, Rao VS, Adelman RA & Rizzolo LJ (2012): Effects of proinflammatory cytokines on the claudin-19 rich tight junctions of human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 5016.
- Perelman A, Wachtel C, Cohen M, Haupt S, Shapiro H & Tzur A (2012): JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. *Cell Death Dis* **3**: e430.
- Perez VL & Caspi RR (2015): Immune mechanisms in inflammatory and degenerative eye disease. *Trends Immunol* **36**: 354–363.
- Polster BM (2013): AIF, reactive oxygen species, and neurodegeneration: a 'complex' problem. *Neurochem Int* **62**: 695–702.
- Qamirani E, Razavi HM, Wu X, Davis MJ, Kuo L & Hein TW (2006): Sodium azide dilates coronary arterioles via activation of inward rectifier K⁺ channels and Na⁺-K⁺ -ATPase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **290**: H1617–H1623.
- Qin S & Rodrigues GA (2010): Differential roles of AMPK α 1 and AMPK α 2 in regulating 4-HNE-induced RPE cell death and permeability. *Exp Eye Res* **91**: 818–824.
- Quirk BJ & Whelan HT (2011): Near-infrared irradiation photobiomodulation: the need for basic science. *Photomed Laser Surg* **29**: 143–144.
- Rizzolo LJ, Peng S, Luo Y & Xiao W (2011): Integration of tight junctions and claudins with the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res* **30**: 296–323.
- Roehlecke C, Schaller A, Knels L & Funk RHW (2009): The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells. *Mol Vis* **15**: 1929–1938.
- Różanowska M & Sarna T (2005): Light-induced damage to the retina: role of rhodopsin chromophore revisited. *Photochem Photobiol* **81**: 1305–1330.
- Safulina D, Veksler V, Zharkovsky A & Kaasik A (2006): Loss of mitochondrial membrane potential is associated with increase in mitochondrial volume: physiological role in neurones. *J Cell Physiol* **206**: 347–353.
- SanGiovanni JP, Arking DE, Iyengar SK et al. (2009): Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration. *PLoS One* **4**: e5508.
- Sarna T (1992): Properties and function of the ocular melanin—a photobiophysical view. *J Photochem Photobiol, B* **12**: 215–258.
- Schipper HM, Chertkow H, Mehindate K, Frankel D, Melmed C & Bergman H (2000): Evaluation of heme oxygenase-1 as a systemic biological marker of sporadic AD. *Neurology* **54**: 1297–1304.
- Sliney DH (1988): Ocular injury due to light toxicity. *Int Ophthalmol Clin* **28**: 246–250.
- Sosna J, Voigt S, Mathieu S et al. (2014): TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci* **71**: 331–348.
- Sui G-Y, Liu G-C, Liu G-Y, Gao Y-Y, Deng Y, Wang W-Y, Tong S-H & Wang L (2013): Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis. *Br J Ophthalmol* **97**: 389–394.
- Tang Z-H, Wang L, Zeng F & Zhang K (2014): Human genetics of diabetic retinopathy. *J Endocrinol Invest* **37**: 1165–1174.
- Ursu ON, Sauter M, Ettischer N, Kandolf R & Klingel K (2014): Heme oxygenase-1 mediates oxidative stress and apoptosis in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Cell Physiol Biochem* **33**: 52–66.
- Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE, Hsu S, Messer RL, Rueggeberg FA & Bouillaguet S (2004): Blue light differentially modulates cell survival and growth. *J Dent Res* **83**: 104–108.
- Wong-Riley MTT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, Kane M & Whelan HT (2005): Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* **280**: 4761–4771.
- Wood JPM, Lascaratos G, Bron AJ & Osborne NN (2007): The influence of visible light exposure on cultured RGC-5 cells. *Mol Vis* **14**: 334–344.
- Yacout SM & Gaillard ER (2017): The anthocyanins, oenin and callistephin, protect RPE cells against oxidative stress. *Photochem Photobiol* **93**: 590–599.
- Yang P, Peairs JJ, Tano R, Zhang N, Tyrell J & Jaffe GJ (2007): Caspase-8-mediated apoptosis in human RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **48**: 3341.
- Ying R, Liang HL, Whelan HT, Eells JT & Wong-Riley MT (2008): Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP⁺-induced neurotoxicity. *Brain Res* **1243**: 167–173.
- Youn H-Y, Chou BR, Cullen AP & Sivak JG (2009): Effects of 400 nm, 420 nm, and 435.8 nm radiations on cultured human retinal pigment epithelial cells. *J Photochem Photobiol, B* **95**: 64–70.

Received on March 7th, 2018.

Accepted on April 8th, 2018.

Correspondence:

Neville N. Osborne

Fundación de Investigación Oftalmológica

Avda. Doctores Fernández-Vega 34

E-33012 Oviedo

Asturias

Spain

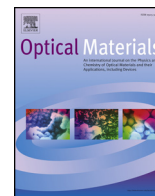
Tel: +34 985240141

Fax: +34 985233288

Email: Neville.osborne@eye.ox.ac.uk

Financial support is gratefully acknowledged from the Fundación BBVA. NNO has a Cátedra de Biomedicina (Chair in Biomedicine).

All authors have approved this final article as being true in representation of the experimental findings.



Potential application of photoluminescent filters for use in ophthalmology

Amador Menéndez-Velázquez^{a,*}, Claudia Núñez-Álvarez^b, Susana del Olmo-Aguado^b,
Jesus Merayo-Llodes^b, Andrés Fernández-Vega^b, Neville N. Osborne^{b,c,**}

^a ITMA Materials Technology, Parque Empresarial Principado de Asturias, c/ Calafates, 11, E-33417, Avilés, Asturias, Spain

^b Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica & Universidad de Oviedo, Avda. Doctores Fernández-Vega 34, E-33012, Oviedo, Asturias, Spain

^c John Radcliffe Hospital, NDCN, University of Oxford, Headley Way, OX3 9DU, Oxford, UK

ARTICLE INFO

Keywords:

Red light enhancement of mitochondrial/
biological functions
Spectral conversion of UV-Blue light
Luminescent materials and filters
Fluorescent organic dyes

ABSTRACT

The use of filters in ophthalmology is not new, but usually they operate by just blocking light of a particular wavelength. In contrast, photoluminescence filters are theoretically able to provide an altered wavelength of light to reach the retina, an approach which potentially can be exploited for therapeutic purposes. Our working hypothesis is that providing a means to deliver a reduced amount of harmful UV-blue light and an increased amount of beneficial red-near infrared light to retinal neuronal mitochondria will improve the health of the tissue and so enhance the health of the retina. The purpose of this communication is a) to briefly review the evidence behind our working hypothesis, b) to propose and describe luminescent spectral conversion filters that might be used to non-invasively achieve our aims related to our hypothesis, and c) to provide some preliminary experimental data to show that such luminescent filters coated on a glass substrate can convert UV-blue light to sufficient red light to enhance cell survival in cultured cells.

1. Introduction

Electromagnetic radiation of different wavelengths can profoundly affect human well-being in many ways. For example, in the case of the ultraviolet (approximately 220 nm–400 nm) band of radiation, it is well known that the associated photons have enough energy to break molecular bonds, thus damaging cells. However, they are also beneficial – killing bacteria and enabling the production of vitamin D – and therefore, not surprisingly, this topic has garnered considerable attention.

Visible light (approximately 380 nm–850 nm) impinging on the retina allows for photopic and scotopic vision to occur. In addition, wavelengths of light near the blue end of the visual spectrum (peak sensitivity around 480 nm) has important additional benefits such as helping to synchronize circadian rhythms [1,2]. On the other hand, the energy of visual UV-blue light in the (380 nm–450 nm) range can have damaging effects on the aging retina and the consensus is that there is a need to protect the retina from such light influences [3,4]. In contrast, evidence from research and pre-clinical trials suggests that enhancing the amount of visual red – near infrared light (roughly from 600 nm to 900 nm) impinging on the retina might have beneficial effects to maintain retinal function [5–7].

The premise of this communication is to show the influence of different wavelengths of light on the health of the eye and then provide proof of principle for the idea of luminescent filters coated on plastic or glass lenses to work as spectral converters. Such filters allow for a reduction of damaging short wavelength radiation (without influencing the normal circadian rhythm) and an enhancement of beneficial long wavelength radiation to impinge on the retina.

In the present communication we initially briefly explain why neuronal mitochondria of the retina can be differentially affected by different wavelengths of visual light (380 nm–900 nm) and the potential consequences on the health of the retina (section 2). We will then argue the development of filters that cause spectral redistribution of light so that the visual spectrum is altered for use in ophthalmology (section 3). This will be followed by an experimental section (section 4) describing how we have developed the luminescent filters. Finally, some preliminary experimental finds will be reported (section 5) where we show that such fluorescent filters coated on a glass substrate can convert UV-blue light to red light sufficiently to enhance cell survival in cultured cells.

* Corresponding author.

** Corresponding author. John Radcliffe Hospital, NDCN, University of Oxford, Headley Way, OX3 9DU, Oxford, UK.

E-mail addresses: amador@itma.es (A. Menéndez-Velázquez), neville.osborne@ndcn.ox.ac.uk (N.N. Osborne).

2. Different wavelengths of light related to ocular health

2.1. Light in relation to the eye

The cornea absorbs wavelengths below 290 nm while the lens in the adult human eye absorbs longer-wavelength UVB (295 nm - 310 nm), and the (310 nm - 380 nm) range of UVA. Both the cornea and the lens also absorb part of the infrared radiation - mainly the water bands at 980 nm, 1200 nm, and 1430 nm [8]. The vitreous absorbs light of > 1400 nm up to 10 μm [9]. Thus, the non-ionizing radiation reaching the retina is the so-called 'visible component' of the electromagnetic spectrum (380 nm - 800 nm), and some of the near infrared (800 nm - 1400 nm). The average human retina absorbs approximately 10^{12} to 10^{15} photons at a time which can be greatly increased by workplace exposure (e.g. welders), activities in high light environments (such as sunshine during skiing) or medical imaging of the retina [10,11].

