



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud
Investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión

**Neuroprotección en retina por plasma rico en
factores de crecimiento como modelo de
regeneración del sistema nervioso central**

Trabajo de investigación realizado por Carlota Suárez Barrio para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Oviedo.

Oviedo, junio 2021



RESUMEN DEL CONTENIDO DE TESIS DOCTORAL

1.- Título de la Tesis	
Español/Otro Idioma: Neuroprotección en retina por plasma rico en factores de crecimiento como modelo de regeneración del SNC	Inglés: Retinal neuroprotection by plasma rich in growth factors as a model of CNS regeneration
2.- Autor	
Nombre: Carlota Suárez Barrio	DNI/Pasaporte/NIE:
Programa de Doctorado: Ciencias de la salud	
Órgano responsable: Centro internacional de postgrado	

RESUMEN (en español)

Las enfermedades neurodegenerativas no solo se manifiestan a nivel del sistema nervioso central (SNC), sino que también pueden hacerlo a nivel ocular, causando importantes secuelas para la calidad de vida y de visión del paciente, así como una gran repercusión en el gasto sanitario y socio laboral. Solo la degeneración macular asociada a la edad (DMAE) afecta a más de 25 de millones de personas en todo el mundo. Esta es una enfermedad que afecta a la mácula, zona de la retina donde se localiza el mayor número de fotorreceptores y que interviene en la visión de alta resolución. Aunque las causas exactas de su aparición se desconocen, algunos de los factores que se sabe que intervienen en su desarrollo son el estrés oxidativo y la inflamación. Por tanto, el tratamiento con agentes antioxidantes podría ser una buena alternativa para paliarla. En la actualidad, la exposición a luces de longitud de onda corta (400-500 nm) es muy alta debido a la contaminación lumínica a la que estamos sometidos. Este tipo de luz ha mostrado ser un precursor de rutas oxidantes, favoreciendo así la aparición de estrés oxidativo y, por tanto, aumentando la muerte celular.

El plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) es un derivado hemático autólogo, que ha demostrado promover la proliferación y la regeneración celular con efectos antiinflamatorios, neurotróficos y protectores en diversas patologías oculares.

Durante esta tesis doctoral, se ha desarrollado un modelo de fototoxicidad por luz azul en combinación con el PRGF en epitelio pigmentario de retina (EPR) con privación de sustrato, con el fin de estudiar diversos parámetros celulares. Los resultados han mostrado que el PRGF protege a las células del EPR en presencia de un agente tóxico, como la luz azul, ya que aumenta los mecanismos antioxidantes presentes en las células, además de favorecer



procesos de renovación celular, como la autofagia, y conservar la funcionalidad celular en un modelo *in vivo* a corto-medio plazo.

RESUMEN (en Inglés)

Neurodegenerative diseases, as well as manifesting in the central nervous system (CNS), can also affect the eyes, causing a significant reduction of quality of life and harming the patient's vision, as well as producing a great impact on health and social costs. Only age-related macular degeneration (AMD) affects over 25 million people worldwide. This disease affects the macula, part of the retina in charge of creating defined images due to its high number of photoreceptors. The main causes of AMD remain unknown, however oxidative stress and inflammation have been demonstrated to be some of the main factors that contribute to its worsening. Therefore, the treatment with antioxidant agents could be a good alternative to mitigate it. Nowadays, shortwave-length light (400-500 nm) exposition has become a risk factor, as it has been demonstrated that it has a role in oxidative stress and, therefore, increasing cell death.

Plasma rich in growth factors (PRGF) is a hemoderivative that has been proven to be a promotor to cell proliferation and regeneration in several eye diseases.

During this thesis, it has been developed a phototoxicity model with blue light in combination with PRGF in retinal pigmentary epithelium (RPE), in order to study several cellular parameters. Results have shown that PRGF protects cells against a blue light insult, as it enhances the antioxidant pathways present in cells. Besides, it promotes cellular renovation processes, such as autophagy, and maintains the cellular functionality in a short-medium time term *in vivo* model.



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

Programa de Doctorado de Ciencias de la Salud
Investigación en Oftalmología y Ciencias de la Visión

**Neuroprotección en retina por plasma rico en
factores de crecimiento como modelo de
regeneración del sistema nervioso central**

Trabajo de investigación realizado por Carlota Suárez Barrio para optar al
Grado de Doctor por la Universidad de Oviedo.

Oviedo, junio 2021

A mis padres.

A Mario.

Todo el que haya hecho una tesis doctoral sabrá que no se trata solo de un proyecto de investigación, sino de vida. El proceso es largo y duro, pero, una vez alcanzas la meta y analizas todo lo aprendido, te das cuenta de que has hecho bien en llegar hasta el final. En estos casi cinco años, han sido muchas las personas que me han apoyado, y por eso tengo que dedicarles mis agradecimientos.

Para empezar, quiero agradecerles a mis directores de tesis, el Prof. Jesús Merayo y la Dra. Susana del Olmo, por darme la oportunidad de embarcarme en esta aventura y dedicarme su tiempo. También al Prof. Neville Osborne, que me acompañó durante los primeros años de tesis y me enseñó otra manera de ver la ciencia. *Thank you, Neville. I will always be grateful for your time and advice.* Al Dr. Álvaro Meana, por introducirme en la FIO.

Por supuesto, no me puedo olvidar de mis pilares, mis compañeras de laboratorio: Claudia, Eva, Joana y Mairobi. Lo mejor que me llevo de esta experiencia es teneros a vosotras como amigas.

También a todos mis compañeros de la FIO, los que estuvieron y los que aún siguen: Enol, Héctor, Montse, Lydia, Sara, Ana, Nacho, Cris, Andrea, Omar, Fede, Sergio, Manuel, Natalia, Lola, Carlos, Raquel, Iriana, Paola...

A mis chicos del IOFV, Ramón y Silvia, por todo el apoyo y ayuda que siempre me han dado. A Esther, por las largas conversaciones sobre la vida. También a Montse, por intentarlo todo.

A mis compañeras del HUCA, en especial a Vicky y a Ángela.

En cuanto a mi vida personal, en primer lugar, a mis padres, Ángeles y Manolo, por apoyarme en todo lo que me propongo, por escucharme, ser mi paño de lágrimas y mi roca. También a mis segundos padres, Tomás y Carmen.

A mis amigas, Lucía, Yanel, Tania, Carolina y Elena. Por todos los brindis que hemos hecho y que haremos.

Agradecimientos

A Andrea y María, porque no importa el tiempo que pase, siempre será como si nos hubiéramos visto ayer.

Al resto de mi familia, en especial, a mi prima María.

A todos mis amigos y conocidos, que se han preocupado por mis avances, se han alegrado por mis logros y enfadado por mis derrotas.

Y, por último, a Mario, mi compañero de vida. Sé que, durante estos años, no siempre ha sido fácil, pero prometo no volver a hacer una tesis.

Índice

1. Abreviaturas	5
2. Introducción	11
1. El sistema visual.....	13
a. La retina.....	15
i. Estructura y tipos celulares.....	15
ii. Degeneración macular asociada a la edad	17
2. Balance metabólico y supervivencia celular	19
a. Fosforilación oxidativa	19
b. Estrés oxidativo y vías antioxidantes	21
c. Muerte celular	23
d. Estrés oxidativo y muerte celular	26
e. Neuroprotección de la retina	28
3. Plasma rico en factores de crecimiento.....	30
a. Aplicaciones terapéuticas.....	32
4. La luz	32
a. Espectro visible	33
b. Fototoxicidad.....	34
5. Modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> para el estudio de patologías retinianas ...	36
3. Justificación	41
4. Hipótesis	45
5. Objetivos	49
6. Animales, material y método	53
1. Animales	55

2. PRGF	56
3. Cultivos celulares.....	56
4. Viabilidad celular.....	57
5. Estado mitocondrial: JC-1	57
6. Cuantificación de especies reactivas del oxígeno: DHE	57
7. Cuantificación de GSH.....	58
8. Cuantificación de expresión proteica por Western blot.....	58
9. Cuantificación de expresión génica por RT-qPCR.....	60
10. Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica.....	61
11. TUNEL.....	62
12. Electrorretinografía.....	63
13. Dispositivos de luz	64
14. Análisis estadístico	64
Capítulo 1: Capacidad antioxidante del PRGF en modelos <i>in vitro</i> de fototoxicidad por luz azul	65
C1.1. Introducción.....	67
C1.2. Diseño experimental.....	69
C1.3. Resultados	74
C1.4. Discusión.....	90
Capítulo 2: Vías moleculares de actuación frente daño celular en modelos <i>in vitro</i>	95
C2.1. Introducción.....	97

C2.2. Diseño experimental.....	98
C2.3. Resultados.....	101
C2.4. Discusión.....	111
Capítulo 3: Estimulación de la autofagia por PRGF en modelo <i>in vitro</i> de fototoxicidad por luz azul.....	115
C3.1. Introducción.....	117
C3.2. Diseño experimental.....	118
C3.3. Resultados.....	121
C3.4. Discusión.....	133
Capítulo 4: Papel neuroprotector del PRGF en un modelo <i>in vivo</i> de fototoxicidad crónica.....	139
C4.1. Introducción.....	141
C4.2. Diseño experimental.....	142
C4.3. Resultados.....	144
C4.4. Discusión.....	155
7. Discusión.....	159
8. Conclusiones.....	165
9. Bibliografía.....	169
10. Divulgación científica.....	203
11. Financiación.....	209
12. Anexos.....	213

Abreviaturas

ADNc: Ácido desoxirribonucleico complementario

ALP: Ruta autofagia-lisosoma

ARE: Elementos de respuesta antioxidante (del inglés: *antioxidant response elements*)

ARN: Ácido ribonucleico

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARVO: del inglés: *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

Atg: Proteínas relacionadas con autofagia (del inglés: *autophagy-related proteins*).

ATP: Adenosín trifosfato

Brn3a: del inglés: *brain-specific homeobox/POU domain protein 3A*

Bcl2: del inglés: *B-cell lymphoma 2*

CO₂: Dióxido de carbono

DAMP: patrones moleculares asociados a daño (del inglés: *damage-associated molecular patterns*)

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol

DCCD: Diclonexilcarbodiimida

DEP: Defectos epiteliales persistentes

DHE: Dihidroetidio

DMAE: Degeneración macular asociada a la edad

DMEM: Medio de Eagle modificado por Dulbecco (del inglés: *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DR: del inglés: *death receptors*

Abreviaturas

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

EGCG: Epigallocatequín galato

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EMM: Espectro electromagnético

EPR: Epitelio pigmentario de retina

ERG: Electrorretinograma

ERO: Especies reactivas del oxígeno

ChAT: Colin-acetiltransferasa (del inglés: *choline acetyltransferase*)

GCL: Ligasa glutamato-cisteína

GCLC: Ligasa glutamato-cisteína, subunidad catalizadora

GCLM: Ligasa glutamato-cisteína, subunidad moduladora

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial (del inglés: *glial fibrillary acidic protein*)

GR: Glutación reductasa

GSH: Glutación en su forma reducida

GSSG: Glutación en su forma oxidada

GSTP1: Glutación S-Transferasa P

HIF-1: Factor 1 inducible de hipoxia (del inglés: *hypoxia inducible factor 1*)

HO-1: Hemoxigenasa-1

IKK: Moléculas adaptadoras inhibidoras de NF κ B

IGF-1: Factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1

IL: Interleuquina

Keap1: Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (del inglés: *Keal-like ECH- associated protein 1*)

LC3: Proteínas 3 de cadena corta asociadas a microtúbulos (del inglés: *microtubule-associated proteins light chain 3*)

LED: Diodo emisor de luz (del inglés: *light emitting diode*)

MLKL: del inglés: *mixed lineage kinase domain like pseudokinase*

MTT: Bromuro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio

NGF: Factor de crecimiento nervioso

NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (del inglés: *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NQO1: NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 (del inglés: *NAD(P)H quinone dehydrogenase 1*)

Nrf2: Factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (del inglés: *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*)

PBS: Tampón fosfato salino (del inglés: *phosphate saline buffer*)

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PEDF: Factor derivado del epitelio pigmentario

PIo: Presión intraocular.

PRGF: Plasma rico en factores de crecimiento

p62/sqstm1: Proteína p62 (del inglés: *sequestosome-1*)

RIPK: Receptor de proteínquinasas (del inglés: *receptor-interacting protein kinases*)

RT-qPCR: Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de transcripción inversa (del inglés: *reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction*)

SBF: Suero bovino fetal

Abreviaturas

SDS: Dodecilsulfato sódico

SEM: Error estándar de la media (del inglés: *standard error of the mean*)

SNC: Sistema nervioso central

TAK1: del inglés: *transforming growth factor beta-activated kinase 1*

TdT: Terminal deoxinucleotidil transferasa

TGF- β 1: Factor de crecimiento transformante β 1

TLR: Receptores de membrana tipo *toll*

TNF: Factor de necrosis tumoral

TUNEL: marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa

UBA: Dominio asociado a ubiquitina

UPS: Ubiquitín proteasoma

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

WB: Western Blot

Introducción

1. El sistema visual

El sistema visual es la parte del sistema nervioso central (SNC) encargada de recibir información del exterior a través de estímulos lumínicos, transformarla en impulsos nerviosos, para finalmente producir una imagen definida que le proporcione al organismo detalles acerca del entorno que lo rodea. Este sistema se comprende principalmente de la integración de un órgano fundamental, el ojo, que actúa como receptor y transformador, y del nervio óptico, que actúa como transmisor de la información hasta el cerebro, donde finalmente se crean las imágenes.

El ojo tiene una forma casi esférica, y está formado por varias estructuras histológicas y tejidos, todos especializados en distintas funciones, divididas en tres tipos en base a su origen embrionario. Estas estructuras son la esclerótica, la úvea y la retina.

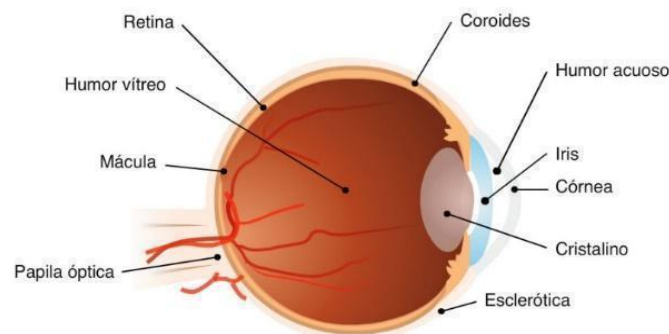


Figura 1. Estructura del ojo

La capa histológica más externa corresponde a la esclerótica o esclera, de origen mesodérmico, que recubre la mayor parte del globo ocular y su función principal es actuar como barrera frente al exterior. Está compuesta por dos láminas, la epiesclera, que está formada por tejido conectivo ligeramente vascularizado, y el estroma, avascular, formado por fibras de colágeno y fibroblastos. Esta capa está cubierta por la membrana conjuntiva, que lubrica el globo ocular, a la que se le adhiere otro órgano importante, la córnea. La córnea, de origen ectodérmico y mesodérmico, tiene una naturaleza muy similar a la esclera, pero es transparente.

Introducción

Su función principal es óptica, y son su estructura y organización celular las que le confieren sus cualidades funcionales.

La segunda estructura histológica es la úvea, y se localiza de manera adyacente a la esclera. Es una capa vascular formada por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides.

Separando esta estructura de la siguiente se encuentran el cristalino, de origen ectodérmico y que actúa como lente, el humor acuoso, situado en la parte anterior del ojo, entre la córnea y el cristalino, y el humor vítreo, que separa el cristalino de la retina.

El iris tiene como función principal el control de la cantidad de luz que entra en el ojo, ya que puede contraerse o dilatarse. El cristalino es una estructura transparente, avascular, que tiene la capacidad de modificar su curvatura y espesor, permitiendo así el enfoque de las imágenes. Su colocación en el globo ocular depende del cuerpo ciliar, que es de origen neuroectodérmico. Esta estructura se ocupa de dar soporte a los músculos ciliares, que anclan el cristalino al globo ocular, pero además de producir el humor acuoso, que se renueva de manera constante, para nutrir y eliminar agentes tóxicos que están en contacto con la córnea y el cristalino. La coroides, que corresponde con la capa más interna de la úvea, es un tejido vascular que se extiende desde el nervio óptico hasta el cuerpo ciliar. Su función principal es nutrir al resto de estructuras del ojo a través del epitelio pigmentario, ya que su vascularización es lo que permite el flujo de nutrientes.

El vítreo, por otra parte, es de origen neuroectodérmico, y tiene una consistencia gelatinosa y transparente. Se sitúa entre la parte posterior del cristalino y la retina.

La retina corresponde a la tercera estructura histológica principal del ojo, y también tiene origen neuroectodérmico¹⁻⁷.

a. La retina

La retina es el órgano más interno del globo ocular. Está constituida por el epitelio pigmentario (EPR), localizado en la parte más externa, en contacto con la coroides, y la neurorretina o retina sensorial, situada en la zona más interna, en contacto con el humor vítreo, y donde se encuentran las células del SNC⁸⁻¹¹.

i. Estructura y tipos celulares

El EPR está formado por una capa monoestratificada de células epiteliales, unidas entre sí mediante uniones estrechas (*zonula occludens*) y desmosomas (*zonula adherens*). Estas células tienen altas concentraciones de melanina, con el fin de absorber el exceso de luz que pueda penetrar hasta el interior del ojo y evitar, así, que difunda hacia otras partes. Esta capa está en contacto directo con la coroides, de manera que esta le proporciona los nutrientes necesarios para las células de la neurorretina.

La neurorretina corresponde con la parte funcional de la retina, ya que es la encargada de recibir los estímulos luminosos, transformarlos en impulsos eléctricos y transmitirlos a través del nervio óptico hasta el cerebro.

Su composición celular es muy variada y especializada, ya que tiene células de tipo neuronal, glial y vascular. Dentro del tipo de células neuronales, se encuentran los fotorreceptores (conos y bastones), células bipolares y células ganglionares. También están las células amacrinas y horizontales, que se encargan de la regulación de la actividad de los otros dos tipos celulares. Entre las células de la glía se encuentran las células de Müller, los astrocitos y la microglía. Por último, entre las células vasculares, están las células endoteliales y los pericitos, que se encuentran rodeando los vasos sanguíneos.

La composición celular, así como su estructuración y orden dentro de la retina, es muy concreta.

La capa más próxima al EPR es la capa de fotorreceptores. Está compuesta por las prolongaciones de conos y bastones. Los bastones tienen como función

Introducción

principal diferenciar entre luz y oscuridad. Están en una concentración mucho mayor que los conos, que son los encargados de diferenciar entre los colores.

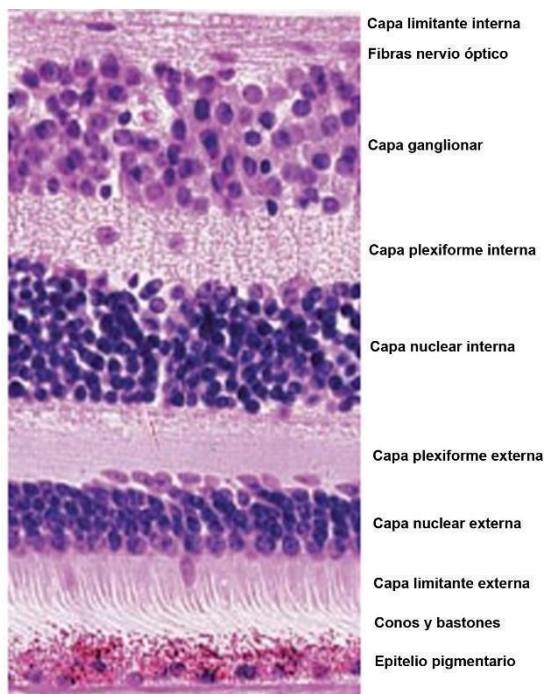


Figura 2. Estructura celular de la retina

A continuación, se encuentra la capa limitante externa, que está formada por los extremos de las células de Müller. La capa nuclear o granulosa externa se forma por los núcleos de los fotorreceptores. La capa plexiforme externa está formada por la sinapsis de los fotorreceptores con las células bipolares, y a su vez de la sinapsis de ambas con las células horizontales. La capa nuclear o granulosa interna comprende los núcleos de las células bipolares, amacrinas, horizontales y las células de Müller. La plexiforme interna corresponde a la sinapsis entre las células ganglionares y bipolares y las amacrinas. Finalmente, se encuentra la capa de las células ganglionares. Los axones de estas células forman las fibras del nervio óptico.

En cuanto a la distribución celular en el espacio, la retina se puede dividir en cuatro partes: retina central, periférica, *ora serrata* y papila óptica.

La retina central posee una población mucho mayor de conos que de bastones. Además, la capa de células ganglionares es más 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 ni ganglionares ni bipolares. Esta zona corresponde con el punto de máxima visión.

La retina periférica se sitúa entre la retina central y la *ora serrata*, y está compuesta principalmente por bastones. La capa de células ganglionares y de fibras nerviosas se va haciendo más fina. La *ora serrata* se corresponde con la terminación anterior de la neuroretina y representa la zona de transición en la que la retina sensorial se va transformando en dos capas de epitelio, que forman parte del cuerpo ciliar. La papila óptica no tiene fotorreceptores y es la zona en la que convergen todos los axones de las células ganglionares que se unen formando el nervio óptico y salen de la retina por un 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. Ambos nervios ópticos, provenientes de cada globo ocular, se entrecruzan en el quiasma para continuar por los tractos ópticos. Es ahí donde la mayoría de las fibras se dirigen hacia los cuerpos geniculados laterales o externos, en la parte posterior inferior del tálamo. Ahí se produce la conexión de los axones de las células ganglionares con otras neuronas, que envían a su vez sus axones hacia el córtex visual, donde se produce finalmente la visión.

ii. Degeneración macular asociada a la edad

Como se ha mencionado previamente, la retina es el órgano funcional del ojo encargado de la producción de imágenes. Por tanto, cualquier daño en su estructura puede producir a medio-largo plazo la pérdida parcial o total de la visión. Según la Organización mundial de la salud (OMS), las enfermedades oculares crónicas son la principal causa de pérdida de visión a escala mundial.

De estas enfermedades crónicas, una de las de mayor prevalencia e importancia, por la falta de tratamientos efectivos, es la degeneración macular asociada a la edad (DMAE)^{12,13}. Esta enfermedad se presenta en dos formas. La seca o atrófica, que es la más común, con una incidencia de alrededor del 85% de los casos, conlleva la muerte de los fotorreceptores de la mácula, por lo que se produce la

pérdida de la visión central. Este tipo de patología lleva asociada la producción de unos depósitos de desecho metabólicos llamados drusas, que se acumulan entre el EPR y la membrana de Bruch¹⁴⁻¹⁶. La acumulación de las drusas es el indicativo de la evolución de la enfermedad, ya que produce la muerte de las células del EPR y, por ende, de los fotorreceptores de la mácula. La DMAE húmeda o exudativa, aunque es menos frecuente (aproximadamente un 15% de los casos), tiene una progresión más rápida. Está causada por una neovascularización que va desde la coroides hasta la neuroretina, que produce hemorragias y derrames en la zona de la mácula, comprometiendo la estructura celular¹⁷.

Las causas de la DMAE no están del todo claras. Se sabe que hay factores intrínsecos, como la predisposición genética o el propio envejecimiento, que favorecen su aparición. Pero también el estilo de vida y otros hábitos poco saludables, como el tabaquismo o la obesidad, pueden aumentar las probabilidades de padecerla. Además, la exposición a luces de longitud de onda corta puede promover el deterioro de los tejidos previamente dañados, exacerbando la enfermedad.

En cuanto a las vías terapéuticas disponibles para aplacarla, tampoco está nada claro. El tratamiento empleado actualmente para la DMAE húmeda, basado en fármacos antiangiogénicos, permite frenar su evolución. Estos fármacos actúan inhibiendo el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), impidiendo así la formación de nuevos vasos sanguíneos. No obstante, son tratamientos invasivos repetitivos no exentos de efectos secundarios. Por otra parte, para el tratamiento de la DMAE seca no hay un tratamiento efectivo, aunque, entre las diversas alternativas que se están investigando, es interesante recalcar el estudio de la respuesta frente a agentes antioxidantes que favorezcan el mantenimiento de la integridad retiniana^{12,13,18,19}.

2. Balance metabólico y supervivencia celular

a. Fosforilación oxidativa

El sistema visual, después del cerebro, es uno de los complejos que más energía necesita para poder llevar a cabo sus funciones. A nivel celular, esta energía se conoce como adenosín trifosfato (ATP), que se genera principalmente a través de un mecanismo oxidativo en la membrana de la mitocondria, también conocido como fosforilación oxidativa. A través de esta reacción, se generan 36 moléculas de ATP de cada molécula de glucosa. Existe también otra vía de producción de ATP denominada glucólisis. Esta se lleva a cabo en el citosol de las células y, a diferencia de la fosforilación oxidativa, solo produce dos moléculas de ATP²⁰.

Debido a la elevada demanda energética de las neuronas, la producción de energía en la retina es una de las más altas del sistema visual y, por eso, este tipo celular posee un alto número de mitocondrias.

Las mitocondrias son unos orgánulos localizados en el citoplasma celular de células eucariotas formados por dos membranas. En la membrana interna es donde se lleva a cabo la producción de ATP. Esta producción se constituye de dos fases: la cadena de transporte de electrones, que se utiliza para bombear protones a través de la membrana para generar un gradiente electroquímico, y el complejo de la ATP sintasa, que cataliza la síntesis de ATP de la fusión de adenosín difosfato (ADP) y un fosfato inorgánico (Pi)²¹⁻²⁵.

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.

- Complejo I (NADH deshidrogenasa o NADH:ubiquinona oxidoreductasa): Es el encargado de captar dos electrones del NADH y transferirlos al transportador liposoluble, coenzima Q. A su vez, también transloca cuatro protones a través de la membrana mitocondrial. Estas reacciones generan especies reactivas del oxígeno (ERO) en la matriz mitocondrial, por lo que también contribuyen al estrés oxidativo.

Introducción

- Complejo II (succinato deshidrogenasa): este complejo une el ciclo de Krebs con la cadena de transporte de electrones, transfiriendo electrones desde el succinato hasta la coenzima Q.
- Complejo III (complejo citocromo bc1 o ubiquinol citocromo c reductasa): Obtiene electrones desde los complejos I y II y los transfiere al citocromo c, situado en el espacio intermembrana de la mitocondria. También transloca cuatro protones a través de la membrana de cada dos electrones transportados desde el producto del complejo I. También es un alto productor de ERO.
- Complejo IV (COX o citocromo c oxidasa): es el último complejo de la cadena. 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, que, sumado a los dos protones empleados en la producción del agua, aumenta el gradiente de protones generado durante el proceso.

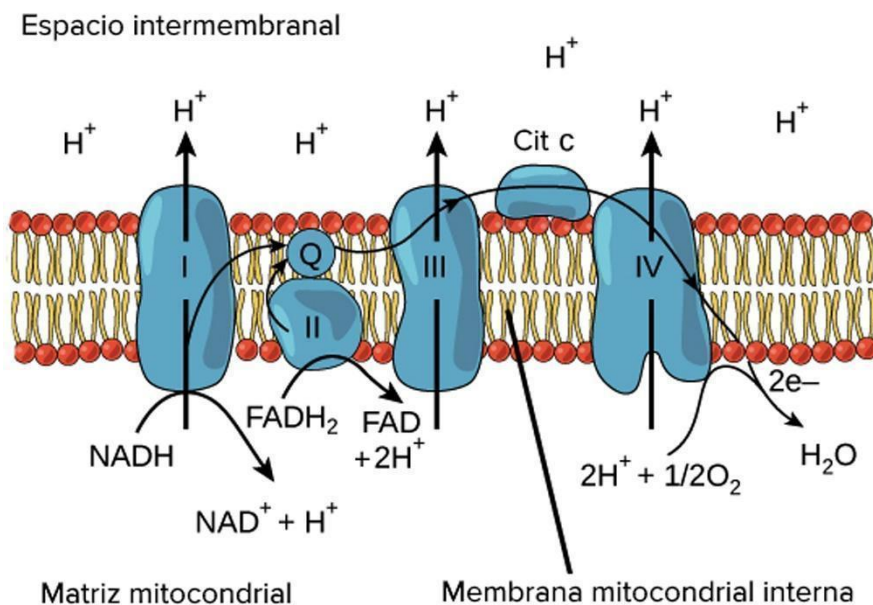


Figura 3. Esquema de la cadena de transporte de electrones llevado a cabo en la membrana mitocondrial.

A continuación, la ATP-sintasa utiliza el gradiente de protones generado a través de la cadena de transporte de electrones para producir las moléculas de ATP.

Además de la producción de ATP, una de las consecuencias de esta reacción es la producción de ERO. En condiciones normales, las células poseen mecanismos para neutralizar la presencia de estos agentes oxidantes, pero una producción masiva o la alteración de alguna de las vías de neutralización puede suponer la acumulación de estas y, por lo tanto, daño celular, que puede derivar en muerte.

b. Estrés oxidativo y vías antioxidantes

El estrés oxidativo se produce como consecuencia del desequilibrio entre la acumulación de ERO y su neutralización por parte de los mecanismos antioxidantes presentes en las células. Sin embargo, hay agentes que favorecen su producción y/o dificultan su neutralización. Estos son conocidos como agentes oxidantes.

Como se ha mencionado anteriormente, las ERO se producen como consecuencia de las reacciones celulares de obtención de energía. Estas moléculas son radicales libres, es decir, que tienen al menos un electrón desapareado. Las ERO actúan como moléculas señalizadoras de reacciones fisiológicas, como la activación de genes y modulación de reacciones químicas. Además, su acumulación puede producir daños en el ADN, así como en otras estructuras celulares, algunos de los cuales pueden ser irreversibles ^{24,26-31}.

No obstante, las células poseen mecanismos que facilitan la neutralización de estas moléculas.

Una de las rutas antioxidantes más importantes que poseen las células es la que se desencadena con el complejo Keap1-Nrf2.

El factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (Nrf2) es un factor de transcripción que tiene la capacidad de inducir la expresión de otros genes con actividad antioxidante³²⁻³⁵. En condiciones normales, este factor de transcripción se encuentra unido a la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1) en el citoplasma de las células, de manera que se mantiene inactivo. Keap1 es una

proteína rica en residuos de cisteína. Esta proteína fomenta la degradación continua del Nrf2 vía proteasoma^{36,37}. Cuando los niveles de ERO aumentan, tres de los residuos de cisteína de Keap1 se modifican de tal forma que se permite la liberación de Nrf2, que se transloca hasta el núcleo para unirse con una secuencia específica del ADN conocida como ARE (del inglés *Antioxidant response element*). Esta unión induce la transcripción de otros genes antioxidantes como son la hemoxigenasa-1 (HO-1), la NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 (NQO1), la ligasa glutamato-cisteína (GCL) y la glutatión-S-transferasa (GST)^{32,33,36-43}.

La HO-1 cataliza la rotura oxidativa de los grupos hemo para la formación de biliverdina (un potente antioxidante), monóxido de carbono, y la liberación de un ion de hierro. Esta proteína está implicada en procesos antioxidantes, antiinflamatorios, antiapoptóticos, antiproliferativos y actúa como inmunomodulador en las células vasculares. También contribuye a la diferenciación de los macrófagos y la polarización de algunos subtipos celulares. Generalmente, se expresa en bajas cantidades, pero su expresión se ve estimulada rápidamente cuando detecta agentes dañinos^{35,42-50}.

NQO1 es una flavoproteína que contiene un grupo FAD, el cual juega un papel fundamental en su estabilidad y funciones. Esta proteína tiene la capacidad de reducir quinonas endógenas y exógenas a hidroquinonas mediante la reducción de dos electrones, de manera que cuando queda oxidada es degradada rápidamente por la vía del proteasoma^{33,34,38,51-53}.

El glutatión es cofactor de varias enzimas detoxificantes, además de intervenir en la conversión de las vitaminas C y E a sus formas reducidas. Protege a las células frente a la apoptosis mediante su interacción con rutas de señalización pro y antiapoptótica y activa diversos factores de transcripción. La primera parte de su síntesis está catalizada por la enzima ligasa glutamato-cisteína (GCL), que consta de dos subunidades: GCLC, la subunidad catalítica, y GCLM, la subunidad moduladora. Esta primera fase incluye la integración de glutamato y cisteína para dar γ -glutamilcisteína (γ -GC). La segunda parte de la síntesis está catalizada

por la enzima glutatión sintetasa (GSS), y cataliza la unión de la glicina con γ -GC, para formar el glutatión (GSH).

El glutatión puede estar presente en la célula de dos formas, la forma reducida (GSH), y la forma oxidada (GSSG). Cuando el GSH detecta la presencia de ERO, le cede uno de sus electrones convirtiéndose en su forma oxidada, GSSG. De esta manera, el radical libre es neutralizado y GSSG vuelve a pasar a su forma reducida mediante la reacción catalizada por la glutatión reductasa (GR)^{36,53-61}.

La glutatión-S-transferasa 1P (GSTP1) pertenece a una familia de enzimas que tienen un papel muy importante en la detoxificación celular ya que catalizan la conjugación de compuestos hidrofóbicos y electrofílicos con GSH⁶².

c. Muerte celular

La muerte celular se puede clasificar en distintos tipos en función de sus características, aunque casi todos responden a procesos organizados desencadenados por diferentes vías de señalización. Estos tipos de muerte celular se pueden clasificar en dos grandes grupos: muerte celular apoptótica y muerte celular no apoptótica.

La muerte celular apoptótica está señalizada por una familia de proteínas, las caspasas, que determinan cada una de las fases que la comprende. Las caspasas son unas proteasas con un residuo de cisteína que fragmentan proteínas en el residuo siguiente al aspartato. Dentro de este grupo de muerte celular, podemos encontrar a su vez otros dos tipos: la apoptosis clásica y la anoikis, que se diferencian entre sí en que la inducción de la segunda depende de la falta de sustrato o de contacto con otras células.

La apoptosis clásica, o también conocida como muerte programada, es una parte fundamental del ciclo celular y su desencadenamiento está precedido por la activación sucesiva de diferentes tipos de caspasas. Es el tipo de muerte celular más estudiado, debido a que mantiene el balance fisiológico entre la proliferación celular y la muerte. En cuanto a la morfología celular, implica el redondeamiento de la célula, condensación y fragmentación de la cromatina, reducción en el

tamaño tanto de la célula como del núcleo y la formación de cuerpos apoptóticos. Estos cuerpos apoptóticos son fragmentos de la membrana plasmática que se transforman en vacuolas y que en su interior incluyen orgánulos citoplasmáticos. Su formación tiene como fin la contención del material celular y evitar, así, que se active la muerte de otras células. Una vez se ha llevado a cabo la apoptosis, los restos celulares serán fagocitados por unas células especializadas denominadas macrófagos. Este tipo celular no implica la activación de rutas de inflamación.

La apoptosis se puede clasificar en tres tipos:

- Apoptosis extrínseca: implica la presencia de ligandos endógenos, como el factor de necrosis tumoral (TNF) o FAS. Cuando se produce la activación de receptores de ligandos de muerte (por ejemplo, TNFR), se desencadena la activación a su vez de caspasa 8. A continuación, se produce la activación de caspasa 3.
- Apoptosis intrínseca: no implica la presencia de receptores de ligandos. Este tipo de muerte celular puede estar inducida por otros factores, como hipoxia, que producen una desregulación en las mitocondrias, que a su vez induce la liberación de proteínas proapoptóticas, como citocromo c, que activan a la caspasa 9.
- Apoptosis dependiente de linfocitos T citotóxicos: Este tipo de muerte implica la activación de caspasa 10.

En estos tres tipos, la activación de las caspasas iniciadoras desencadenará a su vez la de otras caspasas, que serán las que ejecuten el proceso apoptótico⁶³⁻⁶⁷.

Dentro del grupo de muerte celular no apoptótica se encuentran varios tipos, pero algunos de los más importantes son la autofagia, la necrosis o la necroptosis.

La autofagia es uno de los mecanismos de renovación celular más conservados evolutivamente en el reino eucariota. Mediante este proceso, las células pueden desechar partículas o incluso orgánulos que se encuentran dañados y favorecer así su renovación.

Para llevarlo a cabo, las células forman una estructura conocida como autofagosoma, que, gracias a la activación mediada por diversas proteínas, degradará el material dañado⁶⁸⁻⁷¹.

La necrosis es un tipo de muerte celular que se desencadena por la presencia de factores externos, procesos inflamatorios, estímulos mecánicos o irradiación con luz ultravioleta. Morfológicamente, la célula en estado de necrosis suele presentar orgánulos hinchados, dilatación del retículo endoplásmico, rotura de la membrana plasmática y liberación del contenido citoplasmático al espacio extracelular^{38,72-75}.

Similar a la muerte por necrosis, pero sí controlada por vías de señalización de transducción y mecanismos catabólicos, está la necroptosis. Este tipo de muerte celular tiene como fin el asegurar la eliminación de células infectadas, promover la inflamación mediante la liberación de patrones moleculares asociados a daño (DAMP), así como favorecer el reclutamiento de células fagocíticas al lugar del daño. Este tipo de muerte celular se produce por la activación de receptores de membrana tipo toll (TLR)⁷⁶⁻⁷⁹ o los de muerte (*death receptors*, o DR)⁸⁰⁻⁸². Esta activación promueve a su vez la activación de quinasas que fosforilan residuos de serina o treonina para interactuar con otros receptores. Estas quinasas se denominan *receptor-interacting protein kinases* (RIPK). RIPK1 y RIPK3 se unen para formar un complejo denominado necroptosoma, que induce la activación de la proteína MLKL (*mixed lineage kinase domain like pseudokinase*). MLKL se transporta a la membrana celular para inducir la liberación del contenido citoplasmático, que más tarde será degradado^{78,80,80,82-89}.

La activación o inactivación de cualquiera de las rutas de muerte celular es un proceso muy regulado, aunque las vías todavía no están del todo dilucidadas. Sin embargo, en la membrana celular hay determinados receptores que responden a distintos estímulos para activar cada una de las rutas de manera más o menos diferenciada.

Para que se lleve a cabo la apoptosis extrínseca, una molécula conocida como FAS ligando se une a su receptor de membrana, con un dominio FADD en la cara

interna. Cuando se produce la unión entre FAS y su receptor, FADD libera a la procaspasa 8 al citoplasma, para transformarse en caspasa 8. Esta, a su vez, activa a las caspasas 3 y 7, que serán las efectoras de la apoptosis⁹⁰⁻⁹⁷. Sin embargo, este proceso también está regulado con la apoptosis intrínseca, mediante el cual la célula, al detectar estrés oxidativo, interactúa con Bcl2, de manera que se libera el citocromo c de la mitocondria, que a su vez interactuará con la procaspasa 9 para convertirla en caspasa 9, y esta activará también a las caspasas 3 y 7^{91-94,98-101}.

Cuando la célula detecta la unión del TNF α con su receptor TNFR1, pueden activarse tres rutas diferentes. Por una parte, TNFR1 puede interactuar con IKK, que producirá la liberación citoplasmática de NF- κ B^{102,103}, que podrá translocarse al núcleo para activar la expresión de genes antioxidantes e inflamatorios. Por otra, se puede producir la activación de caspasa 8, que desencadenará la ruta previamente nombrada. Por último, se puede producir la activación de RIP1K, que favorecerá la fosforilación de RIPK3 y esta transportará a MLKL hasta el necroptosoma, donde se llevará a cabo la necroptosis. La activación de una ruta u otra depende de la activación de la proteína TAK1 (*transforming growth factor beta-activated kinase 1*), que fosforilará a RIPK1 si detecta niveles altos de RIPK3^{82,104,105}.

d. Estrés oxidativo y muerte celular

Como ya se ha mencionado, los tres tipos más importantes de muerte celular son la apoptosis, la necrosis/necroptosis y la autofagia. Todos ellos están fuertemente vinculados a la presencia de estrés oxidativo.

NF- κ B es un factor de transcripción que se activa en presencia de ERO, y promueve la activación de distintas rutas de muerte celular^{32,102,106,107}.

Las evidencias indican que NF- κ B actúa como mediador en la expresión de p62/sqstm1. p62 es una proteína que juega un papel central en varias rutas de señalización, ya que actúa como adaptador de distintos procesos celulares. Por una parte, esta molécula posee un dominio asociado a ubiquitina (UBA), que

controla el sistema ubiquitín-proteasoma (UPS) y, por otra, una región de interacción con la proteína de cadena corta asociadas a microtúbulos (LC3) denominada LIR, que controla la ruta autofagia-lisosoma (ALP) ^{40,103,108-113}. El UPS se encarga de degradar proteínas o agregados de proteínas de vida corta, mientras que el ALP tiene como función la degradación de proteínas de vida larga u orgánulos celulares que se encuentran en mal estado. Por esto, p62 actúa como punto de unión entre las vías de degradación proteasómicas y lisosómicas.

Por otra parte, la expresión de p62 está íntimamente relacionada con la transcripción de Nrf2, puesto que posee un ARE. Además, p62 también se une a Keap1 gracias a su dominio KIR^{32,112}, de manera que se favorece la liberación de Nrf2 para poner en marcha la expresión de otros genes antioxidantes, ya mencionados previamente, como HO-1 o GCL³².

Por todo esto, la expresión de NF- κ B induce la activación de rutas de renovación celular como la autofagia. Este proceso implica la interacción entre p62 y LC3. LC3 tiene dos formas, la citosólica LC3I, que permanece inactiva, y la forma lipídica, LC3II, que se une a la membrana del fagóforo estimulando su elongación y maduración hasta convertirse en autofagosoma¹¹⁴⁻¹¹⁸. Todo este proceso también está controlado por diferentes proteínas denominadas proteínas relacionadas con autofagia (Atg). Por ejemplo, la unión de LC3II a la membrana del fagóforo está catalizada por el complejo formado entre Atg5-Atg12-Atg16^{115,119-122}.

Asimismo, la expresión de NF- κ B estimula la separación entre la proteína Bcl2, que actúa como inhibidor de la autofagia, de Beclin1, que también participa en la formación del fagóforo^{59,119,121,123,124}.

Por otra parte, NF- κ B activa una ruta de supervivencia antiapoptótica, que incluye la expresión de genes antiapoptóticos, hasta producir la supresión de la ruta de muerte celular estimulada por TNF α . El TNF α es una proteína del grupo de las citoquinas, liberada por las células del sistema inmune, que interviene en la inflamación y la apoptosis. La activación de TNF implica la formación del señalosoma, que consiste en el complejo formado por el receptor 1 de TNF

(TNFR1) y moléculas adaptadoras que actúan como inhibidoras de NF- κ B (IKK). IKK modula la transcripción de NF- κ B mediante la fosforilación de su anclaje al citoplasma, permitiendo que se libere y se transloque al núcleo para activar distintas rutas metabólicas. Esta ruta implica la unión de TNF α con TNFR1, que a su vez activa el complejo caspasa 8/10 ^{76,81,99,103,125-129}.

NF- κ B también controla la vía inflamatoria, ya que tiene la capacidad de regular tanto positiva como negativamente la formación del inflamasoma. Cuando se detectan mitocondrias dañadas, p62 libera señales proinflamatorias para activar la formación del inflamasoma. De esta manera, los macrófagos activados por estas señales eliminan las mitocondrias dañadas, y se previene la activación masiva del inflamasoma que, sumado a la liberación de interleuquina 1 beta (IL1 β), implicaría la muerte de muchos más macrófagos, que ya no podrían encargarse de procesos de renovación, reparación de tejidos o inmunidad mediada. Mediante esta ruta, NF- κ B proporciona una respuesta inflamatoria con función de reparación, previniendo la inflamación a gran escala. Por otro lado, la activación de NF- κ B también produce la expresión mediada de citoquinas inflamatorias como la IL1 β o la IL18. Ambas citoquinas también son utilizadas como marcadores de autofagia, ya que la IL1 β se expresa cuando está activada, mientras que la expresión de IL18 es indicativo de su inhibición¹³⁰⁻¹³².

e. Neuroprotección de la retina

La neuroprotección consiste en el uso de agentes protectores que favorezcan la supervivencia de las células del SNC presentes en la retina. Generalmente, este término se asocia a la supervivencia de las células ganglionares, especialmente comprometida en enfermedades como el glaucoma. Sin embargo, también se puede considerar la existencia de una neuroprotección indirecta, basada en el mantenimiento de otros tipos celulares cuya función principal sea la protección de las células del SNC presentes en la retina¹³³⁻¹⁴¹.

De este modo, el EPR toma relevancia en la neuroprotección ya que, como se ha comentado anteriormente, tiene como funciones principales la nutrición y protección de la capa de fotorreceptores adyacentes. Su integridad es

fundamental para que la supervivencia de estas células no se vea comprometida, ya que las deficiencias celulares en esta capa se ven directamente relacionadas con la muerte de los fotorreceptores. La supervivencia de este tipo celular puede disminuir a causa de varios factores, especialmente por la presencia de ERO, pero también por agentes inflamatorios, por toxicidad o enfermedades hereditarias.

En cuanto a agentes neuroprotectores, se pueden diferenciar distintos tipos. Por una parte, encontramos los neuroprotectores endógenos, que son aquellos que se producen de manera natural por el cuerpo humano.

Por ejemplo, el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) es una proteína de aproximadamente 50 kDa expresada principalmente por el EPR, aunque también por las células de Müller. Su función principal es controlar la producción del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), que favorece la angiogénesis, aunque también está relacionado con la respuesta antiinflamatoria y antioxidante, ya que interacciona con el NF- κ B, activando rutas de neutralización de ERO. Además, tiene la capacidad de transportarse a través de las diferentes capas de la retina hasta alcanzar a las células ganglionares, con el fin de protegerlas frente agentes dañinos¹⁴²⁻¹⁴⁵.

Asimismo, la melatonina, aunque es sintetizada principalmente por la glándula pineal, también se expresa en los fotorreceptores. Esta molécula posee propiedades antioxidantes que reducen el daño oxidativo producido en la retina a causa de la fototoxicidad^{125,146-151}.

Por otra parte, se pueden encontrar los neuroprotectores exógenos, que se obtienen a través de la alimentación o fármacos enriquecidos, de manera que el cuerpo pueda procesarlos e integrarlos en las funciones celulares. Son varias las sustancias con potencial capacidad protectora. Sin embargo, no todas aportan los efectos de protección deseados una vez se utilizan como suplementación en un tratamiento. Por eso, la investigación básica, mediante ensayos *in vitro* e *in vivo*, permite la puesta a punto de protocolos de estandarización, donde se puede reproducir de manera más o menos realista el comportamiento de estas sustancias. No obstante, previamente a la utilización de estas como fármaco, es

necesario que se lleve a cabo un análisis exhaustivo de sus mecanismos de actuación para poder trasladar su uso a la práctica clínica. En este respecto, algunas de las sustancias utilizadas son los ácidos grasos omega y resveratrol, que inducen la autofagia y protegen a las células del EPR^{28,152-156}. Así bien, otros neuroprotectores que se utilizan en investigación básica, aunque su uso todavía no ha sido trasladado a la práctica clínica son el epigallocatequin galato (EGCG)^{57,72,157,158}, que se extrae del té verde, la curcumina^{39,159-164}, extraída de la planta *Curcuma longa*, la nicotinamida¹⁶⁵⁻¹⁶⁸, que es una forma de la vitamina B3, la vitamina E¹⁶⁹ o el azafrán¹⁷⁰. Asimismo, el uso de la coenzima Q10 como neuroprotector está dando muy buenos resultados en experimentación básica¹⁷¹⁻¹⁷³, que incluso han sido demostrados en práctica clínica¹⁷⁴.

Otra vía de protección es la que se obtiene con el uso de luces de longitud de onda larga, como la luz roja (600-700 nm), cuya investigación está en auge. A diferencia de la luz de longitud de onda corta está demostrado que esta favorece los mecanismos protectores presentes en las células, estimulando la proliferación celular, la reducción del estrés oxidativo y de la inflamación, o favoreciendo la cicatrización de heridas¹⁷⁵⁻¹⁸³.

Otros estudios demuestran que el tratamiento con factores de crecimiento puede aumentar la supervivencia de los fotorreceptores. Por ejemplo, el tratamiento con el factor de crecimiento de epitelio del cristalino (LEDGF) protege frente a daños producidos por luz^{125,184}. El factor de crecimiento de fibroblastos (b-FGF) es uno de los factores de crecimiento más estudiados en cuanto a la acción de protección celular frente a daños oxidativos¹⁸⁵⁻¹⁸⁷.

3. Plasma rico en factores de crecimiento

El plasma rico en factores de crecimiento (PRGF) es derivado hemático autólogo, es decir, que se obtiene de la sangre del propio paciente¹⁸⁸⁻¹⁹¹. Una vez analizado y estandarizado su procesamiento, la obtención del PRGF es relativamente sencilla, ya que la muestra de sangre solo requiere de una centrifugación para separar el plasma del resto de componentes celulares que están presentes en ella.

El plasma resultante es activado mediante la adición de cloruro de calcio, que permite la liberación del contenido plaquetario y la formación del coágulo de fibrina, también utilizado como *scaffold* en terapias avanzadas¹⁹². Por último, se somete a temperaturas de 56°C, para la inactivación del sistema del complemento.

El objetivo del procesamiento de la sangre consiste en enriquecer al plasma de los factores de crecimiento presentes en las plaquetas, así como la eliminación del componente leucocitario presente en la sangre. De esta manera, el PRGF se convierte en un plasma que estimula la diferenciación, proliferación y el reclutamiento celular, además de evitar las posibles reacciones inflamatorias. Además, como proviene del propio paciente, no produce rechazo mediado por reacciones inmunes.

La composición de estos factores de crecimiento varía en función de la edad, el género y la sangre de cada paciente, pero se ha demostrado que, en todos los casos, actúa estimulando la proliferación y división celular, de manera que se favorecen procesos de regeneración y cierre de heridas.

Uno de los componentes principales del PRGF es el factor de crecimiento epidérmico (EGF), que favorece la proliferación y migración celular, de manera que se estimula la cicatrización de heridas. También posee factor de crecimiento fibroblástico (FGF), factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1) y factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), todos ellos con funciones importantes en la proliferación y migración de fibroblastos. Asimismo, contiene factor de crecimiento nervioso (NGF), que actúa como factor neurotrófico.

Además, hay estudios que demuestran que el PRGF reduce la formación de cicatrices en la córnea debido al balance producido entre PDGF y el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$). Este último está demostrado que aumenta la producción de depósitos en la matriz extracelular, desencadenando una respuesta fibrótica adversa en diversas estructuras oculares y aumentando la presión intraocular (PIO). Sin embargo, el PRGF parece tener la capacidad de

modular la actividad de este factor de crecimiento, reduciendo la fibrosis tisular y favoreciendo la regeneración celular¹⁹³⁻¹⁹⁹.

a. Aplicaciones terapéuticas

Son muchos los estudios realizados en diferentes partes anatómicas los que avalan la efectividad del PRGF. Desde hace varios años, se utiliza como estimulador de cicatrización en procedimientos quirúrgicos maxilofaciales, como en extracciones de piezas dentarias o en la aplicación de implantes²⁰⁰⁻²⁰⁵. Pero también se ha utilizado ampliamente en traumatología, favoreciendo la regeneración del tejido muscular y articular tras padecer alguna lesión²⁰⁶⁻²⁰⁸.

A nivel ocular, el uso del PRGF como colirio ha sido empleado de manera muy extensa para tratar patologías de la córnea. Por ejemplo, se ha utilizado como tratamiento para enfermedades crónicas, como los defectos epiteliales persistentes (DEP), favoreciendo y estimulando la división de las células madre del limbo corneal para el cierre de heridas, como humectante en enfermedades como el ojo seco, o como tratamiento para la conjuntivitis cicatricial²⁰⁹⁻²¹¹. Sin embargo, también se han encontrado evidencias de que el PRGF en modo de colirio puede difundir hacia capas más internas del ojo, disminuyendo la PIO. Estas características podrían ser muy útiles en el tratamiento de enfermedades como el glaucoma, ya que también se ha demostrado que tiene capacidad antiinflamatoria.

Una nueva vía de aplicación del PRGF en retina comienza a vislumbrarse. Hasta la fecha, se ha utilizado el PRGF como tratamiento en el caso de agujeros maculares muy concretos, mediante el uso de membranas hechas de PRGF, mostrando resultados alentadores, pero que requieren de un estudio en mayor profundidad.

4. La luz

La luz es una parte del espectro electromagnético (EEM). De menor a mayor, este EEM comprende desde rayos gamma o rayos X, seguidos por la radiación ultravioleta (UV), la luz visible y la radiación infrarroja, hasta las ondas de radio.

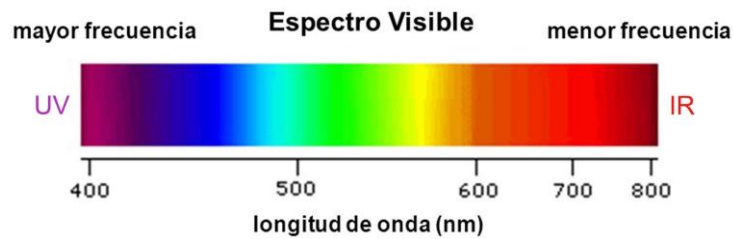


Figura 4. Esquema del espectro visible

a. Espectro visible

Se denomina luz visible a aquella porción de luz captada por el ojo humano que tiene la capacidad de transportarse tanto por el aire como por el vacío. Este tipo de luz comprende desde los 400 nm hasta los 780 nm de longitud de onda y está formada por diferentes fracciones de luz de longitudes de onda diversas. Se compone de fotones, partículas sin masa, que tienen características físicas de comportamiento dual onda-partícula.

El color de la luz corresponde a la percepción del sistema visual humano en función de su longitud de onda. En este respecto, las longitudes de onda más corta corresponden con el espectro visible azulado, mientras que las de longitud de onda más largas son de color rojo, pasando por una gama de colores del verde, amarillo o naranja. Una manera de cuantificar el color de una luz es mediante el uso de grados Kelvin (K). Esta medida se calcula en base a la cantidad de luz que refleja un cuerpo negro en un rango de 1000 a 9000 grados K, siendo aquellas más azuladas las que corresponden con temperaturas más altas y las más cálidas a temperaturas más bajas.

La luz está definida por su rango de emisión del EEM en nm y por su potencia (W). La potencia corresponde a la energía que transportan las ondas por unidad de tiempo, denominado flujo radiante. La intensidad, por otra parte, corresponde a la cantidad de flujo que emite una fuente por unidad de ángulo sólido, y se mide en vatios (W) por estereorradián. La irradiancia se corresponde con la magnitud que mide la potencia incidente expresada por unidad de superficie (W/m^2).

La interacción de la luz con la materia produce diversos efectos ópticos, entre los que se encuentran la refracción, que consiste en la modificación en la dirección y velocidad de la luz al cambiar el medio de propagación, la difracción, en la que se produce una desviación de la luz al pasar por el borde de un cuerpo oscuro o la absorción, en el que la materia capta la luz. En el caso de la absorción óptica, los materiales negros absorben la luz mientras que los blancos la reflejan.

En las últimas décadas, la exposición del ser humano a la luz artificial ha aumentado de manera exponencial. El cambio en el estilo de vida de la población ha producido que se haya pasado de una exposición principalmente a luz natural, con un rango de horas de iluminación más restrictivo, a una exposición a luz artificial, más directa y con un margen horario mucho mayor. Actualmente, la gran mayoría de los hogares poseen electricidad que proporciona luz artificial de manera inmediata. Asimismo, los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de aparatos electrónicos, como los ordenadores o los teléfonos móviles. Sin embargo, el uso continuo de estos dispositivos también puede suponer un perjuicio, ya que producen fatiga ocular además de emitir, la mayoría, luz de longitud de onda corta^{13,71,76,112,124,138,205,212,213}.

b. Fototoxicidad

Las fuentes de producción de luz artificial son muy variadas. No obstante, en los últimos años las más utilizadas han sido las fuentes de tipo LED. Este tipo de dispositivo se constituye de un material semiconductor con dos terminales, que emite la luz por un mecanismo de electroluminiscencia. La corriente eléctrica que pasa por los terminales hace que los electrones cambien de nivel de energía mientras se desplazan por el material semiconductor, produciendo la liberación de fotones. A diferencia de otras fuentes luminosas artificiales, los LED ofrecen grandes ventajas, entre las que se encuentran la larga durabilidad, una alta eficiencia de conversión, baja irradiación de calor y la emisión de un rango estrecho en la longitud de onda. Por todas estas características, se han convertido en una fuente muy utilizada en las pantallas de dispositivos electrónicos, así como foco de iluminación ambiente.

Sin embargo, las fuentes lumínicas artificiales tienen una composición espectral diferente a la solar. Además, hay que tener en cuenta otro factor denominado contaminación lumínica, que hace referencia a la alteración de la oscuridad natural del medio nocturno producida por una fuente de luz artificial. Este efecto es uno de los problemas ambientales más importantes, especialmente en los centros urbanos de los países desarrollados, ya que presenta un gran impacto negativo tanto en los ecosistemas como en la salud humana. Esto, combinado con la exposición prolongada a la iluminación interior, así como a otras fuentes lumínicas procedentes de dispositivos electrónicos, implica la exposición casi permanente a radiaciones de luz.

Las distintas estructuras del ojo tienen la capacidad de absorber y transmitir diversas longitudes de onda provenientes de la luz. La córnea, por ejemplo, absorbe longitudes de onda por debajo de 280 nm, aumentando su transmitancia de manera drástica a partir de los 380 nm. El humor acuoso presenta transmitancia entre los 220 y 2400 nm. El cristalino presenta transmitancia a partir de los 300 nm. Sin embargo, estos valores pueden verse modificados en función de su transparencia, que va disminuyendo con el paso del tiempo. Por otro lado, el humor vítreo permite una transmitancia entre los 300 y 1400 nm. Es necesario que parte de esta radiación llegue hasta la retina sin sufrir ningún tipo de modificación, para que se produzca el proceso de formación de imágenes en el cerebro. Sin embargo, también es importante que se lleve a cabo la filtración de la luz por las capas previas, para evitar que la luz UV incida en la retina²¹⁴.

Por tanto, de media llegan a la retina radiaciones lumínicas de longitudes de onda desde los 380 hasta los 1400 nm, entre los que se encuentran las luces del espectro azul (400-500 nm). Este tipo de luz, aunque también está presente en la radiación solar, corresponde a la porción mayoritaria de la luz artificial. Debido a la alta exposición lumínica a la que la sociedad en general está sometida, una gran parte de radiación de longitud de onda corta llega a la retina. Esto conlleva el aumento de la producción de ERO por parte de las células, así como la activación de distintas cascadas enzimáticas que promueven el daño al ADN mitocondrial. Los conos y bastones absorben la luz de manera selectiva. Por

ejemplo, la rodopsina, que es un pigmento sensible a luz presente en los conos y bastones, es sensible a la luz azul. Esta, cuando detecta la luz azul, aumenta la expresión de varios productos secundarios (por ejemplo, el cromóforo all-trans-retinal) produciendo fototoxicidad mediante el aumento en la producción de ERO²¹⁵.

Asimismo, las mitocondrias también absorben luz del espectro visible. Por ejemplo, la proteína mitocondrial citocromo c oxidasa, que está asociada al complejo IV, absorbe luz azul de entre 400 y 410 nm. La riboflavina, que forma parte de numerosos sistemas enzimáticos, tanto del citoplasma celular como de las mitocondrias, tiene un espectro de absorción de entre 420-520 nm, e induce la oxidación de numerosas sustancias, así como la producción de peróxido de hidrógeno²¹⁶.

Diversas investigaciones enfocadas en determinar el mecanismo de acción de la luz azul a nivel mitocondrial sugieren que esta ejerce una acción combinada en varios de los complejos de la cadena de transporte de electrones, desencadenando diversos eventos celulares que conllevan a la muerte celular por apoptosis y necroptosis. Asimismo, la exposición a luz azul también promueve la fragmentación del ADN y probablemente a la activación de caspasa-3 u otras proteínas asociadas, como Bcl-2. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la fototoxicidad derivada de la exposición de este tipo de luz depende de otros factores como la intensidad, el tiempo de exposición y la existencia de patologías previas^{150,215,217-221}.

5. Modelos *in vitro* e *in vivo* para el estudio de patologías retinianas

La investigación básica es una herramienta muy útil para evaluar y analizar, de manera más o menos sencilla, las respuestas de los organismos frente a determinados estímulos. Para ello, la investigación se puede dividir en dos grandes grupos basados en la diana de experimentación: modelos *in vitro* y modelos *in vivo*.

Los modelos *in vitro* se llevan a cabo sobre uno o varios tipos celulares, ya sea sobre líneas preestablecidas o en cultivos primarios, que se mantienen en condiciones ambientales controladas. El objetivo de la experimentación *in vitro* es reproducir mediante el uso de cultivos celulares las respuestas frente a diversos estímulos, con el objetivo de obtener conocimientos que más tarde serán trasladados al siguiente nivel de investigación, la experimentación *in vivo*. Este tipo se lleva a cabo en animales de experimentación, por lo que su uso requiere de una puesta a punto más controlada, con el fin de mantener el principio ético de las tres erres (reducir, reemplazar y refinar).

Son muchas y muy variadas las investigaciones básicas que aportan conocimientos traslacionales para la práctica clínica, ya que es una manera sencilla de llevar a cabo la puesta a punto de protocolos terapéuticos, que más tarde serán puestos en práctica en seres humanos.

Como se ha comentado anteriormente, la DMAE es una enfermedad que tiene como consecuencia la pérdida de visión por la muerte de las células de la mácula. Esta muerte puede ser desencadenada por varios factores, entre los que se encuentran la acumulación de estrés oxidativo o la neovascularización. Por esto, hay diversos modelos, tanto *in vitro* como *in vivo*, que reproducen algunas de estas condiciones.

Como modelos de estrés oxidativo, el uso de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) como agente oxidante es muy común, ya que aumenta la producción de ERO, activando rutas antioxidantes, como la de Keap1-Nrf2^{31,110,117,163,222-226}. Por otra parte, existen también determinados compuestos con la capacidad de bloquear de manera específica complejos de la cadena de transporte de electrones. En la actualidad, algunos de los más utilizados son la rotenona, que bloquea al complejo I^{76,227-230}, la antimicina, que bloquea al complejo III²³¹⁻²³⁴ o la azida sódica, que bloquea al complejo IV²³⁵⁻²³⁹. Sin embargo, también hay otros agentes que bloquean a la ATP-sintasa mitocondrial, como la oligomicina²⁴⁰⁻²⁴³ o la diclonexilcarbodiimida (DCCD)^{244,245}. Asimismo, otros modelos se basan en la estimulación de la respuesta inflamatoria, utilizando compuestos como LPS

(lipopolisacárido)^{43,103,246–250} o IFN- γ (interferón-gamma)^{131,234,251}, que, además de inflamación, también aumentan el estrés oxidativo en células de la retina.

La hipoxia también ha demostrado ser una de las causas de enfermedades neurodegenerativas. Por eso, algunos de los modelos desarrollados en investigación son los basados en el factor de transcripción HIF-1 (*hypoxia-inducible factor 1*), que aumenta la expresión de VEGF, estimulando la neovascularización de la retina y favoreciendo la aparición de enfermedades como DMAE^{13,32,71,125,212,252–254}. Otros modelos de hipoxia se basan en la disminución del aporte de oxígeno a los cultivos celulares o la privación de sustrato, lo cual produce un aumento en la permeabilidad de la BRB (*blood-retina barrier*), favoreciendo la acumulación de fluidos y contribuyendo a la degeneración celular por aparición de edema y compresión²⁵⁵.

Algunos modelos de investigación se basan en la modificación genética, bloqueando o induciendo la expresión de determinados genes. Estos modelos se pueden utilizar tanto *in vitro* como *in vivo*. En experimentación *in vitro*, la técnica de transfección es muy utilizada, ya que permite el bloqueo génico mediante el uso de plásmidos, que modifican de manera específica la expresión de determinados genes^{83,83,256–258}. Por ejemplo, el bloqueo de la expresión de VEGF es muy utilizado para estudiar tratamientos contra la DMAE húmeda o exudativa^{254,259–261}. En experimentación *in vivo*, el uso de animales *knockout* para determinados genes es también muy común^{32,80,96,252,262–268}. Por ejemplo, algunos de estos genes bloqueados son los de la SOD-1 (superóxido dismutasa-1) o Nrf-2, dos grandes agentes antioxidantes. A continuación, estos animales pueden ser expuestos a otras condiciones tóxicas, como a luz azul, de manera que se facilita el estudio del comportamiento celular de un individuo con DMAE frente a la acción de otro agente dañino.

En experimentación *in vivo*, otros modelos se basan en el daño producido por láser, ya que estimula la neovascularización y reproduce las condiciones de la DMAE²⁶¹, o a través del uso de yoduro de sodio (NAIO₃), ya que produce estrés

oxidativo y estimula las rutas apoptóticas mediante la producción de caspasa 3, 7 y 8 y la activación de rutas necroptóticas^{33,84,212,269}.

