



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL Y ELECTROFISIOLÓGICA DE LA
RETINA DEL RATÓN *SGCD-NULO* COMO MODELO DE
DEGENERACIÓN RETINIANA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MARTHA JANNETH PERALTA ILDEFONSO



**DIRECTOR DE TESIS
Dr. FRANCISCO JAVIER ESTRADA MENA
UNIVERSIDAD PANAMERICANA**

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** Dr. JOSÉ PEDRAZA CHAVERRI

VOCAL: **Profesor:** Dra. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

SECRETARIO: **Profesor:** Dr. FRANCISCO JAVIER ESTRADA MENA

1er. SUPLENTE: **Profesor:** Dra. FRANCISCA MORAYNA GUTIÉRREZ LUNA

2º SUPLENTE: **Profesor:** Dr. JAVIER AXOSCO MARIN

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE BIOLOGÍA MOLECULAR, ESCUELA DE MEDICINA, UNIVERSIDAD PANAMERICANA.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. FRANCISCO JAVIER ESTRADA MENA

SUSTENTANTE (S):

MARTHA JANNETH PERALTA ILDEFONSO

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por la Universidad Panamericana a través del fondo "Fomento a la Investigación UP 2017", bajo el código UP-CI-2017-CS-MX-01."

Se extiende un cordial agradecimiento al Dr. Ramón Coral Vázquez, miembro del Hospital 20 de Noviembre y el Instituto Politécnico Nacional por la donación del ratón *Sgcd-nulo*. De igual forma, se agradece al Dr. Israel Ramírez Sánchez de la Universidad Panamericana y la Universidad de San Diego California (EUA), por la donación de anticuerpos y reactivos necesarios para el desarrollo experimental. Finalmente, se reconoce al Dr. Jorge Eduardo Brieva Rico y al Dr. Ernesto Moya Albor de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Panamericana, así como a la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez del Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla, por las facilidades otorgadas para el uso de las instalaciones y equipos necesarios para la realización del presente trabajo.

ÍNDICE

1. RESUMEN	6
ÍNDICE DE FIGURAS.....	8
ÍNDICE DE TABLAS.....	9
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
LISTA DE SÍMBOLOS	11
2. MARCO TEÓRICO.....	12
2.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL OJO.....	12
2.1.1 <i>Morfología de la retina</i>	13
2.2 DEGENERACIÓN MACULAR ASOCIADA CON LA EDAD (DMAE).....	17
2.2.1 <i>Prevalencia</i>	17
2.2.2 <i>Factores de riesgo</i>	18
2.2.3 <i>Patología</i>	19
2.2.4 <i>Progresión de la DMAE</i>	19
2.2.5 <i>Diagnóstico</i>	21
2.2.6 <i>Tratamiento</i>	25
2.3 COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA (DAPC).....	26
2.3.1 <i>Complejo Sarcoglicano-Sarcospan (SG-SSPN)</i>	27
2.4 RELACIÓN DEL GEN <i>SGCD</i> CON LA DMAE.....	28
2.5 MODELOS MURINOS PARA ESTUDIAR LA DMAE	31
2.5.1 <i>Construcción del ratón Sgcd-nulo</i>	32
2.6 PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES.....	35
2.6.1 <i>Etapas del procesamiento digital de imágenes</i>	36
2.6.2 <i>Propiedades de las imágenes a color</i>	38
2.6.3 <i>Métodos de mejoramiento de imágenes</i>	39
3. JUSTIFICACIÓN.....	42
4. OBJETIVOS.....	44
4.1 OBJETIVO GENERAL.....	44
4.2 HIPÓTESIS	44
4.3 OBJETIVOS PARTICULARES	44
5. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	45
5.1 DISEÑO DEL ESTUDIO	45
5.2 GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES	45
5.2.1 <i>Extracción de DNA de cola de ratón</i>	45
5.2.2 <i>Cuantificación de DNA</i>	47
5.2.3 <i>Integridad del DNA</i>	48
5.2.4 <i>PCR punto final</i>	49
5.2.4.1 <i>Cebadores utilizados para la genotipificación de ratones</i>	50
5.2.4.1 <i>Condiciones y reactivos para la PCR</i>	51

5.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL.....	54
5.3.1 <i>Enucleación de ojos</i>	54
5.3.2 <i>Inclusión en parafina</i>	54
5.3.3 <i>Desparafinización de tejidos</i>	55
5.3.4 <i>Tinción de hematoxilina-eosina</i>	55
5.3.4.1 <i>Análisis de la fragilidad estructural de la retina</i>	56
5.3.4.2 <i>Medición del grosor de las capas de la retina</i>	58
5.3.4.3 <i>Análisis de la densidad de núcleos de las capas nucleares de la retina</i>	59
5.4 ENSAYO DE INMUNOLocalIZACIÓN DEL COMPLEJO SG-SSPN EN RETINA.....	60
5.5 ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN DEL COMPLEJO SG-SSPN MEDIANTE RÉPLICAS EN WESTERN BLOT DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE RETINA.....	62
5.5.1 <i>Extracción de proteínas de retina</i>	62
5.5.2 <i>Cuantificación de proteínas</i>	63
5.5.3 <i>Electroforesis SDS-PAGE</i>	63
5.5.4 <i>Transferencia</i>	64
5.5.5 <i>Inmunodetección</i>	64
5.5.6 <i>Revelado</i>	66
5.5.7 <i>Desacoplamiento de anticuerpos</i>	66
5.6 EVALUACIÓN DE LA AGUDEZA VISUAL.....	67
5.6.1 <i>Procesamiento de datos de los electroretinogramas</i>	68
5.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	71
6. RESULTADOS	72
6.1 CAMBIOS ESTRUCTURALES DE LA RETINA DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	72
6.2 CAMBIOS EN LA EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO SG-SSPN EN LA RETINA DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	75
6.3 ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE LA RETINA DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	82
7. DISCUSIÓN	85
8. CONCLUSIONES	91
9. REFERENCIAS	92

1. RESUMEN

Introducción. La Degeneración Macular Asociada con la Edad (DMAE) es la principal causa de ceguera irreversible en personas de 65 años o más, estimándose que el número de personas con la enfermedad puede llegar a ser de 288 millones en el 2040 como consecuencia del envejecimiento de la población. La DMAE es una enfermedad multifactorial que se caracteriza por un daño estructural en la retina como consecuencia del estrés oxidativo e inflamación producidos. En la actualidad, el conocimiento sobre las bases moleculares de la enfermedad no está bien descrito y no existe un tratamiento efectivo para los pacientes con DMAE del tipo atrofia geográfica, por lo que es necesario contar con modelos y nuevos blancos moleculares de la enfermedad. Recientemente, se ha demostrado la asociación de variaciones genéticas en *SGCD* [gen que codifica para la proteína delta-sarcoglicano (δ -SG)] con el aumento en la susceptibilidad de desarrollar DMAE del tipo atrofia geográfica, sin embargo, aún se desconoce la contribución de δ -SG en el progreso de la degeneración de la retina. No obstante, se sabe que δ -SG forma parte del complejo Sarcoglicano-Sarcospan (SG-SSPN) que está compuesto por las subunidades α -, β -, γ -, δ -, ϵ -Sarcoglicano (SG) y Sarcospan. Estas proteínas glicosiladas tienen como función principal asegurar la estabilidad de la membrana muscular. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue utilizar un modelo de ratón deficiente de δ -SG para caracterizar la influencia de esta proteína sobre la morfología y función de la retina.

Métodos. Se utilizaron 23 ratones C57BL/6J wild-type [*Sgcd* (+/+), WT] y 26 ratones knock-out [*Sgcd* (-/-), KO] de 8 a 10 semanas de edad. Todos los procedimientos con estos animales se realizaron de acuerdo con la declaración de ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) para el uso de Animales en la Investigación Oftálmica y

de la Visión. Para la caracterización estructural, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina de los ojos. Adicionalmente, se analizaron los cambios en la expresión de las subunidades del complejo SG-SSPN mediante ensayos de inmunolocalización y western blot de retinas aisladas. Posteriormente, como parte del análisis de la función de la retina, se obtuvieron electroretinogramas bajo anestesia con 1 s de flash a intensidades de 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 log cd.s/m².

Resultados. En comparación con el WT, la retina del ratón KO presenta 15 veces más probabilidades de presentar soluciones de continuidad y un incremento en la densidad de núcleos en sus capas nucleares. También, el ratón KO presenta una reducción significativa en el grosor de las capas de la retina comparado con el WT. Por otro lado, se encontró que la expresión proteica de las subunidades β -, γ - y ϵ -SG se encuentra reducida, mientras que la expresión de α -SG se incrementa y no hay un cambio aparente en la expresión de SSPN en el ratón KO comparado con el WT. En relación a la fisiología, no se encontró alguna alteración en la función de la retina del ratón KO comparado con el WT.

Conclusiones. Se demostró que la delección de *Sgcd* genera cambios estructurales importantes en la retina, similares a los que ocurren en los pacientes con DMAE del tipo atrofia geográfica. Sin embargo, no se encontró alguna asociación entre la delección de *Sgcd* y la agudeza visual de los ratones. No obstante, las alteraciones estructurales observadas sugieren que este ratón puede ser utilizado como un modelo potencial para comprender la patología de la degeneración retiniana, que se presenta en algunas enfermedades como la DMAE del tipo atrofia geográfica.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA DEL OJO.	13
FIGURA 2. CAPAS DE LA RETINA HUMANA.	14
FIGURA 3. CAPAS DE LA RETINA MURINA.	16
FIGURA 4. ETAPAS CLÍNICAS Y SIGNOS DE LA DMAE.	20
FIGURA 5. CONSECUENCIAS EN LA VISIÓN CON EL DESARROLLO DE LA DMAE.	22
FIGURA 6. FONDO DE OJO CON LÁMPARA DE HENDIDURA DE UN PACIENTE.	22
FIGURA 7. ENFOQUES DIAGNÓSTICOS PARA DETECTAR LA DMAE.	25
FIGURA 8. COMPLEJO DE PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA DISTROFINA (DAPC).	28
FIGURA 9. UBICACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS ASOCIADOS CON EL INCREMENTO EN LA PROBABILIDAD DE DESARROLLAR DMAE.	30
FIGURA 10. DISRUPCIÓN DIRIGIDA DEL GEN <i>SGCD</i> DEL RATÓN.	34
FIGURA 11. ETAPAS DEL PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMÁGENES.	37
FIGURA 12. OPERACIONES REALIZADAS PARA EL MEJORAMIENTO DE UNA IMAGEN.	40
FIGURA 13. ANÁLISIS DE LA INTEGRIDAD DEL DNA MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 1%.	49
FIGURA 14. ESQUEMA REPRESENTATIVO DE LA UNIÓN DE LOS CEBADORES A LA SECUENCIA DEL GEN <i>SGCD</i>	51
FIGURA 15. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS DE PCR MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA AL 2%.	53
FIGURA 16. MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE IMÁGENES PROPUESTO PARA CALCULAR EL ÍNDICE DE FRAGILIDAD.	58
FIGURA 17. MÉTODO DE PROCESAMIENTO DE IMÁGENES PROPUESTO PARA EL CONTEO DE NÚCLEOS... 60	
FIGURA 18. COLOCACIÓN DEL RATÓN EN EL EQUIPO PARA REALIZAR LA EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LA RETINA.	68
FIGURA 19. ERG SUAVIZADO CON LA TRANSFORMADA DE FOURIER Y SUS DOS PRIMERAS DERIVADAS.	70
FIGURA 20. LA RETINA DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i> PRESENTA UN ÍNDICE DE FRAGILIDAD ELEVADO.	72
FIGURA 21. LA RETINA DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i> PRESENTA UNA DISMINUCIÓN SIGNIFICATIVA DE SU GROSOR.	74
FIGURA 22. LA DELECIÓN DE <i>SGCD</i> MODIFICA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO SG-SSPN EN LA RETINA DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	76
FIGURA 23. LA DELECIÓN DE <i>SGCD</i> MODIFICA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO SG-SSPN EN LAS CAPAS DE LA RETINA DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	78
FIGURA 24. LA DELECIÓN DE <i>SGCD</i> MODIFICA LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LAS SUBUNIDADES DEL COMPLEJO SG-SSPN EN LA RETINA DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	81
FIGURA 25. LA DELECIÓN DEL GEN <i>SGCD</i> NO MODIFICA LOS PATRONES DEL ERG DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	82
FIGURA 26. LA DELECIÓN DE <i>SGCD</i> NO MODIFICA LA AMPLITUD Y EL TIEMPO DE LATENCIA DE LA ONDA A, B Y PHNR DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	83
FIGURA 27. LA DELECIÓN DE <i>SGCD</i> NO MODIFICA LA RELACIÓN B/A DEL RATÓN <i>SGCD-NULO</i>	84

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. SECUENCIA DE LOS CEBADORES UTILIZADOS PARA LLEVAR A CABO LA GENOTIPIFICACIÓN DE RATONES.	50
TABLA 2. CANTIDAD DE REACTIVO AJUSTADA PARA LLEVAR A CABO LA PCR EN UN VOLUMEN FINAL DE 12 μ L.	52
TABLA 3. DATOS DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO DE INMUNOLocalIZACIÓN.	61
TABLA 4. DATOS DE LOS ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO DE INMUNOFUORESCENCIA.	61
TABLA 5. DATOS DE LOS ANTICUERPOS PRIMARIOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN.	65
TABLA 6. DATOS DE LOS ANTICUERPOS SECUNDARIOS UTILIZADOS PARA EL ENSAYO DE INMUNODETECCIÓN.	65
TABLA 7. GROSOR DE LA RETINA COMPLETA Y SUS CAPAS.	75
TABLA 8. DIFERENCIAS EN LOS NIVELES TOTALES DE PROTEÍNA NORMALIZADA DEL COMPLEJO SG-SSPN POR GENOTIPO.	80

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
DMAE	Degeneración macular asociada con la edad
<i>SGCD</i>	Gen de delta-sarcoglicano humano
<i>Sgcd</i>	Gen de delta-sarcoglicano murino
KO / <i>Sgcd-nulo</i> / <i>Sgcd (-/-)</i>	Modelo murino con la delección del gen de delta-sarcoglicano
WT / <i>Sgcd (+/+)</i>	Modelo murino con el genotipo silvestre (C57BL/6J)
EPR	Epitelio pigmentario retiniano
SNP	Polimorfismo de nucleótido único
NVC	Neovascularización coroidal
DAPC	Complejo de proteínas asociadas a la distrofina
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
LGDM	Distrofia muscular de Cintura
SG-SSPN	Sarcoglicano-Sarcospan
δ -SG	Delta-sarcoglicano
α -SG	Alfa-sarcoglicano
β -SG	Beta-sarcoglicano
γ -SG	Gama-sarcoglicano
ε -SG	Épsilon-sarcoglicano
SSPN	Sarcospan
FR	Capa de fotorreceptores
SE	Segmentos externos de los fotorreceptores
SI	Segmentos internos de los fotorreceptores
NE	Capa nuclear externa
PE	Capa plexiforme externa
NI	Capa nuclear interna
PI	Capa plexiforme interna

CG	Capa de células ganglionares
ERG	Electroretinograma
ANOVA	Análisis de varianza
M ± SD	Media ± Desviación estándar
M ± IQR	Mediana ± Rango intercuartil

LISTA DE SÍMBOLOS

SÍMBOLO	SIGNIFICADO
nm	Nanómetro
µm	Micrómetro
mm	Milímetro
µm ²	micrómetro cuadrado
µL	Microlitro
mL	Mililitro
ng	Nanogramo
mg	Miligramo
ms	Milisegundo
s	Segundo
min	Minuto
h	Hora
mM	Milimolar
A	Absorbancia
mA	Miliamperes
µV	Microvolts
V	Volts
°C	Grados Celsius
xg	Fuerza g, fuerza centrífuga relativa

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características generales del ojo

El sistema visual detecta e interpreta los estímulos luminosos que se presentan como ondas electromagnéticas. El ojo es capaz de distinguir dos cualidades de la luz: su brillo y su longitud de onda que, para este último caso, las longitudes de onda entre 400 y 750 nm constituyen la luz visible que es capaz de detectar el ojo humano. El ojo consiste de tres capas concéntricas: externa, media e interna. La capa externa es fibrosa e incluye la córnea, el epitelio corneal, la conjuntiva y la esclerótica. La capa media es vascular y comprende el iris y la coroides. La capa interna es neural y contiene la retina, la cual cubre toda la parte posterior del ojo, excepto el punto ciego, que es el disco óptico (cabeza del nervio óptico). La agudeza visual es mayor en el punto central de la retina llamada mácula, dentro de la cual se encuentra la fovea. El ojo también contiene una lente que enfoca la luz, pigmentos que absorben y reducen la dispersión de la luz, y dos líquidos, el humor acuoso que llena la cámara anterior del ojo y, el humor vítreo que llena la cámara posterior (Costanzo, 2011) (Figura 1).

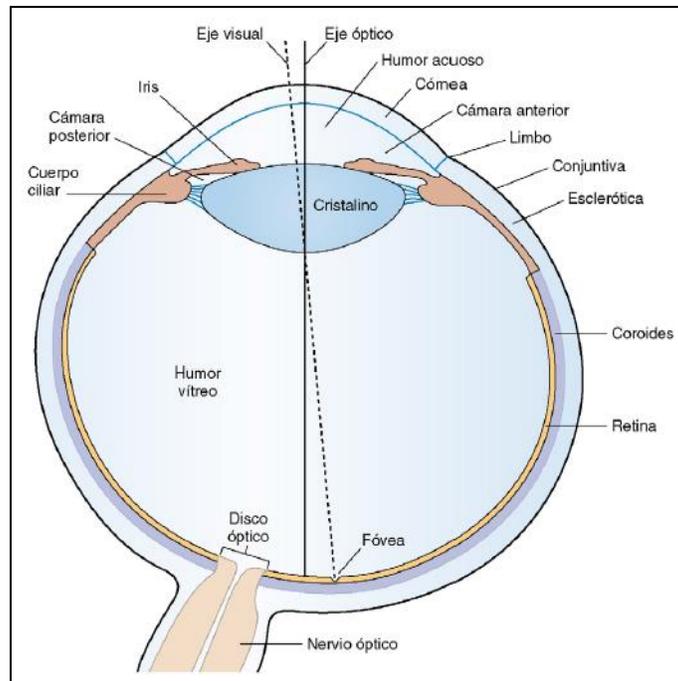


Figura 1. Estructura del ojo.

(Costanzo, 2011).

Los receptores sensoriales para la visión se encuentran en la retina y se conocen como fotorreceptores, de los cuales existen dos tipos: los bastones que son sensibles a la luz de baja intensidad, funcionan bien en la oscuridad y no participan en la visión del color. Por otro lado, los conos operan mejor con luz diurna, por lo que participan en la visión del color. La información que reciben los fotorreceptores la traducen y transportan al sistema nervioso central (SNC) a través de los axones de las células ganglionares retinianas (Costanzo, 2011).

2.1.1 Morfología de la retina

La retina es un tejido complejo con múltiples capas y células responsables de la absorción de la luz y la transmisión de señales al cerebro (Treuting et al., 2012). Las capas de la retina se describen a continuación y corresponden con los números rodeados en círculos de la Figura 2:

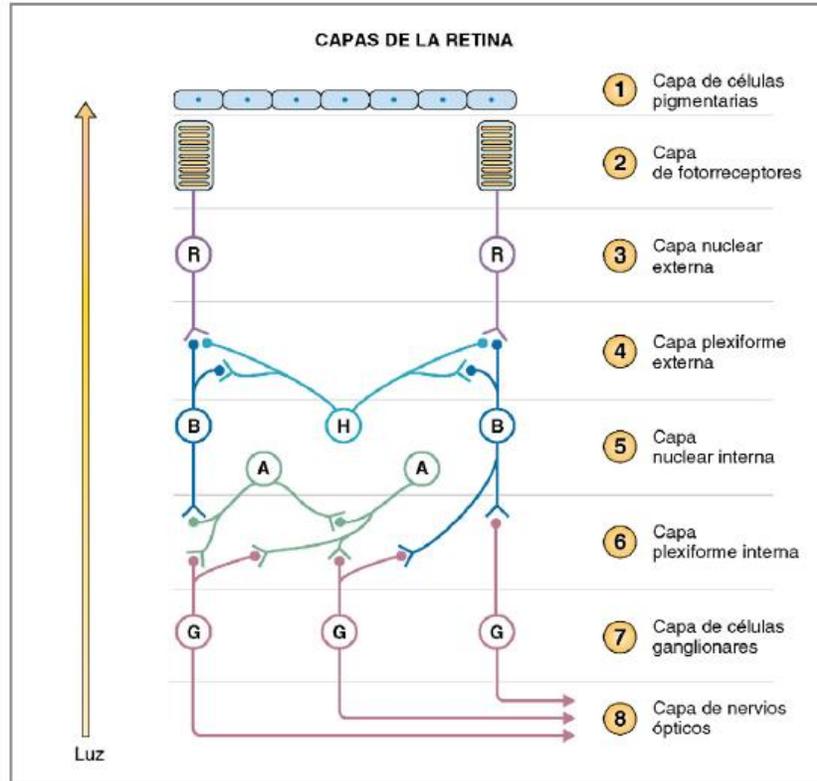


Figura 2. Capas de la retina humana.

Las células de salida de la retina son las células ganglionares retinianas, cuyos axones forman los nervios ópticos. Los números en un círculo corresponden a las capas de la retina descritas en el texto. (A) Células amacrinas; (B) Células bipolares, (G) Células ganglionares; (H) Células horizontales; (R) Fotorreceptores (Costanzo, 2011).

1. *Capa de células pigmentarias.* La retina comienza justo en el interior de la coroides con una capa de Epitelio Pigmentario, la cual absorbe la luz dispersa y previene su dispersión. Además, contiene las células pigmentarias que intervienen en la descomposición de la rodopsina, que es la proteína responsable de la absorción de la luz (Hall & Guyton, 2011).
2. *Capa fotorreceptora.* Contiene a los fotorreceptores (conos y bastones) que están formados de un cuerpo celular, un segmento externo, un

segmento interno y terminales sinápticas. Dentro de la figura 2, solo se presentan los bastones.

3. *Capa nuclear externa*. Contiene los núcleos de los fotorreceptores (R).
4. *Capa plexiforme externa*. Es una capa sináptica que contiene elementos presinápticos y postsinápticos de los fotorreceptores y las interneuronas de la retina. Se pueden establecer uniones sinápticas entre los fotorreceptores y las interneuronas, así como uniones interneurona-interneurona.
5. *Capa nuclear interna*. Contiene los cuerpos celulares de las interneuronas retinianas, entre las que se encuentran las células bipolares (B), células horizontales (H) y células amacrinas (A).
6. *Capa plexiforme interna*. Es la segunda capa sináptica que contiene los elementos presinápticos y postsinápticos de las interneuronas, las que establecen sinapsis con las células ganglionares.
7. *Capa de células ganglionares*. Contiene los cuerpos celulares de las células ganglionares, que son las células de salida de la retina.
8. *Capa del nervio óptico*. Los axones de las células ganglionares retinianas pasan a través de la retina (evitando la mácula), entran en el disco óptico y salen del ojo, formando el nervio óptico (Costanzo, 2011).

El ojo de los mamíferos es similar entre los ratones y humanos, con algunas diferencias histológicas debido al tamaño. Sin embargo, la estructura y organización de las capas de la retina es igual en ambas especies (ver figura 3).

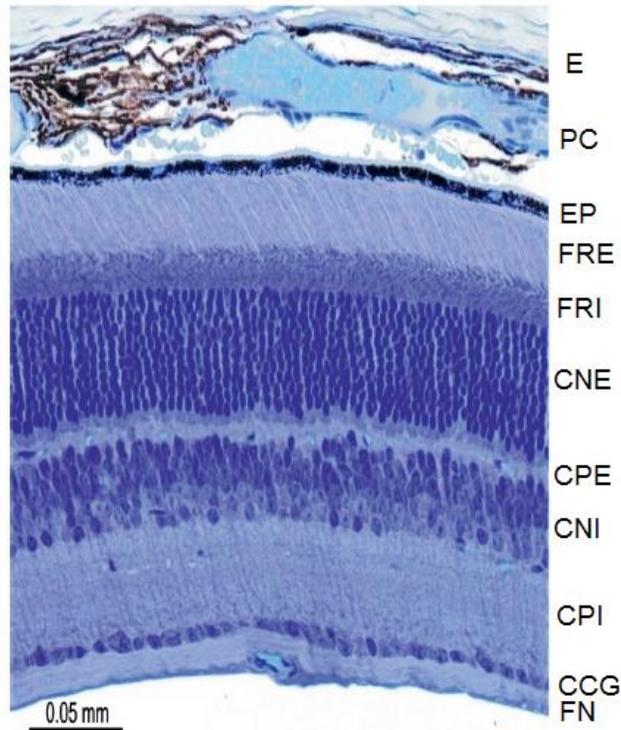


Figura 3. Capas de la retina murina.

Corte transversal (5 μ m) de una retina de ratón teñida con el colorante de Richardson. Se presentan las tres capas celulares y las dos capas sinápticas de la retina. De arriba hacia abajo, las capas se presentan como: (E) Esclera, (PC) Plexus Coroideo, (EP) Epitelio Pigmentario, (FRE) Fotorreceptores Externos, (FRI) Fotorreceptores Internos, (CNE) Capa Nuclear Externa, (CPE) Capa Plexiforme Externa, (CNI) Capa Nuclear Interna, (CPI) Capa Plexiforme Interna, (CCG) Capa de Células Ganglionares, (FN) Fibras Nerviosas. Modificado de Treuting et al., 2012.

El Epitelio Pigmentario Retiniano (EPR) se encuentra separado de la coroides por la membrana de Bruch, la cual es menos prominente en ratones que en los seres humanos. La Membrana Limitante Interna (MLI) es una membrana basal formada por los pies de las células gliales que abarcan el interior de la retina, y cuyos cuerpos celulares se encuentran dentro de la Capa Nuclear Interna y se conocen como células de Müller. La Capa de Fibras Nerviosas contiene los axones de las células

ganglionares no mielinizadas. El humano en promedio tiene de 1 a 1.2 millones de axones de las células ganglionares, mientras que los ratones tienen aproximadamente una décima parte de este número, el cual es variable entre las diferentes cepas. La diferencia más notable entre la retina humana y de ratón radica en que la retina humana contiene un área especializada llamada mácula, que es la responsable de la visión central. Una depresión en el centro de la mácula marca la ubicación de la fovea, que consiste principalmente de fotorreceptores (específicamente de conos, ya que la cantidad de bastones es mínima comparada con la presencia de los conos) (Purves et al., 2001; Treuting et al., 2012).