Large population based studies show that excessive sunlight exposure can aggravate retinal diseases like age-related macular degeneration [12,13]. Basic science reveals that this is likely to be due to the cumulative actions of short wavelength light but this is difficult to assess [14]. The massive conversion from incandescent lights to Light Emitting Diodes (LEDs) for indoor lighting that is enriched in blue radiation raises the potential question of its added dangers to the retina and the external parts of the eye [15]. LEDs employ a chip that emits violet-blue light surrounded by a yellow phosphor coating so appearing white to the naked eye. In contrast, incandescent lights emit a limited small amount of blue light together with other wavelengths including red light that is likely to support healthy retinal functions.

Moreover, it is worth recognising that people are now exposed to more harmful UV-blue light (380 nm–450 nm) than ever before. Lighting in households, offices and elsewhere are now mostly generated from LEDs. But such UV-blue light is derived not only from the Sun and LED lighting but also digital screens (from TVs, computers, laptops, smart phones and tablets) and electronic devices.

2.2. Mitochondria and light

Mitochondria are cytoplasmic organelles that regulate both metabolic and apoptotic signalling pathways. Their major functions include energy generation in the form of ATP, the regulation of cellular calcium homeostasis, balancing reactive oxygen species (ROS) production and detoxification, the mediation of apoptosis cell death, and the synthesis and metabolism of various key molecules such as fatty acids [3,16,17]. Mitochondrial dysfunctions lead to diverse pathologies in a multitude of human diseases [17].

Mitochondria contain a number of chromophores that can absorb light of various wavelengths [18–21]. Flavin and cytochrome oxidases associated with the electron transport system of mitochondria are involved in the generation of ATP and absorb light. For example cytochrome oxidase c (COX) absorbs UV-blue (beginning at 380 nm) and red - near IR parts of the spectrum in both its oxidised and reduced forms [22]. Haemoglobin and other proteins that contain porphyrin, are known to have absorption maxima around 400 nm–410 nm [23,24]. The porphyrin triplets formed by absorption of photons can result in the formation of singlet oxygen and ROS [25]. Another mitochondrial enzyme, cytochrome P450, absorbs light of wavelengths around 450 nm when bound to carbon monoxide [26]. Flavins such as riboflavin (vitamin B2) and flavoprotein nucleotides are essential components of numerous cytosolic and mitochondrial enzyme systems. The absorption spectra of flavins are around 450 nm–520 nm and when activated, causes oxidation of several substances and the generation of hydrogen peroxide [19,27]. Porphyrins also exist in the mitochondrial inner membrane and absorb blue light [28,29].

2.3. Potential negative effects of short wavelength UV-blue light to the retina

UV-blue light (from 380 nm) is absorbed by mitochondrial cytochrome and flavin constituents [19–21] and probably by other mitochondrial fluorophores with the consequent production of ROS. For example, Aggarwal et al. [30] carried out studies on isolated mitochondria and showed a temporal sequence of changes to the organelles when exposed to 400 nm light resulting in a decline in ATP synthesis, the inactivation of respiration and an increase in ATPase activity with a loss in membrane potential. Light has also been shown to negatively affect the function of isolated mitochondria in an intensity-dependent manner indexed by a loss of mitochondrial dehydrogenase and redox potential [31]. Moreover, an UV-blue light insult to cells in culture causes a change in mitochondrial structure and membrane potential and the release of cytochrome c and induces an alteration in mitochondrial components of the oxidative phosphorylation system [32].

Persuasive evidence for a direct effect of light on mitochondria has been demonstrated in cultures of fibroblasts [33]. In these studies, fibroblasts were exposed to ethidium bromide for 50 days, thus damaging mitochondrial DNA and affecting respiratory chain activity. Fibroblasts with impaired mitochondria were unaffected by the light insult. In contrast, fibroblasts with healthy mitochondria exposed to the same light insult are gradually affected resulting in a generation of ROS coupled with eventual cell death. These findings on fibroblasts also provided evidence that visual light was not affecting constituents within the culture medium to indirectly influence.

Mitochondria exist in particularly high densities in retinal photoreceptors and ganglion cells, cell types that die in all retinal degenerating diseases [34]. The possibility exists that UV-blue light insulting to retinal cell mitochondria over time will have a negative effect on the homeostasis state of individual cell-types and those cells with more dependence on their mitochondria, judged by numbers of mitochondria (photoreceptors and ganglion cells), will be negatively affected most. This would also predict that as ageing progresses photoreceptors and ganglion cells will be more prone to other susceptible effects and might help to explain the fact that retinal degeneration diseases (where photoreceptors and/or ganglion cells die) are age-related.

2.4. Potential positive effects of additional red-near infrared light to the retina

A large body of evidence exists on the beneficial effects of tissue exposure to long wavelength red light between the far-red to near-infrared spectrum of visible light (600 nm–1000 nm). The positive effects of red light include improving recovery rates of soft tissue injuries and myocardial infarction [35,36] and promoting wound healing, cause complement propagation, and reducing oxidative stress, inflammation and cell death [18,37,38]. In the case of the eye, red - near infrared light stimulates cytochrome c oxidase (COX) and ATP synthesis in the retina, mitigates oxygen-induced degeneration [39], protects against photoreceptor death *in situ* and attenuates histopathological changes in animal retinas *in situ* [37,39–46].

While the precise action of the many positive effects of red - near infrared light is incompletely understood, the present evidence favours the view that it acts on mitochondrial pigments, particularly COX, to cause an increase in ATP production and ROS, including nitric oxide, and a subsequent action on cellular DNA. This results in an induction of various intracellular signalling pathways and their transcription factors [37,42,47,48]. Most importantly, red -near infrared light has the ability to penetrate through different depths of tissues pending on intensity, and has even been shown to ameliorate traumatic brain injury [49,50], unlike shorter wavelength UV-blue light.

Preclinical research studies have reported the beneficial influence of red - near infrared light therapy, although its use specifically for the treatment of eye disorders remains to be established in mainstream

medicine [49,50] and details of the underlying biochemical mechanism are still to be established. In addition, little attention has been given to the potential negative effects of red-near infrared light therapy when delivered at high intensities. This should however not be a concern, if relatively low additional intensities of red –near IR light are delivered through the pupil to reach the retina.

3. Photoluminescent spectral conversion filters for use in ophthalmology

3.1. Introduction

There are different ways for manipulating the sunlight or artificial light spectrum. Wave interference filters – such as photonic crystals – use the principles of light interference to selectively transmit or reflect particular wavelengths of light. Purely absorptive filters allow the transmission of only certain wavelengths; the other wavelengths are absorbed and lost as heat. For our purposes, we are interested in spectral conversion filters, that is, filters that change the spectral distribution of light. They can manipulate sunlight or artificial light spectrum for different health applications, such as ophthalmology.

3.2. Earlier applications of spectral conversion

Spectral conversion or spectral modification is the process of altering the spectral distribution of light. For many years, spectral modification has been a hot topic for the photovoltaics community. Due to the broadband nature of the sunlight and the narrow spectral sensitivity range of solar cells, there is an opportunity to manipulate the solar spectrum in order to increase the efficiency of these photovoltaic devices. It provides a way of addressing the largest limitation to the improvement of solar cell efficiency: the spectral mismatch between the energy distribution of sunlight and the band gap of a specific semiconductor [51].

Photons with energies greater than the band gap carry excess energy, which is dissipated as heat; photons with energies below the band gap have insufficient energy to create electron–hole pairs and are not absorbed. Spectral conversion offers a way for shifting the spectral distribution of the sunlight in order to have more photons with the required energy to match the band gap of the solar cell [52]. Different devices, such as luminescent solar concentrators (LSCs), can perform this task. LSCs provide a way to get geometrical concentration, but also the requested spectral conversion for improving the performance of the solar cells attached to the LSCs [53–57].

Spectral modification has also shown promise as an effective method of improving alga growth. Microalgae are a highly efficient renewable source of biomass fuel [58] as well as other high-value biochemical components. The efficiency of algal photosynthesis depends on the spectral overlap between solar irradiation and chloroplast absorption. Chloroplasts have absorption peaks around the blue and red region of the spectrum and are poor absorbers of green light, hence the green color of plants. Additionally, the high energy photons in the UV region (280 nm–400 nm) have been shown to cause photosynthetic damage and photo-inhibition [59,60]. Therefore, there is great interest in modification of the spectrum, converting light from outside the photosynthetically active radiation (PAR) region to within (ideally to either the red or the blue region), in order to maximize the growth of algae.

3.3. Neuroprotective and therapeutic luminescent filters for ophthalmology

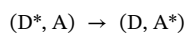
The field of ophthalmology could benefit from spectral conversion techniques. We therefore suggest that the development of an ophthalmic lens that absorbs UV-blue radiation and spectrally converts it to red - near infrared by using luminescent molecular systems is worthy of consideration. Such an ophthalmic lens might exert a neuroprotective

effect (by blocking damaging radiation) and therapeutic effect (by enhancing beneficial wavelengths) to benefit retinal functions. Such a lens will allow also for the transmission of a sufficient amount of the visible light spectrum (in order to preserve the quality of the vision), as well as the transmission of a defined fraction of blue light necessary to not alter the circadian rhythms too much. Thus we suggest that luminescent filters coated on plastic or glass lenses that perform a required spectral conversion can be used for retinal/eye care.

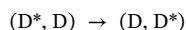
We used two luminescent species (donor and acceptor) and excitation energy transfer technique to reach the required spectral conversion from UV-blue to red - near infrared light. In this subsection we discuss some basic concepts of excitation energy transfer [61] which are the key for the development of our luminescent filters. Excitation energy transfer of an excited state energy of the donor to the ground state of the acceptor is possible. In order to work, a critical requirement is that the emission spectrum of the donor partially overlaps the absorption spectrum of the acceptor. This process occurs in a variety of situations. Excitation energy transfer can be grouped into hetero-transfer versus homo-transfer and radiative vs. non radiative.

3.3.1. Homo vs. hetero transfer

Energy transfer from an excited donor (D^*) to a chemically different ground acceptor (A), is called *hetero-transfer*.



If the donor and the acceptor are identical, then the energy transfer is homo-transfer.