Además, también hay factores ambientales que pueden influir negativamente en la evolución de enfermedades neurodegenerativas, como la exposición prolongada a luces de longitud de onda corta. Por eso, los modelos de fototoxicidad han ganado protagonismo en los últimos años; debido a la alta exposición a luz artificial a la que estamos sometidos. Mediante estos modelos, se pueden determinar las distintas longitudes de onda, intensidades o el tiempo de exposición de diversas fuentes lumínicas que producen alteraciones en las células, con el fin de analizar el comportamiento celular y su respuesta frente a diversos agentes protectores. Gracias a esto, se conoce que las longitudes de onda corta (400-500 nm) corresponden a la parte nociva de la luz, ya que producen reducción en la viabilidad celular, aumento del estrés oxidativo o inflamación, y que las longitudes de onda larga (600-700 nm) protegen a las células mediante la estimulación de la proliferación o reduciendo el daño oxidativo.

Debido a la implicación del estrés oxidativo en el desarrollo de enfermedades como la DMAE, y basándonos en la literatura, en esta tesis doctoral se han desarrollado varios modelos de estrés oxidativo, principalmente de fototoxicidad, en células de epitelio pigmentario de retina con privación parcial de sustrato, con el fin de analizar la respuesta retiniana frente a un daño producido por luz azul o por agentes que bloquean la cadena de transporte de electrones mitocondrial en presencia de un agente protector, como el PRGF, en una enfermedad neurodegenerativa como la DMAE.

Justificación

Las enfermedades neurodegenerativas son una de las mayores causas de pérdida de calidad de vida del ser humano. Por ello, es de vital importancia estudiar sus mecanismos de acción, para encontrar, así, una vía terapéutica que permita paliarlas.

En este respecto, el sistema visual, además de proporcionar a los seres vivos información sobre el entorno que los rodea, actúa como una ventana del SNC. Por eso, mediante el estudio de enfermedades neurodegenerativas del ojo, se puede obtener un conocimiento traslacional, que permita analizar otras enfermedades del SNC.

Entre estas enfermedades neurodegenerativas, se encuentra la DMAE. Esta patología, que se presenta en dos formas, reduce la calidad en la visión de las personas que la padecen ya que afecta a la mácula, zona de la retina encargada de producir imágenes de máxima definición.

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto la utilidad del uso de factores de crecimiento como terapia para tratar diversas enfermedades. En este respecto, el PRGF, que es un derivado hemático autólogo, ha demostrado ser una buena alternativa para tratar patologías corneales, como defectos epiteliales u ojo seco. Su acción, basada en la estimulación de la regeneración celular o la reducción de la inflamación, podría ser una alternativa útil para tratar patologías retinianas como la DMAE.

Por todo esto, es pertinente y queda justificado el estudio del efecto del empleo del PRGF en un modelo experimental de fototoxicidad, como vía terapéutica para tratar enfermedades neurodegenerativas como la DMAE, con el fin de mejorar la calidad de vida de las personas que la padecen.

Hipótesis

El PRGF protege a las células del EPR frente al estrés oxidativo y la muerte celular, mediante la estimulación de mecanismos de protección, como los sistemas antioxidantes y la autofagia, promoviendo la conservación de la integridad celular y funcionalidad de la retina.

Objetivos

Los objetivos de esta tesis doctoral son los siguientes:

1. Profundizar en el estudio del efecto fototóxico de la luz azul sobre células del EPR.
2. Evaluar el efecto protector del PRGF en el EPR en modelos *in vivo* y *ex vivo* tras la acción oxidante de la luz azul.
3. Evaluar la acción protectora del PRGF sobre los diversos complejos mitocondriales en modelos de daño causados por la luz azul, la rotenona y la azida sódica.
4. Evaluar la acción del PRGF en la estimulación de vías de regeneración celular, como la autofagia, tras un daño producido por luz azul.
5. Evaluar el efecto protector del PRGF en la funcionalidad retiniana en un modelo *in vivo* de daño por luz azul.

Animales, material y método

1. Animales

Todos los procedimientos fueron llevados a cabo siguiendo el *Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research* de ARVO y siguiendo la normativa nacional para el uso de animales de experimentación incluidas en el Real Decreto 53/2013 (Ley 32/2007), así como las normativas europeas (Directiva 2010/63/UE sobre la protección de los animales utilizados para fines científicos). Además, cuenta con la autorización del comité ético de experimentación en animales de la Universidad de Oviedo (Oviedo, Principado de Asturias, España) y la Consejería de Desarrollo Rural y Recursos Naturales del Gobierno del Principado de Asturias, con el número de referencia PROAE 17/2017.

Los experimentos fueron llevados a cabo en ratas macho de la cepa *Wistar* de alrededor de 500 gramos de peso. Los animales fueron divididos en diversos grupos de estudio, en función tanto del tratamiento recibido como del tipo de experimento.

Los animales fueron mantenidos en condiciones de alimentación y bebida *ad libitum* y con un régimen lumínico de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. El régimen de exposición, de cuatro horas a la luz azul en los animales correspondientes, se realizó durante las horas de iluminación estándar, con el objetivo de no alterar los ciclos de los animales

Antes de cada procedimiento invasivo, los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina/xilacina 80/10 mg/kg de peso con una inyección intraperitoneal. A continuación, se realizó una segunda inyección con 1/3 de la dosis inicial para asegurar que los animales se mantuvieran dormidos durante, al menos, una hora.

Al finalizar cada experimento, se les realizó la eutanasia y las muestras fueron recogidas para su posterior procesamiento.

2. PRGF

De acuerdo con la declaración de Helsinki, se extrajo la sangre de 4 donantes sanos (mujeres, media de edad 33 ± 7 años), que se colocó en tubos de 9 ml con 3.8% de citrato de sodio. La sangre fue centrifugada siguiendo el protocolo estandarizado de obtención, para poder recoger el plasma completo a continuación, evitando coger la capa de la serie blanca. Después, se añadió cloruro de calcio para la activación del fibrinógeno y se mantuvo a 37°C durante aproximadamente 30 minutos o hasta que se observó la formación del coágulo. El sobrenadante fue recogido y expuesto a 56°C durante una hora para inactivar el sistema del complemento. Por último, el plasma fue filtrado, dividido en fracciones alícuotas y mantenido a -20°C hasta su uso (menos de seis meses).

3. Cultivos celulares

Para los cultivos celulares, se utilizó la línea celular humana inmortalizada ARPE-19 (ATCC® CRL-2302™, Manassas, VA, USA), que se dejó crecer en medio de cultivo DMEM-F12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), suplementado con 2% de antibiótico penicilina/estreptomicina y suero bovino fetal (SBF) al 10%, en condiciones controladas (5% CO₂ a 37°C). Se sembraron 10×10^4 células/ml del cultivo celular en placas de 96 pocillos o frascos T75 en función de los ensayos a realizar. Después de que las células se hubieran asentado (aproximadamente 24 horas en caso de placas de 96 pocillos y 72 horas en el caso de los frascos T75), las muestras fueron expuestas distintos tratamientos.

Para los tratamientos con luz, se utilizaron LED de luz azul (465-475 nm). La temperatura fue monitorizada para que se mantuviera a 37°C. En todos los casos, las células recibieron un pre-tratamiento de oscuridad de una hora con el medio correspondiente para favorecer su asentamiento.

Para los tratamientos con azida sódica y rotenona, la concentración seleccionada del agente fue 5 mM y 1 μ M, respectivamente. En todos los casos, las células recibieron un pre-tratamiento sin agente nocivo de una hora con el medio correspondiente para favorecer su asentamiento.

4. Viabilidad celular

La viabilidad celular fue medida mediante el ensayo de reducción basado en el bromuro 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio (MTT) (M2128, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). En este ensayo, el MTT es reducido principalmente por la acción enzimática de deshidrogenasas mitocondriales y otras enzimas citosólicas, dando como producto final de la reacción la sal formazán, que es una sal insoluble en agua de color morado. En resumen, después de que las células fueron tratadas con sus respectivos medios, se añadió MTT disuelto en medio de cultivo con SBF 1% a una concentración final de 0.5 mg/mL durante 75 minutos a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y se solubilizó el MTT reducido añadiendo 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) (D4540, Sigma-Aldrich) a cada pocillo. Después de 5 minutos de agitación de las placas, se midió la densidad óptica de los cristales solubilizados utilizando un lector de placas automatizado (PerkinElmer 2030 Multilabel Reader, Victor X5, Waltham, MA, USA) a 570 nm de longitud de onda.

5. Estado mitocondrial: JC-1

Para los análisis del estado mitocondrial, las células fueron incubadas con JC-1 (T3168, Sigma-Aldrich) a una concentración de 1.5 µg/mL diluido en medio de cultivo durante 30 minutos en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y oscuridad. La acumulación en la mitocondria de JC-1 se muestra en fluorescencia roja/naranja (590 nm) en orgánulos sanos, y verde cuando está despolarizada (530 nm). Una vez transcurrido el tiempo de incubación y reemplazado el medio por uno fresco, se tomaron imágenes de fluorescencia en el microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B (Leica microsystems, Wetzlar, Alemania) y se cuantificaron los niveles relativos de las intensidades de verde y rojo. Las medidas se realizaron utilizando el lector de placas PerkinElmer a las longitudes de onda de 570 y 535 nm.

6. Cuantificación de especies reactivas del oxígeno: DHE

Para los análisis de ERO, las células fueron incubadas con dihidroetidio (DHE) (D1168, Thermo Fisher Scientific) a una concentración de 40 µM diluido en medio

de cultivo durante 30 minutos en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y oscuridad. Después, fueron lavadas dos veces con medio fresco. Las imágenes se obtuvieron inmediatamente después con microscopía de fluorescencia/contraste. La formación de ERO se determinó midiendo la ratio de fluorescencia de 370 a 420 nm (para los citoplasmas de células vivas) y de 535 a 610 nm (para la cromatina de células vivas, en rojo) utilizando el lector de placas PerkinElmer.

7. Cuantificación de GSH

La cuantificación del GSH se realizó mediante la elaboración de un kit de glutatión (703002, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Para ello, las células ARPE-19 fueron levantadas de los frascos T75 con ayuda de una rasqueta. Tras su recogida, fueron transferidas a un tubo de 1.5 mL, y centrifugadas. A continuación, el pellet depositado en la parte inferior del tubo fue homogeneizado en 500 µL de buffer en frío y sometido a ultrasonidos durante un minuto. Después, las células fueron centrifugadas una vez más a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante fue trasladado a otro tubo, al que se le añadieron 500 µL del agente MPA y se mezcló todo con ayuda del vórtex. Después, la mezcla se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo, se volvió a centrifugar a 3000 g durante 4 minutos. Se añadieron 50 µL del agente TEAM por cada mL de muestra y se mezclaron de nuevo con ayuda del vórtex. Finalmente, se añadieron 50 µL de muestra y 150 µL del cóctel del ensayo a cada pocillo de la placa de 96. Los niveles de GSH se midieron en intervalos de 5 minutos durante 30 minutos a 405-414 nm en el lector de placas PerkinElmer, y las medidas fueron calculadas con ayuda de una recta patrón proporcionada por el kit.

8. Cuantificación de expresión proteica por Western blot

Los análisis de cuantificación proteica medidos mediante Western Blot (WB) se realizan en dos fases. La primera fase consiste en la recolección y extracción de proteínas de la muestra que se desea estudiar, así como de su cuantificación, y la segunda fase consta de una electroforesis para la separación de dichas proteínas

en función de su peso molecular, seguido de un estudio por inmunodetección de las mismas.

Los cultivos celulares de ARPE-19 fueron levantados por raspado de los frascos T75. Las células fueron transferidas a un tubo de 1.5 mL, donde fueron centrifugadas (400 g, 5 minutos). El medio de cultivo fue descartado y las células fueron resuspendidas en un cóctel de buffer de lisis (150 mM de cloruro de sodio, 1% TRITON X-100) que contiene inhibidores de proteasas (P8340, Sigma-Aldrich) y fosfatasas (P0044, Sigma-Aldrich) a una concentración de 2 µg/mL. Después, fueron sometidas a tres ciclos de congelación/descongelación, así como de otros tres ciclos de ultrasonidos de 2 minutos de duración. Por último, las células fueron nuevamente centrifugadas a 15700 g durante 30 minutos y a 4°C para recuperar el sobrenadante que contiene la fracción citosólica de las proteínas.

Para poder realizar la extracción de la fracción nuclear de las proteínas, el pellet de células remanente fue expuesto a un nuevo buffer de extracción (HEPES, MgCl₂, NaCl, EDTA, Glicerol, DTT, 0.2 mM PMSF e inhibidores de proteasas y fosfatasas 2 µg/mL). Se incubó durante 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 cantidad de proteína de cada una de las fracciones fue cuantificada utilizando el kit basado en el ácido bicinconínico, el QuantiPro™ BCA Assay Kit (QPBCA-1KT, Sigma-Aldrich). Una vez conocida la concentración de proteína existente en cada muestra, se tomó la misma cantidad (20 µg) para cada uno de los grupos de estudio, que se mezcló con buffer de muestra (2 M Tris/HCl, pH 6.8, con 8% SDS, 40% glicerol, 8% mercaptoetanol y 0.002% bromofenol) y agua destilada para el ajuste al mismo volumen final y se calentaron hasta 95°C durante 5 minutos (según las indicaciones del anticuerpo a utilizar). A continuación, cada una de las muestras fue colocada en una calle de geles de poliacrilamida (al 10% o al 12%) y 0.1% SDS, dejando una de las calles para añadir 8 µL de marcador molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder (26634, Thermo Fisher Scientific), y se puso en marcha la electroforesis. Una vez hecho esto, las proteínas

fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (10600001, Amersham™, GE Healthcare, Chicago, IL, USA) con un poro de 0.22 µm de diámetro.

Ya sobre las membranas, se procedió al estudio por inmunodetección. Para ello, las membranas fueron incubadas durante toda la noche con los siguientes anticuerpos primarios (ver tabla x) diluidos en tampón con una solución salina de TRIS, con 0.1% de Tween-20 (TBS-T). La detección fue llevada a cabo con la incubación con sus correspondientes anticuerpos secundarios biotinilados. Después, las membranas se incubaron durante 1 hora con el reactivo ABC-HRP kit (PK-6100, Vector laboratories, Burlingame, CA, US) para formar el complejo Avidina-biotina-peroxidasa, que actuará como sustrato de la reacción posterior. Finalmente, se procedió al revelado de las mismas mediante la inmersión en una solución que contenía 3-amino-9-etilcarbazol al 0.016% en acetato de sodio 50 mM (pH 5.0) con 0.05% Tween-20 y 0.03% H₂O₂. Una vez reveladas las membranas, se detuvo la reacción colorimétrica con azida sódica al 0.05% en solución TBS-T.

La cuantificación de la densidad de proteína se realizó con el programa ImageJ/Fiji (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

9. Cuantificación de expresión génica por RT-qPCR

El análisis de la expresión génica se realizó en tres fases. La primera consistió en la extracción del ARNm de las muestras, la segunda, en la transcripción del ARNm en ADNc y, finalmente, la tercera en la que se llevó a cabo el análisis de amplificación mediante RT-qPCR.

Para la extracción de ARN de cultivos *in vitro*, las células sembradas en frascos T75 fueron levantadas con ayuda de una rasqueta y transferidas con su medio de cultivo a un tubo de 1.5 mL. Después del proceso de centrifugado (1400 rpm, 5 minutos), fueron lavadas con PBS a 4°C. A continuación, el pellet de células fue resuspendido en buffer de extracción. Para la línea celular ARPE-19, se utilizó el kit Illustra RNAspin Mini kit de GE Healthcare (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). Para la extracción de ARN de cultivos *ex vivo*, los EPR fueron separados

del resto del ojo con ayuda de un pincel, procurando evitar su manipulación. Por cada muestra se necesitaron tres EPR, puesto que la cantidad de células de cada epitelio era insuficiente para su cuantificación, que se depositaron en un tubo de 1.5 mL. A continuación, se añadieron 100 µl de buffer de extracción y, con ayuda de un pistilo libre de ARN, el tejido fue machacado hasta convertirse en una masa homogénea. Las muestras fueron calentadas a 46°C durante 30 minutos, siguiendo las indicaciones del kit Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Applied biosystems, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA), y a continuación centrifugadas a 3000 g durante dos minutos. La pureza del ARN fue cuantificada mediante la ratio de las absorbancias A260/A280 y A260/A230. Después, 5x105 microgramos del total del ARN obtenido fue convertido a ADNc con ayuda del kit High Capacity RNA-to-cDNA (4387406, Applied Biosystems) siguiendo las indicaciones del fabricante, durante 60 minutos a 37°C, seguidos por 5 minutos a 95°C y finalmente mantenido a 4°C. El estudio de la expresión génica se llevó a cabo mediante cuantificación relativa (el método $\Delta\Delta Ct$) en el termociclador 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), utilizando la mastermix Power SYBR Green (4367659, Applied Biosystems). Cada una de las muestras fue analizada por triplicado en cada uno de los experimentos. Los datos fueron analizados utilizando el programa SDS 1.4 de Applied Biosystems.

10. Inmunohistoquímica e inmunocitoquímica

Los cultivos celulares de la línea ARPE-19 fueron fijados en metanol frío o paraformaldehído 4% durante 10 minutos. Las copas fueron fijadas en metanol frío durante una hora. Los ojos completos fueron fijados en paraformaldehído al 4% durante 2 horas en agitación, tras realizar pequeños agujeros en la córnea para facilitar la penetración del fijador. Tras su fijación, tanto células como tejidos fueron lavados 3 veces en tampón fosfato salino (PBS) durante 10 minutos. Los tejidos que fueron congelados para su procesamiento con criostato se expusieron a un gradiente de sacarosa (15% y 20%) durante una hora respectivamente y 30% durante una noche, para su óptima conservación, previo a la inmersión en una solución acuosa viscosa de alcohol polivinil y polietilenglicol (OCT).

Después de la incubación en el correspondiente suero al 10% en PBS durante 60 minutos para el bloqueo, y de ser lavados en PBS, los cultivos fueron expuestos durante toda la noche y a 4°C a sus correspondientes anticuerpos primarios. Transcurrido ese tiempo, los cultivos fueron lavados con PBS y expuestos a sus correspondientes anticuerpos secundarios durante 2 horas. Después de varios lavados con PBS, se incubaron a temperatura ambiente con DAPI (10236276001, Roche) (0.2 µg/mL) por 10 minutos.

Para los estudios histológicos, se realizó una tinción con hematoxilina-eosina siguiendo el protocolo habitual. Para ello, las secciones del ojo fueron inmersas en hematoxilina durante 3 minutos y lavadas con agua. A continuación, fueron inmersas en eosina durante 2 minutos y lavadas con agua destilada durante 1 minuto. Por último, fueron expuestas a un gradiente de concentración ascendente de alcohol (70°, 80°, 96° y 100°), cada uno de ellos durante 20 segundos, y a xileno I y xileno II, cada uno de 30 segundos.

Las imágenes se obtuvieron utilizando el microscopio de fluorescencia Leica DMI6000B.

11. TUNEL

El TUNEL (marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa) es un ensayo utilizado para la cuantificación de células apoptóticas ya que se basa en la presencia de cortes del ADN identificados por la terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT). En este caso, se utilizó el kit In situ cell detection kit (1215679291, Roche, Hoffman-La Roche, Basilea, Suiza) sobre la línea celular ARPE-19. Brevemente, el protocolo consistió en una permeabilización de las células con tritón 0.1% en PBS. Tras 2 lavados con PBS, las muestras fueron incubadas en el TUNEL reaction mix durante una hora a 37°C. A continuación, se procedió a una tinción con DAPI durante 10 minutos. Tras dos lavados de 5 minutos en PBS, se tomaron imágenes de las células mediante microscopio de fluorescencia.

12. Electrorretinografía

Para poder analizar la respuesta de la retina a una exposición breve de luz se utilizó la electroretinografía, y para ello se empleó el sistema RETIAnimal (Roland Consult, Brandenburg an der Havel, Alemania).

La retina, debido a su composición celular, posee una zona electronegativa, que corresponde con las capas más externas, y una zona electropositiva, que corresponde con las más internas. Además, el globo ocular actúa como un dipolo eléctrico, debido a la diferencia de potencial que existe entre la córnea y la parte posterior del mismo. De esta manera, se puede estudiar el comportamiento eléctrico del sistema una vez ha sido estimulado con una fuente lumínica. Esto queda registrado en un electroretinograma (ERG). En el ERG se puede ver la respuesta de los distintos tipos celulares a la luz. Sin embargo, en este caso, se seleccionó el valor obtenido de la amplitud desde el valle de la onda a hasta el pico de la onda b, que se expresa en μV , puesto que corresponde con la respuesta global de la retina en proporción al área funcional de la misma. El estímulo luminoso fue un destello de luz emitido por un LED blanco (-30 dB, 0.003 cd/m², 0.125 Hz).

A continuación, los animales fueron anestesiados, como previamente se ha descrito, y colocados en el dispositivo. Después de aplicar unas gotas de Goniotal (212902, Alcon Healthcare, Cornellà de Llobregat, Barcelona, España) en ambas córneas, se colocaron los electrodos. El electrodo de tierra se colocó en la base de la cola, los electrodos de referencia cada uno en una escápula, y los electrodos activados en ambas córneas. Un led blanco generó un estímulo lumínico. Las medidas fueron tomadas en condiciones escotópicas y los animales fueron adaptados a la oscuridad durante 16 horas.

Para controlar la presión intraocular (PIO), se tomaron medidas con ayuda de un tonómetro Tonolab (Icare Finland, Vantaa, Finlandia) en los días 0, 10 y 30 días.

13. Dispositivos de luz

Todos los dispositivos de luz fueron diseñados y realizados en el laboratorio. Para ello, se utilizaron bulbos de LED azul de 5 mm (ElectroDH, 12.675/5/AZ/C/SL) y se ensamblaron entre ellos y con resistencias de 56 Ω , siguiendo un circuito determinado. Se conectaron a la corriente gracias al uso de alimentadores a 12V de potencia.

14. Análisis estadístico

Todos los test estadísticos se realizaron en el programa GraphPad Prism versión 7.0a para MAC (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Los datos fueron comparados utilizando el test estadístico ANOVA *One-way*. Para el estudio comparativo de las medias de cada uno de los tratamientos, se utilizaron las pruebas de comparación múltiple Tukey y Sidak. El nivel de significancia se fijó a $p < 0.05$ para todos los casos.

**Capítulo 1: Capacidad
antioxidante del PRGF en
modelos *in vitro* de
fototoxicidad por luz azul**

C1.1. Introducción

La DMAE es una enfermedad neurodegenerativa que tiene como consecuencia el deterioro de la mácula, zona de la retina encargada de producir imágenes definidas debido a su alta densidad de células fotorreceptoras^{12,13,18,270,271}. El EPR es una capa monoestratificada de células epiteliales localizado de manera adyacente a la neuroretina, que se encarga de abastecer de nutrientes a los fotorreceptores, así como de protegerlos de los posibles agentes nocivos que puedan dañarlos. Debido a la importancia funcional de la mácula, así como del EPR, es fundamental que su estructura se conserve intacta, puesto que una de las consecuencias de su degeneración es la pérdida parcial o completa de la visión.

Las causas concretas de la DMAE todavía se desconocen, aunque sí se sabe que hay factores tanto endógenos (el envejecimiento o la predisposición genética), como exógenos (la obesidad o tabaquismo), que pueden acentuar dicha afección.

No obstante, sí que parece haber consenso en que uno de los desencadenantes de esta patología es la acumulación de ERO.

Las ERO son radicales libres que se liberan en el citoplasma a consecuencia de las diversas reacciones metabólicas llevadas a cabo por las células. En condiciones normales, existen mecanismos encargados de neutralizar el efecto nocivo de las ERO. Sin embargo, hay ocasiones en las que la producción de estas es mayor a su neutralización, lo que conlleva que se acumulen en las células y, por lo tanto, puedan causar un efecto nocivo a largo plazo^{28,248,270,272-274}.

En los últimos años, la exposición excesiva a luz de longitud de onda corta, presente en los distintos dispositivos electrónicos, se ha convertido en un factor de riesgo añadido para tener en cuenta. Está demostrado que la sobreexposición a una fuente lumínica de determinadas características en condiciones patológicas puede agravar la enfermedad. Diversos trabajos de investigación han demostrado que la exposición a luces LED de longitud de onda corta aumenta la presencia de ERO y, por lo tanto, pone en riesgo la integridad del EPR, y más concretamente a nivel de la mácula^{217,221,223,275-279}.

Por otra parte, son varios los estudios que demuestran que el PRGF tiene una naturaleza protectora, así como una alta capacidad regenerativa, ya que estimula la proliferación y la diferenciación celular. Así bien, estos datos sugieren que el PRGF podría actuar también como un agente antioxidante, protegiendo a las células frente a agentes nocivos como las ERO, aunque los mecanismos por los cuales el PRGF tendría esa capacidad no han sido descritos^{192,280}.

En condiciones basales, existe un balance en la expresión de Keap1 y Nrf2, puesto que el primero actúa como modulador del segundo. Sin embargo, cuando se produce un aumento de las ERO, Keap1 libera a Nrf2, que viaja desde el citoplasma de la célula hasta el núcleo para poner en marcha la expresión de otros agentes antioxidantes, entre los que se encuentran la HO-1, GSH o NQO1.

El GSH es uno de los complejos antioxidantes más potentes de las células, ya que es capaz de donar un protón a las ERO para estabilizarlas. De esta manera se transforma en su forma oxidada (GSSG), que, finalmente, será de nuevo reducida a GSH por la GR. La expresión temprana de GSH está controlada por la enzima GCL, que se compone de dos subunidades: GCLM, que es la subunidad moduladora, y GCLC, que es la subunidad catalizadora. Además, en el proceso también interviene otra proteína, la GSTP1, que controla la transferencia de compuestos hidrofóbicos y electrofílicos al GSH para poder neutralizar las ERO^{53,60}.

La HO-1 es una enzima que se expresa en condiciones de estrés oxidativo, y que tiene como función principal reducir el superóxido y otras ERO^{35,46-50,281}. NQO1 es una enzima que lleva a cabo la reducción de dos electrones, transformando quinonas en hidroquinonas⁵². También controla la degradación ubiquitina-independiente de p53⁵¹. Puesto que ambas moléculas participan en la eliminación de agentes oxidantes, su estudio es de vital importancia.

Por todo esto, el trabajo de este capítulo se centró en estudiar el efecto de la luz azul en células del EPR, así como la capacidad del PRGF para estimular los sistemas antioxidantes presentes en las células, en un modelo experimental de fototoxicidad.

C1.2. Diseño experimental

Para poder llevar a cabo el estudio del posible efecto antioxidante del PRGF tras un daño producido por luz azul, se realizaron diversos experimentos, tanto *in vitro* como *ex vivo*.

Estudios *in vitro*

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo sobre la línea de cultivos ARPE-19. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos o en frascos T75, a una concentración aproximada de 10×10^4 células/ml en medio DMEM-F12 suplementado con 2% de antibiótico penicilina/estreptomicina y SBF al 10%, en condiciones controladas (5% CO₂ a 37°C). Después de su asentamiento, aproximadamente 24 horas tras la siembra en las placas de 96 pocillos o 72 horas en el caso de los frascos T75, las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos (Tabla 1).

Tratamiento	Medio	Oscuridad/Luz azul
Control	DMEM F12 + SBF 1%	Oscuridad 19 h
Luz azul	DMEM F12 + SBF 1%	Oscuridad 1h/Luz azul 18h
PRGF	DMEM F12 + PRGF 10%	Oscuridad 19 h
Luz azul + PRGF	DMEM F12 + PRGF 10%	Oscuridad 1h/Luz azul 18h

Tabla 1. Grupos experimentales para ensayos *in vitro*

Para los estudios *in vitro*, se utilizó una intensidad de luz de 18 W/m² (aproximadamente 400 lux), puesto que corresponde con la intensidad media a la que la población actual está sometida.

Una vez tratadas las células con su correspondiente tratamiento, se procedió a estudiar los diferentes parámetros.

- Viabilidad celular: Para analizar el efecto tanto del PRGF como de la luz azul, así como de la combinación de ambos, sobre la viabilidad celular, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad por MTT previamente descrito (n=24).
- Estado mitocondrial y presencia de ERO: También se estudió el efecto del PRGF y la luz azul sobre el estado mitocondrial utilizando el marcador JC-

1 (n=8), así como la presencia o ausencia de ERO, con ayuda del marcador DHE (n=8).

- Cuantificación de GSH: Para la cuantificación del GSH se utilizó un kit de cuantificación de glutatión (n=4), previamente descrito.
- Expresión génica: El estudio de la expresión génica de los marcadores (Tabla 2) se realizó mediante RT-qPCR de dos pasos (n=4). Para la extracción del ARN se utilizó el kit Illustra RNAspin Mini kit de GE Healthcare. Después, el ARN fue transcrito a ADNc con ayuda del kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems). Por último, se procedió a la amplificación génica mediante qPCR.

Gen	ID	Forward	Reverse
Actina	NM_0011101.4	5'-ATTCAAATATGAGATGCGTTGTT-3'	5'-GTGGACTTGGGAGAGGACTG-3'
NQO1	NM_000903.3	5'-TTGAGCGAGTTCATAGGAGAG-3'	5'-CCTTCTACTCCGAAGGGT-3'
HO-1	NM_002133.2	5'-CTGGAGGAGGAGATTGAGCG-3'	5'-ATGGCTGGTGTGTAGGGGAT3-3'
GCLM	NM_002061.3	5'-AGCACTTCTCGGCTACGATT-3'	5'-GCGGGAGAGCTGATTCCAAA-3'
GLCL	NM_001498.3	5'-TGGAGACCAGAGTATGGGAGT-3'	5'-AAGTACTGAAGCGAGGGT-3'
GSTP1	NM_000852.3	5'-AGGCCTTCGCTGGAGTTTC-3'	5'-CGGCCTCGAACTGGGAAATA-3'
Keap1	NM_012289.3	5'-CCATGAAGCACCGCGAAGTGCC-3'	5'-GTCTGTATCTGGTCTGTAACACTCCAC-3'
Nrf2	NM_00131904.1	5'-TCAGTCAGCGACGGAAAGAG-3'	5'-GTGGGCAACCTGTCTTTCAT-3'

Tabla 2. Listado de oligonucleótidos utilizados en línea celular ARPE-19 para RT-qPCR

- Expresión proteica: el estudio de la expresión proteica se llevó a cabo mediante WB. Las membranas fueron analizadas mediante inmunodetección de los siguientes anticuerpos (Tabla 3).

Anticuerpo	Referencia (RRID)	Especie	Dilución	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
Actina	Millipore Cat# MAB1501, RRID:AB_2223041	Ratón	1:4000	Millipore, Burlington, MA, USA
Lamina A/C	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc- 56139, RRID:AB_784270	Ratón	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Nrf2	Abcam Cat# ab31163, RRID:AB_881705	Conejo	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
HO-1	Enzo Life Sciences Cat# ADI-SPA-894	Conejo	1:200	Enzo LS, Farmingdale, NY, USA
GCLC	Thermo Fisher Scientific Cat# PA5- 19702, RRID:AB_11008589	Conejo	1µg/mL	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
GCLM	Thermo Fisher Scientific Cat# PA5- 29908, RRID:AB_2547382	Conejo	1:1000	Thermo Fischer, Waltham, MA, USA
Keap1	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc- 514914, RRID:AB_2861131	Mouse	1:50	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Nrf2	Abcam Cat# ab62352, RRID:AB_944418	Conejo	1:100	Abcam, Cambridge, UK
ZO-1	Thermo Fisher Scientific Cat# 61-7300, RRID:AB_2533938	Conejo	1:100	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anticuerpos secundarios				
Anti-ratón	Vector Laboratories Cat# BA-9200, RRID:AB_2336171	Cabra	1:300	Vector labs, Burlingame, CA, USA
Anti- conejo	Vector Laboratories Cat# BA-1000, RRID:AB_2313606	Cabra	1:300	Vector labs, Burlingame, CA, USA

Tabla 3. Listado de anticuerpos utilizados en la línea celular ARPE-19 para WB

- Ensayos inmunocitoquímicos: Para evaluar el estado celular, se realizó una tinción por inmunofluorescencia (Tabla 4). Para ello, se siguió el protocolo descrito anteriormente.

Capítulo 1

Anticuerpo	Referencia (RRID)	Especie	Dilución	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
Nrf2	Abcam Cat# ab31163, RRID:AB_881705	Conejo	1:100	Abcam, Cambridge, UK
HO-1	Enzo Life Sciences Cat# ADI-SPA-894	Conejo	1:200	Enzo LS, Farmingdale, NY, USA
Keap1	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-514914, RRID:AB_2861131	Ratón	1:50	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
ZO-1	Thermo Fisher Scientific Cat# 61-7300, RRID:AB_2533938	Conejo	1:100	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
RPE65	Thermo Fisher Scientific Cat# MA1-16578, RRID:AB_2181003	Ratón	1:100	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anticuerpos secundarios				
Anti-conejo Alexa Fluor 488	Catalog # A32814 Thermo Fisher Scientific Cat# A32814, RRID:AB_2762838	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-ratón Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA

Tabla 4. Anticuerpos empleados en inmunocitoquímica en el modelo *in vitro*.

Estudios *ex vivo*

Los estudios *ex vivo* se llevaron a cabo en ratas macho de la cepa *Wistar* (n=40) de unos 500 gramos de peso. Para ello, los animales fueron anestesiados y sacrificados siguiendo el protocolo previamente descrito. Una vez enucleados los ojos, se retiraron las córneas, cristalinos y vítreos. Las copas oculares fueron colocadas sobre placas de 96 pocillos, de manera que la retina quedase expuesta directamente hacia la luz. En este caso, puesto que se trata de tejido fresco sin fijar ni conservar, la exposición debía ser inferior a cuatro horas, que es el tiempo que tarda en degradarse la retina de manera natural cuando se encuentra fuera del cuerpo. Las copas fueron divididas en los siguientes grupos (Tabla 5). Los grupos experimentales que recibieron luz azul fueron expuestos a una intensidad de 32 W/m² (aproximadamente 900 lux), durante tres horas.

Tratamiento	Medio	Oscuridad/Luz azul
Control	DMEM F12 + SBF 10%	Oscuridad 3 h
Luz azul	DMEM F12 + SBF 10%	Luz azul 3 h
PRGF	PRGF 100%	Oscuridad 3 h
Luz azul + PRGF	PRGF 100%	Luz azul 3 h

Tabla 5. Grupos experimentales para ensayos *ex vivo*.

Una vez transcurrido este tiempo, las copas fueron divididas en dos grupos en función del análisis:

- Expresión génica: el estudio de la expresión génica de los siguientes marcadores (Tabla 6) se llevó a cabo mediante RT-qPCR en dos pasos (n=24).

Gen	ID	Forward	Reverse
Actina	NM_031144.3	5'-GCGTCCACCCGCGAGTACAAC-3'	5'-CGACGACGAGCGCAGCGATA-3'
HO-1	NM_012580.2	5'-CAGCCCCAAATCTGCAACAGA-3'	5'-CAACATGGACGCGCCGACTACCAA-3'
Nrf2	NM_001145412.3	5'-ATTTGTAGATGACCATGAGTCGC-3'	5'-TCCTGCCAAACTTGCCAT-3'

Tabla 6. Listado de oligonucleótidos utilizados en ensayo *ex vivo* para RT-qPCR.

- Ensayos inmunocitoquímicos: para poder realizar un estudio más detallado, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia de los siguientes marcadores (Tabla 7). A continuación, se tomaron las imágenes con ayuda de un microscopio óptico (n=16).

Anticuerpo	Referencia (RRID)	Especie	Dilución	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
Nrf2	Abcam Cat# ab31163, RRID:AB_881705	Conejo	1:1000	Abcam, Cambridge, UK
HO-1	Enzo Life Sciences Cat# ADI-SPA-894	Conejo	1:200	Enzo LS, Farmingdale, NY, USA
ZO-1	Thermo Fisher Scientific Cat# 61- 7300, RRID:AB_2533938	Conejo	1:100	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
RPE65	Thermo Fisher Scientific Cat# MA1- 16578, RRID:AB_2181003	Ratón	1:100	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anticuerpos secundarios				
Anti-conejo Alexa Fluor 488	Catalog # A32814 Thermo Fisher Scientific Cat# A32814, RRID:AB_2762838	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-conejo Alexa Fluor 594	Catalog # A32742 Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-ratón Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA

Tabla 7. Listado de anticuerpos en ensayo *ex vivo* para tinción por inmunofluorescencia

C1.3. Resultados

- Estudios *in vivo*

Para poder determinar el porcentaje de células vivas, se realizó el ensayo de viabilidad por MTT. Los resultados obtenidos con este experimento mostraron (Figura 5) que la viabilidad celular se redujo aproximadamente un 20% con respecto al valor control en presencia de luz azul. Sin embargo, el PRGF por sí solo no produjo ninguna alteración en el número de células vivas y, en combinación con la luz azul, los niveles de viabilidad se restablecieron comparando con los basales.

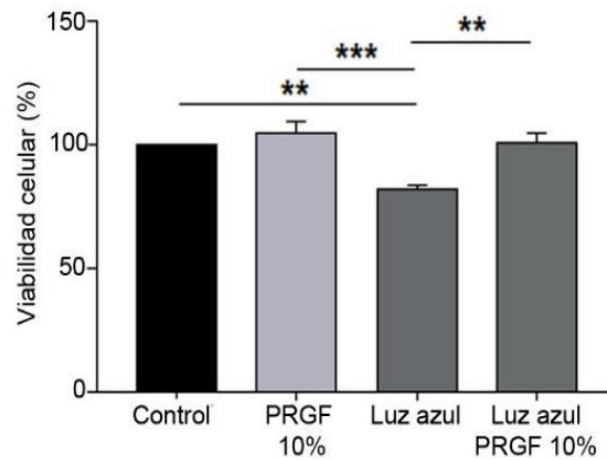


Figura 5. Ensayo de viabilidad (MTT) en ARPE-19 (n=24). La luz azul produjo una disminución en la viabilidad celular estadísticamente significativa con respecto al tratamiento control. El PRGF, por el contrario, no produjo toxicidad y, en combinación con la luz, restableció los niveles de viabilidad celular a los del control. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$.

El estado mitocondrial se determinó gracias al uso del agente JC-1 (Figura 6). Los resultados mostraron que la luz azul redujo de manera significativa la actividad mitocondrial. Para analizar la presencia de ERO, se utilizó el agente DHE. Los resultados obtenidos mostraron que la luz azul aumentó de manera significativa la presencia de estrés oxidativo, mientras que el PRGF, tanto en combinación como solo, la redujo.

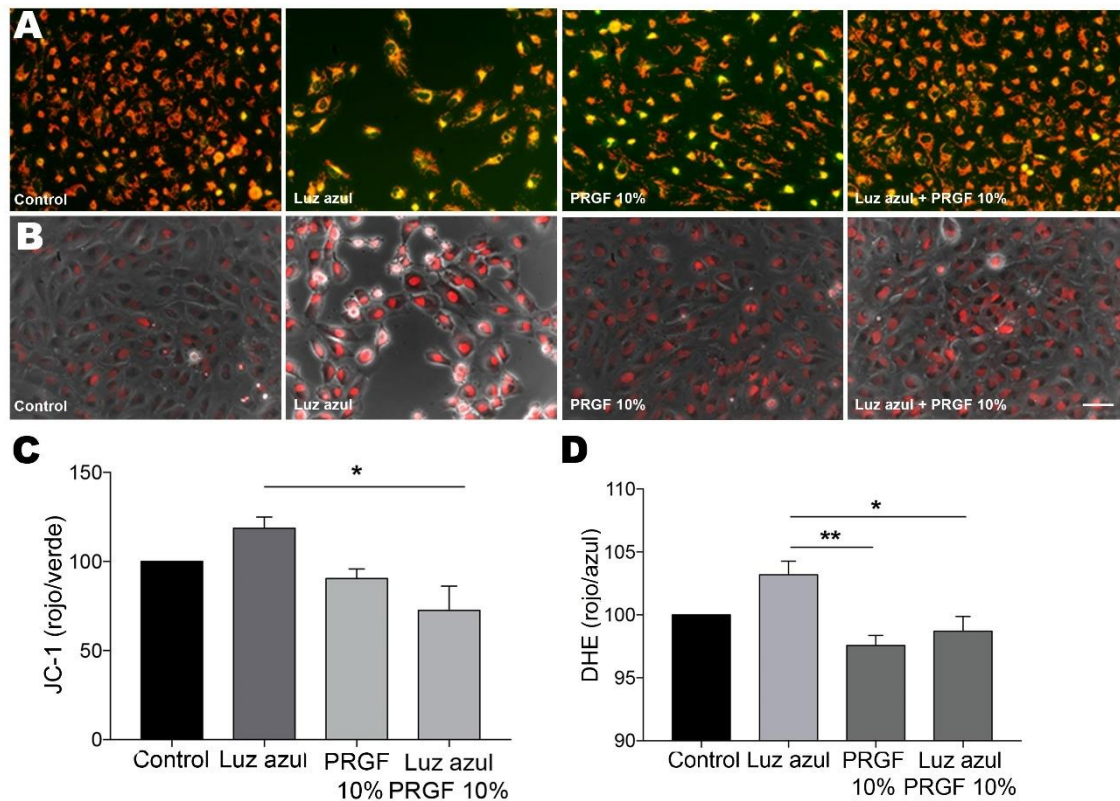


Figura 6.(A) y (C) Cuantificación de la actividad mitocondrial de ARPE-19 determinado por el marcador JC-1. Los resultados mostraron que la luz azul disminuyó la actividad mitocondrial, mientras que, combinada con PRGF, los niveles fueron restablecidos (n=8). (B) y (D) Presencia de ERO en cultivos de ARPE-19 determinado por el marcador DHE. Los resultados mostraron que la luz azul aumentó la presencia de ERO, mientras que, combinada con PRGF, la presencia de agentes oxidantes se redujo de manera significativa (n=8). ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$. Barra de escala 50 μm .

Para poder analizar el estado del tejido, se realizó una tinción del marcador de *zónula occludens*, ZO-1. (Figura 7) Los resultados mostraron que una reducción de su marcaje en presencia de luz azul, que fue recuperada en presencia de PRGF. Además, también se pudo ver un marcaje en la zona nuclear. Por ello, se realizó un western blot de la fracción nuclear (Figura 8), para poder analizar si efectivamente ese marcador se estaba expresando en la zona del núcleo. Los resultados mostraron un aumento de la expresión de este marcador en la fracción nuclear.

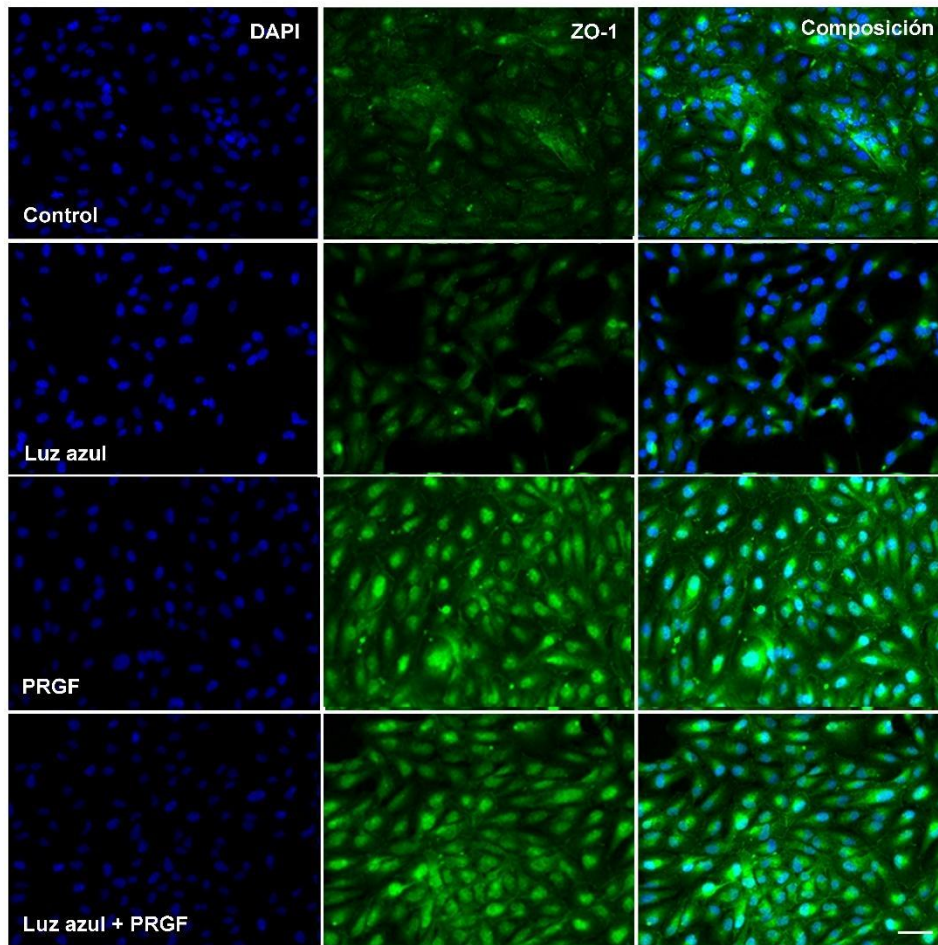


Figura 7. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores ZO-1 (verde) y DAPI (azul). La expresión de ZO-1 se redujo en presencia de luz azul y se recuperó en el tratamiento combinado con PRGF. Barra de escala 50 μm .

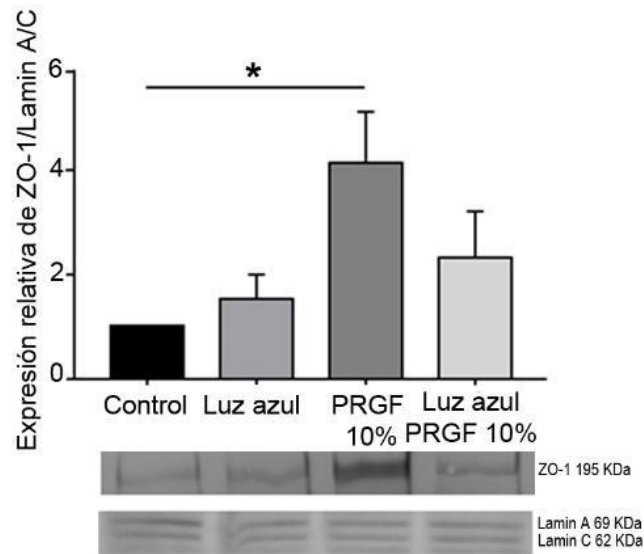


Figura 8. Cuantificación de la expresión proteica de ZO-1 por WB en cultivos de ARPE-19. Los resultados mostraron que el PRGF produjo un incremento significativo con respecto al control. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$.

También se llevó a cabo una tinción del marcador RPE65 (Figura 9), específico para las células del EPR, ya que esta proteína es la responsable de la conversión de all-trans-retinil a 11-cis-retinol durante la fototransducción. Los resultados mostraron una reducción en el marcaje de esta proteína en presencia de luz azul, que fue recuperada en presencia de PRGF.

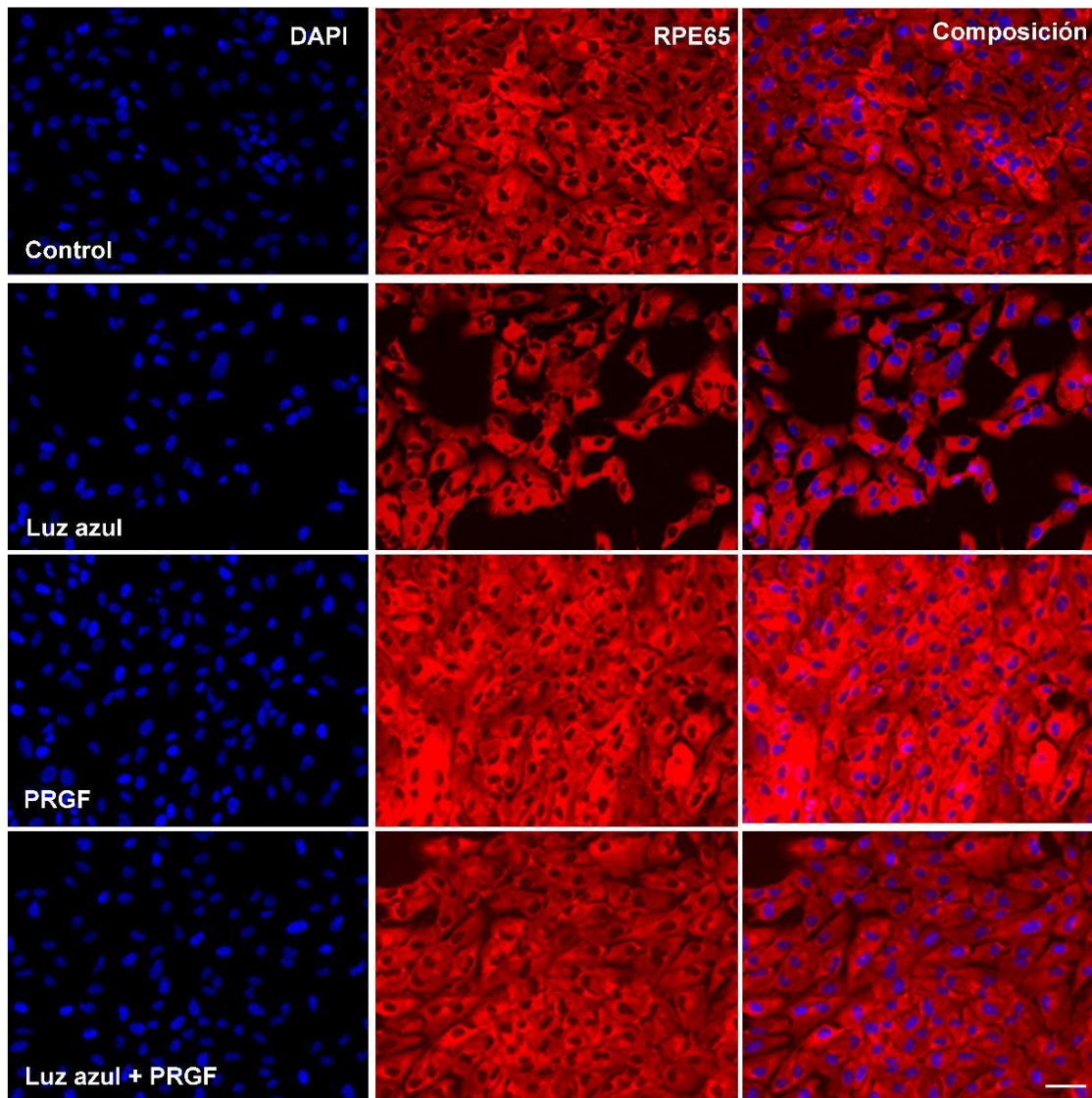


Figura 9. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores RPE65 (rojo) y DAPI (azul). La expresión de RPE65 se redujo en presencia de luz azul y se recuperó en el tratamiento combinado con PRGF. Barra de escala 50 μm .

Los resultados obtenidos de la cuantificación de GSH (Figura 10) mostraron que este disminuyó en presencia de luz azul, mientras que el PRGF, tanto en combinación como solo, produjo su acumulación.

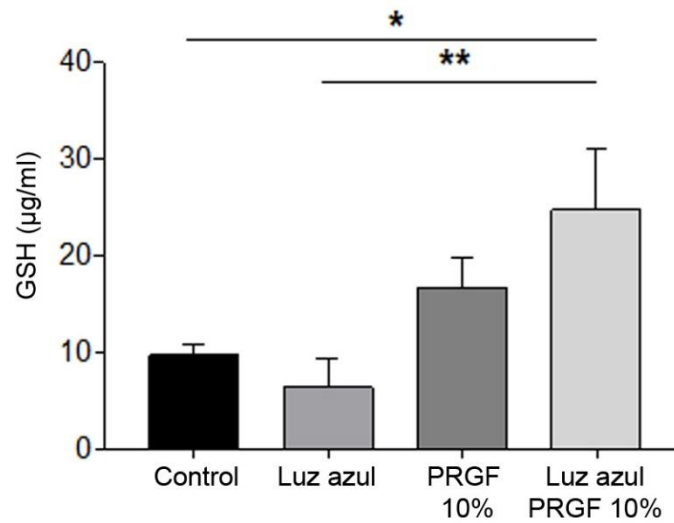


Figura 10. Cuantificación de los niveles de GSH en cultivos de ARPE-19. Los resultados mostraron que la luz azul redujo los niveles de GSH, mientras que el PRGF, tanto solo como combinado, produjo su aumento. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$.

Para poder comprender mejor el proceso, también se analizaron los patrones de expresión, tanto molecular como proteico, de las enzimas catalizadoras de la síntesis del GSH, GCLM y GCLC. Los resultados obtenidos mediante qPCR (Figura 11) mostraron que la luz azul aumentó la expresión de ambas subunidades enzimáticas. Sin embargo, el PRGF, tanto solo como en combinación con la luz, la disminuyó. Por otra parte, el estudio proteico llevado a cabo mediante WB mostró un patrón de expresión diferente. En este caso, en el análisis de expresión de ambas subunidades se pudo observar un aumento significativo en presencia de PRGF. Este resultado se puede relacionar con el obtenido en la cuantificación del GSH, ya que en ambos casos el PRGF produce un incremento.

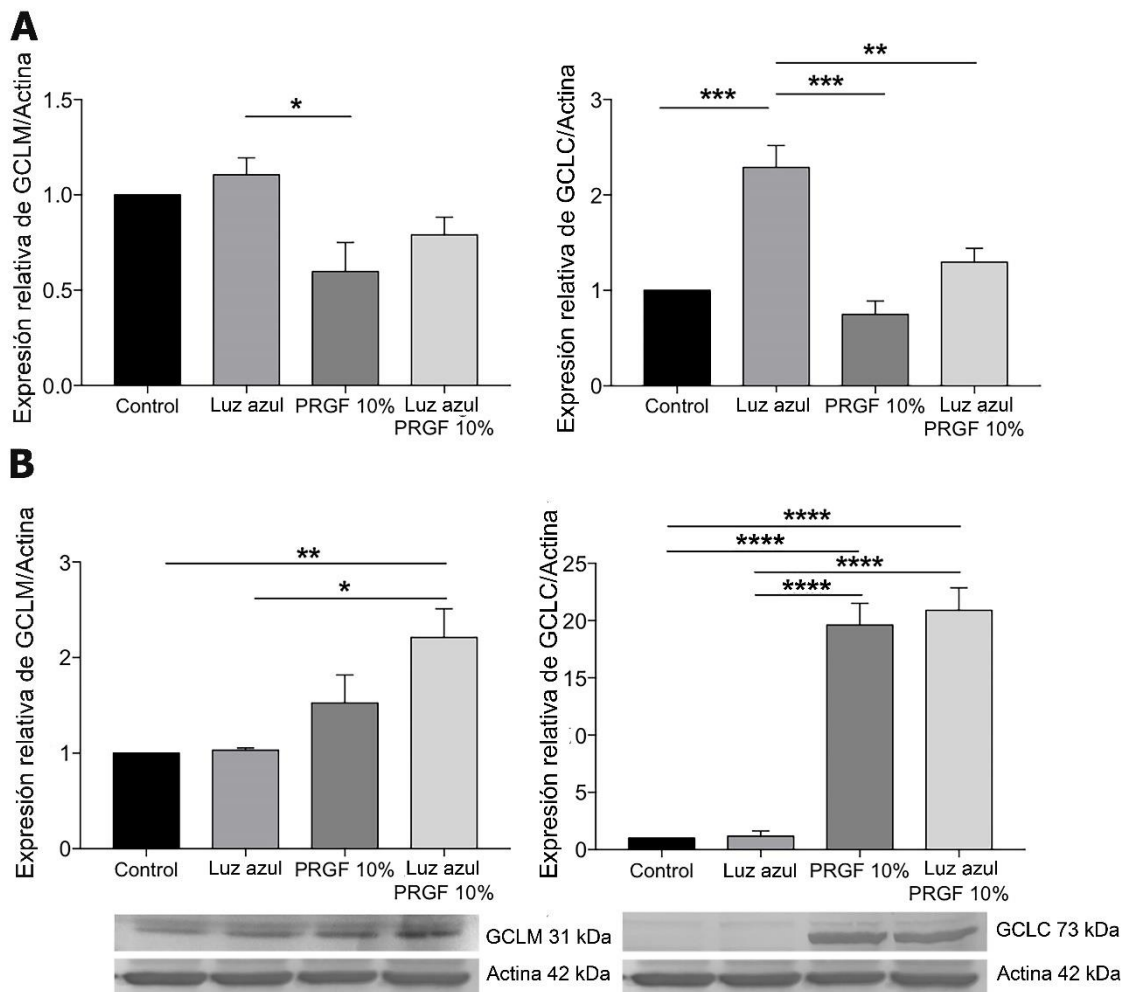


Figura 11. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de GCLM y GCLC por RT-qPCR en cultivos de ARPE-19. Los resultados mostraron que la luz azul aumentó la expresión de ambas subunidades enzimáticas, mientras que el PRGF, tanto solo como combinado, lo mantuvo en niveles basales. (B) Cuantificación de la expresión proteica de GCLM y GCLC por WB en cultivos de ARPE-19. Los resultados mostraron que el PRGF produjo un incremento significativo, especialmente en combinación con la luz azul. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.01$, **** $p < 0.001$.

También se llevó a cabo el estudio molecular de GSTP1 mediante qPCR. Los resultados obtenidos (Figura 12) mostraron que la luz azul produjo un aumento de su expresión, mientras que el grupo de tratamiento con PRGF no sufrió alteraciones con respecto a los valores del control.

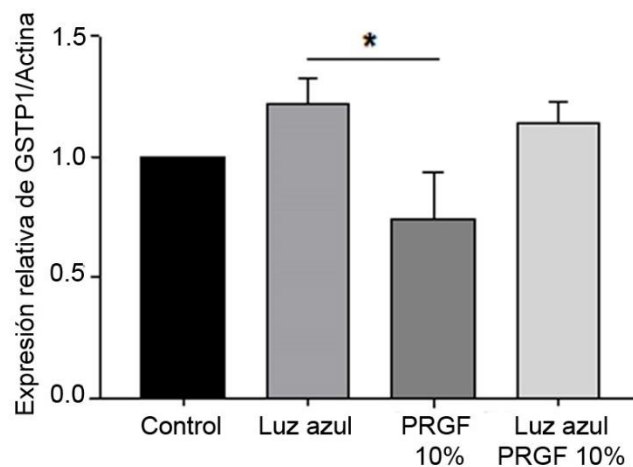


Figura 12. Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de GSTP1 por RT- qPCR. Los resultados mostraron que la luz azul aumentó la expresión de este marcador. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión génica de Keap1-Nrf2 (Figura 13) mostraron que la luz azul aumentó de manera significativa la expresión de ambos marcadores, mientras que el PRGF no la modificó comparando con el control. Por otra parte, se realizó un análisis en la expresión proteica del Nrf2. Los resultados de la expresión citoplasmática no mostraron diferencias entre los distintos tratamientos. Sin embargo, el estudio de la fracción nuclear sí que mostró diferencias significativas, ya que ambos tratamientos con PRGF produjeron un incremento de su expresión.

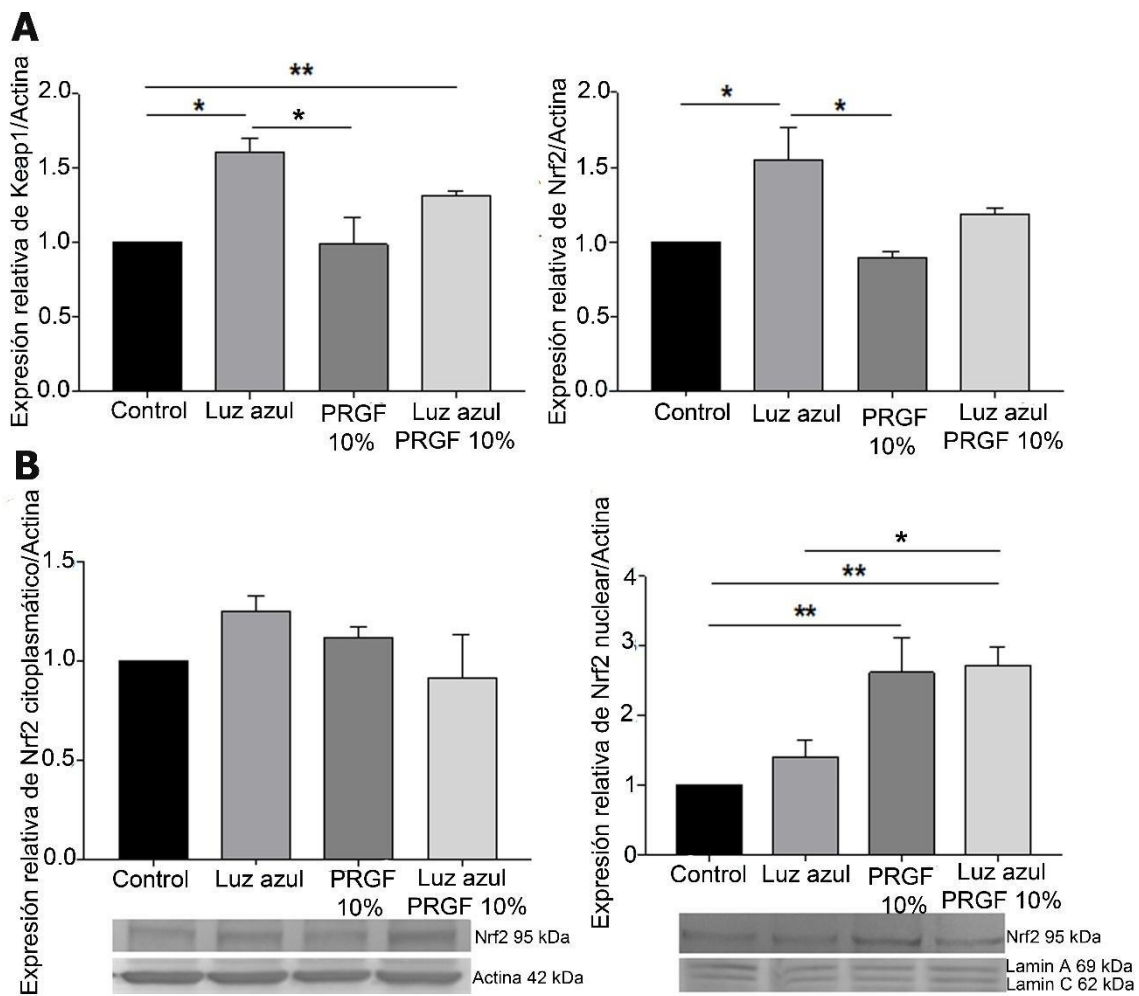


Figura 13. (A) Expresión génica relativa a actina de los marcadores Keap1 y Nrf2 por RT-qPCR. Los resultados mostraron que la luz azul aumentó de manera significativa la expresión de ambos genes. (B) Expresión proteica relativa a actina de las fracciones citoplasmática y nuclear de Nrf2 mediante WB. Los resultados obtenidos de la fracción citoplasmática no mostraron diferencias entre los tratamientos. Por el contrario, en presencia de PRGF sí se detectó un incremento de la expresión de este marcador en la fracción nuclear. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$.

Para poder observar con más detenimiento estos resultados, se estudiaron ambos marcadores mediante técnicas de inmunofluorescencia (Figura 14). Las imágenes muestran que, efectivamente, la presencia tanto de Keap1 como de Nrf2 aumenta en el tratamiento de luz azul, especialmente cuando se combina con PRGF.

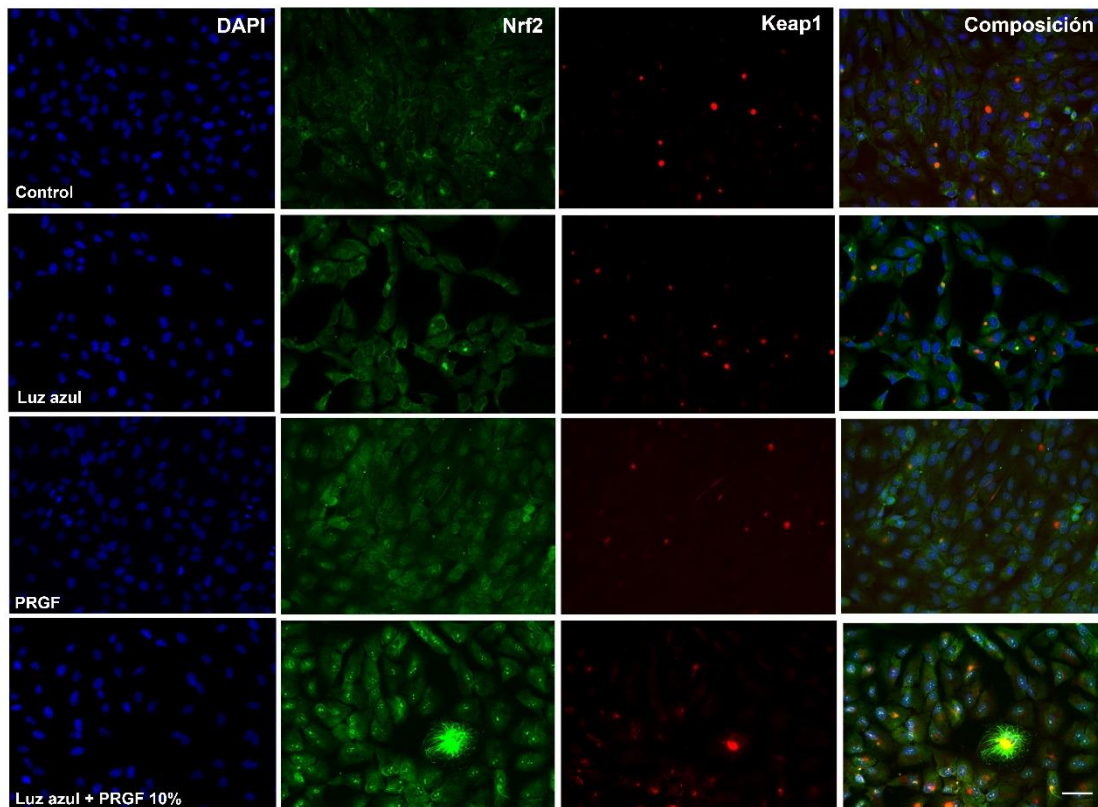


Figura 14. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores Nrf2 (verde), Keap1 (rojo) y DAPI (azul). La expresión de Nrf2 y Keap1 aumenta cuando la luz azul se combina con el PRGF. Barra de escala 50 μ m

También se realizó el estudio molecular de HO-1 (Figura 15). Estos resultados mostraron que la luz azul aumentó de manera significativa su expresión. Sin embargo, el PRGF combinado con la luz azul mostró unos niveles aún más altos, tanto en expresión génica como proteica.