2.2 Degeneración Macular Asociada con la Edad (DMAE)

La Degeneración Macular Asociada con la Edad (DMAE) es la principal causa de ceguera irreversible en personas de edad igual o superior a 65 años (Klein, 2011; Mousavi & Armstrong, 2013) y la tercera causa de ceguera irreversible en el mundo, de acuerdo con los datos reportados por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2002).

2.2.1 Prevalencia

La DMAE representa el 8.7% de la ceguera en todo el mundo y es la causa más común de ceguera en países desarrollados. Además, se ha demostrado que el número de personas con la enfermedad puede llegar a ser de 196 millones en 2020, aumentando a 288 millones en 2040 como consecuencia del envejecimiento de la población (Wong et al., 2014). En México, no se han realizado estudios acerca de la prevalencia de la enfermedad, sin embargo, se sabe que la DMAE temprana se presenta en un 9.7% de Latinos, mientras que una DMAE tardía está presente sólo en un 0.5% de la misma población, siendo esta más común en hombres. Adicionalmente, se ha observado que los Latinos con ascendencia

predominantemente mexicana tienen una tasa elevada de desarrollar DMAE tardía (Varma et al., 2004).

2.2.2 Factores de riesgo

La DMAE es una enfermedad multifactorial que presenta factores de riesgo demográficos y ambientales como la edad, género, raza, dieta, hábitos tabáquicos, y enfermedades cardiovasculares, entre otros. El aumento del riesgo de desarrollar DMAE puede ser atribuido al daño gradual producido a la retina por el estrés oxidativo diario (Ding, Patel, & Chan, 2009), debido a que el EPR es particularmente susceptible a la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) por su alto consumo de oxígeno, elevada proporción de ácidos grasos insaturados y exposición constante a la luz (Masuda, Shimazawa, & Hara, 2017).

Asimismo, la DMAE presenta factores de riesgo genéticos. Los más estudiados están asociados con la modulación del sistema inmune y el sistema del complemento, como el factor H (*CFH*), el factor B (*CFB*), el factor C3 del complemento y el inhibidor de la peptidasa tipo serpina (*SERPING1*). También se ha implicado a los genes asociados al transporte a través de membranas, como las proteínas de unión a ATP (*ABC*) y la subunidad gamma tres de los canales de calcio dependientes de voltaje (*CACNG3*); al sistema vascular, como el factor 2 de crecimiento de fibroblastos (*FGF2*), la fibulina 5, los genes de tipo lisil oxidasa (*LOXL1*) y la selectina-P (*SELP*); al metabolismo lipídico, como la apolipoproteína E (*APOE*) y la lipasa hepática (*LIPC*). Además, otros genes como el de la proteína 2 de susceptibilidad a la maculopatía asociada a la edad (*ARMS2*) y el gen de la proteína de reparación del DNA por escisión (*ERCC6*); aunque aún se desconoce su nivel de asociación (Mousavi & Armstrong,

2013). Aún con estos hallazgos, todavía se desconoce todo el fondo genético asociado con la enfermedad.

2.2.3 Patología

La progresión de la DMAE ocurre durante un periodo de tiempo prolongado, con la incidencia de la enfermedad aumentando a los 70 años. La DMAE afecta principalmente a los fotorreceptores, el EPR, la membrana de Bruch y los coriocapilares. Se presentan cambios en la retina que incluyen alteraciones en el tamaño y la forma celular del EPR, un engrosamiento de la membrana de Bruch y la MLI, y una disminución en los elementos neuronales de la retina (Ding et al., 2009). Conjuntamente, ocurre la formación de depósitos extracelulares compuestos de glicoproteínas y lípidos que se acumulan en la membrana de Bruch, los cuales se denominan drusas. La presencia de estos depósitos en baja proporción se considera como una parte normal del proceso de envejecimiento; sin embargo, su presencia en grandes proporciones en la mácula se considera como parte de la DMAE temprana. La aparición de moléculas relacionadas con la inflamación en las drusas sugiere que el sistema inmunológico está involucrado con la patogénesis de la enfermedad (Hageman et al., 2001).

2.2.4 Progresión de la DMAE

Clínicamente, la DMAE de etapa temprana se caracteriza por un engrosamiento y pérdida de la arquitectura normal de la membrana de Bruch, la acumulación de lipofuscina y la formación de drusas debajo del EPR y la membrana de Bruch (Gao et al., 2015; Green & Enger, 1993). Las drusas se encuentran como regiones localizadas dentro de la región macular. Estas varían en tamaño, forma, color, consistencia y distribución (Figura 4). En la etapa temprana, son visibles oftalmoscópicamente

cuando su diámetro excede los 25 μm , como puntos semitranslúcidos bajo retroiluminación (Sarks et al., 1999).

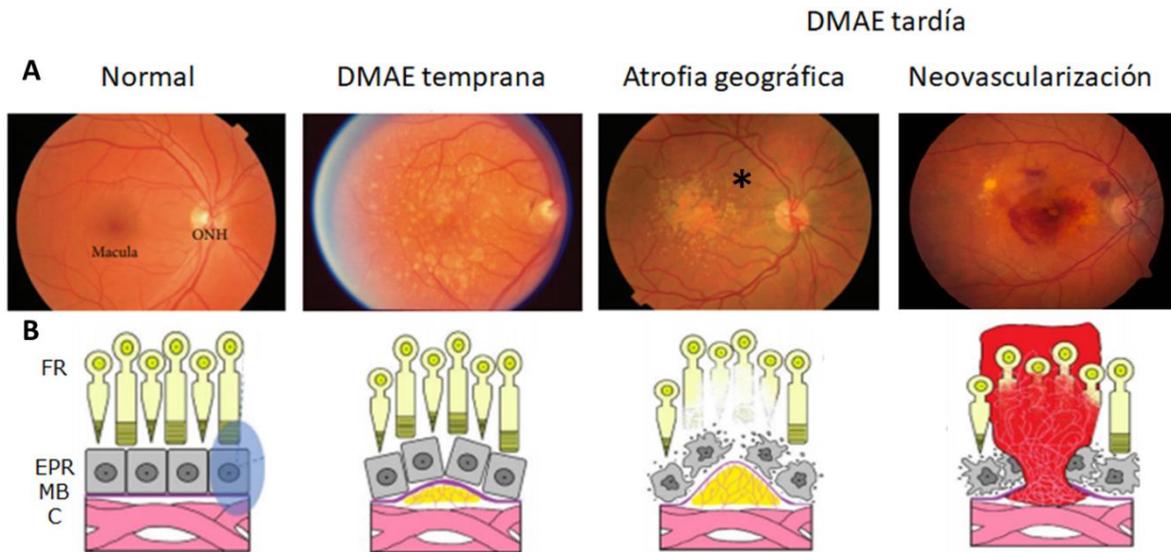


Figura 4. Etapas clínicas y signos de la DMAE.

(A) Fotografías del fondo de ojo donde se observan las características clínicas de la DMAE en diferentes etapas. La DMAE temprana muestra depósitos de drusas amarillas extracelulares que rodean la mácula. La DMAE tardía como atrofia geográfica muestra hipopigmentación u oscurecimiento (*) alrededor de las drusas, mientras que la neovascularización presenta una zona hemorrágica alrededor de la mácula. (B) Diagrama esquemático de la acumulación de drusas y la degeneración del Epitelio Pigmentario Retiniano (EPR) y los fotorreceptores (FR). Cabeza del nervio óptico (ONH, por sus siglas en inglés); Membrana de Bruch (MB); Coroides (C). Modificado de Gao et al., 2015; X. Shaw et al., 2016.

Cuando la DMAE progresa a una etapa tardía, se presenta de dos formas, como atrofia geográfica (AG) y neovascularización coroidea (NVC). La AG, también conocida como DMAE seca, se caracteriza por presentar áreas de hipopigmentación como consecuencia de la pérdida de las células del EPR, que origina una degeneración gradual de los fotorreceptores cercanos, ocasionando un adelgazamiento de la retina y la pérdida progresiva de la visión (Figura 4). Los casos severos de atrofia geográfica pueden

extenderse hacia las capas externas de la retina como, la capa plexiforme externa (PE) y la capa nuclear interna (NI). Por otro lado, se pueden llegar a observar cambios de hiperpigmentación asociados con la proliferación celular del EPR de manera compensatoria y es observada frecuentemente en la periferia de las áreas hipopigmentadas (de Jong, 2006). Por otro lado, la NVC también conocida como DMAE húmeda, se caracteriza por la formación de nuevos vasos coroideos que penetran la membrana de Bruch y crecen dentro del espacio subretinal (Figura 4) (Ding et al., 2009).

2.2.5 Diagnóstico

Los pacientes suelen presentar distorsión, borrosidad o un escotoma (parche negro o gris) en su visión central, que es la progresión gradual de la atrofia geográfica (AG) y el inicio rápido de la neovascularización coroidal (NVC) (Figura 5). Los pacientes con AG en ambos ojos o NVC unilateral pueden ser asintomáticos o simplemente quejarse de una distorsión leve en su visión, la cual puede ser detectada durante una evaluación optométrica de rutina. Aquellos pacientes que presentan pérdida de la visión debida a una AG o NVC en ambos ojos, pueden llegar a desarrollar alucinaciones visuales (Síndrome de Charles Bonnet), que se caracterizan por estar formadas de patrones con luces o colores, animales, personas o escenas (Cook, Patel, & Tufail, 2008).

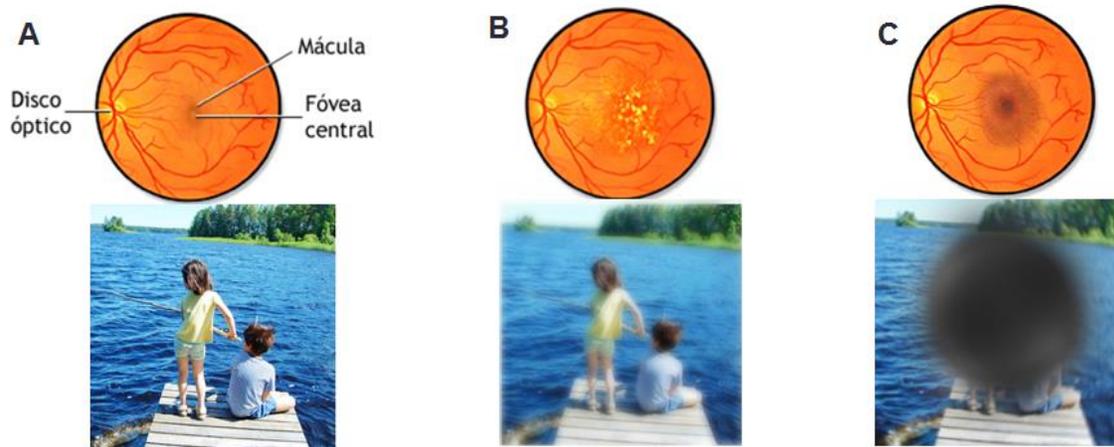


Figura 5. Consecuencias en la visión con el desarrollo de la DMAE. Retina normal (A), Degeneración macular asociada con la edad de etapa temprana (B) y tardía (C; AG y NVC en el mismo ojo). Modificado de Franzreb, n.d.; MedlinePlus, 2017.

Existen en la actualidad algunos métodos de diagnóstico de DMAE. Uno de ellos consiste en un método de visión estereoscópica mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura, en donde se puede observar la presencia de drusas, cambios en la pigmentación, hemorragias o atrofiás que afectan la mácula (Figura 6) (Cook et al., 2008).

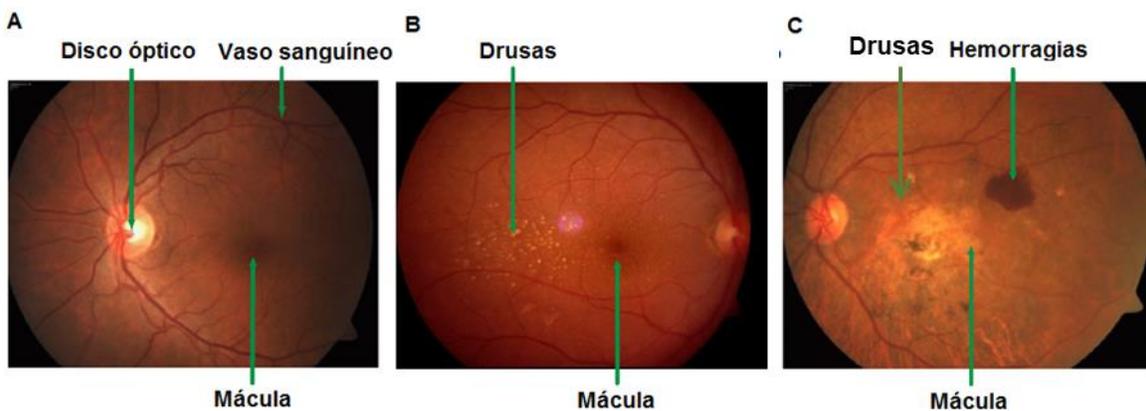


Figura 6. Fondo de ojo con lámpara de hendidura de un paciente.

Retina normal (A), Degeneración macular asociada con la edad con atrofia geográfica (B) y neovascularización (C). Modificado de Mookiah et al., 2014.

Uno de los métodos clásicos para diagnosticar DMAE consiste en el uso de la cuadrícula de Amsler, que consta de siete cuadrados de 10 cm con un punto central para la fijación (Figura 7). Durante la prueba, se le pide al paciente que preste atención al punto central y le haga saber al médico si observa alguna distorsión, áreas borrosas o puntos en blancos en cualquier lugar de la cuadrícula para considerar una prueba positiva para DMAE. A pesar de que es un método utilizado desde 1960, la sensibilidad y especificidad para detectar DMAE es baja. Por lo tanto, se han diseñado otras pruebas como la Perimetría de Hiperagudeza Preferencial (PHP), en donde se presenta al paciente un patrón de líneas punteadas proyectadas durante 160 ms a 14° del centro de su campo visual. Cualquier cambio geométrico en la morfología retiniana conducirá a un defecto de hiperagudeza y, por lo tanto, a la percepción de distorsión. Además, se puede complementar las pruebas anteriores con la prueba de Hiperagudeza en la Discriminación de la Forma (SDH, por sus siglas en inglés), que implica una discriminación de formas; por ejemplo, un círculo perfecto comparado con uno que tiene un contorno distorsionado. Sin embargo, estas pruebas presentan el mismo problema de baja sensibilidad y especificidad (Sim, 2015). Adicionalmente, existen tablas como la de Snellen y el gráfico del tratamiento temprano del estudio de retinopatía diabética (ETDRS, por sus siglas en inglés, Figura 7), las cuales contienen letras de diferentes tamaños dispuestas de la más grande en la parte superior hasta la más pequeña en la parte inferior, que se leen, un ojo a la vez, a una distancia de 6 m. Cada letra de la carta subtiende a un grado de inclinación, por lo que la prueba está diseñada para medir la agudeza visual en términos angulares. El método de puntuación utilizado es el método de asignación de línea, en el que un

paciente recibe crédito por líneas, no por letras leídas. En un adulto sano, el límite de resolución está entre 30 s y 1 min de arco (Kaiser, 2009) .

Las dos modalidades de imagen más comunes utilizadas para detectar edema macular debido a diversas etiologías, incluyen la Angiografía por Fluoresceína (FA, por sus siglas en inglés) y la Tomografía de Coherencia Óptica (OCT, por sus siglas en inglés). Los vasos de la retina y las hemorragias se detectan fotografiando la retina después de inyectar fluoresceína sódica en las venas periféricas del paciente. Los sistemas tradicionales basados en cámaras utilizan luz azul para iluminar la retina y detectar la emisión de la fluoresceína (Figura 7). En los últimos años se ha empleado el uso de la oftalmoscopia láser de exploración confocal (cSLO, por siglas en inglés) que emite una longitud de onda láser muy precisa diseñada para lograr la máxima emisión de la fluoresceína (Shoughy & Kozak, 2016). El OCT, es la primera prueba visual cuantitativa disponible para el diagnóstico de enfermedades visuales. Es una técnica moderna de imagen no invasiva, que se basa en la Interferometría de Baja Coherencia (LCI, por sus siglas en inglés), que es capaz de reconstruir imágenes tomográficas del objeto de estudio. Actualmente se utiliza para la obtención de imágenes rápidas y sin contacto de las estructuras oculares como la córnea, el cristalino, la retina y el nervio óptico con resoluciones de profundidad superiores a 3 μm . Por lo tanto, se utiliza para obtener una sección transversal de las diferentes capas de la retina, permitiendo la detección de modificaciones morfológicas y micrométricas, así como los cambios en el grosor de la retina para la detección temprana de DMAE (Figura 7) (Schwartz & Loewenstein, 2015; Jălu & Jălu, 2012).

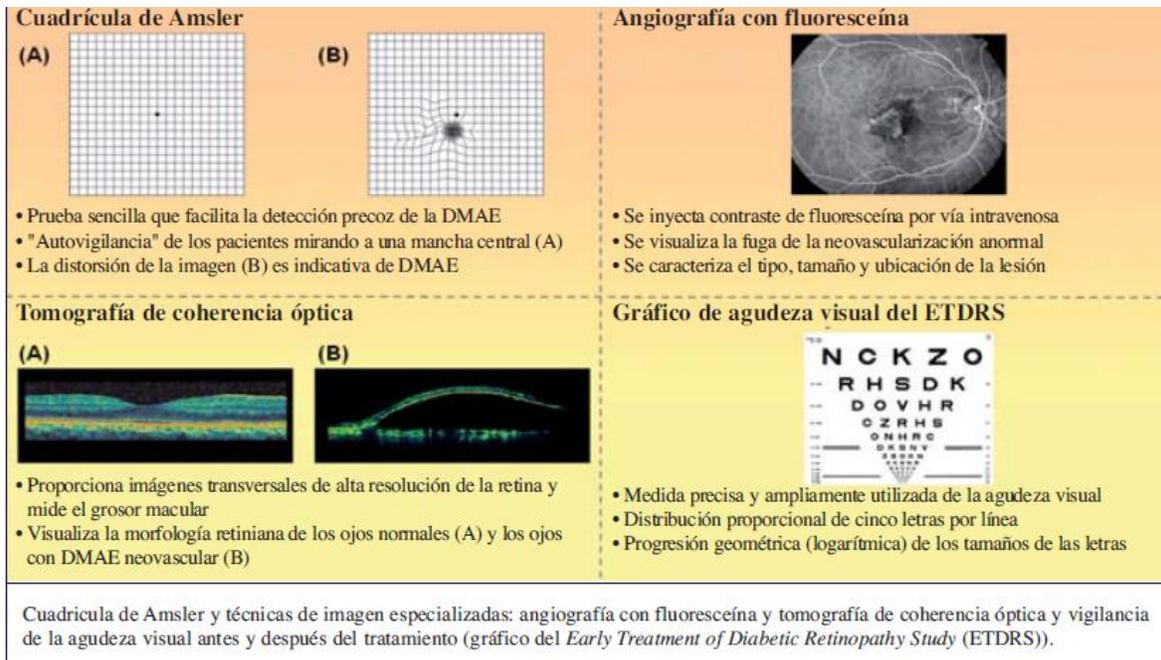


Figura 7. Enfoques diagnósticos para detectar la DMAE.

Modificada de Schmack, Kang & Grossniklaus, 2005.

2.2.6 Tratamiento

La DMAE temprana puede progresar a una atrofia geográfica (AG) o bien, a su forma neovascular (NVC) y en algunos casos, pueden coexistir al mismo tiempo. Actualmente, no existe un tratamiento establecido para tratar la AG, ya que la mayoría de las terapias e investigaciones científicas están dirigidas a la NVC (Bylsma & Guymer, 2005). Algunos métodos propuestos para tratar la NVC consisten en una cirugía de translocación macular para mejorar la agudeza visual de los pacientes; la fotocoagulación térmica o terapia fotodinámica con verteporfina (PDT, por sus siglas en inglés) que generan una cicatriz sobre las lesiones producidas por la neovascularización. Sin embargo, estas alternativas son limitadas por el riesgo de complicaciones y la posibilidad de recurrencia de la enfermedad (Jousseaume & Bornfeld, 2009; Schmack et al., 2005).

Actualmente, se están llevando a cabo varios estudios para probar los efectos de la inhibición selectiva del factor de crecimiento endotelial (VEGF) y la alteración farmacológica de su acción. Estos tratamientos incluyen una inyección intravítrea de un aptámero anti-VEGF o un anticuerpo monoclonal anti-VEGF humano, que se unen efectivamente e inhiben la acción del VEGF, reduciendo así el impulso para la angiogénesis intraocular y la permeabilidad vascular aumentada. Otras terapias consisten en inyectar periocularmente algunos esteroides antiangiogénicos como el Pegatinib sódico (Macugen®, Pfizer) y el Ranibizumab (Lucentis®, Novartis), que mejoran la agudeza visual en el 35% de los pacientes (Browning, Amoaku, & Dua, 2004). No obstante, a pesar de que existen múltiples tratamientos farmacológicos, las encuestas basadas en pacientes han revelado consistentemente que los tratamientos invasivos mencionados anteriormente, confieren una mejor calidad de vida (Solebo et al., 2008).

2.3 Complejo de proteínas asociadas a la distrofina (DAPC)

La Distrofina es una proteína de citoesqueleto de 427 kDa que resulta de la expresión del gen *DMD*. Esta proteína se encuentra asociada con un complejo macromolecular de proteínas llamado el Complejo de Proteínas Asociadas a la Distrofina (DAPC, por sus siglas en inglés), el cual está compuesto por distroglicanos, sarcoglicanos, sarcospan, distrobrevinas y sintrofina (Figura 8, Constantin, 2014). Este complejo tiene un papel principal en el mantenimiento de la estructura y morfología de la unión neuromuscular, así como en numerosas vías de señalización. Se sabe que algunas mutaciones de pérdida de función sobre el DAPC causan Distrofias Musculares como la de Duchenne/Becker (DMD, BMD respectivamente) y de Cintura (LGDM, por sus siglas en inglés). La ausencia del DAPC ocasiona la pérdida del acoplamiento entre la matriz extracelular y el

citoesqueleto, generando ruptura de la membrana muscular y una subsecuente necrosis durante el proceso de contracción (Sancar et al., 2011).

2.3.1 Complejo Sarcoglicano-Sarcospan (SG-SSPN)

El Complejo Sarcoglicano-Sarcospan (SG-SSPN) y el complejo distroglicano son componentes esenciales del DAPC. Los Sarcoglicanos (SGs) son proteínas glicosiladas con dominios transmembranales simples que regulan la estabilidad de la membrana muscular. Actualmente, se han identificado seis productos génicos, que de acuerdo con su topología se clasifican en: α -sarcoglicano (α -SG) y ε -sarcoglicano (ε -SG) que son proteínas transmembranales tipo I que comparten muchas características. Por otro lado, se encuentran γ -sarcoglicano (γ -SG), δ -sarcoglicano (δ -SG) y ζ -sarcoglicano (ζ -SG) que son proteínas transmembranales tipo II que comparten grandes similitudes entre ellas, pero tienen baja similitud con β -sarcoglicano (β -SG). La proteína Sarcospan (SSPN) tiene cuatro dominios transmembranales, que estructuralmente está relacionada con la familia de proteínas tetraspan, un grupo de proteínas que actúan como facilitadores moleculares (Figura 8) (Fort et al., 2005).

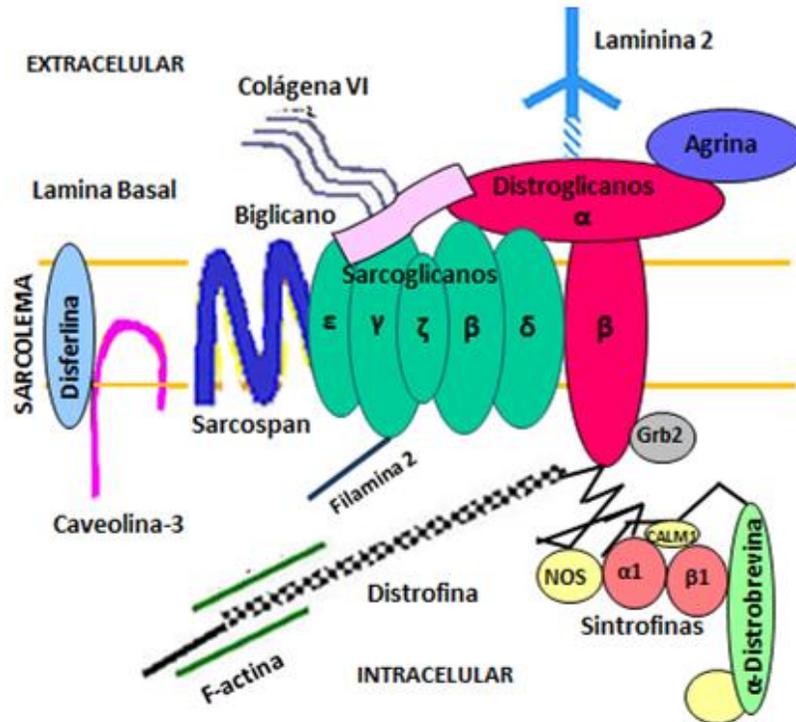


Figura 8. Complejo de Proteínas Asociadas a la Distrofina (DAPC).

Modificado de Pestronk, n.d.

2.4 Relación del gen *SGCD* con la DMAE

El gen *SGCD* se localiza en el brazo largo del cromosoma 5 (5q33.2-q33.3). Está compuesto de aproximadamente 441 kb de DNA genómico y 8 exones. Este gen codifica para la proteína delta-sarcoglicano (δ -SG) de 35 kDa compuesta por 290 aminoácidos (Coral-Vazquez et al., 1999; Tsubata et al., 2000). La función del gen *SGCD* y su proteína δ -SG está bien caracterizada en tejidos como el músculo esquelético y cardíaco. Además, se sabe que mutaciones en este gen promueven el desarrollo de la cardiomiopatía dilatada y vasoconstricciones, donde esta última contribuye a un bajo suministro de oxígeno al tejido que obliga a la formación de nuevos vasos sanguíneos como mecanismo de compensación (Coral-Vazquez et al., 1999; Howell et al., 2003; Martinez et al., 2004; Roberds et al., 1993). Estas alteraciones vasculares solo han

sido observadas cuando no es posible generar una proteína funcional debido a mutaciones en las regiones exónicas del gen *SGCD* (Coral-Vazquez et al., 1999; Tsubata et al., 2000). No obstante, estudios recientes demostraron que el SNP rs13170573 ubicado en la región 5'-UTR del gen *SGCD* está asociado con el desarrollo de angina vasoespástica en pacientes con cardiomiopatía hipertrófica en población mexicana y japonesa (Honda et al., 2007; Ordoñez-Razo et al., 2012). Estos hallazgos sugieren que las mutaciones y/o SNPs en *SGCD* contribuyen con la aparición de alteraciones vasculares, mismas que pueden presentarse durante la DMAE neovasular (Luna-Angulo, 2013). Por ejemplo, en un estudio de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) de población blanca no hispana, se encontró que dos polimorfismos de *SGCD* (rs970476 y rs931798) están relacionados con el aumento en el riesgo de desarrollar DMAE (Lin & Lee, 2010). De igual forma, en un estudio realizado con pacientes mexicanos se encontró que el genotipo G/A del polimorfismo rs931798 aumenta significativamente la probabilidad de que se le diagnostique DMAE al 81% de los casos, especialmente el fenotipo de atrofia geográfica, comparado con el genotipo homocigoto G/G. Adicionalmente, se encontró que el haplotipo GATT en *SGCD* (rs931798, rs140617, rs140616 y rs970476) está asociado con probabilidades más bajas de diagnosticar DMAE (Perez-Ortiz et al., 2018). Estos polimorfismos asociados con el riesgo de diagnosticar DMAE se encuentran en la región del intrón 2-3 del gen *SGCD* (Figura 9).

