



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA RETINA
MEDIDA POR ELECTRORETINOGRAMA (ERG) EN RATONES Y HUMANOS:
IMPLICACIÓN EN CONDICIONES DE OBESIDAD**

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
L.N. RAMSES NOGUEZ IMM

TUTOR:
DRA. STÉPHANIE COLETTE THÉBAULT
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA UNAM
COMITÉ TUTOR:
DR. JOSÉ FERNANDO PEÑA ORTEGA
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA UNAM
ASESORA EXTERNA:
DRA. ELVIRA GALARRAGA PALACIO
INSTITUTO DE FISILOGIA CELULAR, UNAM

Juriquilla, Querétaro, diciembre de 2022



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.

Agradecimientos.

Agradezco al Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a CONACYT por la beca #620199 que he recibido para recibir este trabajo.

Agradezco a los miembros de mi comité tutor, a la Dra. María Elvira Galarraga Palacio y el Dr. José Fernando Peña Ortega.

Agradezco al Dr. Ricardo Miledi[†], al Dr. Ataúlfo Martínez Torres, y al Dr. José Fernando Peña Ortega por haberme recibido en sus respectivos laboratorios. Agradezco a la Dra. Edith Espino Saldaña y al Dr. Benito Ordaz por el apoyo técnico que me brindaron para dominar las técnicas necesarias a la realización de mi proyecto doctoral.

Agradezco a la Dra. Alejandra Castilla León y el MVZ. José Martín García Servín del laboratorio universitario de bioterio.

Agradezco a doña Marina Ramírez Romero auxiliar del laboratorio D-15

Agradezco al Dr. Manuel Miranda Anaya por compartir especímenes de la cepa *Neotomodon alstoni*.

Beca para obtención de grado del donativo PAPIIT-DGAPA IN205420

Agradezco a la Dra. Stéphanie Thébault por su incondicional apoyo durante toda mi formación académica.

Agradezco a la M. en C. Leonor Casanova Rico, Dra. Nuri Aranda López a Ma. Carmen Mendoza López por su apoyo y coordinación en la unidad de enseñanza del INB y a la Lic. Lourdes Lara Ayala por su colaboración en la unidad de videoconferencia.

Agradezco a mi familia y amigos que siempre me han apoyado.

Abstract

Given the ever-increasing prevalence of type 2 diabetes and obesity, the pressure on global healthcare is expected to be colossal, especially in terms of blindness. Electroretinogram (ERG) has long been perceived as a first-use technique for diagnosing eye diseases, but existing methods are insufficient to screen early risk factors of diabetic retinopathy (DR). The electroretinogram (ERG) is one of the main tools to measure retinal function alterations in disease, and one of the earliest alterations in patients with DM2, is the reduction and slowdown of the oscillatory potentials (PO's), which have been proposed as an early marker of DR. However, fluctuations in retinal field potential have never been considered as a marker of T2DM risks.

In this work, the spontaneous oscillatory activity of the retina has been studied in animal models of obesity and in patients with overweight, obesity, metabolic syndrome and DM without RD. This activity is present between 0.1 to 10 Hz in mice, and is altered in the high-fat diet-induced obesity model and in a spontaneous model of obesity in mice. In humans, we observed that spontaneous activity (0.3-40 Hz) measured by ERG is also modified in our study groups, before the OPs are altered. Additionally, we observed that the retinal activity corresponds to the frequencies below 2.1 Hz, according to spectral, correlation and coherence analysis. Using pharmacological approaches combined with *ex vivo* ERG, we showed that this signal comes from the inner part of the retina and depends on gap junctions. These results show the importance of studying spontaneous retinal activity as a biomarker of early alterations of retinal function associated with obesity, and to propose early therapeutic strategies to reduce or avoid retinal complications that can lead to vision loss in patients with risk factors for DM2.