In a homo-transfer process, excitation transport or energy migration can occur. In such case, the process of energy transfer repeats itself such that the excitation migrates over several molecules. In this case, it is possible to transfer energy between molecules but the Stokes shift is low. So this procedure it is not very adequate for our required spectral conversion from UV-blue to red – near IR. Therefore we will use hetero-transfer energy transfer.

3.3.2. Radiative vs. non-radiative energy transfer

In a radiative transfer process, a photon emitted by the donor is absorbed by the acceptor, whereas a non-radiative transfer process occurs without emission of “real” photons; it is mediated by the so-called “virtual” photons.

Radiative energy transfer corresponds to the absorption of a photon by the acceptor, after the emission by the donor. It is observed when the average distance between the donor and the acceptor is larger than the emitted photon wavelength. Such transfer does not require any interaction between D-A pairs, but it depends on the spectral overlap and the concentration of both species (donor and acceptor). We developed multilayer luminescent filters for this purpose.

On the other hand, a non-radiative energy transfer process occurs at sub-wavelength distances and without the emission of a photon; it is the result of the interactions between D-A pairs. Non-radiative energy transfer by the dipole-dipole interaction can extend over distances up to nearly 20 nm. In classical terms, the electronic energy transfer between the donor and the acceptor is viewed as the interaction of two oscillating electric dipoles. The donor's dipole is initially in oscillation and the acceptor's dipole is initially at rest. Because of the resonance condition, the excitation is transferred from the first dipole to the second one. Many researches refer to Förster resonance energy transfer (FRET) for this kind of process. We developed monolayer luminescent filters for this purpose.

4. Experimental procedures

In this section we describe the materials and procedures used for the development of the different luminescent spectral conversion filters.

4.1. Materials

The luminescent species we have chosen are organic molecules, due to their high quantum yield (defined as the number of emitted photons with respect to the number of absorbed photons). They are incorporated into a polymer matrix with high optical transparency such as PMMA. This composite system (polymeric matrix - luminescent species) is deposited on glass in the form of thin film. This thin film works as a luminescent filter that spectrally converts light.

Two different luminescent species were used: a molecule with light absorption/emission spectrum in the blue-UV zone of the spectrum (Lumogen Blau) – the donor - and other molecule with absorption/emission in the red-near infrared part of the spectrum (Lumogen Red) – the acceptor. It is the appropriate combination of both species that allows the desired spectral conversion of UV-blue to red-near infrared light.

4.2. Fabrication techniques

Two different procedures were used to allow the selected luminescent species (Lumogen Blau and Lumogen Red) work together:

Monolayer device. In a first approach we have incorporated several luminescent species in the same layer (Lumogen Blau and Lumogen Red). The Lumogen Blau molecules capture the UV-blue light and transfer the energy non-radiatively to the terminal molecules (Lumogen Red), which are responsible for re-emitting the radiation in a very specific area of the spectrum (red - near infrared). As mentioned, this is called Förster resonance energy transfer (FRET). The luminescent layer is coated in an ophthalmic lens.

Multilayer device. In another procedure each luminescent species is deposited in a different layer. The system consists of three luminescent layers. Two layers are deposited on the upper face of the ophthalmic lens and contain molecules (Lumogen Blau) that absorb the UV-blue light. Two layers are needed to absorb and block a larger fraction of the harmful UV-blue light. Subsequently, this radiation is emitted and absorbed by a third luminescent layer, deposited in the lower part of the lens, and re-emitted as red-near infrared light. This third layer contains Lumogen Red molecules. The resulting device shows a higher luminescence than the monolayer device. This luminescent filter is the selected filter for testing in biological experiments. We will refer to it as luminescent filter prototype.

4.3. Experimental protocols

Both luminescent filters (monolayer and multilayer) use poly (methyl methacrylate) (PMMA) as a host matrix. In a vial, PMMA and toluene are added to a concentration of 150 mg/ml. The vials are heated (at 70 °C) and stirred to dissolve the PMMA. Different amounts of fluorescent dyes (Lumogen Blau and/or Lumogen Red) are added to the previous PMMA/toluene solutions.

In the monolayer configuration, both species (Lumogen Blau and Lumogen Red) are added to the same PMMA/toluene solution. Lumogen Blau is added to obtain a concentration of 9 mg per ml (equal to a 6% solid weight content) and Lumogen Red is also added to obtain a concentration of 6 mg per ml (equal to a 4% solid weight content). We will refer to this formulation as PMMA Lumogen Blau 6% Lumogen Red 4%. We have tried other different formulations such as PMMA Lumogen Blau 6% Lumogen Red 6% and PMMA Lumogen Blau 6% Lumogen Red 8%. After all components are well dissolved the solution is filtered and spin-cast on a clean glass substrate. In all cases the luminescence of the resulting luminescent glass is pretty low, probably due to the formation of certain aggregates.

In the multilayer configuration, Lumogen Blau is added to obtain a concentration of 9 mg per ml (equal to a 6% solid weight content). In a different PMMA/toluene solution Lumogen Red is added to obtain a concentration of 6 mg per ml (equal to a 4% solid weight content). After

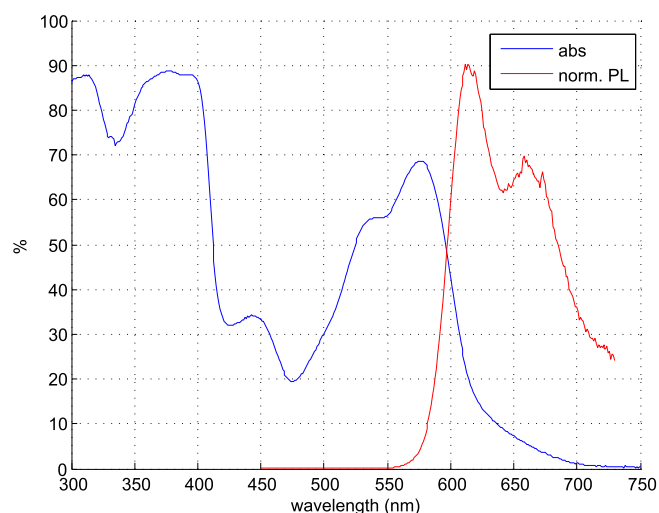


Fig. 1. Absorption and normalized (to the absorption peak) photoluminescence spectra. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

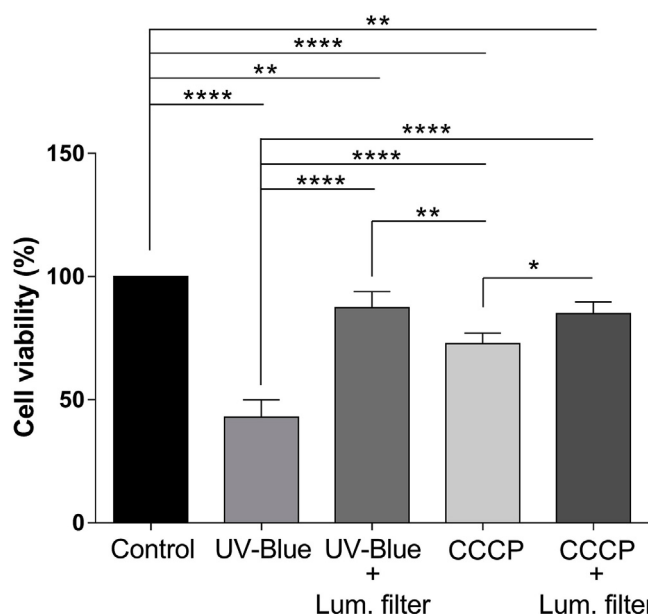


Fig. 2. MTT viability analysis of ARPE-19 exposed to UV-blue light (peak at 390 nm, 0.4 W/m²) or carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 5 μM) in the presence or absence of a luminescence filter (Lum. filter) for 16 h. UV-blue light and CCCP caused a significant reduction of cell viability (***) compared with control cells in the dark. The negative effect of UV-blue light on cell viability is clearly attenuated (42%) by the luminescent filter. However, even in the presence of the luminescence filter some UV-blue light is able to penetrate it to reduce cell viability. Importantly, the negative effect of CCCP is significantly attenuated by the presence of a luminescent filter (* < 0.05) even when not talking into account the negative effects of some UV light that penetrates the filter. Results are expressed as mean values ± SEM where N = 5 (**** < 0.001, (* < 0.05); One way ANOVA plus Tukey test).

all components are well dissolved the solutions are filtered and spin-cast on a clean glass substrate. The formulations of the different layers are: PMMA Lumogen Blau 6% (layer 1), PMMA Lumogen Blau 6% (layer 2) and PMMA Lumogen Red 4% (layer 3). Strong luminescence is observed.

5. Preliminary results and discussion

In this section we present some preliminary results describing the

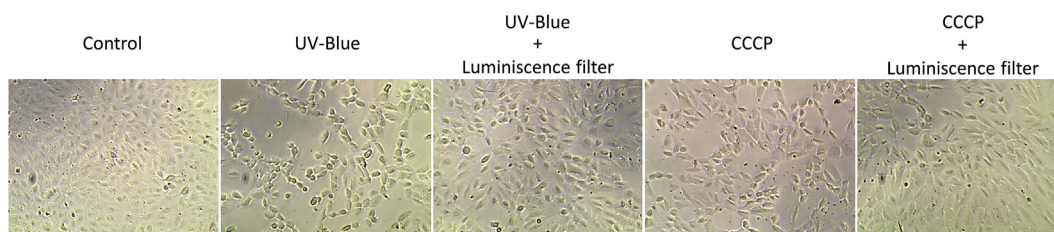


Fig. 3. Light microscope images of ARPE-19 in the dark (control) or when exposed to UV-blue light in the absence or presence of a luminescent filter as described in Fig. 2. The luminescent filter clearly acts both as a barrier filter for the negative effect of UV-blue light and as a spectral converter providing extra red – near IR light to the cells. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

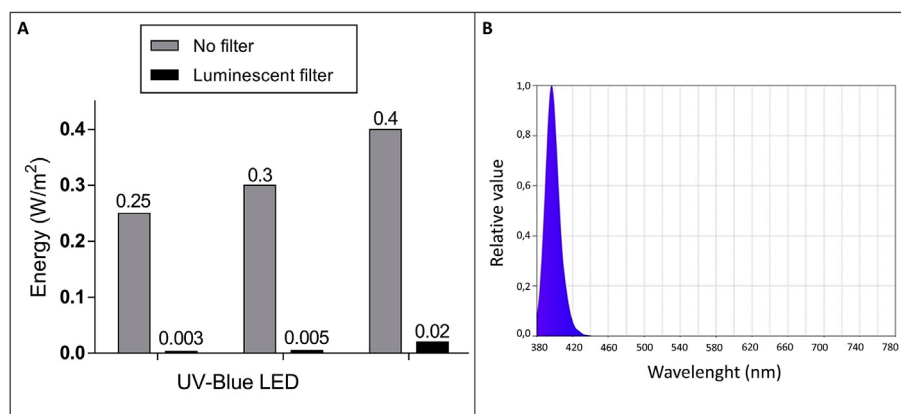


Fig. 4. A) Quantitative measurement of different energies of UV light (in W/m²) that is able to penetrate luminescent filters used in studies described in Fig. 2 and 3. B) The emission spectrum of the UV-blue source (LED) which peaks at 390 nm.

optical properties of the spectral conversion filters and their validity in ophthalmology.