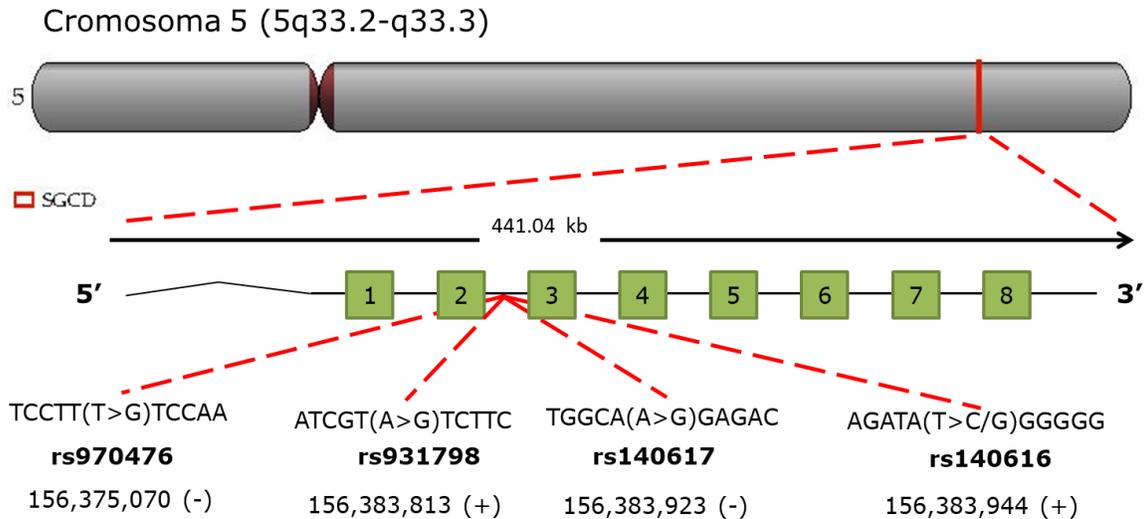


Figura 9. Ubicación de los polimorfismos asociados con el incremento en la probabilidad de desarrollar DMAE.

La ubicación del gen *SGCD* dentro del brazo largo del cromosoma 5 se encuentra indicada en el recuadro de color rojo. Debajo, se encuentra la secuencia del gen *SGCD* compuesta por ocho exones (cuadros de color verde). Las líneas punteadas representan la localización de los polimorfismos dentro de la región intrónica 2-3 del gen. La variación producida por el polimorfismo y su ubicación exacta se encuentran indicadas. Los símbolos (+) y (-) representan la dirección de 5'→3' o 3'→5' respectivamente, en el que se presenta el polimorfismo dentro del gen.

Para conocer la función de los SNPs reportados anteriormente, en un análisis bioinformático realizado por Luna-Angulo (2013), se encontró que el alelo ancestral G del SNP rs931798 genera un sitio potenciador de unión a factores de transcripción como Tal-1alfa y Tal-1beta que están asociados principalmente con la regulación positiva de la diferenciación eritroide (Hsu et al., 1994; Hwang et al., 1993). En contraste, cuando está presente la variante A de este SNP se pierde la interacción con Tal-1alfa, pero se permite la unión de los factores de transcripción de choque térmico HSF1 y HSF2. Actualmente, se desconoce si existe una relación

entre las proteínas HSF1 y HSF2, y la DMAE, sin embargo, se han encontrado altos niveles de otra proteína de choque térmico (Hsp27) en las células ganglionares, el Epitelio Pigmentario de la Retina y los fotorreceptores cuando existe un daño producido por la DMAE (Urbak & Vorum, 2010). Por lo tanto, la activación de las proteínas de choque térmico mediada por la presencia de la variante A del SNP rs931798 de *SGCD* puede ser un factor importante para el desarrollo de la DMAE.

A pesar de estos hallazgos, aún se desconoce la contribución que podrían tener el SNP rs931798 y el haplotipo asociados con un incremento en el diagnóstico de la DMAE. Esto sugiere que se debe continuar estudiando la asociación del gen *SGCD* con el curso natural de la enfermedad.

2.5 Modelos murinos para estudiar la DMAE

Se han realizado muchos estudios para establecer modelos animales que permitan el estudio de la DMAE para identificar factores de riesgo y los mecanismos moleculares involucrados en la progresión de la enfermedad. El ratón es una especie genéticamente bien caracterizada, además, los métodos para la evaluación de lesiones retinianas en ratones se encuentran bien documentadas, sin embargo, el inconveniente principal de estos modelos es que la retina del ratón no tiene mácula. No obstante, la región central de la retina del ratón posee una gran densidad de fotorreceptores similar a la periferia de la mácula humana (Dreher, Leamey, & Protti, 2008; Volland et al., 2015), por lo que resulta un buen modelo para el estudio de las enfermedades retinianas, además de que la mayoría de los genes involucrados en el desarrollo de degeneración retiniana se encuentran en el ratón (Rakoczy et al., 2006).

Actualmente, los modelos murinos de DMAE pueden ser clasificados en tres grupos. En primer lugar, se encuentran los ratones modificados

genéticamente que involucran a genes relacionados con la enfermedad. Los modelos más comunes incluyen la enfermedad de Startgard (Distrofia Macular Juvenil), la Distrofia Retinal en Panal de Doyne (DHRD, por sus siglas en inglés) y la Distrofia de Sorsby. Otros modelos murinos que se utilizan para estudiar genes relevantes para la DMAE, incluyen los genes inflamatorios como *Cfh*^{-/-}, *Ccl2*^{-/-}, *Ccr2*^{-/-}, *Cx3cr1*^{-/-}, y *Ccl2*^{-/-}/*Cx3cr1*^{-/-}, genes asociados al estrés oxidativo como *Sod1*^{-/-} y *Sod2* *knockdown* (expresión reducida), entre otros. En segundo lugar, se encuentran los ratones que han sido manipulados inmunológicamente mediante inmunización con carboxietilpirrol (CEP), un fragmento de DHA (ácido docosahexaenoico) encontrado en drusas, con el que se encontró que podían presentar características de la DMAE seca. Por último, se encuentran las cepas de ratones como *arrd2/arrd2* (mutación del gen *Mdm*) y los ratones acelerados por senescencia (SAM) que desarrollan espontáneamente características de DMAE seca como la atrofia de los fotorreceptores y el engrosamiento de la membrana de Bruch (Ramkumar, Zhang, & Chan, 2010).

2.5.1 Construcción del ratón *Sgcd-nulo*

Para poder investigar los mecanismos involucrados en la patogénesis de una cardiomiopatía asociada con mutaciones en el DAPC, se construyó por ingeniería genética el ratón *Sgcd-nulo*, que presenta una disrupción del complejo SG-SSPN que perturba la función vascular, como un indicio de cardiomiopatía y distrofia muscular exacerbada. Con el propósito de crear el ratón *Sgcd-nulo*, se insertó un vector (casete de Neomicina) para reemplazar el exón 2 del gen *Sgcd*, que codifica para 63 aminoácidos de dominios intracelulares (Figura 10A). El análisis de Southern blot de 370 colonias de origen embrionario resistentes a neomicina (ES) reveló la recombinación homóloga producida en siete colonias independientes (Figura 10B). Dos de las clonas heterocigotas fueron utilizadas para

producir ratones quiméricos fundadores. Los ratones heterocigotos de la generación F1 se cruzaron para obtener ratones *Sgcd-nulos* y se probó que su descendencia contenía la delección del exón 2 mediante un análisis de Southern blot y PCR (Figura 10C). Por otro lado, se realizó un análisis de Northern blot usando como sonda la secuencia de codificación completa del cDNA del gen *Sgcd*. Este análisis reveló un transcrito de 9 kb en el músculo esquelético de ratones silvestres (wild type, WT), heterocigotos y *Sgcd-nulos* (Figura 10D).

El análisis de RT-PCR realizado con cebadores para el exón 1 y 5, mostró un producto de PCR de 600 pb que representan la transcripción normal en ratones WT y heterocigotos; sin embargo, se encontró un producto de PCR adicional de 400 pb en los ratones heterocigotos y mutantes (datos no mostrados). La secuenciación de este producto sugirió que se produjo un empalme alternativo entre el exón 1 y 3 del gen de *Sgcd*, el cual mantendría un marco de lectura abierto del exón 3 a 8, dando lugar a una proteína de 218 aa que carece de todo el dominio transmembranal y parte del extremo N-terminal. No obstante, esta proteína no se detectó en las fibras de músculo esquelético y cardíaco en los ratones *Sgcd-nulos* mediante ensayos de Western blot con anticuerpos dirigidos contra la porción C-terminal o N-terminal de delta-sarcoglicano (Figura 10E) (Coral-Vazquez et al., 1999).

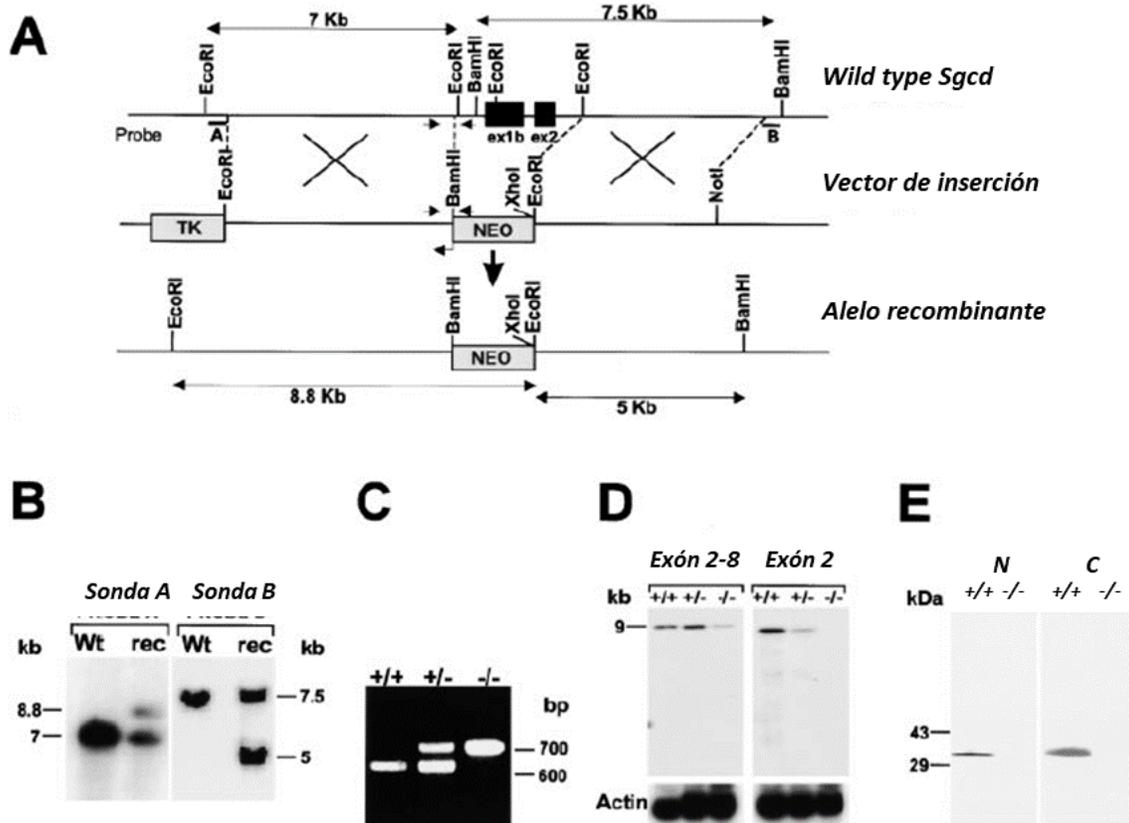


Figura 10. Disrupción dirigida del gen *Sgcd* del ratón.

(A) Mapa de restricción de la región 59 del gen *Sgcd*, el cual muestra el alelo silvestre (*wild type*, *WT*) en la parte superior, el vector de inserción (en el centro) y el alelo generado por recombinación homóloga en la parte inferior (alelo recombinante). Se indica la posición de los casetes NEO y TK, las sondas A y B para los análisis de Southern blot, y los cebadores utilizados para la genotipificación por PCR (→).

(B) Ensayo de Southern blot del DNA de las colonias ES que sobrevivieron a la doble selección restringida a EcoRI o BamHI/ XhoI, utilizando las sondas A y B respectivamente. La sustitución del exón 2 por el casete NEO produce un nuevo fragmento de 8,8 kb que se hibridó con la sonda A, además del fragmento del WT de 7 kb. Como consecuencia del sitio XhoI introducido por el casete NEO, la sonda B se hibrida con un fragmento de 5 kb y el alelo WT de 7,5 kb.

(C) Análisis de PCR de DNA extraído de cola de ratón silvestre (WT, +/+), heterocigoto (+/-) y *Sgcd-nulo* (-/-). Los alelos del WT y el *Sgcd-nulo* produjeron amplicones de 600 y 700 pb respectivamente.

(D) Análisis de Northern blot del RNA extraído del músculo de ratones WT (+/+), heterocigotos (+/-) y *Sgcd-nulo* (-/-). Se utilizó una sonda de cDNA para la secuencia completa de codificación del gen *Sgcd* que detectó un transcrito de 9 kb en los ratones de los tres genotipos. Por el contrario, la hibridación con una sonda correspondiente al exón 2 mostró un transcrito de 9 Kb solo en ratones WT (+/+) y heterocigotos (+/-).

(E) El ensayo de Western blot de preparaciones enriquecidas del músculo esquelético, utilizando un anticuerpo policlonal purificado por cromatografía de afinidad contra el péptido N-terminal (N) y C-terminal (C) de delta-sarcoglicano, revela la expresión de la proteína en el ratón WT (+/+) pero no en el *Sgcd-nulo* (-/-). Modificado de Coral-Vazquez et al., 1999.

2.6 Procesamiento digital de imágenes

En los últimos años, el uso creciente de sistemas de imagen digital para el diagnóstico médico se hace cada vez más importante en el cuidado de la salud. Una imagen puede ser definida como una función bidimensional, $f(x, y)$, donde x e y son coordenadas espaciales, y el valor de amplitud de f en cualquier par de coordenadas (x, y) , se conoce como intensidad o el nivel de grises de la imagen en ese punto. Cuando los valores de x , y y f son finitos y en cantidades discretas, se puede denominar a una imagen como una imagen digital. El área del procesamiento digital de imágenes, hace referencia al procesamiento de imágenes digitales por medio de una computadora. Cada imagen digital está compuesta por números finitos de elementos, donde cada uno tiene una localización y valor específico. Estos elementos se conocen como pixeles. Los pixeles (acrónimo que se forma a partir de las palabras "imagen" y "elemento"), son a los que se asignan valores de brillo o color discretos (Deserno, 2011; Gonzalez, Woods, & Hall, 2002).

2.6.1 Etapas del procesamiento digital de imágenes

El procesamiento digital de imágenes biomédicas abarca cuatro etapas principales (Figura 11):

1. La formación de imágenes incluye todos los pasos desde la captura de la imagen hasta la construcción de una matriz de la imagen digital.
2. La visualización de la imagen se refiere a todos los tipos de manipulación de esta matriz, resultando en una salida optimizada de la imagen.
3. El análisis de imágenes incluye todos los pasos de procesamiento que se utilizan para las medidas cuantitativas, así como para interpretaciones abstractas de imágenes biomédicas. Estos pasos, en ocasiones requieren un conocimiento a priori sobre la naturaleza y el contenido de las imágenes, que deben integrarse en los algoritmos de procesamiento. Por lo tanto, el proceso de análisis es muy específico.
4. El manejo de las imágenes resume todas las técnicas que proporcionan el almacenamiento eficiente, la comunicación, la transmisión, el archivo y el acceso (recuperación) de los datos de una imagen.

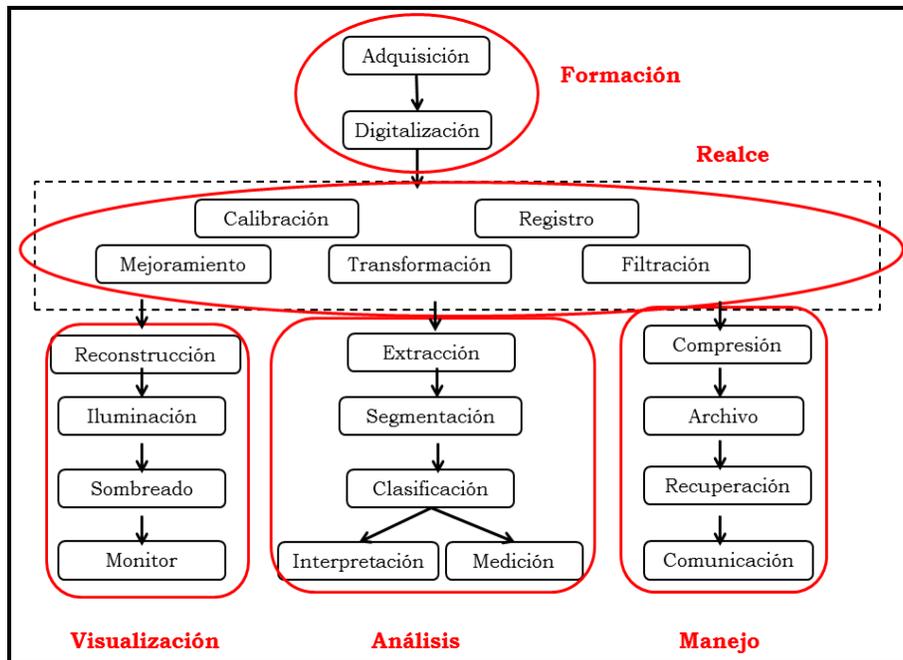


Figura 11. Etapas del procesamiento digital de imágenes.

De manera general, el procesamiento digital consta de cuatro áreas: formación de la imagen, visualización, análisis y manejo. Los algoritmos de realce de imágenes pueden ser asignados pre- y post-procesamiento en todas las áreas Modificado de Deserno, 2011.

En contraste con el análisis de imágenes, que también se denomina procesamiento de imagen de alto nivel, el procesamiento de bajo nivel denota técnicas manuales o automáticas, que pueden realizarse sin un conocimiento previo sobre el contenido específico de las imágenes. Este tipo de algoritmos tienen efectos similares independientemente del contenido de las imágenes. Por ejemplo, la redistribución del histograma de una radiografía para mejorar el contraste, como se hace con cualquier fotografía. Por lo tanto, los métodos de procesamiento de bajo nivel suelen estar disponibles en programas diseñados para el mejoramiento de imágenes (Deserno, 2011).

2.6.2 Propiedades de las imágenes a color

Existen cuatro atributos principales que caracterizan la luz: intensidad, luminosidad, luminancia y brillo. En el caso de la luz acromática, la intensidad es el único atributo implicado. Este es el caso donde se utiliza la escala de grises: la intensidad varía de negro a blanco (niveles de gris en el centro). Por otro lado, en el caso de la luz cromática, los otros tres atributos se utilizan para medir la calidad de la fuente de luz. La luminosidad se refiere a la cantidad de energía emitida por la fuente de luz, y se mide en vatios (W). La luminancia mide la cantidad de luminosidad percibida por un observador, y se mide en lúmenes (lm). El brillo se asocia a la intensidad de la luz que, a pesar de tener una interpretación precisa en las imágenes monocromáticas, es una propiedad subjetiva en el caso de las imágenes cromáticas. Debido a las características de absorción del ojo humano, se considera que los colores se forman a partir de diferentes combinaciones de los colores primarios: rojo, verde y azul. Estos tres colores se pueden agregar para crear los secundarios: magenta (rojo + azul), cian (verde + azul) y amarillo (verde + rojo). El color blanco se puede formar si se mezclan los tres colores primarios o si se mezcla un color secundario con su color primario opuesto (todos en las intensidades correctas) (Frery & Perciano, 2013).

Basados en estos conceptos, se establecieron múltiples modelos para medir cuantitativamente el color. Los modelos de color RGB y HSI son los modelos de color simples que se utilizan ampliamente en la detección y seguimiento del color (Ong & Punzalan, 2014). El modelo RGB (Rojo, Verde y Azul) es utilizado para representar los colores obtenidos a través de dispositivos electrónicos como la televisión, la computadora y cámaras digitales. En este modelo, los tres colores son combinados en diferentes cantidades o proporciones para producir otros colores (Frery & Perciano,

2013). En el modelo de color HSI los colores se distinguen unos de otros por su tono, saturación e intensidad (Báez Rojas & Alonso Pérez, 2008):

1. El tono está asociado con la longitud de onda dominante en una mezcla de ondas luminosas y como se percibe. Cuando se dice que un objeto es rojo, verde o café se está indicando su tono.
2. La saturación se refiere a la cantidad de luz blanca mezclada con el color dominante. Es un atributo que puede diferenciar un color intenso de uno pálido. Cada uno de los colores primarios tienen su mayor valor de saturación antes de ser mezclados con otros. Así, el azul cielo es muy claro (menos saturado), mientras que el azul marino es más opaco (más saturado).
3. La intensidad representa la iluminación percibida. Da la sensación de que algún objeto refleja más o menos luz. Este atributo se puede observar claramente en un televisor en blanco y negro.

El proceso de selección de la mejor representación de color implica saber cómo se generan las señales de color y que información se necesita de estas señales. En particular, los modelos de color pueden usarse para definir colores, discriminar y juzgar la similitud entre ellos (Nayyer, Sharma, & Sharma, 2015).

2.6.3 Métodos de mejoramiento de imágenes

Los métodos de procesamiento de una imagen mejoran su calidad. Estas técnicas son útiles cuando las imágenes son examinadas en una pantalla, en donde el color proporciona información inadecuada para la interpretación de la imagen (Kumar, n.d.). Existe una amplia variedad de técnicas para mejorar la calidad de una imagen, que implican el uso de operaciones para transformar una imagen de entrada en una imagen de

salida. Estas operaciones pueden ser clasificadas en tres categorías (Figura 12) (Young, Gerbrands, & Vliet, 2007):

1. Puntuales: El valor de salida en un punto (x, y) depende solo del valor de entrada en esa misma coordenada.
2. Locales: El valor de salida en un punto (x, y) depende de los valores de entrada en la vecindad de esa misma coordenada.
3. Global: El valor de salida en un punto (x, y) depende de todos los valores de la imagen de entrada.

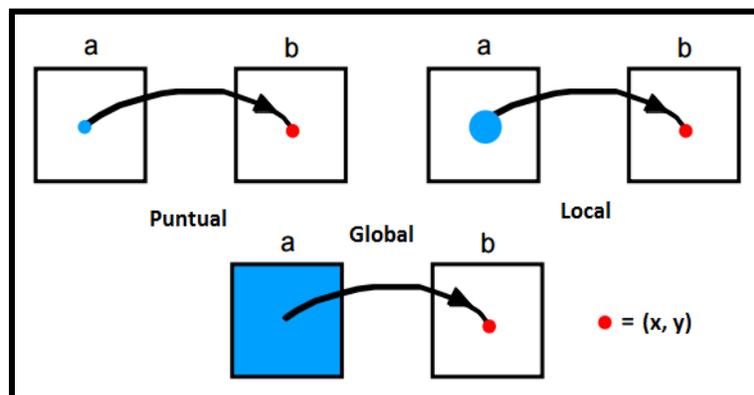


Figura 12. Operaciones realizadas para el mejoramiento de una imagen.

Imagen de entrada (a) utilizada para obtener una imagen de salida (b).
Modificada de Young et al., 2007.

Las operaciones puntuales comúnmente utilizadas son:

1. La identidad: Es la función más básica y genera una imagen de salida que es una copia de la imagen de entrada.
2. El negativo: Esta función crea una nueva imagen que es la inversa de la imagen de entrada. Esta función es útil con imágenes que se generan por absorción de radiación, como en el caso del procesamiento de imágenes médicas.

3. La función de umbral: Esta función genera una imagen binaria de salida de una imagen de entrada de escala de grises.

Las operaciones grupales se conforman de las operaciones locales y globales, en donde, para definir que valores se van a utilizar para realizar las diferentes transformaciones, se utilizan diferentes "máscaras" o filtros. Se pueden presentar dos tipos de filtros: el filtro de paso alto y el filtro de paso bajo, que dejan pasar frecuencias altas o bajas, respectivamente. En el caso de las imágenes, las altas frecuencias están asociadas a cambios abruptos en la intensidad de los píxeles vecinos y, las bajas frecuencias están asociadas a pequeños cambios en la intensidad de los píxeles. Estos filtros suelen utilizarse cuando se requiere hacer la segmentación de una imagen, detectar bordes, entre otros (Posada-Gómez, 2001).

3. JUSTIFICACIÓN

La Degeneración Macular Asociada con la Edad (DMAE) es una de las principales causas de ceguera irreversible en todo el mundo. En México se desconoce la prevalencia de la enfermedad, sin embargo, se sabe que un 9.7% de los Latinos puede presentar DME temprana y un 0.5% DMAE tardía (Varma et al., 2004). A pesar de ser una causa frecuente de discapacidad visual, existen diferencias regionales en la incidencia y prevalencia que sugieren que los factores genéticos y ambientales podrían influir en el riesgo de desarrollar DMAE (Wong et al., 2014). Algunos de los factores genéticos más estudiados son mutaciones y polimorfismos de genes asociados con la modulación del sistema inmune y el sistema del complemento, aunque aún se desconoce su nivel de asociación y el fondo genético y proteico involucrado en la enfermedad (Mousavi & Armstrong, 2013). Además, es importante mencionar que en la actualidad no existe un tratamiento efectivo para los pacientes con DMAE del tipo atrofia geográfica (Bylisma & Guymer, 2005). En un estudio de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés) de una población blanca no hispana, se encontraron un total de siete SNPs (polimorfismos de nucleótido único) entre los genes *CFH*, *CFHR4* y *SGCD* asociados con un aumento en la probabilidad de desarrollar DMAE (Lin & Lee, 2010). De igual forma, se demostró que un polimorfismo del gen *SGCD* que codifica para la proteína delta-sarcoglicano (miembro del Complejo de Proteínas Asociado con la Distrofina, DAPC), incrementa las probabilidades de desarrollar DMAE, especialmente el fenotipo de atrofia geográfica en pacientes mexicanos (Perez-Ortiz et al., 2018).