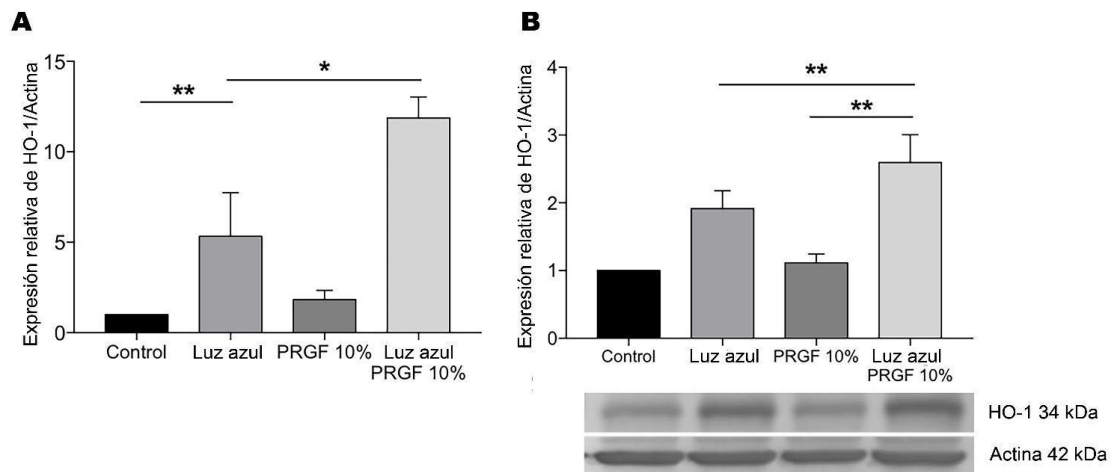


Figura 15. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de HO-1. Los resultados muestran que la combinación de PRGF con luz azul aumentó de manera significativa la expresión de este marcador. (B) Cuantificación de la expresión proteica relativa a actina de HO-1. Los resultados muestran que la expresión proteica aumentó de manera significativa en el tratamiento combinado de PRGF con luz azul. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$.

Estos resultados fueron analizados con más detenimiento mediante un estudio de inmunofluorescencia para este marcador (Figura 16). Al igual que lo observado en el análisis de la expresión génica, el PRGF en combinación con la luz azul incrementó la expresión de HO-1.

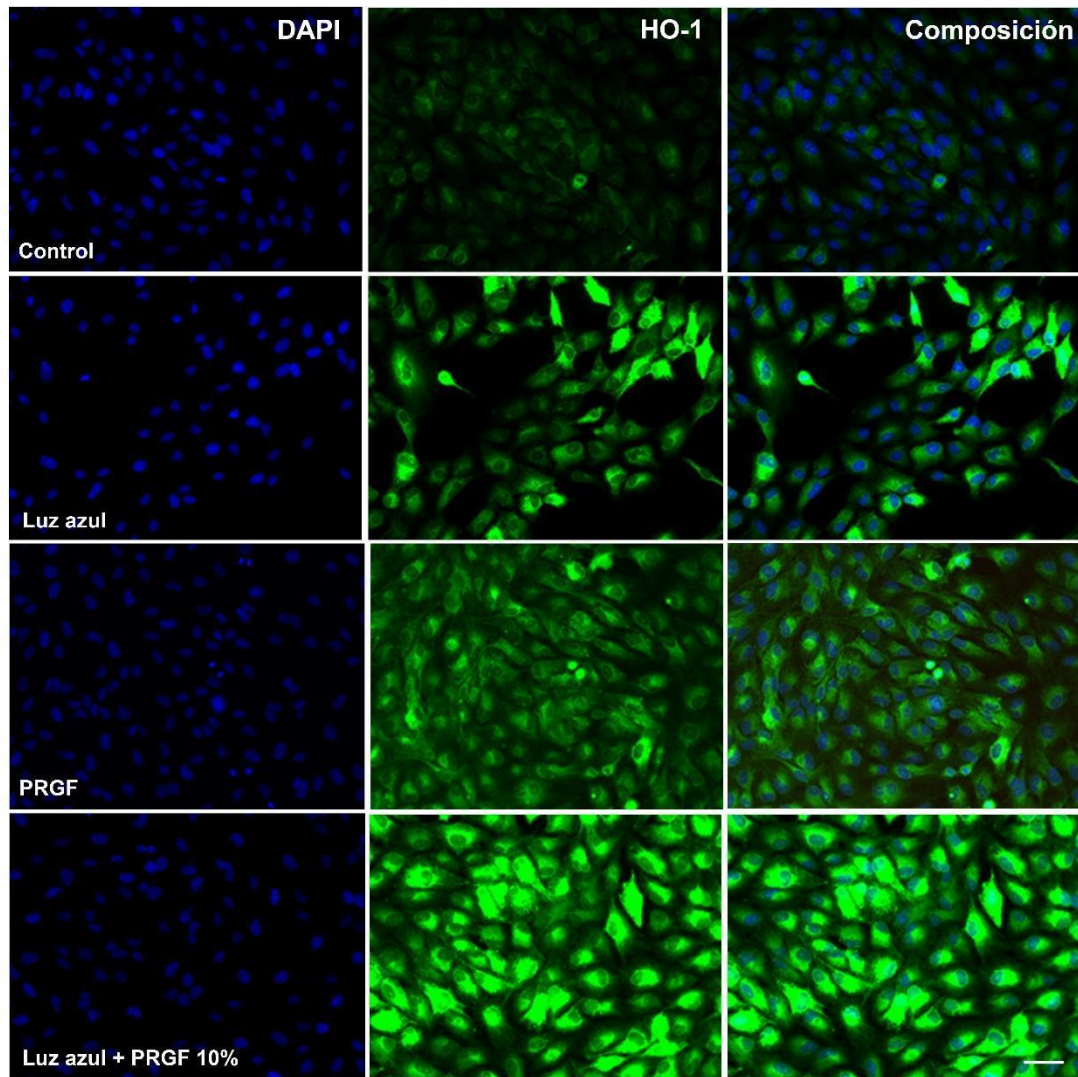


Figura 16. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores HO-1 (verde), y DAPI (azul). La expresión de HO-1 aumenta cuando la luz azul se combina con el PRGF. Barra de escala 50 μ m.

También se analizó la expresión génica mediante RT-qPCR de NQO1. Los resultados obtenidos (Figura 17) mostraron que la luz azul indujo, de manera significativa, la sobreexpresión de dicho marcador.

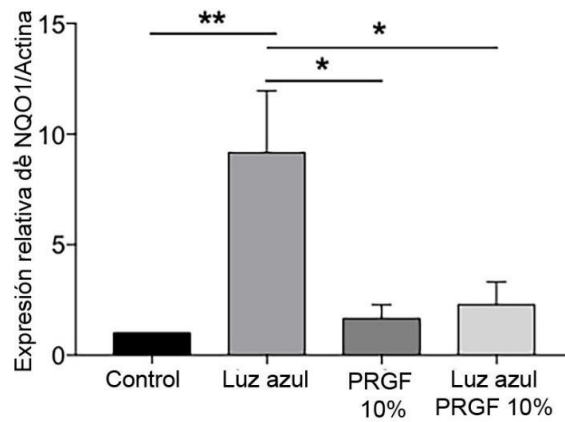


Figura 17. Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de NQO1. Los resultados muestran que la luz aumenta de manera significativa su expresión. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$, ** $p < 0.05$.

Para poder analizar la integridad del EPR, se realizaron dos tinciones por inmunofluorescencia. Por una parte, los resultados obtenidos con el marcador ZO-1 (Figura 18) muestran que las uniones intercelulares se ven deterioradas en presencia de la luz, mientras que los tratamientos con PRGF mostraron resultados similares al control.

También se analizó la expresión del marcador RPE65. Los resultados mostraron (Figura 19) que la luz azul produce agujeros en el RPE, mientras que los tratamientos con PRGF mostraron resultados equivalentes al control.

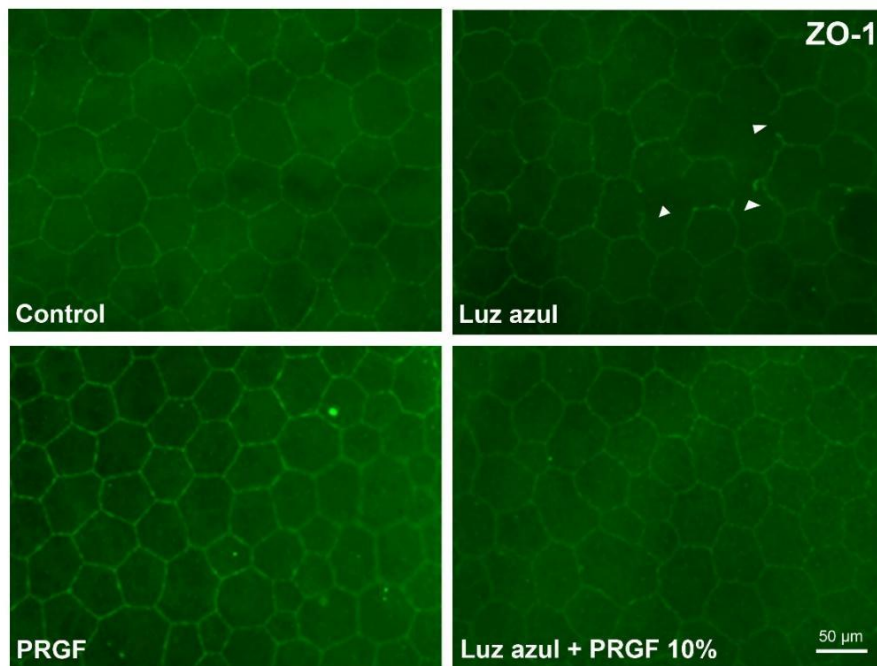


Figura 18. Inmunofluorescencia en RPE de ZO-1 (verde). Los resultados muestran que la luz azul reduce las uniones intercelulares, mientras que el resto de los tratamientos mantienen las uniones intactas. Barra de escala 50 μm.

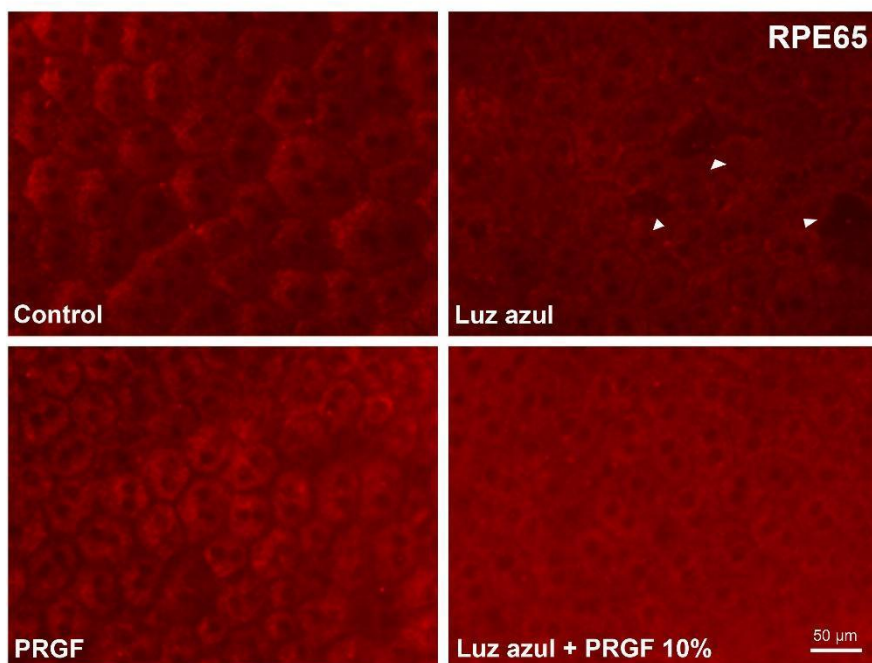


Figura 19. Inmunofluorescencia en RPE de RPE65 (rojo). Los resultados muestran que la luz azul produce agujeros en la capa de RPE, mientras que el resto de los tratamientos mantienen la integridad del epitelio. Barra de escala 50 μm.

Para poder estudiar el efecto a nivel oxidativo de la luz azul, se analizó también la expresión de los marcadores HO-1 y Nrf2. Los resultados obtenidos del análisis de expresión de HO-1 (Figura 20) mostraron que la luz azul aumentó su expresión de manera significativa con respecto al tratamiento de PRGF y luz azul.

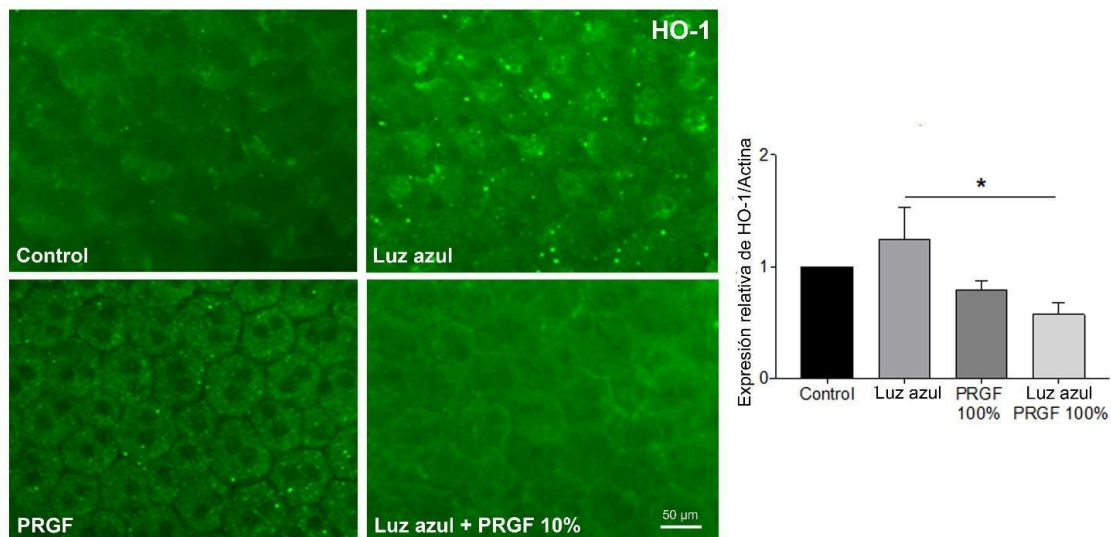


Figura 20. Inmunofluorescencia en RPE de HO-1 (izquierda) y cuantificación de la expresión génica relativa a actina de HO-1 por RT-qPCR (derecha). Los resultados muestran que la expresión de HO-1 aumenta en presencia de luz azul, mientras que los tratamientos con PRGF la reducen. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$. Barra de escala 50 μm .

Los resultados obtenidos del análisis de expresión del marcador Nrf2 (Figura 21) mostraron un patrón similar al de HO-1, ya que la luz azul aumentó su expresión de manera significativa.

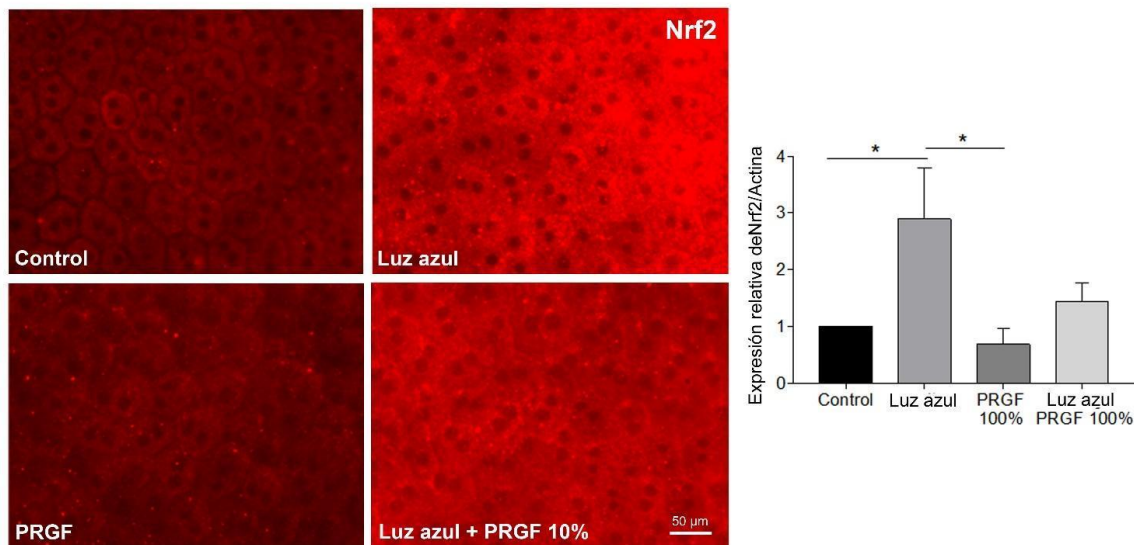


Figura 21. Inmunofluorescencia en RPE de Nrf2 (izquierda) y cuantificación de la expresión génica relativa a actina de Nrf2 por RT-qPCR (derecha). Los resultados muestran que la expresión de este marcador aumenta de manera significativa en presencia de luz azul, mientras que los tratamientos con PRGF mantienen niveles similares al control ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$. Barra de escala 50 μm .

C1.4. Discusión

La DMAE es una de las causas de ceguera con mayor prevalencia en personas de más de 65 años^{13,16,18}. Esta enfermedad afecta directamente al EPR, que es la parte de la retina encargada de proporcionar nutrientes a los fotorreceptores, así como de protegerlos frente a los radicales libres^{19,248,270,271,282}. Las investigaciones de los últimos años han marcado la evidencia de que la luz de longitud de onda corta del espectro del azul puede agravar este tipo de enfermedades. Se ha demostrado que la luz azul aumenta la presencia y/o acumulación de ERO^{217,221,275-278,283-286}. Estas ERO pueden actuar directamente sobre la mitocondria, ya que son capaces de degradar las enzimas responsables de la cadena de transporte de electrones, impidiendo, así, que se produzca ATP en las células y, por lo tanto, desencadenando la muerte celular.

Sin embargo, hay varios trabajos que muestran que el PRGF puede actuar como un agente protector. Algunos autores ponen en evidencia que el PRGF favorece la cicatrización de heridas y actúa como mediador de la inflamación en otro tipo de patologías oculares^{145,189,192,196,205,209,211,280,287-294}. Por eso, durante esta tesis

doctoral, se ha querido analizar el efecto combinado del PRGF con la luz azul, y ver así si este podría actuar como agente neuroprotector ante la fototoxicidad.

Los resultados *in vitro* mostraron que el tratamiento de luz azul redujo la supervivencia celular comparando con el tratamiento control. Sin embargo, cuando la luz se aplicó en combinación con PRGF, la viabilidad celular volvió a alcanzar niveles basales. Además, también se pudo comprobar que el PRGF por sí solo no produjo efecto nocivo en ninguno de los parámetros analizados. En cuanto al estado mitocondrial, se pudo observar que la luz azul redujo el número de mitocondrias funcionales comparado con el tratamiento combinado con PRGF. Asimismo, el resultado obtenido del tratamiento de PRGF muestra que el número de mitocondrias funcionales no se vio reducido ni modificado con respecto al tratamiento control. Los resultados obtenidos con el agente DHE para analizar la presencia de ERO mostraron que la luz azul aumentó significativamente el estrés oxidativo comparando con ambos tratamientos de PRGF. Estos dos experimentos muestran que el PRGF no solo no resulta tóxico para las células a nivel mitocondrial, sino que es capaz de revertir la acción oxidante de la luz azul.

Para estudiar la ruta antioxidante Keap1-Nrf2, se analizó la acción de sus componentes principales. Keap1 actúa como modulador de la expresión de Nrf2, ya que se mantiene unido a él en el citoplasma, con el objetivo de que este permanezca inactivo. Cuando los niveles de ERO aumentan, Keap1 libera a Nrf2, que se transloca al núcleo para activar la expresión de otras moléculas antioxidantes como son GSH, HO-1 y NQO1.

Para poder determinar la acción de la GCL, se cuantificaron los niveles de GSH, ya que es una de las moléculas antioxidantes más importantes presente en las células. Los resultados mostraron que la luz azul redujo los niveles de GSH. Esto podría deberse a que el GSH le cede un protón a las ERO para estabilizarlas, transformándose así en su forma oxidada GSSG. Sin embargo, el PRGF, tanto solo como en combinación con la luz azul, produjo un aumento en los niveles de GSH, incluso superiores a los detectados en las muestras control. Para poder

entender mejor este proceso, también se estudiaron los niveles de expresión tanto génica como proteica de la enzima GCL, que está implicada en el primer paso de la síntesis de GSH. GCL está compuesta por dos subunidades, GCLM (subunidad moduladora) y GCLC (subunidad catalizadora). Los resultados obtenidos por qPCR mostraron que la expresión de ambas subunidades aumentó en presencia de luz azul. Esto concuerda con los resultados obtenidos en la cuantificación de GSH, puesto que la concentración de esta molécula depende directamente de la expresión de ambos genes. Así bien, si observamos el patrón de expresión génica de estos dos genes en presencia de PRGF, tanto solo como combinado con luz azul, podemos observar que se redujo. A nivel de expresión proteica, se puede comprobar que ambos tratamientos con PRGF muestran niveles muy altos de ambas subunidades, especialmente GCLC. Como ocurría con los niveles de GSH, cuanto mayores son los niveles de ERO, mayor es el consumo de estas enzimas. Para finalizar, también se estudió la expresión génica de GSTP1, que modula la donación de compuestos hidrofóbicos y electrolíticos de GSH para proteger a las células frente a las ERO. Los resultados moleculares mostraron que la luz azul aumentó la expresión de esta molécula y que el PRGF lo neutralizó.

Los resultados de la expresión molecular de Keap1 mostraron que la luz azul incrementó su expresión. Sin embargo, el PRGF combinado con el daño no mostró una reducción significativa. La expresión génica de Nrf2 también aumentó en presencia de luz azul y se redujo, aunque tampoco de manera significativa, en el tratamiento combinado con PRGF. Por el contrario, el conjunto de los resultados obtenidos a nivel proteico reveló un aumento y translocación del marcador en presencia de PRGF, sugiriendo que el PRGF tiene la capacidad de estimular esta ruta antioxidante.

Como se ha indicado anteriormente, la HO-1 y NQO1 participan en la regulación del estado oxidativo de las células. Su estudio mostró que, a nivel génico, la expresión de HO-1 aumentó de manera significativa en presencia de luz azul comparando con el tratamiento control. Sin embargo, el PRGF en presencia de luz azul mostró niveles incluso mayores. Esto podría estar relacionado con los altos niveles de la fracción nuclear de Nrf2. A nivel de expresión proteica, la

presencia de HO-1 en el citoplasma aumentó en presencia de luz azul, pero fue aún mayor cuando se combinó con PRGF. La expresión molecular de NQO1 también aumentó de manera significativa en presencia de luz azul, comparado con el tratamiento control. Sin embargo, en este caso, el PRGF, tanto en combinación como de manera individual, no produjo un incremento en la expresión.

Los experimentos realizados *ex vivo* mostraron una respuesta diferente a la observada en el modelo experimental *in vitro*. Los resultados obtenidos en el estudio de ZO1 y RPE65 muestran que la luz azul deteriora el estado general del tejido, produciendo agujeros y discontinuidades entre las células, mientras que el resto de los tratamientos lo mantienen intacto. En el caso de ZO-1, es importante remarcar que las uniones intercelulares son determinantes para analizar el estado del tejido, ya que son las encargadas de favorecer la comunicación celular. Cuando se producen agujeros entre las células, se rompe la comunicación entre ellas, de manera que se favorecen procesos inflamatorios o de muerte celular.

Por otra parte, los resultados obtenidos para los mediadores antioxidantes, HO-1 y Nrf2, mostraron un incremento de su expresión, tanto a nivel génico como a nivel proteico, por la exposición a luz azul, siendo esta revertida con el empleo del PRGF. Algunos autores sugieren que la expresión de HO-1 muestra patrones distintos en función de la especie que se esté estudiando, lo cual podría corresponderse con los resultados observados en este estudio^{45,47,295}. Sin embargo, también se podría considerar que la expresión de HO-1 sigue un patrón de expresión temporal, y que las tres horas de estudio no fueron suficiente para poder observar el patrón de expresión de esta molécula. Esto podría explicar también el patrón de expresión de Nrf2.

El conjunto de los datos recopilados en este estudio indica que la luz azul altera el patrón de expresión en todos los mediadores antioxidantes analizados, como GCL, Keap1, Nrf2, HO-1 o NQO1, tanto en los estudios *in vivo* como en los *ex vivo*. Sin embargo, los resultados también muestran que el PRGF contrarresta el

Capítulo 1

efecto nocivo de la luz de longitud de onda corta, protegiendo a las células frente al estrés oxidativo y actuando como un agente estimulador de los sistemas antioxidantes presentes en ellas.

**Capítulo 2: Vías moleculares de
actuación frente daño celular
en modelos *in vitro***

C2.1. Introducción

La mitocondria es el orgánulo encargado de producir la mayor fuente de energía de la célula. Este proceso de obtención de energía, en forma de ATP, se denomina fosforilación oxidativa, y está dividida en dos fases: la cadena de transporte de electrones, que está formada por cuatro complejos, y la actividad de la ATP-sintasa. Mediante este proceso bioquímico, la célula es capaz de producir 38 moléculas de ATP, frente a las 2 que se producen durante la glucólisis, de manera que es fundamental que esta cadena no sufra ninguna alteración, ya que podría suponer la muerte celular.

Existen diversos factores que pueden alterar la cadena de transporte de electrones. Entre ellos, se encuentra la acumulación de ERO, que produce la disrupción de alguno de los complejos que la componen y, por tanto, interrumpiendo el flujo de electrones para la producción de energía^{25,27,222,264,274,296-299}.

El uso de inhibidores con alta especificidad para los diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones permite estudiar el comportamiento mitocondrial en función del componente alterado permitiendo profundizar en la búsqueda de dianas terapéuticas más específicas.

La azida sódica (NaN_3) es una sal incolora, altamente soluble en agua y muy tóxica. Esta bloquea la cadena de transporte de electrones actuando como inhibidor del complejo IV (citocromo c oxidasa)^{237,239,300-304}. Algunos trabajos de investigación del grupo liderado por el profesor Neville Osborne muestran que actúa activando la producción de ERO y procesos apoptóticos dependientes de caspasas^{228,300,305}. Por otra parte, la rotenona, que es un derivado vegetal, actúa inhibiendo al complejo I (NADH-ubiquinona reductasa). Se ha comprobado que este compuesto reduce la supervivencia celular ya que activa rutas proapoptóticas, además de aumentar la producción de ERO en la célula^{86,227,228,230,306,307}.

Durante esta tesis doctoral, se ha analizado la interacción entre la luz azul y la célula, mostrando que aumenta la presencia de ERO, produce estrés oxidativo, reduce la viabilidad celular o altera su funcionalidad. En cuanto a su intervención directa sobre la cadena de transporte de electrones, algunos autores sugieren que posee una acción combinada sobre todos los complejos^{85,308-315}. Asimismo, parece que activa rutas de muerte celular tanto apoptóticas^{164,316-318} como necroptóticas⁸⁵.

Brevemente, se conoce como apoptosis o muerte celular programa al proceso mediado por unas proteínas denominadas caspasas, que se encargan de degradar componentes dañados, y necroptosis al proceso de muerte celular mediado por unas quinasas, las RIPK, que favorecen la aparición de inflamación y están relacionadas con la degradación vía necroptosoma.

Por todo esto, en este capítulo se estudia la acción oxidante de los agentes azida sódica y rotenona, como se hizo anteriormente con la luz azul, y cómo el PRGF puede neutralizar sus efectos. También se lleva a cabo un análisis breve de la acción de los tres agentes en procesos de muerte celular.

C2.2. Diseño experimental

Para poder llevar a cabo el estudio del posible efecto protector PRGF tras un daño producido por luz azul, rotenona y azida sódica, se realizaron diversos experimentos *in vitro* en la línea celular ARPE-19.

Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos o en frascos T75, a una concentración aproximada de 10×10^4 células/ml en medio DMEM-F12 suplementado con 2% de antibiótico penicilina/estreptomicina y SBF al 10%, en condiciones controladas (5% CO₂ a 37°C). Después de su asentamiento, aproximadamente 24 horas tras la siembra en las placas de 96 pocillos o 72 horas en el caso de los frascos T75, las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos (Tabla 8, Tabla 9, Tabla 10).

Tratamiento	Medio	Oscuridad/Luz azul
Control	DMEM F12 + SBF 1%	Oscuridad 19 h
Luz azul	DMEM F12 + SBF 1%	Oscuridad 1h/Luz azul 18h
PRGF	DMEM F12 + PRGF 10%	Oscuridad 19 h
Luz azul + PRGF	DMEM F12 + PRGF 10%	Oscuridad 1h/Luz azul 18h

Tabla 8. Tratamientos de luz para experimento *in vitro* en ARPE-19

Tratamiento	Medio
Control	DMEM F12 + SBF 1% 19 h
Rotenona 1 μ M	DMEM F12 + SBF 1% 1h + Rotenona 1 μ M 18 h
PRGF	DMEM F12 + PRGF 10% 19 h
Rotenona 1 μ M + PRGF	DMEM F12 + PRGF 10% 1h + Rotenona 1 μ M 18 h

Tabla 9. Tratamientos de rotenona para experimento *in vitro* en ARPE-19

Tratamiento	Medio
Control	DMEM F12 + SBF 1% 19 h
Azida sódica 5 mM	DMEM F12 + SBF 1% 1h + Azida sódica 5 mM 18 h
PRGF	DMEM F12 + PRGF 10% 19 h
Azida sódica 5 mM + PRGF	DMEM F12 + PRGF 10% 1h + Azida sódica 5 mM 18 h

Tabla 10. Tratamientos de azida sódica para experimento *in vitro* en ARPE-19

Para los estudios *in vitro* con luz, se utilizó una intensidad de luz de 18 W/m² (aproximadamente 400 lux), puesto que corresponde con la intensidad media a la que la población puede estar expuesta.

Una vez tratadas las células con su correspondiente tratamiento, se procedió a estudiar los diferentes parámetros.

- Viabilidad celular: Para analizar el efecto tanto del PRGF con cada uno de los agentes nocivos sobre la viabilidad celular, se llevó a cabo el ensayo de viabilidad por MTT, previamente descrito (n=24).
- Estado mitocondrial y presencia de ERO: También se estudió el efecto del PRGF y los agentes nocivos sobre el estado mitocondrial utilizando el marcador JC-1 (n=8), así como la presencia o ausencia de ERO, con ayuda del marcador DHE (n=8).
- TUNEL: se llevó a cabo un ensayo TUNEL para el estudio de células apoptóticas siguiendo el protocolo descrito anteriormente.

- **Expresión génica:** El estudio de la expresión génica de los marcadores (Tabla 4) se realizó mediante RT-qPCR de dos pasos (n=4). Para la extracción del ARN se utilizó el kit Illustra RNAspin Mini kit de GE Healthcare. Después, el ARN fue transcrito a ADNc con ayuda del kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems). Por último, se procedió a la amplificación génica mediante qPCR.

Gen	ID	Forward	Reverse
Actina	NM_001101.4	5'-ATCCAAATATGAGATGCGTTGTT-3'	5'-GTGGACTTGGGAGAGGACTG-3'
TNFR1	NM_001065.4	5'-CCCCTGGTCATTTTCTTTG-3'	5'-ATTTCACAAACAATGGAG-3'
RIPK1	NM_001317061.3	5'-TGATAATACCACTAGCTGACG-3'	5'-ACAGTTTTCCAGTGCTTTC-3'

Tabla 11. Listado de oligonucleótidos utilizados en línea celular ARPE-19 para RT-qPCR

- **Ensayos inmunocitoquímicos:** para poder realizar un estudio más completo, se realizaron tinciones de inmunofluorescencia de los siguientes marcadores (Tabla 12). A continuación, se tomaron las imágenes con ayuda de un microscopio óptico (n=16).

Anticuerpo	Referencia (RRID)	Especie	Dilución	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
HO-1	Enzo Life Sciences Cat# ADI-SPA-894	Conejo	1:200	Enzo LS, Farmingdale, NY, USA
ZO-1	Thermo Fisher Scientific Cat# 61-7300, RRID:AB_2533938	Conejo	1:100	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
RIPK3	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-135171, RRID:AB_10611187	Conejo	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Caspasa 8	Millipore Cat# MAB10754, RRID:AB_10807850	Conejo	1:100	Millipore, Burlington, MA, USA
Caspasa 3	Abcam Cat# ab13847, RRID:AB_443014	Conejo	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Caspasa 7	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-28295, RRID:AB_673487	Ratón	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Anticuerpos secundarios				
Anti-conejo Alexa Fluor 488	Catalog # A32814 Thermo Fisher Scientific Cat# A32814, RRID:AB_2762838	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-conejo Alexa Fluor 594	Catalog # A32742 Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-ratón Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA

Tabla 12. Listado de anticuerpos usados en ARPE-19 para tinción por inmunofluorescencia

C2.3. Resultados

Primero, se realizó un análisis de la viabilidad celular para determinar la acción de la azida sódica y la rotenona en la supervivencia. Al igual que en los resultados presentados en el capítulo 1 sobre la luz azul, las concentraciones de cada uno de los agentes fueron seleccionadas para alcanzar un daño aproximado del 20% (Figura 22). En el caso de la combinación de azida sódica con PRGF 10%, no se observó una mejoría de la viabilidad celular. Sin embargo, combinado con la rotenona se alcanzó una concentración próxima a valores control.

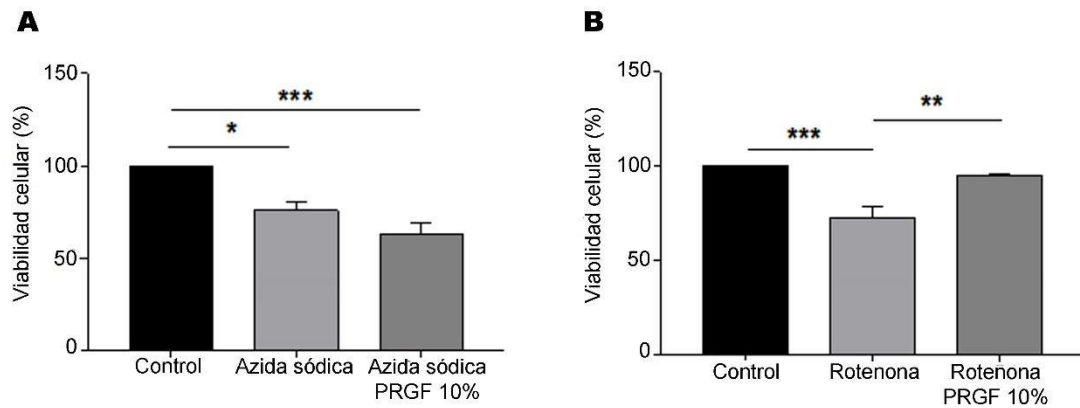


Figura 22. Ensayo de viabilidad (MTT) en ARPE-19. (A) MTT en ARPE-19 tratadas con azida sódica 5 mM (n=24). Los resultados muestran que la concentración de 5mM de azida sódica produce alrededor del 20% de muerte celular. El PRGF combinado con azida sódica no recupera la viabilidad celular. (B) MTT en ARPE-19 tratadas con rotenona 1 μ M (n=24). El tratamiento con rotenona produce aproximadamente una disminución del 20% de la supervivencia celular. El tratamiento combinado de PRGF y rotenona recupera la viabilidad celular a valores próximos al control. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$ ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$.

A continuación, se llevó a cabo un análisis del estado mitocondrial utilizando el marcador JC-1. Los resultados mostraron (Figura 23) que la azida sódica combinada con PRGF no produjo una mejoría en el potencial de membrana mitocondrial, mientras que el tratamiento combinado con rotenona recuperó la actividad mitocondrial a valores próximos al control.

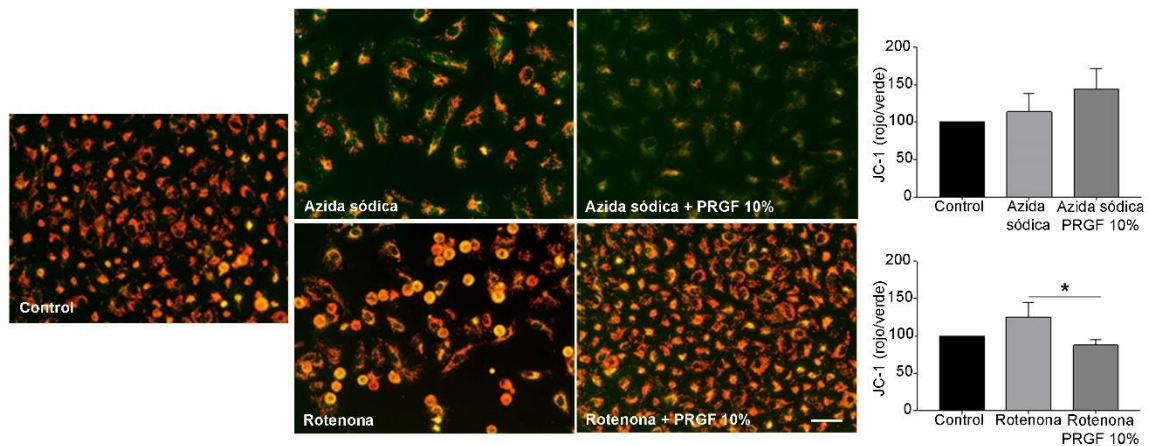


Figura 23.. Cuantificación de la actividad mitocondrial de ARPE-19 determinado por el marcador JC-1. Los resultados mostraron que la azida sódica reduce la actividad mitocondrial comparado con el control. Sin embargo, el tratamiento combinado con PRGF no recupera los niveles normales. La rotenona también reduce la actividad mitocondrial, pero el tratamiento con PRGF recupera valores próximos a los del control. (n=8). ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$. Barra de escala 50 μ m.

Por otro lado, al realizar el estudio de la producción de ERO con ayuda del marcador DHE (Figura 24), se pudo comprobar que ambos agentes combinados con PRGF mostraron valores de ERO próximos a los obtenidos con el tratamiento control.

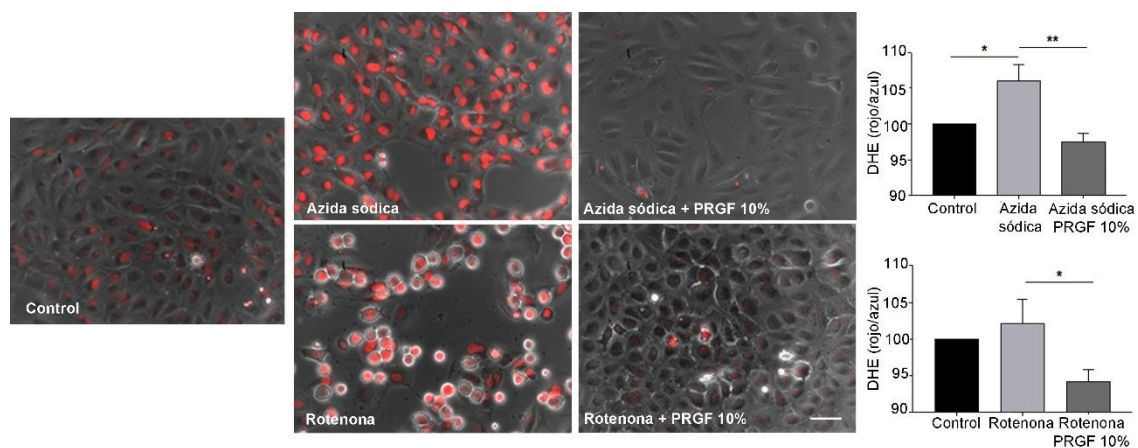


Figura 24. Presencia de ERO en cultivos de ARPE-19 determinado por el marcador DHE. La azida sódica aumentó la presencia de ERO, que se vio reducida de manera significativa cuando se combinó con PRGF. La rotenona también mostró un aumento en la producción de ERO y, al igual que la azida sódica, se redujo en presencia de PRGF (n=8). ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. Barra de escala 50 μm .

Los resultados obtenidos con el marcador antioxidante HO-1 (Figura 25) mostraron que ambos agentes produjeron un ligero aumento, mientras que la combinación con PRGF, al igual que ocurrió con la luz azul, aumenta su expresión todavía más.

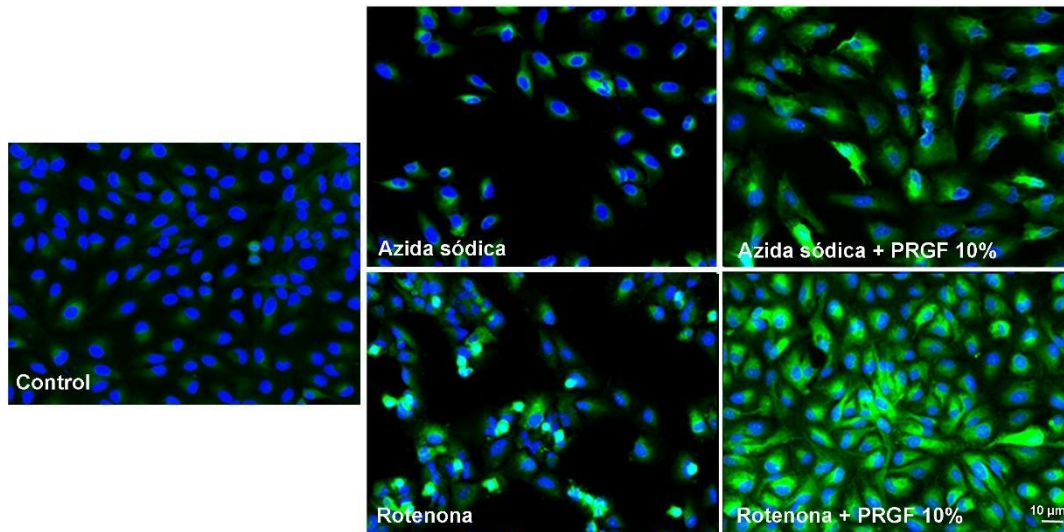


Figura 25. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores HO-1 (verde) y DAPI (azul). La expresión de HO-1 aumentó en presencia tanto de azida sódica como de rotenona. Sin embargo, aumentó aún más en presencia del PRGF. Barra de escala 10 µm.

También se llevó a cabo un análisis del marcador ZO-1 (Figura 26). En este caso, se pudo comprobar que tanto la azida sódica como la rotenona redujeron su expresión, mientras que la combinación de ambos con PRGF mostró una recuperación de esta. Al igual que ocurrió con la luz azul, la expresión de este marcador aumentó de manera significativa en el núcleo. En cuanto a la expresión del marcador RPE65, se pudo observar una disminución de su marcaje en presencia de ambos agentes y una recuperación en presencia de PRGF (Figura 27).

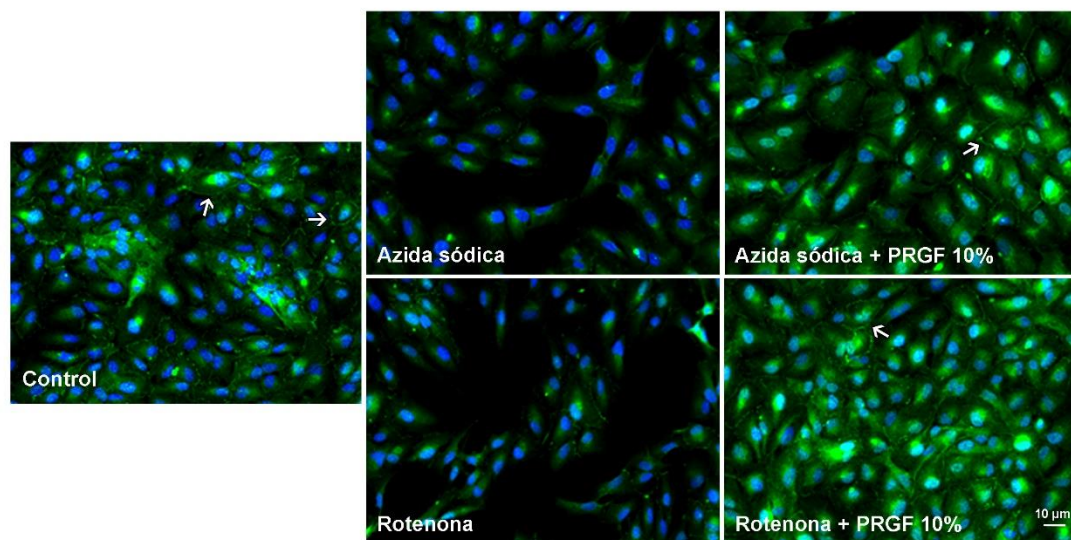


Figura 26. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores ZO-1 (verde) y DAPI (azul). La expresión de ZO-1 se redujo en presencia tanto de azida sódica como de rotenona. Sin embargo, se recuperó en presencia del PRGF. Las flechas blancas señalan las uniones intercelulares. Barra de escala 10 µm.

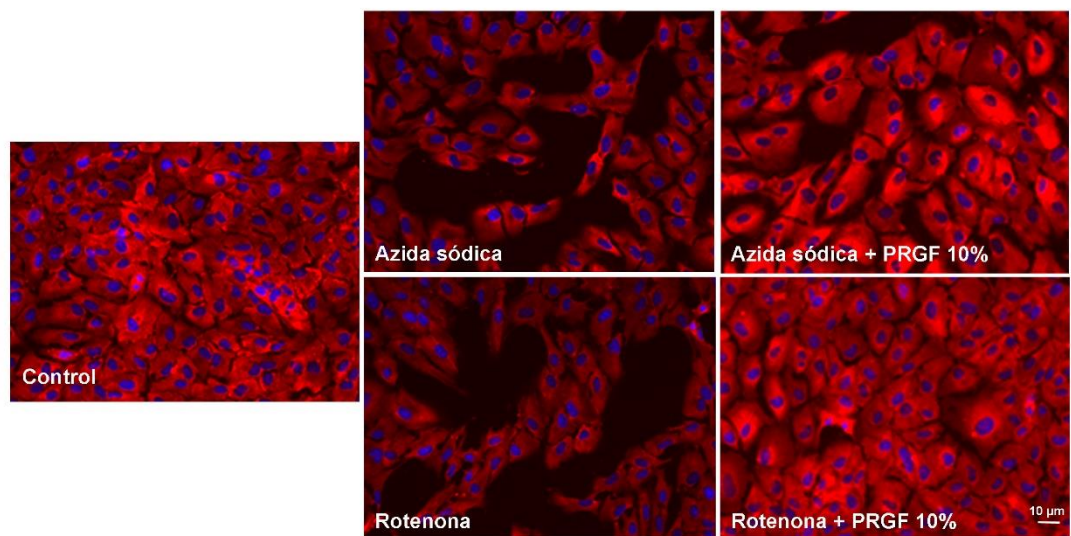


Figura 27. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores RPE65 (rojo) y DAPI (azul). La expresión de RPE65 se redujo en presencia tanto de azida sódica como de rotenona. Sin embargo, se recuperó en presencia del PRGF. Barra de escala 10 µm.

También se analizó un marcador de apoptosis (TUNEL). Los resultados mostraron (Figura 28) que los tres agentes sufrieron un aumento en el número de células positivas (rojas). El número de células positivas se vio reducido de

manera mucho más clara en los tratamientos combinados de luz azul y rotenona con PRGF.

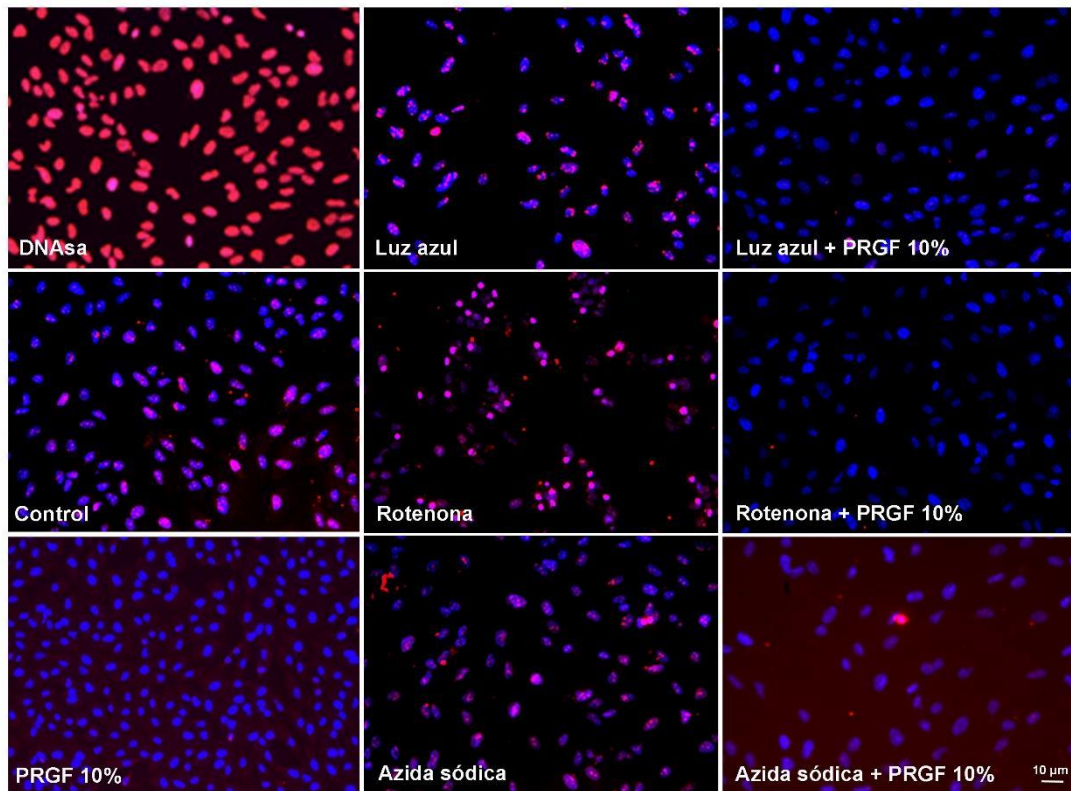


Figura 28. TUNEL en ARPE-19. Los resultados mostraron que todos los tratamientos de daño (luz azul, azida sódica y rotenona) aumentaron el número de células positivas. El tratamiento con PRGF redujo el número de células positivas cuando se combinó con luz azul y rotenona, no tanto en presencia de azida sódica. Imagen superior derecha (DNAsa): control positivo de la técnica empleada. Barra de escala 10 µm.

El análisis de expresión génica de TNFR1 (Figura 29) mostró un aumento en los tratamientos con luz azul y azida sódica. Además, ambos agentes mostraron una reducción en la expresión en el tratamiento combinado con PRGF, con valores próximos al control, a diferencia de la rotenona que mostró un aumento significativo.

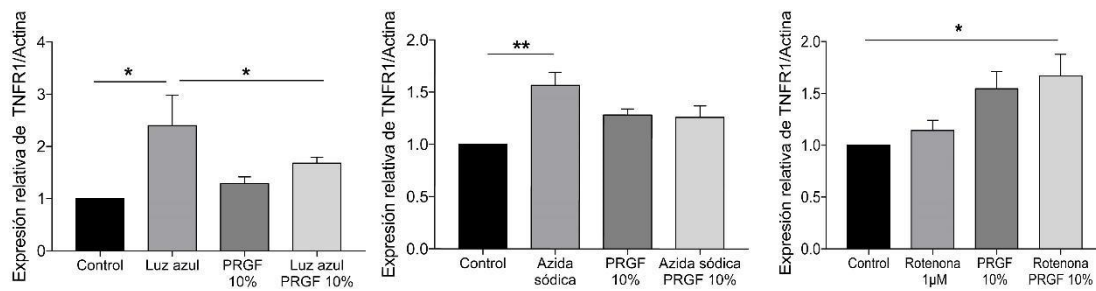


Figura 29. Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de TNFR1 (n=4). Los resultados mostraron que tanto la luz azul como la rotenona producen un aumento significativo de la expresión de este marcador, y que la combinación de ambos con el PRGF mantuvo niveles próximos al control. En el caso de la rotenona, observamos un aumento en la expresión en el tratamiento combinado con PRGF. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

El análisis de la expresión génica de RIPK1 (Figura 30) mostró que tanto la luz azul como la rotenona produjeron un aumento en la expresión, que fue disminuida en la combinación de ambos con PRGF. Sin embargo, la azida sódica mostró una expresión por debajo del valor de control, que se vio también reducida en presencia de PRGF.

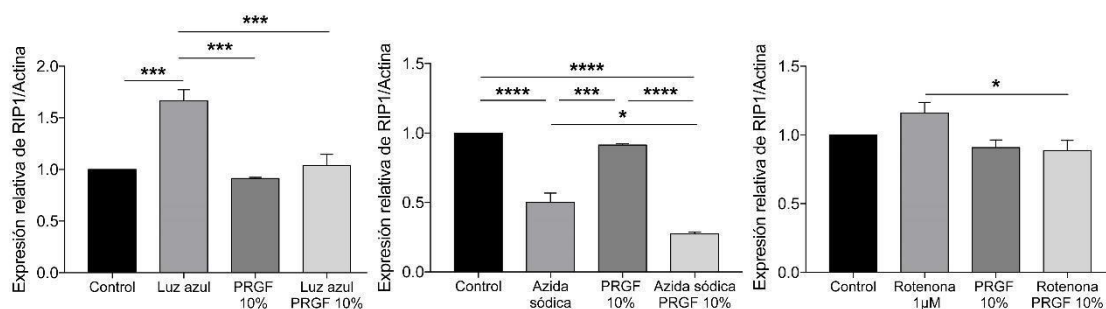


Figura 30. Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de RIPK1 (n=4). Los resultados mostraron que la luz y la rotenona mostraron una reducción significativa de su expresión en presencia de PRGF. El resultado de azida sódica mostró una reducción en la expresión de este marcador, tanto solo como combinado con PRGF. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

Además, el marcador RIPK3 mostró un aumento de su expresión en presencia de luz azul en el estudio llevado a cabo mediante inmunofluorescencia (Figura 31),

que se redujo en el tratamiento combinado con PRGF. Ni la azida sódica ni la rotenona mostraron una expresión elevada para este marcador.

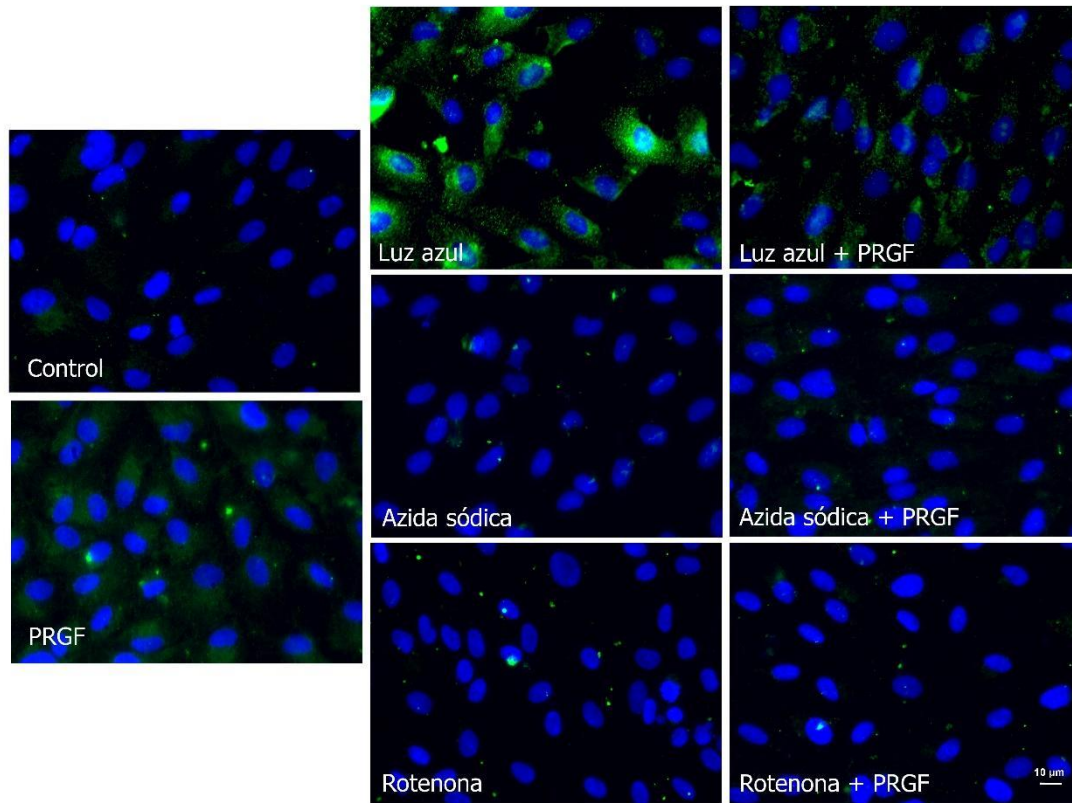


Figura 31. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores RIPK3 (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron un aumento en la expresión de este marcador en el tratamiento Barra de escala 10 µm.

Para el análisis de la ruta apoptótica, se llevó a cabo el estudio de las caspasas 8 y 7.

La caspasa 8 mostró un aumento en su expresión en presencia de rotenona (Figura 32). Este marcador hace de puente entre ambas rutas, la apoptótica y la necroptótica, ya que inhibe la acción de la RIPK1 para favorecer la ruta de apoptosis.

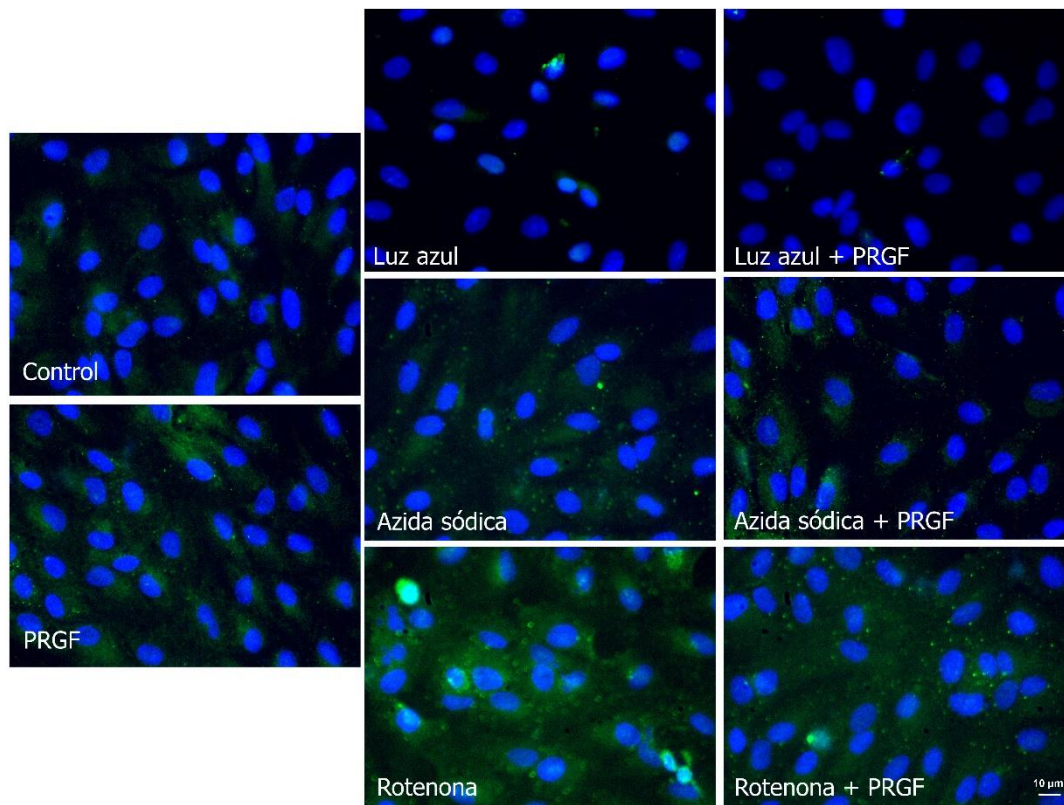


Figura 32. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores Caspasa 8 (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron un aumento en la expresión de este marcador en presencia de rotenona. La presencia de PRGF en combinación con la rotenona redujo ligeramente el marcaje. Tanto la luz azul como la azida sódica no mostraron diferencias comparado con el control. Barra de escala 10 µm.

Los resultados obtenidos del análisis de expresión de caspasa 3 (Figura 33) mostraron que la luz azul aumentó de manera significativa el marcaje de esta molécula, especialmente en el núcleo, que se vio reducido en presencia de PRGF incluso por debajo de niveles control.

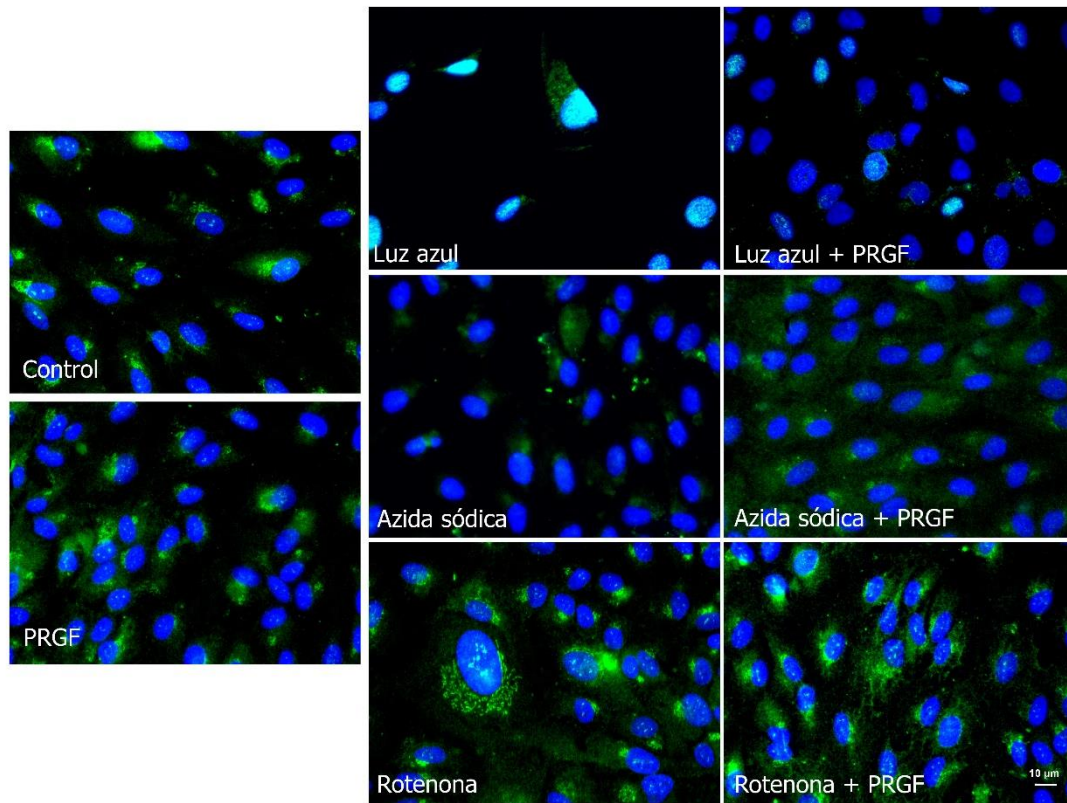


Figura 33. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores Caspasa 3 (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron un aumento en la expresión de este marcador en presencia de rotenona y de luz azul. La presencia de PRGF en combinación ambos agentes, especialmente con luz azul, redujo la expresión de este marcador. Barra de escala 10 µm.

La caspasa 7 mostró una expresión proteica mayor en presencia de azida sódica y rotenona (Figura 34). La combinación con PRGF redujo ligeramente la expresión, especialmente en el caso de la azida sódica.