Resumen

Debido al aumento en la prevalencia de la obesidad y diabetes mellitus tipo 2 (DM2), se prevé que los gastos en salud para combatir sus consecuencias sean insostenibles, en especial, por la ceguera ocasionada por la retinopatía diabética (RD). Por lo anterior, métodos de diagnóstico temprano de los factores de riesgo de DM2 son necesarios. El electroretinograma (ERG) es una de las principales herramientas para medir las alteraciones funcionales de la retina en condiciones de enfermedad, y unas de las alteraciones más tempranas medidas por el ERG evocado en pacientes con DM2, han sido la reducción y ralentización en los potenciales oscilatorios (PO's), por lo que se han propuesto como marcador temprano de la RD. Sin embargo, nunca se ha contemplado las fluctuaciones del potencial de campo de la retina como marcador de las condiciones de riesgo de DM2.

En el presente trabajo, se ha estudiado la actividad oscilatoria espontánea de la retina en modelos animales de obesidad y en pacientes con sobrepeso, obesidad, síndrome metabólico y DM sin RD. Dicha actividad se encuentra en un rango de 0.1 a 10 Hz en ratones, y se altera en un modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasa y otro de obesidad espontánea en ratón. Además, en humanos, observamos que también se modifica la actividad espontánea (0.3-40 Hz) medida por ERG en nuestros grupos de estudio, antes de que se alteren los PO's. Adicionalmente, observamos que la actividad propia de la retina corresponde a las frecuencias debajo de 2.1 Hz, de acuerdo con análisis espectrales, de correlación y de coherencia. Mediante aproximaciones farmacológicas combinadas con ERG *ex vivo*, mostramos que esta señal proviene de la parte interna de la retina y que depende de las uniones comunicantes. Estos resultados, muestran la importancia del estudio de la actividad espontánea de la retina para su uso como biomarcador de alteraciones tempranas de la función retiniana en asociación con la obesidad, y para plantear estrategias terapéuticas tempranas para disminuir o evitar las complicaciones retinianas que pueden llevar a la pérdida de la visión en pacientes con factores de riesgo para DM2.

Abreviaturas

AMF	Ácido meclofenámico
BHR	Barrera hematorretiniana
CGc	Capa de células ganglionares
cGMP	Fosfato del guanosín monofosfato cíclico
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
DAG	Dieta alta en grasa
DM	Diabetes Mellitus
EPR	Epitelio pigmentario retiniano
ERG	Electrorretinograma
GABA	Ácido gamma-aminobutírico
IMO	Instituto mexicano de oftalmología
INDEREB	Instituto de la retina del bajo
PO	Potenciales oscilatorios
RD	Retinopatía diabética
SM	Síndrome Metabólico

Contenido

AGRADECIMIENTOS.....	2
ABSTRACT	4
RESUMEN.....	5
ABREVIATURAS	6
I. INTRODUCCIÓN	10
I.1. LA RETINA, MÁS ALLÁ DE UN RECEPTOR SENSORIAL.....	11
I.1.A MORFOFISIOLOGÍA DE LA RETINA.....	12
I.1.B PRINCIPALES CIRCUITOS NEURONALES EN LA RETINA.....	15
I.1.C FUNCIONES DE LA RETINA Y SU MODULACIÓN.....	19
I.1.C.A FUNCIÓN RECEPTORA DE LA RETINA O FOTOTRANSDUCCIÓN.....	20
I.1.C.B SEPARACIÓN DE LAS SEÑALES LUMINOSAS EN VÍAS ON Y OFF	22
I.1.C.C DETECCIÓN DE COLOR.....	24
I.1.C.D DETECCIÓN DE CONTRASTE.....	25
I.1.C.E ADAPTACIÓN A LA LUZ.....	26
I.1.C.F REGULACIÓN DE LOS CICLOS CIRCADIANOS EN LA RETINA	27
I.2 EL ELECTRORETINOGRAMA (ERG) Y LA ACTIVIDAD INTRÍNSECA DE LA RETINA.....	28
I.3 IMPACTO DE LAS ALTERACIONES METABÓLICAS EN LOS CIRCUITOS DE LA RETINA.....	32
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	34
III. HIPÓTESIS	35
IV. OBJETIVO GENERAL.....	35
IV.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
V.1 ÉTICA	35
V.2 REACTIVOS.....	36
V.3 ANIMALES	36
V.4 IMPLEMENTACIÓN DE MODELO DE OBESIDAD CON DIETA ALTA EN GRASA EN RATÓN.....	37
V.5 DESCRIPCIÓN DE LOS DATOS EN HUMANOS.....	37
V.6 EXPLANTES DE RETINA	39