La importancia de estudiar a los miembros del DAPC se debe a su asociación con una gran cantidad de fenotipos de distrofia muscular (Campbell, 1995). En algunos de los pacientes afectados por la distrofia muscular de Duchenne (deficiencia de distrofina), Becker (fenotipo leve)

o Distrofia muscular de cintura y extremidades tipo 2D (LGMD2, deficiencia de los sarcoglicanos), existen informes sobre deficiencias visuales y alteraciones de la función de la retina (medida por electroretinografía, ERG). Parte de esos efectos pueden deberse a un papel crítico del DAPC en el mantenimiento de la homeostasis y función de la retina, que hasta ahora es desconocido (Barboni et al., 2013; Costa et al., 2007). Lo que se sabe hasta ahora, es que la expresión de los componentes del complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) en la retina murina es parcialmente independiente de la distrofina, específicamente de las subunidades β -, γ -, δ -, ϵ -sarcoglicano y sarcospan que se encuentran a lo largo de la Membrana Limitante Externa e Interna, probablemente en las células de Müller y en los axones de las células ganglionares (Fort et al., 2005). También, se ha descrito la importancia del DAPC en la homeostasis de la retina, ya que las proteínas β - y δ -SG, β -dístroglicano, α 1-sintrofina y distrofina 71 (DP71) participan en la formación de la barrera sanguínea y su ausencia conduce a edema retiniano (Claudepierre et al., 2000).

De acuerdo con estos hallazgos, el objetivo de este proyecto fue caracterizar los cambios en la estructura y función de la retina, así como la expresión de las proteínas del complejo SG en los ratones deficientes de δ -SG (*Sgcd-nulo*, KO). Este modelo murino se seleccionó debido a que, existe evidencia de que las mutaciones y/o polimorfismos del gen *SGCD* pueden tener un papel fundamental en el desarrollo de DMAE. Por lo que, el ratón *Sgcd-nulo* podría ser considerado como un modelo potencial para entender los mecanismos involucrados en el desarrollo de la DMAE.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Caracterizar el efecto de la delección del gen *Sgcd* sobre la estructura y función de la retina del ratón C57Bl-6J.

4.2 Hipótesis

La delección del gen *Sgcd* provocará cambios en la estructura y función de la retina del ratón *Sgcd-nulo* comparado con el C57Bl-6J.

4.3 Objetivos particulares

1. Cuantificar el número de soluciones de continuidad de la retina de los grupos KO (knock out, *Sgcd-nulo*) y WT (wild type, C57Bl-6J).
2. Medir el grosor de la retina completa y sus capas de los grupos KO y WT.
3. Estimar la densidad de núcleos en la Capa Nuclear Externa e Interna de la retina de los grupos KO y WT.
4. Evaluar por inmunolocalización indirecta la presencia de las subunidades del complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) en las capas de la retina de los grupos KO y WT.
5. Cuantificar los niveles de expresión de las subunidades del complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) por western blot (WB) en la retina de los grupos KO y WT.
6. Estimar la amplitud y el tiempo de latencia de la onda A, B y PhNR a diferentes intensidades del ERG los grupos KO y WT.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1 Diseño del estudio

Se realizó un estudio animal de casos y controles, con un total de 49 ratones C57BL/6J, de los cuales 23 fueron WT (*wild type*) y 26 KO (*knock out, Sgcd-nulo*) de 8 a 10 semanas de edad. De cada grupo de ratones, 8 de ellos se utilizaron para realizar los ensayos de caracterización estructural e inmunolocalización (solo 3 de cada grupo). Además, se usaron 9 para ensayos de western blot (12 para los KO) y 6 para la evaluación de la agudeza visual, utilizando en cada uno proporciones iguales de machos y hembras. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (No. CICUAL-04/15-08-2014) de la Escuela de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, y se realizaron de acuerdo con los requerimientos establecidos por la Declaración de ARVO (*Association for Research in Vision and Ophthalmology*) para el Uso de Animales en la Investigación Oftálmica y de la Visión.

5.2 Genotipificación de ratones

5.2.1 Extracción de DNA de cola de ratón

En la actualidad, existen diferentes metodologías relacionadas con el aislamiento de DNA genómico (Tan & Yiap, 2009). El método tradicional consiste en el uso de una solución fenol/cloroformo, sin embargo, este protocolo presenta las desventajas de ser tóxico, necesita una proteasa para llevar a cabo la digestión celular y requiere mucho tiempo debido a sus múltiples etapas. Por lo que, este método resulta inconveniente cuando se genotipifica un gran número de muestras, por ejemplo, durante la caracterización de ratones transgénicos (Z. Wang & Storm, 2006). Por lo tanto, para simplificar la genotipificación de ratones, se modificó el

protocolo descrito por Zangala (Zangala, 2007). Después de la sexta o séptima semana de nacimiento de los ratones, se cortó aproximadamente 3 mm de la punta de la cola de cada ratón y se colocó en tubos de 1.5 mL, los cuales se mantuvieron a 4°C durante el procedimiento. Posteriormente, se realizaron tres lavados con 1 mL de PBS 1X para eliminar algunos contaminantes como partículas pequeñas de comida, aserrín, excremento, entre otros, que pudieran encontrarse dentro del pelaje de cada ratón. Enseguida, se agregaron 90 µL de NaCl 5 mM para empezar a deshidratar las células y con ayuda de un vástago de aluminio, se procedió a macerar el tejido para destruir las fibras de colágeno y liberar los cuerpos celulares. Una vez que se observó que el tejido se encontraba libre del pelaje y completamente destruido, se colocó en hielo y se repitió el mismo procedimiento con las siguientes muestras.

Cuando todas las muestras se trituraron, se agregaron 37.5 µL de SDS al 10% y se mezcló con vórtex a velocidad media durante 30 s aproximadamente, para degradar las membranas celulares (Z. Wang & Storm, 2006). Luego, se colocaron 307.5 µL de NaCl saturado para continuar con el proceso de deshidratación celular y de igual forma, se mezcló con vórtex a velocidad media durante 30 s y se incubó durante 5 min a temperatura ambiente. Después, se centrifugó 10 min a 16, 873 xg a 4°C para eliminar los restos celulares. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo de 1.5 mL frío y se añadió 1 mL de etanol absoluto frío (este reactivo se colocó antes de iniciar el protocolo a -20°C). Inmediatamente, se observó la formación de un precipitado de color blanco compuesto por SDS, NaCl y DNA (Murphy, 1993). Pasado un tiempo de incubación de 5 min a temperatura ambiente, los tubos se centrifugaron 1 min a 16, 873 xg a 4°C para asegurar que todo el sedimento formado se encontrara en la parte baja del tubo. A continuación, se descartó el sobrenadante y el sedimento se lavó con 1

mL de etanol al 70% para eliminar los residuos de las sales (Chen, Rangasamy, Tan, Wang, & Siegfried, 2010). Nuevamente se centrifugó por 10 min a 16, 873 xg a 4°C y al finalizar, se observó una banda ligeramente translúcida que pertenecía al DNA. Se desechó el sobrenadante y se dejaron secar los tubos al aire, para finalmente resuspender el DNA en 20 µL de agua libre de nucleasas.

5.2.2 Cuantificación de DNA

La determinación de la cantidad de DNA se realizó siguiendo el método de espectrofotometría UV-Visible, el cual consiste en medir el valor de absorbancia de las muestras a 260 nm, ya que se ha descrito en la literatura que un valor de absorbancia de 1 a 260 nm, equivale a una concentración de 50 ng/µL para DNA de doble cadena (dsDNA) y de 40 ng/µL para DNA de cadena sencilla (ssDNA) y RNA (Nielsen et al., 2008). Igualmente, se determinó la pureza del DNA mediante la relación 260/280 y 260/320, puesto que ambas relaciones indican la presencia de algunos contaminantes (Olson & Morrow, 2012).

Considerando lo anterior, se diseñó un protocolo de cuantificación de DNA dentro del software Multiskan™ GO, en donde se estableció que el espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO midiera las absorbancias a 260, 280 y 320 nm. Además, se programó para que, al término de las lecturas de absorbancia, se obtuviera de manera automática el cálculo de la concentración y pureza del DNA de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

$$\text{Concentración DNA ng/}\mu\text{L} = (A_{260} - A_{320}) * 50 \text{ ng/}\mu\text{L} * \left(\frac{10 \text{ mm}}{0.5 \text{ mm}}\right)$$

$$\text{Pureza DNA} = \frac{(A_{260} - A_{320})}{(A_{280} - A_{320})}$$

La cuantificación de DNA se realizó utilizando una microplaca (Placa μ Drop™). Se colocaron 2 μ L por duplicado del blanco y la muestra sobre la microplaca y se midieron los valores de absorbancia. A continuación, se determinó la media de las concentraciones y la relación 260/280. Se utilizaron sólo las muestras que tuvieron como mínimo 150 ng/ μ L de DNA y una relación 260/280 entre 1.8 y 2.0, debido a que los valores fuera del intervalo mencionado, indican la presencia de contaminantes que pueden interferir con la eficiencia de la reacción de PCR (Olson & Morrow, 2012). Finalmente, se realizó una dilución de las muestras para ajustar la concentración a 150 ng/ μ L, en un volumen final de 10 μ L de agua inyectable.

5.2.3 Integridad del DNA

La electroforesis en gel de agarosa es un método de rutina utilizado para separar proteínas, DNA o RNA. Los ácidos nucleicos se separan de acuerdo a su tamaño con la ayuda de un campo eléctrico, en el que las moléculas cargadas negativamente (DNA, RNA y algunas proteínas), migran hacia el polo del ánodo (cargado positivamente). El flujo migratorio está determinado únicamente por el peso molecular; es decir, las moléculas de bajo peso migran más rápido que las que poseen un elevado peso molecular (Yilmaz, Ozic, & Gok, 2012). El fundamento de esta técnica se utilizó para evaluar la integridad del DNA extraído. El protocolo utilizado es el propuesto por Lee et al., (2012); sin embargo, se incluyen algunas modificaciones realizadas durante su aplicación.

Los geles de agarosa (ThermoFisher Scientific, #R0491) se prepararon a una concentración de 1% (m/v) con el amortiguador de corrida TAE 1X¹

¹ El amortiguador de corrida TAE 1X se utiliza porque el Tris-acetato en forma de iones transporta la corriente eléctrica, amortigua el pH y mantiene un medio de baja conductividad. El EDTA se añade como agente quelante de los iones Mg²⁺ para inactivar

(40Mm Tris-acetato, 1 mM EDTA pH = 8), debido a que el DNA extraído es el genómico (>1,000 pb) (Yilmaz et al., 2012). Se cargaron en los pozos 3 μ L de muestra de DNA (150 ng/ μ L) mezclado con 2 μ L del colorante de carga 6X (0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol). Inmediatamente, se cerró la cámara y se ajustaron las condiciones a 80 V, 400 mA y 30 min. Concluido el tiempo de corrida, el gel se retiró de la cámara y se colocó en una solución de bromuro de etidio (0.5 μ g/mL) durante 5 min. Por último, se reveló el gel bajo luz UV en el transiluminador [UVP Ultraviolet Transiluminator]. La integridad del DNA se definió como la presencia de bandas definidas y una baja detección de un barrido de DNA como resultado de la degradación del mismo durante el proceso de extracción (Figura 13).

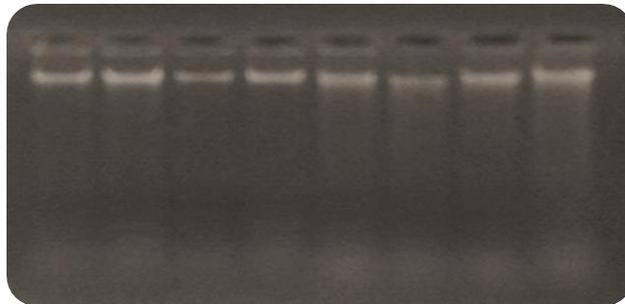


Figura 13. Análisis de la integridad del DNA mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Ejemplo de la integridad de algunas muestras de DNA extraídas de cola de ratón.

5.2.4 PCR punto final

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) es una reacción enzimática descubierta por el Dr. Kary Mullis, que consiste en la amplificación de fragmentos específicos de DNA. Cada ensayo de PCR requiere de un DNA molde, cebadores, nucleótidos (Adenina, Timina,

las nucleasas que pudieran estar presentes (Sanderson, Araki, Lilley, Guerrero, & Lewis, 2015).

Citosina y Guanina) y la enzima DNA polimerasa. Los cebadores, que son fragmentos cortos de DNA con una secuencia complementaria al DNA molde, sirven como un punto de referencia para que la DNA polimerasa inicie la reacción. La reacción de PCR inicia con la desnaturalización del DNA molde en cadenas sencillas, para permitir el alineamiento de los cebadores y finalmente, realizar la extensión o síntesis de las cadenas de DNA. Estos pasos se repiten entre 25 y 40 ciclos (Garibyan & Avashia, 2013).

5.2.4.1 Cebadores utilizados para la genotipificación de ratones

Los cebadores utilizados para llevar a cabo la reacción de PCR fueron diferentes a los utilizados por Coral-Vazquez et al., 1999 (Figura 9), por lo que de acuerdo con su diseño (Tabla 1), la temperatura de alineamiento utilizada fue de 67°C y el tamaño de los amplicones fue de 752 pb para los ratones WT (C57Bl-6J), 1,014 pb para los ratones KO (*Sgcd-nulo*), mientras que el genotipo HT (heterocigoto) presentó los dos amplicones (Figura 14).

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados para llevar a cabo la genotipificación de ratones.

Primer	Secuencia
FW	5' GCT TTC CCT GCT CCT GGT TCA TTT 3'
RW	5' TTC CCA CTT CTT GAC CCT GTC GTT 3'
NEO	5' ACC TTG CTC CTG CCG AGA AAG TAT 3'

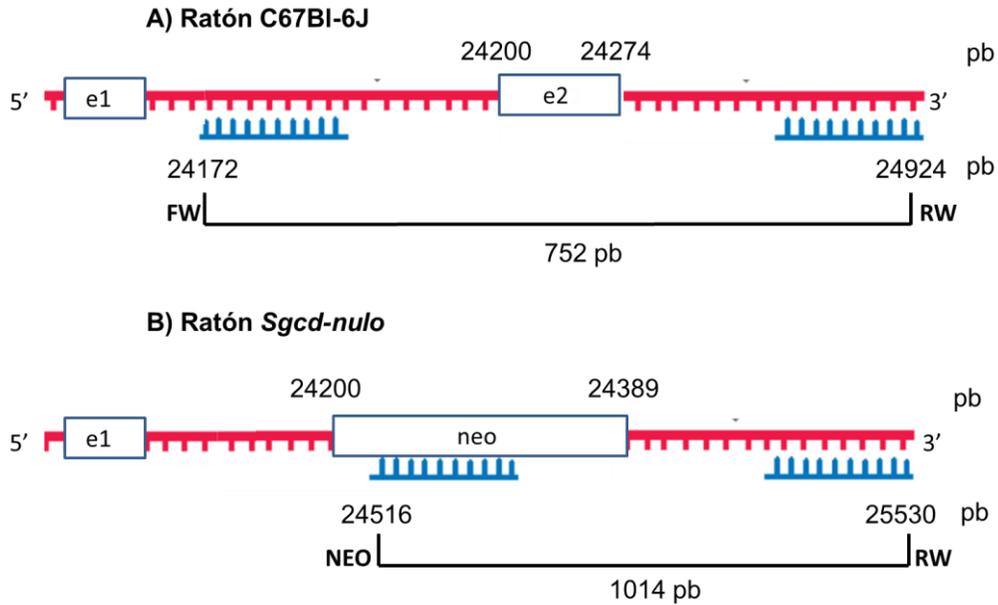


Figura 14. Esquema representativo de la unión de los cebadores a la secuencia del gen *Sgcd*.

Unión de los cebadores a la secuencia del gen *Sgcd* del ratón C57Bl/6J (WT, A) y *Sgcd-nulo* (KO, B). Los números representan la posición en pares de bases (pb) del gen en donde se unen los cebadores (FW, RW, NEO), así como la ubicación del exón 2 (e2) del gen en el ratón WT y su reemplazo por el casete de neomicina (neo) en el ratón KO. Exón 1 (e1). La secuencia de los cebadores utilizados se encuentra en la tabla 1.

5.2.4.1 Condiciones y reactivos para la PCR

La PCR se llevó a cabo con la enzima DreamTaq DNA Polymerase (ThermoFisher Scientific, #EP0702 500]. Enseguida se presenta la cantidad de cada uno de los reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción en un volumen final de 12 μ L (Tabla 2).

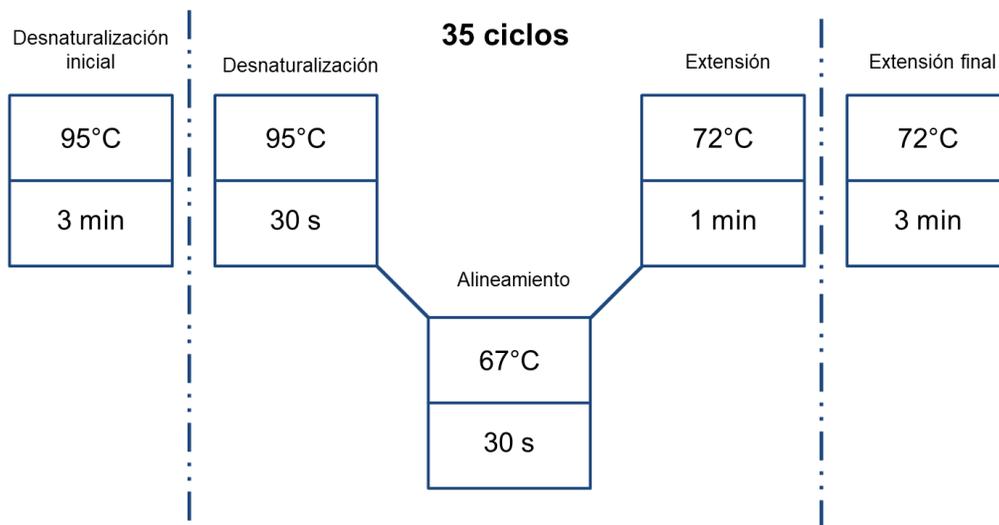
Tabla 2. Cantidad de reactivo ajustada para llevar a cabo la PCR en un volumen final de 12 μ L.

Reactivo	Concentración inicial	Volumen (μL) para 1 reacción	Concentración final
DreamTaq buffer	10 X	1.2	1 X
dNTPs Mix	2 mM (cada uno)	1.2	0.2 mM (cada uno)
FW	1 X	1.0	0.08 X
RW	1 X	1.0	0.08 X
NEO	1 X	1.0	0.08 X
DNA	150 ng/ μ L	1.0	15 ng/ μ L
DreamTaq	5 U/ μ L	0.1	0.5 U/ μ L
Agua libre de nucleasas	-	5.5	-
Volumen final	-	12	-

DreamTaq buffer (Amortiguador); dNTPs Mix (dinucleótidos trifosfatados); FW (cebador que reconoce al DNA molde en dirección 5' a 3'); RW (cebador que reconoce al DNA molde en dirección 3' a 5'); NEO (cebador que reconoce la inserción del casete de neomicina en el genoma del ratón *Sgcd-nulo*); DreamTaq (DNA polimerasa).

Los dNTPs Mix 2 mM se prepararon usando una dilución 1:50 de los dNTP Set (ThermoFisher Scientific, #R0181 4 x 25 μ mol) con agua libre de nucleasas. Los cebadores se mandaron a sintetizar a Invitrogen™ y se realizó una dilución 1:10 de cada uno para obtener la concentración final 1X.

Las condiciones utilizadas para llevar a cabo la reacción en el termociclador (Gradient Palm-Cycler™, Biocompare) son las siguientes:



El análisis de los productos de PCR se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (ThermoFisher Scientific, #R0491) al 2% (m/v), siguiendo lo descrito anteriormente, usando como referencia un marcador de peso molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, ThermoFisher Scientific, #SM0242) (Figura 15).



Figura 15. Análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Análisis de la amplificación de los productos de PCR obtenidos para la genotipificación de ratones: WT (752 pb), KO (1,014 pb) y HT (752 y 1,014 pb); Control de reacción (CR, componentes de la master mix sin DNA).

Los siguientes ensayos se realizaron cuando los ratones cumplieron de 8 a 10 semanas de edad y sólo se utilizaron los ratones con genotipo WT

[wild type, *Sgcd* (+/+)] y KO [knock out, *Sgcd-nulo*, *Sgcd* (-/-)]. Los ratones con genotipo heterocigoto (HT) se utilizaron para reproducción.

5.3 Caracterización estructural

La caracterización estructural de la retina se realizó mediante la tinción de hematoxilina y eosina. Esta tinción consiste en utilizar un colorante básico como la hematoxilina, que forma un complejo con los ácidos nucleicos y permite observar los núcleos celulares de color azul-púrpura. Por otro lado, la eosina es un colorante ácido que se une a las proteínas del citoplasma y la matriz extracelular, otorgándoles un color rosado. Esta técnica es utilizada para el reconocimiento de los diferentes tipos de tejidos y los cambios morfológicos de los mismos (Fischer et al., 2017).

5.3.1 Enucleación de ojos

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical, siguiendo los criterios establecidos en el punto número 9 de la NOM-062-ZOO-1999 (Ochoa, 1999). Enseguida, se realizó la enucleación del globo ocular con ayuda de unas pinzas para protruir el ojo y con unas tijeras curvas se recortó el nervio óptico (Wilding et al., 2015). El par de ojos de cada ratón se recuperó en un tubo de 1.5 mL con 300 µL de PBS 1X.

5.3.2 Inclusión en parafina

Los ojos enucleados se fijaron con paraformaldehído al 4% (J.T. Baker, #S898-07) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los tejidos se colocaron dentro de un molde de plástico (ThermoFisher Scientific, #1000957) y se deshidrataron con la siguiente serie de alcoholes: 96, 96, 96, 100, 100, 100 % por 1 h cada uno. El aclaramiento se realizó con tres series de xilol (Xileno J.T. Baker, #9490-02) durante 1 h a temperatura ambiente, utilizando el Procesador de Tejidos (Autotechnicon, The

Technicon #2A). Después, los tejidos se colocaron en parafina (SIGMA, #P3558-1KG) por 1 h a 50°C y se cambiaron a parafina nueva por 1 h a 50°C.

Los bloques de parafina se construyeron utilizando el Tissue Embedding Center (Tissue-Tek it). Cada ojo se colocó en un molde de plástico (Leica Biosystems #3803065) y se rellenó con parafina a 50°C. Se realizaron cortes transversales de 2.5 µm en el micrótopo (Microm HM #325) y se colocaron cuatro cortes por laminilla. En total se obtuvieron 12 laminillas por grupo, correspondientes a 3 ratones en cada grupo.

5.3.3 Desparafinización de tejidos

Las laminillas se desparafinaron colocándolas en el horno a 100°C durante 30 min y se pasaron a xilol por 20 min. Se hidrató el tejido siguiendo la siguiente serie de concentraciones de alcohol: xilol absoluto (1:1 xilol-etanol 100%), 100, 96 y 70% por 3 min en cada uno.

5.3.4 Tinción de hematoxilina-eosina

La tinción de núcleos se realizó colocando las laminillas desparafinadas en hematoxilina de Mayer (Alumbre de amonio al 5%, hematoxilina al 0.1%, yodato de sodio al 0.02%, ácido cítrico al 0.1%, hidrato de cloral al 5%) durante 5 min. Después se realizó un lavado con agua de la llave hasta retirar el exceso del colorante, se colocaron en agua bidestilada de entrada por salida y se sumergieron en agua amoniacal (hidróxido de amonio al 30%) hasta virar la hematoxilina y se pasaron al alcohol ácido (etanol 70%, HCl al 1 %) durante 2 min. Se realizó un lavado con agua bidestilada durante 2 min y se colocaron en alcohol al 70% de entrada por salida. Enseguida, se realizó la tinción de citoplasma con eosina Y (Eosina Y hidrosoluble 1%) durante 30 s y se deshidrató el tejido con la siguiente serie de alcoholes: 70, 96, 100% y xilol absoluto por 3 min en

cada uno. Posteriormente, se colocaron en xilol por 3 min, y al sacar las laminillas se agregó a cada una solución de montaje (Leica Biosystems #3801740) y se cubrieron los tejidos con cubreobjetos de 24 x 50 mm. Se tomaron las fotos de cada corte en el microscopio Axioplan 2 (Zeiss) en campo claro con el objetivo 5X para las fotos de ojo completo, 10X para realizar la medición del grosor de la retina y a 40X para la determinación de la densidad de núcleos. Las imágenes se analizaron con MatLab R2013b en las instalaciones de la Escuela de Ingeniería de la Universidad Panamericana, bajo la supervisión y asesoramiento del Dr. Jorge Eduardo Brieva Rico y el Dr. Ernesto Moya Albor.

5.3.4.1 Análisis de la fragilidad estructural de la retina

Se desarrolló un algoritmo de procesamiento de imágenes para obtener una estimación cuantificable de la fragilidad de las capas de la retina, en donde se utilizaron 16 imágenes por grupo que se tomaron a un aumento de 5X. En primer lugar, se visualizó la imagen a analizar (Figura 16A) y se realizó la selección del área de interés (ROI) mediante una interfaz gráfica que permite al usuario delimitar manualmente el área que contiene las capas de la retina (Figura 16B). Una vez que se definió el ROI, la imagen RGB original se transformó al modelo HSV para identificar las rupturas. El modelo HSV permite extraer las variables perceptivas del tono (H), saturación (S) y valor (V). Específicamente, el componente de tono representa al color (rojo, amarillo, púrpura, etc.), la saturación mide la desviación de un tono acromático (es decir, blanco), y el valor indica la desviación de un tono de color negro (energía cero) (Smith, 1978).