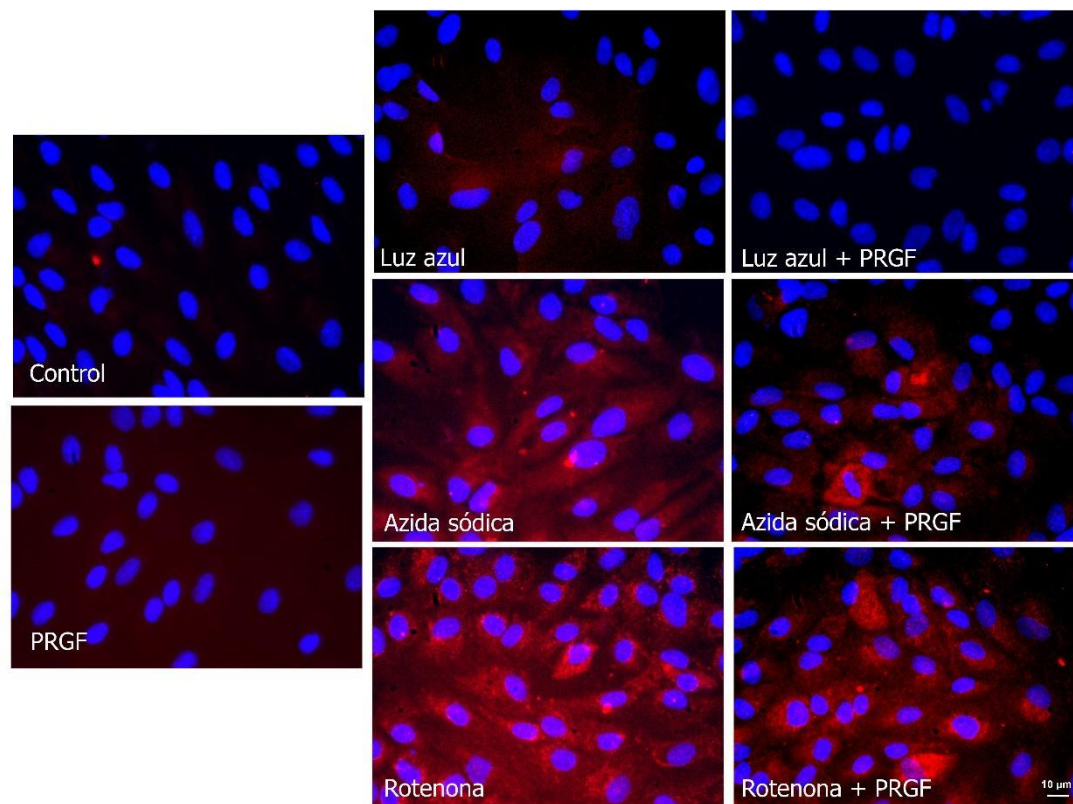


Figura 34. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores Caspasa 7 (rojo) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron un aumento en la expresión de este marcador en los tratamientos con azida sódica y rotenona. En ambos casos el tratamiento combinado con PRGF redujo ligeramente el marcaje. Barra de escala 10 μm .

C2.4. Discusión

La mitocondria es uno de los orgánulos más importantes de la célula debido a su implicación directa en la producción de energía.

La azida sódica es un compuesto que inactiva de manera selectiva el complejo de IV de la cadena de transporte de electrones, mientras que la rotenona inactiva el complejo I. Por otro lado, la acción de la luz azul todavía no está dilucidada, aunque parece que inactiva de manera combinada varios de los complejos.

Puesto que en el primer capítulo de esta tesis doctoral se analizó la acción antioxidante del PRGF tras un daño producido por luz azul, y dada la importancia de la mitocondria en el estrés oxidativo, en este capítulo se procedió a analizar la acción de la azida sódica y la rotenona, por ser conocida su acción

inhibitoria a nivel de los complejos mitocondriales, así como su interacción con el PRGF, y la acción combinada de los tres agentes con el PRGF en rutas de muerte celular.

Primero, se estudió la viabilidad celular en la línea ARPE-19 después de la acción de la azida sódica y la rotenona en combinación con el PRGF. Los resultados mostraron que el PRGF solo fue capaz de revertir el efecto de la rotenona.

A nivel mitocondrial, el tratamiento con rotenona produjo una reducción significativa de la actividad, mientras que el tratamiento combinado con PRGF recuperó los valores próximos al control. El tratamiento con azida sódica no mostró diferencias significativas en cuanto a la pérdida de funcionalidad. Sin embargo, en cuanto a la producción de ERO, ambos agentes mostraron un aumento significativo en la producción de estrés oxidativo, que fue reducido en presencia de PRGF. El empleo del marcador relacionado con estrés oxidativo, HO-1, mostró un aumento en presencia de ambos agentes y, al igual que ocurría en presencia de luz azul, su expresión se incrementó todavía más en combinación con PRGF.

Este resultado puede sugerir que el PRGF, al igual que ocurrió con la luz azul, estimula los mecanismos antioxidantes, para favorecer la recuperación celular frente al estrés oxidativo.

También se analizó el marcador ZO-1, que estudia las uniones intercelulares. Ambos tratamientos mostraron una reducción en este marcador, que se vio revertida en presencia del PRGF. Aunque ZO-1 no es considerado un marcador de proliferación, en la literatura se ha descrito que su expresión en el núcleo podría estar relacionada con el estado proliferativo de la célula que lo expresa, principalmente cuando no hay contacto con las células adyacentes. Al igual que ocurrió con la luz azul, el marcaje de esta proteína aumenta en la zona nuclear, sugiriendo un aumento en la proliferación celular cuando existe tratamiento con PRGF.

En lo relativo a la muerte celular se analizó la presencia de apoptosis mediante TUNEL. El TUNEL mostró un aumento de apoptosis en todos los tratamientos, que fue revertido por PRGF en presencia de rotenona y luz azul.

TNF α es una citoquina expresada por macrófagos y monocitos como respuesta a un daño. Cuando se produce su liberación, se aumenta la producción de su principal receptor de membrana, TNFR1. Esta unión puede desencadenar diferentes respuestas celulares^{80,96,105,127,319-322}.

Por una parte, se puede activar la ruta necroptótica, que estará desencadenada por la fosforilación de RIPK1, que a su vez fosforilará a RIPK3. Esta última también fosforilará a MLKL, lo cual es esencial para desencadenar la necroptosis mediada por TNF α ^{126,128,305,323-326}. Los resultados obtenidos mostraron que la luz azul y la azida sódica aumentaron de manera significativa la expresión de TNFR1. En el caso de la luz azul, el tratamiento combinado con PRGF redujo de manera significativa su expresión génica.

La expresión de RIPK1 y RIPK3 se vio exacerbada en presencia de luz azul y reducida en el tratamiento combinado con PRGF. Sin embargo, tanto la azida sódica como la rotenona mostraron valores bajos para ambas quinasas.

En cuanto a la caspasa 8, que es un marcador que inhibe la ruta necroptótica^{79,93,327}, se pudo observar que la rotenona mostró un aumento en su expresión^{79,93,327}. Esto sugiere que este agente favorece la ruta apoptótica frente a la necroptótica. El tratamiento combinado con PRGF mostró valores menores que en el tratamiento del agente nocivo de manera individual.

En cuanto a la caspasa 3, la luz azul fue el único tratamiento que mostró un aumento de expresión algo significativo con respecto al control, que fue reducido en presencia del PRGF. Este marcador, aunque es sintetizado y activado en el citoplasma celular, lleva a cabo su función en el núcleo, por lo que su translocación sugiere que solo este tratamiento estimula su activación^{92,96,230}. El tratamiento con rotenona también mostró activación, aunque no se puede determinar de forma clara si es mayor o igual al tratamiento control. La caspasa

7 mostró un aumento en la expresión para los tratamientos de azida sódica y rotenona, que fueron ligeramente reducidos en presencia de PRGF.

El análisis de los resultados obtenidos en este apartado de la investigación, y basándose en la literatura, podría confirmar que la rotenona y la azida sódica, al igual que lo observado en el primer capítulo con la luz azul, aumentan el estrés oxidativo presente en la célula, y que el PRGF, especialmente en presencia de la luz azul y la rotenona, tiene la capacidad de protegerlas. El hecho de la reducida acción del PRGF frente al daño por azida sódica podría sugerir que su acción podría estar dirigida a los complejos I, II y III de la cadena de transporte de electrones, ya que no se observan diferencias en los tratamientos de azida sódica.

Los resultados relativos a la estimulación de la necroptosis por acción de la luz azul y de la apoptosis por exposición a la rotenona y la azida sódica parecen ir en consonancia con lo descrito por otros autores. El PRGF, en este caso, redujo la expresión de los marcadores, sugiriendo, por tanto, que podría ser de utilidad como tratamiento frente a diversos mecanismos de muerte celular. No obstante, estos resultados deben ser considerados como preliminares, siendo necesarios estudios más en profundidad.

**Capítulo 3: Estimulación de la
autofagia por PRGF en modelo
in vitro de fototoxicidad por luz
azul**

C3.1. Introducción

La autofagia es uno de los procesos biológicos más conservados en eucariotas, mediante el cual las células eliminan componentes celulares que han sido dañados o degradados. Se puede dividir en tres tipos. La macroautofagia (referida como autofagia en adelante), microautofagia y autofagia mediada por chaperonas. La autofagia es un proceso catabólico que activa la degradación de componentes celulares dañados vía lisosomas mediante la formación de autofagosomas. Este mecanismo se activa después de la exposición de las células a diferentes daños, como son el estrés oxidativo o la inflamación, aunque también después de periodos de ayuno, y es una vía de renovación y protección muy útil para las células^{69,71,77,130,328}.

Como se ha mencionado anteriormente, la luz azul (400-500 nm) puede producir daños oxidativos en las células, pero además también puede actuar como un agente proinflamatorio. Con el objetivo de mitigar su efecto dañino, tras la exposición a la luz azul, las células pueden inducir la expresión de marcadores que inician rutas antioxidantes y antiinflamatorias, como el NF- κ B. NF- κ B es un factor transcripcional que promueve su expresión en presencia de ERO, seguido por la activación de las rutas de la autofagia y la proinflamatoria^{103,106,329-331}. La ruta de la autofagia está precedida por la activación de la proteína p62 (p62/sqstm1), que promueve la renovación de proteínas poliubiquitinizadas hacia el proteasoma, regula la actividad de rutas antioxidantes mediante la unión a Keap1 y modula la liberación de Nrf2 desde el citoplasma hasta el núcleo^{40,71,76,77,108,109,111,112}. De este modo, Nrf2 activa la expresión de genes antioxidantes como HO-1 y también interactúa con LC3. También existen las proteínas Atg, que controlan el proceso de activación de autofagia uniéndose entre ellas y con otras moléculas para activar la formación del fagóforo. Por ejemplo, la expresión de la forma citosólica del LC3, LC3I, está estimulada por Atg4 y Atg7. A esto le sigue la unión de LC3I con la fosfatidiletanolamina (PE) inducida por Atg3, transformando el LC3I en su forma lipídica, LC3II^{59,70,114-117,122,332,333}. A continuación, LC3II es activada por el complejo formado por Atg5-

Atg12-Atg16 que se une al fagóforo para su elongación, y permanecen unidos hasta que el autofagosoma se fusiona con el lisosoma. La porción de LC3II que permanece en la cara citoplasmática de la membrana del autofagosoma se deslipida por la acción de Atg4 y se recicla, mientras que la porción de LC3II que queda en la cara interna será degradada junto al fagolisosoma una vez se produzca su fusión. Muchos investigadores consideran, por tanto, al LC3 como un buen marcador de autofagia, puesto que está presente desde las fases iniciales de formación del fagóforo. También existe una ruta alternativa al LC3 que está mediada por la unión entre Atg5 y Atg7^{59,68,119,120,122,328,334}.

Asimismo, la expresión de NF- κ B estimula la separación entre la proteína Bcl-2, que actúa como inhibidor de la autofagia, de Beclin1, que también participa en la formación del autofagosoma^{77,119,124,259,334}.

Por otra parte, NF- κ B también modula la respuesta proinflamatoria. Cuando se produce su activación, se estimula la formación del inflamasoma mediante la expresión de citoquinas como la IL1 β o la IL18. Sin embargo, la acción combinada de NF- κ B con p62 también regulan la expresión del inflamasoma, controlando su activación e inhibición^{13,69,103,131,330}. Por ejemplo, durante la autofagia se estimula la expresión de IL1 β , sin embargo, se inhibe la expresión de IL18^{130,335,336}.

Por ello, este estudio analiza cómo la luz azul y el estrés oxidativo que esta produce puede modular las rutas autofágicas y proinflamatorias, además de estudiar la posible acción del PRGF en estos procesos.

C3.2. Diseño experimental

Los estudios *in vitro* se llevaron a cabo sobre la línea celular ARPE-19. Las células fueron sembradas en placas de 96 pocillos o en frascos T75, a una concentración aproximada de 10x10⁴ células/ml en medio DMEM-F12 suplementado con 2% de antibiótico penicilina/estreptomicina y SBF al 10%, en condiciones controladas (5% CO₂ a 37°C). Después de su asentamiento, aproximadamente 24 horas tras la siembra en las placas de 96 pocillos o 72 horas en el caso de los frascos T75, las células fueron expuestas a los siguientes tratamientos (Tabla 13).

Tratamiento	Medio	Oscuridad/Luz azul
Control	DMEM F12 + SBF 1%	Oscuridad 19 h
Luz azul	DMEM F12 + SBF 1%	Oscuridad 1h/Luz azul 18h
PRGF	DMEM F12 + PRGF 10%	Oscuridad 19 h
Luz azul + PRGF	DMEM F12 + PRGF 10%	Oscuridad 1h/Luz azul 18h

Tabla 13. Tratamientos para experimento *in vitro* en ARPE-19

Para los estudios *in vitro*, se utilizó una intensidad de luz de 18 W/m² (aproximadamente 400 lux), puesto que corresponde con la intensidad media estimada a la que la población está expuesta.

Una vez tratadas las células con su correspondiente tratamiento, se procedió a estudiar los diferentes parámetros.

- Expresión génica: El estudio de la expresión génica de los marcadores (Tabla 14) se realizó mediante RT-qPCR de dos pasos (n=4). Para la extracción del ARN se utilizó el kit Illustra RNAspin Mini kit de GE Healthcare. Después, el ARN fue transcrito a ADNc con ayuda del kit High Capacity RNA-to-cDNA (Applied Biosystems). Por último, se procedió a la amplificación génica mediante qPCR.

Gen	ID	Forward	Reverse
Actina	NM_001101.4	5'-ATTCCAAATATGAGATGCGTTGTT-3'	5'-GTGGACTTGGGAGAGGACTG-3'
NF-κB	NM_001165412.2	5'-CAGATGGCCCATACCTTCAAAT-3'	5'-CGGAAACGAAATCCTCTCTGTT-3'
p62	NM_001142298.2	5'-TGTGAATTCCTGAAGAACG-3'	5'-TCGATATCAACTTCAATGCC-3'
ATG5	NM_001286106.2	5'-CCCTCTGGGGTACATGTCT-3'	5'-CGTCCAAACCACACATCTCG-3'
LC3	NM_032514.4	5'-GTTGGTCAAGATCATCCG-3	5'-TTTCTCCTGCTCGTAGATG-3
Beclin1	NM_001313998.2	5'-CAGTATCAGAGAGAATACAGTG-3'	5'-TGGAAGGTTGCATTAAGAC-3'
IL1β	NM_000576.3	5'-GGCTGCTCTGGATTCTCT-3'	5'-ATTTCACTGGCGAGCTCAGG-3'
IL18	NM_001243211.2	5'-TGCAGTCTACACAGCTTCGG-3'	5'-GTTTGTTCGAGAGGAAGCG-3'

Tabla 14. Listado de oligonucleótidos utilizados en línea celular ARPE-19 para RT-qPCR

- Expresión proteica: el estudio de la expresión proteica se llevó a cabo mediante WB. Las membranas fueron analizadas mediante inmunodetección de los siguientes anticuerpos (Tabla 15).

Anticuerpo	Referencia (RRID)	Especie	Dilución	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
Actina	Millipore Cat# MAB1501, RRID:AB_2223041	Ratón	1:4000	Millipore, Burlington, MA, USA
NF-kB	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-109, RRID:AB_632039	Conejo	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
p62	Abcam Cat# ab56416, RRID:AB_945626	Ratón	1:500	Abcam, Cambridge, UK
ATG5	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc- 133158, RRID:AB_2243288	Ratón	1:500	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
LC3	Abcam Cat# ab192890, RRID:AB_2827794	Conejo	1:2000	Abcam, Cambridge, UK
Beclin1	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc- 48341, RRID:AB_626745	Ratón	1:1500	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
IL1β	Abcam Cat# ab9722, RRID:AB_308765	Conejo	1:100	Abcam, Cambridge, UK
IL18	Abcam Cat# ab191152, RRID:AB_2737346	Conejo	1:250	Abcam, Cambridge, UK
Anticuerpos secundarios				
Anti-ratón	Vector Laboratories Cat# BA-9200, RRID:AB_2336171	Cabra	1:300	Vector labs, Burlingame, CA, USA
Anti- conejo	Vector Laboratories Cat# BA-1000, RRID:AB_2313606	Cabra	1:300	Vector labs, Burlingame, CA, USA

Tabla 15. Listado de anticuerpos utilizados en la línea celular ARPE-19 para WB.

- **Inmunofluorescencia:** Para evaluar el estado celular de la retina, se realizó una inmunofluorescencia para los siguientes anticuerpos (Tabla 16).

Anticuerpo	Referencia (RRID)	Especie	Dilución	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
NF-κB	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-109, RRID:AB_632039	Conejo	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
p62	Abcam Cat# ab56416, RRID:AB_945626	Ratón	1:100	Abcam, Cambridge, UK
LC3	Abcam Cat# ab192890, RRID:AB_2827794	Conejo	1:100	Abcam, Cambridge, UK
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-7382, RRID:AB_626736	Mouse	1:100	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Anticuerpos secundarios				
Anti-conejo Alexa Fluor 488	Catalog # A32814 Thermo Fisher Scientific Cat# A32814, RRID:AB_2762838	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-conejo Alexa Fluor 594	Catalog # A32742 Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-ratón Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA

Tabla 16. Listado de anticuerpos utilizados en la línea celular ARPE19 para inmunofluorescencia.

C3.3. Resultados

Los resultados obtenidos en el estudio de la expresión de NF-κB mostraron que la luz azul aumenta de manera significativa la expresión génica de este marcador (Figura 35). Sin embargo, cuando analizamos los resultados obtenidos mediante WB, no se observan diferencias entre los tratamientos. Esto puede ser debido a que, cuando se activa, este factor de transcripción se transloca al núcleo. Para analizar este resultado, se realizó una tinción por inmunofluorescencia. Los resultados mostraron (Figura 36) que, efectivamente, la luz azul incrementa la expresión nuclear/perinuclear de este marcador, mientras que en el resto de los tratamientos permanece en el citosol de manera más difusa. Es llamativo que el tratamiento con PRGF produce un marcaje punteado en la zona citoplasmática.

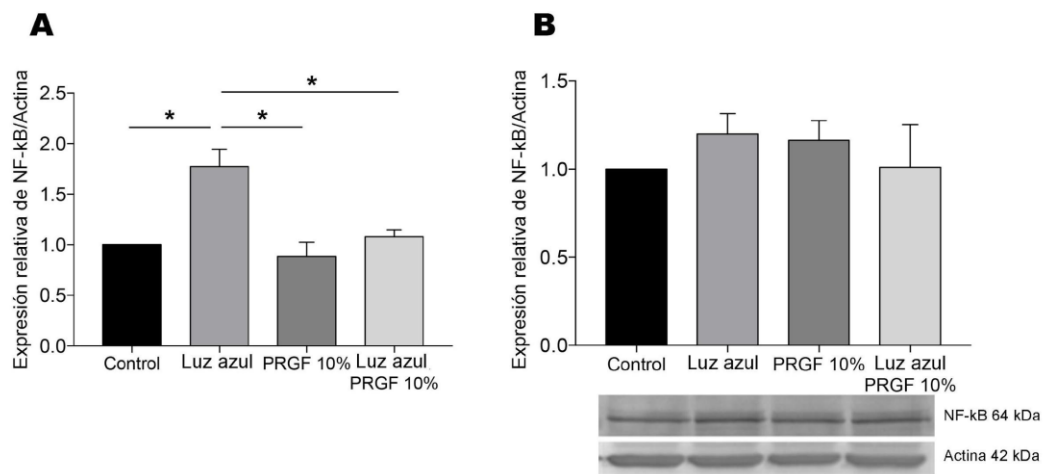


Figura 35. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de NF-κB por qPCR. Los resultados mostraron que la luz azul aumentó la expresión de este marcador, mientras que ambos tratamientos con PRGF mostraron una expresión próxima a la del control. (B) Cuantificación de la expresión proteica relativa a actina de NF-κB por WB. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.5$ (n=4).

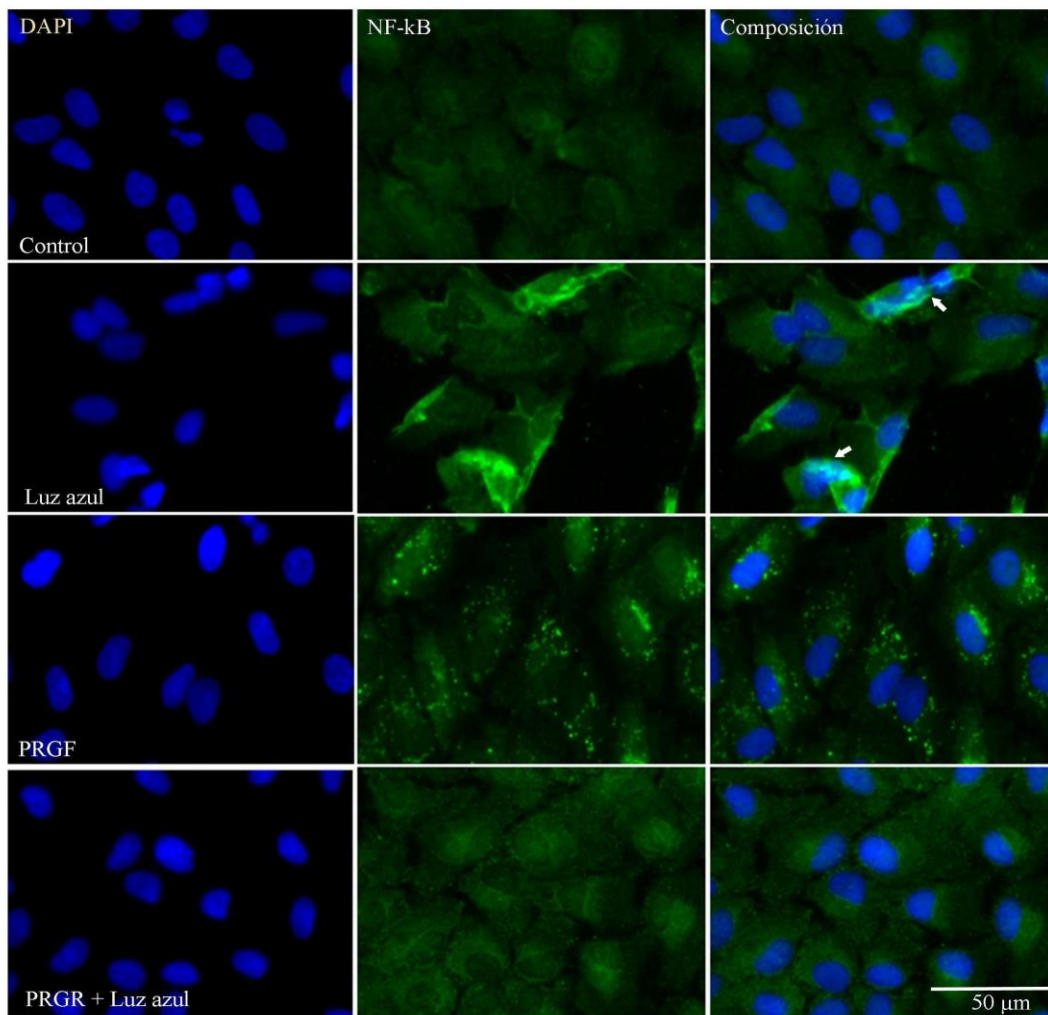


Figura 36. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores NF- κ B (verde) y DAPI (azul). La expresión de NF- κ B aumenta en presencia de luz azul en la zona del núcleo. El tratamiento de PRGF produce un marcaje en punteado en la zona citoplasmática. Barra de escala 50 μ m (n=4).

Puesto que en algunos marcadores se pudo observar un patrón temporal de expresión, se analizó también su expresión a las 3 horas del tratamiento (Figura 37). En este caso, podemos observar que, efectivamente, el marcaje es mayor en la zona nuclear y perinuclear del tratamiento con luz azul, mientras que en el resto de los tratamientos no se puede determinar un marcaje con claridad.

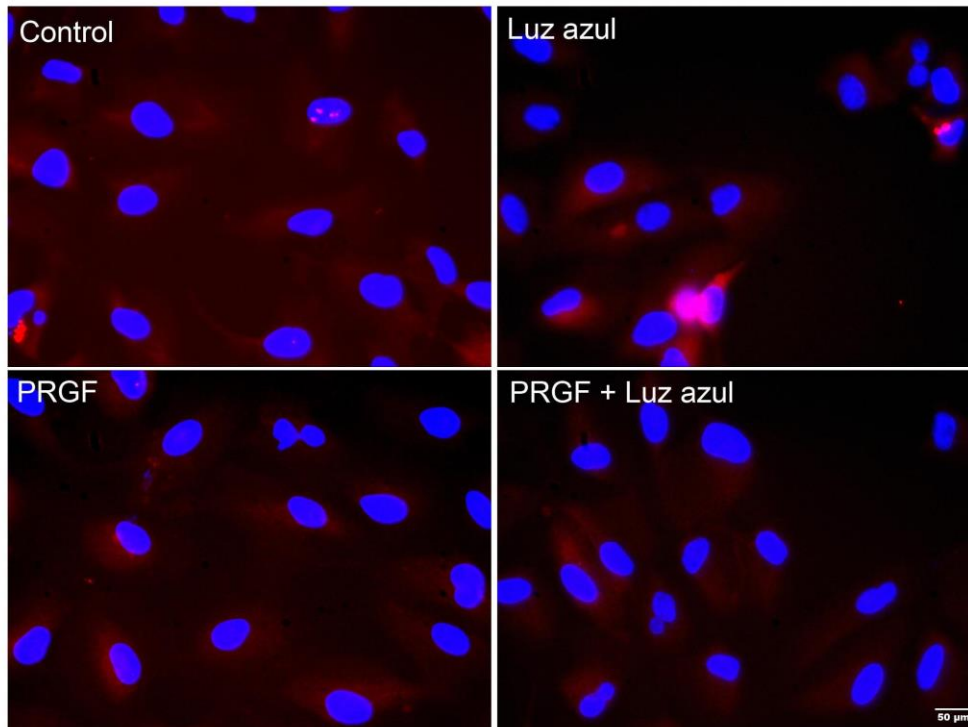


Figura 37. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores NF- κ B (rojo) y DAPI (azul) a las 3 horas de experimentación. Los resultados muestran que la luz azul aumenta la expresión de este marcador en la zona nuclear, mientras que el resto de los tratamientos apenas muestran marcaje. Barra de escala 50 μ m (n=4).

El análisis de la expresión del marcador p62 mostró que la luz azul, tanto sola como en combinación con PRGF, produce un aumento significativo de su expresión génica (Figura 38). Sin embargo, los resultados del estudio proteico mostraron que el tratamiento combinado de PRGF con luz azul aumenta de manera significativa su expresión.

Este resultado también fue analizado mediante inmunofluorescencia (Figura 39), y se pudo observar que el patrón de la expresión de este marcador aumentaba de manera notable en presencia únicamente de luz azul, sobre todo en la zona perinuclear, mientras que el tratamiento combinado producía un marcaje mucho más difuso.

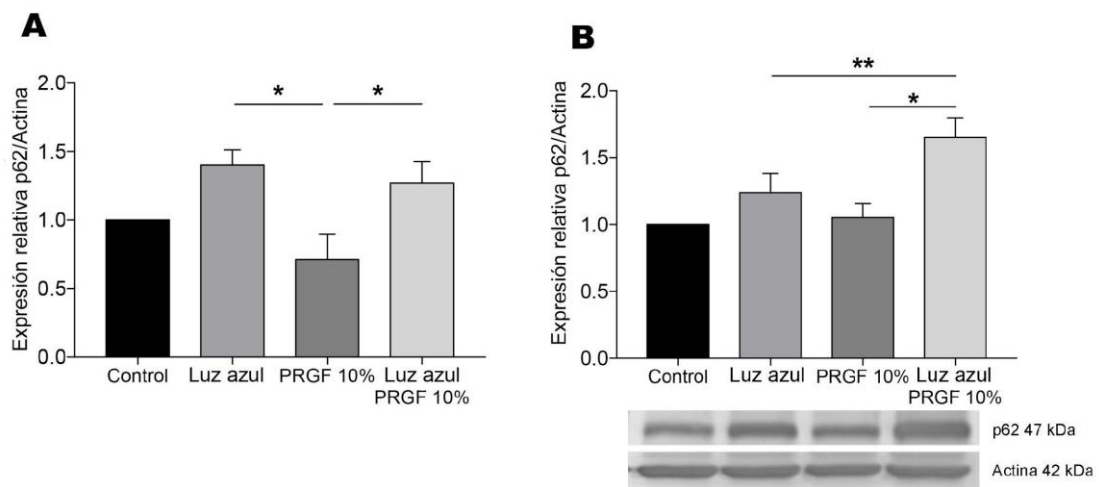


Figura 38. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de p62 por qPCR. Los resultados mostraron que la luz azul aumentó la expresión de este marcador, tanto solo como en combinación con PRGF. (B) Cuantificación de la expresión proteica relativa a actina de p62 por WB. Los resultados mostraron un aumento significativo en la expresión de este marcador en el tratamiento combinado de PRGF con luz azul. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ (n=4).

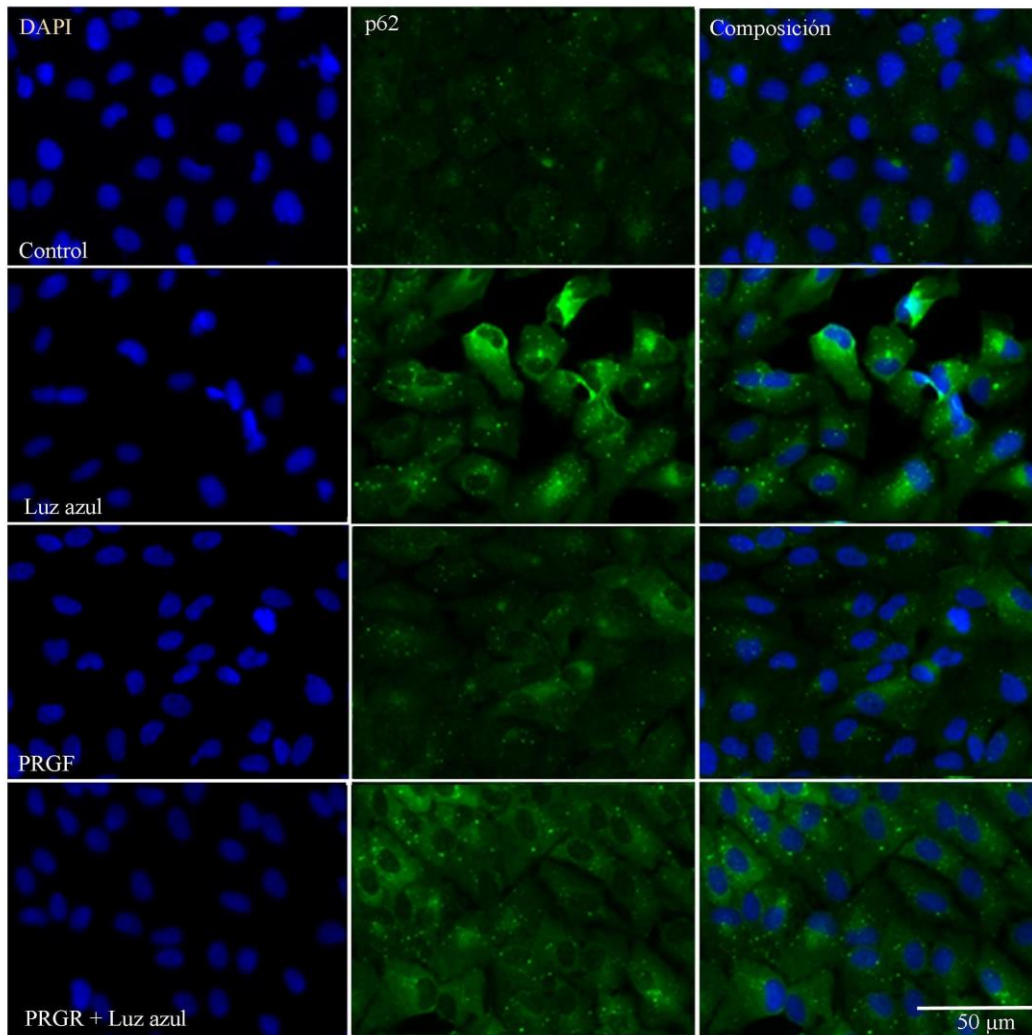


Figura 39. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores p62 (verde) y DAPI (azul). La expresión de p62 aumenta en presencia de luz azul, tanto solo como en combinación de PRGF. Barra de escala 50 μm . (n=4).

Los estudios realizados sobre el marcador Atg5 mostraron que la expresión génica y proteica muestran patrones contrarios (Figura 40). Por una parte, los resultados de qPCR mostraron un aumento significativo en la expresión en el tratamiento con PRGF. Sin embargo, los resultados obtenidos mediante WB mostraron un aumento significativo de este marcador en presencia de luz azul, tanto solo como combinado con PRGF.

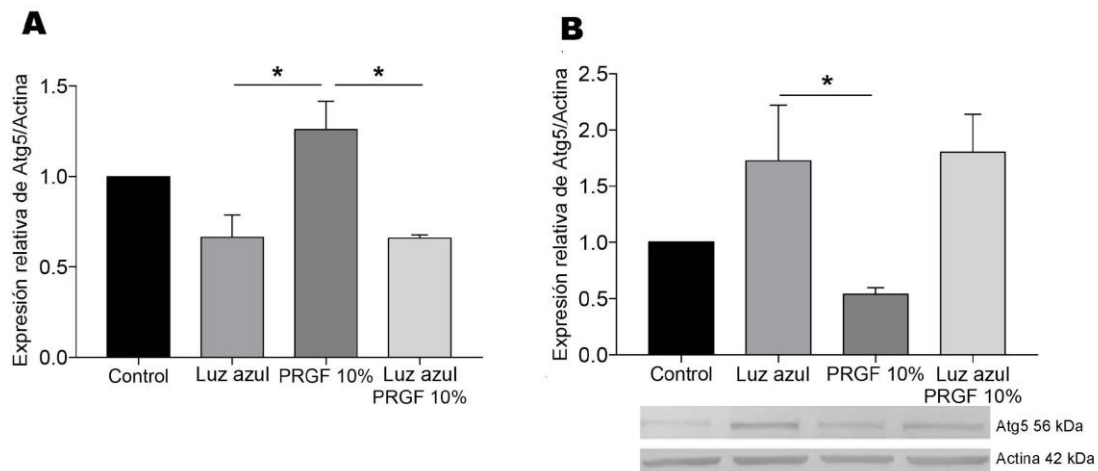


Figura 40. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de Atg5 por qPCR. Los resultados mostraron un aumento significativo de su expresión en presencia de PRGF. (B) Cuantificación de la expresión proteica relativa a actina de Atg5 por WB. Los resultados mostraron un patrón de expresión contrario al obtenido mediante QPCR, con un aumento significativo de la expresión en presencia de luz azul. El resultado de la combinación de PRGF y luz azul no mostró significancia, aunque se puede ver que es mucho más alto que los otros dos tratamientos. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$ (n=4).

El análisis de expresión génica de LC3 mostró un aumento en presencia de la luz azul (Figura 41). Sin embargo, para analizar la expresión real de este marcador a nivel proteico, hay que tener en cuenta el ratio calculado a partir de la expresión del marcador LC3II y LC3I. En este caso, podemos ver que la expresión de LC3II en presencia de luz azul es mayor que la obtenida de LC3I. Por el contrario, observamos que la expresión de LC3I es algo mayor que la de LC3II cuando se produce la combinación entre PRGF y luz azul. Esto, combinado con los resultados obtenidos mediante qPCR, pueden indicar que la luz azul estimula la producción de LC3II para producir la maduración del autofagosoma. Por el contrario, en el tratamiento combinado, aunque la expresión génica también es alta, el proceso de maduración no es tan necesario porque no hay tanto daño.

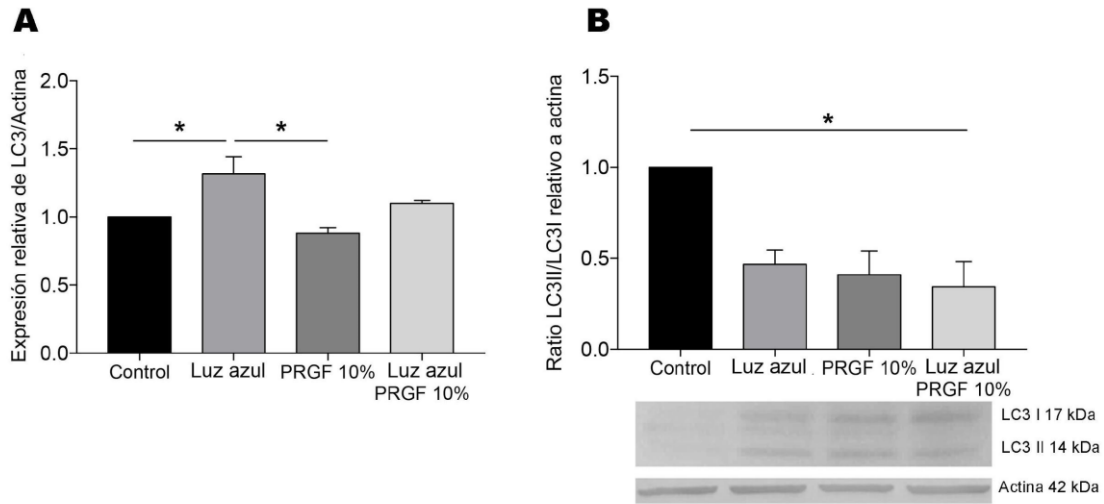


Figura 41. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de LC3 por qPCR. Los resultados mostraron un aumento significativo de su expresión en presencia de luz azul. (B) Ratio de la expresión proteica de LC3II/LC3I relativa a actina cuantificada por WB. Los resultados mostraron un aumento en la expresión de LC3I en presencia de PRGF, tanto sola como en combinación de luz azul. Sin embargo, el tratamiento con luz azul mostró una expresión algo mayor de LC3II. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$ (n=4).

Para poder analizar la expresión de LC3 en un tiempo corto, se realizó una tinción de inmunofluorescencia a las tres horas (Figura 42). En las imágenes se puede observar que la expresión de LC3 aumenta en presencia de luz azul, mientras que el resto de los tratamientos, en especial el de PRGF solo, muestran una reducción en la expresión de este marcador.

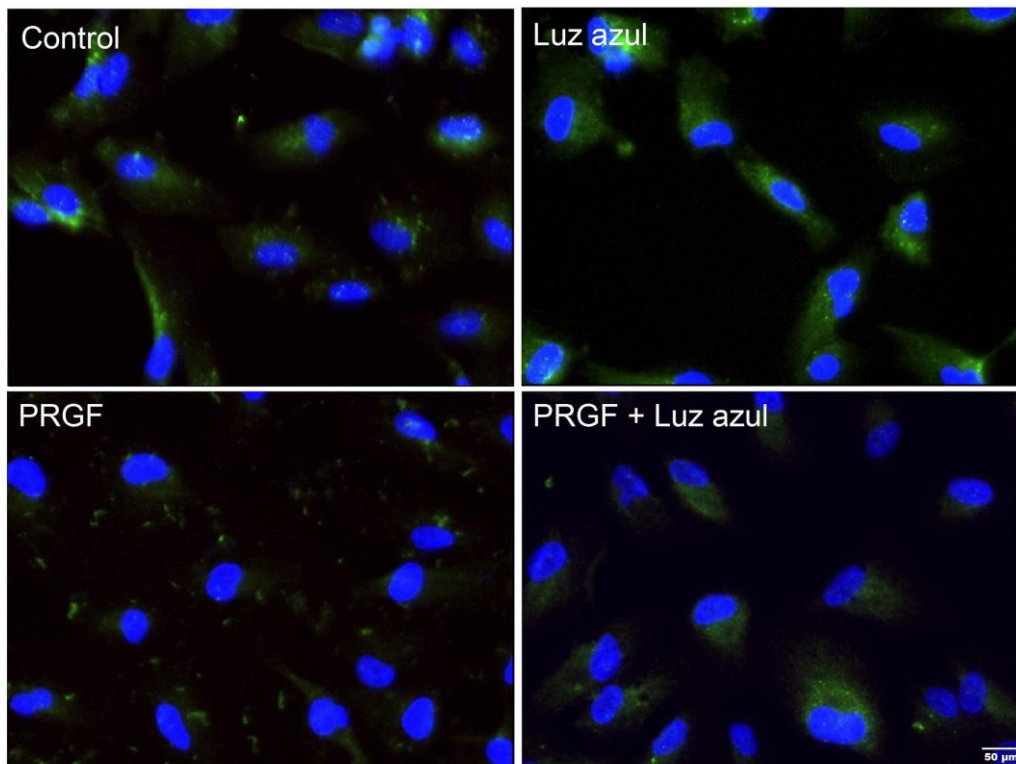


Figura 42. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores LC3 (verde) y DAPI (azul). Se puede apreciar un aumento de la expresión de este marcador en presencia de luz azul en comparación con el resto de los tratamientos. Barra de escala 50 μ m (n=4).

El análisis de la expresión génica del marcador Beclin1 (Figura 43) mostró un aumento en presencia de luz azul, tanto sola como en combinación con PRGF. Sin embargo, la expresión proteica no mostró un patrón tan definido. Se puede observar que todos los tratamientos muestran una expresión por encima del valor del control, pero no se aprecian diferencias significativas en los tratamientos.

Para analizar este resultado, se realizó una tinción del marcador Bcl-2, que actúa como inhibidor de Beclin1. Los resultados (Figura 44) mostraron un aumento de la expresión en los tratamientos control y luz azul, mientras que ambos tratamientos con PRGF, especialmente el que está en combinación con luz azul, mostraron una expresión más baja. Esto podría indicar que el tratamiento combinado de PRGF y luz azul promueve la autofagia vía Beclin1.

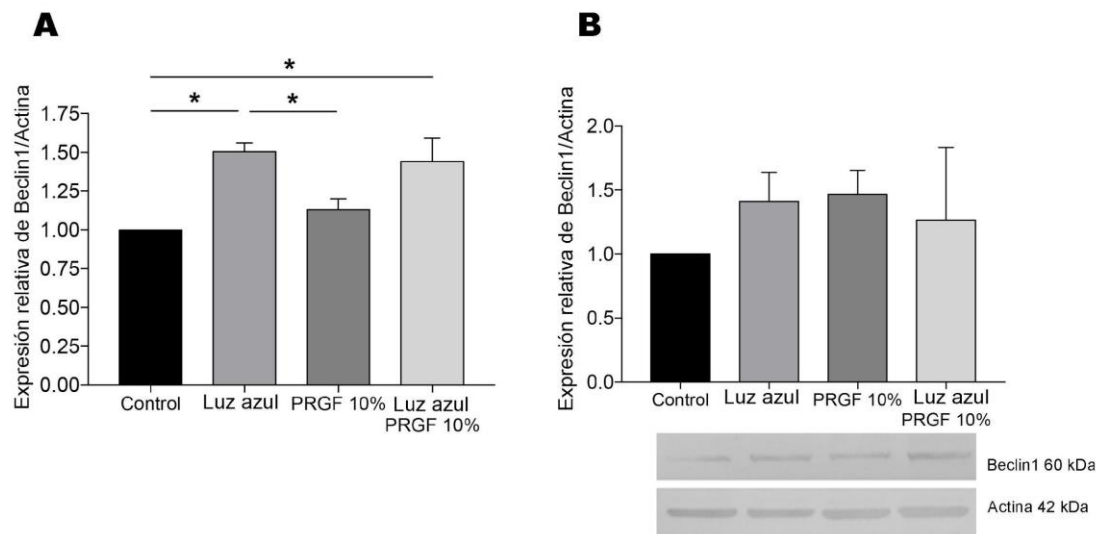


Figura 43. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de Beclin1 por qPCR. Los resultados mostraron un aumento significativo de su expresión en presencia de luz azul, tanto sola como en combinación con PRGF. (B) Cuantificación de la expresión proteica relativa a actina de Beclin1 por WB. Los resultados no mostraron diferencias significativas, aunque sí se puede apreciar un aumento en todos los tratamientos con respecto al control. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$ (n=4).

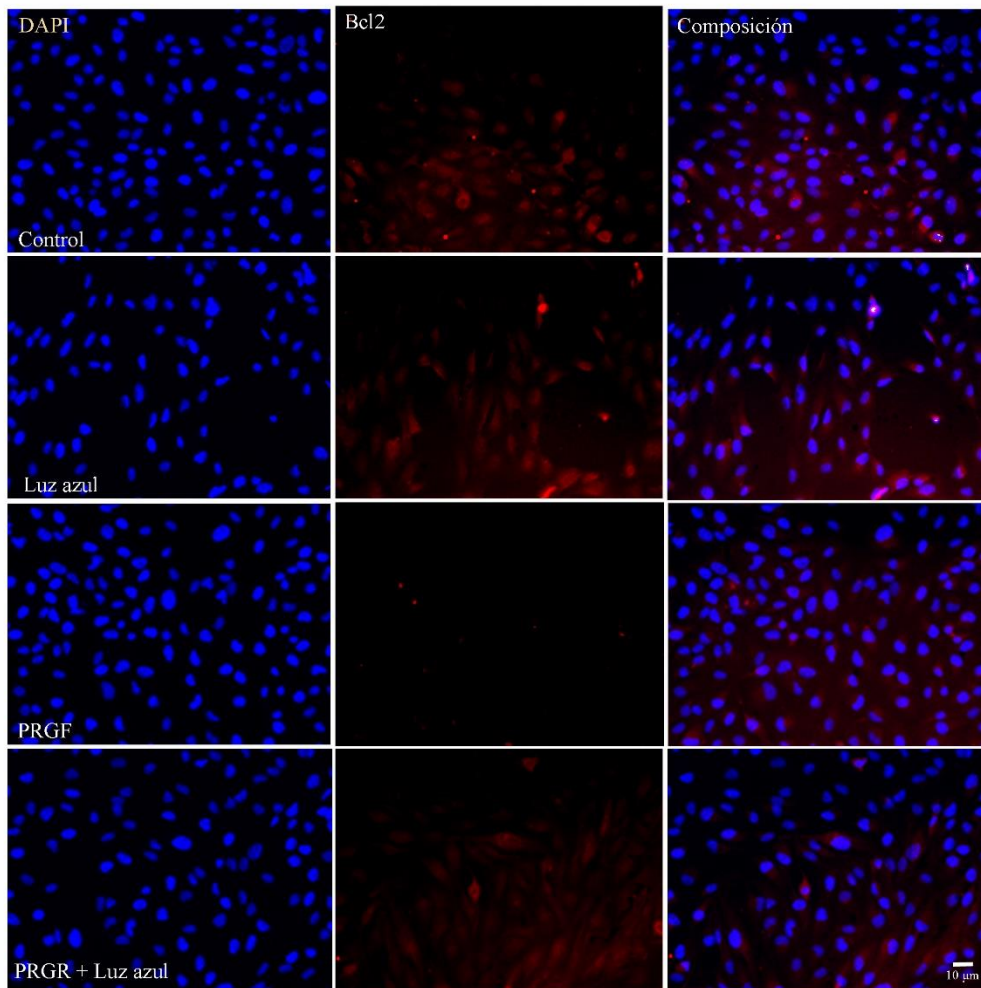


Figura 44. Inmunofluorescencia en ARPE-19 de los marcadores Bcl2 (rojo) y DAPI (azul). El tratamiento que menos expresión presenta es el de la combinación de PRGF con luz azul. Barra de escala 10 μm (n=4).

La expresión génica de la citoquina IL1 β (Figura 45) se vio aumentada en presencia de luz azul. Sin embargo, los resultados obtenidos del análisis de la expresión proteica mostraron un aumento significativo de la expresión del tratamiento con PRGF, en especial de la combinación del PRGF con la luz azul. Esto podría ser indicativo de que la combinación de ambos tratamientos favorece la autofagia.

Por el contrario, el marcador IL18 mostró una reducción significativa de su expresión génica en el tratamiento combinado de PRGF y luz azul con respecto al tratamiento de luz azul (Figura 46). Este resultado fue muy parecido al obtenido del análisis de su expresión proteica. Ya que este marcador se expresa

cuando se produce la inhibición de la autofagia, ambos resultados podrían sugerir que la combinación de PRGF y luz azul estimula este tipo de muerte celular.

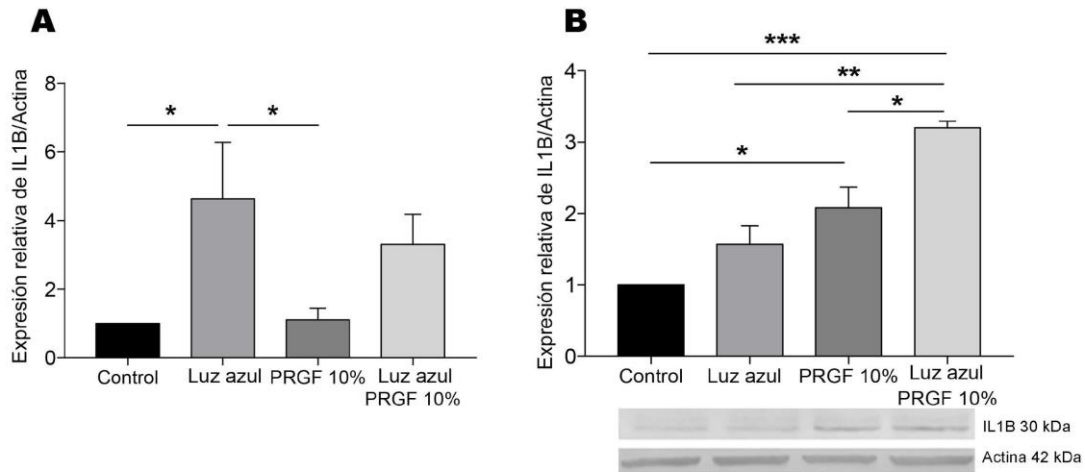


Figura 45. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de IL1β por qPCR. Los resultados mostraron un aumento significativo de su expresión en presencia de luz azul. El tratamiento en combinación con PRGF también mostró un aumento de expresión, aunque no fue significativo. (B) Cuantificación de la expresión proteica relativa a actina de IL1β por WB. Los resultados mostraron un aumento significativo de todos los tratamientos con respecto al control, especialmente el tratamiento combinado de PRGF con luz azul. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.001$ ($n=4$).

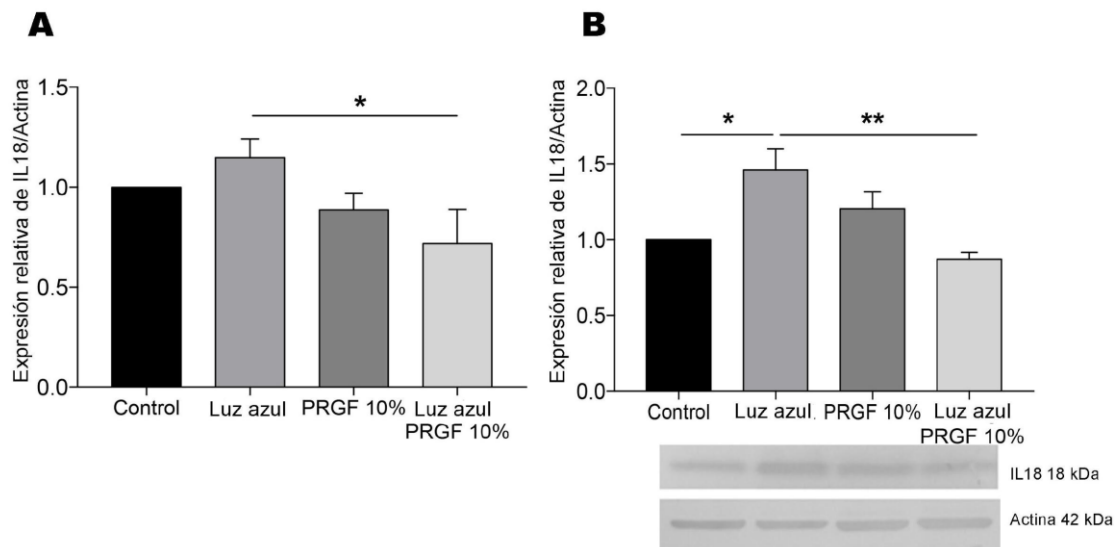


Figura 46. (A) Cuantificación de la expresión génica relativa a actina de IL18 por qPCR. Los resultados mostraron un aumento significativo de su expresión en presencia de luz azul. (B) Cuantificación de la expresión proteica relativa a actina de IL18 por WB. Los resultados mostraron un aumento significativo de la expresión de este marcador en presencia de luz azul. ANOVA *One-way*, test Tukey de comparación múltiple, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ ($n=4$).

C3.4. Discusión

La autofagia es uno de los procesos más regulados y conservados en la renovación celular. Está controlada por la activación y la inactivación de distintos marcadores, como respuesta a un daño producido a sus componentes celulares por factores como el estrés oxidativo o la inflamación. En este trabajo de tesis doctoral, se ha descrito ampliamente la implicación de la luz azul en el incremento de la presencia de ERO, y cómo puede actuar como una fuente de daño produciendo la disrupción de diferentes rutas metabólicas en la retina.

Aunque las células retinianas poseen rutas antioxidantes protectoras, puede que estas no sean lo suficientemente potentes cuando los niveles de ERO son elevados y/o están mantenidos durante periodos prolongados de tiempo.

En esta tesis, se ha comprobado que el PRGF disminuye el daño producido por la luz azul, ya que es capaz de regular rutas antioxidantes que protegen a las células impidiendo la acción nociva de la luz sobre diferentes proteínas.

Por eso, estudiar si el PRGF favorece rutas de renovación celular, como la autofagia, es de interés para su uso en el desarrollo de estrategias terapéuticas. NF- κ B es un factor de transcripción que se activa cuando se produce un aumento de ERO, y que tiene como función principal la regulación de diversas rutas metabólicas, entre las que se incluyen las rutas antioxidantes e inflamatorias. Este factor de transcripción se activa en el citoplasma, seguido de la activación de la expresión de citoquinas inflamatorias como IL1 β . NF- κ B controla su propia actividad proinflamatoria mediante la renovación de p62 en mitocondrias dañadas, actuando como un control negativo, pero también regulando la inflamación en el tejido dañado^{103,106,329,330}.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la expresión génica del NF- κ B aumenta de manera significativa en presencia de luz azul. Como se ha observado anteriormente, la luz azul actúa como factor oxidante, aumentando la presencia de ERO, por lo que este aumento en la expresión del factor de transcripción NF- κ B podría apoyar también esa hipótesis. Sin embargo, cuando la luz azul se combina con el PRGF, la expresión de este marcador se ve reducida, aunque no de manera significativa. Por otra parte, el tratamiento de PRGF también muestra una expresión por debajo de la obtenida con el tratamiento control, por lo que podría sugerir que el PRGF, al disminuir la acción de las ERO, también contribuye a la disminución de este marcador. En cuanto a la expresión proteica, no se vieron diferencias entre los tratamientos. Esto podría deberse a que el NF- κ B se transloca al núcleo para llevar a cabo la activación en la expresión de otros genes, por lo que su presencia proteica en el citoplasma podría sugerir que permanece inactivo hasta que su acción es requerida. Para poder estudiar este resultado con más detenimiento, se realizó una tinción por inmunofluorescencia. Mediante las imágenes obtenidas, se pudo determinar el aumento de la presencia del marcador en la zona nuclear y perinuclear. Esto apoya la teoría de la translocación al núcleo y explica la ausencia de diferencias proteicas del citoplasma entre los tratamientos analizados mediante WB. Además, para poder confirmar si la expresión de este marcador sigue un patrón temporal, también se realizó una tinción por inmunofluorescencia a las 3 horas

de experimento. Los resultados mostraron que, al igual que ocurría tras 18 horas de daño, la expresión de este marcador aumenta en la zona del núcleo cuando detecta la presencia de luz azul, a diferencia del resto de tratamientos.

La proteína p62 actúa como adaptador entre el UPS y el ALP. Cuando el proteasoma está sobresaturado, p62 activa la ruta de ALP, ya que posee una zona de interacción con LC3^{32,102,108-113,337}. Esta proteína también actúa como un ARE, ya que, en presencia de ERO, interactúa con Keap1, favoreciendo la liberación de Nrf2, que se transloca al núcleo y estimula la expresión de otros genes antioxidantes, como se indicó en el primer capítulo. Los resultados obtenidos de la expresión génica de este marcador muestran que la luz azul aumenta su expresión. Sin embargo, la combinación del PRGF con la luz azul produce un aumento aún más significativo. Esto podría sugerir que la expresión de este marcador aumenta con el objetivo de favorecer las rutas antioxidantes y autofágicas. Los resultados obtenidos mediante WB confirmaron los resultados obtenidos por qPCR, ya que el tratamiento combinado de luz azul y PRGF muestra un aumento en la expresión proteica. Estos resultados se analizaron también con ayuda de una tinción por inmunofluorescencia, que mostró un aumento llamativo en la expresión del marcador en presencia de luz azul en la zona perinuclear. El tratamiento combinado de PRGF y luz azul también mostró un aumento en la expresión, aunque siguiendo un patrón más difuso. Liu et al describen que la presencia de agregados de p62 suele ir directamente relacionada con una reducción de la autofagia y un aumento en la UPS¹¹². Anteriormente, se mostró que el PRGF promueve las rutas antioxidantes cuando detecta la presencia de la luz azul. Este resultado concuerda con el descubrimiento del aumento de expresión de p62 inducido por el PRGF combinado con luz azul, sugiriendo que se promueven las rutas protectoras controladas por la proteína. En cualquier caso, parece claro que la acción del p62 comprende un intrincado proceso, en el que se combinan acciones orientadas hacia la ruta antioxidante, hacia las rutas de muerte celular por ubiquitinación o hacia la autofagia.

Parece claro que la autofagia es un proceso muy controlado. Varios autores han descrito que la presencia de LC3 es un signo de activación de autofagia^{114-116,122,338}.

Este marcador se expresa en dos formas. La inactiva, LC3I, que se localiza en el citoplasma, y la forma activa, LC3II que se forma al unirse a un grupo lipídico. LC3II se ancla a la membrana del fagóforo y, favorecido por otros mediadores, estimula su elongación hasta convertirlo en autofagosoma. Estos mediadores son las proteínas Atg. Por ejemplo, Atg5 se une a Atg12 para formar un complejo. Este complejo, cuando detecta la presencia de LC3II, se une a Atg16 para favorecer el anclaje de LC3II a la membrana del fagóforo. Los análisis de la expresión génica de Atg5 en este trabajo mostraron que el PRGF favorece su expresión, en contraposición con los obtenidos del análisis proteico. Esta proteína actúa en las etapas iniciales de la formación del autofagosoma, por lo que este resultado podría sugerir que su detección sería más propicia al inicio del proceso. En ese respecto, los resultados obtenidos mediante WB mostraron que la luz azul, tanto individualmente como en combinación con el PRGF, estimula su expresión. Todo esto podría apoyar la hipótesis de que la expresión de Atg5 se estimula en las etapas iniciales del daño, ya que participa en el anclaje de LC3II a la membrana del fagóforo, pero que permanece activada durante un periodo de tiempo más largo. Por otra parte, también hay evidencias de que la expresión de Atg5/Atg12 está controlada por los ritmos circadianos, por lo que la expresión de este marcador podría seguir un patrón cíclico.

Los análisis de la expresión génica de LC3 mostraron que la luz aumenta su expresión. Esto sugiere que la activación de la autofagia está promovida por la luz azul, debido al aumento de los daños producidos en las células. Varios estudios demuestran que la expresión de LC3, como ocurría con Atg5, es mayor en las fases iniciales de la autofagia, debido a su implicación en la maduración del fagóforo. Sin embargo, la exposición de luz azul indujo la expresión de este marcador durante todo el experimento. Para determinar la cantidad real de proteína activa en las células, hay que tener en cuenta la ratio entre LC3II y LC3I. Así, los resultados mostraron que el tratamiento con luz azul y PRGF estimula la expresión de LC3I por encima de LC3II. Esto podría ser indicativo de que la expresión de este marcador es más fácilmente observable en etapas iniciales del proceso, así como que, una vez que el autofagosoma está formado y ha

madurado, no es necesaria la conversión de LC3I a LC3II. Asimismo, no sería necesario promover la expresión de este gen si la proteína no está siendo activada. Song et al observaron que la expresión proteica de LC3 sigue un patrón contrario a p62 y que la expresión de este último aumenta cuando detecta bajas cantidades de LC3II¹¹⁰.

NF- κ B también activa la liberación de Beclin1 de su inhibidor, Bcl-2^{124,339}. Como LC3, Beclin1 juega un papel importante en la elongación y maduración del fagóforo¹²⁴. Los resultados obtenidos del análisis de expresión génica para este marcador mostraron que la luz azul aumenta su expresión, tanto sola como en combinación con PRGF. Los resultados obtenidos por WB mostraron que el PRGF estimula la expresión proteica de este marcador, aunque los resultados no son estadísticamente significativos. Aunque la combinación de PRGF y luz azul no mostró resultados del todo concluyentes, sí que sugieren un aumento en la expresión con respecto a los obtenidos en el control, y por lo tanto podrían sugerir una estimulación de la autofagia. Para poder analizar este resultado, se llevó a cabo la tinción por inmunofluorescencia de su inhibidor, Bcl2. Los resultados de este análisis mostraron que, tanto en condiciones normales como en presencia de luz azul, su expresión es elevada. Sin embargo, ambos tratamientos con PRGF, pero en especial el que está en combinación con luz azul, mostraron una disminución llamativa en su expresión. Esto podría sugerir que, al reducir su expresión, se está favoreciendo la de Beclin1 y, por lo tanto, la autofagia.

Como se mencionó anteriormente, NF- κ B también juega un papel fundamental en la regulación del proceso inflamatorio. Además, tiene la capacidad de modular su propia función proinflamatoria mediante un *feedback* negativo, controlando la formación del inflammasoma y, por lo tanto, previniendo el daño tisular inducido por inflamación. Varios estudios demuestran que diversas citoquinas participan en el proceso de autofagia. Cuando NF- κ B se activa después de detectar la presencia de ERO, se produce la activación de citoquinas como IL1 β y IL18. De hecho, la intervención de la IL1 β en la autofagia ha sido ampliamente estudiada. Los resultados obtenidos por qPCR mostraron que la luz

azul estimula la expresión génica de este marcador. Asimismo, el tratamiento combinado de PRGF y luz azul produjo una reducción de su expresión. No obstante, los resultados de WB mostraron un aumento en la expresión cuando el PRGF se combina con la luz azul. Esto podría deberse a la presencia de esta citoquina en la activación de la autofagia. Por otro lado, IL18 se expresa cuando la autofagia está inhibida. Los datos obtenidos en este trabajo muestran que el tratamiento de PRGF redujo su expresión tanto génica como proteica, sugiriendo que la autofagia no está inhibida.

Todo esto podría indicar que la luz azul, a causa del daño que produce en las células, estimula la autofagia. Sin embargo, la combinación del PRGF con la luz azul la estimula aún más. Para descartar que el PRGF esté causando algún tipo de daño, los resultados muestran que, por sí solo, no altera los mecanismos celulares, pero sí prepara a las células para que aumenten su respuesta frente al daño.

Como limitaciones cabe señalar que este trabajo está realizado en un procedimiento de 18 horas de exposición, por lo que sería interesante estudiar el mismo proceso en un periodo de tiempo más corto, con el fin de analizar las respuestas de marcadores tempranos como LC3 y Atg5.

**Capítulo 4: Papel neuroprotector
del PRGF en un modelo *in vivo*
de fototoxicidad crónica**

C4.1. Introducción

En los últimos años, se ha puesto de manifiesto que la continua exposición a la luz artificial podría convertirse en un factor de riesgo para personas que padecen patologías oculares. Esta luz artificial, que forma parte del espectro visible, está compuesta por fracciones de longitud de onda más cortas, entre las que se encuentra la luz azul (400-500 nm). Varias investigaciones ponen de manifiesto que esta radiación es la responsable de inducir daños en la retina, puesto que tiene la capacidad de atravesar las estructuras previas a esta, estimulando la desorganización de sus componentes moleculares y generando, finalmente, la destrucción de su integridad celular^{150,177,340-349,217,350,351,219,221,275,277,278,308,316}.