5.1. Optical properties of the luminescent filters

Fig. 1 show the absorption and emission spectra of the luminescent filter prototype (multilayer configuration) deposited on glass of refractivity index 1.5. The blue line corresponds to the absorption spectrum and the red line to the emission or photoluminescence spectrum. It can be seen that in the (350 nm–400 nm) spectral range almost 90% of the incident radiation is absorbed (blue line), radiation that is converted to red - near infrared (red line). It can also be observed that there is only partial absorption in blue, with a minimum around 480 nm, so as not to interfere with circadian rhythms. There is also an unwanted band of absorption in the (500 nm - 600 nm) range, which should be eliminated in more advanced versions of the luminescent filter.

5.2. Preliminary biological results and discussion

Preliminary studies on a retinal pigment epithelial cell line (ARPE-19 cells) were conducted to determine whether the luminescent filter prototype (multilayer configuration) allows for the production of sufficient red light from UV-blue light to have a positive influence on cell viability. Some results are shown in Figs. 2 and 3. In these studies ARPE-19 cells in culture were exposed to a defined amount of UV light (emission peak around 390 nm, 0.4 W/m², see Fig. 4B) or the toxin, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP, 5 μM), in the absence or presence of the luminescent filter for a period of 16 h. Cultures were then either assayed quantitatively for the number of living cells, using an MTT colorimetric viability assay (Fig. 2), or viewed by photographed (Fig. 3). As can be seen in Fig. 2, UV-blue light and CCCP causes loss of cell viability by approximately 57% and 30%, respectively. However, in the presence of the luminescent filter the loss of viability caused by UV-blue light was reduced to be approximately

15%. Direct measurement for different amounts of UV light penetrating the filter (using a photo/radiometer) was measured and shown to be 0.02 W/m² when exposed to 0.4 W/m² of UV-blue light (Fig. 4). We therefore suggest that the luminescent filter acts as a barrier filter to most of the UV-blue light and that the small amount of UV-blue light that impinge on cells to likely have a negative effect.

It is also evident that the negative effect of CCCP on cell viability is clearly attenuated (12%) by the luminescent filter in the presence of UV-blue light. However, when taking into account the additional negative influence of the small amount of UV-blue light that penetrates the luminescent filter, the actual “protective” influence of the luminescent filter caused by emission of red light (see Fig. 1) is probably significantly greater than 12%. We are therefore of the opinion that the studies provide good evidence for UV light being converted to some red - near IR light by the luminescent filter and it is this light that attenuates CCCP-induce loss of cell viability.

The quantitative data for cell viability as shown in Fig. 2 can be visually observed by photographing the “living” cells that remain attached to the culture wells as shown in Fig. 3. All these findings strongly suggest that the prototype luminescent filter used in these studies has the potential to change the visible spectrum by reducing the amount of UV-blue light and increasing the amounts of red - near infrared light to provide a possible therapeutic procedure for the treatment of retinal dysfunctions in ophthalmology.

6. Summary and conclusions

Maintaining optimum mitochondrial function is essential for neurons to survive and from the scientific point view evidence exist to show that short wavelength light (UV-blue) is harmful, acting on various cellular pigments some being located to mitochondria. In contrast, longer wavelength (red to near-infrared) light has positive functions both physiologically and biochemically enhancing mitochondrial functions. From a medical point of view, the retina unlike other parts of

the central nervous system is directly exposed to both short (UV-blue, beginning at 380 nm) and long (red - near infrared) wavelength light. A potential therapeutic procedure for use in ophthalmology might therefore be possible simply by reducing the amount of UV-blue light and enhancing the red - near infrared light reaching the retina to enhance mitochondrial functions. Luminescent filters coated on ophthalmic lenses can potentially achieve such a goal.

Initial studies as described provides proof of principle for UV light that does not reach the retina can be partially converted to low intensity extra red - near infrared light by luminescent filters. At the same time the luminescent filters reduce some of the very shortest wavelength of blue light (that is potentially damaging to the retina) by spectrally converting it to the beneficial red - near infrared light. Luminescent filters therefore provide a means to respectively reduce and increase the amount of UV-blue and red - near infrared light impinging on the retina. This has the potential to have positive effects on mitochondria and to illicit beneficial influences for the healthy and unhealthy retina.

Acknowledgment

This work was supported by the grant RTC-2014-3055-1 financed by the Spanish “Ministerio de Economía y Competitividad”.