Se utilizó la componente de valor del modelo HSV para estimar una curva que codificara la forma y dirección de las capas retinianas. Primero, se obtuvo una máscara binaria para cada ROI al asignar un valor lógico "1" a los píxeles dentro del ROI y un valor lógico "0" a los píxeles fuera del

ROI. Esta máscara binaria se suavizó aplicando los siguientes operadores y filtros morfológicos (Gonzalez et al., 2002):

- Operador de suavizado: Reduce la máscara a una línea.
- Operador de estímulo: Elimina píxeles que quedaron fuera de la línea.
- Filtro de Roberts: Realiza una detección y definición de los bordes de la línea.
- Operador cerrado: Realiza un cierre binario; es decir, complementa los espacios vacíos que pudieron quedar después de la aplicación del operador de estímulo, mediante la asignación de un valor lógico "1".
- Obtención de las coordenadas de la curva resultante.

El resultado de la aplicación de los operadores morfológicos es una curva, la cual es una estimación de las coordenadas de una línea central que sigue la dirección de las capas de la retina (Figura 16C). Luego, para localizar y contar el número de rupturas, se utilizaron las coordenadas de la curva para realizar un escaneo de píxeles mediante un desplazamiento cada cinco píxeles. Por lo tanto, para un píxel y otro separado cinco posiciones adelante, se definieron dos matrices de 3x3 píxeles. En cada matriz, se calculó la media de intensidad y posteriormente se obtuvo la diferencia de las medias de cada matriz. La figura 16D presenta el histograma de las diferencias calculadas para los píxeles analizados, donde un umbral de 40 nos permitió detectar las distancias que correspondían a las rupturas relevantes.

Finalmente, se representó gráficamente con un asterisco los píxeles cuando la diferencia fue mayor a 40 (Figura 16E) y se realizó el conteo de asteriscos, definiendo a estos como el índice de fragilidad. El número de

rupturas o soluciones de continuidad se comparó estadísticamente mediante una prueba t-Student no paramétrica (< 30) en SAS v. 9.4.

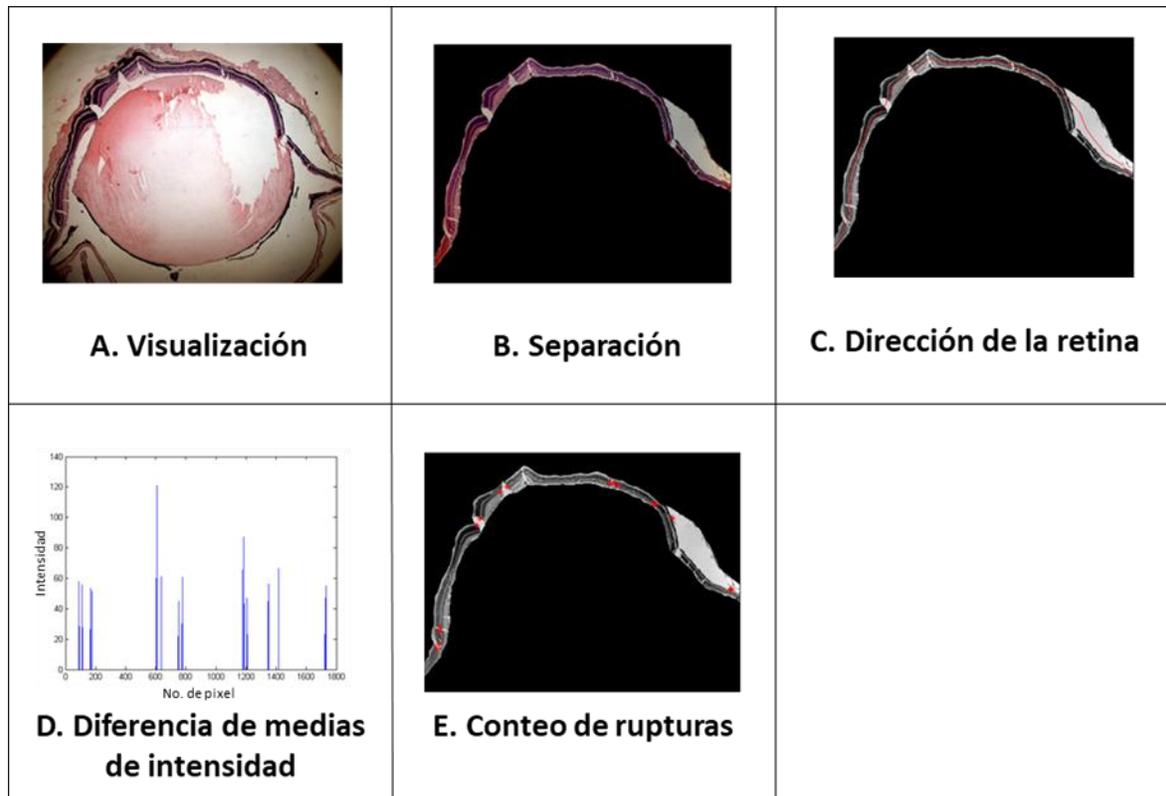


Figura 16. Método de procesamiento de imágenes propuesto para calcular el índice de fragilidad.

5.3.4.2 Medición del grosor de las capas de la retina

El grosor de la retina completa y sus capas se midió mediante microscopía de campo claro a un aumento de 10X, utilizando el Software AxioVision Rel. 4.8 (Carl Zeiss Inc.). En promedio, se obtuvieron tres imágenes y tres mediciones de cada ojo a 500 μm a la derecha e izquierda del nervio óptico. El grosor de la retina se comparó estadísticamente mediante una prueba t-Student (>30) para el grosor de la retina completa, y un ANOVA y t-Student para el grosor de las capas de la retina en SAS v. 9.4

5.3.4.3 Análisis de la densidad de núcleos de las capas nucleares de la retina

Una de las consecuencias de la DMAE es la alteración en la cantidad de fotorreceptores; por lo que se diseñó una métrica que proporciona una medida cuantitativa del número de núcleos por unidad de área, para conocer la densidad de los núcleos de los fotorreceptores y las interneuronas retinianas en la capa nuclear externa e interna respectivamente. Para calcular esta métrica se utilizaron imágenes tomadas con un aumento de 40X y alrededor de 1 mm del lado derecho e izquierdo del nervio óptico (Figura 17A).

En primera instancia, se pre-procesaron las imágenes para resaltar los núcleos en cada una de las capas. Para esto, se obtuvo el ROI correspondiente para cada capa, utilizando el mismo método de la sección de índice de fragilidad (Figura 17B). De igual forma, la imagen RGB se convirtió al modelo HSV para separar la intensidad y la información de crominancia de cada pixel. Posteriormente, se aplicó una transformación negativa sobre la intensidad para realzar los núcleos del fondo (Figura 17C).

Enseguida, para realizar un recuento del número de núcleos se realizó una segmentación de las capas en dos clases mediante la aplicación de un método de umbral, el cual consiste en realizar una segmentación por diferencias de intensidad, en donde el umbral utilizado se calculó de acuerdo con la intensidad media global de la imagen analizada; es decir, para imágenes oscuras se fijó en 215 y para imágenes brillosas en 130. La imagen resultante genera una nueva región que separa los núcleos de la sección analizada (Figura 17D).

Finalmente, los núcleos se contaron aplicando el método de Wang y colaboradores (Wang et al., 2015), que combina un enfoque de separación y una técnica de reconocimiento de contornos basado en la detección de bordes para identificar los límites de los núcleos (Figura 17E). Se analizaron un total de 50 imágenes para los ratones WT y 68 para los KO, por lo que, la densidad de núcleos se comparó estadísticamente mediante una t-Student (> 30) en SAS v. 9.4.

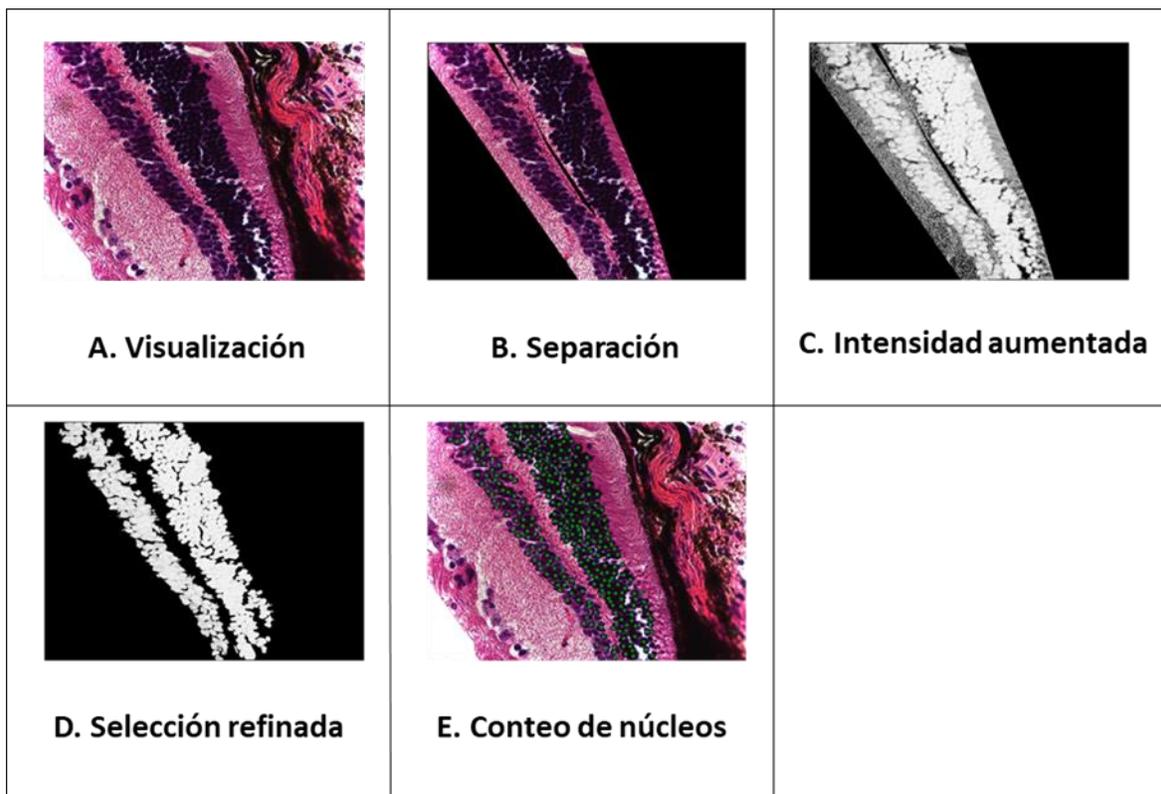


Figura 17. Método de procesamiento de imágenes propuesto para el conteo de núcleos.

5.4 Ensayo de inmunolocalización del complejo SG-SSPN en retina

Se obtuvieron cortes de los bloques de parafina y se desparafinaron de acuerdo con lo descrito anteriormente. Enseguida, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 1X y los tejidos se permeabilizaron por 30 min

con una solución de Tritón al 1%. Después, se aplicó bloqueador universal (BioGenex #HK083-50K) por 1 h. Luego, se incubó durante toda la noche con el anticuerpo primario (Tabla 3) y 0.3% de albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés).

Tabla 3. Datos de los anticuerpos primarios utilizados para el ensayo de inmunolocalización.

Anticuerpo	Marca	#Catalogo	Dilución	Origen
Anti-δ-SG	GeneTex	GTX53783	1: 50	Ratón
Anti-α-SG	GeneTex	GTX87192	1:100	Conejo
Anti-γ-SG	GeneTex	GTX117176	1: 100	Conejo
Anti-β-SG	GeneTex	GTX46747	1: 100	Conejo
Anti-ϵ-SG	GeneTex	GTX116453	1: 100	Conejo
Anti-SSPN	Abcam	ab186730	1: 100	Conejo

Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 1X y se dejó incubando por 90 min con el anticuerpo secundario (Tabla 4). Posteriormente, se realizaron tres lavados de 5 min con PBS 1X y se aplicó una gota de solución de montaje (DAPI, 4'6'-diamino-2-fenilindol) para contrateñir (Abcam #ab228549).

Tabla 4. Datos de los anticuerpos secundarios utilizados para el ensayo de inmunofluorescencia.

Anticuerpo	Marca	#Catalogo	Dilución
Anti-conejo Cy3	Thermo Fisher Scientific	A10520	1: 500
Anti-ratón Cy3	Thermo Fisher Scientific	A10521	1: 300

Se obtuvieron las imágenes de seis muestras por grupo a un aumento de 20x3.63 en el microscopio confocal (Nikon Confocal A1R+ STORM Microscope). Las imágenes se analizaron mediante la cuantificación de la

intensidad de fluorescencia emitida con el software ImageJ (National Institutes of Health) y comparadas estadísticamente en SAS v.9.4 con una prueba t-Student no paramétrica para el análisis de la retina completa, y un ANOVA no paramétrica para el análisis de las capas de la retina.

5.5 Ensayo de inmunodetección del complejo SG-SSPN mediante réplicas en western blot de extractos de proteínas de retina

El ensayo de inmunodetección se realizó usando el fundamento de la técnica de Western Blot. En esta técnica, una mezcla de proteínas se separa en función del peso molecular a través de la electroforesis en gel. Enseguida, las proteínas son transferidas a una membrana de nitrocelulosa o fluoruro de polivinilideno (PVDF), misma que se incubó con anticuerpos específicos para la proteína de interés. Los anticuerpos unidos se detectan sobre una placa radiográfica en forma de bandas, donde el grosor de la banda corresponde a la cantidad de proteína presente (Mahmood & Yang, 2012).

5.5.1 Extracción de proteínas de retina

Los ojos de ratón obtenidos mediante enucleación se utilizaron para realizar la disección de retina. Sobre el microscopio estereoscópico (Zeiss), los ojos se colocaron en una caja de Petri con 100 μ L de PBS 1X. La córnea se sujetó con unas pinzas dentadas y se realizó una punción con una aguja 27G en el borde esclerocorneal. Se recortó sobre el borde con una tijera curva hasta separar la córnea de la esclera. Inmediatamente, el cristalino también se liberó. Con unas tijeras planas, se recortó el nervio óptico y se transfirió la sección posterior del ojo a una caja de Petri con 4 mL de PBS 1X. Con mucho cuidado y con ayuda de unas pinzas, la esclera se separó de la coroides y retina, y esta última se

colocó dentro de un tubo de 1.5 mL con 100 μ L de amortiguador de lisis (Tris-HCl 20 mM pH= 7.4, NaCl 140 mM, EDTA 2 mM, Na_3VO_4 5 mM, NaF 30 mM, Tritón X-100 al 1%, SDS al 0.1%), 10 μ L de inhibidores de proteasas (cOmplete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche #04693124001), 10 μ L inhibidores de fosfatasas (PhosSTOP Phosphatase Inhibitor Cocktail Tablets, Roche #04906837001) y 0.1 μ L de PMSF.

Se recolectaron un total de seis retinas por cada grupo. Los tejidos se disgregaron con vástagos de aluminio y con agitación rápida en vórtex por intervalos de 30 s, procurando mantenerlos la mayor parte del tiempo a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 16, 873 xg durante 30 min a 4°C y el sobrenadante se recuperó en un tubo de 1.5 mL frío. En total se realizó la extracción de tres grupos de ratones WT y cuatro grupos de ratones KO.

5.5.2 Cuantificación de proteínas

Las muestras de proteínas se diluyeron en una relación 1:50 para cuantificarlas. Se preparó una curva patrón de BSA (Quick Start™ Bovine Serum Albumin Standard 2 mg/mL, BIO-RAD #500-0206) con las siguientes concentraciones: 0.80, 0.40, 0.20, 0.10, 0.05 y 0.025 μ g/ μ L. Sobre una placa de ELISA, 5 μ L de las muestras diluidas y la curva patrón se colocaron por triplicado y se mezclaron con 200 μ L del reactivo de Bradford (Quick Start™ Bradford 1x Dye Reagent, BIO-RAD #500-0205). La absorbancia se determinó a 595 nm en el espectrofotómetro para microplacas Multiskan™ GO y la cantidad de proteínas se calculó usando la curva patrón y siguiendo la Ley de Lambert-Beer.

5.5.3 Electroforesis SDS-PAGE

Se colocaron 30 μ g de proteína de retina y 15 μ g de músculo esquelético (proteína extraída como control positivo) en tubos de 0.6 mL y se agregó

un volumen de amortiguador de carga 2X (Tris-HCl 1 M pH= 6.8, SDS 10%, Glicerol 20%, 1.25 mL de β -mercaptoetanol por cada 5mL de amortiguador, azul de bromofenol 0.2 mg/mL) que completara 10 μ L. Los tubos se calentaron en baño seco a 95°C durante 5 min y las proteínas se separaron en un gel de acrilamida al 15%, junto con el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™, BIO-RAD # 161-0375). El corrimiento electroforético se realizó a 65 V, 400 mA y 30 min para alinear las muestras en el gel concentrador y a, 100 V, 400 mA y 120 min para la separación proteica con amortiguador de corrida 1X (Dilución 1:10 del amortiguador de corrida 10 X (Glicina 192 mM, Tris-base 25 mM, SDS al 0.1%).

5.5.4 Transferencia

Al término de la electroforesis, las proteínas se transfirieron en cámara húmeda a una membrana de PVDF a 100 V, 400 mA y 100 min con amortiguador de transferencia 1X (Dilución 1:10 del amortiguador 10X (Tris base 25 mM pH= 8.3, glicina 192 mM), metanol absoluto al 10%). Posteriormente, la membrana se retiró y se tiñó con rojo de Ponceau al 0.01% (Sigma-Aldrich #P3504-10G) durante 10 min en agitación. Se realizaron tres lavados con agua desionizada para eliminar el exceso del colorante y observar las bandas de las proteínas transferidas. Enseguida, se realizaron tres lavados con TBS-T 1X (Dilución 1:10 de TBS 10X (Tris-HCl 0.2 M pH=7.6, NaCl 1.5 M) con Tween-20 1%).

5.5.5 Inmunodetección

Las membranas se incubaron con solución de bloqueo al 5% (Blotting-Grade Blocker, BIO-RAD #170-6404) preparada con TBS-T durante dos horas en agitación a 70 rpm. Pasado el tiempo, se retiró la solución de

bloqueo y se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario (Tabla 5) preparado en solución de bloqueo, en agitación a 70 rpm.

Tabla 5. Datos de los anticuerpos primarios utilizados para el ensayo de inmunodetección.

Anticuerpo	Marca	#Catalogo	Dilución	Origen
Anti-δ-SG	GeneTex	GTX53783	1: 150	Ratón
Anti-α-SG	GeneTex	GTX87192	1:1000	Conejo
Anti-γ-SG	GeneTex	GTX117176	1: 1000	Conejo
Anti-β-SG	GeneTex	GTX46747	1: 1000	Conejo
Anti-ϵ-SG	GeneTex	GTX116453	1: 1000	Conejo
Anti-SSPN	Abcam	ab186730	1: 1000	Conejo
Anti-GAPDH	Cell Signaling Technology	2118	1: 5000	Conejo

Se recuperó el anticuerpo primario y se realizaron tres lavados de 10 min con TBS-T 1X. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario (Tabla 6) (acoplado a la enzima HRP) preparado en solución de bloqueo durante dos horas a temperatura ambiente y al finalizar el tiempo, se realizaron otros tres lavados de 10 min con TBS-T 1X.

Tabla 6. Datos de los anticuerpos secundarios utilizados para el ensayo de inmunodetección.

Anticuerpo	Marca	#Catalogo	Dilución
Anti-conejo	Cell Signaling Technology	7074S	1: 7000
Anti-ratón	Cell Signaling Technology	7076S	1: 4000

5.5.6 Revelado

Dentro del cuarto oscuro bajo luz roja, las membranas se colocaron sobre un acetato. Se mezclaron 150 μ L del reactivo A y 150 μ L del reactivo B (SuperSignal™ West Femto Trial Kit, ThermoFisher Scientific #34094) en un tubo de 1.5 mL; previa agitación en vórtex, el volumen final se colocó sobre la membrana y esta se cubrió con otro acetato. Pasados 5 s de reacción, se colocó encima del acetato una placa radiográfica (Película MIN-R EV, Carestream Dental) que se expuso a la reacción quimioluminiscente a diferentes tiempos (5 s a 3 min). El revelado se realizó colocando la placa 10 s dentro de 50 mL de revelador (Rapid Access Developer, Carestream Dental #183 8374). Después se lavó con agua de la llave durante 10 s y se colocó 10 s dentro de 50 mL de fijador (Rapid Access Fixer, Carestream Dental #183 8374). Enseguida, se volvió a lavar con agua de la llave por 10 s y las placas se dejaron secar al aire. Las placas se escanearon para obtener la imagen digital y se analizaron por densitometría con Image Studio Lite v. 5.2 y comparadas estadísticamente mediante una prueba t-Student no paramétrica en SAS v.9.4.

5.5.7 Desacoplamiento de anticuerpos

Para visualizar una proteína diferente sobre la misma membrana, después del revelado las membranas se lavaron dos veces con TBS-T durante 5 min. Después, se realizaron dos lavados con amortiguador de lavado (glicina 100 mM pH= 2.2, SDS al 0.1%, Tween-20 al 1%) durante 10 min, enseguida tres lavados con PBS 1X por 10 min y tres lavados con TBS-T de 10 min. Finalmente, se realizaron los pasos siguientes de la inmunodetección y revelado.

5.6 Evaluación de la agudeza visual

Las pruebas electrofisiológicas de la visión son métodos poco invasivos que permiten evaluar los cambios en la corriente de iones dentro de la retina, como respuesta a un estímulo luminoso. Uno de los métodos utilizados es el Electroretinograma (ERG) flash, el cual puede ser obtenido usando una gran variedad de estímulos y parámetros de luz, que permiten identificar la función de distintos tipos celulares de la retina. Así, considerando que los sujetos de estudio son ratones, se realizó el ERG flash adaptado a la oscuridad para evaluar la visión mediada por los bastones. Por tanto, la respuesta obtenida es dada por la amplitud de dos ondas; la onda **a** que corresponde a la activación de los fotorreceptores y la onda **b**, que es generada por la activación de las células bipolares glutamatérgicas (Leinonen & Tanila, 2017).

La agudeza visual de los ratones se obtuvo mediante ensayos de electrofisiología de la retina, en el Instituto de Neurobiología de la UNAM campus Juriquilla. Los criterios utilizados durante la evaluación siguen los requerimientos descritos por la Sociedad Internacional para la Electrofisiología Clínica de la Visión (ISCEV, por sus siglas en inglés] (Holder et al., 2007). Los ratones se anestesiaron vía intramuscular con Ketamina (1000 mg/ 10 mL) y Xilazina (2%) en una relación 70:30 (1 µL/1 g de peso corporal). Una vez que los ratones se encontraron bajo el efecto de la anestesia, se realizó un corte de vibrissas para que no interfirieran con la evaluación. Enseguida, se administró una gota de tropicamida al 0.5%/fenilefrina al 0.5% en los dos ojos para dilatar las pupilas.

El ERG flash se obtuvo de los dos ojos con un electrodo de plata, el cual se colocó sobre la córnea. Además, dos electrodos de referencia fueron posicionados subcutáneamente cerca de los ojos (Figura 18). Enseguida,

se realizó la estimulación luminosa inducida durante 1 s con cuatro intensidades: 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 log cd.s/m² (PS33 Plus PhotoStimulator, GRASS Technologies). Para observar gráficamente la señal obtenida por el estímulo, se utilizó un amplificador para cambiar la respuesta de 3 a 3000 Hz (P511AC Amplifier, GRASS Technologies) (Díaz-Lezama et al., 2016).



Figura 18. Colocación del ratón en el equipo para realizar la evaluación electrofisiológica de la retina.

Al finalizar el protocolo, los ratones se colocaron en una cama térmica y sus ojos se rehidrataron con carboximetilcelulosa sódica al 0.5% para su recuperación. El promedio de 16 mediciones durante un segundo se analizó para la obtención de los electroretinogramas.

5.6.1 Procesamiento de datos de los electroretinogramas

De acuerdo con Wood et al. (Wood, Margrain, & Binns, 2014), el ERG proporciona una medida cuantitativa de la función de la retina. Los potenciales bio-eléctricos generados durante la transducción de señales en la retina generan dos tipos de onda. Los cambios de amplitud y en el

tiempo de las ondas a y b se han asociado con una gama de patología retinianas. En la figura 19A se presenta un ERG, en el que, debido a la alta variabilidad de la señal, es necesario depurar la señal para realzar los puntos de inflexión relevantes. Para esto, se realizó un análisis de Fourier para eliminar las altas frecuencias y obtener una versión suavizada de las ondas en el ERG (Figura 19B) (Oppenheim, Willsky, & Nawab, 1996).

El filtro utilizado para eliminar las altas frecuencias consiste en calcular la transformada de Fourier del ERG para remover los componentes que están por encima de la frecuencia de corte. En las figuras 19C y 19D, se observa el espectro de Fourier del ERG y el espectro de Fourier filtrado con una frecuencia de corte de 60 Hz. El ERG suavizado obtenido con la transformada de Fourier inversa se presenta en la figura 18B, en el cual se puede observar la localización de la onda a y b, así como la respuesta negativa fotópica (PhNR, por sus siglas en inglés). La PhNR es la onda negativa que precede a la onda b como respuesta de los conos.

Para cuantificar los parámetros relevantes de la onda a, b y el PhNR, se calculó la primera y segunda derivada del ERG suavizado, utilizando un filtro derivativo Gaussiano de 5 puntos en un paradigma iterativo (Gonzalez et al., 2002). Este filtro permitió determinar los puntos de inflexión del ERG a través de los tres cruces por cero de la segunda derivada (Wood et al., 2014). La figura 19E presenta el ERG suavizado y su primera y segunda derivada, en la que los valores se normalizaron para presentar las tres ondas en el mismo gráfico. Finalmente, la amplitud de la onda a se midió desde la línea base hasta el punto más bajo de la onda, y la amplitud de la onda b desde el punto más bajo de la onda a hasta el pico de la onda b. El PhNR se midió desde la línea base hasta el segundo punto más bajo de la señal. En total, se analizó la respuesta a los diferentes estímulos de seis ratones por grupo y los resultados se

compararon estadísticamente mediante un ANOVA y t-Student no paramétrica con SAS v.9.4.