Como se ha mencionado anteriormente, hay diferentes factores que pueden afectar a la retina. Estos, entre los que se encuentra el envejecimiento o el estilo de vida, toman mayor relevancia en presencia de enfermedades preexistentes, pudiendo llegar a causar la degradación progresiva de las células retinianas hasta producir, incluso, una pérdida parcial o total de la visión. 17

Las enfermedades neurodegenerativas, como la DMAE, conllevan a la muerte progresiva de los fotorreceptores. Particularmente en el caso de la DMAE seca, la muerte de este tipo de células se produce como consecuencia de la formación de unos depósitos, conocidos como drusas, que inducen, a su vez, la muerte de las células del EPR y, por tanto, de la fuente de alimento y protección de los fotorreceptores. El estrés oxidativo también tiene un papel importante en el deterioro retiniano, ya que la exposición continua y/o mantenida a ERO produce una desregulación de las bases moleculares presentes en las células, llegando a producir la muerte celular. Por esto, en clínica es muy importante realizar pruebas que estudien la funcionalidad retiniana con el fin de analizar el desarrollo y la evolución de la enfermedad. En este respecto, una técnica ampliamente utilizada y fiable es el estudio del ERG.

En los últimos años, se ha comprobado que los agentes antioxidantes pueden ser utilizados como preservantes de la funcionalidad retiniana. Basándonos en esto,

el PRGF podría ser también un agente neuroprotector, ya que, como se indicó en el capítulo anterior, reduce la presencia de ERO tras la exposición a la luz azul y, por tanto, protege a las células frente al daño oxidativo.

Por lo tanto, este capítulo se centra en analizar el efecto combinado del PRGF y de la luz azul, tanto a nivel funcional como mediante el estudio de diversas moléculas que muestran el estado celular de la retina en un modelo *in vivo*

C4.2. Diseño experimental

El diseño experimental para el estudio de la respuesta funcional de la retina ante un daño producido por luz azul se dividió en dos partes: funcionalidad y cambios moleculares.

Estudios de funcionalidad

El análisis funcional se llevó a cabo mediante ERG. Esta técnica permite determinar la respuesta de la retina ante un estímulo lumínico mediante el estudio de distintas ondas y, por ende, su estado funcional.

Para poder llevar a cabo este experimento, se utilizaron ratas *Wistar* (n=16), que fueron divididas en dos grupos en base al tiempo de exposición. Ambos grupos fueron expuestos al patrón de luz/oscuridad descrito en la Tabla 17. El grupo T10 se mantuvo en ensayo durante 10 días, mientras que el grupo T30 lo hizo durante 30 días. Ambos grupos fueron expuestos al mismo procedimiento.

Previamente al inicio del experimento, los animales fueron mantenidos durante 16 horas en oscuridad para la realización de los electrorretinogramas y medidas de la Plo correspondientes al tiempo 0, en condiciones basales. Los animales fueron expuestos a sus respectivos tratamientos experimentales durante 10 y 30 días según el grupo de estudio, realizándose las pruebas de funcionalidad y medidas de Plo cada 10 días. En el día 7 de experimento, los animales recibieron tratamiento con PRGF o salino, en base a su grupo experimental correspondiente. A los ojos derechos se les inyectaron 10 μ l de suero salino, utilizando una jeringa tipo Hamilton en la esclera, justo después del limbo, mientras que los ojos

izquierdos fueron inyectados con 10 μ l de PRGF 100%. Tras el tratamiento, los animales se mantuvieron bajo las condiciones experimentales correspondientes hasta finalizar los tiempos de estudio. Finalmente, los animales fueron eutanasiados y los ojos fueron enucleados.

Tratamientos	Medio	Oscuridad/Luz
Control	10 μ l solución salina	Oscuridad
Luz azul	10 μ l solución salina	Luz azul 100 lux (4 horas/día)
PRGF	10 μ l PRGF 100%	Oscuridad
Luz azul + PRGF	10 μ l PRGF 100%	Luz azul 100 lux (4 horas/día)

Tabla 17. Listado de tratamientos en experimentos *in vivo*

Estudios moleculares

Los ojos de los animales, previamente fijados en paraformaldehído 4% e incluidos en OCT para su congelación, fueron procesados y cortados en secciones transversales de 7 μ m de espesor mediante criostato.

Las secciones transversales se analizaron mediante ensayos de histología clásica (hematoxilina-eosina) e inmunofluorescencia.

- Hematoxilina-eosina: las muestras fueron teñidas con hematoxilina-eosina, siguiendo el protocolo habitual descrito previamente, para analizar el espesor de la retina. Una vez realizada la tinción, se tomaron las imágenes de la zona más próxima al nervio óptico con ayuda de un microscopio y fueron analizadas con el programa Fiji. Para ello, se tomaron 5 medidas de los espesores de las diferentes imágenes y se calcularon las medias.
- Inmunofluorescencia: Para evaluar el estado celular de la retina, se realizó una inmunofluorescencia para los siguientes anticuerpos (Tabla 18). A continuación, se calculó el *Mean gray value* (MGV) para determinados marcadores con ayuda de Fiji. Para el marcador Brn3a se realizó una cuantificación de las células positivas de tres imágenes de cada tratamiento. A continuación, los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa GraphPad.

Anticuerpo	Referencia (RRID)	Especies	Dilución	Casa comercial
Anticuerpos primarios				
HO-1	Enzo Life Sciences Cat# ADI-SPA-894	Conejo	1:100	Enzo LS, Farmingdale, NY, USA
GFAP	Agilent Cat# Z0334, RRID:AB_10013382	Conejo	1:500	Dako, Santa Clara, CA, USA
ChAT	Millipore Cat# AB144P-200UL, RRID:AB_90661	Cabra	1:250	Millipore, Burlington, MA, USA
Brn3a	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc- 31984, RRID:AB_2167511	Ratón	1:200	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Rodopsina	Millipore Cat# MABN15, RRID:AB_10807045	Ratón	1:200	Millipore, Burlington, MA, USA
Anticuerpos secundarios				
Anti-conejo Alexa Fluor 488	Catalog # A32814 Thermo Fisher Scientific Cat# A32814, RRID:AB_2762838	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-cabra Alexa Fluor 594	Catalog # A32758 Thermo Fisher Scientific Cat# A32758, RRID:AB_2762828	Burro	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-ratón Alexa Fluor 594	Catalog # A32742 Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Cabra	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA

Tabla 18. Anticuerpos empleados en inmunohistoquímica en el modelo *in vivo*.

C4.3. Resultados

Los resultados obtenidos a través del análisis del ERG mostraron que, a los 10 días (Figura 47), la luz azul produjo una disminución significativa de la actividad de la retina. Sin embargo, ambos tratamientos con PRGF mostraron resultados similares a los obtenidos con el control. En el experimento realizado a 30 días se pudo observar que ocurre algo similar (Figura 49). La luz redujo de manera significativa la respuesta retiniana, lo que fue contrarrestado por el tratamiento combinado con PRGF. En ambos casos, se pudo observar que hay una diferencia entre el tiempo 0 y cada uno de los tiempos de experimentación. Esto podría deberse a un efecto secundario de la realización de un procedimiento invasivo, como es la inyección intraocular.

Para poder analizar estos datos y hacer un seguimiento del estado del ojo, se realizaron medidas de la PIO durante el experimento. En la Figura 48 se puede ver que no hay diferencias significativas entre los valores obtenidos a tiempo 0 y a tiempo 10. Esto nos indica que el procedimiento de inyección del correspondiente tratamiento no afectó a la presión intraocular. Datos similares se obtuvieron en el grupo T30 en el experimento realizado a 30 días (Figura 50).

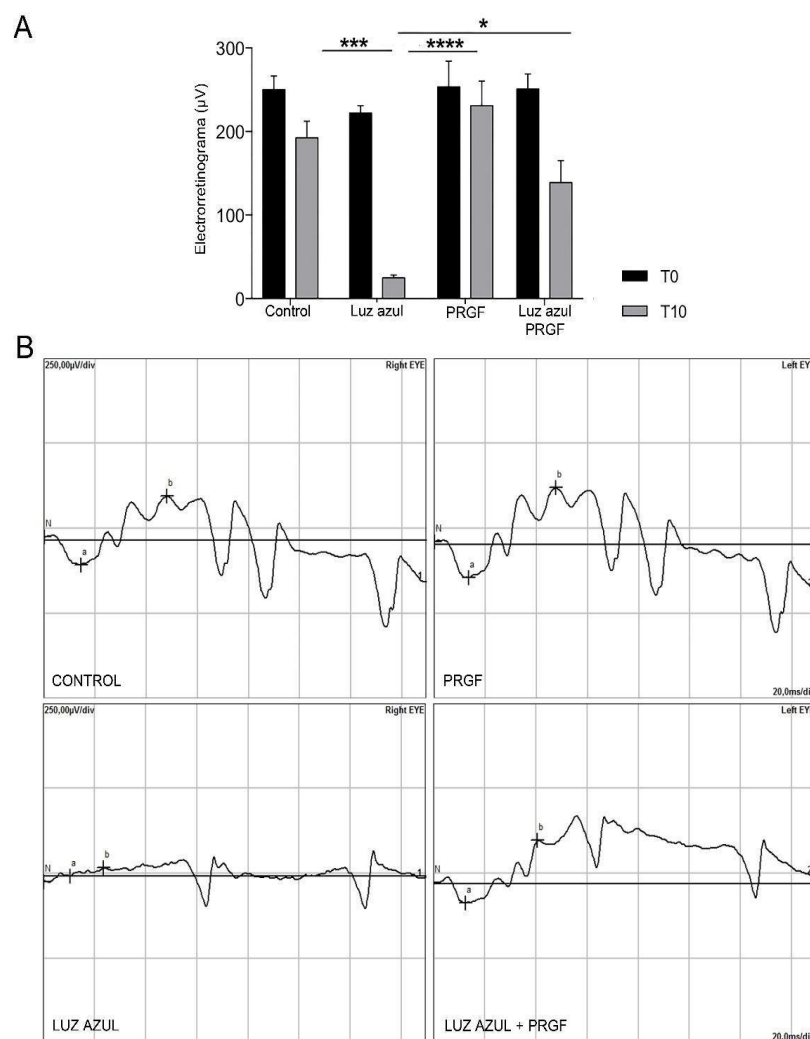


Figura 47. Medidas de la onda b obtenidas mediante ERG en condiciones escotópicas a tiempo 0 y tiempo 10. (n=4). (A) Representación gráfica del ERG en el tiempo 0 y a los 10 días del experimento. Los resultados muestran que la luz azul produjo una disminución en la funcionalidad de la retina. Ambos tratamientos de PRGF mostraron valores similares a los obtenidos en el control. (B) Diagrama de ERG a tiempo 10. Los tratamientos de control y PRGF mostraron patrones normales. Sin embargo, la luz azul redujo la señal de la retina. El PRGF en combinación con la luz azul produjo una mejora en la respuesta comparando con el tratamiento únicamente de luz. Anova *Two-way*. Test Tukey de comparación múltiple * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

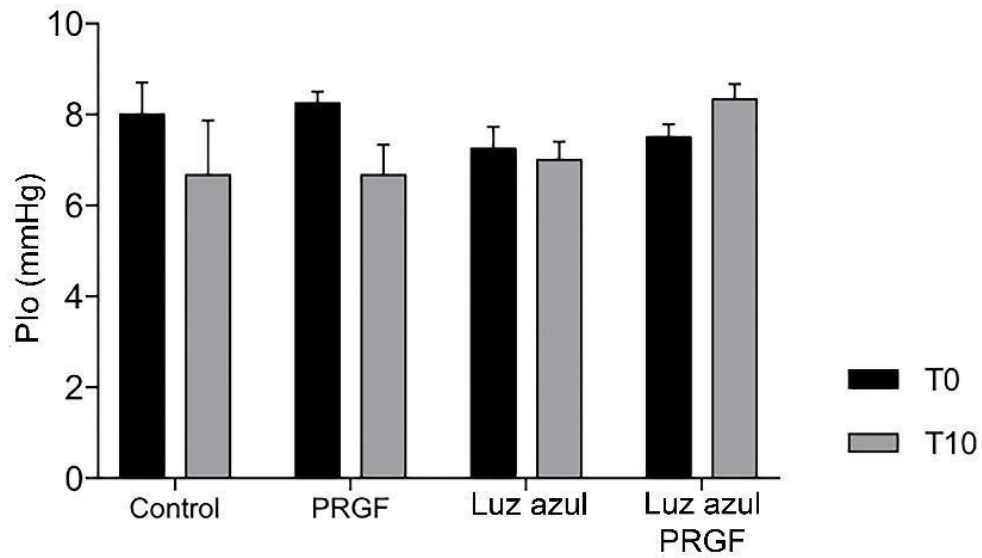


Figura 48. Gráfico de la presión intraocular (PIO) a tiempo 0 y a tiempo 10 días. Los resultados muestran que no hay diferencias significativas. Anova *Two-way*. Test Tukey de comparación múltiple (n=4).

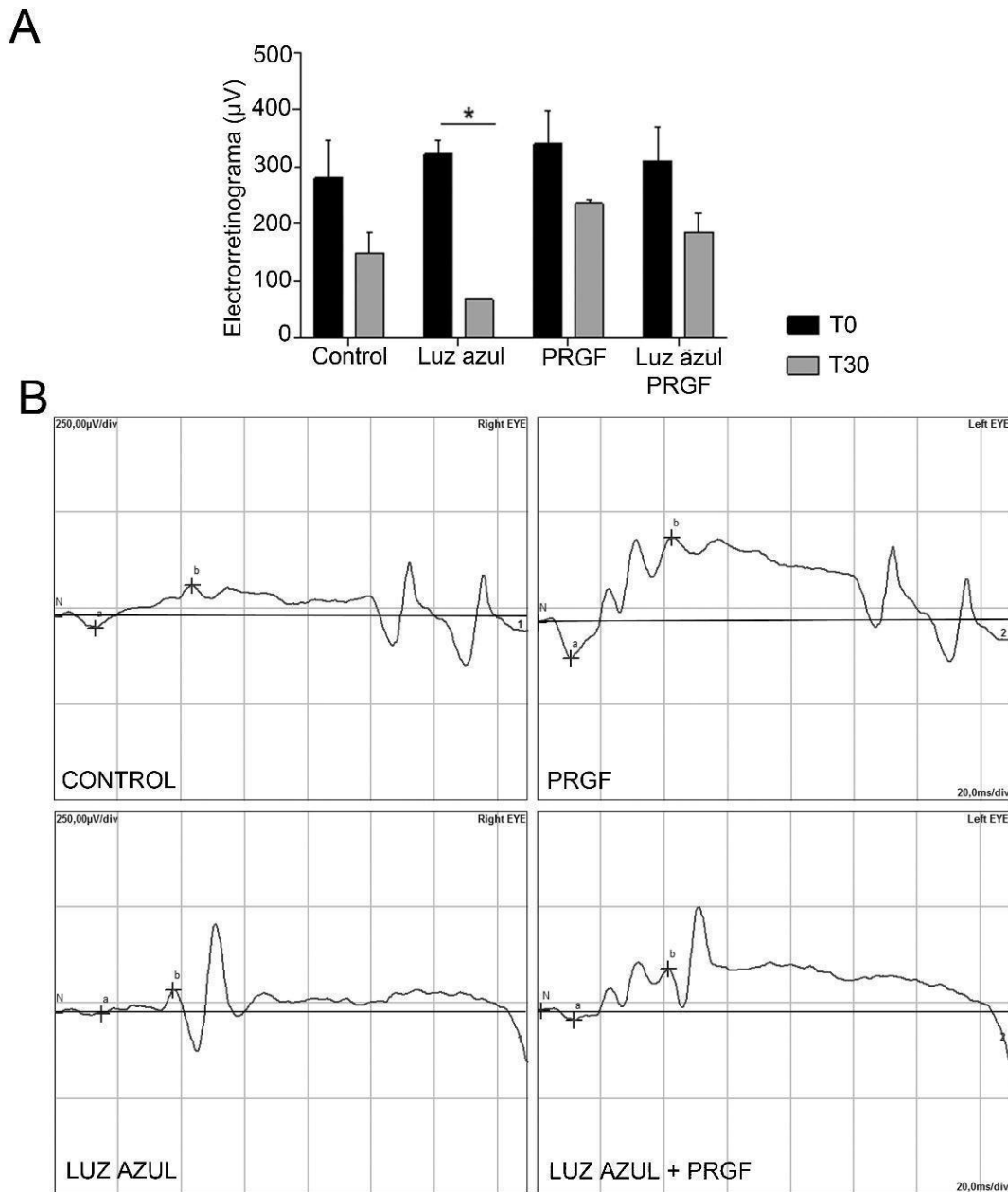


Figura 49. Medidas de la onda b obtenidas mediante ERG en condiciones escotópicas a tiempo 0 y tiempo 30. (n=4). (A) Representación gráfica del ERG a tiempo 0 y a los 30 días del experimento. Los resultados muestran que la luz azul produjo una disminución en la funcionalidad de la retina. Ambos tratamientos de PRGF mostraron valores similares a los obtenidos en el control, incluso algo mejores. (B) Diagrama de ERG a tiempo 30. El tratamiento de PRGF mostró un patrón normal. Sin embargo, la luz azul redujo la señal de la retina. El PRGF en combinación con la luz azul produjo una mejora en la respuesta comparando con el tratamiento únicamente de luz. Anova *Two-way*. Test Tukey de comparación múltiple * $p < 0.05$.

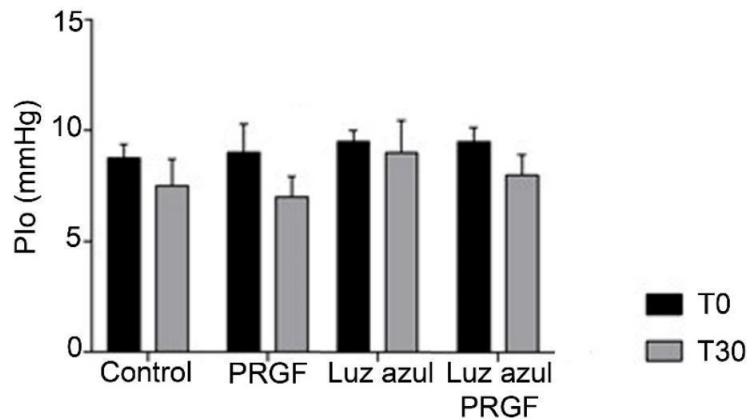


Figura 50. Gráfico de la presión intraocular (PIO) a tiempo 0 y a tiempo 30 días. Los resultados no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos. Anova *Two-way*. Test Tukey de comparación múltiple (n=4).

El análisis realizado del espesor retiniano a través de la tinción con hematoxilina-eosina mostró que, a los 10 días, el tratamiento de luz supuso un aumento significativo del mismo (Figura 51). Sin embargo, ambos tratamientos con PRGF no produjeron ninguna modificación significativa del espesor con respecto a los resultados obtenidos en el control.

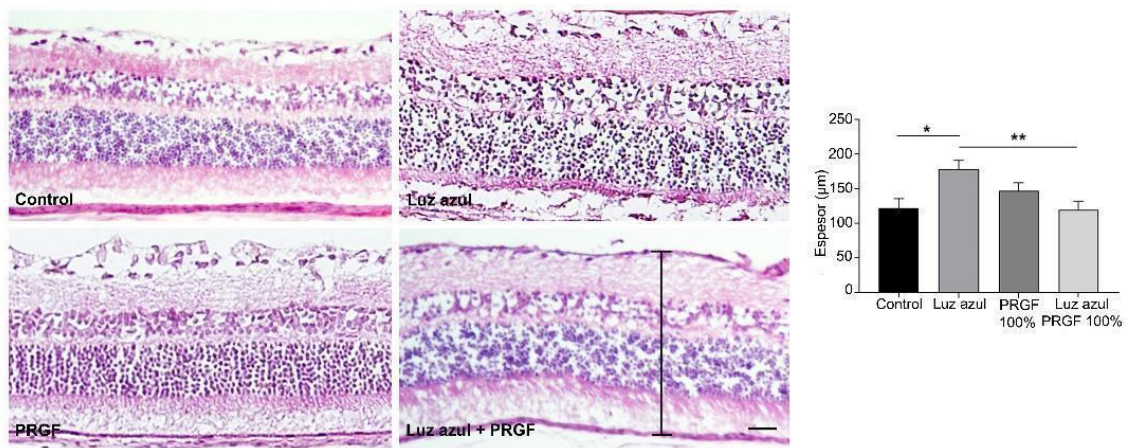


Figura 51. Cortes transversales de secciones de retinas del experimento de 10 días teñidos con hematoxilina eosina (n=4). Las imágenes mostraron que el PRGF combinado con luz azul mantuvo el espesor de la retina en valores próximos al control. Sin embargo, la luz azul causó una disrupción en la integridad de la retina. La cuantificación de las medias del espesor mostró que hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos de las retinas expuestas a luz azul y las que fueron sometidas a la combinación de luz azul y PRGF. Anova *One-way*. Test Sidak de comparación múltiple * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. Barra de escala 20 μm .

Por el contrario, a los 30 días, se pudo observar una contracción del espesor retiniano en el tratamiento con luz azul (Figura 54). Como ocurrió en el experimento llevado a cabo durante 10 días, ambos tratamientos con PRGF mostraron valores similares al control.

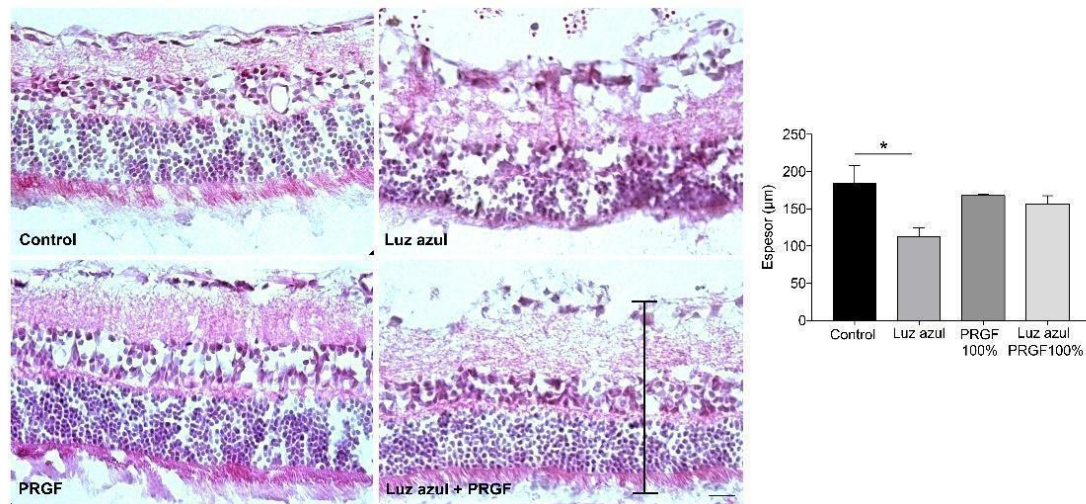


Figura 52. Cortes transversales de secciones de retinas del experimento de 30 días teñidos con hematoxilina eosina (n=4). Las imágenes mostraron que el PRGF combinado con luz azul mantuvo el espesor de la retina en valores próximos al control. Sin embargo, la luz azul causó una disrupción en la integridad de la retina. La cuantificación de las medias del espesor mostró que hay diferencias significativas entre los resultados obtenidos de las retinas expuestas a luz azul y el control. Anova *One-way*. Test Sidak de comparación múltiple * $p < 0.05$. Barra de escala 20 μm .

Los resultados obtenidos de la expresión de Brain-specific homeobox/POU domain protein 3A (Brn3a) a 10 días (Figura 53) mostraron que el PRGF, tanto solo como combinado con luz azul, produjo un aumento significativo. A los 30 días (Figura 54), se puede observar un patrón similar.

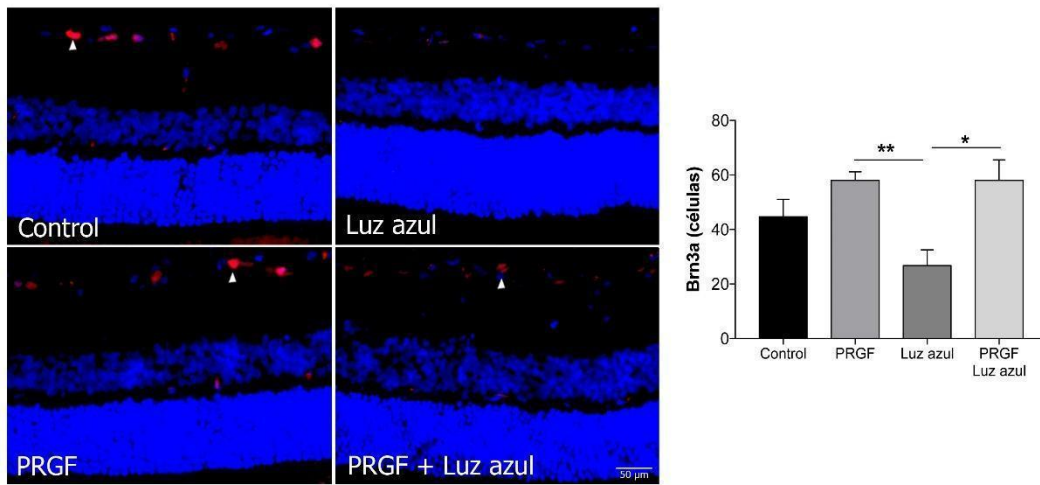


Figura 53. Corte transversal de sección de retina a tiempo 10 días en tinción por inmunofluorescencia de Brn3a (rojo) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados obtenidos mostraron que el PRGF, tanto solo como en combinación con la luz azul, aumentó el número de células positivas comparado con el tratamiento de luz azul. Anova *One-way*. Test Sidak de comparación múltiple * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$. Barra de escala 50 μm .

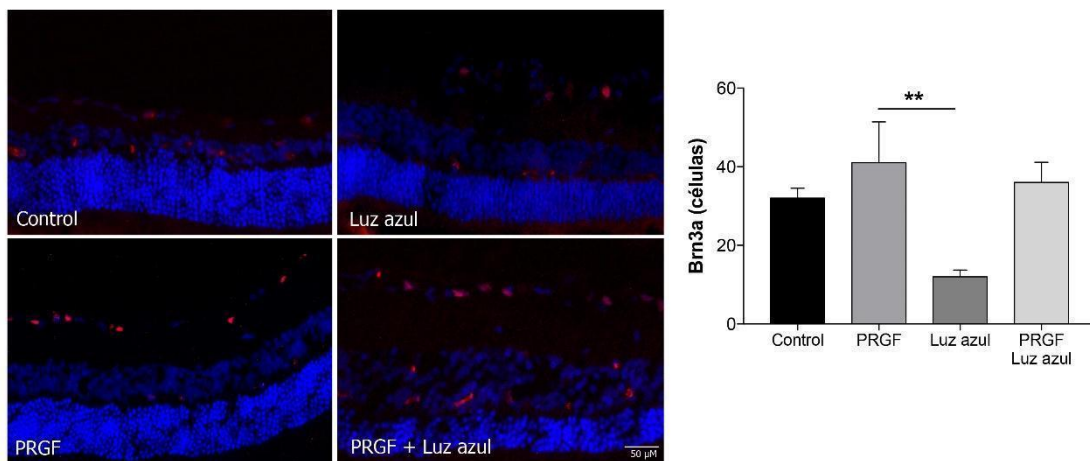


Figura 54. Corte transversal de sección de retina a tiempo 30 días en tinción por inmunofluorescencia de Brn3a (rojo) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados obtenidos mostraron que el PRGF aumentó el número de células positivas comparado con el tratamiento de luz azul. El tratamiento de la combinación de luz azul y PRGF también muestra un nivel similar al del PRGF solo, pero los resultados no son estadísticamente significativos. Anova *One-way*. Test Sidak de comparación múltiple ** $p < 0.005$. Barra de escala 50 μm .

El análisis de las imágenes de inmunofluorescencia para el marcador GFAP (Figura 55) mostró un aumento significativo de su expresión en presencia de luz azul, mientras que ambos tratamientos con PRGF mostraron una expresión menor incluso que los resultados obtenidos en el tratamiento control. Este patrón se produjo tanto a los 10 días como a los 30 (Figura 56), aunque sí se puede ver

que, en el segundo grupo, la expresión es algo mayor en todos los tratamientos. En cuanto a la respuesta del grupo control, el aumento de la expresión de este marcador podría deberse al propio procedimiento invasivo del tratamiento, ya que el suero salino no es capaz de revertir el daño producido y estimula la respuesta de las células gliales.

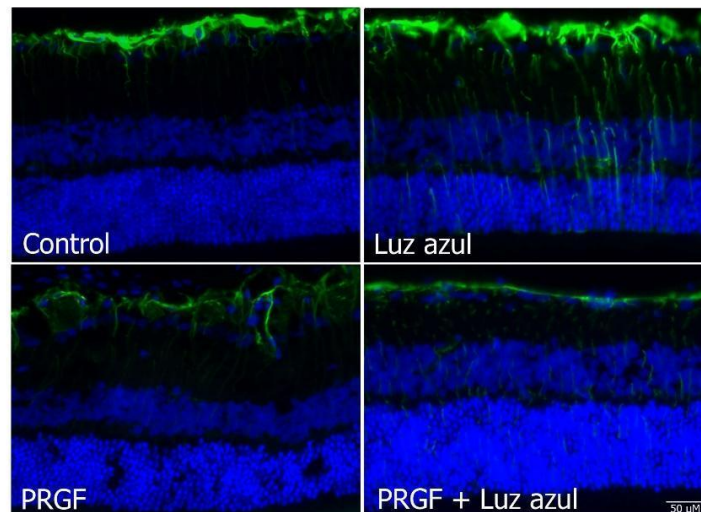


Figura 55. Corte transversal de sección de retina a tiempo 10 días en tinción por inmunofluorescencia de GFAP (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados obtenidos mostraron que la luz azul produjo un aumento en la expresión de este marcador, a diferencia de ambos tratamientos con PRGF, que mostraron una expresión incluso por debajo de la obtenida en el tratamiento control. Barra de escala 50 µm.

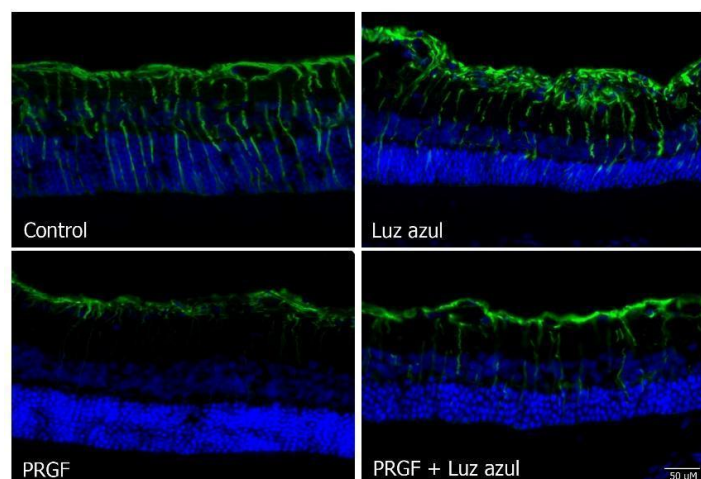


Figura 56. Corte transversal de sección de retina a tiempo 30 días en tinción por inmunofluorescencia de GFAP (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados obtenidos mostraron que la luz azul produjo un aumento en la expresión de este marcador, a diferencia de ambos tratamientos con PRGF, que mostraron una expresión incluso por debajo de la obtenida en el tratamiento control. Barra de escala 50 µm.

Los resultados obtenidos de la expresión de Colin-acetiltransferasa (ChAT) mostraron una gran reducción de su expresión en presencia de luz azul tanto a los 10 días (Figura 57) como a los 30 (Figura 58). En ambos casos, se pudo observar que la expresión de este marcador en los tratamientos de PRGF mostró valores muy similares a los del control.

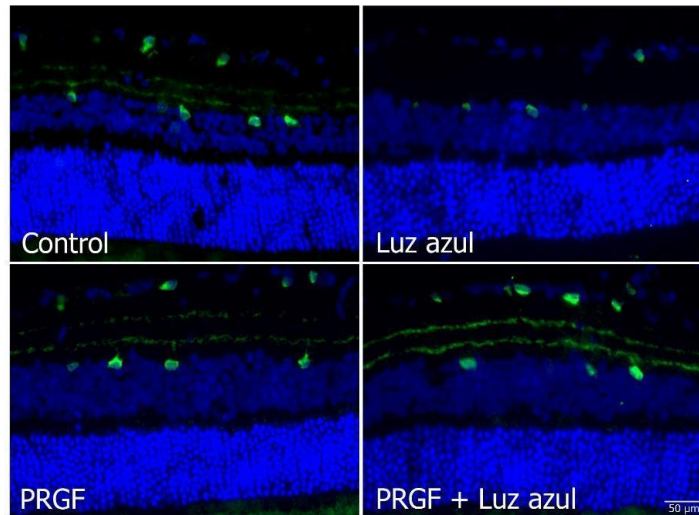


Figura 57. Corte transversal de sección de retina a tiempo 10 días en tinción por inmunofluorescencia de ChAT (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron una disminución de la expresión de este marcador en el tratamiento con luz azul. Ambos tratamientos de PRGF mostraron un patrón de expresión muy similar al del control. Barra de escala 50 µm.

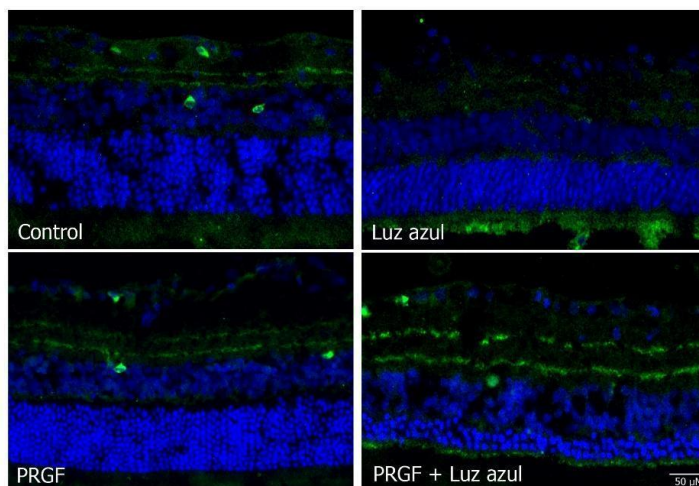


Figura 58. Corte transversal de sección de retina a tiempo 30 días en tinción por inmunofluorescencia de ChAT (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron una disminución de la expresión de este marcador en el tratamiento con luz azul. Ambos tratamientos de PRGF mostraron un patrón de expresión muy similar al del control. Barra de escala 50 µm.

La expresión de HO-1 a los 10 días (Figura 59) aumentó de manera significativa comparando con los tratamientos de PRGF. A los 30 días (Figura 60), también se puede ver una expresión ligeramente elevada en los tratamientos con luz azul, aunque las diferencias no son significativas. Esto probablemente se deba a que este marcador tiene un patrón de expresión vinculado con el tiempo, por lo que se va estabilizando según pasan los días de exposición al daño.

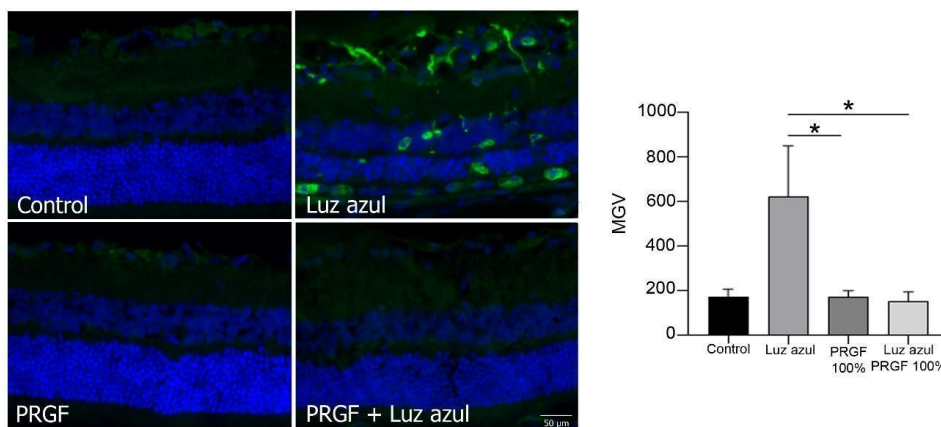


Figura 59. Corte transversal de sección de retina a tiempo 10 en tinción por inmunofluorescencia de HO-1 (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron un aumento en la expresión de HO-1 causado por la presencia de la luz azul. Los resultados del mean gray value (MGV) confirmaron el aumento de expresión en comparación con ambos tratamientos de PRGF. Anova *One-way*. Test Sidak de comparación múltiple * $p < 0.05$ Barra de escala 50 μm

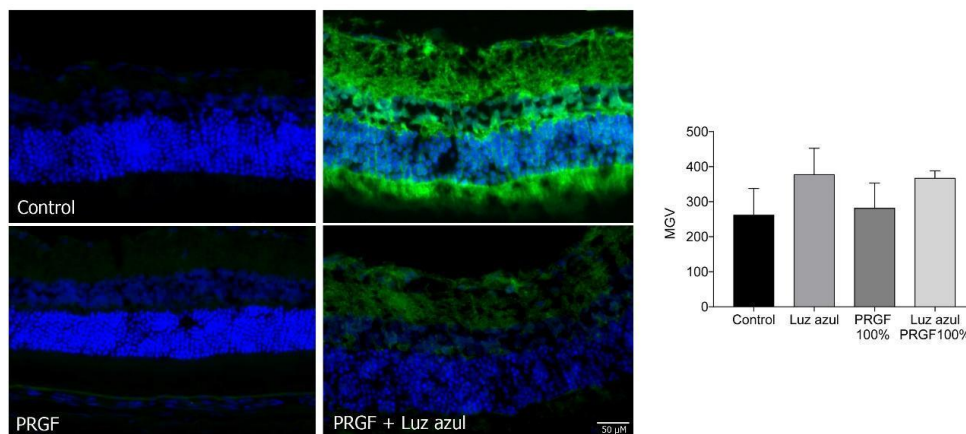


Figura 60. Corte transversal de sección de retina a tiempo 30 en tinción por inmunofluorescencia de HO-1 (verde) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron un aumento en la expresión de HO-1 causado por la presencia de la luz azul. El análisis del MGV no mostró diferencias significativas en la expresión, aunque sí se puede observar una tendencia de incremento en los tratamientos con luz azul. Anova *One-way*. Test Sidak de comparación múltiple. Barra de escala 50 μm .

Los resultados obtenidos mediante el análisis de expresión de la rodopsina mostraron que, a los 10 días (Figura 61), su expresión disminuyó de manera significativa en el tratamiento con luz azul. A los 30 días (Figura 62), también se redujo, sin embargo, los valores no fueron significativos.

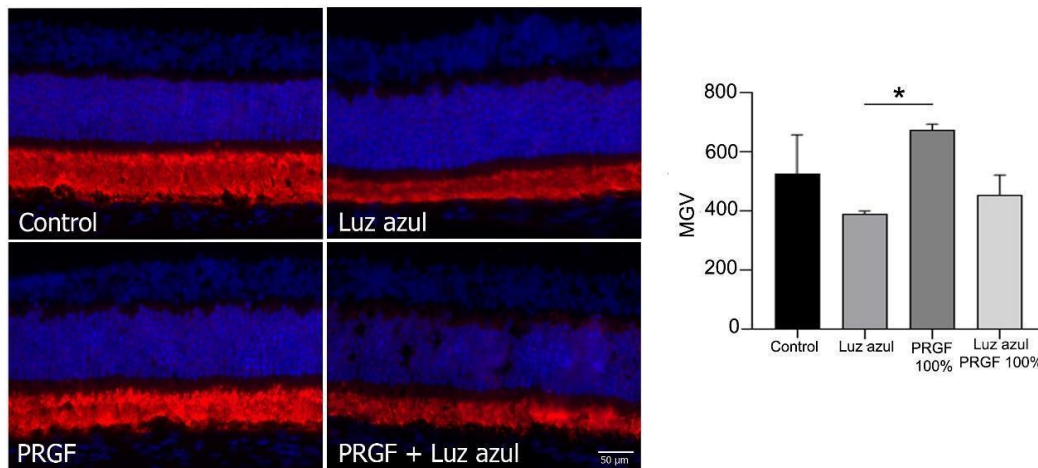


Figura 61. Corte transversal de sección de retina a tiempo 10 en tinción por inmunofluorescencia de Rodopsina (rojo) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron una reducción en la expresión de este marcador en presencia de luz azul en comparación con el tratamiento de PRGF solo. El resto de los grupos experimentales mostraron valores próximos al control. Anova *One-way*. Test Sidak de comparación múltiple. Barra de escala 50 μm .

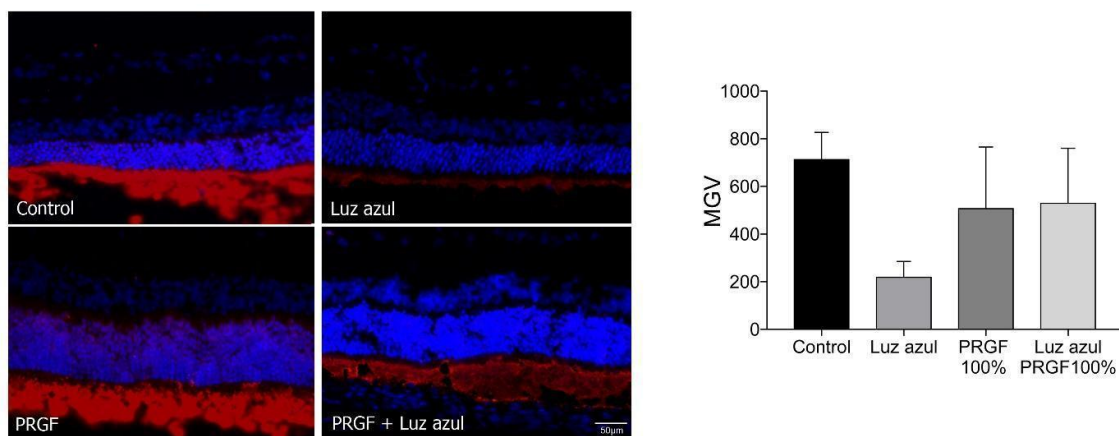


Figura 62. Corte transversal de sección de retina a tiempo 30 en tinción por inmunofluorescencia de Rodopsina (rojo) y DAPI (azul) (n=4). Los resultados mostraron una reducción en la expresión de este marcador en presencia de luz azul en comparación con el tratamiento de PRGF solo. El resto de los grupos experimentales mostraron valores próximos al control. En este caso, el MGV no mostró diferencias significativas entre los grupos, aunque sí se confirma la tendencia. Anova *One-way*. Test Sidak de comparación múltiple. Barra de escala 50 μm .

C4.4. Discusión

La retina es una de las partes más importantes del ojo, ya que es la principal responsable de la visión en los seres vivos. Es un tejido que está compuesto por diferentes tipos celulares, como neuronas, fotorreceptores, o células epiteliales, y todas ellas participan en los diversos procesos bioquímicos llevados a cabo. Por ejemplo, los fotorreceptores controlan el proceso mediante el cual se envían estímulos eléctricos a través del nervio óptico hasta llegar al cerebro, para crear imágenes. Sin embargo, las células del EPR se encargan de nutrir y protegerlos. Por todo esto, es vital que se mantenga la integridad de todos los tipos celulares.

Hay diversos factores que pueden comprometer la supervivencia celular, entre los que se encuentran el estilo de vida, pero también el envejecimiento. Sin embargo, en los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de un nuevo riesgo potencial, la luz azul. Este tipo de luz de longitud de onda corta es capaz de alcanzar las células de la retina y dañar sus estructuras. Este factor supone un riesgo añadido en individuos con patologías previas, ya que podría acelerar o agravar la degeneración, y como consecuencia desembocar en una ceguera parcial o total. Por esta razón, los investigadores llevan años buscando soluciones para frenar este problema.

El PRGF es un plasma que se obtiene de la sangre del propio paciente. Su eficacia ha sido demostrada en diferentes tejidos, donde estimula la proliferación celular, actuando como un adyuvante en la cicatrización, o comportándose como agente antiinflamatorio. En retina, hasta la fecha, ha sido utilizado para tratar determinados casos de agujeros maculares, mostrando resultados positivos tanto en la cicatrización como en la recuperación de la visión. Asimismo, en el capítulo anterior se pudo observar la eficacia del PRGF como antioxidante. Por todo ello, parece que este agente podría actuar como neuroprotector de la retina, preservando su estructura y funcionalidad.

El ERG es una herramienta muy utilizada para determinar el estado de la retina, puesto que proporciona la información de su respuesta frente a un estímulo luminoso.

Capítulo 4

Para poder examinar con mayor precisión el estado retiniano, se elaboró un diseño experimental a corto plazo (10 días) y a medio plazo (30 días), de manera que se pudiera analizar el efecto del PRGF como agente neuroprotector mediante un modelo de fototoxicidad.

Los valores obtenidos mediante ERG a día 10 mostraron que la señal obtenida se ve reducida en todos los casos salvo en el tratamiento de PRGF cuando comparamos los resultados con los obtenidos a tiempo 0. En el caso del control, esta reducción puede ser causada por el propio pinchazo para la inoculación del tratamiento, un procedimiento invasivo no exento de riesgos. No se puede descartar que se haya producido una pequeña fuga del humor vítreo, generando una disminución de la presión intraocular. Además, a posteriori, se notificó, por parte de la empresa fabricante, un defecto en las agujas empleadas para el suministro del tratamiento que implicaba la posible aparición de inflamación e irritación por la deposición de residuos de silicona, de modo que podría influir en la aparición de los daños. No obstante, los resultados obtenidos del tratamiento con luz azul sí mostraron una reducción significativa de la señal comparando con el control.

Por otra parte, si se analizan los resultados obtenidos de la P_{Io}, no se observan diferencias significativas entre los tratamientos. Este resultado es interesante, puesto que, en caso de producirse un aumento en la presión intraocular, podría alterar otras estructuras celulares causando un efecto indeseado.

En los resultados obtenidos a 30 días se puede ver que la respuesta de la retina medida mediante ERG se reduce de manera significativa en el tratamiento de luz azul comparando con los valores obtenidos a T₀. Sin embargo, en el resto de los tratamientos se puede observar que hay una tendencia a igualarse a los valores de referencia. Esto muestra que la luz azul produce daños en los fotorreceptores. Cabe destacar que el tratamiento con PRGF también sigue la tendencia a igualarse con el valor obtenido a tiempo 0, lo cual indica que un solo pinchazo de PRGF ya es capaz de proteger a la retina frente al daño producido por luz azul, al menos durante 30 días. Los valores de P_{Io} no son significativos, aunque

sí podemos observar una tendencia ligeramente más alta en el tratamiento de luz azul.

El estudio inmunohistoquímico de las muestras obtenidas a 10 días mostró que la luz azul aumenta de manera significativa el espesor del tejido. Algunos autores sugieren que, en las etapas iniciales del daño, las células de la retina se hinchan y deforman, generando un patrón desordenado. Sin embargo, a medida que pasa el tiempo, la retina va adelgazando, perdiendo capas celulares y, por lo tanto, funcionalidad. Cuando se analizan los resultados obtenidos a 30 días, se puede comprobar que es eso lo que ocurre, ya que el tratamiento con luz azul mostró un estrechamiento del espesor estadísticamente significativo comparado con el control. Asimismo, se puede ver que el tratamiento combinado de PRGF y luz azul mostró resultados muy similares a los obtenidos en el control.

Además, se analizaron diferentes marcadores para poder conocer el estado celular. Brn3a es un marcador de células ganglionares^{352,353}. En este caso, se puede observar que la luz azul produjo, tanto a día 10 como a día 30, una reducción significativa en el número de células Brn3a positivas. Esto está apoyado por los trabajos de otros investigadores, que muestran que la luz azul reduce la supervivencia de las células ganglionares, produciendo una disminución en la recogida de información visual que se envía a los fotorreceptores y, por lo tanto, reduciendo el campo visual. Los análisis llevados a cabo de ChAT, que es un marcador de células neuronales^{166,354}, son similares a los obtenidos con Brn3a. En este caso, al producirse una reducción del número de neuronas inducida por la presencia de la luz azul se disminuiría la capacidad visual. Los resultados obtenidos del análisis de la rodopsina, un marcador de bastones^{215,311,353,355}, muestran que la luz azul también reduce su presencia. En los datos obtenidos a día 10 se pueden observar con mayor facilidad las diferencias entre los distintos tratamientos, mientras que en el día 30 los valores son algo más heterogéneos en los grupos con tratamiento de PRGF, de manera que no se observan diferencias estadísticamente significativas a pesar de la reducción drástica de rodopsina en el grupo expuesto únicamente a luz azul. Esto podría tener como consecuencia la alteración de la visión en condiciones escotópicas, puesto que los bastones son

las células implicadas en ese tipo de visión. GFAP es un marcador expresado por distintos tipos celulares del SNC^{247,356-360}, como los astrocitos o las células de Müller, como respuesta a un estímulo nocivo. También está relacionada a otras proteínas estructurales como la vimentina, y es responsable de la producción de cicatrices por la interacción con el tejido fibroso. Por esta razón, es un buen marcador para daño en las células de la glía. Los resultados a 10 días mostraron diferencias comparando cada uno de los tratamientos. A 30 días, se hace todavía más evidente que la acción de la luz azul aumenta la presencia de daño glial. Asimismo, también se puede observar que el tratamiento de PRGF, tanto en combinación como solo, reduce significativamente su expresión.

Por último, también se analizó la presencia de uno de los marcadores antioxidantes más importantes, HO-1. Los resultados a 10 días mostraron un aumento significativo del marcador en presencia de luz azul. Sin embargo, a los 30 días, los resultados obtenidos fueron menos diferenciados. Esto podría ser indicativo de que la HO-1 sigue un patrón temporal en su expresión, como se había comentado previamente, pero también posiblemente condicionado por la disminución del espesor de la retina.

Finalmente, se podría decir que la luz azul reduce de manera visible la funcionalidad de la retina ya que afecta a los distintos tipos celulares que lo componen. No obstante, la acción del PRGF, tanto a 10 como a 30 días, reduce los signos nocivos producidos por la luz azul, manteniendo los niveles celulares muy próximos a los basales y, por tanto, conservando la integridad celular de la retina.

Discusión

El estudio de las enfermedades neurodegenerativas es de vital importancia no solo por la pérdida de la calidad de vida que supone para las personas que las padecen, sino también por el impacto socioeconómico que conllevan.

Una manera efectiva de analizar las respuestas del SNC es a través de los ojos, ya que actúan como ventanas del cerebro. Por eso, el estudio de enfermedades neurodegenerativas oculares, como la DMAE, puede servir como modelo para, posteriormente, trasladar los hallazgos a otro tipo de enfermedades del SNC, como el Parkinson o el Alzheimer.

La DMAE es una de las causas de pérdida de calidad visual con mayor prevalencia, ya que afecta a cerca de 25 millones de personas en todo el mundo. En el caso de la DMAE seca o atrófica, los tratamientos disponibles en la actualidad para paliarla no son del todo efectivos, ya que mitigan algunos de los efectos secundarios, pero no son capaces de paralizar su avance o revertir sus consecuencias. Por todo esto, encontrar una terapia para tratarla es de vital importancia.

Como se ha explicado anteriormente, las causas de la DMAE no están del todo claras, aunque sí se sabe que hay diversos factores que pueden exacerbarla. Entre estos factores, se encuentra la exposición continua a luces de longitud de onda corta, como la luz azul.

En los últimos años, se ha comprobado que los tratamientos basados en el uso de factores de crecimiento mejoran la regeneración celular. En este respecto, el PRGF, que es un hemoderivado autólogo, podría ser una buena alternativa. Debido a su composición rica en factores de crecimiento y libre de la serie blanca, que podría causar reacciones inflamatorias, su utilización como fármaco para el tratamiento de enfermedades ha ido ganando peso en la práctica clínica. En implantología oral y traumatología, se ha utilizado ampliamente para favorecer la cicatrización de heridas, ya que promueve la regeneración celular, mediante la estimulación de la proliferación celular, y reduciendo la aparición de procesos inflamatorios. En oftalmología, es utilizado como tratamiento de enfermedades de la superficie ocular, como defectos epiteliales u ojo seco. Además, su efecto

beneficioso también ha sido comprobado en el tratamiento de agujeros maculares, sugiriendo que podría ser una buena vía terapéutica para tratar enfermedades como la DMAE.

Por todo esto, se ha estudiado el efecto beneficioso del PRGF en un modelo de fototoxicidad por luz azul como posible tratamiento para enfermedades como la DMAE.

Debido a la importancia del estrés oxidativo en el avance de las enfermedades neurodegenerativas, lo primero que se analizó fue el efecto antioxidante del PRGF. Los resultados obtenidos en el modelo de fototoxicidad mostraron que el PRGF reduce el estrés oxidativo de las células, ya que estimula los propios mecanismos antioxidantes presentes en ellas. Asimismo, mantiene la actividad mitocondrial en rangos muy próximos a los basales. Además, durante estos estudios también se pudo comprobar que el PRGF en sí mismo no produce modificaciones moleculares en las células ni en sus mitocondrias, sino que solo actúa cuando detecta la presencia de algún agente oxidante, como es la luz azul. Esto es de gran utilidad, puesto que las alteraciones celulares podrían producir efectos secundarios indeseados.

Además de la luz azul, también existen diversos agentes que afectan de manera selectiva a la actividad mitocondrial, bloqueando alguno de los complejos de la cadena de transporte de electrones. Para estudiar el comportamiento del PRGF en presencia de deficiencias mitocondriales, también se analizaron dos agentes bloqueantes: la azida sódica y la rotenona. En este caso, los datos preliminares sugieren que la acción protectora del PRGF podría estar centrada en los complejos I, II y III, ya que se vio mayor protección en presencia de la rotenona y de la luz azul que de la azida sódica.

Durante este análisis comparativo, se realizó un estudio de dos importantes tipos de muerte celular: la apoptosis y la necroptosis. Aunque todavía preliminares, los resultados obtenidos parecen corroborar las investigaciones llevadas a cabo por otros equipos, en las que la rotenona y la azida sódica muestran marcadores de muerte celular mayoritariamente apoptóticos. Asimismo, la bibliografía es

heterogénea en cuanto al tipo o tipos de muerte celular que la luz azul podría activar. Algunos autores sugieren que activa rutas apoptóticas, mientras que otros necroptóticas. En este caso, los resultados obtenidos parecen mostrar que la luz azul podría poner en marcha ambas rutas de muerte celular. Por su parte, el PRGF parece reducir las señales de muerte celular en presencia de rotenona y de luz azul. En cuanto a la azida sódica, los resultados parecen mostrar que el PRGF no produce una disminución de sus efectos tóxicos. A pesar de que tanto la rotenona como la azida sódica activan rutas de muerte apoptóticas, cabe destacar que ambas están desencadenadas por el bloqueo de distintos complejos de la cadena de transporte de electrones mitocondriales. Esto sugiere que la acción protectora del PRGF no se lleva a cabo de la misma forma en todos los complejos mitocondriales, por lo que sería interesante analizarlo en mayor profundidad en trabajos futuros.

Una de las vías de autorrenovación celular es la autofagia, ya que es un mecanismo que destruye componentes celulares que están dañados y estimula, así, su síntesis de nuevo. El estudio de la acción del PRGF y la fototoxicidad sobre la autofagia mostró que el PRGF por sí solo no aumenta la autofagia, lo cual sugiere que, en condiciones basales, no produce daño celular y por tanto no se requiere de una renovación de los componentes celulares. Sin embargo, cuando el PRGF se combina con el daño producido por luz azul, se promueve la autofagia incluso por encima de los niveles producidos únicamente por el daño. Este resultado se puede correlacionar con los resultados anteriores, sugiriendo que el PRGF solo actúa en presencia de daño, favoreciendo así la renovación celular y el mejor funcionamiento de los mecanismos moleculares de las células.

El efecto del PRGF como protector de la funcionalidad celular tras un daño producido por luz azul a corto y a medio plazo es fundamental para su potencial aplicación clínica. Los resultados mostraron que la luz azul redujo de manera significativa la funcionalidad celular en ambos modelos temporales. Sin embargo, el PRGF combinado con la luz azul mantuvo niveles de funcionalidad muy próximos al control en todas las pruebas realizadas. Esto podría ser de gran importancia, ya que el mantenimiento de la funcionalidad retiniana es una de las

premisas más estudiadas tanto en investigación preclínica como clínica. Además, es importante remarcar que estos resultados fueron obtenidos con una sola administración de PRGF en un tiempo concreto. Esto sugiere que el efecto protector del PRGF se mantiene, al menos, durante 30 días de experimentación, lo cual puede ser útil para conocer la posología del tratamiento en clínica. Asimismo, también sería interesante analizar las respuestas retinianas en un periodo de tiempo aún mayor, para analizar su evolución en un modelo a largo plazo y comprobar durante cuánto tiempo se mantiene el efecto protector del PRGF.

Por otra parte, este estudio también abre la puerta a otras investigaciones futuras, en las que la vía de administración del PRGF fuese tópica y no intravítrea. De esta manera, se eliminarían las posibles reacciones inmunológicas producidas al administrar el PRGF, ya que la inyección podría causar heridas.

En general, los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis doctoral sugieren que el PRGF tiene una acción protectora combinada, tanto a nivel de daño oxidativo, como promotor de rutas de renovación celular, o como protector de la funcionalidad celular cuando detecta un daño. Por sí solo, parece que no modifica las bases moleculares de las células, por lo que se podría concluir que su acción solo se pone en marcha en presencia de agentes tóxicos o nocivos, lo cual es muy interesante ya que no produciría efectos secundarios indeseados.

Conclusiones

1. Con la literatura como referencia, se ha corroborado que la luz azul promueve la aparición de estrés oxidativo en células del EPR, ya que aumenta la presencia de ERO y disminuye la actividad mitocondrial, causando daño y muerte celular y, por tanto, alterando la integridad de la retina.
2. El PRGF protege a las células del EPR frente al estrés oxidativo producido por el efecto fototóxico de la luz azul ya que estimula sus propias rutas antioxidantes, conservando la actividad mitocondrial.
3. El PRGF protege a las células del EPR frente a la activación de diversas rutas de muerte celular, como la apoptosis y la necroptosis, reduciendo la expresión de marcadores de muerte celular promovidos por agentes tóxicos que ejercen una acción directa sobre la mitocondria.
4. El PRGF estimula rutas de renovación celular, como la autofagia, en un modelo de fototoxicidad por luz azul, favoreciendo la conservación de los componentes celulares dañados.
5. Una única dosis de PRGF en el modelo *in vivo* protege a la retina y su funcionalidad frente al daño fototóxico crónico, prolongándose su efecto varias semanas tras su aplicación.

Bibliografía

- 1 Levy-Schoen A. Eye movements and vision. *Neuropsychologia* 1968; **6**: 389–390.
- 2 Sutherland S. Eye, brain and vision. *Nature* 1993; **362**: 419–420.
- 3 Sivak JG. Clinical anatomy of the eye. *Optom Vis Sci* 1990; **67**: 153.
- 4 Atchison DA. Optics of the human eye. In: *Encyclopedia of Modern Optics*. 2018, pp 43–63.
- 5 Cholkar K, Dasari SR, Pal D, Mitra AK. Eye: Anatomy, physiology and barriers to drug delivery. In: *Ocular Transporters and Receptors: Their Role in Drug Delivery*. Elsevier Ltd., 2013, pp 1–36.
- 6 Dobbs SM, Gregory RL. Eye and Brain: The Psychology of Seeing. *Art Educ* 1969; **22**: 32.
- 7 Forrester J V, Dick AD, McMenamin PG, Roberts F. *The Eye, 4th Edition*. 2016.
- 8 Wassle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol. Rev.* 1991; **71**: 447–480.
- 9 Sefton A. The Vertebrate Retina: Principles of Structure and Function. *Med J Aust* 1975; **2**: 610–610.
- 10 Masland RH. The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci* 2001; **4**: 877–886.
- 11 Sterling P. The retina. An approachable part of the brain. *Cell* 1988; **53**: 175–176.
- 12 Fisher CR, Ferrington DA. Perspective on AMD pathobiology: A bioenergetic crisis in the RPE. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2018; **59**: 41–47.
- 13 Nowak JZ. Age-related macular degeneration (AMD): Pathogenesis and therapy. *Pharmacol Reports* 2006; **58**: 353–363.
- 14 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**: 270–277.
- 15 Punjab OS, Kaiser PK. Complement therapy in dry age-related macular degeneration. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2013; **10**: 5–10.
- 16 Gehrs KM, Anderson DH, Johnson L V., Hageman GS. Age-related

- macular degeneration - Emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med* 2006; **38**: 450–471.
- 17 Ivandic BT, Ivandic T. Low-Level Laser Therapy Improves Vision in Patients with Age-Related Macular Degeneration. *Photomed Laser Surg* 2008; **26**: 241–245.
- 18 Hernández-Zimbrón LF, Zamora-Alvarado R, Ochoa-De La Paz L, Velez-Montoya R, Zenteno E, Gullias-Cañizo R *et al.* Age-Related Macular Degeneration: New Paradigms for Treatment and Management of AMD. *Oxid Med Cell Longev* 2018; **2018**: 1–14.
- 19 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.
- 20 by Nature Education S. Contents of Cell Biology for Seminars | Learn Science at Scitable. 2014.<https://www.nature.com/scitable/ebooks/cell-biology-for-seminars-14760004/129391449/>.
- 21 Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Hudson G, Chinnery PF. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet* 2009; **46**: 145–158.
- 22 Van Der Blik AM. Fussy mitochondria fuse in response to stress. *EMBO J* 2009; **28**: 1533–1534.
- 23 Takemoto K, Miyata S, Takamura H, Katayama T, Tohyama M. Mitochondrial TRAP1 regulates the unfolded protein response in the endoplasmic reticulum. *Neurochem Int* 2011; **58**: 880–887.
- 24 Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007; **12**: 913–22.
- 25 Contreras L, Drago I, Zampese E, Pozzan T. Mitochondria: The calcium connection. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* 2010; **1797**: 607–618.
- 26 Tezel G. Oxidative stress in glaucomatous neurodegeneration: Mechanisms and consequences. *Prog Retin Eye Res* 2006; **25**: 490–513.
- 27 Samper E, Nicholls DG, Melov S. Mitochondrial oxidative stress causes chromosomal instability of mouse embryonic fibroblasts. *Aging Cell* 2003; **2**: 277–285.
- 28 Beatty S, Koh HH, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000; **45**: 115–134.

- 29 Tezel G, Yang X, Luo C, Kain AD, Powell DW, Kuehn MH *et al.* Oxidative stress and the regulation of complement activation in human glaucoma. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2010; **51**: 5071–5082.
- 30 Chrysostomou V, Rezanian F, Trounce IA, Crowston JG. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 2013; **13**: 12–15.
- 31 Ryter SW, Hong PK, Hoetzel A, Park JW, Nakhira K, Wang X *et al.* Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxidants Redox Signal*. 2007; **9**: 49–89.
- 32 Katsuragi Y, Ichimura Y, Komatsu M. Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. *Curr Opin Toxicol* 2016; **1**: 54–61.
- 33 Sachdeva MM, Cano M, Handa JT. Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp Eye Res* 2014; **119**: 111–114.
- 34 Vu KT, Hulleman JD. An inducible form of Nrf2 confers enhanced protection against acute oxidative stresses in RPE cells. *Exp Eye Res* 2017; **164**: 31–36.
- 35 He M, Pan H, Chang RC-CC, So K-FF, 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. *PLoS One* 2014; **9**: 84800.
- 36 Zhu C, Dong Y, Liu H, Ren H, Cui Z. Hesperetin protects against H₂O₂-triggered oxidative damage via upregulation of the Keap1-Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells. *Biomed Pharmacother* 2017; **88**: 124–133.
- 37 Kansanen E, Kuosmanen SM, Leinonen H, Levonenn AL. The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biol* 2013; **1**: 45–49.
- 38 Hanus J, Kolkin A, Chimienti J, Botsay S, Wang S. 4-acetoxyphenol prevents RPE oxidative stress-induced necrosis by functioning as an NRF2 stabilizer. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2015; **56**: 5048–5059.
- 39 Balogun E, Hoque M, Gong P, Killeen E, Green CJ, Foresti R *et al.* Curcumin activates the haem oxygenase-1 gene via regulation of Nrf2 and the antioxidant-responsive element. *Biochem J* 2003; **371**: 887–95.
- 40 Ichimura Y, Komatsu M. Activation of p62/SQSTM1-keap1-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 pathway in cancer. *Front Oncol* 2018; **8**: 210.