References

- [1] R.N. Van Gelder, E.D. Buhr, Ocular photoreception for circadian rhythm entrainment in mammals, *Annu. Rev. Vis. Sci.* 2 (2016) 153–169, <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-111815-114558>.
- [2] L. Lazzarini Ospri, G. Prusky, S. Hattar, Mood, the circadian system, and melanopsin retinal ganglion cells, *Annu. Rev. Neurosci.* 40 (2017) 539–556, <https://doi.org/10.1146/annurev-neuro-072116-031324>.
- [3] N.N. Osborne, C. Núñez-Álvarez, S. del Olmo-Aguado, The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglions cells, *Exp. Eye Res.* 128 (2014) 8–14, <https://doi.org/10.1016/j.EXER.2014.08.012>.
- [4] J.G. Lawrenson, C.C. Hull, L.E. Downie, The effect of blue-light blocking spectacle lenses on visual performance, macular health and the sleep-wake cycle: a systematic review of the literature, *Ophthalmic Physiol. Optic.* 37 (2017) 644–654, <https://doi.org/10.1111/opo.12406>.
- [5] S.-R. Tsai, M.R. Hamblin, Biological effects and medical applications of infrared radiation, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 170 (2017) 197–207, <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2017.04.014>.
- [6] S. del Olmo-Aguado, C. Núñez-Álvarez, N.N. Osborne, Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death *in situ*, *Acta Ophthalmol.* 94 (2016) e481–e491, <https://doi.org/10.1111/aos.12996>.
- [7] D.M. Johnstone, C. Moro, J. Stone, A.-L. Benabid, J. Mitrofanis, Turning on lights to stop neurodegeneration: the potential of near infrared light therapy in Alzheimer's and Parkinson's disease, *Front. Neurosci.* 9 (2016) 500, <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00500>.
- [8] F.S. Said, R.A. Weale, The variation with age of the spectral transmissivity of the living human crystalline lens, *Gerontology* 3 (1959) 213–231, <https://doi.org/10.1159/000210900>.
- [9] C.J. Association for Research in Vision and Ophthalmology, H. Snieder, C.E. Gilbert, T.D. Spector, Investigative Ophthalmology & Visual Science, C.V. Mosby Co, 1977, <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2122713>, Accessed date: 2 March 2018.
- [10] J.J. Hunter, J.I.W. Morgan, W.H. Merigan, D.H. Sliney, J.R. Sparrow, D.R. Williams, The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light, *Prog. Retin. Eye Res.* 31 (2012) 28–42, <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2011.11.001>.
- [11] J. Porter, H.M. Queener, J.E. Lin, K. Thorn, A. Awwal, Adaptive optics for vision science principles, practices, design, and applications, (n.d.). [http://optics.sgu.ru/~ulianov/Students/Books/Applied_Optics/J_Porter_et_all_Adaptive_Optics_for_Vision_Science_\(2006\).pdf](http://optics.sgu.ru/~ulianov/Students/Books/Applied_Optics/J_Porter_et_all_Adaptive_Optics_for_Vision_Science_(2006).pdf) (accessed March 2, 2018).
- [12] R. Klein, K.E. Lee, J.D. Maynard, S.M. Meuer, R.E. Gangnon, B.E.K. Klein, Skin intrinsic fluorescence and age-related macular degeneration: the Beaver Dam eye study, *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 58 (2017) 6328, <https://doi.org/10.1167/iovs.17-22382>.
- [13] G.-Y. Sui, G.-C. Liu, G.-Y. Liu, Y.-Y. Gao, Y. Deng, W.-Y. Wang, S.-H. Tong, L. Wang, Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis, *Br. J. Ophthalmol.* 97 (2013) 389–394, <https://doi.org/10.1136/bjophthalmol-2012-302281>.
- [14] D. Sliney, Exposure geometry and spectral environment determine photobiological effects on the human eye, *Photochem. Photobiol.* 81 (2005) 483–489, <https://doi.org/10.1562/2005-02-14-RA-439>.
- [15] F. Behar-Cohen, C. Martinsons, F. Viénot, G. Zissis, A. Barlier-Salsi, J.P. Cesarini, O. Enouf, M. Garcia, S. Picaud, D. Attia, Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: any risks for the eye? *Prog. Retin. Eye Res.* 30 (2011) 239–257, <https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2011.04.002>.
- [16] D.C. Chan, Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development, *Cell* 125 (2006) 1241–1252, <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.06.010>.
- [17] E.A. Schon, G. Manfredi, Neuronal degeneration and mitochondrial dysfunction, *J. Clin. Invest.* 111 (2003) 303–312, <https://doi.org/10.1172/JCI17741>.
- [18] H.L. Liang, H.T. Whelan, J.T. Eells, H. Meng, E. Buchmann, A. Lerch-Gaggl, M. Wong-Riley, Photobiomodulation partially rescues visual cortical neurons from cyanide-induced apoptosis, *Neuroscience* 139 (2006) 639–649, <https://doi.org/10.1016/J.NEUROSCIENCE.2005.12.047>.
- [19] P.E. Hockberger, T.A. Skimina, V.E. Centonze, C. Lavin, S. Chu, S. Dadras, J.K. Reddy, J.G. White, Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H₂O₂ in mammalian cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 6255–6260, <https://doi.org/10.1073/PNAS.96.11.6255>.
- [20] E.L. Hull, T.H. Foster, Cytochrome spectroscopy in scattering suspensions containing mitochondria and red blood cells, *Appl. Spectrosc.* 55 (2) (2001) 149–154, <https://www.osapublishing.org/as/abstract.cfm?uri=as-55-2-149>, Accessed date: 2 March 2018.
- [21] T.I. Karu, L.V. Pyatibrat, S.F. Kolyakov, N.I. Afanasyeva, Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 81 (2005) 98–106, <https://doi.org/10.1016/J.JPHOTOBIO.2005.07.002>.
- [22] V. Massey, The chemical and biological versatility of riboflavin, *Biochem. Soc. Trans.* 28 (2000) 283–296 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961912>, Accessed date: 2 March 2018.
- [23] J.E. Bell, C. Hall, Hemoproteins, in: J.E. Bell (Ed.), *Spectrosc. Biochem*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1981, pp. 42–46.
- [24] J. Mellerio, No Title, in: F.A. Albert, D.M. Jacoby (Eds.), *Princ. Pract. Ophthalmol. Basic Sci*, Saunders, Philadelphia, 1994, pp. 1326–1345.
- [25] R. Bonnett, A.A. Charlamides, E.J. Land, R.S. Sinclair, D. Tait, T.G. Truscott, Triplet states of porphyrin esters, *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases* 76 (1980) 852, <https://doi.org/10.1039/f19807600852>.
- [26] P.R. Ortiz de Montellano, The 1994 Bernard B. Brodie Award Lecture. Structure, mechanism, and inhibition of cytochrome P450, *Drug Metab. Dispos.* 23 (1995).
- [27] J. García, E. Silva, Flavin-sensitized photooxidation of amino acids present in a parenteral nutrition infusate: protection by ascorbic acid, *J. Nutr. Biochem.* 8 (1997) 341–345, [https://doi.org/10.1016/S0955-2863\(97\)00024-7](https://doi.org/10.1016/S0955-2863(97)00024-7).
- [28] L.A. Gorgidze, S.A. Oshemkova, I.A. Vorobjev, Blue light inhibits mitosis in tissue culture cells, *Biosci. Rep.* 18 (1998) 215–224, <https://doi.org/10.1023/A:1020104914726>.
- [29] J.C. Wataha, J.B. Lewis, P.E. Lockwood, S. Hsu, R.L. Messer, F.A. Rueggeberg, S. Bouillaguet, Blue light differentially modulates cell survival and growth, *J. Dent. Res.* 83 (2004) 104–108, <https://doi.org/10.1177/154405910408300204>.
- [30] B.B. Aggarwal, A.T. Quintanilha, R. Cammack, L. Packer, Damage to mitochondrial electron transport and energy coupling by visible light, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* 502 (1978) 367–382, [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(78\)90057-9](https://doi.org/10.1016/0005-2728(78)90057-9).
- [31] N.N. Osborne, G. Lascaratos, A.J. Bron, G. Chidlow, J.P.M. Wood, A hypothesis to suggest that light is a risk factor in glaucoma and the mitochondrial optic neuropathies, *Br. J. Ophthalmol.* 90 (2006) 237–241, <https://doi.org/10.1136/bjo.2005.082230>.
- [32] S. del Olmo-Aguado, A.G. Manso, N.N. Osborne, Light might directly affect retinal ganglion cell mitochondria to potentially influence function[†], *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 1346–1355, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01120.x>.
- [33] N.N. Osborne, G.-Y. Li, D. Ji, H.J. Mortiboys, S. Jackson, Light affects mitochondria to cause apoptosis to cultured cells: possible relevance to ganglion cell death in certain optic neuropathies, *J. Neurochem.* 105 (2008) 2013–2028, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05320.x>.
- [34] N.N. Osborne, Mitochondria: their role in ganglion cell death and survival in primary open angle glaucoma, *Exp. Eye Res.* 90 (2010) 750–757, <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2010.03.008>.
- [35] U. Oron, T. Yaakobi, A. Oron, D. Mordechovitz, R. Shofti, G. Hayam, U. Dror, L. Gepstein, T. Wolf, C. Haudenschild, S.B. Haim, Low-energy laser irradiation reduces formation of scar tissue after myocardial infarction in rats and dogs, *Circulation* 103 (2001) 296–301 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11208692>, Accessed date: 2 March 2018.
- [36] Z. Simunovic, A.D. Ivankovich, A. Depolo, Wound healing of animal and human body sport and traffic accident injuries using low-level laser therapy treatment: a randomized clinical study of seventy-four patients with control group, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 18 (2000) 67–73, <https://doi.org/10.1089/clm.2000.18.67>.
- [37] M.T.T. Wong-Riley, H.L. Liang, J.T. Eells, B. Chance, M.M. Henry, E. Buchmann, M. Kane, H.T. Whelan, Photobiomodulation directly benefits primary neurons functionally inactivated by toxins: role of cytochrome c oxidase, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 4761–4771, <https://doi.org/10.1074/jbc.M409650200>.
- [38] R. Ying, H.L. Liang, H.T. Whelan, J.T. Eells, M.T. Wong-Riley, Pretreatment with near-infrared light via light-emitting diode provides added benefit against rotenone- and MPP⁺-induced neurotoxicity, *Brain Res.* 1243 (2008) 167–173, <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRES.2008.09.057>.
- [39] R. Albarraçin, R. Natoli, M. Rutar, K. Valter, J. Provis, 670 nm light mitigates oxygen-induced degeneration in C57BL/6J mouse retina, *BMC Neurosci.* 14 (2013) 125, <https://doi.org/10.1186/1471-2202-14-125>.
- [40] R. Albarraçin, J. Eells, K. Valter, Photobiomodulation protects the retina from light-induced photoreceptor degeneration, *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* 52 (2011) 3582, <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6664>.
- [41] R. Albarraçin, K. Valter, 670 nm red light preconditioning supports müller cell function: evidence from the white light-induced damage model in the rat retina[†], *Photochem. Photobiol.* 88 (2012) 1418–1427, <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01130.x>.

- [42] R. Begum, M.B. Powner, N. Hudson, C. Hogg, G. Jeffery, Treatment with 670 nm light up regulates cytochrome C oxidase expression and reduces inflammation in an age-related macular degeneration model, *PLoS One* 8 (2013) e57828, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057828>.
- [43] J.T. Eells, M.T.T. Wong-Riley, J. VerHoeve, M. Henry, E.V. Buchman, M.P. Kane, L.J. Gould, R. Das, M. Jett, B.D. Hodgson, D. Margolis, H.T. Whelan, Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy, *Mitochondrion* 4 (2004) 559–567, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2004.07.033>.
- [44] R. Natoli, Y. Zhu, K. Valter, S. Bisti, J. Eells, J. Stone, Gene and noncoding RNA regulation underlying photoreceptor protection: microarray study of dietary anti-oxidant saffron and photobiomodulation in rat retina, *Mol. Vis.* 16 (2010) 1801–1822 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20844572>, Accessed date: 2 March 2018.
- [45] J.C. Rojas, J. Lee, J.M. John, F. Gonzalez-Lima, Neuroprotective effects of near-infrared light in an in vivo model of mitochondrial optic neuropathy, *J. Neurosci.* 28 (2008) 13511–13521, <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3457-08.2008>.
- [46] D. Gkotsi, R. Begum, T. Salt, G. Lascaratos, C. Hogg, K.-Y. Chau, A.H.V. Schapira, G. Jeffery, Recharging mitochondrial batteries in old eyes. Near infra-red increases ATP, *Exp. Eye Res.* 122 (2014) 50–53, <https://doi.org/10.1016/j.exer.2014.02.023>.
- [47] J.T. Eells, M.M. Henry, P. Summerfelt, M.T.T. Wong-Riley, E.V. Buchmann, M. Kane, N.T. Whelan, H.T. Whelan, Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100 (2003) 3439–3444, <https://doi.org/10.1073/pnas.0534746100>.
- [48] T. Karu, Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 49 (1999) 1–17, [https://doi.org/10.1016/S1011-1344\(98\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(98)00219-X).
- [49] L. Huang, Y. Xuan, Y. Koide, T. Zhiyentayev, M. Tanaka, M.R. Hamblin, Type I and Type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: an in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria, *Lasers Surg. Med. Times* 44 (2012) 490–499, <https://doi.org/10.1002/lsm.22045>.
- [50] Q. Wu, W. Xuan, T. Ando, T. Xu, L. Huang, Y.-Y. Huang, T. Dai, S. Dhital, S.K. Sharma, M.J. Whalen, M.R. Hamblin, Low-Level laser therapy for closed-head traumatic brain injury in mice: effect of different wavelengths, *Laser Surg. Med.* 44 (2012) 218–226, <https://doi.org/10.1002/lsm.22003>.
- [51] X. Huang, S. Han, W. Huang, X. Liu, Enhancing solar cell efficiency: the search for luminescent materials as spectral converters, *Chem. Soc. Rev.* 42 (2013) 173–201, <https://doi.org/10.1039/C2CS35288E>.
- [52] E. Klampaftis, D. Ross, K.R. McIntosh, B.S. Richards, Enhancing the performance of solar cells via luminescent down-shifting of the incident spectrum: a review, *Sol. Energy Mater. Sol. Cells* 93 (2009) 1182–1194, <https://doi.org/10.1016/j.solmat.2009.02.020>.
- [53] W.H. Weber, J. Lambe, Luminescent greenhouse collector for solar radiation, *Appl. Opt.* 15 (1976) 2299, <https://doi.org/10.1364/AO.15.002299>.
- [54] A. Menéndez-Velázquez, C.L. Mulder, N.J. Thompson, T.L. Andrew, P.D. Reuswig, C. Rotschild, M.A. Baldo, Light-recycling within electronic displays using deep red and near infrared photoluminescent polarizers, *Energy Environ. Sci.* 6 (2013) 72–75, <https://doi.org/10.1039/C2EE23265K>.
- [55] C.L. Mulder, P.D. Reuswig, A.M. Velázquez, H. Kim, C. Rotschild, M.A. Baldo, Dye alignment in luminescent solar concentrators: I Vertical alignment for improved waveguide coupling, *Optic Express* 18 (2010) A79, <https://doi.org/10.1364/OE.18.000A79>.
- [56] C.L. Mulder, P.D. Reuswig, A.P. Beyler, H. Kim, C. Rotschild, M.A. Baldo, Dye alignment in luminescent solar concentrators: II Horizontal alignment for energy harvesting in linear polarizers, *Optic Express* 18 (2010) A91, <https://doi.org/10.1364/OE.18.000A91>.
- [57] M.J. Currie, J.K. Mapel, T.D. Heidel, S. Goffri, M.A. Baldo, High-efficiency organic solar concentrators for photovoltaics, *Science* 321 (2008) 226–228, <https://doi.org/10.1126/science.1158342>.
- [58] C.-Y. Chen, K.-L. Yeh, R. Aisyah, D.-J. Lee, J.-S. Chang, Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 71–81, <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.06.159>.
- [59] T. Nielsen, L.O. Björn, N.G.A. Ekelund, Impact of natural and artificial UVB radiation on motility and growth rate of marine dinoflagellates, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 27 (1995) 73–79, [https://doi.org/10.1016/1011-1344\(94\)07059-W](https://doi.org/10.1016/1011-1344(94)07059-W).
- [60] M.J. Dring, A. Wagner, K. Luning, Contribution of the UV component of natural sunlight to photoinhibition of photosynthesis in six species of subtidal brown and red seaweeds, *Plant Cell Environ.* 24 (2001) 1153–1164, <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2001.00765.x>.
- [61] B. Valeur, M.N. Berberan-Santos, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, Wiley-VCH, 2013.