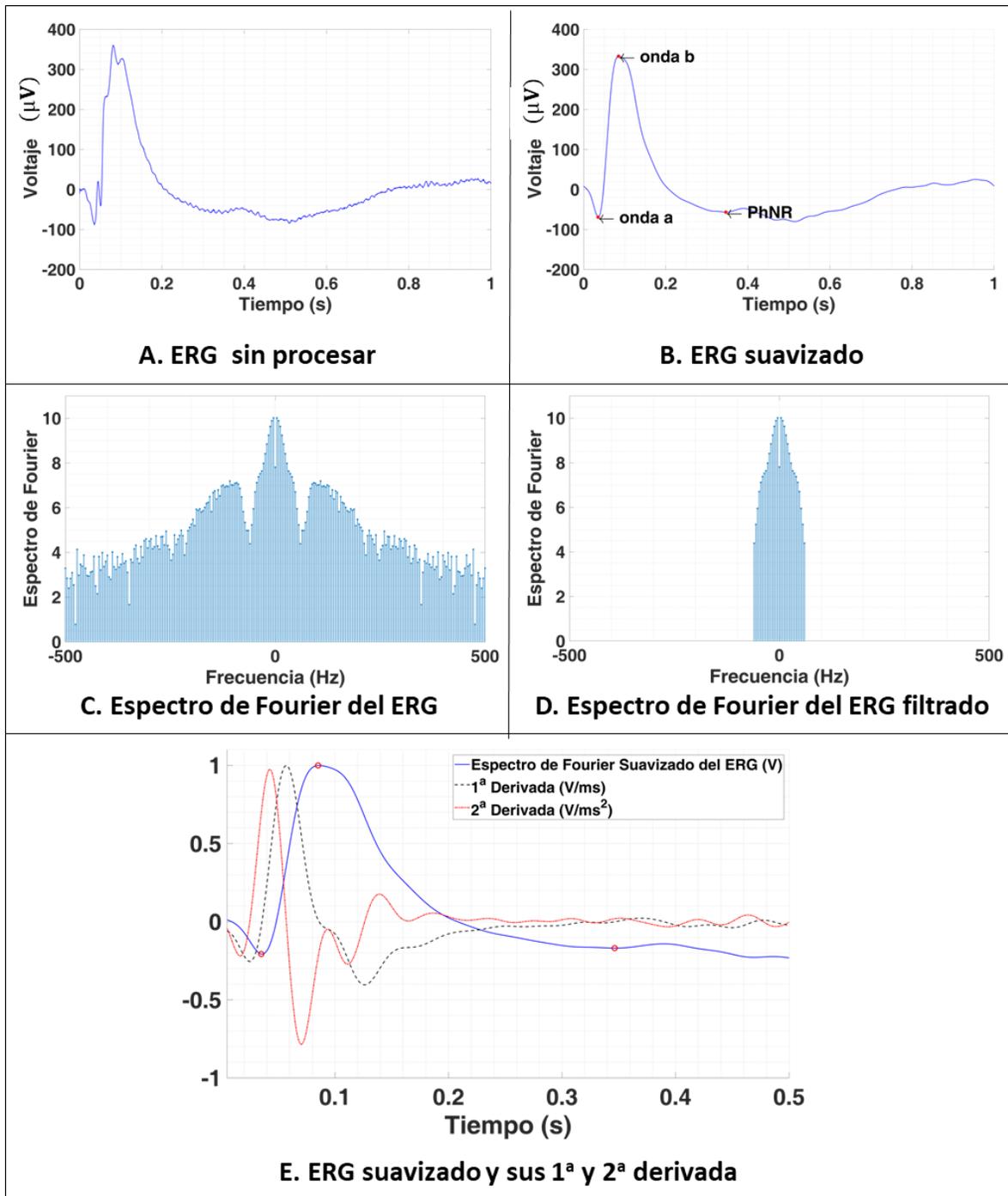


Figura 19. ERG suavizado con la transformada de Fourier y sus dos primeras derivadas.

5.7. Análisis estadístico

Para describir el efecto de la delección de *Sgcd* sobre las evaluaciones anatómicas y electrofisiológicas, en primer lugar, se verificó la distribución normal de los datos mediante pruebas de Kolmogórov-Smirnov. Enseguida, cuando el tamaño de la muestra fue superior a 30 unidades de observación, como en la medición del grosor de la retina y la determinación de la densidad de núcleos, se aplicaron métodos paramétricos. Por lo tanto, se obtuvo la media y la desviación estándar (SD) mediante una prueba t de Student y un análisis de varianza (ANOVA) con valores de p corregidos usando la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Por otro lado, cuando el tamaño de la muestra fue menor a 30 unidades de observación o los datos no se distribuyeron normalmente, se aplicaron pruebas estadísticas no paramétricas como el análisis de dos muestras de Wilcoxon y el ANOVA de Friedman de dos vías; utilizando también la corrección de Bonferroni para el valor de p en múltiples comparaciones. Con estas pruebas se obtuvo la mediana y el rango intercuartil (IQR, por sus siglas en inglés) del análisis de la fragilidad estructural, la determinación de los niveles de expresión del complejo sarcoglicano-sarcospan y la evaluación electrofisiología de la retina.

Se consideró a los resultados estadísticamente significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05. No obstante, cuando se realizaron múltiples comparaciones, la significancia fue considerada cuando el valor de p fue menor a 0.002, debido a la corrección de Bonferroni. Todas las comparaciones se realizaron con el software SAS v.9.4.

6. RESULTADOS

6.1 Cambios estructurales de la retina del ratón *Sgcd-nulo*

Para determinar si existe alguna diferencia entre el número de soluciones de continuidad de la retina del ratón C57Bl-6J, knock-out para *Sgcd* comparado con el WT, se realizaron tinciones de hematoxilina-eosina, de donde se observaron múltiples soluciones de continuidad (rupturas) perpendiculares (flechas) en la retina del ratón *Sgcd-nulo* comparado con el ratón WT (Figura 20A). Con el algoritmo desarrollado para cuantificar el número de soluciones de continuidad, se graficó la mediana del número de soluciones de continuidad en función del genotipo *Sgcd* (KO vs WT); con lo que, podemos decir que hay 15 veces más soluciones de continuidad en la retina del ratón KO comparado con el WT ($p < 0.0001$, figura 20B).

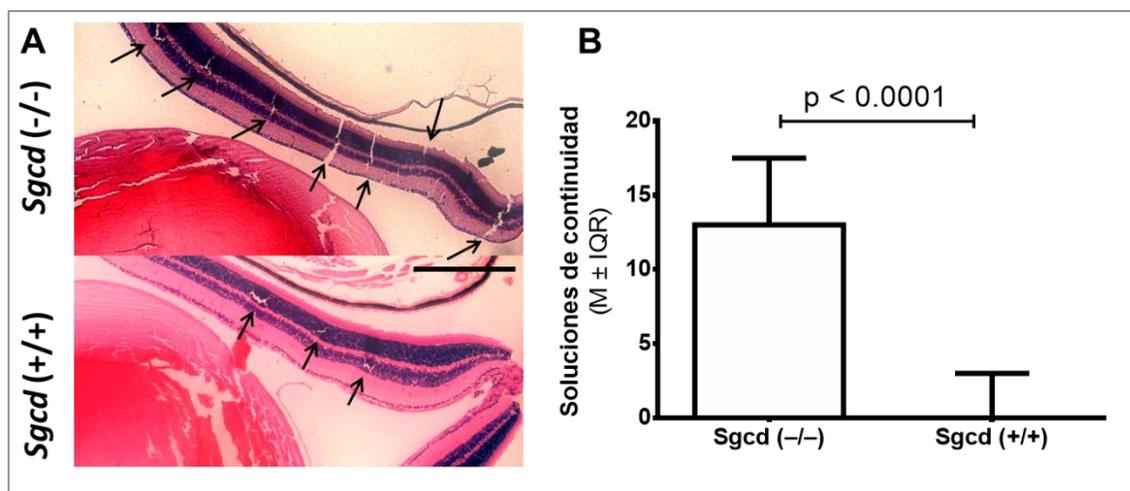


Figura 20. La retina del ratón *Sgcd-nulo* presenta un índice de fragilidad elevado.

(A) Tinción de hematoxilina-eosina de un corte transversal ($2.5 \mu\text{m}$) de la retina del ratón KO y WT a un aumento de 5X. Barra de escala: $30 \mu\text{m}$. (B) Número de soluciones de continuidad estratificado por grupos; Mediana \pm IQR, Análisis de

dos muestras de Wilcoxon (t-Student no paramétrica). Flechas: soluciones de continuidad.

Enseguida, para evaluar si existe alguna diferencia entre el grosor de las capas de la retina entre el ratón KO para *Sgcd* comparado con el WT, se tomaron fotografías a 10X de las tinciones con Hematoxilina-Eosina y se midió el grosor de las capas de la retina. En la figura 21B se observa el grosor promedio de la retina completa en función del genotipo *Sgcd* (KO vs WT), donde encontramos una disminución significativamente de ~40% del grosor de la retina del ratón KO comparado con el WT ($p < 0.0001$).

Adicionalmente, en la figura 21C se observa el grosor promedio de las capas de la retina en función del genotipo *Sgcd* (KO vs WT), de donde se encontró evidencia estadísticamente significativa para asegurar que hay un cambio en el grosor de alguna de las capas de la retina del ratón KO comparado con el WT ($p < 0.0001$). De forma más específica, observamos que hay una reducción significativa del grosor promedio de aproximadamente el 50% de la capa de fotorreceptores (FR), ~40% de los fotorreceptores internos (SI), de la capa plexiforme externa (PE) e interna (PI) y la capa nuclear interna (NI); ~30% de los fotorreceptores externos (SE) y ~25% de la capa nuclear externa (NE) de la retina del ratón KO comparado con el WT ($p < 0.0001$). Sin embargo, en la capa de células ganglionares (CG) no se encontró evidencia significativa para asegurar que hay un cambio en el grosor de la capa de la retina del ratón KO comparado con el WT ($p > 0.002$). El grosor promedio de las capas y los valores de p estratificado por grupos se encuentran en la tabla 7.

Por otro lado, para conocer si existe alguna diferencia entre la densidad de núcleos en la capa nuclear externa e interna del ratón KO comparado con el WT, se aplicó un algoritmo matemático sobre las imágenes 40X de las tinciones de hematoxilina-eosina (Figura 21A). En la figura 21D se

observa la densidad de núcleos (número de núcleos por cada 100 μm^2) en función del genotipo *Sgcd* (KO vs WT), de lo cual podemos asumir que hay significativamente un incremento en la densidad de núcleos de $\sim 10\%$ en la capa nuclear externa y $\sim 20\%$ en la capa nuclear interna ($p < 0.0033$ y $p < 0.0001$, respectivamente) del ratón KO comparado con el WT.

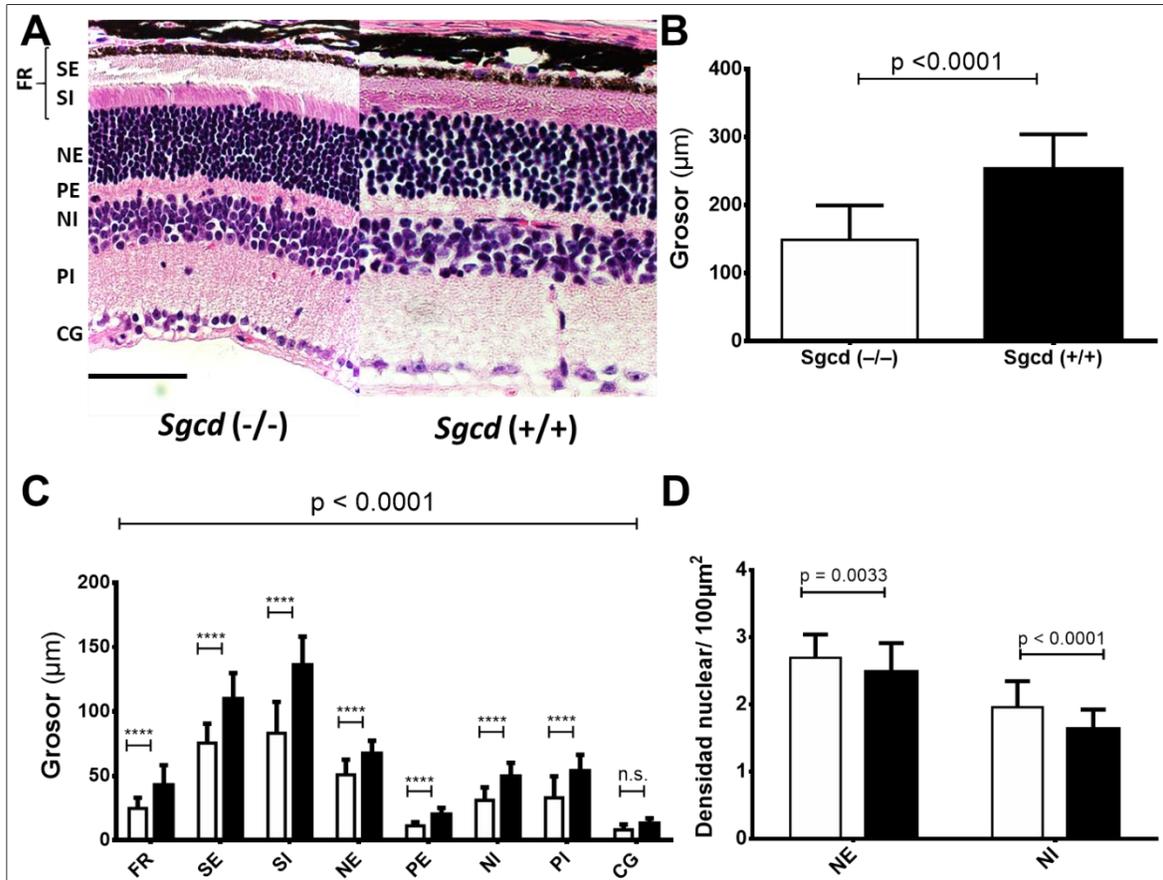


Figura 21. La retina del ratón *Sgcd-nulo* presenta una disminución significativa de su grosor.

(A) Tinción de hematoxilina-eosina de un corte transversal (2.5 μm) de la retina del ratón KO y WT a un aumento de 40X. Barra de escala: 30 μm . (B) Grosor de la retina estratificado por grupos; Media \pm SD, t-Student. (C) Grosor de las capas de la retina estratificado por grupos; Media \pm SD, ANOVA y t-Student con los valores de p estimados con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Capas de la retina: Fotorreceptores (FR), Segmentos externos

(SE), Segmentos internos (SI), Nuclear externa (NE), Plexiforme Externa (PE), Nuclear Interna (NI), Plexiforme interna (PI), Células ganglionares (CG). (D) Densidad de núcleos de la Capa Nuclear Externa (NE) e Interna (NI) estratificado por grupos; Media \pm SD, t-Student. n.s.: no significativo.

Tabla 7. Grosor de la retina completa y sus capas.

Capa	<i>Sgcd</i> (-/-)	<i>Sgcd</i> (+/+)	p-value ^{1,2}
Grosor de la retina(μ m) ¹	149.0 \pm 51.0	252.4 \pm 51.5	<0.0001
Diferencias por capa ²			<0.0001 ^a
Fotorreceptores (FR)	24.7 \pm 8.3	42.6 \pm 15.6	<0.0001
Segmentos externos (SE)	75.5 \pm 15.0	109.6 \pm 20.2	<0.0001
Segmentos internos (SI)	83.1 \pm 24.3	135.8 \pm 22.4	<0.0001
Nuclear Externa (NE)	50.8 \pm 11.8	67.0 \pm 10.2	<0.0001
Plexiforme Externa (PE)	11.2 \pm 2.7	19.9 \pm 5.3	<0.0001
Nuclear Interna (NI)	31.0 \pm 10.1	49.4 \pm 10.7	<0.0001
Plexiforme Interna (PI)	32.9 \pm 16.7	53.6 \pm 12.7	<0.0001
Células Ganglionares (CG)	8.1 \pm 4.1	12.9 \pm 4.1	n.s.

¹Media \pm SD, t-Student. ²Media \pm SD, ANOVA y t-Student con los valores de p estimados con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. n.s.: no significativo.

6.2 Cambios en la expresión de las subunidades del complejo SG-SSPN en la retina del ratón *Sgcd*-nulo

Con la finalidad de determinar si existe algún cambio en la expresión de las subunidades del complejo sarcoglicano-sarcospan (SG-SSPN) en la retina del ratón *Sgcd*-nulo (KO) comparado con el WT, se realizaron en primer lugar, ensayos de inmunolocalización. En la figura 22 se observa la ausencia de la proteína de δ -SG como consecuencia de la delección del gen *Sgcd* en el ratón KO. Así mismo, es evidente un aumento en la expresión de la proteína α -SG, así como una disminución en la expresión

de las subunidades β -, γ - y ϵ -SG, y sin un notable cambio en la expresión de SSPN en las capas de la retina del ratón KO comparado con el WT.

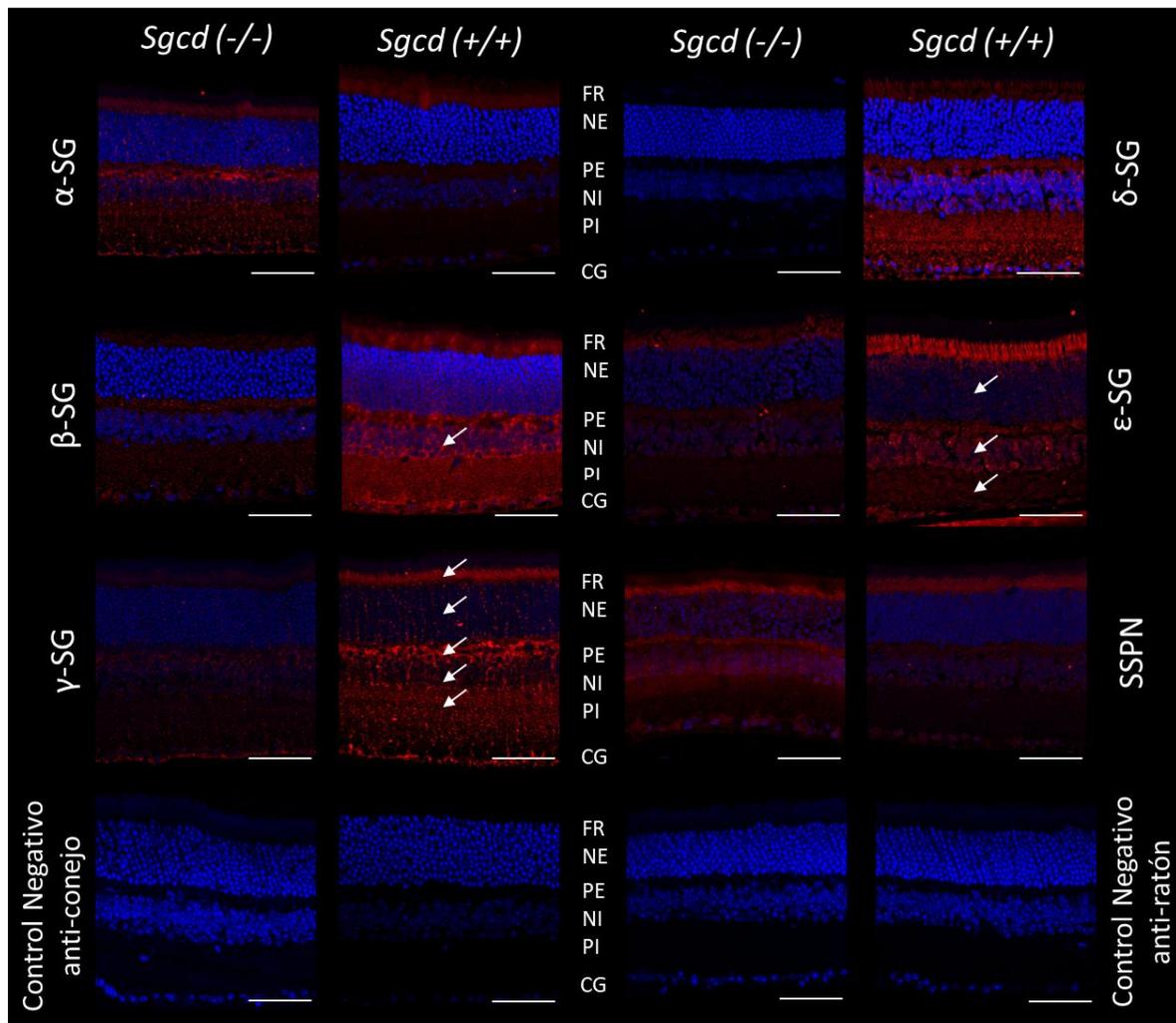


Figura 22. La delección de *Sgcd* modifica los niveles de expresión de las subunidades del complejo SG-SSPN en la retina del ratón *Sgcd-nulo*.

Ensayos de inmunolocalización de las subunidades del complejo SG-SSPN sobre un corte transversal (2.5 μ m) de la retina del ratón KO y WT a un aumento de 20x3.63. Capas de la retina: Fotorreceptores (FR), Nuclear Externa (NE), Plexiforme Externa (PE), Nuclear Interna (NI), Plexiforme Interna (PI), Células Ganglionares (CG). Barra de escala: 50 μ m.

De acuerdo con las observaciones realizadas sobre las imágenes de inmunolocalización, para determinar si existe algún cambio cuantitativo en la expresión de las subunidades del complejo SG-SSPN en la retina del ratón KO comparado con el WT, se graficó la mediana de la intensidad de fluorescencia de la retina completa y sus capas en función del genotipo *Sgcd* (KO vs WT). En el análisis de la intensidad de fluorescencia de la retina completa, se encontró evidencia estadísticamente significativa para decir que hay un aumento en la expresión de la subunidad α -SG ($p=0.0062$) y una disminución en la expresión de las subunidades β -, γ -, y ϵ -SG ($p=0.0027, 0.0017, 0.0034$ respectivamente) en la retina completa del ratón KO comparado con el WT. No obstante, no se encontró algún cambio en la expresión de SSPN ($p=0.2232$) en la retina completa del ratón KO comparado con el WT (Figura 23).

Por otro lado, para conocer si existía algún cambio en la expresión de las subunidades del complejo SG-SSPN en alguna de las capas de la retina, se realizó un análisis estratificado por capas. Así, para la subunidad α -SG (Figura 23B) no se encontró evidencia estadísticamente significativa para decir que hay un cambio en la expresión de α -SG en las capas de la retina del ratón KO comparado con el WT ($p=0.1083$). De igual forma, no se encontró evidencia estadísticamente significativa para decir que hay un cambio en la expresión de β -SG en las capas de la retina del ratón KO comparado con el WT ($p=0.7851$); sin embargo, existe una tendencia a la disminución en la expresión de β -SG en la capa nuclear interna (NI, Figura 22, flecha) de la retina del ratón KO comparado con el WT ($p=0.0027$; Figura 23C).

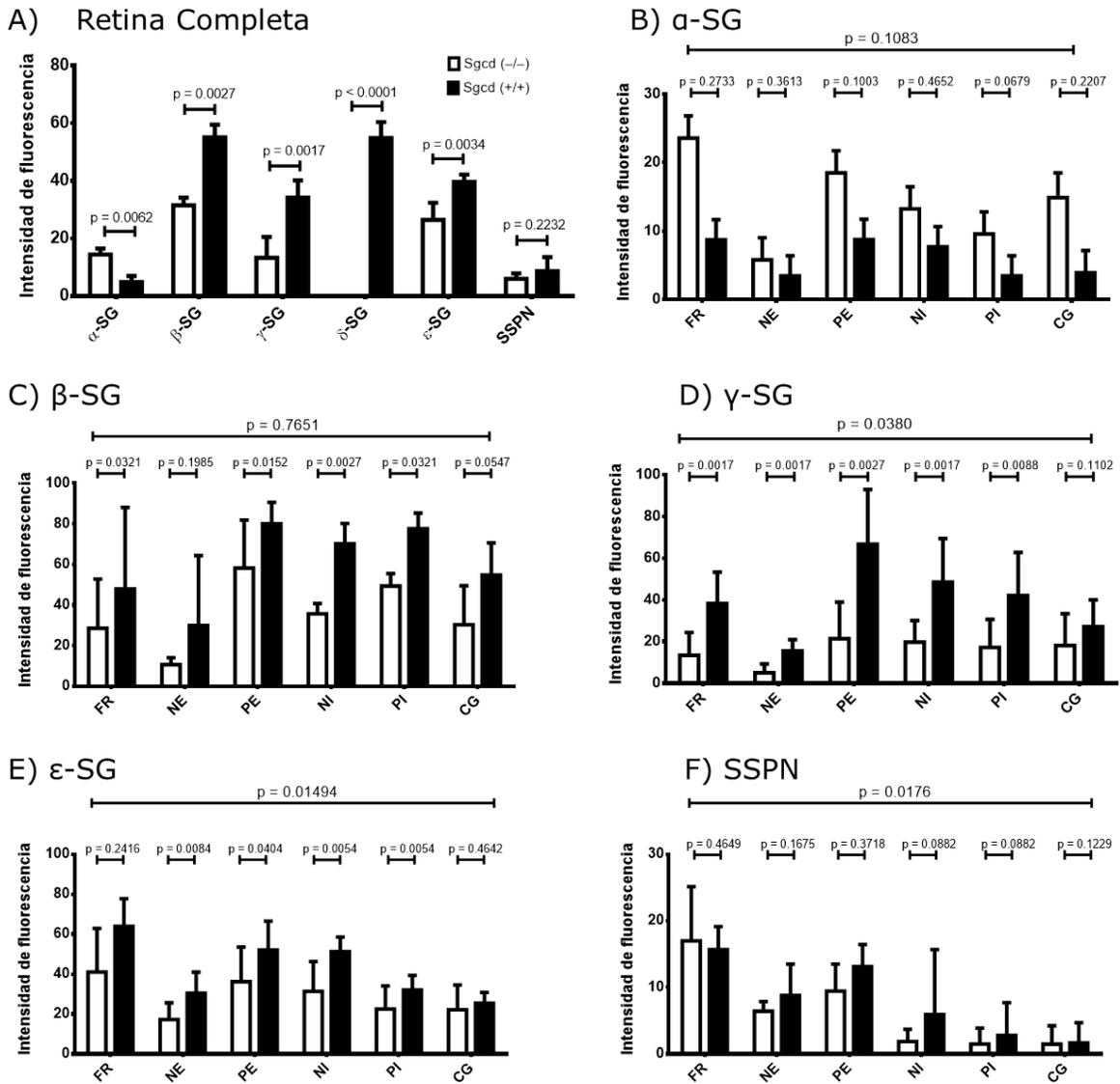


Figura 23. La delección de *Sgcd* modifica los niveles de expresión de las subunidades del complejo SG-SSPN en las capas de la retina del ratón *Sgcd-nulo*.

Intensidad de fluorescencia de las subunidades del complejo SG-SSPN en las capas de la retina estratificado por grupos; Mediana ± IQR, t-Student (retina completa) y Mediana ± IQR (capas de la retina), ANOVA de Friedman de dos vías y t-Student con la corrección de Bonferroni para múltiples comparaciones. Capas de la retina: Fotorreceptores (FR), Nuclear Externa (NE), Plexiforme Externa (PE), Nuclear Interna (NI), Plexiforme Interna (PI), Células Ganglionares (CG).