- 41 Takayama K, Kaneko H, Kataoka K, Kimoto R, Hwang S-J, Ye F *et al.* Nuclear Factor (Erythroid-Derived)-Related Factor 2-Associated Retinal Pigment Epithelial Cell Protection under Blue Light-Induced Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 1–9.
- 42 Zhang H, Liu YY, Jiang Q, Li KR, Zhao YX, Cao C *et al.* Salvianolic acid A protects RPE cells against oxidative stress through activation of Nrf2/HO-1 signaling. *Free Radic Biol Med* 2014; **69**: 219–228.
- 43 Trotter LA, Patel D, Dubin S, Guerra C, McCloud V, Lockwood P *et al.* Violet/blue light activates Nrf2 signaling and modulates the inflammatory response of THP-1 monocytes. *Photochem Photobiol Sci* 2017; **16**: 883–889.
- 44 Saviranta NMM, Veeroos L, Granlund LJ, Hassinen VH, Kaarniranta K, Karjalainen RO. Plant flavonol quercetin and isoflavone biochanin A differentially induce protection against oxidative stress and inflammation in ARPE-19 cells. *Food Res Int* 2011; **44**: 109–113.
- 45 Juan SH, Cheng TH, Lin HC, Chu YL, Lee W Sen. Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Pharmacol* 2005; **69**: 41–48.
- 46 Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; **50**: 323–354.
- 47 Kutty RK, Nagineni CN, Kutty G, Hooks JJ, Chader GJ, Wiggert B. Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor-beta. *J Cell Physiol* 1994; **159**: 371–378.
- 48 Lever JM, Boddu R, George JF, Agarwal A. Heme oxygenase-1 in kidney health and disease. *Antioxidants Redox Signal* 2016; **25**: 165–183.
- 49 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**: 1297–304.
- 50 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**: 52–66.
- 51 Ross D, Siegel D. NQO1 in protection against oxidative stress. *Curr. Opin. Toxicol.* 2018; **7**: 67–72.
- 52 Ross D, Siegel D. Functions of NQO1 in cellular protection and CoQ10

- metabolism and its potential role as a redox sensitive molecular switch. *Front Physiol* 2017; **8**: 1–10.
- 53 Zou X, Feng Z, Li Y, Wang Y, Wertz K, Weber P *et al.* Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: Activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J Nutr Biochem* 2012; **23**: 994–1006.
- 54 Ho Y-C, Huang F-M, Chang Y-C. Cytotoxicity of formaldehyde on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2007; **83**: 340–344.
- 55 Xu X, Chua CC, Kong J, Kostrzewa RM, Kumaraguru U, Hamdy RC *et al.* Necrostatin-1 protects against glutamate-induced glutathione depletion and caspase-independent cell death in HT-22 cells. *J Neurochem* 2007; **103**: 2004–2014.
- 56 Gosbell AD, Stefanovic N, Scurr LL, Pete J, Kola I, Favilla I *et al.* Retinal light damage: Structural and functional effects of the antioxidant glutathione peroxidase-1. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 2613–2622.
- 57 Kim CY, Lee C, Park GH, Jang JH. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against β -amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity. *Arch Pharm Res* 2009; **32**: 869–881.
- 58 Michael R, Bron AJ. The ageing lens and cataract: a model of normal and pathological ageing. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* 2011; **366**: 1278–1292.
- 59 Trachsel-Moncho L, Benlloch-Navarro S, Fernández-Carbonell Á, Ramírez-Lamelas DT, Olivar T, Silvestre D *et al.* Oxidative stress and autophagy-related changes during retinal degeneration and development. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 1–12.
- 60 Franklin CC, Backos DS, Mohar I, White CC, Forman HJ, Kavanagh TJ. Structure, function, and post-translational regulation of the catalytic and modifier subunits of glutamate cysteine ligase. *Mol. Aspects Med.* 2009; **30**: 86–98.
- 61 Charles I, Khalyfa A, Kumar DM, Krishnamoorthy RR, Roque RS, Cooper N *et al.* Serum deprivation induces apoptotic cell death of transformed rat retinal ganglion cells via mitochondrial signaling pathways. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2005; **46**: 1330–1338.
- 62 Lee WH, Joshi P, Wen R. Glutathione S-transferase pi isoform (GSTP1)

- expression in murine retina increases with developmental maturity. *Adv Exp Med Biol* 2014; **801**: 23–30.
- 63 Meier P, Finch A, Evan G. Apoptosis in development. *Nature* 2000; **407**: 796–801.
- 64 Konopleva M, Zhao S, Xie Z, Segall H, Younes A, Claxton DF *et al.* Apoptosis: Molecules and mechanisms. *Adv Exp Med Biol* 1999; **457**: 217–236.
- 65 Lawen A. Apoptosis - An introduction. *BioEssays* 2003; **25**: 888–896.
- 66 Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997; **326**: 1–16.
- 67 Savitskaya MA, Onishchenko GE. Mechanisms of apoptosis. *Biochem* 2015; **80**: 1393–1405.
- 68 Frudd K, Burgoyne T, Burgoyne JR. Oxidation of Atg3 and Atg7 mediates inhibition of autophagy. *Nat Commun* 2018; **9**: 1–15.
- 69 Qian M, Fang X, Wang X. Autophagy and inflammation. *Clin Transl Med* 2017; **6**: 24.
- 70 Szatmári-Tóth M, Kristóf E, Veréb Z, Akhtar S, Facskó A, Fésüs L *et al.* Clearance of autophagy-associated dying retinal pigment epithelial cells – a possible source for inflammation in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis* 2016; **7**: 1–13.
- 71 Glick D, Barth S, Macleod KF. Autophagy: Cellular and molecular mechanisms. *J Pathol* 2010; **221**: 3–12.
- 72 Li GY, Fan B, Zheng YC. Calcium overload is a critical step in programmed necrosis of ARPE-19 cells induced by high-concentration H₂O₂. *Biomed Environ Sci* 2010; **23**: 371–377.
- 73 Manuscript A. Pathogen subversion of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe* 2010; **7**: 302–313.
- 74 Toro G De. Muerte celular programada . Revisión del paradigma apoptosis-necrosis y formas alternativas de muerte celular. *Apoptosis* 2006; : 1–6.
- 75 Tezel G, Yang X, Yang J, Wax MB. Role of tumor necrosis factor receptor-1 in the death of retinal ganglion cells following optic nerve crush injury in mice. *Brain Res* 2004; **996**: 202–212.

- 76 Ornatowski W, Lu Q, Yegambaram M, Garcia AE, Zemskov EA, Maltepe E *et al.* Complex interplay between autophagy and oxidative stress in the development of pulmonary disease. *Redox Biol* 2020; **36**: 101679.
- 77 Kim JY, Zhao H, Martinez J, Doggett TA, Kolesnikov A V., Tang PH *et al.* Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell* 2013; **154**: 365–376.
- 78 Christofferson DE, Yuan J. Necroptosis as an alternative form of programmed cell death. *Curr Opin Cell Biol* 2010; **22**: 263–268.
- 79 Kim SJ, Li J. Caspase blockade induces RIP3-mediated programmed necrosis in Toll-like receptor-activated microglia. *Cell Death Dis* 2013; **4**. doi:10.1038/cddis.2013.238.
- 80 Sosna J, Voigt S, Mathieu S, Lange A, Thon L, Davarnia P *et al.* TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death. *Cell Mol Life Sci* 2014; **71**: 331–348.
- 81 Salvesen GS, Dixit VM. Caspase activation: The induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; **96**: 10964–10967.
- 82 Johnston A, Wang Z. Necroptosis: MLKL Polymerization. *J Nat Sci* 2018; **4**: 1–10.
- 83 Jouan-Lanhouet S, Arshad MI, Piquet-Pellorce C, Martin-Chouly C, Le Moigne-Muller G, Van Herreweghe F *et al.* TRAIL induces necroptosis involving RIPK1/RIPK3-dependent PARP-1 activation. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 2003–2014.
- 84 Hanus J, Anderson C, Sarraf D, Ma J, Wang S. Retinal pigment epithelial cell necroptosis in response to sodium iodate. *Cell Death Discov* 2016; **2**: 1–9.
- 85 del Olmo-Aguado S, Núñez-Álvarez C, Osborne NN. Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. *Neurochem Res* 2016; **41**: 2324–2335.
- 86 Callizot N, Combes M, Henriques A, Poindron P. Necrosis, apoptosis, necroptosis, three modes of action of dopaminergic neuron neurotoxins. *PLoS One* 2019; **14**: 0215277.
- 87 Marshall KD, Baines CP. Necroptosis: Is there a role for mitochondria? *Front Physiol* 2014; **5** AUG: 1–5.
- 88 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**: 221–232.
- 89 Rosenbaum DM, Degterev A, David J, Rosenbaum PS, Roth S, Grotta JC *et al.* Necroptosis, a novel form of caspase-independent cell death, contributes to neuronal damage in a retinal ischemia-reperfusion injury model. *J Neurosci Res* 2010; **88**: 1569–1576.
- 90 Wang Y, Zhang M, Sun Y, Wang X, Song Z, Li H *et al.* Role of short-wavelength blue light in the formation of cataracts and the expression of caspase-1, caspase-11, Gasdermin D in rat lens epithelial cells: Insights into a novel pathogenic mechanism of cataracts. *BMC Ophthalmol* 2020; **20**: 289.
- 91 Ausch C, Buxhofer-Ausch V, Olszewski U, Hinterberger W, Ogris E, Schiessel R *et al.* Caspase-cleaved cytokeratin 18 fragment (M30) as marker of postoperative residual tumor load in colon cancer patients. *Eur J Surg Oncol* 2009; **35**: 1164–1168.
- 92 Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T. Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *J Biol Chem* 2005; **280**: 857–860.
- 93 Yang P, Peairs JJ, Tano R, Zhang N, Tyrell J, Jaffe GJ. Caspase-8-mediated apoptosis in human RPE cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: 3341–3349.
- 94 Nakanishi Y, Nakamura M, Mukuno H, Kanamori A, Seigel GM, Negi A. Latanoprost rescues retinal neuro-glial cells from apoptosis by inhibiting caspase-3, which is mediated by p44/p42 mitogen-activated protein kinase. *Exp Eye Res* 2006; **83**: 1108–1117.
- 95 Feng S, Yang Y, Mei Y, Ma L, Zhu D *et al.*, Hoti N *et al.* Cleavage of RIP3 inactivates its caspase-independent apoptosis pathway by removal of kinase domain. *Cell Signal* 2007; **19**: 2056–2067.
- 96 He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L *et al.* Receptor Interacting Protein Kinase-3 Determines Cellular Necrotic Response to TNF- α . *Cell* 2009; **137**: 1100–1111.
- 97 Besirli C, And ;, Zacks DN. Medical retina feature story. Retinal Neuroprotection. 2003; **44**: 1262–1267.
- 98 Li G-Y, 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**: 35–43.
- 99 Tezel G, Yang X. Caspase-independent component of retinal ganglion cell death, in vitro. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 4049–4059.
- 100 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**: 3341.
- 101 Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I. Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2007; **48**: 2753–2759.
- 102 Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT *et al.* The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF- κ B Mediator in Tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; **13**: 343–354.
- 103 Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalapour S, Wong J *et al.* NF- κ B Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* 2016; **164**: 896–910.
- 104 Vanlangenakker N, Vanden Berghe T, Bogaert P, Laukens B, Zobel K, Deshayes K *et al.* cIAP1 and TAK1 protect cells from TNF-induced necrosis by preventing RIP1/RIP3-dependent reactive oxygen species production. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 656–665.
- 105 Arslan SÇ, Scheidereit C. The prevalence of TNF α -induced necrosis over apoptosis is determined by TAK1-RIP1 interplay. *PLoS One* 2011; **6**. doi:10.1371/journal.pone.0026069.
- 106 Zambrano S, de Toma I, Piffer A, Bianchi ME, Agresti A. NF- κ B oscillations translate into functionally related patterns of gene expression. *Elife* 2016; **5**: 1–38.
- 107 Okamoto T, Ozawa Y, Kamoshita M, Osada H, Toda E, Kurihara T *et al.* The neuroprotective effect of rapamycin as a modulator of the mTOR-NF-KB axis during retinal inflammation. *PLoS One* 2016; **11**: 1–14.
- 108 Wang L, Cano M, Handa JT. P62 provides dual cytoprotection against oxidative stress in the retinal pigment epithelium. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2014; **1843**: 1248–1258.
- 109 Marchesi N, Thongon N, Pascale A, Provenzani A, Koskela A, Korhonen E *et al.* Autophagy Stimulus Promotes Early HuR Protein Activation and p62/SQSTM1 Protein Synthesis in ARPE-19 Cells by Triggering Erk1/2,

- p38MAPK, and JNK Kinase Pathways. *Oxid Med Cell Longev* 2018; **2018**: 1–15.
- 110 Song C, Mitter SK, Qi X, Beli E, Rao H V., Ding J *et al.* Oxidative stress-mediated NF κ B phosphorylation upregulates p62/SQSTM1 and promotes retinal pigmented epithelial cell survival through increased autophagy. *PLoS One* 2017; **12**: 1–26.
- 111 Su J, Liu F, Xia M, Xu Y, Li X, Kang J *et al.* p62 participates in the inhibition of NF- κ B signaling and apoptosis induced by sulfasalazine in human glioma U251 cells. *Oncol Rep* 2015; **34**: 235–243.
- 112 Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL *et al.* p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cell Mol Biol Lett* 2016; **21**: 1–14.
- 113 Duran A, Linares JF, Galvez AS, Wikenheiser K, Flores JM, Diaz-Meco MT *et al.* The Signaling Adaptor p62 Is an Important NF- κ B Mediator in Tumorigenesis. *Cancer Cell* 2008; **13**: 343–354.
- 114 Mizushima N, Yoshimori T. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* 2007; **3**: 542–545.
- 115 Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 and autophagy. *Methods Mol Biol* 2008; **445**: 77–88.
- 116 Golestaneh N, Chu Y, Xiao YY, Stoleru GL, Theos AC. Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis* 2017; **8**: 1–13.
- 117 Josifovska N, Albert R, Nagymihály R, Lytvynchuk L, Moe MC, Kaarniranta K *et al.* Resveratrol as inducer of autophagy, pro-survival, and anti-inflammatory stimuli in cultured human RPE cells. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 1–12.
- 118 Sakakura K, Takahashi H, Kaira K, Toyoda M, Oyama T, Chikamatsu K. Immunological significance of the accumulation of autophagy components in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Sci* 2015; **106**: 1–8.
- 119 Graf MR, Jia W, Johnson RS, Dent P, Mitchell C, Loria RM. Autophagy and the functional roles of Atg5 and beclin-1 in the anti-tumor effects of 3 β androstene 17 α diol neuro-steroid on malignant glioma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; **115**: 137–145.
- 120 Romanov J, Walczak M, Ibiricu I, Schüchner S, Ogris E, Kraft C *et al.*

- Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J* 2012; **31**: 4304–4317.
- 121 Tang JY, Fang YY, Edward H, Huang YC, Hsu NCH, Yang WC *et al.* Immunopositivity of Beclin-1 and ATG5 as indicators of survival and disease recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2013; **33**: 5611–5616.
- 122 Hu Z, Zhang J, Zhang Q. Expression pattern and functions of autophagy-related gene atg5 in zebrafish organogenesis. *Autophagy* 2011; **7**: 1514–1527.
- 123 Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ.* 2011; **18**: 571–580.
- 124 Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 571–580.
- 125 Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Remé CE. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 2005; **24**: 275–306.
- 126 Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny M V. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; **19**: 107–120.
- 127 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**: 602–609.
- 128 Duprez L, Takahashi N, Van Hauwermeiren F, Vandendriessche B, Goossens V, Vanden Berghe T *et al.* RIP Kinase-Dependent Necrosis Drives Lethal Systemic Inflammatory Response Syndrome. *Immunity* 2011; **35**: 908–918.
- 129 Liu C, Tang J. Expression levels of tumor necrosis factor- α and the corresponding receptors are correlated with trauma severity. *Oncol Lett* 2014; **8**: 2747–2751.
- 130 Harris J. Autophagy and IL-1 family cytokines. *Front Immunol* 2013; **4**: 1–6.
- 131 Liu X, Ye F, Xiong H, Hu D, Limb GA, Xie T *et al.* IL-1 β Upregulates IL-8 Production in Human Müller Cells Through Activation of the p38 MAPK and ERK1/2 Signaling Pathways. *Inflammation* 2014; **37**: 1486–1495.
- 132 Shi H, Zhang Z, Wang X, Li R, Hou W, Bi W *et al.* Inhibition of autophagy

- induces IL-1 β release from ARPE-19 cells via ROS mediated NLRP3 inflammasome activation under high glucose stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; **463**: 1071–1076.
- 133 Himori N, Maruyama K, Yamamoto K, Yasuda M, Ryu M, Omodaka K *et al.* Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res* 2014; **92**: 1134–1142.
- 134 Almasieh M, Zhou Y, Kelly ME, Casanova C, Di Polo A. Structural and functional neuroprotection in glaucoma: Role of galantamine-mediated activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Cell Death Dis* 2010; **1**: 1–11.
- 135 Vidal-Sanz M, Lafuente M, Sobrado-Calvo P, Sellés-Navarro I, Rodriguez E, Mayor-Torroglosa S *et al.* Death and neuroprotection of retinal ganglion cells after different types of injury. *Neurotox Res* 2000; **2**: 215–227.
- 136 Nucci C, Strouthidis NG, Khaw PT. Neuroprotection and other novel therapies for glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 2013; **13**: 1–4.
- 137 Song W, Huang P, Zhang C. Neuroprotective therapies for glaucoma. *Drug Des Devel Ther* 2015; **9**: 1469–1479.
- 138 Osborne NN. Recent clinical findings with memantine should not mean that the idea of neuroprotection in glaucoma is abandoned. *Acta Ophthalmol* 2009; **87**: 450–454.
- 139 Vajda FJE. Neuroprotection and neurodegenerative disease. *J Clin Neurosci* 2002; **9**: 4–8.
- 140 Osborne NN, Chidlow G, Layton CJ, Wood JPM, Casson RJ, Melena J. Optic nerve and neuroprotection strategies. *Eye* 2004; **18**: 1075–1084.
- 141 Doozandeh A, Yazdani S. Neuroprotection in glaucoma. *J Ophthalmic Vis Res* 2016; **11**: 209–220.
- 142 Ablonczy Z, Dahrouj M, Tang PH, Liu Y, Sambamurti K, Marmorstein AD *et al.* Human retinal pigment epithelium cells as functional models for the RPE in vivo. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**: 8614–8620.
- 143 Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakagawa K, Kohno RI *et al.* Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am J*

- Pathol* 2008; **173**: 1326–1338.
- 144 Unterlauff JD, Eichler W, Kuhne K, Mei Yang X, Yafai Y, Wiedemann P *et al.* Pigment epithelium-derived factor released by Müller glial cells exerts neuroprotective effects on retinal ganglion cells. *Neurochem Res* 2012; **37**: 1524–1533.
- 145 Anitua E, de la Fuente M, del Olmo-Aguado S, Suarez-Barrio C, Merayo-Llodes J, Muruzabal F. Plasma rich in growth factors reduces blue light-induced oxidative damage on retinal pigment epithelial cells and restores their homeostasis by modulating vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor expression. *Clin Exp Ophthalmol* 2020; **48**: 830–838.
- 146 Blasiak J, Reiter RJ, Kaarniranta K. Melatonin in Retinal Physiology and Pathology: The Case of Age-Related Macular Degeneration. *Oxid Med Cell Longev* 2016; **2016**: 1–12.
- 147 Argun M, Tök L, Uğuz AC, Çelik Ö, Tök ÖY, Naziroğlu M. Melatonin and amfenac modulate calcium entry, apoptosis, and oxidative stress in ARPE-19 cell culture exposed to blue light irradiation (405 nm). *Eye* 2014; **28**: 752–760.
- 148 Turner PL, Mainster MA. Circadian photoreception: Ageing and the eye's important role in systemic health. *Br J Ophthalmol* 2008; **92**: 1439–1444.
- 149 Contín MA, Benedetto MM, Quinteros-Quintana ML, Guido ME. Light pollution: The possible consequences of excessive illumination on retina. *Eye* 2016; **30**: 255–263.
- 150 Mainster MA. Violet and blue light blocking intraocular lenses: Photoprotection versus photoreception. *Br J Ophthalmol* 2006; **90**: 784–792.
- 151 Zhao ZC, Zhou Y, Tan G, Li J. Research progress about the effect and prevention of blue light on eyes. *Int J Ophthalmol* 2018; **11**: 1999–2003.
- 152 Benedetto MM, Contin MA. Oxidative stress in retinal degeneration promoted by constant LED light. *Front Cell Neurosci* 2019; **13**: 1–11.
- 153 Drew VJ, Tseng CL, Seghatchian J, Burnouf T. Reflections on dry eye syndrome treatment: Therapeutic role of blood products. *Front Med* 2018; **5**: 1–11.
- 154 Chew EY, Clemons TE, SanGiovanni JP, Danis R, Ferris FL, Elman M *et al.* Lutein + zeaxanthin and omega-3 fatty acids for age-related macular

- degeneration: The Age-Related Eye Disease Study 2 (AREDS2) randomized clinical trial. *JAMA - J Am Med Assoc* 2013; **309**: 2005–2015.
- 155 Infirmiry RV. Progress in Retinal and Eye. *Prog Retin Eye Res* 2011; **30**: 81–114.
- 156 Ishima Y, Maruyama T. Human Serum Albumin as Carrier in Drug Delivery Systems. *Yakugaku Zasshi* 2016; **136**: 39–47.
- 157 Alex AF, Spitznas M, Tittel AP, Kurts C, Eter N. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate (EGCG), resveratrol, and curcumin on proliferation of human retinal pigment epithelial cells in vitro. *Curr Eye Res* 2010; **35**: 1021–1033.
- 158 Chan C-M, Huang J-H, Lin H-H, Chiang H-S, Chen B-H, Hong J-Y *et al.* Protective effects of (-)-epigallocatechin gallate on UV A-induced damage in ARPE19 cells. *Mol Vis* 2008; **14**: 2528–2534.
- 159 Li Y, Zou X, Cao K, Xu J, Yue T, Dai F *et al.* Curcumin analog 1, 5-bis (2-trifluoromethylphenyl)-1, 4-pentadien-3-one exhibits enhanced ability on Nrf2 activation and protection against acrolein-induced ARPE-19 cell toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; **272**: 726–735.
- 160 Howell JC, Chun E, Farrell AN, Hur EY, Caroti CM, Iuvone PM *et al.* Global microRNA expression profiling: curcumin (diferuloylmethane) alters oxidative stress-responsive microRNAs in human ARPE-19 cells. *Mol Vis* 2013; **19**: 544–60.
- 161 Zhu W, Wu Y, Meng Y-F, Wang J-Y, Xu M, Tao J-J *et al.* Effect of curcumin on aging retinal pigment epithelial cells. *Drug Des Devel Ther* 2015; **9**: 5337–44.
- 162 Woo JM, Shin D-Y, Lee SJ, Joe Y, Zheng M, Yim JH *et al.* Curcumin protects retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via induction of heme oxygenase-1 expression and reduction of reactive oxygen. *Mol Vis* 2012; **18**: 901–8.
- 163 Mandal MNA, Patlolla JMR, Zheng L, Agbaga MP, Tran JTA, Wicker L *et al.* Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. *Free Radic Biol Med* 2009; **46**: 672–679.
- 164 Park S Il, Lee EH, Kim SR, Jang YP. Anti-apoptotic effects of Curcuma longa L. extract and its curcuminoids against blue light-induced cytotoxicity in A2E-laden human retinal pigment epithelial cells. *J Pharm Pharmacol* 2017; **69**: 334–340.

- 165 Sheline CT, Zhou Y, Bai S. Light-induced photoreceptor and RPE degeneration involve zinc toxicity and are attenuated by pyruvate, nicotinamide, or cyclic light. *Mol Vis* 2010; **16**: 2639–52.
- 166 Ji D, Li GY, Osborne NN. Nicotinamide attenuates retinal ischemia and light insults to neurones. *Neurochem Int* 2008; **52**: 786–798.
- 167 Sheline CT, Zhou Y, Bai S. Light-induced photoreceptor and RPE degeneration involve zinc toxicity and are attenuated by pyruvate, nicotinamide, or cyclic light. *Mol Vis* 2010; **16**: 2639–52.
- 168 Bai S, Sheline CT. NAD⁺ maintenance attenuates light induced photoreceptor degeneration. *Exp Eye Res* 2013; **108**: 76–83.
- 169 Cheung W, Guo LI, Cordeiro MF. Neuroprotection in Glaucoma: Drug-Based Approaches. *Optom. Vis. Sci.* 2008; **85**: E406–E416.
- 170 Bisti S, Maccarone R, Falsini B. Saffron and retina: Neuroprotection and pharmacokinetics. *Vis Neurosci* 2014; **31**: 355–361.
- 171 Lulli M, Witort E, Papucci L, Torre E, Schiavone N, Dal Monte M *et al.* Coenzyme Q10 protects retinal cells from apoptosis induced by radiation in vitro and in vivo. *J Radiat Res* 2012; **53**: 695–703.
- 172 Qu J, Kaufman Y, Washington I. Coenzyme Q10 in the human retina. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 1814–1818.
- 173 Nucci C, Tartaglione R, Cerulli A, Mancino R, Spanò A, Cavaliere F *et al.* Retinal Damage Caused by High Intraocular Pressure-Induced Transient Ischemia is Prevented by Coenzyme Q10 in Rat. *Int Rev Neurobiol* 2007; **82**: 397–406.
- 174 Fernández-Vega B, González-Iglesias H, Vega JA, Nicieza J, Fernández-Vega Á. Coenzyme Q10 treatment improved visual field after homonymous quadrantanopia caused by occipital lobe infarction. *Am J Ophthalmol Case Reports* 2019; **13**: 70–75.
- 175 del Olmo-Aguado S, Manso AG, Osborne NN. Light might directly affect retinal ganglion cell mitochondria to potentially influence function. *Photochem Photobiol* 2012; **88**: 1346–55.
- 176 Kreslavski VD, Fomina IR, Los DA, Carpentier R, Kuznetsov V V., Allakhverdiev SI. Red and near infra-red signaling: Hypothesis and perspectives. *J Photochem Photobiol C Photochem Rev* 2012; **13**: 190–203.
- 177 Osborne NN, Li G-Y, 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**: 2013–2028.
- 178 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**: 1418–1427.
- 179 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**: 481–491.
- 180 Giuliani A, Lorenzini L, Gallamini M, Massella A, Giardino L, Calzà L. Low infra red laser light irradiation on cultured neural cells: Effects on mitochondria and cell viability after oxidative stress. *BMC Complement Altern Med* 2009; **9**: 1–10.
- 181 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**: 125.
- 182 Gongruttananun N. Influence of red light on reproductive performance, eggshell ultrastructure, and eye morphology in Thai-native hens. *Poult Sci* 2011; **90**: 2855–2863.
- 183 Mamalis A, Koo E, Isseroff RR, Murphy W, Jagdeo J. Resveratrol prevents high fluence red light-emitting diode reactive oxygen species-mediated photoinhibition of human skin fibroblast migration. *PLoS One* 2015; **10**: 1–10.
- 184 Zhao HS, Wang Y, Yin ZQ. A comparison of LEDGFp52 and CNTF on the in vitro growth of rat retinal ganglion cell neurites. *Neurosci Lett* 2008; **440**: 9–13.
- 185 Wada M, Gelfman CM, Matsunaga H, Alizadeh M, Morse L, Handa JT *et al.* Density-dependent expression of FGF-2 in response to oxidative stress in RPE cells in vitro. *Curr Eye Res* 2001; **23**: 226–31.
- 186 Wang X, Zhou X, Ma J, Tian H, Jiao Y, Zhang R *et al.* Effects of keratinocyte growth factor-2 on corneal epithelial wound healing in a rabbit model of carbon dioxide laser injury. *Biol Pharm Bull* 2010; **33**: 971–976.
- 187 El-Sharkawy H, Kantarci A, Deady J, Hasturk H, Liu H, Alshahat M *et al.* Platelet-Rich Plasma: Growth Factors and Pro- and Anti-Inflammatory Properties. *J Periodontol* 2007; **78**: 661–669.

- 188 Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007; **28**: 4551–4560.
- 189 Merayo-Llodes J, Riestra AC, Meana Á, Vázquez N, Chacon M, Medina MP *et al.* PRGF-Endoret: A new approach in the treatment of limbal stem cell deficiency. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2016; **57**: 4350.
- 190 Dohan Ehrenfest David M. Classification of platelet concentrates (Platelet-Rich Plasma-PRP, Platelet-Rich Fibrin-PRF) for topical and infiltrative use in orthopedic and sports medicine: current consensus, clinical implications and perspectives. *Muscle, Ligaments Tendons J* 2014; **4**: 3–9.
- 191 Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andia I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol Sci* 2008; **29**: 37–41.
- 192 Arias JD, Hoyos AT, Alcántara B, Sanchez-Avila RM, Arango FJ, Galvis V. Plasma rich in growth factors for persistent macular hole. *Retin Cases Brief Rep* 2019; **Publish Ah**. doi:10.1097/icb.0000000000000957.
- 193 Burmeister SL, Hartwig D, Astrid Limb G, Kremling C, Hoerauf H, Müller M *et al.* Effect of various platelet preparations on retinal Müller cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 4881–4886.
- 194 Tsubota K, Goto E, Fujita H, Ono M, Inoue H, Saito I *et al.* Treatment of dry eye by autologous serum application in Sjögren's syndrome. *Br J Ophthalmol* 1999; **83**: 390–5.
- 195 Schultz G, Chegini N, Grant M, Khaw P, MacKay S. Effects of growth factors on corneal wound healing. *Acta Ophthalmol Suppl (Oxf)* 1992; **70**: 60–6.
- 196 Anitua E, de la Fuente M, Muruzabal F, Riestra A, Merayo-Llodes J, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp Eye Res* 2015; **135**: 118–126.
- 197 López-García JS, García-Lozano I, Rivas L, Ramírez N, Raposo R, Méndez MT. Autologous serum eye drops diluted with sodium hyaluronate: Clinical and experimental comparative study. *Acta Ophthalmol* 2014; **92**: 22–29.
- 198 Anitua E, Andía I, Sanchez M, Azofra J, del Mar Zalduendo M, de la Fuente M *et al.* Autologous preparations rich in growth factors promote proliferation and induce VEGF and HGF production by human tendon

- cells in culture. *J Orthop Res* 2005; **23**: 281–286.
- 199 Schultz G, Clark W, Rotatori DS. EGF and TGF- α in wound healing and repair. *J Cell Biochem* 1991; **45**: 346–352.
- 200 Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999; **14**: 529–535.
- 201 Bielecki T, M. Dohan Ehrenfest D. Platelet-Rich Plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): Surgical Adjuvants, Preparations for In Situ Regenerative Medicine and Tools for Tissue Engineering. *Curr Pharm Biotechnol* 2012; **13**: 1121–1130.
- 202 Cieslik-Bielecka A, Dohan Ehrenfest DM, Lubkowska A, Bielecki T. Microbicidal properties of Leukocyte- and Platelet-Rich Plasma/Fibrin (L-PRP/L-PRF): new perspectives. *J Biol Regul Homeost Agents* 2012; **26**: 43–52.
- 203 Dohan Ehrenfest DM, Pinto NR, Pereda A, Jiménez P, Corso M Del, Kang BS *et al.* The impact of the centrifuge characteristics and centrifugation protocols on the cells, growth factors, and fibrin architecture of a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF) clot and membrane. *Platelets* 2018; **29**: 171–184.
- 204 Anitua E, Sánchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andía I. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol* 2006; **24**: 227–234.
- 205 Anitua E, Sanchez M, Merayo-Lloves J, de La Fuente M, Muruzabal F, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates proliferation and migration of primary keratocytes and conjunctival fibroblasts and inhibits and reverts TGF- β 1-induced myodifferentiation. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2011; **52**: 6066–6073.
- 206 Anitua E, Sanchez M, De la Fuente M, Zalduendo MM, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* 2012; **20**: 1657–1665.
- 207 Assirelli E, Filardo G, Mariani E, Kon E, Roffi A, Vaccaro F *et al.* Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* 2015; **23**: 2690–2703.
- 208 Marmotti A, Bruzzone M, Bonasia DE, Castoldi F, Rossi R, Piras L *et al.* One-step osteochondral repair with cartilage fragments in a composite

- scaffold. *Knee Surgery, Sport Traumatol Arthrosc* 2012; **20**: 2590–2601.
- 209 López-Plandolit S, Morales M-CC, Freire V, Etxebarria J, Durán JA. Plasma Rich in Growth Factors as a Therapeutic Agent for Persistent Corneal Epithelial Defects. *Cornea* 2010; **29**: 843–848.
- 210 Poon AC, Geerling G, Dart JKG, Fraenkel GE, Daniels JT. Autologous serum eyedrops for dry eyes and epithelial defects: Clinical and in vitro toxicity studies. *Br J Ophthalmol* 2001; **85**: 1188–1197.
- 211 de la Sen-Corcuera B, Montero-Iruzubieta J, Sánchez-Ávila RM, Orive G, Anitua E, Caro-Magdaleno M *et al.* Plasma rich in growth factors for the treatment of cicatrizing conjunctivitis. *Clin Ophthalmol* 2020; **14**: 1619–1627.
- 212 Li Y, Reza RG, Atmaca-Sonmez P, Ratajczak MZ, Ildstad ST, Kaplan HJ *et al.* Retinal pigment epithelium damage enhances expression of chemoattractants and migration of bone marrow-derived stem cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 1646–1652.
- 213 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**: 64–70.
- 214 Sliney DH. How light reaches the eye and its components. In: *International Journal of Toxicology*. Int J Toxicol, 2002, pp 501–509.
- 215 Organisciak DT, Vaughan DK. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res* 2010; **29**: 113–134.
- 216 Kam JH, Weinrich TW, Sangha H, Powner MB, Fosbury R, Jeffery G. Mitochondrial absorption of short wavelength light drives primate blue retinal cones into glycolysis which may increase their pace of aging. *Vis Neurosci* 2019; **36**: E007.
- 217 Lin CH, Wu MR, Huang WJ, Chow DSL, Hsiao G, Cheng YW. Low-luminance blue light-enhanced phototoxicity in A2E-Laden RPE cell cultures and rats. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 1–19.
- 218 Krigel A, Berdugo M, Picard E, Levy-Boukris R, Jaadane I, Jonet L *et al.* Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals LED phototoxicity. *Neuroscience* 2016; **339**: 296–307.
- 219 Sliney DH. How light reaches the eye and its components. *Int J Toxicol* 2002; **21**: 501–509.
- 220 Youssef PN, Sheibani N, Albert DM. Retinal light toxicity. *Eye* 2011; **25**: 1–

- 14.
- 221 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**: 523–531.
- 222 Boveris A, Navarro A. Brain mitochondrial dysfunction in aging. *IUBMB Life* 2008; **60**: 308–314.
- 223 Marie M, Bigot K, Angebault C, Barrau C, Gondouin P, Pagan D *et al.* Light action spectrum on oxidative stress and mitochondrial damage in A2E-loaded retinal pigment epithelium cells. *Cell Death Dis* 2018; **9**: 287.
- 224 Liang FQ, Godley BF. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: A possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2003; **76**: 397–403.
- 225 Yang P, Peairs JJ, Tano R, Jaffe GJ. Oxidant-mediated Akt activation in human RPE cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 4598–4606.
- 226 Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; **78**: 547–81.
- 227 Wood JPM, Lascaratos G, Bron AJ, Osborne NN. The influence of visible light exposure on cultured RGC-5 cells. *Mol Vis* 2008; **14**: 334–44.
- 228 Kamalden TA, Ji D, Osborne NN. Rotenone-induced death of RGC-5 cells is caspase independent, involves the JNK and p38 pathways and is attenuated by specific green tea flavonoids. *Neurochem Res* 2012; **37**: 1091–1101.
- 229 T. A. Tengku Kamalden; A. J. Bron; N. N. Osborne. RGC-5 Cell Apoptosis Caused by Rotenone and White Light Are Similar but Not Identical With Both Being Attenuated by Two Green Tea Flavonoids. *iovs* 2010; **51**.
- 230 Li J, Spletter ML, Johnson DA, Wright LS, Svendsen CN, Johnson JA. Rotenone-induced caspase 9/3-independent and -dependent cell death in undifferentiated and differentiated human neural stem cells. *J Neurochem* 2005; **92**: 462–476.
- 231 Wang W, Yang X, De Silanes IL, Carling D, Gorospe M. Increased AMP:ATP ratio and AMP-activated protein kinase activity during cellular senescence linked to reduced HuR function. *J Biol Chem* 2003; **278**: 27016–27023.

- 232 Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL, Lesnefsky EJ. Production of reactive oxygen species by mitochondria: Central role of complex III. *J Biol Chem* 2003; **278**: 36027–36031.
- 233 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**: 347–53.
- 234 Yang D, Elnor SG, Bian ZM, Till GO, Petty HR, Elnor VM. Pro-inflammatory cytokines increase reactive oxygen species through mitochondria and NADPH oxidase in cultured RPE cells. *Exp Eye Res* 2007; **85**: 462–472.
- 235 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**: 425–437.
- 236 Barron MJ, Griffiths P, Turnbull DM, Bates D, Nichols P. The distributions of mitochondria and sodium channels reflect the specific energy requirements and conduction properties of the human optic nerve head. *Br J Ophthalmol* 2004; **88**: 286–290.
- 237 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**: 622–9.
- 238 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**: H1617-23.
- 239 Selvatici R, Previati M, Marino S, Marani L, Falzarano S, Lanzoni I *et al.* Sodium azide induced neuronal damage in Vitro: Evidence for non-apoptotic cell death. *Neurochem Res* 2009; **34**: 909–916.
- 240 Kawashima H, Ozawa Y, Toda E, Homma K, Osada H, Narimatsu T *et al.* Neuroprotective and vision-protective effect of preserving ATP levels by AMPK activator. *FASEB J* 2020; **34**: 5016–5026.
- 241 Millman JR, Doggett T, Thebeau C, Zhang S, Semenkovich CF, Rajagopal R. Measurement of energy metabolism in explanted retinal tissue using extracellular flux analysis. *J Vis Exp* 2019; **2019**: 1–15.
- 242 Du J, Rountree A, Cleghorn WM, Contreras L, Lindsay KJ, Sadilek M *et al.* Phototransduction influences metabolic flux and nucleotide metabolism in mouse retina. *J Biol Chem* 2016; **291**: 4698–4710.

- 243 Kooragayala K, Gotoh N, Cogliati T, Nellissery J, Kaden TR, French S *et al.* Quantification of oxygen consumption in retina ex vivo demonstrates limited reserve capacity of photoreceptor mitochondria. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2015; **56**: 8428–8436.
- 244 Renthal R, Cothran M, Espinoza B, Wall KA, Bernard M. Light Activates the Reaction of Bacteriorhodopsin Aspartic Acid-115 with Dicyclohexylcarbodiimide. *Biochemistry* 1985; **24**: 4275–4279.
- 245 Renthal R, Brogley L, Vila J. Altered protein-chromophore interaction in dicyclohexylcarbodiimide-modified purple membrane sheets. *BBA - Bioenerg* 1988; **935**: 109–114.
- 246 Wang Y, Hanus JW, Abu-Asab MS, Shen D, Ogilvy A, Ou J *et al.* NLRP3 upregulation in retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Int J Mol Sci* 2016; **17**: 73.
- 247 Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Noda K, Imamura Y, Kobayashi S *et al.* Neuroprotective effect of an antioxidant, lutein, during retinal inflammation. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 1433–1439.
- 248 Kauppinen A, Niskanen H, Suuronen T, Kinnunen K, Salminen A, Kaarniranta K. Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cells-Implications for age-related macular degeneration (AMD). *Immunol Lett* 2012; **147**: 29–33.
- 249 Carmona JU, Ríos DL, López C, Álvarez ME, Pérez JE, Bohórquez ME. In vitro effects of platelet-rich gel supernatants on histology and chondrocyte apoptosis scores, hyaluronan release and gene expression of equine cartilage explants challenged with lipopolysaccharide. *BMC Vet Res* 2016; **12**: 135.
- 250 Zhang D, Wang C, Cao S, Ye Z, Deng B, Kijlstra A *et al.* High-salt enhances the inflammatory response by retina pigment epithelium cells following lipopolysaccharide stimulation. *Mediators Inflamm* 2015; **2015**: 1–10.
- 251 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**: 5016.
- 252 Brafman A, Mett I, Shafir M, Gottlieb H, Damari G, Gozlan-Kelner S *et al.* Inhibition of oxygen-induced retinopathy in RTP801-deficient mice. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2004; **45**: 3796–3805.

- 253 Slomiany MG, Rosenzweig SA. Autocrine Effects of IGF-1 Induced VEGF and IGFBP-3 Secretion in Retinal Pigment Epithelial Cell Line ARPE-19. *AmJ Physiol Cell Physiol* 2004; **294**: 746–753.
- 254 Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H *et al.* Hypoxia inducible factor-1 α is increased in ischemic retina: Temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 1999; **40**: 182–189.
- 255 Kaur C. Hypoxia-ischemia and retinal ganglion cell damage. *Clin Ophthalmol* 2008; **2**: 879.
- 256 Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F *et al.* Regulation of hypoxia-inducible factor 1 α expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 7004–14.
- 257 Frassetto LJ, Schlieve CR, Lieven CJ, Utter AA, Jones M V., Agarwal N *et al.* Kinase-dependent differentiation of a retinal ganglion cell precursor. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2006; **47**: 427–438.
- 258 Loeffler M, Daugas E, Susin S a, Zamzami N, Metivier D, Nieminen a L *et al.* Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *FASEB J* 2001; **15**: 758–767.
- 259 Chen Y, Yan Q, Xu Y, Ye F, Sun X, Zhu H *et al.* BNIP3-mediated Autophagy Induced Inflammatory Response and Inhibited VEGF Expression in Cultured Retinal Pigment Epithelium Cells Under Hypoxia. *Curr Mol Med* 2019; **19**: 395–404.
- 260 Saghizadeh M, Chwa M, Aoki A, Lin B, Pirouzmanesh A, Brown DJ *et al.* Altered expression of growth factors and cytokines in keratoconus, bullous keratopathy and diabetic human corneas. *Exp Eye Res* 2001; **73**: 179–189.
- 261 Edwards AO, Malek G. Molecular genetics of AMD and current animal models. *Angiogenesis* 2007; **10**: 119–132.
- 262 Pennesi ME, Neuringer M, Courtney RJ. Animal models of age related macular degeneration. *Mol Aspects Med* 2012; **33**: 487–509.
- 263 Hao W, Wenzel A, Obin MS, Chen CK, Brill E, Krasnoperova N V. *et al.* Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 2002; **32**: 254–260.
- 264 Brown EE, DeWeerd AJ, Ildefonso CJ, Lewin AS, Ash JD. Mitochondrial oxidative stress in the retinal pigment epithelium (RPE) led to metabolic

- dysfunction in both the RPE and retinal photoreceptors. *Redox Biol* 2019; **24**: 1–11.
- 265 Gesteira TF, Sun M, Coulson-Thomas YM, Yamaguchi Y, Yeh L-K, Hascall V *et al.* Hyaluronan Rich Microenvironment in the Limbal Stem Cell Niche Regulates Limbal Stem Cell Differentiation. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 2017; **58**: 4407.
- 266 Heeman B, Van den Haute C, Aelvoet S-A, Valsecchi F, Rodenburg RJ, Reumers V *et al.* Depletion of PINK1 affects mitochondrial metabolism, calcium homeostasis and energy maintenance. *J Cell Sci* 2011; **124**: 1115–1125.
- 267 Johnson SC, Yanos ME, Bitto A, Castanza A, Gagnidze A, Gonzalez B *et al.* Dose-dependent effects of mTOR inhibition on weight and mitochondrial disease in mice. *Front Genet* 2015; **6**: 1–8.
- 268 Linkermann A, Brasen JH, Darding M, Jin MK, Sanz AB, Heller J-O *et al.* Two independent pathways of regulated necrosis mediate ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci* 2013; **110**: 12024–12029.
- 269 Zhang XY, Ng TK, Brelén ME, Wu D, Wang JX, Chan KP *et al.* Continuous exposure to non-lethal doses of sodium iodate induces retinal pigment epithelial cell dysfunction. *Sci Rep* 2016; **6**: 1–13.
- 270 Hanus J, Anderson C, Wang S. RPE necroptosis in response to oxidative stress and in AMD. *Ageing Res Rev* 2015; **24**: 286–298.
- 271 Tokarz P, Kaarniranta K, Blasiak J. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). *Biogerontology* 2013; **14**: 461–482.
- 272 Kurz T, Karlsson M, Brunk UT, Nilsson SE, Frennesson C. ARPE-19 retinal pigment epithelial cells are highly resistant to oxidative stress and exercise strict control over their lysosomal redox-active iron. *Autophagy* 2009; **5**: 494–501.
- 273 Klein JA, Ackerman SL. Oxidative stress, cell cycle, and neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 2003; **111**: 785–793.
- 274 Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B. Mitochondrial oxidative stress: implications for cell death. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2007; **47**: 143–83.
- 275 Godley BF, Shamsi FA, Liang F-Q, Jarrett SG, Davies S, Boulton M. Blue Light Induces Mitochondrial DNA Damage and Free Radical Production

- in Epithelial Cells*. *J Biol Chem* 2005; **280**: 21061–21066.
- 276 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**: 470–5.
- 277 Jaadane I, Villalpando Rodriguez GE, Boulenguez P, Chahory S, Carré S, Savoldelli M *et al.* Effects of white light-emitting diode (LED) exposure on retinal pigment epithelium in vivo. *J Cell Mol Med* 2017; **21**: 3453–3466.
- 278 Núñez-Álvarez C, Suárez-Barrio C, del Olmo Aguado S, Osborne NN. Blue light negatively affects the survival of ARPE19 cells through an action on their mitochondria and blunted by red light. *Acta Ophthalmol* 2019; **97**: 103–115.
- 279 Adachi C. Blue light-emitting organic electroluminescent devices The origin of changes in electrical properties of organic films fabricated at various vacuum-deposition rates View project. *Artic Appl Phys Lett* 1990; **56**: 799–801.
- 280 Sánchez-ávila RM, González ÁFV, Sanz ÁFV, Merayo-Lloves J. Treatment of recurrent myopic macular hole using membrane of plasma rich in growth factors. *Int Med Case Rep J* 2019; **12**: 229–233.
- 281 Araujo JA, Zhang M, Yin F. Heme oxygenase-1, oxidation, inflammation, and atherosclerosis. *Front Pharmacol* 2012; **3 JUL**: 119.
- 282 Mitter SK, Song C, Qi X, Mao H, Rao H, Akin D *et al.* Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress Dysregulated autophagy in the RPE is associated with increased susceptibility to oxidative stress and AMD. *Autophagy* 2014; **8627**: 1989–2005.
- 283 del Olmo-Aguado S, Manso AG, Osborne NN. Light might directly affect retinal ganglion cell mitochondria to potentially influence function. *Photochem Photobiol* 2012; **88**: 1346–55.
- 284 Lougheed T. Hidden blue hazard?: Led lighting and retinal damage in rats. *Environ. Health Perspect.* 2014; **122**: 81.
- 285 Putting BJ, Zweypfenning RC, Vrensen GF, Oosterhuis J a, van Best J a. Blood-retinal barrier dysfunction at the pigment epithelium induced by blue light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; **33**: 3385–93.
- 286 Yu T, Chen CZ, Xing YQ. Inhibition of cell proliferation, migration and

- apoptosis in blue-light illuminated human retinal pigment epithelium cells by down-regulation of HtrA1. *Int J Ophthalmol* 2017; **10**: 524–529.
- 287 Etxebarria J, Sanz-Lázaro S, Hernández-Moya R, Freire V, Durán JA, Morales MC *et al.* Serum from plasma rich in growth factors regenerates rabbit corneas by promoting cell proliferation, migration, differentiation, adhesion and limbal stemness. *Acta Ophthalmol* 2017; **95**: 693–705.
- 288 Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Hernández-Moya R, Durán JA, Morales MC. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: An in vitro and in vivo comparative study. *Cornea* 2014; **33**: 614–620.
- 289 Freire V, Andollo N, Etxebarria J, Durán JA, Morales M-CC. In Vitro Effects of Three Blood Derivatives on Human Corneal Epithelial Cells. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 2012; **53**: 5571.
- 290 López-Plandolit S, Morales M-C, Freire V, Grau AE, Durán JA. Efficacy of Plasma Rich in Growth Factors for the Treatment of Dry Eye. *Cornea* 2011; **30**: 1312–1317.
- 291 Suárez-Barrio C, Etxebarria J, Hernández-Moya R, Del Val-Alonso M, Rodríguez-Astigarraga M, Urkaregi A *et al.* Hyaluronic acid combined with serum rich in growth factors in corneal epithelial defects. *Int J Mol Sci* 2019; **20**: 1–22.
- 292 Sánchez-Avila RM, Merayo-Llodes J, Fernández ML, Rodríguez-Gutiérrez LA, Rodríguez-Calvo PP, Fernández-Vega Cueto A *et al.* Plasma rich in growth factors eye drops to treat secondary ocular surface disorders in patients with glaucoma. *Int Med Case Rep J* 2018; **11**: 97–103.
- 293 Anitua E, de la Fuente M, Muruzabal F, Riestra A, Merayo-Llodes J, Orive G. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp Eye Res* 2015; **135**: 118–126.
- 294 Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007; **28**: 4551–4560.
- 295 Himori N, Maruyama K, Yamamoto K, Yasuda M, Ryu M, Omodaka K *et al.* Critical neuroprotective roles of heme oxygenase-1 induction against axonal injury-induced retinal ganglion cell death. *J Neurosci Res* 2014; **92**: 1134–1142.
- 296 Suen D, Norris KL, Youle RJ. Mitochondrial dynamics and apoptosis

- Mitochondrial dynamics and apoptosis. 2008; : 1577–1590.
- 297 Fleury C, Mignotte B, Vayssière J-L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie*; **84**: 131–41.
- 298 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**: 983–993.
- 299 Chrysostomou V, Rezanian F, Trounce IA, Crowston JG. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in glaucoma. *Curr Opin Pharmacol* 2013; **13**: 12–5.
- 300 Li GY, 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**: 35–43.
- 301 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.
- 302 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**: 425–437.
- 303 Karu TI, Pyatibrat L V, Afanasyeva NI. A novel mitochondrial signaling pathway activated by visible-to-near infrared radiation. *Photochem Photobiol*; **80**: 366–72.
- 304 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.
- 305 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**: 425–437.
- 306 Liang HL, Whelan HT, Eells JT, Wong-Riley MTT. Near-infrared light via light-emitting diode treatment is therapeutic against rotenone- and 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced neurotoxicity. *Neuroscience* 2008; **153**: 963–974.
- 307 Beretta S, Wood JPM, Derham B, Sala G, Tremolizzo L, Ferrarese C *et al.* Partial mitochondrial complex I inhibition induces oxidative damage and

- perturbs glutamate transport in primary retinal cultures. Relevance to Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON). *Neurobiol Dis* 2006; **24**: 308–317.
- 308 Osborne NN, 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.
- 309 Tao J-X, Zhou W-C, Zhu X-G. Mitochondria as Potential Targets and Initiators of the Blue Light Hazard to the Retina. *Oxid Med Cell Longev* 2019; **2019**: 6435364.
- 310 del Olmo-Aguado S, Manso AG, Osborne NN. Light Might Directly Affect Retinal Ganglion Cell Mitochondria to Potentially Influence Function †. *Photochem Photobiol* 2012; **88**: 1346–1355.
- 311 Grimm C, Wenzel A, Williams TP, Rol PO, Hafezi F, Remé CE. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: Effect of photoreversal of bleaching. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2001; **42**: 497–505.
- 312 Christie JM. Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev Plant Biol* 2007; **58**: 21–45.
- 313 Godley BF, Shamsi FA, Liang F-Q, Jarrett SG, Davies S, Boulton M. Blue Light Induces Mitochondrial DNA Damage and Free Radical Production in Epithelial Cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 21061–21066.
- 314 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**: 29–35.
- 315 Shang YM, Wang GS, Sliney D, Yang CH, Lee LL. White light-emitting diodes (LEDs) at domestic lighting levels and retinal injury in a rat model. *Environ Health Perspect* 2014; **122**: 269–276.
- 316 Osborne NN, Li G-Y, 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**: 2013–28.
- 317 Tartaglione MF, Zabaleta ME, Lazzarini R, Piva F, Busilacchi EM, Poloni A *et al.* Apoptotic mechanism activated by blue light and cisplatinum in cutaneous squamous cell carcinoma cells. *Int J Mol Med* 2021; **47**: 1–1.
- 318 Wu J, Seregard S, Spångberg B, Oskarsson M, Chen E. Blue light induced

- apoptosis in rat retina. *Eye* 1999; **13**: 577–583.
- 319 An E, Gordish-Dressman H, Hathout Y. Effect of TNF- α on human ARPE-19-secreted proteins. *Mol Vis* 2008; **14**: 2292–2303.
- 320 Ma F, Zhang L, Westlund KN. Reactive oxygen species mediate TNFR1 increase after TRPV1 activation in mouse DRG neurons. *Mol Pain* 2009; **5**: 1–11.
- 321 Kim YS, Morgan MJ, Choksi S, Liu Z gang. TNF-Induced Activation of the Nox1 NADPH Oxidase and Its Role in the Induction of Necrotic Cell Death. *Mol Cell* 2007; **26**: 675–687.
- 322 Yang S, Xie C, Chen Y, Wang J, Chen X, Lu Z *et al.* Differential roles of TNF α -TNFR1 and TNF α -TNFR2 in the differentiation and function of CD4 + Foxp3 + induced Treg cells in vitro and in vivo periphery in autoimmune diseases. *Cell Death Dis* 2019; **10**: 1–13.
- 323 Xie T, Peng W, Liu Y, Yan C, Maki J, Degterev A *et al.* Structural basis of RIP1 inhibition by necrostatins. *Structure* 2013; **21**: 493–499.
- 324 Declercq W, Vanden Berghe T, Vandenabeele P. RIP Kinases at the Crossroads of Cell Death and Survival. *Cell* 2009; **138**: 229–232.
- 325 Moriwaki K, Chan FKM. RIP3: A molecular switch for necrosis and inflammation. *Genes Dev* 2013; **27**: 1640–1649.
- 326 Bray K, Mathew R, Lau A, Kamphorst JJ, Fan J, Chen J *et al.* Autophagy suppresses RIP kinase-dependent necrosis enabling survival to mTOR inhibition. *PLoS One* 2012; **7**: 41831.
- 327 Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat Immunol* 2000; **1**: 489–495.
- 328 Chen Y, Perusek L, Maeda A. Autophagy in light-induced retinal damage. *Exp. Eye Res.* 2016; **144**: 64–72.
- 329 Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF- κ B: Current knowledge, new insights, and future perspectives. *Cell Res* 2010; **20**: 24–33.
- 330 Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2017; **2**: 1–9.
- 331 Su YJ, Qu Y, Zhao FY, Li HF, Mu DZ, Li XH. Regulation of autophagy by the nuclear factor κ B signaling pathway in the hippocampus of rats with

- sepsis. *J Neuroinflammation* 2015; **12**: 1–12.
- 332 Schaeffer V, Goedert M. Stimulation of autophagy is neuroprotective in a mouse model of human tauopathy. *Autophagy* 2012; **8**: 1686–1687.
- 333 Wang YQ, Wang L, Zhang MY, Wang T, Bao HJ, Liu WL *et al.* Necrostatin-1 suppresses autophagy and apoptosis in mice traumatic brain injury model. *Neurochem Res* 2012; **37**: 1849–1858.
- 334 Tang JY, Fang YY, Edward H, Huang YC, Hsu NCH, Yang WC *et al.* Immunopositivity of Beclin-1 and ATG5 as indicators of survival and disease recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2013; **33**: 5611–5616.
- 335 Franchi L, Eigenbrod T, Muñoz-Planillo R, Nuñez G. The inflammasome: A caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. *Nat Immunol* 2009; **10**: 241–247.
- 336 Abe T, Sugano E, Saigo Y, Tamai M. Interleukin-1 β and Barrier Function of Retinal Pigment Epithelial Cells (ARPE-19): Aberrant Expression of Junctional Complex Molecules. *Investig Ophthalmology Vis Sci* 2003; **44**: 4097.
- 337 Zhang ZY, Bao XL, Cong YY, Fan B, Li GY, Žerovnik E. Autophagy in Age-Related Macular Degeneration: A Regulatory Mechanism of Oxidative Stress. *Oxid Med Cell Longev* 2020; **2020**: 1–13.
- 338 Chen Y, Sawada O, Kohno H, Le YZ, Subauste C, Maeda T *et al.* Autophagy protects the retina from light-induced degeneration. *J Biol Chem* 2013; **288**: 7506–7518.
- 339 Antonsson B, Martinou JC. The Bcl-2 protein family. *Exp Cell Res* 2000; **256**: 50–57.
- 340 Gorgidze LA, Oshemkova SA, Vorobjev IA. Blue light inhibits mitosis in tissue culture cells. *Biosci Rep* 1998; **18**: 215–24.
- 341 Moon J, Yun J, Yoon YD, Park S-I, Seo Y-J, Park W-S *et al.* Blue light effect on retinal pigment epithelial cells by display devices. *Integr Biol* 2017; **9**: 436–443.
- 342 El-Esawi M, Arthaut LD, Jourdan N, D’Harlingue A, Link J, Martino CF *et al.* Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of Arabidopsis cryptochrome. *Sci Rep* 2017; **7**: 1–9.
- 343 Núñez-Álvarez C, Osborne NN. Blue light exacerbates and red light counteracts negative insults to retinal ganglion cells in situ and R28 cells in

- vitro. *Neurochem Int* 2019; **125**: 187–196.
- 344 Seko Y, Pang J, Tokoro T, Ichinose S, Mochizuki M. Blue light-induced apoptosis in cultured retinal pigment epithelium cells of the rat. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001; **239**: 47–52.
- 345 Behar-Cohen F, Martinsons C, Viénot F, Zissis G, Barlier-Salsi A, Cesarini JPP *et al.* Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: Any risks for the eye? *Prog Retin Eye Res* 2011; **30**: 239–257.
- 346 Lockwood DB, Wataha JC, Lewis JB, Tseng WY, Messer RLW, Hsu SD. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent Mater* 2005; **21**: 683–688.
- 347 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**: 5223.
- 348 Geiger P, Barben M, Grimm C, Samardzija M. Blue light-induced retinal lesions, intraretinal vascular leakage and edema formation in the all-cone mouse retina. *Cell Death Dis* 2015; **6**: e1985-12.
- 349 Lawrenson JG, Hull CC, Downie LE. 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 Opt* 2017; **37**: 644–654.
- 350 Knels L, Valtink M, Roehlecke C, Lupp A, de la Vega J, Mehner M *et al.* Blue light stress in retinal neuronal (R28) cells is dependent on wavelength range and irradiance. *Eur J Neurosci* 2011; **34**: 548–558.
- 351 Narimatsu T, Negishi K, Miyake S, Hirasawa M, Osada H, Kurihara T *et al.* Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material *in vivo*. *Exp Eye Res* 2015; **132**: 48–51.
- 352 Nadal-Nicolás FM, Jiménez-López M, Sobrado-Calvo P, Nieto-López L, Cánovas-Martinez I, Salinas-Navarro M *et al.* Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: Qualitative and quantitative time course studies in naïve and optic nerve-injured retinas. *Investig Ophthalmol Vis Sci* 2009; **50**: 3860–3868.
- 353 García-Ayuso D, Salinas-Navarro M, Agudo M, Cuenca N, Pinilla I, Vidal-Sanz M *et al.* Retinal ganglion cell numbers and delayed retinal ganglion cell death in the P23H rat retina. *Exp Eye Res* 2010; **91**: 800–810.

Bibliográfia

- 354 Kim IB, Lee EJ, Kim MK, Park DK, Chun MH. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in the developing rat retina. *J Comp Neurol* 2000; **427**: 604–16.
- 355 Reuter TE, White RH, Wald G. Rhodopsin and porphyropsin fields in the adult bullfrog retina. *J Gen Physiol* 1971; **58**: 351–371.
- 356 Del Olmo-Aguado S, U~ Nez-Alvarez CN, Osborne NN. Red light of the visual spectrum attenuates cell death in culture and retinal ganglion cell death in situ. *Wiley Online Libr* 2016; **94**: e481–e491.
- 357 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. *PLoS One* 2013; **8**: 57828.
- 358 Velez G, Weingarden AR, Tucker BA, Lei H, Kazlauskas A, Young MJ. Retinal pigment epithelium and müller progenitor cell interaction increase müller progenitor cell expression of PDGFR α and ability to induce proliferative vitreoretinopathy in a rabbit model. *Stem Cells Int* 2012; **2012**: 1–6.
- 359 Seigel GM, Notter MF. Differentiation of Y79 retinoblastoma cells induced by succinylated concanavalin A. *Cell Growth Differ* 1993; **4**: 1–7.
- 360 Krishnamoorthy RR, Agarwal P, Prasanna G, Vopat K, Lambert W, Sheedlo HJ *et al.* Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Mol Brain Res* 2001; **86**: 1–12.

Divulgación científica

Publicaciones en revistas:

- *Blue light negatively affects the survival of ARPE19 cells through an action on their mitochondria and blunted by red light.* Núñez-Álvarez, Claudia; Suárez-Barrio, Carlota; del Olmo Aguado, Susana; Osborne, Neville N; *Acta Ophthalmologica.* 97(1):103-115. 2018.
- *Hyaluronic acid combined with serum rich in growth factors in corneal epithelial defects.* Suárez-Barrio, Carlota; Etxebarria, Jaime; Hernández-Moya, Raquel; Del Val-Alonso, Marina; Rodríguez-Astigarraga, Maddalen; Urkaregi, Arantza; Freire, Vanesa; Morales, María Celia; Durán, Juan Antonio; Vicario, Marta; Molina, Irene; Herrero-Vanrell, Rocío Andollo; Noelia. *International Journal of Molecular Sciences.* 20(7): 1-22. 2019.
- *Antioxidant role of PRGF on RPE cells after blue light insult as a therapy for neurodegenerative diseases.* Suárez-Barrio, Carlota; Del Olmo-Aguado, Susana; García-Pérez, Eva; de la Fuente, María; Muruzabal, Francisco; Anitua, Eduardo; Baamonde-Arbaiza, Begoña; Fernández-Vega-Cueto, Luis; Fernández-Vega, Luis; Merayo-Llives, Jesús. *International Journal of Molecular Sciences.* 21(3). 2020.
- *Plasma Rich in Growth Factors Enhances Cell Survival after in Situ Retinal Degeneration.* Suárez-Barrio, Carlota; del Olmo-Aguado, Susana; García-Pérez, Eva; Artime, Enol; de la Fuente, María; Muruzabal, Francisco; Anitua, Eduardo; Baamonde-Arbaiza, Begoña; Fernández-Vega, Luis; Merayo-Llives, Jesús. *International Journal of Molecular Sciences.* 21(20):7442. 2020.
- *Plasma rich in growth factors reduces blue light-induced oxidative damage on retinal pigment epithelial cells and restores their homeostasis by modulating vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor expression.* Anitua, Eduardo; de la Fuente, María; del Olmo-Aguado, Susana; Suarez-Barrio, Carlota; Merayo-Llives, Jesús; Muruzabal, Francisco. *Clinical and Experimental Ophthalmology.* 48(6): 830-838. 2020.

Publicaciones en congresos:

- *Use of sodium hyaluronate in combination with a blood derivative in the re-epithelialization of rabbit cornea.* Andollo Victoriano, Noelia; Suárez Barrio, Carlota; Hernáez Moya, Raquel; Vicario, María; Herrero Vanrell, Rocío; Molina Martínez, Irene Teresa; Durán, Juan A.; Etxebarria, Jaime. European Association for Vision and Eye Research Conference. (EVER). (2017, Niza, Francia)
- *PRGF enhances RPE cell survival.* Carlota Suárez Barrio; Susana Del Olmo-Aguado; Claudia Núñez; María de la Fuente; Francisco Muruzabal; Gorka Orive; Eduardo Anitua; Neville N. Osborne; Jesús M. Merayo-Llodes. Annual Meeting of the Association-for-Research-in-Vision-and-Ophthalmology (ARVO) (2019. Vancouver, Canada).
- *Blue light-cytotoxic protection of plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) in retinal pigment epithelium cells.* Sabino Padilla; María de la Fuente; Francisco Muruzabal; Borja de la Sen; Susana Del Olmo-Aguado; Carlota Suarez-Barrio; Jesús Merayo-Llodes; Eduardo Anitua. Annual Meeting of the Association-for-Research-in-Vision-and-Ophthalmology (ARVO) (2019. Vancouver, Canada).
- *Corneas discarded by low endothelial count: a source of human corneal endothelial cells (hCECs).* Álvaro Meana; Natalia Vázquez; Sergio Alonso-Alonso; Carlota Suarez-Barrio, Susana del Olmo Aguado; Manuel Chacón; Eva García-Pérez; Mairobi Persinal-Medina; Miguel Naveiras; José F. Alfonso; Jesús Merayo-Llodes. Annual Meeting of the Association-for-Research-in-Vision-and-Ophthalmology (ARVO). (2020, Baltimore, EEUU).
- *Plasma rich in growth factors protects retina against blue light in an in vivo model.* Susana del Olmo-Aguado; Carlota Suárez-Barrio; Eva García-Pérez; Enol Artime; Jesús Merayo-Llodes. Annual Meeting of the Association-for-Research-in-Vision-and-Ophthalmology (ARVO) (2021).
- *Distal nerve degeneration in the cornea is initiated by oxidative stress.* Sánchez Fernández, Cristina; Suarez-Barrio, Carlota; del Olmo-Aguado, Susana;

- Martin, Carla; Fernández-Vega-Cueto, Luis; Quirós, Luis Manuel; Merayo-Lloves, Jesús; Alcalde, Ignacio. Annual Meeting of the Association-for-Research-in-Vision-and-Ophthalmology (ARVO) (2021).
- *Development of a new xeno-free human corneal endothelial cells culture system based on platelet rich in growth factors.* Sergio Alonso-Alonso, Natalia Vázquez, Carlota Suárez-Barrio, Susana del Olmo-Aguado, Manuel Chacón, Eva García-Pérez, Mairobi Persinal-Medina, José F. Alfonso, Belén Alfonso, Jesús Merayo-Lloves, Álvaro Meana. Annual Meeting of the Association-for-Research-in-Vision-and-Ophthalmology (ARVO) (2021).