Curriculum vitae



Claudia Núñez Álvarez

Generado desde: Editor CVN de FECYT

Fecha del documento: 13/05/2019

v 1.4.0

cf3e99ff950e1bfb6c7c4a4fa57f23e3

Este fichero electrónico (PDF) contiene incrustada la tecnología CVN (CVN-XML). La tecnología CVN de este fichero permite exportar e importar los datos curriculares desde y hacia cualquier base de datos compatible. Listado de Bases de Datos adaptadas disponible en <http://cvn.fecyt.es/>



Resumen libre del currículum

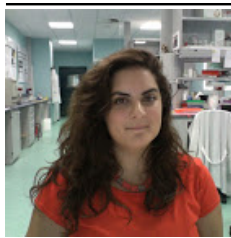
Descripción breve de la trayectoria científica, los principales logros científico-técnicos obtenidos, los intereses y objetivos científico-técnicos a medio/largo plazo de la línea de investigación. Incluye también otros aspectos o peculiaridades importantes.

Since I was young, I have always been interested in Science, mainly in the Biotechnology field, framed not only in basic but also in applied science. Up to the present, I have been focused in translational basic research, in particular, in Ophthalmology, where I have been able to develop several private and public projects. This has allowed me to work in the official and administrative part of the project management, at the same time that I have been in the laboratory learning, developing and adapting techniques and protocols. The main focus of the group where I am working currently, is to describe the molecular mechanisms of cell death in neurodegenerative diseases in the retina, for example in glaucoma. Different *in vitro* and *in vivo* models are used to test the effectiveness of diverse neuroprotective strategies that we study (drugs, antioxidant molecules, external factors, etc.) I have special experience working with cell cultures, primary and established cell lines, where I have developed proliferation and cytotoxicity assays, cell death assays, detection of reactive oxygen species, mitochondrial polarization studies, immunocytochemistry... The *in vivo* model has allowed me to take a close look at basic histology techniques (sample process to obtain sections in paraffin or cryopreserved) basic dyes, immunohistochemistry, animal use (anesthetic and operation methodologies)... A main part of the studies developed have been related to molecular biology techniques as protein analysis by Western Blot and gene expression studies by RTqPCR.

The following software is the main I have experience in:

1. Word, Excel, Internet, Mail, etc.
2. Access
3. Design: Photoshop, Illustrator, Flash
4. Microsoft Office
5. Operating systems: Windows, MacOS
6. Specific:
 - a. Statistics: Graph Pad Prism
 - b. Image analysis: ImageJ, Fiji (open source image management and conversion tool).
 - c. Audacity (open source audio management and conversion tool).
 - d. VideoConverter, MovieMaker: (open source audio management and conversion tool).

I am dynamic and responsible, I like to get involved at work and get the best possible results.



Claudia Núñez Álvarez

Apellidos: **Núñez Álvarez**
 Nombre: **Claudia**
 DNI: **71451894W**
 Fecha de nacimiento: **03/08/1984**
 Sexo: **Mujer**
 Teléfono fijo: **(+34) 985780981**
 Correo electrónico: **claudia.nunez.alvarez@gmail.com**
 Teléfono móvil: **(0034) 656685179**

Situación profesional actual

Entidad empleadora: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Departamento: Medicina, Facultad de Medicina
Categoría profesional: Estudiante de Doctorado (último año)
Fecha de inicio: 01/01/2019
Modalidad de contrato: No remunerado

Cargos y actividades desempeñados con anterioridad

	Entidad empleadora	Categoría profesional	Fecha de inicio
1	Fundación de Investigación Oftalmológica	Investigadora	22/02/2014
2	Fundación de Investigación Oftalmológica	Directora técnica	22/02/2012
3	Unidad de Microbiología, Hospital de León	Becaria	15/09/2010
4	Departamento de Biología Celular, Universidad de León	Colaboradora	16/02/2011
5	Fundación de Investigación Oftalmológica	Becaria	15/09/2009
6	Instituto de Medioambiente, Universidad de León	Becaria	15/06/2008

- Entidad empleadora:** Fundación de Investigación Oftalmológica
Categoría profesional: Investigadora
Fecha de inicio-fin: 22/02/2014 - 31/12/2018 **Duración:** 10 meses - 9 días
- Entidad empleadora:** Fundación de Investigación Oftalmológica **Tipo de entidad:** Fundación Oftalmológica
Categoría profesional: Directora técnica
Fecha de inicio-fin: 22/02/2012 - 22/02/2014 **Duración:** 2 años
- Entidad empleadora:** Unidad de Microbiología, Hospital de León **Tipo de entidad:** Universidad
Categoría profesional: Becaria



Fecha de inicio-fin: 15/09/2010 - 15/12/2011 **Duración:** 3 meses

4 Entidad empleadora: Departamento de Biología Celular, Universidad de León

Categoría profesional: Colaboradora

Fecha de inicio-fin: 16/02/2011 - 11/11/2011 **Duración:** 9 meses

5 Entidad empleadora: Fundación de Investigación Oftalmológica **Tipo de entidad:** Fundación

Categoría profesional: Becaria

Fecha de inicio-fin: 15/09/2009 - 15/06/2010 **Duración:** 9 meses

6 Entidad empleadora: Instituto de Medioambiente, Universidad de León **Tipo de entidad:** Organismo Público de Investigación

Categoría profesional: Becaria

Fecha de inicio-fin: 15/06/2008 - 15/09/2008 **Duración:** 3 meses



Formación académica recibida

Titulación universitaria

Estudios de 1º y 2º ciclo, y antiguos ciclos (Licenciados, Diplomados, Ingenieros Superiores, Ingenieros Técnicos, Arquitectos)

Titulación universitaria: Titulado Superior

Nombre del título: Licenciada en Biotecnología

Entidad de titulación: Universidad de León

Fecha de titulación: 15/02/2012

Tipo de entidad: Universidad

Formación especializada, continuada, técnica, profesionalizada, de reciclaje y actualización (distinta a la formación académica reglada y a la sanitaria)

- 1 Título de la formación:** Máster en Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de finalización: 30/06/2018 **Duración en horas:** 1500 horas
- 2 Título de la formación:** Medicamentos biológicos.
Entidad de titulación: Ágora sanitaria. **Tipo de entidad:** Entidad Empresarial
Fecha de finalización: 27/05/2018 **Duración en horas:** 40 horas
- 3 Título de la formación:** Técnicas de separación aplicadas a la industria farmacéutica y biofarmacéutica. Normativa GMP.
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de finalización: 17/03/2018 **Duración en horas:** 20 horas
- 4 Título de la formación:** How to Get Published in an International Journal
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de finalización: 26/04/2017 **Duración en horas:** 2 horas
- 5 Título de la formación:** Función de Diseño de Proyectos y Procedimientos para el trabajo con Animales. Función D.
Entidad de titulación: Animalaria SL **Tipo de entidad:** Entidad Empresarial
Fecha de finalización: 19/12/2016 **Duración en horas:** 50 horas
- 6 Título de la formación:** Transplantes de Córnea y Terapias Avanzadas de la Superficie Ocular y Córnea.
Entidad de titulación: Instituto Universitario **Tipo de entidad:** Instituto Universitario de Investigación
Fernández-Vega
Fecha de finalización: 16/04/2016 **Duración en horas:** 14 horas
- 7 Título de la formación:** I Curso de Proceso y análisis de imágenes con ImageJ-Fiji
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de finalización: 26/06/2015 **Duración en horas:** 20 horas