V.7 ELECTORRETINOGRAMA (ERG)	39
V.7.1 <i>IN VIVO</i>	39
V.7.2 <i>EX VIVO</i>	40
V.8 MEDICIÓN DE MOVIMIENTOS DEL RATÓN	40
V.9 ANÁLISIS DE ERG	40
V.10 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	41
VI. RESULTADOS	43
VI.1 ¿LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA RETINA MEDIDA POR ERG SE MODIFICA EN CONDICIONES DE OBESIDAD?	43
VI.1.A. IMPLEMENTACIÓN DEL MODELO DE OBESIDAD POR DIETA ATA EN GRASA EN EL RATÓN	43
VI.1.B ALTERACIONES DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA REGISTRADA POR ERG EN MODELOS DE OBESIDAD EN RATÓN	46
.....	48
.....	49
VI.1.C VALORACIÓN DE LOS COMPONENTES ESPECTRALES DEL ERG NO EVOCADO A LO LARGO DEL TIEMPO EN EL MODELO DE OBESIDAD INDUCIDO POR DIETA ALTA EN GRASA	49
.....	50
.....	51
VI.1.D ALTERACIONES DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA ESPONTÁNEA REGISTRADA POR ERG EN ASOCIACIÓN CON FACTORES DE RIESGO PARA LA DIABETES TIPO 2 EN EL HUMANO	52
.....	57
VI.2 APROXIMACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS DE LA ACTIVIDAD ESPONTÁNEA DE LA RETINA MEDIDA POR ERG	58
.....	62
.....	63
VII. DISCUSIÓN	63
VIII. CONCLUSIONES	71
IX. BIBLIOGRAFÍA	73

I. Introducción

Las oscilaciones espontáneas del cerebro en estado de reposo, también conocidas como «ruido» o actividad basal, son propiedades emergentes de la actividad de distintos circuitos neuronales, entre ellos los de la corteza visual (1). Esta actividad representa el balance entre las entradas sinápticas excitadoras e inhibitoras que reciben las neuronas, que dependen de las propiedades intrínsecas y el tipo de conexiones entre las neuronas que forman los circuitos (2). Cabe precisar que células individuales pueden presentar actividad espontánea, y el registro de esta actividad en el potencial de campo, se debe a la actividad sincronizada de grupo neuronales (1). Uno de los intereses en estudiar dicha actividad, es que se modifica en condiciones patológicas (2), y se ha propuesto como un biomarcador en la epilepsia (3), y otros trastornos neurodegenerativos (4).

En la retina en desarrollo, se han descrito circuitos transitorios que generan ondas espontáneas (5–7). En la etapa adulta, la retina parece no presentar actividad espontánea, a menos que sea sujeta a procesos neurodegenerativos como es la retinitis pigmentosa (8,9), o que las sinapsis químicas excitatorias e inhibitoras de la retina sean bloqueadas farmacológicamente (10–12). Esto muestra que la retina de adulto cuenta con los componentes necesarios para generar oscilaciones espontáneas (13). Sin embargo, se han estudiado poco y siempre de forma invasiva. Asimismo, si bien se cuenta con información sobre la disfunción retiniana en condiciones de diabetes (14–19), que incluye cambios morfológicos y funcionales en los circuitos de la retina expuesta a altas concentraciones de glucosa (20), así como daños en los microcircuitos que controlan la inhibición en la retina (21), se sabe muy poco sobre la contribución de la actividad espontánea de la retina en etapas tempranas de esta enfermedad.