Financiación

El trabajo desarrollado en esta tesis doctoral ha contado con financiación del Programa Estatal de Investigación Orientada a los Retos de la Sociedad, a través de la convocatoria de Acción Estratégica en Salud 2017, del Instituto de Salud Carlos III, del Ministerio de Economía, Industria y Competitividad del Gobierno de España. Nº Ref: PI17/01549.



Unión Europea

Fondo Europeo
de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

Anexos



Article

Antioxidant Role of PRGF on RPE Cells after Blue Light Insult as a Therapy for Neurodegenerative Diseases

Carlota Suárez-Barrio ^{1,2} , Susana del Olmo-Aguado ^{1,2,*} , Eva García-Pérez ¹ ,
María de la Fuente ^{3,4}, Francisco Muruzabal ^{3,4}, Eduardo Anitua ^{3,4},
Begoña Baamonde-Arbaiza ^{1,2}, Luis Fernández-Vega-Cueto ^{1,2}, Luis Fernández-Vega ^{1,2} and
Jesús Merayo-Llodes ^{1,2}

¹ Instituto Universitario Fernández-Vega. Fundación de Investigación Oftalmológica & Universidad de Oviedo, 33012 Oviedo, Spain; carlotasb.8@gmail.com (C.S.-B.); evagp2002@gmail.com (E.G.-P.); bbaamonde@yahoo.es (B.B.-A.); lfvf@fernandez-vega.com (L.F.-V.-C.); prof.luis@fernandez-vega.com (L.F.-V.); merayo@fio.as (J.M.-L.)

² Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Avenida de Roma s/n., 33011 Oviedo, Spain

³ BTI Biotechnology Institute, 01007 Vitoria, Spain; maria.delafuente@bti-implant.es (M.d.l.F.); francisco.muruzabal@bti-implant.es (F.M.); dentalresearch@fundacioneduardoanitua.org (E.A.)

⁴ University Institute for Regenerative Medicine and Oral Implantology—UIRMI (UPV/EHU—Fundación Eduardo Anitua), 01007 Vitoria, Spain

* Correspondence: solmo@fio.as

Received: 7 January 2020; Accepted: 31 January 2020; Published: 4 February 2020



Abstract: Oxidative stress has a strong impact on the development of retinal diseases such as age-related macular degeneration (AMD). Plasma rich in growth factors (PRGF) is a novel therapeutic approach in ophthalmological pathologies. The aim of this study was to analyze the antioxidant effect of PRGF in retinal epithelial cells (EPR) in in vitro and ex vivo retinal phototoxicity models. In vitro analyses were performed on ARPE19 human cell line. Viability and mitochondrial status were assessed in order to test the primary effects of PRGF. GSH level, and protein and gene expression of the main antioxidant pathway (Keap1, Nrf2, GCL, HO-1, and NQO1) were also studied. Ex vivo analyses were performed on rat RPE, and HO-1 and Nrf2 gene and protein expression were evaluated. The results show that PRGF reduces light insult by stimulating the cell response against oxidative damage and modulates the antioxidant pathway. We conclude that PRGF's protective effect could prove useful as a new therapy for treating neurodegenerative disorders such as AMD.

Keywords: age-related macular degeneration (AMD); neurodegenerative disease; retinal pigment epithelium (RPE); ARPE19; plasma rich in growth factors (PRGF); blue light; reactive oxygen species (ROS); antioxidant

1. Introduction

Age-related macular degeneration (AMD) is a neurodegenerative disease that leads to deficiencies of retinal pigment epithelium (RPE) and, consequently, reduction in visual function [1]. The RPE is a single layer of cells adjacent to the outer segment of photoreceptor of the retina and Bruch's membrane [2]. Among the main functions of RPE are the maintenance and survival of photoreceptors, which it achieves by providing nutrients taken from the choroidal capillaries, as well as the protection of cones and rods from free radicals [3]. The macula corresponds to the portion of the RPE that creates defined images. As such, it is involved in face recognition, reading, and other activities that require sharp definition vision, and for this reason maintenance of the integrity of the macular is of great

importance [4]. The causes of AMD are not fully understood, although the aging process and oxidation caused by the presence of reactive oxygen species (ROS) are known to be the principal factors behind this pathology [5–7].

RPE cells, such as rods and cones, are rich in mitochondria. In this regard, the importance of the activity of this organelle to produce energy for the maintenance of cell function is well known [8]. This energy takes the form of adenosine triphosphate (ATP) and it is produced by the electron flow carried out by the four complexes of the electron transport chain, which is governed by fundamental enzymes in the mitochondrial inner membrane [9,10]. Nevertheless, the presence of ROS can counteract the enzymes' functions by interrupting their reactions, thus, reducing ATP production and, as a result, leading to oxidative stress and cell death [11,12].

ROS output can be increased by a number of factors, including the aging process, smoking, and obesity, all of which contribute to the detriment of RPE cells [13]. However, there is one other factor, the incidence of which has increased in importance considerably in recent years due to its widespread introduction in contemporary life [14]. This factor is the influence of blue light, i.e. short wavelength light of 400 to 500 nm [12]. This wavelength corresponds with the visible spectrum that reaches the retina and is one of the main fractions of new white illumination [15,16]. The constant exposure of people in modern developed society to this type of light results in their increased risk of suffering from a variety of ocular disorders [16–21]. Moreover, there is some evidence that the action of blue light on the eye is increased when tissues are damaged or in suboptimal conditions, thus, worsening its impact on individuals with pathological conditions [22–27].

In order to address this situation, researchers have been trying to find a solution to reduce this harm through the use of antioxidants. Expression of these molecules is stimulated by the increased releasing of ROS in order to counteract oxidant species and block their action. Hence, they are able to reduce the damage caused by oxidation.

There is some evidence that suggests plasma rich in growth factors (PRGF) could act as a protector [28]. PRGF is a serum that is extracted from a patient's blood. The procedure to obtain it involves removing the white cell series from blood, and therefore avoids the natural immunological response. Its beneficial effect has been proven with respect to various pathologies. It has been widely used in oral implantology and traumatology in order to enhance wound healing [29–31]. With this same purpose, it has been used in ophthalmology to treat ocular surface diseases such as persistent epithelium defects (PED) and other pathologies [32–36]. It contributes to the acceleration of the healing process by increasing the proliferation and migration rate of cells. In addition, it is also involved in eye hydration [37] and reducing inflammation. Previous research has shown the retina responds well to PRGF treatment [38].

Therefore, the inherent features of PRGF suggest that it could act as an antioxidant agent. Consequently, we studied one of the most important antioxidant pathways, the Keap1-Nrf2 pathway, in order to test whether PRGF enhances the expression of antioxidant molecules. Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) binds to nuclear factor erythroid-related factor 2 (Nrf2) in the cytoplasm, keeping it inactivated. When ROS production increases, specific cysteine residues of Keap-1 are modified, releasing Nrf2 [39]. This translocates to nucleus, activating the expression of antioxidant enzymes such as heme oxygenase-1 (HO-1), glutamate-cysteine ligase (GCL), and NAD(P)H:quinone oxidoreductase (NQO1). These molecules join to ROS, blocking their action and reducing their effect, and thus protect cells against oxidation [40].

2. Results

2.1. *In Vitro* Viability Assays in ARPE19 Cell Cultures

Cell viability was measured at 1 + 18 h on ARPE19 cell cultures under the following treatments (see Table 1). For this, we performed MTT assays ($n = 24$) to assess the viability differences based on the treatment applied.

Table 1. Experimental groups for ARPE19 analysis.

Treatments	Medium	Dark/Blue Light
Control	DMEM F12 + FBS 1%	Dark 19 h
Blue light	DMEM F12 + FBS 1%	Dark 1 h + blue light 18 h
PRGF 10%	PRGF 10% on culture medium DMEM F12 +FBS 1%	Dark 19 h
PRGF 10% + blue light	PRGF 10% on culture medium DMEM F12 +FBS 1%	Dark 1 h + blue light 18 h

After 19 h of experimental conditions, the results demonstrated that blue light reduced cell viability by around 20% as compared with the control treatment. We also found that PRGF did not significantly alter cell viability as compared with the control, indicating that PRGF is not in itself toxic to cell. However, the most important result we found was that cell viability recovered to a statistically significant extent when blue light was combined with PRGF 10%, with it reaching normal values as compared with the control (Figure 1).

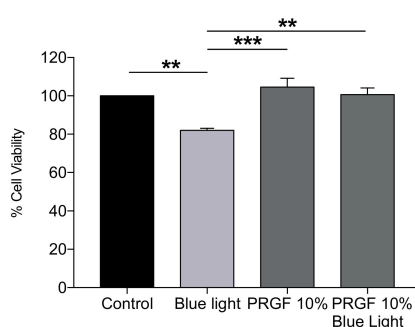


Figure 1. ARPE19 MTT assay ($n = 24$) for viability. Plasma rich in growth factors (PRGF) 10% protects cells against blue light insult by increasing cell viability up to control levels. Statistical analysis: One-way Anova, Tukey multiple comparison test, $** p < 0.005$, and $*** p < 0.0005$.

2.2. Analysis of ARPE19 Mitochondria Status and ROS Production

JC-1 staining was used to test mitochondrial status. This dye has two forms. It is red when mitochondria are in a healthy condition and green when they are depolarized. For this aspect of the trial, ARPE19 cells were divided into the same four groups previously described.

Cells exposed to blue light showed more depolarization than those in the control condition, suggesting that the mitochondria could be in a worse condition. In addition, PRGF 10% and PRGF 10% + blue light groups showed more polarization than the control. Quantitative analysis showed that PRGF significantly reduced the effect of blue light in cell mitochondria (Figure 2A).

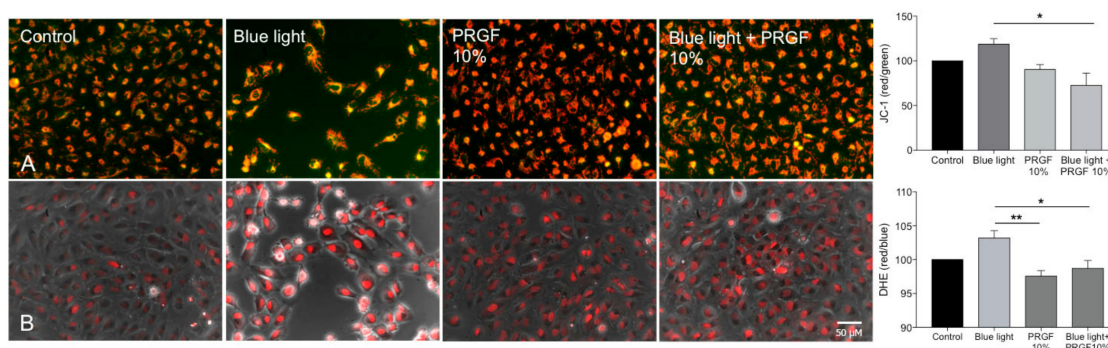


Figure 2. ARPE19 cell cultures ($n = 4$). (A) JC-1 staining to study mitochondria status, PRGF enhances mitochondria status in presence of blue light; (B) Dihydroethidium staining (DHE) for the presence of reactive oxygen species (ROS), PRGF significantly reduces the expression of ROS as compared with the blue light treatment. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, $* p < 0.05$, and $** p < 0.005$. Scale = 50 μ M.

Dihydroethidium staining (DHE) was used to check for any changes in ROS production in ARPE19 cells that were dependent on the treatment. Analysis showed that blue light increased the presence of ROS, while PRGF 10% reduced it significantly in both treatment scenarios where it was used (Figure 2B).

2.3. GSH Quantification and GCL Gene and Protein Expression

A glutathione assay kit was used to quantify the concentration of GSH (the reduced form of glutathione) in ARPE19 cell cultures. Cells were divided into the same four treatment groups described above. The results showed that blue light reduced GSH levels, although the difference was not significant as compared with the control (Figure 3).

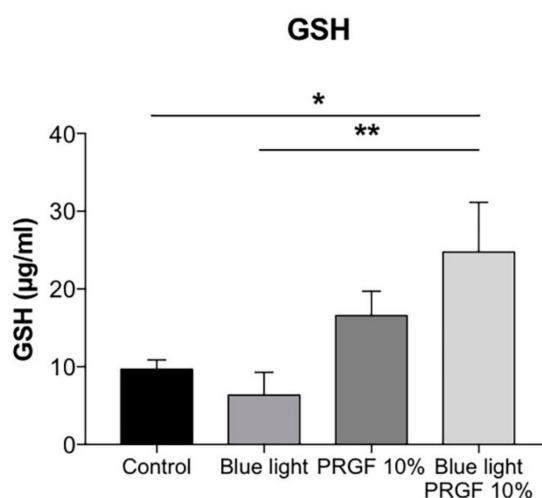


Figure 3. GSH quantification in ARPE19 cultures ($n = 4$). Blue light reduced the concentration of GSH, while PRGF significantly increased GSH compared to control. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, * $p < 0.05$, and ** $p < 0.005$.

The increase in ROS due to blue light could cause this result. Therefore, GSH is oxidized in order to protect cells against oxidant molecules. However, PRGF, whether in combination with blue light or not, significantly increased the expression of GSH.

In order to test the GSH pathway, we studied the expression of GCLM and GCLC. The results of qPCR showed that the expression of both glutamate-cystein ligase (GCL) subunits was increased by the presence of blue light (Figure 4A).

However, the increase was only significant for GCLC. The presence of PRGF, on the one hand, resulted in the significantly reduced expression of both molecules as compared with the blue light group, on the other hand for GCLC, the effect was significant whether or not PRGF was combined with blue light. Western blot analysis showed that PRGF increased the levels of both subunits in both the presence and absence of blue light as compared with the control group (Figure 4B).

Tests for the gene expression of GSTP1 were also performed. This molecule modulates the conjugation of GSH with hydrophobic and electrophilic compounds, protecting cells against ROS. The results (Figure 5) showed that blue light induced an increase in GSTP1 expression while PRGF reduced it significantly.

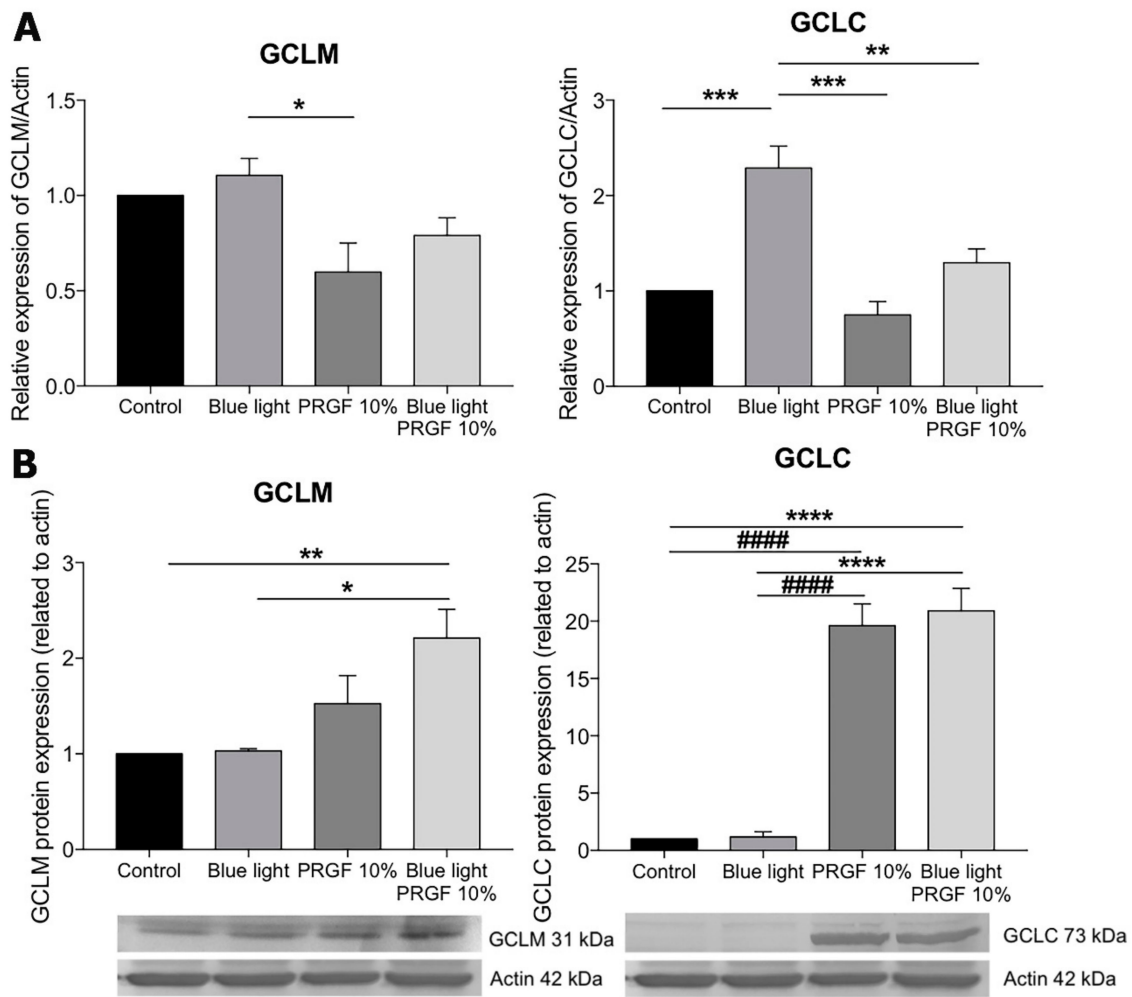


Figure 4. (A) GCLM and GCLC gene expression related to actin in ARPE19 ($n = 4$), PRGF reduced their expression in both the presence and absence of blue light; (B) GCLM and GCLC Western blot analysis in ARPE19, PRGF increased their expression in both cases. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$, and ##### $p < 0.0001$.

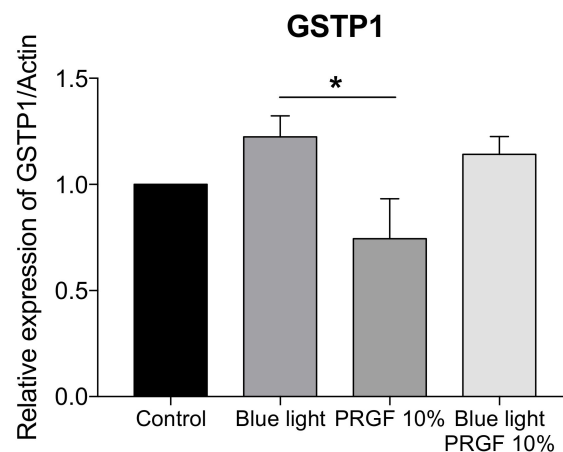


Figure 5. Gene expression of GSTP1 related to actin in ARPE19 cell cultures ($n = 4$). Blue light increased the expression of GSTP1, and PRGF reduced it significantly. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, and * $p < 0.05$.

2.4. Keap1-Nrf2 Antioxidant Pathway

We also studied the response of the Keap1-Nrf2 pathway to blue light and PRGF. The molecular results showed that blue light significantly increased the gene expression of both Nrf2 and Keap1 as compared with both the control group and PRGF 10% (Figure 6A). However, the expression of Keap1 in the blue light alone group was significantly different to the PRGF combined with blue light group. In terms of protein expression, we analyzed Nrf2 expression in cytoplasm and nucleus (Figure 6B). Cytoplasmic Nrf2 expression was increased in the presence of blue light but this was not statistically significant. However, nuclear Nrf2 was higher in the presence of PRGF as compared with the control. The results, therefore, show that PRGF increased the expression of antioxidant molecules.

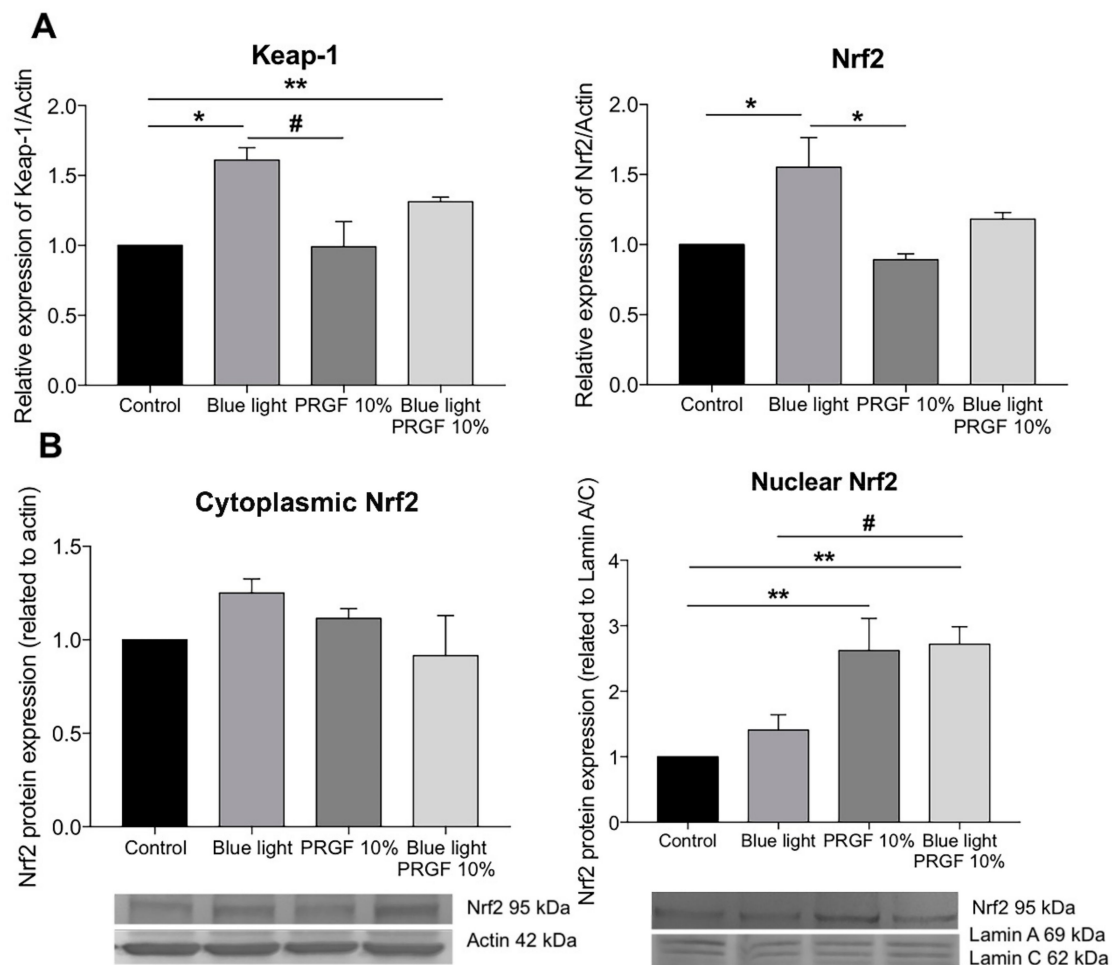


Figure 6. ARPE19 cell cultures ($n = 4$). (A) Nrf2 and Keap1 gene expression related to actin, blue light increased the expression of both genes but PRGF reduced it; (B) Nrf2 protein expression, blue light slightly increased the expression of cytoplasmic Nrf2 as compared with the control, nuclear Nrf2 increased when cells were treated with PRGF. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, and # $p < 0.05$.

To complete our analysis of the antioxidant pathway, we also studied the gene expression of molecules such as HO-1 and NQO1.

We found that HO-1 gene expression was stimulated by the presence of blue light (Figure 7A), as well as in the group where PRGF was combined with blue light. The Western blot (Figure 7B) and immunocytochemistry (Figure 8) results for HO-1 confirmed that PRGF stimulated the expression of HO-1 in the presence of blue light.

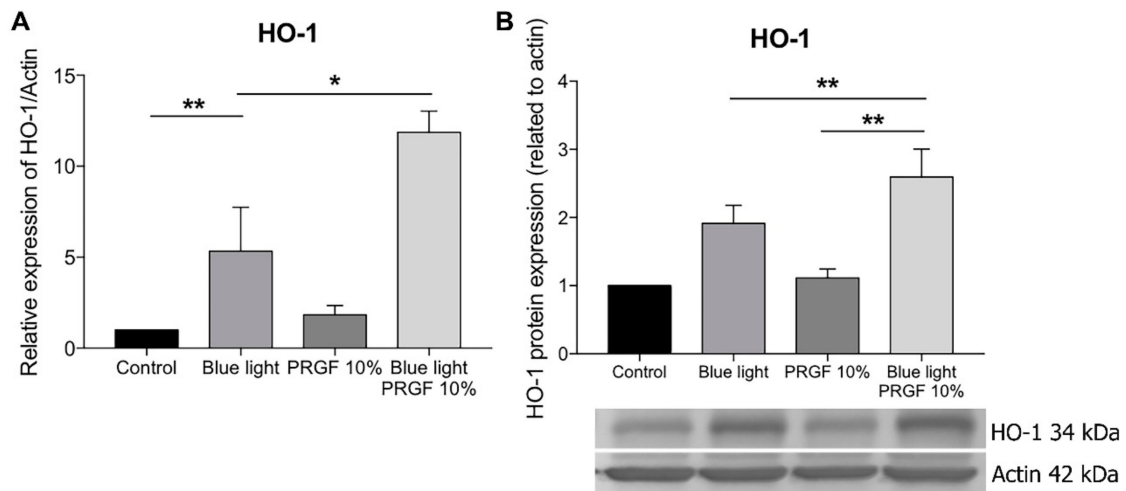


Figure 7. ARPE19 cell cultures. (A) HO-1 gene expression related to actin, blue light stimulated the expression of HO-1 as compared with the control, PRGF combined with blue light treatment showed a higher expression of HO-1 as compared with the other groups; (B) HO-1 protein expression related to actin, blue light increased the expression of HO-1 as did PRGF combined with blue light treatment. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, * $p < 0.05$, and ** $p < 0.005$.

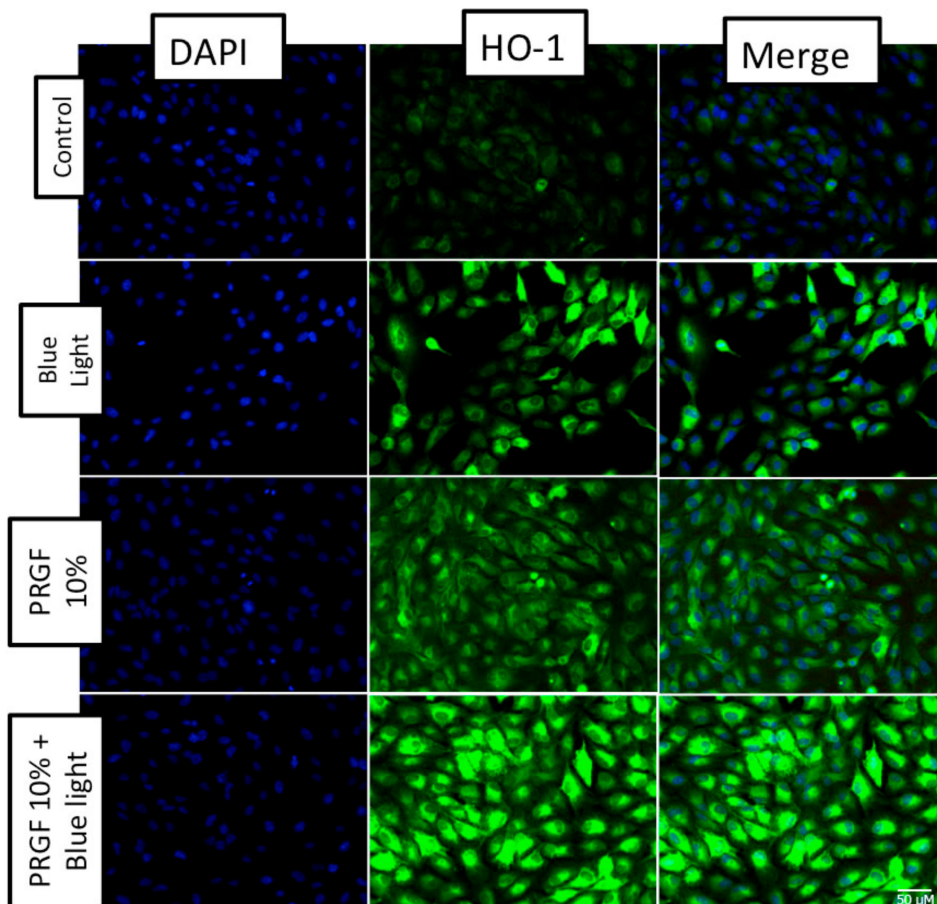


Figure 8. ARPE19 immunocytochemistry for HO-1 (green) and DAPI (blue) ($n = 4$). The results showed that blue light increased HO-1 expression. In addition, PRGF intrinsically expressed HO-1 as compared with the control. PRGF combined with blue light also increased staining for HO-1. Scale = 50 μM .

The molecular analysis of the NQO1 gene showed that blue light significantly increased its expression, however, PRGF, in combination with blue light or not, reduced it (Figure 9).

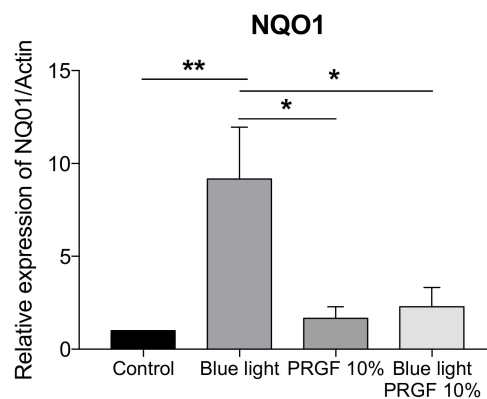


Figure 9. ARPE19 qPCR for NQO1 related to actin ($n = 4$). NQO1 expression is increased by blue light. However, PRGF reduced it significantly. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, * $p < 0.05$, and ** $p < 0.005$.

2.5. RPE Antioxidant Analysis in an Ex Vivo Model

An ex vivo model was performed to study the antioxidant effect on RPE of HO-1 and Nrf2. For this, rat eyecups were exposed to various conditions in order to observe the response of the tissue to the different insults (see Table 2).

Table 2. Experimental groups for ex vivo model.

Treatments	Medium	Dark/Blue Light
Control	DMEM F12 + FBS 10%	Dark 3 h
Blue light	DMEM F12 + FBS 10%	Blue light 3 h
PRGF 100%	PRGF 100%	Dark 3 h
PRGF 100% + blue light	PRGF 100%	Blue light 3 h

Using immunocytochemistry, we analyzed the expression of HO-1 (Figure 10A) and Nrf2 (Figure 11A). HO-1 expression was enhanced by the presence of blue light and reduced by PRGF 100% (Figure 10A).

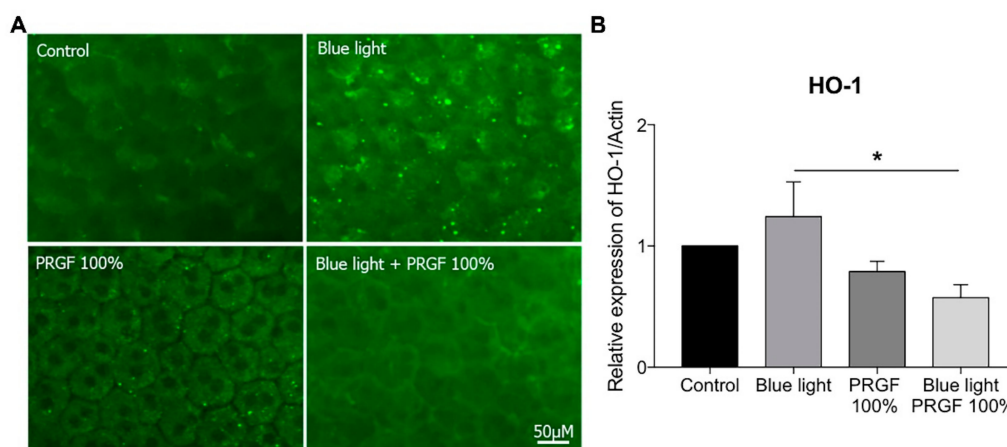


Figure 10. (A) RPE immunocytochemistry for HO-1 (green) ($n = 4$), results showed that blue light increased HO-1 expression but PRGF 100% reduced it; (B) expression of HO-1 is increased by blue light, PRGF 100% significantly reduced its expression when combined with blue light. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, and * $p < 0.05$. Scale = 50 μ M.

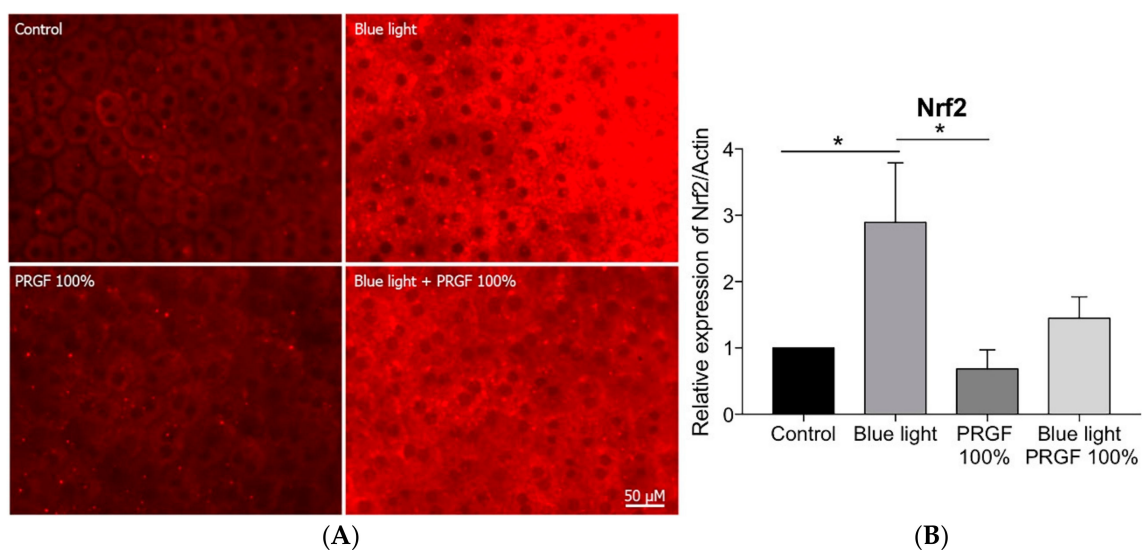


Figure 11. (A) RPE immunocytochemistry for Nrf2 (red) ($n = 4$), results showed that blue light increased Nrf2 staining, PRGF 100% combined with blue light resulted in reduced intensity of staining compared to blue light results; (B) Nrf2 gene expression was stimulated by blue light while PRGF 100% reduced it. Statistical analysis: One-way ANOVA, Tukey multiple comparison test, and $* p < 0.05$. Scale = 0.5 μM .

Nrf2 expression was stimulated by the presence of blue light, but PRGF 100% combined with blue light reduced it (Figure 11A). In order to confirm the results obtained by immunocytochemistry, we performed qPCR on the same genes. The results showed that HO-1 expression was significantly increased by blue light, whereas PRGF, both on its own and in combination with blue light, reduced it as compared with the control levels (Figure 10B). Furthermore, Nrf2 expression was also significantly increased under blue light conditions as compared with the control and PRGF 100% reduced its expression although this was not statistically significant (Figure 11B).

3. Discussion

AMD is one of the leading causes of blindness across the world. This pathology affects the RPE, which is the layer of cells that provides nutrients to photoreceptors and protects them against the action of free radicals [41–44]. There are a number of factors that aggravate this disease and one of them is blue light, which is found in white light LEDs and several devices, meaning that in developed countries people are frequently exposed to it. It is known that pathological tissues are more sensitive to this harm because of their vulnerability which increases the risk of suffering from neurodegenerative issues such as AMD [45,46].

Blue light is known to increase the production of free radicals (ROS), which affect mitochondrial function by degrading the enzymes that participate in the electron transport chain. This can lead to a deficiency in ATP production and finally cell death [47–50].

There is some evidence showing that PRGF can act as a protector. Several authors have demonstrated the benefits of using PRGF for wound healing and inflammation in ocular surface pathologies [28,32,33,35,36,51,52]. This research group, therefore, wanted to test whether it could act as a neuroprotective agent on RPE cells.

To do this, we used ARPE19 cells, an immortalized cell line of RPE human cells. First, a viability test was performed in order to study how blue light and PRGF could affect the cells. Our results showed that blue light reduced cell viability by about 20% as compared with the control, although viability for the PRGF 10% and the blue light group demonstrated normal levels as compared with the control and PRGF alone was not found to be toxic for cells since viability levels were similar to that of the control.

Mitochondrial status results showed that mitochondrial activity was affected by blue light but that the presence of PRGF during exposure to blue light or PRGF exposure alone did not cause a decrease in mitochondrial function. The DHE results showed that PRGF reduces the presence of ROS when cells are exposed to blue light. This suggests that PRGF could protect mitochondria against the harmful action of blue light.

In order to test the antioxidant pathway of Keap1-Nrf2, we decided to study its main components. Keap1 acts as a modulator of Nrf2 expression, binding to Nrf2 in the cytoplasm and keeping it inactive. When ROS levels increase, Keap1 releases Nrf2, which translocates to the nucleus and activates the expression of other antioxidant molecules such as GCL, HO-1, and NQO1 [53,54]. To examine this, we quantified glutathione (GSH) concentration. GSH is one of the major antioxidant molecules released in order to protect cells against ROS insult [40,55–59]. Our results showed that blue light reduced the concentration of GSH. This is because GSH donates a proton to ROS to stabilize them, and thus transforms into its oxidized form (GSSG). However, PRGF, whether combined or not with blue light, increased GSH concentration back up to control levels. We also studied GCL, which is the enzyme involved in the first step of glutathione synthesis. GCL is formed by two subunits, GCLM (modulator subunit) and GCLC (catalyser subunit). We studied the molecular and protein expression of both subunits and the qPCR results showed that the gene expression of both increased after exposure to blue light. This makes sense because GSH production depends on GCL genes expression. In terms of proteins, our results showed that PRGF increased the expression of both subunits. As happened in the GSH quantification, the more ROS are released the more GSH is consumed, and therefore enzyme too. We also tested the gene expression of GSTP1, which is involved in modulating the donation to GSH of hydrophobic and electrophilic compounds in order to protect against ROS [60]. The molecular results showed that blue light increased the expression of this molecule and PRGF neutralized it.

The results of the molecular expression of Keap1 showed that blue light increased its expression. However, PRGF combined with the insult did not significantly reduced it. Nrf2 gene expression was also increased by the presence of blue light but reduced by PRGF. In order to test protein expression, we used a Western blot analysis of both cytoplasmic and nuclear Nrf2 fractions. The results showed that cytoplasmic Nrf2 expression did not change as a function of the treatment applied. However, the nuclear expression of Nrf2 increased in the presence of PRGF. This result, thus, demonstrates that PRGF stimulates the antioxidant pathway.

We also studied the expression of HO-1 and NQO1. Gene expression of HO-1 was shown to be significantly increased by blue light as compared with the control. However, PRGF in the presence of blue light led to an even greater increase. This result could be explained by the increase of Nrf2 in nucleus. In terms of protein expression, HO-1 cytoplasmic expression is also elevated under blue light conditions, and it is also significantly increased when PRGF is present as well as blue light. These results concurred with those of the immunocytochemistry.

NQO1 gene expression was also increased by the presence of blue light, although in this case, PRGF whether combined or not did not increase its expression compared to control.

The *ex vivo* experiment results showed a different response. The RPE cells from rat eyecups were exposed to different treatments (only for 3 h to avoid tissue deterioration). The response of the tissue was analyzed (gene expression and immunocytochemistry of HO-1 and Nrf2) to examine the effects of the action of PRGF and blue light. The results showed that HO-1 expression in both cases was slightly stimulated by the presence of blue light. However, in this case, PRGF reduced expression of both genes as compared with the control. Some research has shown that HO-1 expression differs in terms of the species involved. We also consider that HO-1 expression is time dependant, and that 3 h would not have been enough time for HO-1 to be expressed, as happened with cell culture experiments [61,62]. The Nrf2 results showed that its expression was stimulated by blue light and reduced by PRGF, following the same pattern as HO-1. This could be related to the species as well as to exposure time. Nevertheless, tissue integrity was better maintained when blue light was combined with PRGF.

In summary, blue light has been shown to alter the expression of different molecules in both ARPE19 cells and in RPE from rat eyecups. The expression of antioxidant genes such as Nrf2, HO-1, GCL, and NQO1 was increased in the presence of blue light. However, the results also demonstrated that PRGF blunts this effect by protecting cells against oxidative stress.

Future research work is needed to deepen our understanding of how PRGF can be used as a neuroprotector for retinal disorders.

4. Animals, Material, and Methods

4.1. PRGF

In accordance with the Helsinki Declaration of 2013, blood from 4 different healthy donors (all women, mean age 33 ± 7 years) was collected and placed in 9 mL tubes with 3.8% sodium citrate (Vacuette tube, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). The blood was then centrifuged at room temperature (Endoret System, BTI Biotechnology Institute, S.L., Vitoria, Spain). Whole plasma was collected after centrifugation, avoiding the leukocyte layer, and transferred to a 15 mL tube. Plasma was mixed with calcium chloride for fibrinogen activation and incubated for 30 min at 37 °C, or until clotting was achieved. The supernatant was collected and exposed to heat (56 °C) for 1 h in order to inactivate the complement system. After that, the plasma was filtered, aliquoted, and kept at -4 °C until use (less than 6 months).

4.2. Cell Culture Analysis

Human ARPE19 cells (ATCC, Wesel, Germany) were grown in a culture medium that consisted of DMEM-F12 solution (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA), supplemented with 2% antibiotic penicillin/streptomycin (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) and 10% FBS, and kept in a humidified atmosphere of 5% CO₂, at 37 °C. Doubling growth time was approximately 60 h. Either 100 µL or 2 mL of cell culture (approximately 10×10^4 cells/mL) were taken and placed in 96-well plates or T75 flasks, respectively.

After allowing the cells to settle (approximately 24 h in the case of the 96-well plates and 72 h in that of the T75 flasks) the samples were subjected to the treatment regimens indicated in Table 1.

Blue light LEDs (Electro DH SL, Barcelona, Spain) were used to deliver light (465–475 nm, 400 lux, 18 W/m²) to the cultures and the temperature was monitored to maintain it at 37 °C.

The aim of giving cells a one-hour pretreatment in the dark was to let them settle in the new culture medium.

4.3. Cell Viability

Cell viability was assessed by the MTT reduction assay. Briefly, cells were subjected to the appropriate treatment and then MTT (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was added at a final concentration of 0.5 mg/mL for 75 min at 37 °C. After that, the medium was removed and the reduced MTT (blue formazan crystals) was solubilized by adding 100 µL DMSO to each well. After agitation of the plates for 5 min, the optical density of the solubilized crystals was measured using an automated microplate reader at a wavelength of 570 nm (PerkinElmer 2030 Multilabel Reader, Victor X5, Waltham, MA, USA).

4.4. JC-1 and DHE

For the analysis of mitochondrial status, cells were incubated with JC-1 (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) dye (1.5 µg/mL) for 30 min. The accumulation of JC-1 in mitochondria appears as a red/orange fluorescence (590 nm) in healthy organelles and green when it is depolarised (530 nm). Fluorescence images of cells were recorded and the relative levels of the intensities of green/red JC-1 fluorescence quantified using a microplate reader at wavelengths of 570 nm and 535 nm.

For the analysis of ROS, culture medium was removed and the cells incubated with DHE (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (40 μ M), for 30 min after which they were 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 to 420 nm (for cytoplasm of living cells) and 535 to 610 nm (for chromatin of living cells, in red) using a microplate reader.

4.5. GSH Quantification

A glutathione assay kit (703002, Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA) was used to quantify GSH concentration. Briefly, ARPE19 cells were centrifuged after collection. The resulting pellet was homogenized and sonicated for 1 min in 500 μ L of cold buffer. After this, the cells were centrifuged again at 10,000 \times g 15 min at 4 °C. The supernatant was mixed with 500 μ L of MPA reagent and mixed by vortexing, left to stand at room temperature for 5 min and, then, recentrifuged at 3000 \times g 4 min. Then, 50 μ L of TEAM Reagent was added per ml of sample and vortexed. Finally, 50 μ L of sample and 150 μ L of Assay Cocktail were added to each well of a 96-well plate. GSH levels were tested at five minutes intervals for 30 min at 405–414 nm in a plate reader.

4.6. Immunocytochemistry

ARPE19 cell cultures were fixed in cold methanol or 4% paraformaldehyde for 10 min which was followed by washing in phosphate buffer (PBS). After incubation in goat serum (10% in PBS) for 60 min and washing in PBS, cultures were then exposed overnight at 4 °C to anti-HO-1 (Enzo LS, Farmingdale, NY, USA, 1:100). After washing with PBS, cultures were, then, exposed for 2 h to the appropriate secondary antibody conjugated either to Alexa Fluor 488 or to Alexa Fluor 594 (1:300), and then washed in buffer. After that, 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).

4.7. Western Blot Analysis

ARPE19 cells were collected by scraping them from the T75 flasks, followed by centrifugation and resuspension in a cocktail lysis buffer that contained phosphatase and protease inhibitors (Sigma, Aldrich). After freezing and thawing in combination with sonication, the supernatant with its protein content was collected. In order to extract the nuclear protein fraction, the pellet was exposed to a further extraction process with a buffer (HEPES, MgCl₂, NaCl, EDTA, glycerol, and DTT). 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, 1:4.000), anti-lamin A/C (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA, 1:100), anti-Nrf2 (Abcam, Cambridge, UK, 1:1.000), Anti-HO-1 (ADI-SPA895, Enzo LS, 1:200), GCLC (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA, 1 μ g/mL), GCLM (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA, 1:1.000). 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 (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

4.8. RNA Extraction and mRNA Analysis

Total RNA from ARPE19 cells was extracted using the Illustra RNAspin Mini kit from GE Healthcare. The purity of the RNA was then checked by the A260/A280 and A260/A230 ratio. Next, 0.5 μ g of total RNA was used for linear conversion of RNA to cDNA with High Capacity

RNA-to-cDNA Master Mix (Cat. Num. 4387406, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions (60 min at 37 °C, 5 min at 95 °C, and held at 4 °C). Primers (see Table 3) were customised using PrimerBLAST and synthesized by Sigma-Aldrich. Gene expression was performed by relative quantification in a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) using a Power SYBR Green PCR Master Mix (Cat. Num. 4367659, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) and the $\Delta\Delta C_t$ method. Each sample was analyzed in triplicate for each of the experiments ($n = 4$). Data were analyzed using SDS 1.4 software (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

Table 3. Sequences of human primers used.

Gene	ID	Forward	Reverse
<i>Actin</i>	NM_001101.4	5'-ATTCCAAATATGAGATGCGTTGTT-3'	5'-GTGGACTGGGAGAGGACTG-3'
<i>NQO1</i>	NM_000903.3	5'-TTGAGCGAGTGTTCATAGGAGAG-3'	5'-CCTTCTACTCCGGAAGGGT-3'
<i>HO-1</i>	NM_002133.2	5'-CTGGAGGAGGAGATTGAGCG-3'	5'-ATGGCTGGTGTGTAGGGGAT-3'
<i>GCLM</i>	NM_002061.3	5'-AGCAXTTTCTCGGCTACGATT-3'	5'-GCGGGAGAGCTGATTCCAAA-3'
<i>GCLC</i>	NM_001498.3	5'-TGGAGACCAGATATGGGAGT-3'	5'-AAGGTACTGAACGAGGGT-3'
<i>GSTP1</i>	NM_000852.3	5'-AGGCCTTCGCTGGAGTTTC-3'	5'-CGGCCTCGAACTGGGAAATA-3'
<i>Keap1</i>	NM_012289.3	5'-CCATGAAGCACGGCGAAGTCCC-3'	5'-GTCTGTATCTGGGTCGTAACACTCCAC-3'
<i>Nrf2</i>	NM_001313904.1	5'-TCAGTCAGCGACGGAAAGAG-3'	5'-GTGGGCAACCTGTCTTTCAT-3'

4.9. Animals

This study was performed in accordance with the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The procedures and experimental designs were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Oviedo (Oviedo, Principado de Asturias, Spain) (PROAE 17/2017) and complied with European and national laws.

Wistar male rats of about 500 gr ($n = 40$) were anaesthetised with ketamine/xylazine 80/10 mg/kg. A second injection of 1/3 of the initial anaesthetic solution was used to keep the rats asleep for 60 min. After that, they were euthanised with a pentobarbital injection and their eyes enucleated. After this, the cornea, lens, and vitreous were removed and the eyecups were placed in a 96-well plate. Blue light LEDs were used to deliver light to the RPE at 465–475 nm (900 lux, 32 W/m²) for 3 h.

4.9.1. Immunocytochemistry

Eyecups of 16 male Wistar rats were fixed in cold methanol for 60 min, then, washed in phosphate buffer (PBS). After incubation in goat serum (10% in PBS) for 60 min and washing in PBS, the cultures were then exposed overnight at 4 °C to anti-ZO-1 (Thermo Fischer, Waltham, MA, USA, 1:100), anti-HO-1 (Enzo LS, Farmingdale, NY, USA, 1:100), and anti-Nrf2 (Abcam, Cambridge, UK, 1:100). After washing with PBS, cultures were then exposed for 2 h to the appropriate secondary antibody conjugated to either Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (1:300) and washed in buffer. After that, DAPI (0.2 µg/mL) was added to a wash solution. Images were obtained using a Leica DMI6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

4.9.2. RNA Extraction and mRNA Analysis

RPE from male Wistar rats ($n = 24$) was removed from the eyecup by scraping carefully with a scalper. Total RNA from RPE was extracted using the Arcturus PicoPure RNA Isolation Kit (Applied biosystems, Thermo Fischer, Waltham, MA, USA). The purity of RNA was checked by the A260/A280 and A260/A230 ratio. Next, 0.5 µg of total RNA was used for the linear conversion of RNA to cDNA with High Capacity RNA-to-cDNA Master Mix (Cat. Num. 4387406, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) following the manufacturer's instructions (60 min at 37 °C, 5 min at 95 °C, and held at 4 °C). Primers (see Table 4) were customised using PrimerBLAST and synthesized by Sigma-Aldrich. Gene expression was analyzed by relative quantification ($\Delta\Delta C_t$ method) on a 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) using a Power SYBR Green PCR Master Mix (cat. no. 4367659, Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Each sample was analyzed in triplicate for

each of the experiments ($n = 4$). Data were analyzed using SDS 1.4 software (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA).

Table 4. Sequences of rat primers used.

Gene	ID	Forward	Reverse
<i>Actin</i>	NM_031144.3	5'-GCGTCCACCCGCGAGTACAAC-3'	5'-CGACGACGAGCGCAGCGATA-3'
<i>HO-1</i>	NM_012580.2	5'-CAGCCCCAAATCCTGCAACAGA-3'	5'-CAACATGGACGCGCCGACTACCAA-3'
<i>Nrf2</i>	NM_001145412.3	5'-ATTGTAGATGACCATGAGTCGC-3'	5'-TCCTGCCAAACTTGCTCCAT-3'

4.10. Statistical Analysis

All statistical tests were analyzed using Graphpad Prism version 7.0a for Mac (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). To assess the statistical significance of two mean differences, we used a one-way ANOVA test. For the statistical comparison of mean differences between treatments we used a Tukey multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when p -values were < 0.05 .

Author Contributions: Conceptualization, C.S.-B., J.M.-L. and S.d.O.-A.; methodology, C.S.-B., E.G.-P., B.B.-A., L.F.-V.-C., M.d.l.F., F.M., E.A and S.d.O.-A.; formal analysis, C.S.-B. and S.d.O.-A.; investigation, C.S.-B., E.G.-P. and S.d.O.-A.; resources, L.F.-V.-C., L.F.-V., J.M.-L. and S.d.O.-A.; writing—original draft preparation, C.S.-B., E.G.-P. and S.d.O.-A.; writing—review and editing, C.S.-B., E.G.-P., B.B.-A., L.F.-V.-C., L.F.-V., J.M.-L., M.d.l.F., F.M., E.A and S.d.O.-A.; visualization, C.S.-B., E.G.-P., B.B.-A., L.F.-V.-C., L.F.-V., J.M.-L., M.d.l.F., F.M., E.A and S.d.O.-A.; supervision, L.F.-V.-C., J.M.-L. and S.d.O.-A.; project administration, S.O.A.; funding acquisition, L.F.-V. and S.d.O.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by the grant PI17/01549 from the “Acción Estratégica en Salud (AES)”- Instituto de Salud Carlos III- of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and the European Union through the “Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER)”.

Acknowledgments: Authors are grateful to Enol Artime, Joana Serrano, Claudia Núñez, and Neville Osborne for their help.

Conflicts of Interest: C.S.B., S.O.A., E.G.P., B.B.A., L.F.V.C., L.F.V., and J.M.L.L. declare no conflict of interest. M.F., F.M. and E.A. declare the following competing financial interest(s): E.A. is the Scientific Director and M.F. and F.M. are researchers at BTI Biotechnology Institute, a company that investigates in the fields of oral implantology and PRGF-Endoret technology.

Data availability Statement: All the obtained data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

References

- Moutray, T.; Chakravarthy, U. Age-related macular degeneration: Current treatment and future options. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **2011**, *2*, 325–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- La Cour, M.; Tezel, T. The Retinal Pigment Epithelium. *Adv. Organ. Biol.* **2005**, *10*, 253–272.
- Boulton, M.; Dayhaw-Barker, P. The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye* **2001**, *15*, 384–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Thoreson, W.B.; Margalit, E. Macular Degeneration. In *Reference Module in Biomedical Sciences*; Elsevier: New York, NY, USA, 2014.
- Brown, E.E.; DeWeerd, A.J.; Ildefonso, C.J.; Lewin, A.S.; Ash, J.D. Mitochondrial oxidative stress in the retinal pigment epithelium (RPE) led to metabolic dysfunction in both the RPE and retinal photoreceptors. *Redox Biol.* **2019**, *24*, 101201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Datta, S.; Cano, M.; Ebrahimi, K.; Wang, L.; Handa, J.T. The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog. Retin. Eye Res.* **2017**, *60*, 201–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Beatty, S.; Koh, H.H.; Phil, M.; Henson, D.; Boulton, M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv. Ophthalmol.* **2000**, *45*, 115–134. [[CrossRef](#)]
- Tao, J.X.; Zhou, W.C.; Zhu, X.G. Mitochondria as Potential Targets and Initiators of the Blue Light Hazard to the Retina. *Oxid. Med. Cell. Longev.* **2019**, *2019*, 6435364. [[CrossRef](#)]
- Detmer, S.A.; Chan, D.C. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2007**, *8*, 870–879. [[CrossRef](#)]

10. Kumari, A. Electron Transport Chain. In *Sweet Biochemistry*; Elsevier: New York, NY, USA, 2018; pp. 13–16.
11. Osborne, N.N. Mitochondria: Their role in ganglion cell death and survival in primary open angle glaucoma. *Exp. Eye Res.* **2010**, *90*, 750–757. [[CrossRef](#)]
12. Núñez-Álvarez, C.; Suárez-Barrio, C.; del Olmo Aguado, S.; Osborne, N.N. Blue light negatively affects the survival of ARPE19 cells through an action on their mitochondria and blunted by red light. *Acta Ophthalmol.* **2019**, *97*, e103–e115. [[CrossRef](#)]
13. Liang, F.Q.; Godley, B.F. Oxidative stress-induced mitochondrial DNA damage in human retinal pigment epithelial cells: A possible mechanism for RPE aging and age-related macular degeneration. *Exp. Eye Res.* **2003**, *76*, 397–403. [[CrossRef](#)]
14. Organisciak, D.T.; Vaughan, D.K. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Prog. Retin. Eye Res.* **2010**, *29*, 113–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Jaadane, I.; Villalpando Rodriguez, G.E.; Boulenguez, P.; Chahory, S.; Carré, S.; Savoldelli, M.; Jonet, L.; Behar-Cohen, F.; Martinsons, C.; Torriglia, A. Effects of white light-emitting diode (LED) exposure on retinal pigment epithelium in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 3453–3466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Krigel, A.; Berdugo, M.; Picard, E.; Levy-Boukris, R.; Jaadane, I.; Jonet, L.; Dernigoghossian, M.; Andrieu-Soler, C.; Torriglia, A.; Behar-Cohen, F. Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals LED phototoxicity. *Neuroscience* **2016**, *339*, 296–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Alaimo, A.; Liñares, G.G.; Bujjamer, J.M.; Gorojod, R.M.; Alcon, S.P.; Martínez, J.H.; Baldessari, A.; Grecco, H.E.; Kotler, M.L. Toxicity of blue led light and A2E is associated to mitochondrial dynamics impairment in ARPE-19 cells: Implications for age-related macular degeneration. *Arch. Toxicol.* **2019**, *93*, 1401–1415. [[CrossRef](#)]
18. Behar-Cohen, F.; Martinsons, C.; Viénot, F.; Zissis, G.; Barlier-Salsi, A.; Cesarini, J.P.; Enouf, O.; Garcia, M.; Picaud, S.; Attia, D. Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: Any risks for the eye? *Prog. Retin. Eye Res.* **2011**, *30*, 239–257. [[CrossRef](#)]
19. Lougheed, T. Hidden blue hazard?: Led lighting and retinal damage in rats. *Environ. Health Perspect.* **2014**, *122*, A81. [[CrossRef](#)]
20. Holzman, D.C. What's in a color? The unique human health effects of blue light. *Environ. Health Perspect.* **2010**, *118*, A22–A27. [[CrossRef](#)]
21. Shang, Y.M.; Wang, G.S.; Sliney, D.; Yang, C.H.; Lee, L.L. White light-emitting diodes (LEDs) at domestic lighting levels and retinal injury in a rat model. *Environ. Health Perspect.* **2014**, *122*, 269–276. [[CrossRef](#)]
22. King, A.; Gottlieb, E.; Brooks, D.G.; Murphy, M.P.; Dunaief, J.L. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*, 470–475. [[CrossRef](#)]
23. Ott, M.; Gogvadze, V.; Orrenius, S.; Zhivotovsky, B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* **2007**, *12*, 913–922. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Osborne, N.N.; Li, G.-Y.; Ji, D.; Mortiboys, H.J.; 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*, 2013–2028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Youn, H.-Y.; Chou, B.R.; Cullen, A.P.; Sivak, J.G. Effects of 400 nm, 420 nm, and 435.8 nm radiations on cultured human retinal pigment epithelial cells. *J. Photochem. Photobiol. B* **2009**, *95*, 64–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Orrenius, S. Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab. Rev.* **2007**, *39*, 443–455. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Del Olmo-Aguado, S.; Núñez-Álvarez, C.; Osborne, N.N. Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 2324–2335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Anitua, E.; Sánchez, M.; Orive, G.; Andía, I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4551–4560. [[CrossRef](#)]
29. Anitua, E.; Sanchez, M.; De la Fuente, M.; Zalduendo, M.M.; Orive, G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg. Sport. Traumatol. Arthrosc.* **2012**, *20*, 1657–1665. [[CrossRef](#)]
30. Anitua, E.; Sánchez, M.; Orive, G.; Andia, I. Delivering growth factors for therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2008**, *29*, 37–41. [[CrossRef](#)]

31. Anitua, E.; Andia, I.; Ardanza, B.; Nurden, P.; Nurden, A.T. Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb. Haemost.* **2004**, *91*, 4–15. [[CrossRef](#)]
32. López-Plandolit, S.; Morales, M.-C.; Freire, V.; Grau, A.E.; Durán, J.A. Efficacy of Plasma Rich in Growth Factors for the Treatment of Dry Eye. *Cornea* **2011**, *30*, 1312–1317. [[CrossRef](#)]
33. López-Plandolit, S.; Morales, M.-C.; Freire, V.; Etxebarria, J.; Durán, J.A. Plasma Rich in Growth Factors as a Therapeutic Agent for Persistent Corneal Epithelial Defects. *Cornea* **2010**, *29*, 843–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Freire, V.; Andollo, N.; Etxebarria, J.; Durán, J.A.; Morales, M.-C. In Vitro Effects of Three Blood Derivatives on Human Corneal Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **2012**, *53*, 5571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Etxebarria, J.; Sanz-Lázaro, S.; Hernáez-Moya, R.; Freire, V.; Durán, J.A.; Morales, M.C.; Andollo, N. Serum from plasma rich in growth factors regenerates rabbit corneas by promoting cell proliferation, migration, differentiation, adhesion and limbal stemness. *Acta Ophthalmol.* **2017**, *95*, e693–e705. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Freire, V.; Andollo, N.; Etxebarria, J.; Hernáez-Moya, R.; Durán, J.A.; Morales, M.C. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: An in vitro and in vivo comparative study. *Cornea* **2014**, *33*, 614–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Drew, V.J.; Tseng, C.L.; Seghatchian, J.; Burnouf, T. Reflections on dry eye syndrome treatment: Therapeutic role of blood products. *Front. Med.* **2018**, *5*, 33. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Sánchez-ávila, R.M.; González, Á.F.V.; Sanz, Á.F.V.; Merayo-Llodes, J. Treatment of recurrent myopic macular hole using membrane of plasma rich in growth factors. *Int. Med. Case Rep. J.* **2019**, *12*, 229–233. [[CrossRef](#)]
39. Katsuragi, Y.; Ichimura, Y.; Komatsu, M. Regulation of the Keap1–Nrf2 pathway by p62/SQSTM1. *Curr. Opin. Toxicol.* **2016**, *1*, 54–61. [[CrossRef](#)]
40. Zhu, C.; Dong, Y.; Liu, H.; Ren, H.; Cui, Z. Hesperetin protects against H₂O₂-triggered oxidative damage via upregulation of the Keap1–Nrf2/HO-1 signal pathway in ARPE-19 cells. *Biomed. Pharmacother.* **2017**, *88*, 124–133. [[CrossRef](#)]
41. Gehrs, K.M.; Anderson, D.H.; Johnson, L.V.; Hageman, G.S. Age-related macular degeneration—Emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann. Med.* **2006**, *38*, 450–471. [[CrossRef](#)]
42. Klein, R.; Chou, C.F.; Klein, B.E.K.; Zhang, X.; Meuer, S.M.; Saaddine, J.B. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch. Ophthalmol.* **2011**, *129*, 75–80. [[CrossRef](#)]
43. Golestaneh, N.; Chu, Y.; Xiao, Y.Y.; Stoleru, G.L.; Theos, A.C. Dysfunctional autophagy in RPE, a contributing factor in age-related macular degeneration. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Fisher, C.R.; Ferrington, D.A. Perspective on AMD pathobiology: A bioenergetic crisis in the RPE. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2018**, *59*, AMD41–AMD47. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Moon, J.; Yun, J.; Yoon, Y.D.; Park, S.I.; Seo, Y.J.; Park, W.S.; Chu, H.Y.; Park, K.H.; Lee, M.Y.; Lee, C.W.; et al. Blue light effect on retinal pigment epithelial cells by display devices. *Integr. Biol.* **2017**, *9*, 436–443. [[CrossRef](#)]
46. Roehlecke, C.; Schaller, A.; Knels, L.; Funk, R.H.W. The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 1929–1938.
47. Lockwood, D.B.; Wataha, J.C.; Lewis, J.B.; Tseng, W.Y.; Messer, R.L.W.; Hsu, S.D. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent. Mater.* **2005**, *21*, 683–688. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. El-Esawi, M.; Arthaut, L.D.; Jourdan, N.; D’Harlingue, A.; Link, J.; Martino, C.F.; Ahmad, M. Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of Arabidopsis cryptochrome. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–9. [[CrossRef](#)]
49. Fleury, C.; Mignotte, B.; Vayssière, J.-L. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* **2002**, *84*, 131–141. [[CrossRef](#)]
50. Ryter, S.W.; Hong, P.K.; Hoetzel, A.; Park, J.W.; Nakahira, K.; Wang, X.; Choi, A.M.K. Mechanisms of cell death in oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal* **2007**, *9*, 49–89. [[CrossRef](#)]
51. Haigler, M.C.; Abdulrehman, E.; Siddappa, S.; Kishore, R.; Padilla, M.; Enciso, R. Use of platelet-rich plasma, platelet-rich growth factor with arthrocentesis or arthroscopy to treat temporomandibular joint osteoarthritis: Systematic review with meta-analyses. *J. Am. Dent. Assoc.* **2018**, *149*, 940–952. [[CrossRef](#)]
52. Suárez-Barrio, C.; Etxebarria, J.; Hernáez-Moya, R.; Del Val-Alonso, M.; Rodríguez-Astigarraga, M.; Urkaregi, A.; Freire, V.; Morales, M.C.; Durán, J.A.; Vicario, M.; et al. Hyaluronic acid combined with serum rich in growth factors in corneal epithelial defects. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1655. [[CrossRef](#)]

53. Hanus, J.; Kolkin, A.; Chimienti, J.; Botsay, S.; Wang, S. 4-acetoxyphenol prevents RPE oxidative stress-induced necrosis by functioning as an NRF2 stabilizer. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2015**, *56*, 5048–5059. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Sachdeva, M.M.; Cano, M.; Handa, J.T. Nrf2 signaling is impaired in the aging RPE given an oxidative insult. *Exp. Eye Res.* **2014**, *119*, 111–114. [[CrossRef](#)]
55. Vu, K.T.; Hulleman, J.D. An inducible form of Nrf2 confers enhanced protection against acute oxidative stresses in RPE cells. *Exp. Eye Res.* **2017**, *164*, 31–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Zou, X.; Feng, Z.; Li, Y.; Wang, Y.; Wertz, K.; Weber, P.; Fu, Y.; Liu, J. Stimulation of GSH synthesis to prevent oxidative stress-induced apoptosis by hydroxytyrosol in human retinal pigment epithelial cells: Activation of Nrf2 and JNK-p62/SQSTM1 pathways. *J. Nutr. Biochem.* **2012**, *23*, 994–1006. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Kim, C.Y.; Lee, C.; Park, G.H.; Jang, J.H. Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against β -amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity. *Arch. Pharm. Res.* **2009**, *32*, 869–881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Malone, P.E.; Hernandez, M.R. 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp. Eye Res.* **2007**, *84*, 444–454. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Argun, M.; Tök, L.; Uğuz, A.C.; Çelik, Ö.; Tök, Ö.Y.; Naziroğlu, M. Melatonin and amfenac modulate calcium entry, apoptosis, and oxidative stress in ARPE-19 cell culture exposed to blue light irradiation (405 nm). *Eye* **2014**, *28*, 752–760. [[CrossRef](#)]
60. Lee, W.H.; Joshi, P.; Wen, R. Glutathione S-transferase pi isoform (GSTP1) expression in murine retina increases with developmental maturity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **2014**, *801*, 23–30.
61. Juan, S.H.; Cheng, T.H.; Lin, H.C.; Chu, Y.L.; Lee, W. Sen Mechanism of concentration-dependent induction of heme oxygenase-1 by resveratrol in human aortic smooth muscle cells. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *69*, 41–48. [[CrossRef](#)]
62. Lever, J.M.; Boddu, R.; George, J.F.; Agarwal, A. Heme oxygenase-1 in kidney health and disease. *Antioxid. Redox Signal* **2016**, *25*, 165–183. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Plasma Rich in Growth Factors Enhances Cell Survival after in Situ Retinal Degeneration

Carlota Suárez-Barrio ^{1,2} , Susana del Olmo-Aguado ^{1,2,*} , Eva García-Pérez ¹ ,
Enol Artime ¹, María de la Fuente ^{3,4}, Francisco Muruzabal ^{3,4} , Eduardo Anitua ^{3,4} ,
Begoña Baamonde-Arbaiza ^{1,2}, Luis Fernández-Vega ^{1,2} and Jesús Merayo-Llodes ^{1,2}

¹ Instituto Universitario Fernández-Vega, Fundación de Investigación Oftalmológica & Universidad de Oviedo, 33012 Oviedo, Spain; carlotasb.8@gmail.com (C.S.-B.); evagp2002@gmail.com (E.G.-P.); enol.artime@fio.as (E.A.); bbaamonde@yahoo.es (B.B.-A.); prof.luis@fernandez-vega.com (L.F.-V.); merayo@fio.as (J.M.-L.)