- 8 Título de la formación:** Curso de Actualización en Glaucoma
Entidad de titulación: Instituto Oftalmológico Fernández-Vega **Tipo de entidad:** Instituciones Sanitarias
Fecha de finalización: 25/04/2015 **Duración en horas:** 11 horas
- 9 Título de la formación:** II Curso de microscopía láser confocal y análisis de imágenes
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de finalización: 12/12/2014 **Duración en horas:** 12 horas
- 10 Título de la formación:** IV Jornadas Doctorales
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de finalización: 11/12/2014 **Duración en horas:** 20 horas
- 11 Título de la formación:** Formación teórico-práctica para las Brigadas de Emergencias
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Fecha de finalización: 14/11/2014 **Duración en horas:** 12 horas
- 12 Título de la formación:** Certificado acreditativo de competencia para personal que lleva a cabo los procedimientos con animales: Categoría B.
Entidad de titulación: Animalaria, Formación y Gestión S.L.
Fecha de finalización: 16/12/2013 **Duración en horas:** 40 horas

Conocimiento de idiomas

Idioma	Comprensión auditiva	Comprensión de lectura	Interacción oral	Expresión oral	Expresión escrita
Francés	A1	A2	A2	A1	A1
Inglés	C1	C1	C1	C1	C1

Actividad docente

Formación académica impartida

- 1 Nombre de la asignatura/curso:** Sesiones Bibliográficas: Damage assessment techniques in animal glaucoma models. In vivo monitoring.
Titulación universitaria: Programa de formación continuada en Oftalmología y Ciencias de la Visión.
Fecha de inicio: 01/09/2014 **Fecha de finalización:** 29/05/2015
Fecha de finalización: 28/05/2015
Entidad de realización: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Facultad, instituto, centro: Facultad de Medicina
- 2 Nombre de la asignatura/curso:** Sesiones Bibliográficas: Detección de muerte celular in vitro. Estudios de proliferación y viabilidad celular.
Titulación universitaria: Programa de formación continuada en Oftalmología y Ciencias de la Visión.
Fecha de inicio: 02/09/2013 **Fecha de finalización:** 02/06/2014
Fecha de finalización: 08/04/2014
Entidad de realización: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Facultad, instituto, centro: Facultad de Medicina



3 Nombre de la asignatura/curso: Sesiones Bibliográficas: Luz y degeneración retiniana: el papel de la metalotioneína III.

Titulación universitaria: Programa de formación continuada en Oftalmología y Ciencias de la Visión.

Fecha de finalización: 22/03/2018

Entidad de realización: Universidad de Oviedo

Tipo de entidad: Universidad

Facultad, instituto, centro: Instituto Universitario Fernández Vega

4 Nombre de la asignatura/curso: Sesiones Bibliográficas: Cultivos primarios en retina.

Titulación universitaria: Programa de formación continuada en Oftalmología y Ciencias de la Visión.

Fecha de finalización: 09/11/2016

Entidad de realización: Universidad de Oviedo

Tipo de entidad: Universidad

Facultad, instituto, centro: Instituto Universitario Fernández Vega

Otras actividades/méritos no incluidos en la relación anterior

1 Descripción de la actividad: Actividades en Investigación y Docencia. Colaborador de Honor. Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas. Curso 2014/15

Entidad organizadora: Universidad de Oviedo

Tipo de entidad: Universidad

Fecha de finalización: 22/02/2016

2 Descripción de la actividad: Actividades en Investigación y Docencia. Colaborador de Honor. Departamento de Cirugía y Especialidades Médico-quirúrgicas. Curso 2013/14

Entidad organizadora: Universidad de Oviedo

Tipo de entidad: Universidad

Fecha de finalización: 22/10/2014

Experiencia científica y tecnológica

Actividad científica o tecnológica

Proyectos de I+D+i financiados en convocatorias competitivas de Administraciones o entidades públicas y privadas

1 Nombre del proyecto: Nuevas aplicaciones del suero rico en factores de crecimiento en patologías retinianas.

Entidad de realización: Fundación de Investigación Oftalmológica. **Tipo de entidad:** Fundación

Ciudad entidad realización: Oviedo, Principado de Asturias, España

Nombres investigadores principales (IP, Co-IP,...): Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne; Jesús Manuel Merayo Lloves

Nº de investigadores/as: 4

Entidad/es financiadora/s:

Fondo Europeo de Desarrollo Regional. (FIS)

Fecha de inicio-fin: 01/09/2017 - 01/09/2020



- 2 Nombre del proyecto:** Lentes oftálmicas con películas luminiscentes en la neuroprotección de la superficie ocular, córnea y retina: la gafa terapéutica. EYECARELENS.
Entidad de realización: Fundación de Investigación Oftalmológica **Tipo de entidad:** Fundación
Ciudad entidad realización: Oviedo, Principado de Asturias, España
Nombres investigadores principales (IP, Co-IP,...): José F Alfonso Sánchez
Nº de investigadores/as: 10
Fecha de inicio-fin: 01/09/2016 - 01/09/2019
Cuantía total: 175.000 €
- 3 Nombre del proyecto:** Desarrollo de nanomateriales luminiscentes para la neuroprotección y nanoterapia de patologías oculares en un modelo experimental de daño retiniano por luz. RETINETA
Entidad de realización: Fundación de Investigación Oftalmológica **Tipo de entidad:** Fundación
Ciudad entidad realización: Avda. Doctores Fernández-Vega, 34, Oviedo, Principado de Asturias, España
Nº de investigadores/as: 10
Fecha de inicio-fin: 01/07/2014 - 31/12/2016
Cuantía total: 105.604 €
- 4 Nombre del proyecto:** Surfeye: Nuevos abordajes para el Diagnóstico, Tratamiento y Regeneración de la patología de la superficie ocular.
Entidad de realización: Fundación de Investigación Oftalmológica
Ciudad entidad realización: Avda. Doctores Fernández-Vega, 34, Oviedo, Principado de Asturias, España
Nº de investigadores/as: 20
Fecha de inicio-fin: 01/07/2014 - 31/12/2016
Cuantía total: 138,23 €

Contratos, convenios o proyectos de I+D+i no competitivos con Administraciones o entidades públicas o privadas

- 1 Nombre del proyecto:** Efecto de la luz en la Neurobiología de la Retina: Daño por luz y Neuroprotección.
Grado de contribución: Investigador/a
Nº de investigadores/as: 3
Entidad/es financiadora/s:
Fundación ENDESA **Tipo de entidad:** Fundación
Ciudad entidad financiadora: Alfonso XII 26 2ºA, Madrid, Comunidad de Madrid, España
Fecha de inicio: 01/01/2013 **Duración:** 1 año
Cuantía total: 75.000 €
- 2 Nombre del proyecto:** Cátedra de BBVA en Biomedicina
Grado de contribución: Investigador/a
Nº de investigadores/as: 4
Entidad/es financiadora/s:
Fundación BBVA **Tipo de entidad:** Fundación
Ciudad entidad financiadora: Madrid, Comunidad de Madrid, España
Fecha de inicio: 01/07/2009 **Duración:** 4 años - 6 meses
Cuantía total: 419.980 €



Actividades científicas y tecnológicas

Producción científica

Publicaciones, documentos científicos y técnicos

- 1 Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. Blue light exacerbates and red light counteracts negative insults to retinal ganglion cells in situ and R28 cells in vitro. *Neurochemistry International*. 125, pp. 187 - 196. Elsevier, 01/05/2019.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
Autor de correspondencia: No
- 2 Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. Enhancement of corneal epithelium cell survival, proliferation and migration by red light: Relevance to corneal wound healing. *Experimental Eye Research*. Marzo - 180, pp. 231 - 241. Elsevier, 01/03/2019.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
- 3 Amador Menéndez Velázquez; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Manuel Merayo Lloves; Andrés Fernández-Vega Cueto-Felgueroso; Neville Osborne. Potential application of photoluminescent filters for use in ophthalmology. *Optical materials*. 86, pp. 505 - 511. Elsevier, 01/12/2018.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
- 4 Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Neville Naresh Osborne. Blue light negatively affects the survival of ARPE19 cells through an action on their mitochondria and blunted by red light. *Experimental Eye Research*. 29/09/2018.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
- 5 Neville Naresh Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Belén Joglar Santos; Susana del Olmo Aguado. Visual light effects on mitochondria: The potential implications in relation to glaucoma. *Mitochondrion*. 01/09/2017.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
- 6 Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Neville Naresh Osborne. Near infra-red light attenuates corneal endothelial cell dysfunction in situ and in vitro. *Experimental Eye Research*. 16/08/2017.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
- 7 Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Naresh Osborne. Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. *Neurochemical Research*. Epub ahead of print, 23/05/2016.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
- 8 Neville Naresh Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Belén Joglar Santos; Susana del Olmo Aguado. Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. *European Journal of Pharmacology*. Epub ahead of print, 14/04/2016.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
- 9 Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Naresh Osborne. Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death in situ. *Acta Ophthalmologica*. Epub ahead of print., 29/02/2016.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista



- 10** Neville Naresh Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado. The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglions cells. *Experimental Eye Research*. 128, pp. 8 - 14. 11/2014.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Documento o Informe científico-técnico
- 11** Neville Naresh Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado. Targeting mitochondrial dysfunction as in aging and glaucoma. *Drug Discovery Today*. 19 - 10, pp. 1613 - 1622. 10/2014.
Tipo de producción: Artículo científico **Tipo de soporte:** Revista
- 12** Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Dan Ji; Alberto García Manso; Neville Naresh Osborne. RTP801 immunoreactivity in retinal ganglion cells and its down-regulation in cultured cells protect them from light and cobalt chloride. *Brain research Bulletin*. 98, pp. 132 - 144. 09/2013.
Tipo de producción: Artículo científico

Trabajos presentados en congresos nacionales o internacionales

- 1** **Título del trabajo:** Red light attenuates corneal and retinal damage: relevance in relation to glaucoma.
Nombre del congreso: ARVO2015
Ciudad de celebración: Denver, Estados Unidos de América
Fecha de celebración: 03/05/2015
Fecha de finalización: 07/05/2015
Entidad organizadora: The Association for Research in Vision and Ophthalmology **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones
Ciudad entidad organizadora: Rockville, Maryland, Estados Unidos de América
Neville Naresh Osborne; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves; Claudia Núñez Álvarez.
- 2** **Título del trabajo:** Red light has the capacity to blunt corneal endothelial cell damage in situ
Nombre del congreso: ARVO2015
Ciudad de celebración: Denver, Estados Unidos de América
Fecha de celebración: 03/05/2015
Fecha de finalización: 07/05/2015
Entidad organizadora: The Association for Research in Vision and Ophthalmology **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones
Ciudad entidad organizadora: Rockville, Maryland, Estados Unidos de América
Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves; Neville Naresh Osborne.
- 3** **Título del trabajo:** Rapamycin down-regulates REDD1 to blunt cell death: a potential way to maintain retinal ganglion cell function as in glaucoma.
Nombre del congreso: EVER 2014 CONGRESS
Ciudad de celebración: Niza, Francia
Fecha de celebración: 01/10/2014
Fecha de finalización: 04/10/2014
Entidad organizadora: European Association for Vision and Eye Research
Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Naresh Osborne.
- 4** **Título del trabajo:** Red light has the capacity to blunt corneal endothelial cell damage in situ
Nombre del congreso: EVER 2014 CONGRESS
Ciudad de celebración: NIZA, Francia
Fecha de celebración: 01/10/2014
Fecha de finalización: 04/10/2014



Entidad organizadora: European Association for Vision and Eye Research
Neville Naresh Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves.