La mayoría de los casos de retinopatía diabética derivan de la diabetes tipo 2, debido a que su prevalencia es mayor a la diabetes tipo 1 (22). El principal factor de riesgo de la diabetes tipo 2, es la obesidad, la cual resulta del aumento de los ácidos grasos libres en la sangre a causa de un desequilibrio a favor de una ingesta calórica excesiva, ocasionando una pérdida en la homeostasis glucémica (23).

Es en ese contexto que se ubica el presente trabajo, enfocado a estudiar la actividad espontánea de la retina medida por una técnica no invasiva, a saber, el electroretinograma (ERG), tanto en condiciones control como en un modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasa en el ratón, el cual recapitula las alteraciones sufridas por los pacientes con prediabetes, que incluyen, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y obesidad (24).

Como antecedentes del trabajo, se presentan la retina y sus funciones, con un enfoque particular en la contribución de los circuitos retinianos en ellas, así como lo reportado sobre las alteraciones en la actividad neuronal intrínseca de la retina u otras partes del sistema nervioso central, asociadas a la obesidad, prediabetes y diabetes.

I.1. La retina, más allá de un receptor sensorial

Para poner en contexto la importancia de la retina y sus componentes en la visión, se debe mencionar algunas nociones generales sobre los sistemas sensoriales en el ámbito físicosensible. Los órganos sensoriales son órganos capaces de detectar una gran variedad de estímulos físicos que nos rodean, sonidos, olores, sabores y luz, por mencionar algunos de ellos, y transducir estos estímulos a señales neuronales, para que puedan ser interpretados por el cerebro con el fin de obtener información del entorno y generar una respuesta adecuada (25). Son formados por receptores sensoriales y partes del sistema nervioso responsables de procesar la información sensorial (25).

En general, un estímulo genera un cambio electroquímico tras la activación de su receptor, iniciando con un cambio en el potencial de membrana de la célula receptora (26). Esa información puede ser transmitida a la médula espinal y después al cerebro, o directamente al cerebro como sucede en el sistema visual (26). Posteriormente, la información es procesada en distintas áreas del cerebro dedicadas a estímulos específicos, como son la corteza auditiva primaria o la corteza visual primaria, que a su vez envían esta información a áreas asociativas del cerebro, donde se integra la información sensorial para tener una percepción

precisa del estímulo sensorial, como lo son la identificación y localización de objetos en el campo visual (27).

La retina, además de ser el tejido donde se transducen las señales luminosas en estímulos electroquímicos, proceso conocido como fototransducción, cuenta con arreglos neuronales en vías radiales y circuitos que contribuyen a separar las señales luminosas en canales ON y OFF, a la percepción de color, detección y refuerzo de contraste, detección de rasgos, adaptación a distintas intensidades luminosas para poder ver de día y de noche, regulación de los ciclos circadianos, sincronización de los movimientos oculares, control de la pupila y estabilización espacial de la imagen, es decir, la posibilidad de discriminar posición y movimiento de objetos (28–31). Por lo que, en la retina ocurre un preprocesamiento de la información lumínica antes de ser enviada al cerebro (32).