² Instituto de Investigación Sanitaria del Principado de Asturias, Avenida de Roma s/n, 33011 Oviedo, Spain

³ BTI Biotechnology Institute, 01007 Vitoria, Spain; maria.delafuente@bti-implant.es (M.d.l.F.); francisco.muruzabal@bti-implant.es (F.M.); dentalresearch@fundacioneduardoanitua.org (E.A.)

⁴ University Institute for Regenerative Medicine and Oral Implantology—UIRMI (UPV/EHU-Fundación Eduardo Anitua), 01007 Vitoria, Spain

* Correspondence: solmo@fio.as

Received: 26 August 2020; Accepted: 8 October 2020; Published: 9 October 2020



Abstract: Purpose: The purpose of this study was to examine the effect of plasma rich in growth factors (PRGFs) under blue light conditions in an in vivo model of retinal degeneration. Methods: Male Wistar rats were exposed to dark/blue light conditions for 9 days. On day 7, right eyes were injected with saline and left eyes with PRGF. Electroretinography (ERG) and intraocular pressure (IoP) measurements were performed before and after the experiment. After sacrifice, retinal samples were collected. Hematoxylin and eosin staining was performed to analyze the structure of retinal sections. Immunofluorescence for brain-specific homeobox/POU domain protein 3A (Brn3a), choline acetyltransferase (ChAT), rhodopsin, heme oxygenase-1 (HO-1), and glial fibrillary acidic protein (GFAP) was performed to study the retinal conditions. Results: Retinal signaling measured by ERG was reduced by blue light and recovered with PRGF; however, IoP measurements did not show significant differences among treatments. Blue light reduced the expression for Brn3a, ChAT, and rhodopsin. Treatment with PRGF showed a recovery in their expressions. HO-1 and GFAP results showed that blue light increased their expression but the use of PRGF reduced the effect of light. Conclusions: Blue light causes retinal degeneration. PRGF mitigated the injury, restoring the functionality of these cells and maintaining the tissue integrity.

Keywords: retina; plasma rich in growth factors (PRGF); blue light; degeneration; electrical signaling; photoreceptor; retinal injury

1. Introduction

The role of artificial light in retinal degeneration has been gaining attention as a possible risk factor [1–7]. White light, which corresponds to visible light, is commonly formed by different fractions of short wavelengths, including the blue light spectrum. This short wavelength light reaches the retinal cells, causing a disruption in their molecular bases and finally damaging the cell structure [3,8–10]. The presence of risk factors, such as obesity, smoking, and aging, on top of pre-existing eye pathologies, can lead to a progressive decline in retinal cells' integrity and, eventually, loss of vision [11–16].

Specifically, blue light is known to increase the presence of reactive oxygen species (ROS). These molecules involve a deregulation of the main enzymes of the retinal metabolism present in the

mitochondrial electron transport chain, producing a progressive interruption of ATP production, thereby promoting cell death. This can lead to a decrease in the number of visual cells, inducing a reduction in their functionality and, consequently, loss of vision. These cells are photoreceptors, such as cones and rods, and ganglion cells, amongst others [17–21].

Researchers have been attempting to find a solution to this problem for several years. For instance, plasma rich in growth factors (PRGF), which is a serum obtained from a patient's blood, has been already proven to enhance cell proliferation, help with wound healing, and act as a neuroprotector or an anti-inflammatory agent [22–24]. It has been widely used in oral implantology and traumatology, and in ophthalmology for treating ocular surface diseases, such as persistent epithelial defects (PEDs) [25–29], conjunctivitis, or other ocular surface pathologies [30,31]. In the retina, PRGF has been proven to reduce macular holes [32,33]. Our group previously tested its effect on retinal pigment epithelium (RPE) through the reduction in the harm produced by oxidative stress. It was found to decrease the effect of blue light by activating the different antioxidant pathways while blocking its damage to cells [34,35].

Therefore, the aim of this work was to check if PRGF can also protect the visual function *in situ* by preserving neuronal cells in the retina, such as ganglion cells and photoreceptors, against the action of damaging insults from blue light.

2. Results

2.1. Electroretinogram and Intraocular Pressure (IoP)

ERG results showed that the electrical signal at day 10 was lower compared to those obtained on day 0 in every group except for PRGF, which had a similar response at both timepoints. This decrease may have been caused by the injection, which may have damaged the cells. However, PRGF mitigated this effect. On day 10, blue light disrupted the signaling pattern compared to the control. Nevertheless, when blue light was combined with PRGF, the electrical signal started recovering closer to the control results (Figure 1).

The IoPs of animals were controlled during the experiment. The intraocular injection of saline or PRGF increased the IoP and produced an undesirable effect in the retina. The results showed that after 10 days, mean IoP values decreased to 6–7 mmHg compared to day 0 results (Figure 2). This result suggested that the injection could cause a leak in vitreous humour but did not show a potential additional insult to the retina.

2.2. Retinal Degeneration Can Involve Changes in Retinal Thickness

We also studied the effect of PRGF and blue light on retinal thickness. The retinas of the four experimental groups stained with H&E were analyzed using ImageJ software to quantify the length from ganglion cells layer to the RPE by taking five different measurements along the retina, and means were calculated. The results showed that blue light caused damage to the retina, increasing its thickness by creating holes amongst cells and conferring a relaxed structure (Figure 3). When blue light was combined with PRGF, the retina maintained its integrity compared to the control.

2.3. Immunofluorescence Study

To check the integrity and functionality of the retina after blue light exposure, we studied the action of three different markers: brain-specific homeobox/POU domain protein 3A (Brn3a), which is a ganglion cell marker; choline-acetyltransferase (ChAT), which is a marker for cholinergic amacrine cells; and rhodopsin, which is located in rods and plays a role in visual function.

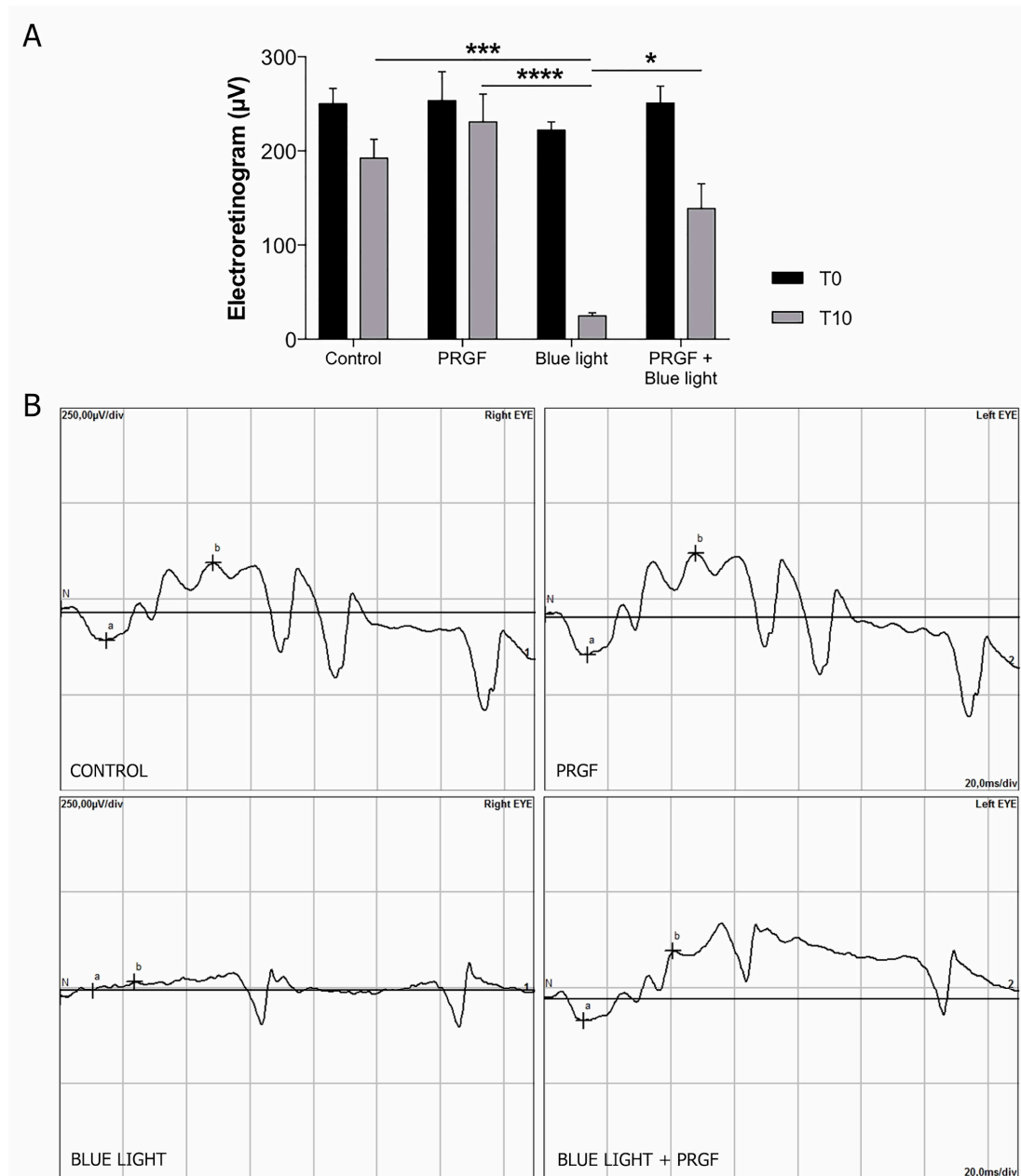


Figure 1. (A) Graphical representation of wave b measurements obtained from electroretinography (ERG) in scotopic 3.0 conditions at time 0 and time 10 ($n = 4$). T10 results showed that blue light reduced significantly the electrical signal produced by rat retinas compared to control. However, plasma rich in growth factors (PRGF) combined with blue light recovered the signaling pattern. We also found significant differences in the interaction between time and treatment ($p = 0.036$). Simple statistical analysis for time showed significant differences ($p < 0.0001$) probably produced by the experimental procedure. The treatment parameter also showed significant differences ($p = 0.0001$), indicating that blue light reduced the electrical signal and PRGF recovered it. Statistical analysis: Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test; * $p < 0.05$, *** $p < 0.0005$, **** $p < 0.0001$. (B) ERG diagram at time 10. Control and PRGF-treated retinas showed a normal electrical signal. Retinas treated with blue light showed a disruption of the electrical signal, which was recovered close to control values when blue light was combined with PRGF.

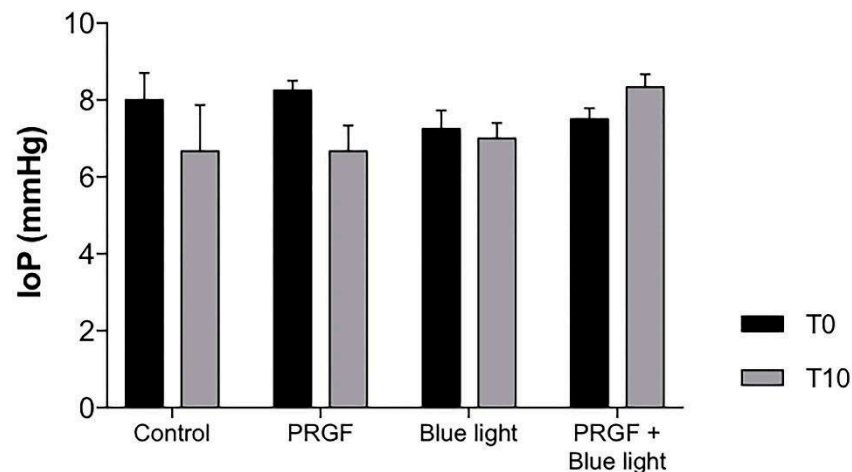


Figure 2. Intraocular pressure (IoP) values on day 0 (T0) and day 10 (T10) ($n = 4$). On day 0, the IoPs from each group were similar (7–8 mmHg). On day 10, IoP values of control, blue light, and PRGF treatments decreased to a mean value of 6–7 mmHg. However, PRGF combined with blue light kept the intraocular pressure closer to basal values. Statistical analysis: Two-way ANOVA, Tukey's multiple comparison test.

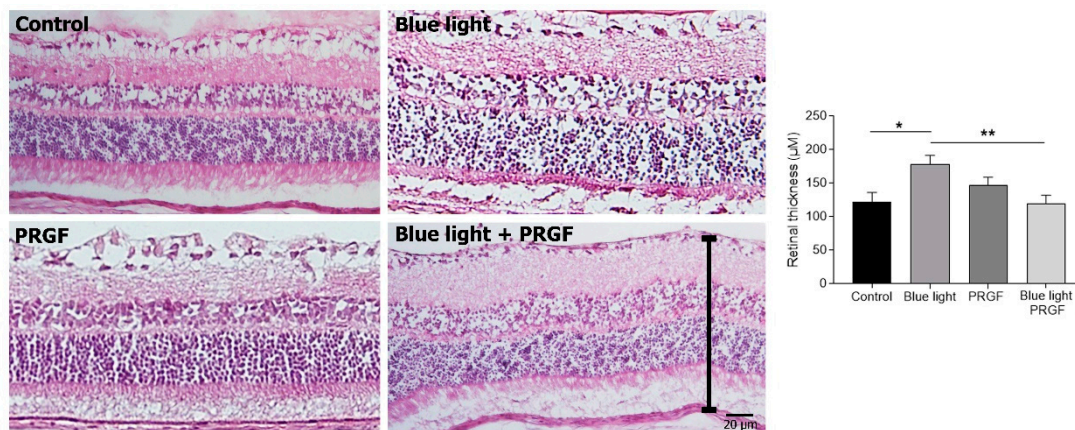


Figure 3. Hematoxylin and eosin (H&E) staining of transversal sections of experimental retinas ($n = 4$). PRGF combined with blue light maintained the tissue close to control conditions. However, blue light disrupted the retina's integrity. Means of quantification thickness showed that there were significant differences between the result obtained from blue-light-exposed retinas and those treated with a combination of blue light and PRGF. Statistical analysis: One-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test, * $p < 0.05$ and ** $p < 0.005$. Scale = 20 μm .

Immunofluorescence for Brn3a (Figure 4) showed that blue light decreased the number of positive cells compared to the control and PRGF conditions. Brn3a positive cells were quantified by using ImageJ software. For that, we selected sections from the whole retina and positive cells were counted. Analysis indicated that PRGF recovered the damage caused by blue light. These results also suggest that PRGF reduced the damage caused by the injection to ganglion cells, as the PRGF treatment's count showed a higher number than the control. When the light was combined with PRGF, the expression of this protein in ganglion cells recovered to control conditions.

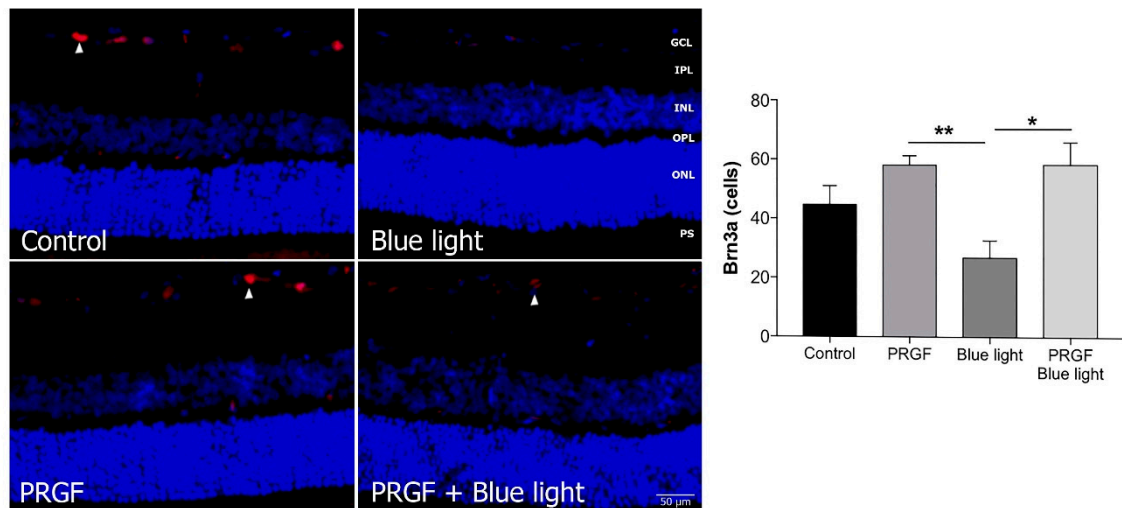


Figure 4. Immunofluorescence for Brn3a (red) and DAPI (blue) in transversal sections of retinas ($n = 4$). The results showed that the expression of Brn3a was interrupted by blue light compared to control and PRGF treatment conditions. However, when blue light was combined with PRGF, its expression recovered. Arrowheads show positive cells for Brn3a. Statistical analysis: One-way ANOVA, Sidak's multiple comparison test ($n = 3$), * $p < 0.05$ and ** $p < 0.05$. Scale = 50 μm .

ChAT immunofluorescence results (Figure 5) showed that blue light decreased the expression of this enzyme, which is recuperated when it is combined with PRGF. PRGF alone showed an expression similar to control.

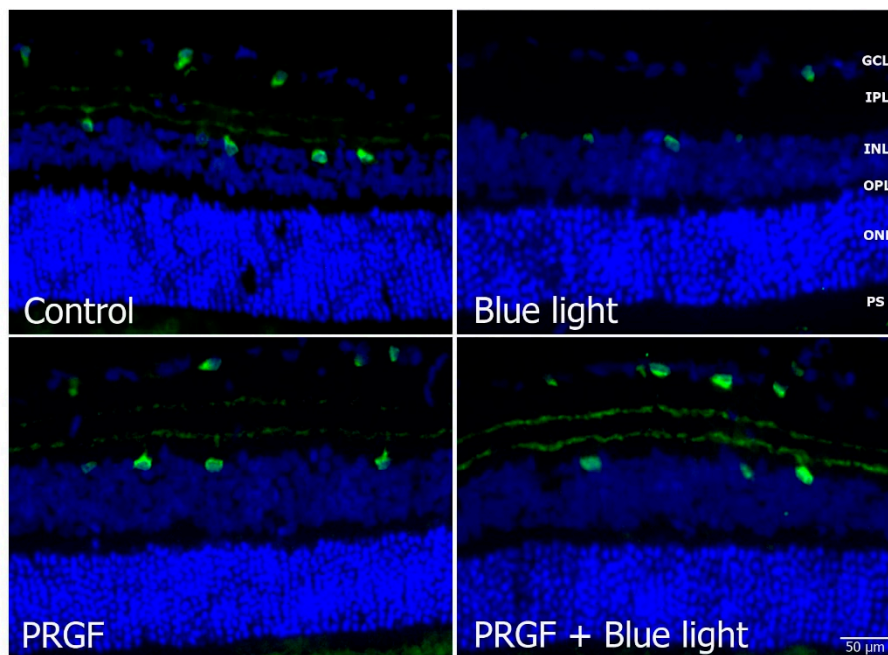


Figure 5. Immunofluorescence for ChAT (green) and DAPI (blue) in transversal section of retinas ($n = 4$). The results showed that blue light decreased its expression compared to the control. However, PRGF combined with blue light recovered the expression. Scale = 50 μm .

To analyze the differences within rhodopsin results, we also quantified the fluorescence using ImageJ software. The software compares the intensity of the expression related to the thickness of the tissue, or mean grey value (MGV). We found (Figure 6) that blue light significantly reduced the rhodopsin expression compared to PRGF treatment. Regarding the combination of PRGF and blue

light, there were no statistically significant differences. However, we observed a positive tendency toward control results.

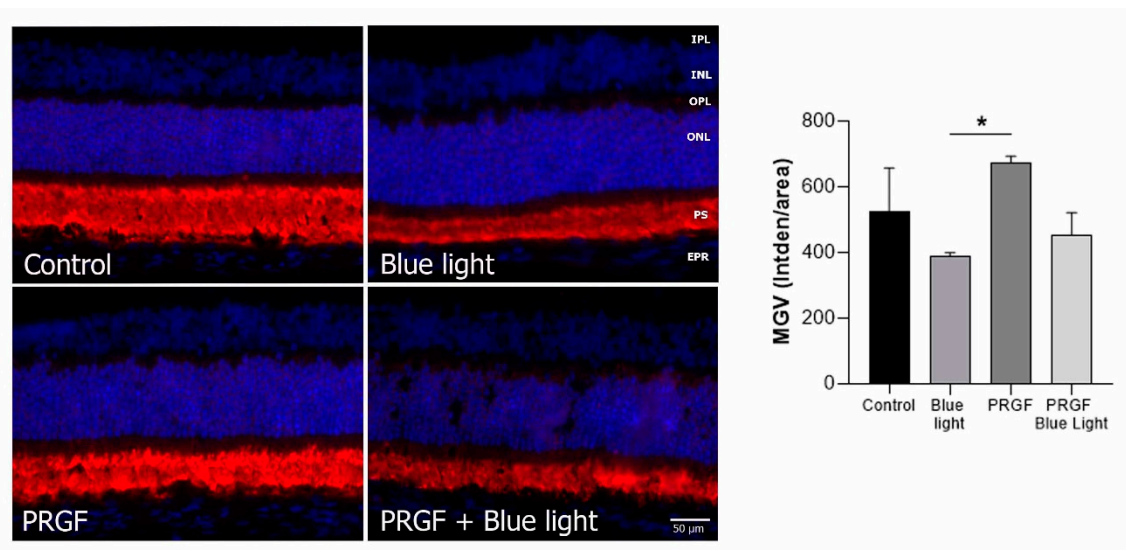


Figure 6. Immunofluorescence for rhodopsin (red) and DAPI (blue) in transversal section of retinas ($n = 4$). The results showed that the expression of rhodopsin was reduced by blue light compared to PRGF treatment conditions. Statistical analysis: One-way ANOVA, Sidak’s multiple comparison test, $* p < 0.05$. Scale = 50 μm .

To assess oxidative stress and retinal damage in our samples, the expressions of heme oxygenase-1 (HO-1) and glial fibrillary acidic protein (GFAP), respectively, were studied.

For analyzing HO-1, we also studied the MGV. The results (Figure 7) showed that blue light significantly increased the expression of HO-1, and this was mitigated by PRGF. PRGF, alone or in combination with blue light, did not show expression for this marker. This result suggested that blue light increases the expression of oxidant markers such as HO-1 and that PRGF reduces it.

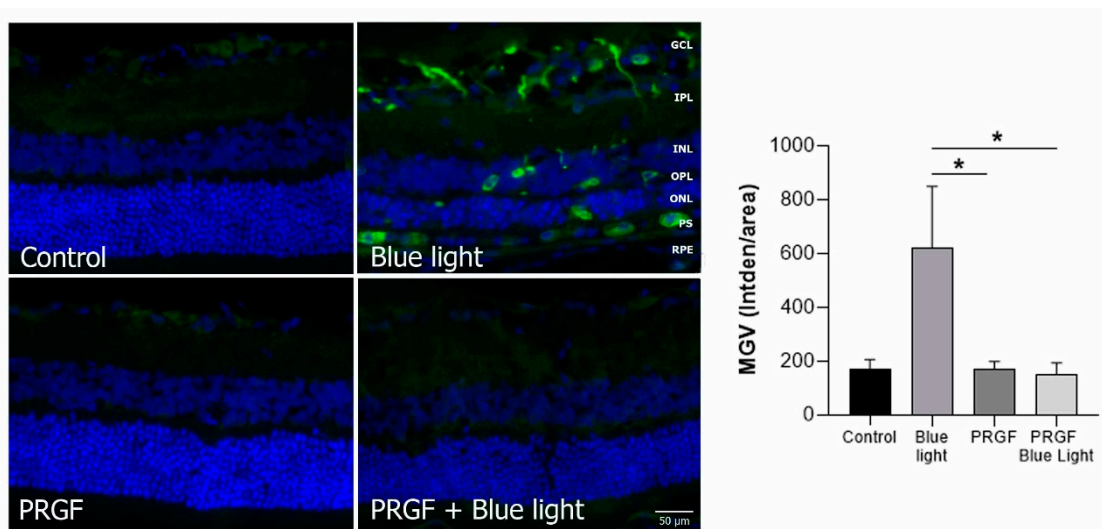


Figure 7. Immunofluorescence for HO-1 (green) and DAPI (blue) in transversal section of retinas ($n = 4$). The results showed that the expression of HO-1 was increased by blue light compared to PRGF treatment conditions. Differences between control and blue light were also detected; however, statistical analysis did not show significance ($p = 0.0578$). Statistical analysis: one-way ANOVA, $* p < 0.05$. Scale = 50 μm .

Immunofluorescence for GFAP (Figure 8) showed that blue light also increased the expression of this marker, which decreased in the presence of PRGF. This result suggested that blue light increased the damage to retinal cells, activating the response of glial cells and producing scarring, and PRGF protected them.

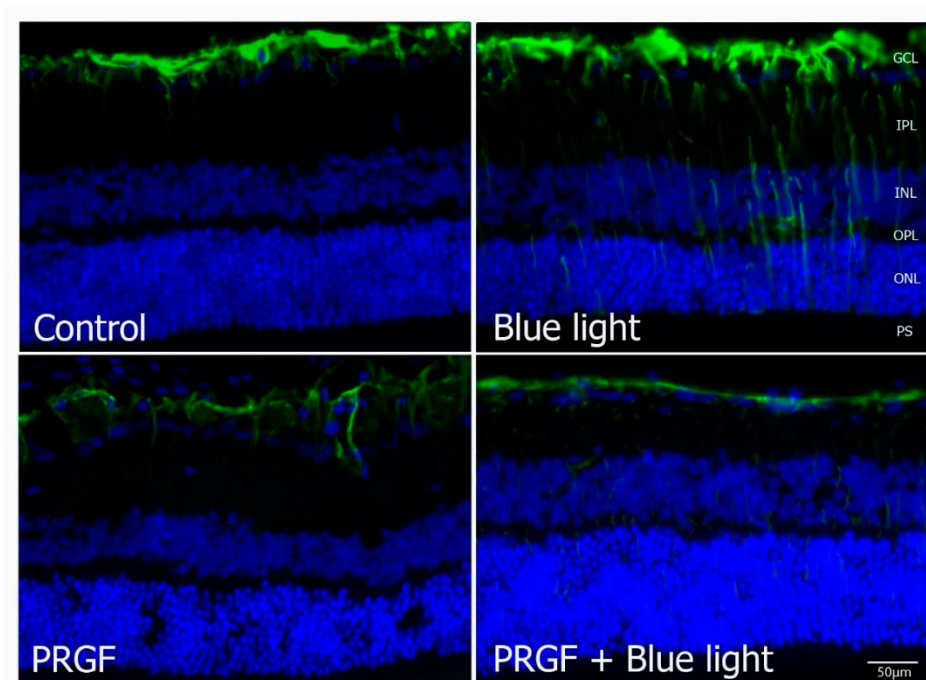


Figure 8. Immunofluorescence for GFAP (green) and DAPI (blue) in transversal section of retinas ($n = 4$). The results showed that blue light increased its expression compared to control. However, PRGF combined with blue light reduced the expression, even more than that in the control results. Scale = 50 μm .

3. Discussion

The retina is one of the most important parts in the eye, due to the role it played in visual function. This tissue is composed of different cell types, such as neuronal cells, photoreceptors, and epithelial cells, which are involved in the biochemical processes that are carried out in this tissue. For instance, photoreceptors oversee the process of sending electrical stimuli through the optical nerve to the brain to create images [36,37]. Epithelial cells are involved in the protection of and nutrient transport to photoreceptors [38]. As such, maintenance of retina integrity is essential [39].

Many factors can affect retinal cell survival, such as aging, obesity, or smoking. However, in the last few years, researchers have become more aware of light as a risk factor due to its presence in contemporary life. White light includes different short wavelengths, such as blue light. This type of light reaches the retinal cells and has the potential to disrupt their functions, thereby damaging the structure. This stimulus, combined with other factors such as previous pathologies, can lead to an ongoing degeneration and, finally, visual loss [4,5,8,9,13,20,40–46].

Researchers have been attempting to determine how to delay the degeneration process. In this regard, PRGF, which is a serum extracted from a patient's blood, has been proven to be an enhancer of cell regeneration, a stimulator of wound healing, a neuroprotector, and an anti-inflammatory agent [22–24,47,48]. It has been used in oral implantology and traumatology. In ophthalmology, it has been used for treating eye surface disorders such as PED or dry eye [25,27–29,31,47,49]. In terms of pathologies related to the retina, PRGF has also been used to treat macular holes, producing good results in both anatomical closure and vision recovery [32,33]. Other experimental studies demonstrated the neuroprotector role of PRGF in the retina. We previously studied the PRGF antioxidant effect, reverting

the damage produced after blue light exposure and enhancing cell survival in RPE cells [34,35]. Oxidative stress is involved in the pathophysiology of retinal degenerations, such as age-related macular degeneration (AMD) and glaucoma, and exogenous factors, such as short wavelength light, can exacerbate those diseases.

ERG measurements are useful for studying the retinal state, as they indicate the response to a luminous stimulus. The study of scotopic conditions enables the analysis of the functional state of photoreceptors. The results indicated that at day 10, the electrical signal was lower compared to day 0 in all the treatments except for PRGF. This reduction might have been caused by the injection, which may have damaged cells and produced a slight leak in the vitreous humour, as evidenced by the IoP measurements. When examining the results obtained on day 10, blue light significantly reduced the electrical signal produced by retinal cells. This was mitigated when the eye was treated with PRGF, showing similar results to the control. This suggests that PRGF reduces the harm produced by blue light in terms of functionality. PRGF did not produce an increase in IoP. Notably, the administration of PRGF did not cause an increase in IoP, as it could be derived from the secondary effects, similar to those in diseases such as glaucoma.

The maintenance of the integrity of retinal structure is essential for preserving visual function. The analysis of retinal transversal sections showed that blue light significantly increased the thickness of the retina due to the disruption of tissue integrity. However, PRGF preserved the retinal structure even when light exposure was applied. Some authors suggested that light can disrupt the cellular structure of the retina. First, photoreceptors become swollen and tortuous. After a few days of light exposure, the mitochondria of the anterior segment become swollen too and chromatin condenses [8,50,51].

PRGF was demonstrated to be useful for the protection of several cell types. Brn3a is a marker of retinal ganglion cells [52–54]. Blue light produced a loss in positive cells for Brn3a, which was reverted when PRGF was injected. This corresponds to the observations reported by other authors, which showed that blue light reduces the survival of ganglion cells [51], reducing the collection of visual information that is sent to photoreceptors and, therefore, the visual function. Similar results were obtained in the study of ChAT, which is a marker for neurons [55,56]. This investigation showed that its expression lowered in the presence of blue light but increased to control levels when combined with PRGF. The reduction in the expression of this marker showed that the electrical signal may not be sent through these cells to photoreceptors, causing a reduction in visual function. Rhodopsin, which is a rod marker [14,15,57–59], staining showed that blue light reduced the thickness of the rod layer and the fluorescence intensity. In this regard, the reduction in rhodopsin produced by blue light contributed to the deterioration in vision, as rods are involved in visual function under dark conditions. GFAP is expressed by several cells of the central nervous system cells, such as astrocytes and Müller cells, after exposure to an insult. It is also related to other structural proteins such as vimentin, and it is responsible for creating scars by interacting with the fibrous tissue. Therefore, it is a suitable marker for glial damage [60–64]. Immunofluorescence results for this protein showed that blue light increased the glial damage, which was reverted when light was combined with PRGF. All results suggested that blue light reduces the functionality of retinal cells and treatment with PRGF reduces the impact of the insult even when the treatment is administered once the damage is initiated.

Blue light produces oxidative stress, which can be detected by the increase in HO-1 expression [44,65–68]. The antioxidant capacity of PRGF reduced the expression of HO-1 to control levels. Our previous work regarding oxidative damage caused by blue light proved that blue light increases the presence of ROS, thereby enhancing HO-1 staining [35]. In the present study, the HO-1 staining results also showed that blue light significantly increased the expression of this protein, suggesting a high presence of oxidant products. This was reduced to control results when PRGF was present, suggesting that PRGF blocks the oxidant pathway, protecting cells against oxidative stress.

As the study limitations, we found that the injections of both saline and PRGF could damage retinal cells, thereby complicating the analysis of the different responses to the treatments. The study only included one PRGF injection in a short period of time and the time that PRGF can protect cells

remains unknown. Nevertheless, the data suggest that PRGF reduced the damage caused by the invasive experimental procedure. However, future investigations are needed to test the efficiency of PRGF in the retina for a longer duration.

Finally, we concluded that PRGF enhances the integrity and retinal function when there is oxidative damage caused by exposure to blue light. Future research work is needed to deepen our understanding of how PRGF protects cells and its potential therapeutic use in retinal degeneration.

4. Animals, Materials and Methods

4.1. PRGF

In accordance with the Declaration of Helsinki of 2013, blood from four different healthy donors (all women, mean age 33 ± 7 years) was collected and placed in 9-mL tubes with 3.8% sodium citrate (Vacuette tube, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). The blood was then centrifuged at room temperature (Endoret System, BTI Biotechnology Institute, S.L., Vitoria, Spain). Whole-plasma was collected after centrifugation, avoiding the leukocyte layer, and transferred to a 15-mL tube. Plasma was mixed with calcium chloride for fibrinogen activation and incubated for 30 min at 37 °C, or until clotting was achieved. The supernatant was collected and exposed to heat (56 °C) for 1 h to inactivate the complement system. After that, the plasma was filtered, aliquoted, and kept at -4 °C until use (less than 6 months).

4.2. Animals

This study was performed in accordance with the association for research in vision and ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research. The procedures and experimental designs were approved by the Animal Experimentation Ethics Committee of the University of Oviedo (Oviedo, Principado de Asturias, Spain; PROAE 17/2017, approved on 23/03/2017) and complied with European and national laws.

Wistar male rats weighing about 500 g were divided into dark and blue light groups (Table 1) and treated by the following experimental design (Figure 9): the day prior to the experiment, animals were moved and kept in the dark for 16 h. They were anaesthetized with ketamine/xylazine 80/10 mg/kg. A second injection of 1/3 of the initial anesthetic solution was used to keep the rats asleep for 60 min. After that, electroretinogram (ERG) and intraocular pressure (IoP) measurements were performed. For 7 days, animals were exposed either to dark or blue light depending on the experimental group. Blue light LEDs (Electro DH, SL, Barcelona, Spain) were used to deliver light to the rat eyes at 465–475 nm (10 W/m^2) for 4 h each day. On day 7, right eyes were injected with 10 μL of saline solution and left eyes with 10 μL of PRGF using a Hamilton syringe in the sclera, right after the corneal limbus (Figure 10). IoP was also measured to observe differences. After this procedure, animals were returned to their experimental dark/light exposure pattern. On day 9, animals were moved and kept in dark conditions for 16 h. After that time and after being anaesthetized, ERG and IoP measurements were performed. Finally, animals were euthanized with a pentobarbital injection and their eyes enucleated. To conclude, eyes were fixed with paraformaldehyde 4% for 2 h and frozen in optimal cutting temperature (OCT) compound.

Table 1. Experimental groups.

Treatment	Medium	Dark/Blue Light
Control	10 μL saline solution	Dark
Blue light	10 μL Saline solution	Blue light
PRGF	10 μL PRGF 100%	Dark
Blue light + PRGF	10 μL PRGF 100%	Blue light

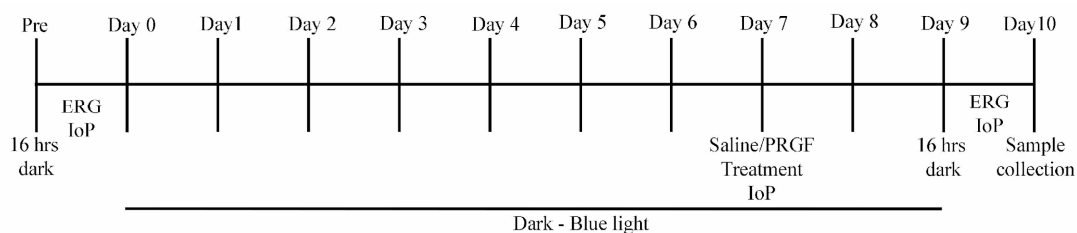


Figure 9. Experimental design diagram.

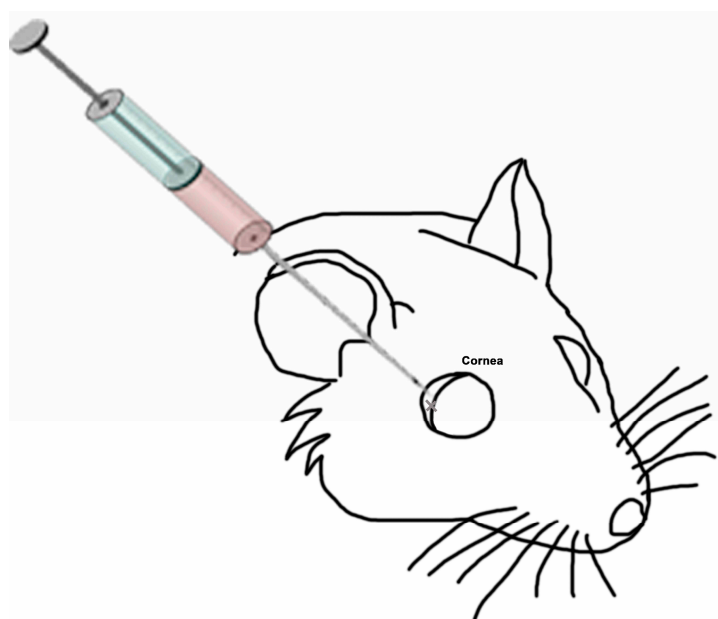


Figure 10. Diagram of eye injection.

4.3. Electroretinogram and Intraocular Pressure

Animals were exposed to the ERG electrophysiology assay (RETIAnimal, Roland Consult, Brandenburg, Germany) to analyze the retinal state before and after dark/blue light experimental treatment. First, animals were anaesthetized as previously described and located in the device. After applying a Goniotal (Alcon Healthcare, S.A. Barcelona, Spain) drop into both corneas, electrodes were located. A ground was also located on the base of the tail, with one reference electrode on each scapula and the activated electrodes in both corneas. Light stimulus was generated with a white LED (-30 dB, 0.003 cd/m^2 , and 0.125 Hz). Measurements were recorded under scotopic conditions and animals were adapted to darkness for 16 h.

Intraocular pressure was measured with a Tonolab tonometer (Icare Tonolab, Vantaa, Finland) on days 0 and 10.

4.4. Immunofluorescence

The eyes of eight male Wistar rats were fixed in cold paraformaldehyde 4% for 2 h and cut in transversal sections by cryostat Microm HM 550 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Then, they were washed in phosphate buffered saline (PBS). After incubation in 10% goat serum (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) or donkey serum (Jackson ImmunoResearch Europe Ltd., Ely, Cambridgeshire, U.K.) in PBS for 60 min and washing in PBS, the retinal sections were then exposed overnight at 4°C to primary antibodies (Table 2). After washing with PBS, tissues were then exposed for 2 h to the appropriate secondary antibody conjugated with either Alexa Fluor 488 or Alexa Fluor 594 (1:300) and washed in buffer. In the end, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was

added to a wash solution. Images were obtained using a Leica DMI6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Table 2. Antibodies used in this study.

Antibody	Reference (RRID)	Species	Dilution	Company
Primary Antibodies				
HO-1	Enzo Life Sciences Cat# SPA-894F, RRID:AB_991588	Rabbit	1:100	Enzo LS, Farmingdale, NY, USA
GFAP	Agilent Cat# Z0334, RRID:AB_10013382	Rabbit	1:500	Dako, Santa Clara, CA, USA
ChAT	Millipore Cat# AB144P, RRID:AB_2079751	Goat	1:250	Millipore, Burlington, MA, USA
Brn3a	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-31984, RRID:AB_2167511	Mouse	1:200	Santa Cruz, Dallas, TX, USA
Rhodopsin	Millipore Cat# MABN15, RRID:AB_10807045	Mouse	1:200	Millipore, Burlington, MA, USA
Secondary Antibodies				
Anti-rabbit Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific Cat# A32731TR, RRID:AB_2866491	Goat	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-goat Alexa Fluor 488	Thermo Fisher Scientific Cat# A32814TR, RRID:AB_2866497	Donkey	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA
Anti-mouse Alexa Fluor 594	Thermo Fisher Scientific Cat# A32742, RRID:AB_2762825	Goat	1:300	ThermoFisher, Waltham, MA, USA

4.5. Histological Studies and Retinal Thickness Quantification

For histological studies, samples were dyed following the hematoxylin and eosin (H&E) regular protocol. Briefly, eye sections were exposed to hematoxylin for 3 min, rinsed with water, exposed to eosin for 2 min, and washed with distilled water for 1 min. After this, they were exposed to different concentrations of alcohol (70%, 80%, 96%, and 100%) for 20 s each, and xylene I and xylene II for 30 s each.

Images were obtained using a Leica DMI6000B fluorescence microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

Once pictures of H&E-stained sections were taken, images were processed in Fiji (ImageJ, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The thicknesses of retinas were quantified in five different areas for each group, and mean values were calculated.

4.6. Statistical Analysis

All statistical tests were analysed using GraphPad Prism version 7.0a for Mac (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). To assess the statistical significance, one-way and two-way ANOVAs were performed. For the statistical comparison of mean differences between treatments, we used Tuckey's multiple comparison test and Sidak's multiple comparison test. Differences were considered statistically significant when p -values were <0.05 .

Author Contributions: Conceptualization, C.S.-B., J.M.-L. and S.d.O.-A.; methodology, C.S.-B., E.G.-P., B.B.-A., M.d.l.F., F.M., E.A. (Eduardo Anitua) and S.d.O.-A.; formal analysis, C.S.-B. and S.d.O.-A.; investigation, C.S.-B., E.G.-P., E.A. (Enol Artime) and S.d.O.-A.; resources, L.F.-V., J.M.-L. and S.d.O.-A.; writing—original draft preparation, C.S.-B., E.G.-P. and S.d.O.-A.; writing—review and editing, C.S.-B., E.G.-P., B.B.-A., E.A. (Enol Artime), L.F.-V., J.M.-L., M.d.l.F., F.M., E.A. (Eduardo Anitua) and S.d.O.-A.; visualization, C.S.-B., E.G.-P., B.B.-A., E.A. (Enol Artime), L.F.-V., J.M.-L., M.d.l.F., F.M., E.A. (Eduardo Anitua) and S.d.O.-A.; supervision, J.M.-L. and S.d.O.-A.;

project administration, S.d.O.-A.; funding acquisition, L.F.-V. and S.d.O.-A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was supported by grant PI17/01549 from the Acción Estratégica en Salud (AES), Instituto de Salud Carlos III, of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, and the European Union through the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER).

Conflicts of Interest: C.S.-B., E.G.-P., B.B.-A., E.A. (Enol Artime), L.F.-V., J.M.-L. and S.d.O.-A. declare no conflict of interest. M.d.l.F., F.M. and E.A. (Eduardo Anitua) declare the following competing financial interest(s): E.A. (Eduardo Anitua) is the Scientific Director and M.d.l.F. and F.M. are researchers at BTI Biotechnology Institute, a company that investigates in the fields of oral implantology and PRGF-Endoret technology.

References

1. 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*, 1418–1427. [[CrossRef](#)]
2. Behar-Cohen, F.; Martinsons, C.; Viénot, F.; Zisis, G.; Barlier-Salsi, A.; Cesarini, J.P.; Enouf, O.; Garcia, M.; Picaud, S.; Attia, D. Light-emitting diodes (LED) for domestic lighting: Any risks for the eye? *Prog. Retin. Eye Res.* **2011**, *30*, 239–257. [[CrossRef](#)]
3. Iandiev, I.; Wurm, A.; Hollborn, M.; Wiedemann, P.; Grimm, C.; Remé, C.E.; Reichenbach, A.; Pannicke, T.; Bringmann, A. Müller Cell Response to Blue Light Injury of the Rat Retina. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49*, 3559. [[CrossRef](#)]
4. Jaadane, I.; Villalpando Rodriguez, G.E.; Boulenguez, P.; Chahory, S.; Carré, S.; Savoldelli, M.; Jonet, L.; Behar-Cohen, F.; Martinsons, C.; Torriglia, A. Effects of white light-emitting diode (LED) exposure on retinal pigment epithelium in vivo. *J. Cell. Mol. Med.* **2017**, *21*, 3453–3466. [[CrossRef](#)]
5. Osborne, N.N.; Li, G.-Y.; Ji, D.; Mortiboys, H.J.; 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*, 2013–2028. [[CrossRef](#)]
6. Shang, Y.M.; Wang, G.S.; Sliney, D.; Yang, C.H.; Lee, L.L. White light-emitting diodes (LEDs) at domestic lighting levels and retinal injury in a rat model. *Environ. Health Perspect.* **2014**, *122*, 269–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sheline, C.T.; Zhou, Y.; Bai, S. Light-induced photoreceptor and RPE degeneration involve zinc toxicity and are attenuated by pyruvate, nicotinamide, or cyclic light. *Mol. Vis.* **2010**, *16*, 2639–2652.
8. Geiger, P.; Barben, M.; Grimm, C.; Samardzija, M. Blue light-induced retinal lesions, intraretinal vascular leakage and edema formation in the all-cone mouse retina. *Cell Death Dis.* **2015**, *6*, e1985. [[CrossRef](#)]
9. Godley, B.F.; Shamsi, F.A.; Liang, F.-Q.; Jarrett, S.G.; Davies, S.; Boulton, M. Blue Light Induces Mitochondrial DNA Damage and Free Radical Production in Epithelial Cells. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 21061–21066. [[CrossRef](#)]
10. Núñez-Álvarez, C.; Suárez-Barrio, C.; del Olmo Aguado, S.; Osborne, N.N. Blue light negatively affects the survival of ARPE19 cells through an action on their mitochondria and blunted by red light. *Acta Ophthalmol.* **2019**, *97*, e103–e115. [[CrossRef](#)]
11. Bringmann, A.; Pannicke, T.; Grosche, J.; Francke, M.; Wiedemann, P.; Skatchkov, S.N.; Osborne, N.N.; Reichenbach, A. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **2006**, *25*, 397–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Moutray, T.; Chakravarthy, U. Age-related macular degeneration: Current treatment and future options. *Ther. Adv. Chronic Dis.* **2011**, *2*, 325–331. [[CrossRef](#)]
13. Narimatsu, T.; Negishi, K.; Miyake, S.; Hirasawa, M.; Osada, H.; Kurihara, T.; Tsubota, K.; Ozawa, Y. Blue light-induced inflammatory marker expression in the retinal pigment epithelium-choroid of mice and the protective effect of a yellow intraocular lens material in vivo. *Exp. Eye Res.* **2015**, *132*, 48–51. [[CrossRef](#)]
14. Organisciak, D.T.; Vaughan, D.K. Retinal light damage: Mechanisms and protection. *Prog. Retin. Eye Res.* **2010**, *29*, 113–134. [[CrossRef](#)]
15. Wenzel, A.; Grimm, C.; Samardzija, M.; Remé, C.E. Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* **2005**, *24*, 275–306. [[CrossRef](#)]
16. Xu, H.; Chen, M.; Forrester, J.V. Para-inflammation in the aging retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **2009**, *28*, 348–368. [[CrossRef](#)]

17. El-Esawi, M.; Arthaut, L.D.; Jourdan, N.; D'Harlingue, A.; Link, J.; Martino, C.F.; Ahmad, M. Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of Arabidopsis cryptochrome. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 13875. [[CrossRef](#)]
18. Lockwood, D.B.; Wataha, J.C.; Lewis, J.B.; Tseng, W.Y.; Messer, R.L.W.; Hsu, S.D. Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent. Mater.* **2005**, *21*, 683–688. [[CrossRef](#)]
19. Marie, M.; Bigot, K.; Angebault, C.; Barrau, C.; Gondouin, P.; Pagan, D.; Fouquet, S.; Villette, T.; Sahel, J.-A.; Lenaers, G.; et al. Light action spectrum on oxidative stress and mitochondrial damage in A2E-loaded retinal pigment epithelium cells. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 287. [[CrossRef](#)]
20. Osborne, N.N.; 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. [[CrossRef](#)]
21. Lascaratos, G.; Ji, D.; Wood, J.P.M.; Osborne, N.N. Visible light affects mitochondrial function and induces neuronal death in retinal cell cultures. *Vision Res.* **2007**, *47*, 1191–1201. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Anitua, E.; Sanchez, M.; De la Fuente, M.; Zalduendo, M.M.; Orive, G. Plasma rich in growth factors (PRGF-Endoret) stimulates tendon and synovial fibroblasts migration and improves the biological properties of hyaluronic acid. *Knee Surg. Sport. Traumatol. Arthrosc.* **2012**, *20*, 1657–1665. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Anitua, E.; Sánchez, M.; Orive, G.; Andía, I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* **2007**, *28*, 4551–4560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Paknejad, M.; Shayesteh, Y.S.; Yaghobee, S.; Shariat, S.; Dehghan, M.; Motahari, P. Evaluation of the Effect of Plasma Rich in Growth Factors (PRGF) on Bone Regeneration. *J. Dent.* **2012**, *9*, 59–67.
25. Etxebarria, J.; Sanz-Lázaro, S.; Hernández-Moya, R.; Freire, V.; Durán, J.A.; Morales, M.C.; Andollo, N. Serum from plasma rich in growth factors regenerates rabbit corneas by promoting cell proliferation, migration, differentiation, adhesion and limbal stemness. *Acta Ophthalmol.* **2017**, *95*, e693–e705. [[CrossRef](#)]
26. Freire, V.; Andollo, N.; Etxebarria, J.; Hernández-Moya, R.; Durán, J.A.; Morales, M.C. Corneal wound healing promoted by 3 blood derivatives: An in vitro and in vivo comparative study. *Cornea* **2014**, *33*, 614–620. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. López-Plandolit, S.; Morales, M.-C.; Freire, V.; Etxebarria, J.; Durán, J.A. Plasma Rich in Growth Factors as a Therapeutic Agent for Persistent Corneal Epithelial Defects. *Cornea* **2010**, *29*, 843–848. [[CrossRef](#)]
28. López-Plandolit, S.; Morales, M.-C.; Freire, V.; Grau, A.E.; Durán, J.A. Efficacy of Plasma Rich in Growth Factors for the Treatment of Dry Eye. *Cornea* **2011**, *30*, 1312–1317. [[CrossRef](#)]
29. Suárez-Barrio, C.; Etxebarria, J.; Hernández-Moya, R.; Del Val-Alonso, M.; Rodríguez-Astigarraga, M.; Urkaregi, A.; Freire, V.; Morales, M.C.; Durán, J.A.; Vicario, M.; et al. Hyaluronic acid combined with serum rich in growth factors in corneal epithelial defects. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1655. [[CrossRef](#)]
30. De la Sen-Corcuera, B.; Montero-Iruzubieta, J.; Sánchez-Ávila, R.M.; Orive, G.; Anitua, E.; Caro-Magdaleno, M.; Merayo-Llodes, J. Plasma rich in growth factors for the treatment of cicatrizing conjunctivitis. *Clin. Ophthalmol.* **2020**, *14*, 1619–1627. [[CrossRef](#)]
31. Sánchez-Avila, R.M.; Merayo-Llodes, J.; Fernández, M.L.; Rodríguez-Gutiérrez, L.A.; Rodríguez-Calvo, P.P.; Fernández-Vega Cueto, A.; Muruzabal, F.; Orive, G.; Anitua, E. Plasma rich in growth factors eye drops to treat secondary ocular surface disorders in patients with glaucoma. *Int. Med. Case Rep. J.* **2018**, *11*, 97–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Arias, J.D.; Hoyos, A.T.; Alcántara, B.; Sanchez-Avila, R.M.; Arango, F.J.; Galvis, V. Plasma Rich in Growth Factors for Persistent Macular Hole. *Retin. Cases Brief Rep.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Sánchez-Ávila, R.M.; González, Á.F.V.; Sanz, Á.F.V.; Merayo-Llodes, J. Treatment of recurrent myopic macular hole using membrane of plasma rich in growth factors. *Int. Med. Case Rep. J.* **2019**, *12*, 229–233. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Suárez-Barrio, C.; Del Olmo-Aguado, S.; García-Pérez, E.; De la Fuente, M.; Muruzabal, F.; Anitua, E.; Baamonde-Arbaiza, B.; Fernández-Vega-Cueto, L.; Fernández-Vega, L.; Merayo-Llodes, J. Antioxidant role of PRGF on RPE cells after blue light insult as a therapy for neurodegenerative diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1021. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Anitua, E.; De la Fuente, M.; Del Olmo-Aguado, S.; Suarez-Barrio, C.; Merayo-Llodes, J.; Muruzabal, F. Plasma rich in growth factors reduces blue light-induced oxidative damage on retinal pigment epithelial cells and restores their homeostasis by modulating vascular endothelial growth factor and pigment epithelium-derived factor expression. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **2020**, *48*, 830–838. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Sernagor, E.; Eglén, S.J.; Wong, R.O.L. Development of retinal ganglion cell structure and function. *Prog. Retin. Eye Res.* **2001**, *20*, 139–174. [[CrossRef](#)]
37. VanderWall, K.B.; Vij, R.; Ohlemacher, S.K.; Sridhar, A.; Fligor, C.M.; Feder, E.M.; Edler, M.C.; Baucum, A.J.; Cummins, T.R.; Meyer, J.S. Astrocytes Regulate the Development and Maturation of Retinal Ganglion Cells Derived from Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rep.* **2019**, *12*, 201–212. [[CrossRef](#)]
38. Boulton, M.; Dayhaw-Barker, P. The role of the retinal pigment epithelium: Topographical variation and ageing changes. *Eye* **2001**, *15*, 384–389. [[CrossRef](#)]
39. Nirenberg, S.; Pandarinath, C. Retinal prosthetic strategy with the capacity to restore normal vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 15012–15017. [[CrossRef](#)]
40. Yu, Z.-L.; Qiu, S.; Chen, X.-C.; Dai, Z.-H.; Huang, Y.-C.; Li, Y.-N.; Cai, R.-H.; Lei, H.-T.; Gu, H.-Y. Neuroglobin—A potential biological marker of retinal damage induced by LED light. *Neuroscience* **2014**, *270*, 158–167. [[CrossRef](#)]
41. King, A.; Gottlieb, E.; Brooks, D.G.; Murphy, M.P.; Dunaief, J.L. Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem. Photobiol.* **2004**, *79*, 470–475. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Huang, C.; Zhang, P.; Wang, W.; Xu, Y.; Wang, M.; Chen, X.; Dong, X. Long-term blue light exposure induces RGC-5 cell death in vitro: Involvement of mitochondria-dependent apoptosis, oxidative stress, and MAPK signaling pathways. *Apoptosis* **2014**, *19*, 922–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Krigel, A.; Berdugo, M.; Picard, E.; Levy-Boukris, R.; Jaadane, I.; Jonet, L.; Dernigoghossian, M.; Andrieu-Soler, C.; Torriglia, A.; Behar-Cohen, F. Light-induced retinal damage using different light sources, protocols and rat strains reveals LED phototoxicity. *Neuroscience* **2016**, *339*, 296–307. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Roehlecke, C.; Schaller, A.; Knels, L.; Funk, R.H.W. The influence of sublethal blue light exposure on human RPE cells. *Mol. Vis.* **2009**, *15*, 1929–1938. [[PubMed](#)]
45. Wataha, J.C.; Lockwood, P.E.; Lewis, J.B.; Rueggeberg, F.A.; Messer, R.L.W. Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent. Mater.* **2004**, *20*, 150–157. [[CrossRef](#)]
46. Del Olmo-Aguado, S.; Manso, A.G.; Osborne, N.N. Light Might Directly Affect Retinal Ganglion Cell Mitochondria to Potentially Influence Function. *Photochem. Photobiol.* **2012**, *88*, 1346–1355. [[CrossRef](#)]
47. Anitua, E.; De la Fuente, M.; Muruzabal, F.; Riestra, A.; Merayo-Llodes, J.; Orive, G. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp. Eye Res.* **2015**, *135*, 118–126. [[CrossRef](#)]
48. Molina-Miñano, F.; López-Jornet, P.; Camacho-Alonso, F.; Vicente-Ortega, V. The use of plasma rich in growth factors on wound healing in the skin: Experimental study in rabbits. *Int. Wound J.* **2009**, *6*, 145–148. [[CrossRef](#)]
49. Freire, V.; Andollo, N.; Etxebarria, J.; Durán, J.A.; Morales, M.-C. In Vitro Effects of Three Blood Derivatives on Human Corneal Epithelial Cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2012**, *53*, 5571. [[CrossRef](#)]
50. Youssef, P.N.; Sheibani, N.; Albert, D.M. Retinal light toxicity. *Eye* **2011**, *25*, 1–14. [[CrossRef](#)]
51. Zhao, Z.C.; Zhou, Y.; Tan, G.; Li, J. Research progress about the effect and prevention of blue light on eyes. *Int. J. Ophthalmol.* **2018**, *11*, 1999–2003. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Nadal-Nicolás, F.M.; Jiménez-López, M.; Salinas-Navarro, M.; Sobrado-Calvo, P.; Albuquerque-Béjar, J.J.; Vidal-Sanz, M.; Agudo-Barriuso, M. Whole Number, Distribution and Co-Expression of Brn3 Transcription Factors in Retinal Ganglion Cells of Adult Albino and Pigmented Rats. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49830. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Nadal-Nicolás, F.M.; Jiménez-López, M.; Sobrado-Calvo, P.; Nieto-López, L.; Cánovas-Martinez, I.; Salinas-Navarro, M.; Vidal-Sanz, M.; Agudo, M. Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: Qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2009**, *50*, 3860–3868. [[CrossRef](#)]
54. Stankowska, D.L.; Minton, A.Z.; Rutledge, M.A.; Mueller, B.H.; Phatak, N.R.; He, S.; Ma, H.-Y.; Forster, M.J.; Yorio, T.; Krishnamoorthy, R.R. Neuroprotective Effects of Transcription Factor Brn3b in an Ocular Hypertension Rat Model of Glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2015**, *56*, 893–907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Del Olmo-Aguado, S.; Núñez-Álvarez, C.; Osborne, N.N. Blue Light Action on Mitochondria Leads to Cell Death by Necroptosis. *Neurochem. Res.* **2016**, *41*, 2324–2335. [[CrossRef](#)]

56. Kim, I.B.; Lee, E.J.; Kim, M.K.; Park, D.K.; Chun, M.H. Choline acetyltransferase-immunoreactive neurons in the developing rat retina. *J. Comp. Neurol.* **2000**, *427*, 604–616. [[CrossRef](#)]
57. Gonzalez-Cordero, A.; West, E.L.; Pearson, R.A.; Duran, Y.; Carvalho, L.S.; Chu, C.J.; Naeem, A.; Blackford, S.J.I.; Georgiadis, A.; Lakowski, J.; et al. Photoreceptor precursors derived from three-dimensional embryonic stem cell cultures integrate and mature within adult degenerate retina. *Nat. Biotechnol.* **2013**, *31*, 741–747. [[CrossRef](#)]
58. Grimm, C.; Wenzel, A.; Williams, T.P.; Rol, P.O.; Hafezi, F.; Remé, C.E. Rhodopsin-mediated blue-light damage to the rat retina: Effect of photoreversal of bleaching. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2001**, *42*, 497–505.
59. Reuter, T.E.; White, R.H.; Wald, G. Rhodopsin and porphyropsin fields in the adult bullfrog retina. *J. Gen. Physiol.* **1971**, *58*, 351–371. [[CrossRef](#)]
60. Begum, R.; Powner, M.B.; 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. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e57828. [[CrossRef](#)]
61. Casson, R.J.; Wood, J.P.M.; Melena, J.; Chidlow, G.; Osborne, N.N. The effect of ischemic preconditioning on light-induced photoreceptor injury. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2003**, *44*, 1348–1354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Chen, S.T.; Hsu, J.R.; Hsu, P.C.; Chuang, J.I. The retina as a novel in Vivo model for studying the role of molecules of the Bcl-2 family in relation to MPTP neurotoxicity. *Neurochem. Res.* **2003**, *28*, 805–814. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Johnson, T.V.; Martin, K.R. Development and characterization of an adult retinal explant organotypic tissue culture system as an in vitro intraocular stem cell transplantation model. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2008**, *49*, 3503–3512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Krishnamoorthy, R.R.; Agarwal, P.; Prasanna, G.; Vopat, K.; Lambert, W.; Sheedlo, H.J.; Pang, I.H.; Shade, D.; Wordinger, R.J.; Yorio, T.; et al. Characterization of a transformed rat retinal ganglion cell line. *Mol. Brain Res.* **2001**, *86*, 1–12. [[CrossRef](#)]
65. He, M.; Pan, H.; Chang, R.C.-C.; So, K.-F.; Brecha, N.C.; 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. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e84800. [[CrossRef](#)]
66. Ji, D.; Kamalden, T.A.; del Olmo-Aguado, S.; Osborne, N.N. Light- and sodium azide-induced death of RGC-5 cells in culture occurs via different mechanisms. *Apoptosis* **2011**, *16*, 425–437. [[CrossRef](#)]
67. Kutty, R.K.; Nagineni, C.N.; Kutty, G.; Hooks, J.J.; Chader, G.J.; Wiggert, B. Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor-beta. *J. Cell Physiol.* **1994**, *159*, 371–378. [[CrossRef](#)]
68. Ursu, O.N.; 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*, 52–66. [[CrossRef](#)]