- 5 Título del trabajo:** RTP801 in the mammalian retinal ganglion cells.
Nombre del congreso: 15º Congreso Nacional de la SENC
Ciudad de celebración: Oviedo, Principado de Asturias, España
Fecha de celebración: 25/09/2013
Fecha de finalización: 27/09/2013
Entidad organizadora: SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NEUROCIENCIA
Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguada; Neville Naresh Osborne.
- 6 Título del trabajo:** Effect of oxygen and glucose deprivation (OGD) on mRNA levels of vesicular glutamate transporters (VGLUTs) in rat hippocampal and cerebral cortex sections.
Nombre del congreso: Neuroscience
Ciudad de celebración: Washington, Estados Unidos de América
Fecha de celebración: 12/11/2011
Fecha de finalización: 16/11/2011
Entidad organizadora: Society of Neuroscience. **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones
Ciudad entidad organizadora: Washington, Estados Unidos de América
Irene López Llorente; Beatriz Martínez Villayandre; Taiana Burguin; Diego Pérez Rodríguez; Claudia Núñez Álvarez; Arsenio Fernández López.
- 7 Título del trabajo:** Effectiveness of Heated Haematic Derivatives in Corneal Epithelial Wound Healing.
Nombre del congreso: ARVO2010
Ciudad de celebración: Fort Lauderdale, Florida, Estados Unidos de América
Fecha de celebración: 05/2010
Fecha de finalización: 05/2010
Entidad organizadora: The Association for Research in Vision and Ophthalmology **Tipo de entidad:** Asociaciones y Agrupaciones
Ciudad entidad organizadora: Rockville, Maryland, Estados Unidos de América
Claudia Núñez Álvarez; Jesús Merayo Lloves; Guilherme H. Ferrara de Almeida; Ignacio Eugenio Alcalde Dominguez; Manuel Chacón; Eduardo Anitua.

Otros méritos

Estancias en centros de I+D+i públicos o privados

Entidad de realización: Universidad de Oviedo **Tipo de entidad:** Universidad
Facultad, instituto, centro: Facultad de Medicina
Ciudad entidad realización: Oviedo, Principado de Asturias, España
Fecha de inicio-fin: 01/02/2018 - 01/06/2018 **Duración:** 5 meses
Objetivos de la estancia: Doctorado/a
Tareas contrastables: Evaluación del efecto de la radiación de diferentes longitudes de onda sobre el crecimiento microbiano.

Cuaderno de actividades



Documento de actividades

DATOS DEL DOCTORANDO

Programa de Doctorado
CIENCIAS DE LA SALUD
Apellidos y nombre del doctorando/a
NÚÑEZ ÁLVAREZ CLAUDIA

ACTIVIDADES FORMATIVAS ESPECÍFICAS

(indicando lugar, fecha y, en su caso, calificación obtenida)

1. Título de la formación: Máster en Terapias Avanzadas y Medicina Regenerativa
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo Tipo de entidad: Universidad
Fecha de finalización: 30/06/2018 Duración en horas: 1500 horas
2. Título de la formación: Medicamentos biológicos.
Entidad de titulación: Ágora sanitaria. Tipo de entidad: Entidad Empresarial
Fecha de finalización: 27/05/2018 Duración en horas: 40 horas
3. Título de la formación: Técnicas de separación aplicadas a la industria farmacéutica y biofarmacéutica.
Normativa GMP.
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo Tipo de entidad: Universidad
Fecha de finalización: 17/03/2018 Duración en horas: 20 horas
4. Título de la formación: How to Get Published in an International Journal
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo Tipo de entidad: Universidad
Fecha de finalización: 26/04/2017 Duración en horas: 2 horas
5. Título de la formación: Función de Diseño de Proyectos y Procedimientos para el trabajo con Animales.
Función D.
Entidad de titulación: Animalaria SL Tipo de entidad: Entidad Empresarial
Fecha de finalización: 19/12/2016 Duración en horas: 50 horas



6. Título de la formación: Transplantes de Córnea y Terapias Avanzadas de la Superficie Ocular y Córnea.
Entidad de titulación: Instituto Universitario Fernández-Vega
Tipo de entidad: Instituto Universitario de Investigación
Fecha de finalización: 16/04/2016 Duración en horas: 14 horas
7. Título de la formación: I Curso de Proceso y análisis de imágenes con ImageJ-Fiji
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo Tipo de entidad: Universidad
Fecha de finalización: 26/06/2015 Duración en horas: 20 horas
8. Título de la formación: Curso de Actualización en Glaucoma
Entidad de titulación: Instituto Oftalmológico Fernández-Vega
Tipo de entidad: Instituciones Sanitarias
Fecha de finalización: 25/04/2015 Duración en horas: 11 horas
9. Título de la formación: II Curso de microscopía láser confocal y análisis de imágenes
Entidad de titulación: Universidad de Oviedo Tipo de entidad: Universidad
Fecha de finalización: 12/12/2014 Duración en horas: 12 horas
10. Título de la formación: Certificado acreditativo de competencia para personal que lleva a cabo los procedimientos con animales: Categoría B.
Entidad de titulación: Animalaria, Formación y Gestión S.L.
Fecha de finalización: 16/12/2013 Duración en horas: 40 horas

ACTIVIDADES FORMATIVAS TRANSVERSALES

- IV Jornadas Doctorales, Universidad de Oviedo (Campus de Mieres) Diciembre 2014.
- VI Jornadas Doctorales, Universidad de Oviedo (Campus de Mieres) Julio 2017.

ESTANCIAS EN OTROS CENTROS

(indicar fechas y actividad realizada)

Área de Microbiología, Departamento de Biología Funcional. Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.
Marzo - junio 2018.
Evaluación del efecto de diferentes longitudes de onda en la viabilidad de microorganismos tipo de la flora ocular. (Capítulo VII de la tesis doctoral)

AYUDAS Y BECAS

(indicar organismo, objeto de la financiación y periodo)



PARTICIPACIÓN EN CONGRESOS Y SEMINARIOS

(indicar fecha, lugar, tipo de participación y, en su caso, título del trabajo)

- Red light attenuates corneal and retinal damage: relevance in relation to glaucoma. Neville Osborne; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves; Claudia Núñez Álvarez. ARVO2015. Denver, Colorado.
- Red light has the capacity to blunt corneal endothelial cell damage in situ. Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves; Neville Naresh Osborne. ARVO2015. Denver, Colorado.
- Rapamycin down-regulates REDD1 to blunt cell death: a potential way to maintain retinal ganglion cell function as in glaucoma. Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. EVER 2014 CONGRESS. 01/10/2014. Niza, Francia.
- Red light has the capacity to blunt corneal endothelial cell damage in situ. Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Merayo Lloves. EVER 2014 CONGRESS. 01/10/2014. Niza, Francia.
- RTP801 in the mammalian retinal ganglion cells. Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguada; Neville Osborne. 15º Congreso Nacional de la SENC. Oviedo 25/09/2013.

PUBLICACIONES

(indicar las referencias completas de las publicaciones citadas)

- Blue light exacerbates and red light counteracts negative insults to retinal ganglion cells in situ and R28 cells in vitro. Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. Neurochemistry International. 125, pp. 187 - 196. Elsevier, 01/05/2019.
- Enhancement of corneal epithelium cell survival, proliferation and migration by red light: Relevance to corneal wound healing. Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. Experimental Eye Research. 180, pp. 231 - 241. Elsevier, 01/03/2019.
- Potential application of photoluminescent filters for use in ophthalmology. Amador Menéndez Velázquez; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Jesús Manuel Merayo Lloves; Andrés Fernández-Vega Cueto-Felgueroso; Neville Osborne. Optical materials. 86, pp. 505 - 511. Elsevier, 01/12/2018.
- Blue light negatively affects the survival of ARPE19 cells through an action on their mitochondria and blunted by red light. Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Neville Osborne. Experimental Eye



Research. 29/09/2018.

- Near infra-red light attenuates corneal endothelial cell dysfunction in situ and in vitro. Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado; Neville Osborne. Experimental Eye Research. 16/08/2017.
- Visual light effects on mitochondria: The potential implications in relation to glaucoma. Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Belén Joglar Santos; Susana del Olmo Aguado. Mitochondrion. 01/09/2017.
- Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. Neurochemical Research. 23/05/2016.
- Glaucoma: Focus on mitochondria in relation to pathogenesis and neuroprotection. Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Belén Joglar Santos; Susana del Olmo Aguado. European Journal of Pharmacology. 14/04/2016.
- Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death in situ. Susana del Olmo Aguado; Claudia Núñez Álvarez; Neville Osborne. Acta Ophthalmologica. 29/02/2016.
- The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglions cells. Neville Osborne; Claudia Núñez Álvarez; Susana del Olmo Aguado. Experimental Eye Research. 128, pp. 8 - 14. 01/11/2014.

(Lugar) y (fecha)

Oviedo, mayo 2019

El/La Doctorando/a:	El/La tutor/a:	El Director/es:
Fdo:	Fdo:	Fdo.