Por otro lado, se encontró evidencia estadísticamente significativa para decir que hay una disminución en la expresión de γ -SG ($p= 0.0380$) en la capa de fotorreceptores (FR), la capa nuclear externa (NE) y la capa nuclear interna (NI) ($p= 0.0017$ para las tres capas) de la retina del ratón KO comparado con el WT (Figura 23D). Asimismo, se encontró una tendencia a la disminución de la expresión de γ -SG en la capa plexiforme externa (PE) e interna (PI) ($p= 0.0027$ y 0.0088 respectivamente) de la retina del ratón KO comparado con el WT (Figura 23D; Figura 22, flechas). Sin embargo, no se encontró evidencia significativa para decir que hay un cambio en los niveles de expresión de la proteína ϵ -SG (Figura 23E) en las capas de la retina del ratón KO comparado con el WT ($p= 0.0149$). No obstante, se encontró una tendencia a la disminución de la expresión de ϵ -SG en la capa nuclear externa (NE, $p= 0.0084$) e interna (NI, $p= 0.0054$) y la capa plexiforme interna (PI, $p= 0.0054$; Figura 22, flechas). De igual forma, no se encontró evidencia significativa para decir que hay un cambio en los niveles de expresión de SSPN en el ratón KO comparado con el WT ($p= 0.0176$; Figura 23F).

Adicionalmente, se realizaron ensayos de western blot de extractos de proteína total obtenidos de retina y músculo esquelético (gastrocnemio, ME) de ratones KO y WT (Figura 24A), de donde se observaron algunos cambios en la expresión de las subunidades del complejo SG-SSPN, como la notoria ausencia de la expresión de la proteína de δ -SG como consecuencia de la delección del gen *Sgcd* en el ratón KO. Se utilizó como control positivo el extracto de ME, en el cual se observó una reducción significativa de todos los componentes del complejo SG-SSPN. Después del análisis densitométrico, se encontró evidencia estadísticamente significativa para asegurar que hay un incremento de $\sim 20\%$ en los niveles de expresión de la proteína α -SG, mientras que hay una disminución de $\sim 25\%$, $\sim 40\%$ y $\sim 10\%$ en los niveles de expresión de las subunidades β -

, γ - y ϵ -SG (respectivamente) en el ratón KO comparado con el WT ($p=0.0286$ para todos, Figura 24B). Por otro lado, no se encontró evidencia estadísticamente significativa para asegurar que hay algún cambio en los niveles de expresión de la proteína SSPN ($p=0.1143$) en el ratón KO comparado con el WT. Para el análisis estadístico se planteó como hipótesis nula (H_1) que, la proteína α -SG se encontraría sobre expresada y las otras subunidades del complejo tendrían una disminución en sus niveles de expresión en la retina del ratón KO comparado con el WT. La mediana de la expresión proteica normalizada y los valores de p estratificado por cada subunidad del complejo SG-SSPN se encuentran en la tabla 8.

Tabla 8. Diferencias en los niveles totales de proteína normalizada del complejo SG-SSPN por genotipo.

Subunidad	Mediana (IC 95%) <i>Sgcd</i> (- / -) vs. <i>Sgcd</i> (+ / +)	p	H_1
α -SG	0.1320 (0.0775, 0.2031)	0.0286	$M_{KO} > M_{WT}$
β -SG	-0.1598 (-0.1986, -0.0572)	0.0286	$M_{KO} < M_{WT}$
γ -SG	-0.7787 (-0.9732, -0.4996)	0.0286	$M_{KO} < M_{WT}$
δ -SG	-1.0802 (-1.5383, -0.8444)	0.0286	$M_{KO} < M_{WT}$
ϵ -SG	-0.0846 (-0.1108, -0.0260)	0.0286	$M_{KO} < M_{WT}$
SSPN	-0.18043 (-0.3132, 0.0668)	0.1143	$M_{KO} < M_{WT}$

IC: Intervalo de confianza. H_1 : Hipótesis nula propuesta para el análisis. SG: sarcoglicano. SSPN: sarcospan. Mediana de la expresión proteica normalizada entre el ratón KO (M_{KO}) y el WT and wild type (M_{WT}). Mediana \pm IC (95%), Análisis de dos muestras de Wilcoxon (t-Student no paramétrica).

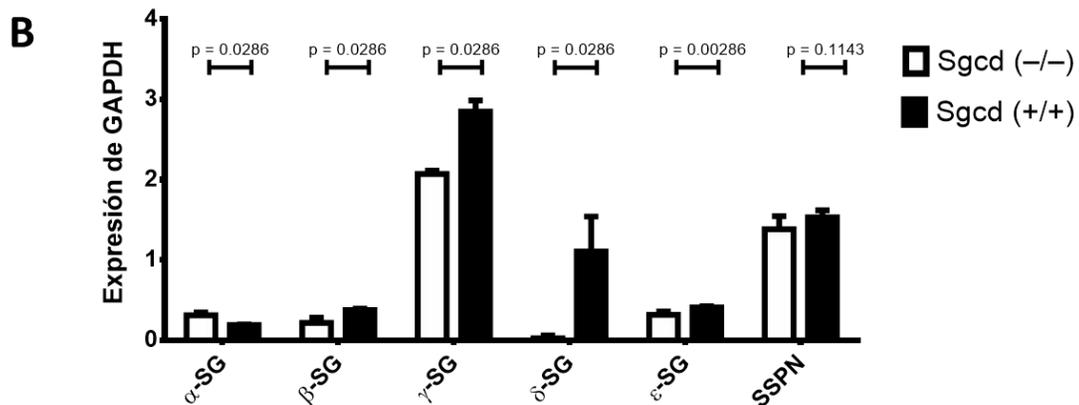
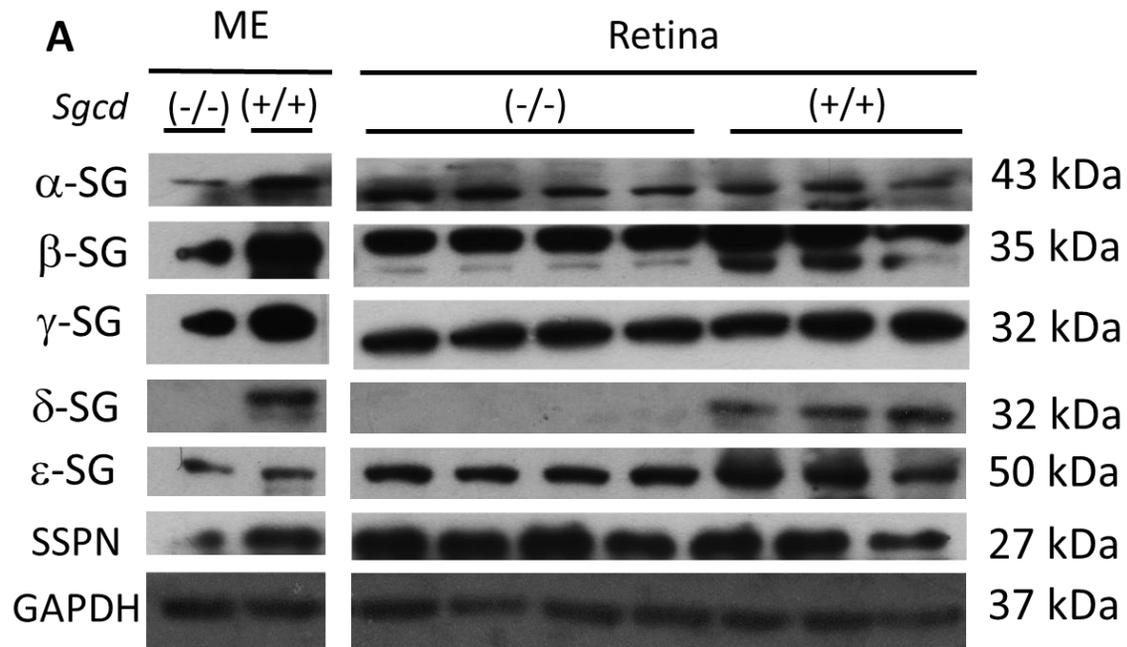


Figura 24. La delección de *Sgcd* modifica los niveles de expresión de las subunidades del complejo SG-SSPN en la retina del ratón *Sgcd-nulo*.

(A) Western blot del complejo SG-SSPN de músculo esquelético (ME, gastrocnemio) y retina de ratón. (B) Expresión proteica normalizada de las subunidades del complejo SG-SSPN estratificada por genotipo. Cada carril representa un grupo diferente compuesto por el extracto de proteínas de 6 retinas o ME. Mediana \pm IQR, Análisis de dos muestras de Wilcoxon (t-Student no paramétrica).

6.3 Análisis de la función de la retina del ratón *Sgcd-nulo*

Para evaluar si existe un cambio en la capacidad visual del ratón *Sgcd-nulo* (KO) comparado con el ratón WT, se realizaron ensayos de electrofisiología y se obtuvieron los patrones del ERG suavizado de cada ratón (Figura 25). Sin embargo, visualmente no se encontró alguna diferencia entre la forma del ERG del ratón KO comparado con el WT, en ninguna de las diferentes intensidades.



Figura 25. La delección del gen *Sgcd* no modifica los patrones del ERG del ratón *Sgcd-nulo*.

Enseguida, se graficó la mediana de la amplitud (μV) y el tiempo de latencia (ms) de la onda A, B y la respuesta negativa fotópica (PhNR) en función de las diferentes intensidades ($\log \text{cd.s/m}^2$) y estratificado por grupos (Figura 26). En general, no hay evidencia estadísticamente significativa para decir que hay un cambio en la amplitud de la onda A, B y PhNR a diferentes intensidades en el ratón KO comparado con el WT ($p= 0.7805$ para todos). De igual forma, no se encontró evidencia estadísticamente significativa para indicar que hay un cambio en el tiempo de latencia de la onda A, B y PhNR a diferentes intensidades en el ratón KO comparado con el WT ($p= 0.7717, 0.7771$ y 0.7782 respectivamente).

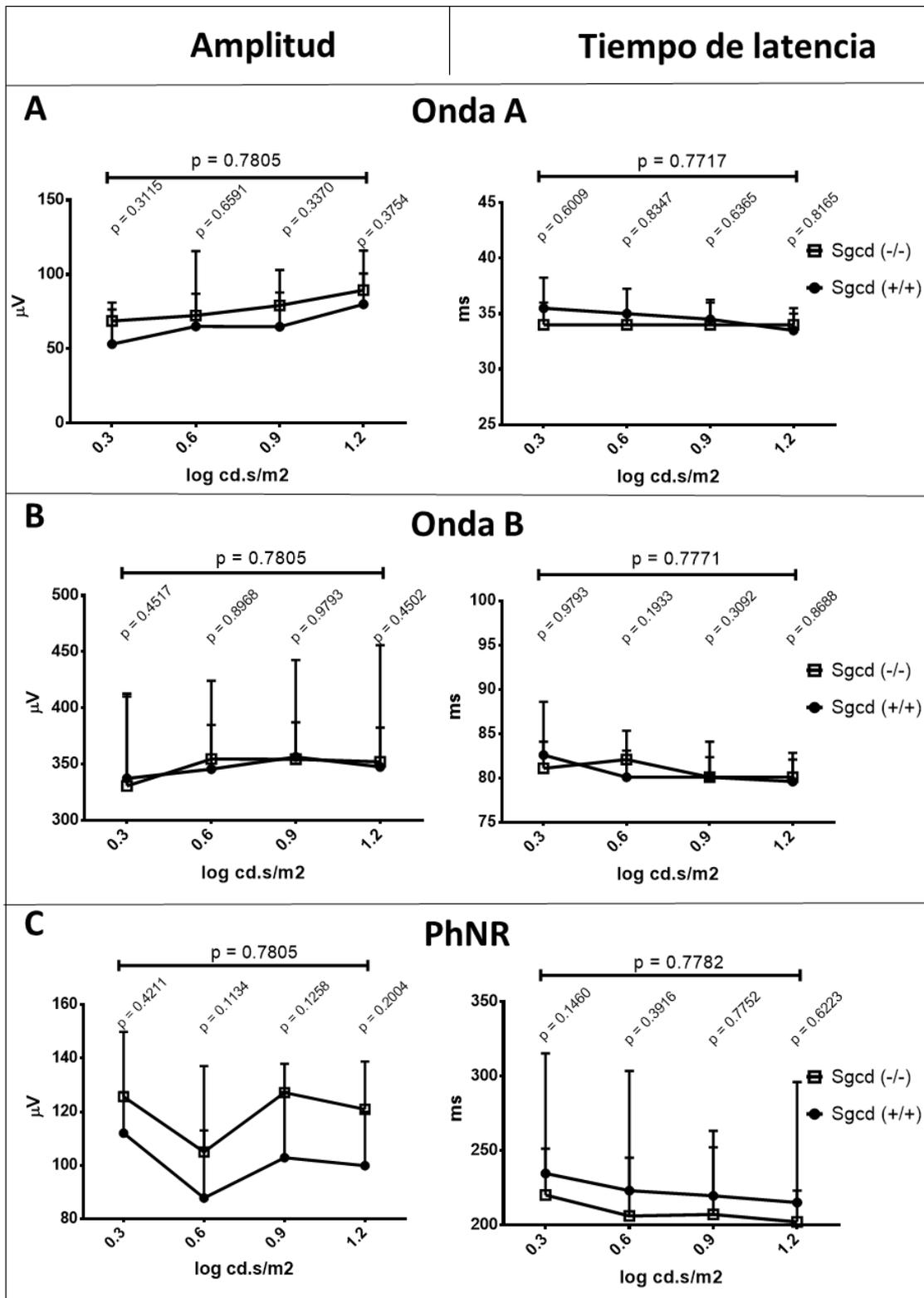


Figura 26. La delección de *Sgcd* no modifica la amplitud y el tiempo de latencia de la onda A, B y PhNR del ratón *Sgcd-nulo*.

Amplitud (μV) y tiempo de latencia (ms) de la onda A (A), B (B) y PhNR (C) en función de las diferentes intensidades ($\log \text{cd.s/m}^2$) estratificado por grupos; Mediana \pm IQR, ANOVA de Friedman de dos vías ($p < 0.05$) y t-Student con la corrección de Bonferroni ($p = 0.002$) para múltiples comparaciones.

Finalmente, se graficó la relación de la onda B/A en función de las diferentes intensidades y estratificado por grupos para minimizar la fuente de variabilidad en la amplitud de las ondas de los ratones. Sin embargo, no se encontró evidencia estadísticamente significativa para asegurar que hay un cambio en la relación B/A en el ratón KO comparado con el WT ($p = 0.7805$; Figura 27).

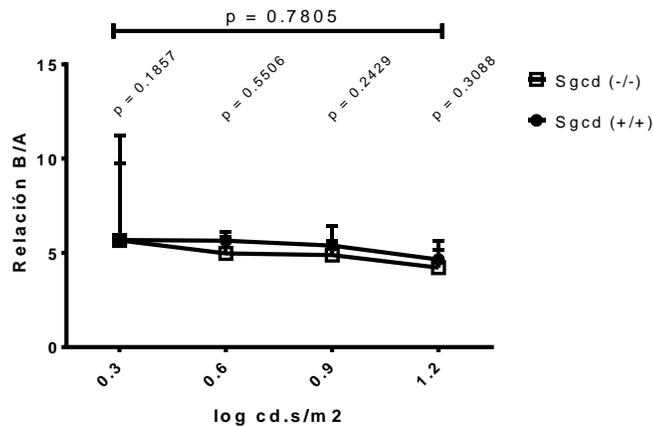


Figura 27. La delección de *Sgcd* no modifica la relación B/A del ratón *Sgcd*-nulo.

Relación B/A en función de las diferentes intensidades ($\log \text{cd.s/m}^2$) estratificado por grupos; Mediana \pm IQR, ANOVA de Friedman de dos vías ($p < 0.05$) y t-Student con la corrección de Bonferroni ($p = 0.002$) para múltiples comparaciones.

7. DISCUSIÓN

La Degeneración Macular Asociada con la Edad (DMAE) es la principal causa de ceguera irreversible en los países desarrollados, con una tasa de prevalencia global de 8.7% que aumenta con el envejecimiento de la población. Se estima que para el 2020 habrá un total de 196 millones de personas afectadas con la enfermedad, incrementando a 288 millones para el 2040 sin el desarrollo de un tratamiento efectivo. Además, se sabe que al menos 1 de cada 10 hispanos tiene DMAE, que es ligeramente más alta que la tasa global (Eye & Prevalence, 2004; Klein, 2011; Varma et al., 2004; Wong et al., 2014). En estudios previos, se ha demostrado la asociación de un polimorfismo (rs931798) en el gen *SGCD* con un aumento en la probabilidad de desarrollar DMAE (Lin & Lee, 2010; Perez-Ortiz et al., 2018). Por lo tanto, en este trabajo se utilizó al ratón *Sgcd-nulo*, ya que en la actualidad se han utilizado modelos animales para comprender como varios genes afectan la integridad de la retina y pueden contribuir a la patogénesis de la DMAE, sin embargo, a la fecha no existe un modelo animal único que desarrolle todos los signos de la DMAE de manera progresiva (Fletcher et al., 2014). Los modelos de ratón han ayudado a entender la formación de las degeneraciones retinianas, sin embargo, la retina del ratón no tiene mácula, por lo que se ha cuestionado si es un buen modelo para el estudio de la DMAE. No obstante, los estudios recientes han revelado que la región central de la retina del ratón posee una gran densidad de fotorreceptores y una carga fagocítica del epitelio pigmentario similar a la periferia de la mácula humana (Dreher et al., 2008; Volland et al., 2015).

Así, como parte de la evaluación estructural de la retina, se encontró que el ratón *Sgcd (-/-)* presenta una disminución de más del 25% del grosor de las capas de la retina (Figura 21), a excepción de la capa de células

ganglionares, comparado con el ratón *Sgcd* (+/+). Este adelgazamiento de la retina es similar a lo que se ha observado en los pacientes que desarrollan DMAE del tipo atrofia geográfica y Retinopatía diabética (Brandl et al., 2019; Pappuru et al., 2011; Shahidi et al., 2002; Vujosevic & Midená, 2013). Asimismo, se encontró un aumento en la fragilidad de la retina (Figura 20) y un aumento en la densidad de núcleos en la capa nuclear externa e interna (Figura 21) de la retina del ratón *Sgcd* (-/-) comparado con el *Sgcd* (+/+).

Adicionalmente, se encontró una disminución en los niveles de expresión de las subunidades β , γ y ϵ -SG en el ratón *Sgcd* (-/-) comparado con el *Sgcd* (+/+) (Figura 22-24). La disminución de los niveles de expresión del complejo SG-SSPN se ha observado previamente en el músculo esquelético y cardíaco del ratón *Sgcd* (-/-) (Coral-Vazquez et al., 1999), sin embargo, no se habían descrito los cambios en la expresión de este complejo en la retina de este ratón. Esta disminución en los niveles de expresión puede atribuirse a que cuando falta un miembro del complejo, especialmente β y δ -SG que forman el corazón del complejo, las otras subunidades son eliminadas a través del complejo proteasoma al no ensamblarse el complejo en el músculo esquelético (Annese et al., 2016). A la fecha, lo único que se ha descrito es que la expresión del complejo SG-SSPN es parcialmente independiente de la expresión de la distrofina en la retina del ratón, en donde, debido a su localización se piensa que su función es brindar estabilidad a la estructura de la retina (Fort et al., 2005) a través de la adhesión de las células gliales de Müller con la matriz extracelular (Claudepierre et al., 2000). Consecuentemente, se puede asociar la disminución de la expresión de las subunidades β , γ y ϵ -SG con el aumento de la fragilidad de la retina del ratón *Sgcd* (-/-).

En contraste, se observó que existe un aumento en los niveles de expresión de la proteína α -SG en la retina del del ratón *Sgcd* (-/-) comparado con el *Sgcd* (+/+) (Figura 22-24). En primer lugar, es importante notar que es la primera vez que se describe la expresión de α -SG en la retina del ratón, en donde se puede decir que tiene un papel importante en la estabilización de la retina al formar parte del complejo SG-SSPN. Por ende, el incremento en sus niveles de expresión con la delección de *Sgcd*, puede ser atribuido a un efecto compensatorio en respuesta a la disminución de la expresión de ϵ -SG, pues se sabe que esta proteína mejora el fenotipo de los ratones nulos para α -SG, por lo que se ha sugerido la posibilidad de que ϵ -SG reemplaza a α -SG en el músculo estriado (Imamura et al., 2005). Esto se apoya en que α y ϵ comparten una identidad de casi el 50% a nivel de aminoácidos, lo que sugiere que cumplen una función similar (Barresi et al., 2000; Liu & Engvall, 1999). En consecuencia, cuando existe la ausencia de ϵ -SG, α -SG podría reemplazar a ϵ -SG en la retina.

Por otro lado, no se encontró algún cambio en los niveles de expresión de SSPN en la retina del ratón *Sgcd* (-/-) comparado con el *Sgcd* (+/+) (Figura 22-24). Estos hallazgos son diferentes a lo descrito en el músculo esquelético y cardiaco, en los que la ausencia de alguno de los miembros del complejo SG conduce a una disminución o ausencia de la expresión de SSPN (Araishi et al., 1999; Duclos et al., 1998; Lancioni et al., 2011). Por el contrario, se sabe que la delección de SSPN no modifica los niveles de expresión del complejo SG, lo que supone que la expresión de SSPN es dependiente del complejo SG, mientras que el complejo SG es independiente de SSPN (Lebakken et al., 2002). Sin embargo, los resultados obtenidos sugieren que la expresión de SSPN es independiente del complejo SG en la retina, ya que la delección de δ -SG no afecta su expresión.

Las diferencias en los patrones de expresión del complejo SG-SSPN en la retina del ratón *Sgcd* (-/-), podrían apoyar la hipótesis sobre la posible existencia de dos complejos diferentes compuestos por los sarcoglicanos en las células gliales de Müller de la retina. El primero, compuesto por Dp71 y la unidad tetramérica bien caracterizada de ϵ -, β -, γ - y δ -SG; y un segundo complejo independiente de Dp71 y compuesto por los SGs y algunas proteínas aún no identificadas (Fort et al., 2005). Así, el segundo complejo podría estar compuesto por SSPN y otras proteínas que tengan un papel diferente al primer complejo sobre el funcionamiento de la retina. Sin embargo, aún se requieren más estudios para comprender la función que tienen los SGs y SSPN en la retina.

Además, en los ensayos de inmunolocalización no se encontraron diferencias en la localización de las subunidades del complejo alrededor de las capas de la retina del ratón *Sgcd* (-/-) comparado con el *Sgcd* (+/+). Y, a pesar de los cambios encontrados en los niveles de expresión del complejo SG-SSPN en la retina del ratón *Sgcd* (-/-) comparado con el *Sgcd* (+/+); se encontró que la delección de *Sgcd* no produce cambios significativos en las capas individuales de la retina, a excepción de la proteína γ -SG, que presenta una disminución significativa en sus niveles de expresión en la capa de fotorreceptores, nuclear externa e interna (Figura 22 y 23) de la retina del ratón *Sgcd* (-/-) comparado con el *Sgcd* (+/+). De acuerdo con estos hallazgos, podemos sugerir que las proteínas γ -SG y δ -SG tienen un papel primordial en el mantenimiento de la estructura y grosor de la retina.

Finalmente, al evaluar la capacidad visual del ratón *Sgcd* (-/-) comparado con el *Sgcd* (+/+), no se encontró alguna diferencia significativa (Figura 25-27). Estos resultados son sorprendentes, debido a que se ha encontrado una estrecha relación entre la reducción del grosor de la retina

con una disminución en la agudeza visual en los pacientes con DMAE del tipo atrofia geográfica (Pappuru et al., 2011). Así, ya que en el ratón *Sgcd* (-/-) se observó una disminución en el grosor y un incremento evidente de la fragilidad estructural de la retina, se puede especular que la ausencia de una alteración visual es debido a la edad temprana (dos meses) de los ratones utilizados, ya que la DMAE es una enfermedad completamente dependiente de la edad, por lo que sería importante evaluar la capacidad visual de los ratones *Sgcd* (-/-) entre los cinco y seis meses de edad, ya que después de ese periodo los ratones pueden sufrir muerte prematura (Blain & Straub, 2011).

Por otro lado, en estudios previos se ha observado que una deficiencia de δ -SG aumenta la liberación de Ca^{2+} , probablemente a través de SERCA1 (ATPasa 1 de calcio del retículo sarcoplásmico) y que promueve una activación del factor de transcripción NFAT (Factor nuclear de las células T activadas) (Coral-Vazquez et al., 1999; Lipskaia et al., 2007). Esta predisposición al aumento de los niveles de calcio en el músculo esquelético, podría sugerir que la deficiencia de δ -SG también aumenta los niveles de calcio en la retina. Aunado a esto, se sabe que los niveles elevados de calcio en el espacio subretiniano aumentan la corriente de calcio a través del canal de cationes $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$, que engaña al fotorreceptor para que se adapte y absorba mayor cantidad de luz (Lavallee et al., 2006; Livsey et al., 1990; Loeffler & Mangini, 1998; Mangini et al., 1997; Steinberg & Li, 1994). Esta suposición, podría explicar la ausencia de una alteración visual en los ratones *Sgcd* (-/-), ya que una mayor absorción de luz puede contribuir a la formación de los potenciales evocados de la retina, que hacen que la señal producida sea similar a la de los ratones *Sgcd* (+/+). Por lo tanto, sería importante medir los niveles de calcio en el espacio subretiniano en estos ratones para poder conocer más sobre los efectos de la deficiencia de δ -SG en la

retina. Adicionalmente, en otros estudios se ha asociado un aumento en la proliferación celular con un incremento en los niveles de calcio (Lipskaia & Lompré, 2004). Así, esto también podría explicar el incremento en la densidad de núcleos en las capas nucleares de la retina.

8. CONCLUSIONES

- Se demostró que la delección de δ -SG genera cambios estructurales en la retina, como un aumento en la fragilidad y la densidad de núcleos, así como una disminución del grosor de las capas de la retina, que es similar a lo que ocurre con los pacientes con DMAE del tipo atrofia geográfica.
- No se encontraron diferencias en la localización del complejo SG-SSPN en la retina del ratón *Sgcd-nulo* comparado con el WT.
- Se encontró que los niveles de expresión del complejo SG-SSPN en la retina es diferente al músculo esquelético y cardiaco en el ratón *Sgcd-nulo*, en donde la expresión de α -SG se encuentra incrementada, mientras que no hay cambios evidentes en la expresión de SSPN en el ratón *Sgcd-nulo* comparado con el WT.
- No se encontró asociación entre la delección de *Sgcd* y la agudeza visual de los ratones.
- Las alteraciones estructurales observadas en el ratón *Sgcd-nulo*, sugieren que este ratón puede ser utilizado como un modelo potencial para comprender la patología de la degeneración retiniana que se presenta en algunas enfermedades como la DMAE del tipo atrofia geográfica.

9. REFERENCIAS

- Annese, T., Corsi, P., Ruggieri, S., Tamma, R., Marinaccio, C., Picocci, S., ... Nico, B. (2016). Isolation and characterization of neural stem cells from dystrophic mdx mouse. *Experimental Cell Research*, 343(2), 190–207. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2016.03.019>
- Araishi, K., Sasaoka, T., Imamura, M., Noguchi, S., Hama, H., Wakabayashi, E., ... Ozawa, E. (1999). Loss of the sarcoglycan complex and sarcospan leads to muscular dystrophy in β -sarcoglycan-deficient mice. *Human Molecular Genetics*, 8(9), 1589–1598. <https://doi.org/10.1093/hmg/8.9.1589>
- Báez Rojas, J. J., & Alonso Pérez, M. A. (2008). Uso del sistema HSI para asignar falso color a objetos en imágenes digitales . *Revista Mexicana de Física E* . scielomx .
- Barboni, M. T. S., Nagy, B. V., de Araújo Moura, A. L., Damico, F. M., da Costa, M. F., Kremers, J., & Ventura, D. F. (2013). ON and OFF Electroretinography and Contrast Sensitivity in Duchenne Muscular Dystrophy ON and OFF ERG and Contrast Sensitivity in DMD. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(5), 3195–3204. <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11700>
- Barresi, R., Moore, S. A., Stolle, C. A., Mendell, J. R., & Campbell, K. P. (2000). Expression of γ -sarcoglycan in smooth muscle and its interaction with the smooth muscle sarcoglycan-sarcospan complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38554–38560. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007799200>
- Blain, A. M., & Straub, V. W. (2011). δ -Sarcoglycan-deficient muscular dystrophy: from discovery to therapeutic approaches. *Skeletal Muscle*, 1(1), 13. <https://doi.org/10.1186/2044-5040-1-13>
- Brandl, C., Brücklmayer, C., Günther, F., Zimmermann, M. E., Küchenhoff, H., Helbig, H., ... Stark, K. J. (2019). Retinal Layer Thicknesses in Early Age-Related Macular Degeneration: Results From the German AugUR

- Study Retinal Layer Thicknesses in Early AMD. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 60(5), 1581–1594. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-25332>
- Browning, A. C., Amoaku, W. M., & Dua, H. S. (2004). Treatment of age-related macular degeneration. *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97(4), 166–169. <https://doi.org/10.1258/jrsm.97.4.166>
- Bylisma, G. W., & Guymer, R. H. (2005). Treatment of age-related macular degeneration. *Clinical & Experimental Optometry: Journal of the Australian Optometrical Association*, 88(5), 322–334. <https://doi.org/10.1038/nri3459>
- Campbell, K. P. (1995). Three muscular dystrophies: Loss of cytoskeleton-extracellular matrix linkage. *Cell*, 80(5), 675–679. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90344-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90344-5)
- Chen, H., Rangasamy, M., Tan, S. Y., Wang, H., & Siegfried, B. D. (2010). Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. *PLoS ONE*, 5(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011963>
- Claudepierre, T., Dalloz, C., Mornet, D., Matsumura, K., & Sahel, J. (2000). Characterization of the intermolecular associations of the dystrophin-associated glycoprotein complex in retinal Müller glial cells, 3417, 3409–3417.
- Claudepierre, T., Mornet, D., Pannicke, T., Forster, V., Dalloz, C., Bolaños, F., ... Rendon, A. (2000). Expression of Dp71 in Müller Glial Cells: A Comparison with Utrophin- and Dystrophin-Associated Proteins. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(1), 294–304. Retrieved from <https://doi.org/>
- Constantin, B. (2014). Dystrophin complex functions as a scaffold for signalling proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1838(2), 635–642. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2013.08.023>

- Cook, H. L., Patel, P. J., & Tufail, A. (2008). Age-related macular degeneration: Diagnosis and management. *British Medical Bulletin*, *85*(1), 127–149. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldn012>
- Coral-Vazquez, R., Cohn, R. D., Moore, S. a, Hill, J. a, Weiss, R. M., Davisson, R. L., ... Campbell, K. P. (1999). Disruption of the Sarcoglycan – Sarcospan Complex in Vascular Smooth Muscle: A Novel Mechanism for Cardiomyopathy and Muscular Dystrophy. *Animals*, *98*, 465–474.
- Costa, M. F., Oliveira, A. G. F., Feitosa-Santana, C., Zatz, M., & Ventura, D. F. (2007). Red-green color vision impairment in Duchenne muscular dystrophy. *American Journal of Human Genetics*, *80*(6), 1064–1075. <https://doi.org/10.1086/518127>
- Costanzo, L. S. (2011). *Fisiología*. (S. A. ELSEVIER ESPAÑA, Ed.) (4th ed.). ESPAÑA.
- de Jong, P. T. V. M. (2006). Age-related macular degeneration. *The New England Journal of Medicine*, *355*(14), 1474–1485. <https://doi.org/10.1056/NEJMra062326>
- Deserno, T. M. (2011). *Biomedical Image Processing. Image (Rochester, N.Y.)*. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-15816-2>
- Díaz-Lezama, N., Wu, Z., Adán-Castro, E., Arnold, E., Vázquez-Membrillo, M., Arredondo-Zamarripa, D., ... Clapp, C. (2016). Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: Therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1. *Laboratory Investigation*, *96*(3), 283–295. <https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.135>
- Ding, X., Patel, M., & Chan, C.-C. (2009). Molecular pathology of age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, *28*(1), 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.10.001>
- Dreher, B., Leamey, C., & Protti, D. (2008). Comparative Survey of the

Mammalian Visual System with Reference to the Mouse. In *Eye, Retina, and Visual System of the Mouse* (pp. 35–60). MIT Press.

Duclos, F., Straub, V., Moore, S. A., Venzke, D. P., Hrstka, R. F., Crosbie, R. H., ... Campbell, K. P. (1998). Progressive muscular dystrophy in α -sarcoglycan-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, *142*(6), 1461–1471. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.6.1461>

Eye, T., & Prevalence, D. (2004). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the United States, *122*.

Fischer, A. H., Jacobson, K. A., Rose, J., & Zeller, R. (2017). Hematoxylin and Eosin Staining of Tissue and Cell Sections, *3*(5), 4986–4988. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot4986>

Fletcher, E. L., Jobling, A. I., Greferath, U., Mills, S. A., Waugh, M., Ho, T., ... Vessey, K. A. (2014). Studying age-related macular degeneration using animal models. *Optometry and Vision Science*, *91*(8), 878–886. <https://doi.org/10.1097/OPX.0000000000000322>

Fort, P., Estrada, F. J., Bordais, A., Mornet, D., Sahel, J. A., Picaud, S., ... Rendon, A. (2005). The sarcoglycan-sarcospan complex localization in mouse retina is independent from dystrophins. *Neuroscience Research*, *53*(1), 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.neures.2005.05.007>

Franzreb, M. (n.d.). Tratamiento degeneración macular. Retrieved from <https://www.drmarcofranzreb.com/enfermedades/enfermedades-oculares/degeneracion-macular/>

Frery, A. C., & Perciano, T. (2013). Introduction to Image Processing Using R: Learning by Examples. *SpringerBriefs in Computer Science*, 102 pages. <https://doi.org/10.1007/978-1-4471-4950-7>

Gao, J., Liu, R. T., Cao, S., Cui, J. Z., Wang, A., To, E., & Matsubara, J. A. (2015). NLRP3 Inflammasome: Activation and Regulation in Age-Related Macular

Degeneration. *Mediators of Inflammation*, 2015.
<https://doi.org/10.1155/2015/690243>

Garibyan, L., & Avashia, N. (2013). Research Techniques Made Simple: Polymerase Chain Reaction (PCR). *The Journal of Investigative Dermatology*. <https://doi.org/10.1038/jid.2013.1>.

Gonzalez, R. C., Woods, R. E., & Hall, P. (2002). *Digital Image Processing* (Second Edi). United States of America: Prentice Hall.

Green, W. R., & Enger, C. (1993). Age-related Macular Degeneration Histopathologic Studies: The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology*, 100(10), 1519–1535. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(93\)31466-1](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(93)31466-1)

Hageman, G. S., Luthert, P. J., Victor Chong, N. H., Johnson, L. V., Anderson, D. H., & Mullins, R. F. (2001). An integrated hypothesis that considers drusen as biomarkers of immune-mediated processes at the RPE-Bruch's membrane interface in aging and age-related macular degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 20(6), 705–732. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(01\)00010-6](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(01)00010-6)

Hall, J. E., & Guyton, A. C. (2011). *GUYTON & HALL: TRATADO DE FISIOLÓGÍA MÉDICA*. (S. A. ELSEVIER ESPAÑA, Ed.) (12th ed.). BARCELONA.

Holder, G. E., Brigell, M. G., Hawlina, M., Meigen, T., Vaegan, & Bach, M. (2007). ISCEV standard for clinical pattern electroretinography - 2007 update. *Documenta Ophthalmologica*, 114(3), 111–116. <https://doi.org/10.1007/s10633-007-9053-1>

Honda, T., Sugiyama, S., Sakamoto, T., Kaikita, K., & Ogawa, H. (2007). Impact of delta-sarcoglycan gene polymorphism on the occurrence of coronary spastic angina in Japanese patients with hypertrophic cardiomyopathy. *Circulation Journal*. <https://doi.org/10.1253/circj.71.1263>

- Howell, K., Preston, R. J., & McLoughlin, P. (2003). Chronic hypoxia causes angiogenesis in addition to remodelling in the adult rat pulmonary circulation. *Journal of Physiology*.
<https://doi.org/10.1113/jphysiol.2002.030676>
- Hsu, H. L., Huang, L., Tsan, J. T., Funk, W., Wright, W. E., Hu, J. S., ... Baer, R. (1994). Preferred sequences for DNA recognition by the TAL1 helix-loop-helix proteins. *Molecular and Cellular Biology*.
<https://doi.org/10.1128/mcb.14.2.1256>
- Hwang, L., Siegelman, M., Davis, L., Oppenheimer-Marks, N., & Baer, R. (1993). Expression of the TAL1 proto-oncogene in cultured endothelial cells and blood vessels of the spleen. *Oncogene*, 8(11), 3043–3046.
- Imamura, M., Mochizuki, Y., Engvall, E., & Takeda, S. (2005). E-Sarcoglycan compensates for lack of α -sarcoglycan in a mouse model of limb-girdle muscular dystrophy. *Human Molecular Genetics*, 14(6), 775–783.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddi072>
- Jousen, A. M., & Bornfeld, N. (2009). The Treatment of Wet Age-Related Macular Degeneration, 106(18).
<https://doi.org/10.3238/arztebl.2009.0312>
- Kaiser, P. K. (2009). Prospective evaluation of visual acuity assessment: a comparison of snellen versus etdrs charts in clinical practice (an aos thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*, 107, 311–324.
- Klein, R. (2011). Prevalence of Age-Related Macular Degeneration in the US Population. *Archives of Ophthalmology*, 129(1), 75.
<https://doi.org/10.1001/archophthalmol.2010.318>
- Kumar, M. (n.d.). Digital image processing, 81–102.
- Lancioni, A., Rotundo, I. L., Kobayashi, Y. M., D’Orsi, L., Aurino, S., Nigro, G., ... Nigro, V. (2011). Combined deficiency of alpha and epsilon sarcoglycan

disrupts the cardiac dystrophin complex. *Human Molecular Genetics*, 20(23), 4644–4654. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr398>

Lavallee, C. R., Chalifoux, J. R., Moosally, A. J., & Balkema, G. W. (2006). Elevated Free Calcium Levels in the Subretinal Space Elevate the Absolute Dark-Adapted Threshold in Hypopigmented Mice. *Journal of Neurophysiology*, 90(6), 3654–3662. <https://doi.org/10.1152/jn.00736.2003>

Lebakken, C. S., Venzke, D. P., Hrstka, R. F., Consolino, C. M., Faulkner, J. A., Williamson, R. A., & Campbell, K. P. (2002). Sarcospan-Deficient Mice Maintain Normal Muscle Function. *Molecular and Cellular Biology*, 20(5), 1669–1677. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.5.1669-1677.2000>

Lee, P. Y., Costumbrado, J., Hsu, C.-Y., & Kim, Y. H. (2012). Agarose Gel Electrophoresis for the Separation of DNA Fragments, (62), e3923. <https://doi.org/doi:10.3791/3923>

Leinonen, H., & Tanila, H. (2017). Vision in laboratory rodents-Tools to measure it and implications for behavioral research. *Behavioural Brain Research*, (May), 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2017.07.040>

Lin, W. Y., & Lee, W. C. (2010). Incorporating prior knowledge to facilitate discoveries in a genome-wide association study on age-related macular degeneration. *BMC Research Notes*, 3, 2–6. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-3-26>

Lipskaia, L., & Lompré, A. M. (2004). Alteration in temporal kinetics of Ca²⁺ signaling and control of growth and proliferation. *Biology of the Cell*, 96(1), 55–68. <https://doi.org/10.1016/j.biolcel.2003.11.001>

Lipskaia, L., Pinet, C., Fromes, Y., Hatem, S., Cantaloube, I., Coulombe, A., & Lompré, A. M. (2007). Mutation of δ -sarcoglycan is associated with Ca²⁺-dependent vascular remodeling in the syrian hamster. *American Journal of Pathology*, 171(1), 162–171. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.070054>

- Liu, L. A., & Engvall, E. (1999). Sarcoglycan isoforms in skeletal muscle. *Journal of Biological Chemistry*, 274(53), 38171–38176. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.53.38171>
- Livsey, C. T., Huang, B., Xu, J., & Karwoski, C. J. (1990). Light-evoked changes in extracellular calcium concentration in frog retina. *Vision Research*, 30(6), 853–861. [https://doi.org/10.1016/0042-6989\(90\)90054-O](https://doi.org/10.1016/0042-6989(90)90054-O)
- Loeffler, K. U., & Mangini, N. J. (1998). Immunohistochemical localization of Na⁺/Ca²⁺ exchanger in human retina and retinal pigment epithelium. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 236(12), 929–933. <https://doi.org/10.1007/s004170050182>
- Luna-Angulo, A. B. (2013). *Análisis de polimorfismos del gen SGCD en la Degeneración Macular Relacionada con la Edad en pacientes mexicanos*. Instituto Politécnico Nacional, Escuela Superior de Medicina.
- Mahmood, T., & Yang, P. (2012). Western Blot : Technique , Theory , and Trouble Shooting, 4(9), 7–12. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- Mangini, N. J., Haugh-Scheidt, L., Valle, J. E., Cragoe, E. J., Ripps, H., & Kennedy, B. G. (1997). Sodium-calcium exchanger in cultured human retinal pigment epithelium. *Experimental Eye Research*, 65(6), 821–834. <https://doi.org/10.1006/exer.1997.0390>
- Martinez-Lemus, L. A., Hill, M. A., Bolz, S. S., Pohl, U., & Meininger, G. A. (2004). Acute mechanoadaptation of vascular smooth muscle cells in response to continuous arteriolar vasoconstriction: implications for functional remodeling. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*.
- Masuda, T., Shimazawa, M., & Hara, H. (2017). Retinal Diseases Associated with Oxidative Stress and the Effects of a Free Radical Scavenger (Edaravone). *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017, 1–14. <https://doi.org/10.1155/2017/9208489>

- MedlinePlus. (2017). Degeneración macular. *Biblioteca Nacional de Medicina de Los EE. UU. NIH*. Retrieved from https://medlineplus.gov/spanish/ency/esp_imagepages/19532.htm
- Mookiah, M. R. K., Acharya, U. R., Koh, J. E. W., Chandran, V., Chua, C. K., Tan, J. H., ... Laude, A. (2014). Automated diagnosis of Age-related Macular Degeneration using greyscale features from digital fundus images. *Computers in Biology and Medicine*, 53, 55–64. <https://doi.org/10.1016/j.combiomed.2014.07.015>
- Mousavi, M., & Armstrong, R. A. (2013). Genetic risk factors and age-related macular degeneration (AMD). *Journal of Optometry*, 6(4), 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.optom.2013.07.002>
- Murphy, D. (1993). Isolation of Genomic DNA from Tail Tissue. In D. Murphy & D. A. Carter (Eds.), *Transgenesis Techniques: Principles and Protocols* (pp. 309–312). Totowa, NJ: Humana Press. <https://doi.org/10.1385/0-89603-245-0:309>
- Nayyer, R., Sharma, B., & Sharma, E. B. (2015). Use and analysis of Color Models in Image Processing * Correspondence Info :, *01(08)*, 329–330. <https://doi.org/10.7439/ijasar>
- Nielsen, K., Mogensen, H. S., Hedman, J., Niederstätter, H., Parson, W., & Morling, N. (2008). Comparison of five DNA quantification methods. *Forensic Science International: Genetics*, 2(3), 226–230. <https://doi.org/10.1016/j.fsigen.2008.02.008>
- Ochoa, L. (1999). Norma Oficial Mexicana, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. *Nom-062-Zoo*, 1–58.
- Olson, N. D., & Morrow, J. B. (2012). DNA extract characterization process for microbial detection methods development and validation. *BMC Research Notes*, 5(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-668>

- OMS. (2002). Causes of blindness and visual impairment. Retrieved March 19, 2017, from <http://www.who.int/blindness/causes/en/>
- Ong, M. B., & Punzalan, E. R. (2014). Comparative Analysis of RGB and HSV Color Models in Extracting Color Features of Green Dye Solutions, 1–7.
- Oppenheim, A. V, Willsky, A. S., & Nawab, S. H. (1996). *Signals & Systems (2Nd Ed.)*. Upper Saddle River, NJ, USA: Prentice-Hall, Inc.
- Ordoñez-Razo, R. M., Garrido-Garduño, M. H., Pérez-Martínez, R. A., Ruiz, V. M., Herrera-Tepatlán, E., Rodríguez-Cruz, M., ... Salamanca-Gómez, F. A. (2012). A delta-sarcoglycan gene polymorphism as a risk factor for hypertrophic cardiomyopathy. *Genetic Testing and Molecular Biomarkers*. <https://doi.org/10.1089/gtmb.2011.0343>
- Pappuru, R. R., Ouyang, Y., Nittala, M. G., Hemmati, H. D., Keane, P. A., Walsh, A. C., & Sadda, S. R. (2011). Relationship between outer retinal thickness substructures and visual acuity in eyes with dry age-related macular degeneration. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(9), 6743–6748. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-6723>
- Perez-Ortiz, A. C., Luna-Angulo, A., Zenteno, J. C., Rendon, A., Cortes-Ballinas, L. G., Jimenez-Collado, D., ... Estrada-Mena, F. J. (2018). Significant association between variant in sgcd and age-related macular degeneration. *Genes*, 9(10), 1. – 11. <https://doi.org/10.3390/genes9100467>
- Pestronk, A. (n.d.). Membrane-associated protein complexes in skeletal muscle fibers & connective tissue. Retrieved from <https://neuromuscular.wustl.edu/musdist/dag2.htm>
- Posada-gómez, R. (2001). Digital Image Processing Using LabView.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, et al. (2001). Anatomical Distribution of Rods and Cones. In Sunderland (MA): Sinauer Associates (Ed.), *Neuroscience* (2nd ed.). Retrieved from

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK10848/>

Rakoczy, E. P., Yu, M. J. T., Nusinowitz, S., Chang, B., & Heckenlively, J. R. (2006). Mouse models of age-related macular degeneration. *Experimental Eye Research*, 82(5), 741–752. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2005.10.012>

Ramkumar, H. L., Zhang, J., & Chan, C. C. (2010). Retinal ultrastructure of murine models of dry age-related macular degeneration (AMD). *Progress in Retinal and Eye Research*. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2010.02.002>

Roberds, S. L., Ervasti, J. M., Anderson, R. D., Ohlendieck, K., Kahl, S. D., Zoloto, D., & Campbell, K. P. (1993). Disruption of the dystrophin-glycoprotein complex in the cardiomyopathic hamster. *Journal of Biological Chemistry*.

Sancar, F., Touroutine, D., Gao, S., Oh, H. J., Gendrel, M., Bessereau, J. L., ... Richmond, J. E. (2011). The dystrophin-associated protein complex maintains muscle excitability by regulating Ca²⁺-dependent K⁺ (BK) channel localization. *Journal of Biological Chemistry*, 286(38), 33501–33510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.227678>

Sanderson, B. A., Araki, N., Lilley, J. L., Guerrero, G., & Lewis, L. K. (2015). NIH Public Access, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2014.03.003>.Modification

Sarks, S. H., Arnold, J. J., Killingsworth, M. C., & Sarks, J. P. (1999). Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study. *British Journal of Ophthalmology*, 83(3), 358–368. <https://doi.org/10.1136/bjo.83.3.358>

Schmack, I., Kang, S. J., & Grossniklaus, H. E. (2005). Histopatología de la degeneración macular asociada a la edad. *Degeneración Macular Asociada a La Edad*, 74–75.

- Schwartz, R., & Loewenstein, A. (2015). Early detection of age related macular degeneration: current status. *International Journal of Retina and Vitreous*, 1(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/s40942-015-0022-7>
- Shahidi, M., Blair, N. P., Mori, M., Gieser, J., & Pulido, J. S. (2002). Retinal topography and thickness mapping in atrophic age related macular degeneration. *British Journal of Ophthalmology*, 86(6), 623–626. <https://doi.org/10.1136/bjo.86.6.623>
- Shoughy, S. S., & Kozak, I. (2016). Selective and complementary use of Optical Coherence Tomography and Fluorescein Angiography in retinal practice. *Eye and Vision (London, England)*, 3, 26. <https://doi.org/10.1186/s40662-016-0058-2>
- Sim, D. A. (2015). Strategies for improving early detection and diagnosis of neovascular age-related macular degeneration, 353–366.
- Smith, A. R. (1978). Color Gamut Transform Pairs. *SIGGRAPH Comput. Graph.*, 12(3), 12–19. <https://doi.org/10.1145/965139.807361>
- Solebo, A. L., Angunawela, R. I., Dasgupta, S., & Marshall, J. (2008). Recent advances in the treatment of age-related macular degeneration, (May), 309–310.
- Steinberg, R. H., & Li, J. D. (1994). Calcium gradients and light-evoked calcium changes outside rods in the intact cat retina. *Visual Neuroscience*, 11(4), 753–761. <https://doi.org/10.1017/S0952523800003059>
- Țălu, S.-D., & Țălu, Ș. (2012). Use of OCT Imaging in the Diagnosis and Monitoring of Age Related Macular Degeneration. In Y. Gui-Shuang (Ed.), *Age Related Macular Degeneration – The Recent Advances in Basic Research and Clinical Care* (pp. 253–272). INTECH. Retrieved from <http://www.intechopen.com/books/age-related-macular-degeneration-the-recent-advances-in-basic-researchand-clinical-care/use-of-oct-imaging-in-the-diagnosis-and-monitoring-of-age-related-macular-degeneration>

- Tan, S. C., & Yiap, B. C. (2009). DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2009. <https://doi.org/10.1155/2009/574398>
- Treuting, P. M., Wong, R., Tu, D. C., & Phan, I. (2012). *Special Senses: Eye. Comparative Anatomy and Histology* (First Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381361-9.00021-4>
- Tsubata, S., Bowles, K. R., Vatta, M., Zintz, C., Titus, J., Muhonen, L., ... Towbin, J. A. (2000). Mutations in the human δ -sarcoglycan gene in familial and sporadic dilated cardiomyopathy. *Journal of Clinical Investigation*. <https://doi.org/10.1172/JCI9224>
- Urbak, L., & Vorum, H. (2010). Heat Shock Proteins in the Human Eye. *International Journal of Proteomics*, 2010, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2010/479571>
- Varma, R., Fraser-Bell, S., Tan, S., Klein, R., & Azen, S. P. (2004). Prevalence of age-related macular degeneration in Latinos: The Los Angeles Latino eye study. *Ophthalmology*, 111(7), 1288–1297. <https://doi.org/10.1016/j.ophtha.2004.01.023>
- Volland, S., Esteve-Rudd, J., Hoo, J., Yee, C., & Williams, D. S. (2015). A comparison of some organizational characteristics of the mouse central retina and the human macula. *PLoS ONE*, 10(4), 1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125631>
- Vujosevic, S., & Midená, E. (2013). Retinal Layers Changes in Human Preclinical and Early Clinical Diabetic Retinopathy Support Early Retinal Neuronal and Müller Cells Alterations. *Journal of Diabetes Research*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/905058>
- Wang, Y., Zhang, Z., Wang, H., & Bi, S. (2015). Segmentation of the clustered cells with optimized boundary detection in negative phase contrast images. *PLoS ONE*, 10(6), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130178>

- Wang, Z., & Storm, D. R. (2006). Extraction of DNA from mouse tails. *BioTechniques*, 41(4), 410–412. <https://doi.org/10.2144/000112255>
- Wilding, L. A., Uchihashi, M., Bergin, I. L., & Nowland, M. H. (2015). Enucleation for Treating Rodent Ocular Disease, *54*(3), 328–332.
- Wong, W. L., Su, X., Li, X., Cheung, C. M. G., Klein, R., Cheng, C. Y., & Wong, T. Y. (2014). Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: A systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*, 2(2), e106–e116. [https://doi.org/10.1016/S2214-109X\(13\)70145-1](https://doi.org/10.1016/S2214-109X(13)70145-1)
- Wood, A., Margrain, T., & Binns, A. M. (2014). Detection of Early Age-Related Macular Degeneration Using Novel Functional Parameters of the Focal Cone Electroretinogram, *9*(5), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096742>
- X. Shaw, P., Stiles, T., Douglas, C., Ho, D., Fan, W., Du, H., & Xiao, X. (2016). Oxidative stress, innate immunity, and age-related macular degeneration. *AIMS Molecular Science*, 3(2), 196–221. <https://doi.org/10.3934/molsci.2016.2.196>
- Yilmaz, M., Ozic, C., & Gok, I. (2012). Principles of nucleic acid separation by agarose gel electrophoresis. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics*, 34–40. <https://doi.org/10.5772/2205>
- Young, I. T., Gerbrands, J. J., & Vliet, L. J. Van. (2007). Fundamentals of Image Processing, 1–112.
- Zangala, T. (2007). Isolation of Genomic DNA from Mouse Tails. *Journal of Visualized Experiments*, (6), 246. <https://doi.org/10.3791/246>