I.1.A Morfofisiología de la retina

La retina es una delgada lamina de tejido nervioso sensible a la luz, que recubre los tres cuartos posteriores del globo ocular, en su parte interna (33) (**Figura 1A**). Su estructura es estratificada y se describen clásicamente diez capas retinianas, desde la más externa (coroides) hasta la más interna (vítreo):

1. Epitelio pigmentario retiniano (EPR)
2. Segmentos externos de los fotorreceptores (SE)
3. Membrana limitante externa (MLE)
4. Capa nuclear externa (CNE)
5. Capa plexiforme externa (CPE)
6. Capa nuclear interna (CNI)
7. Capa plexiforme interna (CPI)
8. Capa de células ganglionares (CCG)
9. Capas de fibras del nervio óptico (CFNO)
10. Membrana limitante interna (MLI)

En estas capas se distribuyen los cinco tipos principales de neuronas retinianas, los fotorreceptores, las células horizontales, bipolares, amacrinas y

ganglionares (34,35). Estas células están dispuestas en las tres capas nucleares y las dos sinápticas conocidas como capas plexiformes (29,36). Los fotorreceptores se encuentran en la capa nuclear más externa y liberan glutamato a las dendritas de las células bipolares y horizontales en la capa plexiforme externa (37). Las células bipolares, a su vez, proyectan a la capa plexiforme interna, donde se conectan a las dendritas de las células amacrinas y células ganglionares vía sinapsis excitatorias glutaminérgicas (38). Finalmente, las células ganglionares integran la información que reciben y la envían a través de sus axones que forman el nervio óptico, al núcleo geniculado lateral, que envía a su vez información a la corteza visual en el lóbulo occipital, en las áreas 17, 18 y 19 (32). Los conceptos aquí referidos se ilustran en la **Figura 1B**.

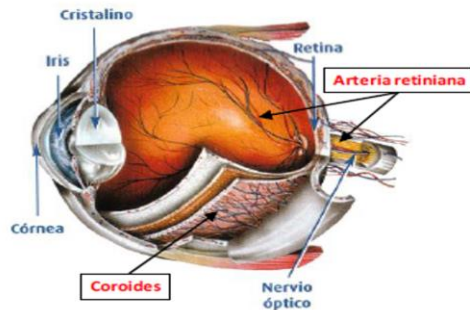
Desde que los trabajos de Ramon y Cajal permitieron observar la organización de las células de la retina (39), se ha propuesto que su función es determinada por la disposición de los distintos tipos celulares de forma laminar. Cada tipo celular en la retina es indispensable para la función visual, pero no todas son capaces de detectar la luz. Además de las neuronas ya mencionadas, otro tipo celular de origen neuroectodérmico en la retina, son las células del epitelio pigmentario retiniano (EPR), localizadas entre los segmentos externos de los fotorreceptores y la membrana de Bruch's, que separa la retina de los vasos fenestrados de la coroides que irrigan a la retina por su parte externa (40) (**Figura 1B**). Cabe señalar que las uniones estrechas que unen el EPR, de tipo monocúbico, forman parte de la barrera hematorretiniana externa (40). Asimismo las principales funciones del EPR son, el reciclado de los fotopigmentos usados por los fotorreceptores, la absorción de la luz que no ha sido procesada en los fotorreceptores, la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, el mantenimiento del balance iónico en el espacio sub-retiniano, la eliminación de los desechos de la retina al torrente sanguíneo, así como el suplir nutrientes a la retina (40). La retina cuenta también con células gliales, de tres tipos : la microglía, los astrocitos y las células de Müller, que ayudan a mantener la homeostasis en la retina a nivel de la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, eliminación de los desechos neuronales, y liberación de neurotransmisores, entre otros (41). Las células de Müller, astrocitos y microglia difieren en su forma y

localización; los núcleos de las células de Müller se encuentran en la capa nuclear interna y extienden sus procesos desde la capa nuclear externa hasta la capa de las células ganglionares (41). Así forman las membranas limitantes externa e interna, respectivamente (41). Los núcleos y procesos de la microglía se encuentran en las capas plexiformes; los cuerpos celulares y procesos de los astrocitos se encuentran en la capa de fibras nerviosas de la retina (41,42). Los procesos de los astrocitos y las células de Müller rodean los vasos sanguíneos de tipo capilar (41,42) en la CNI (42,43), los cuales, comparten una lámina basal con los pericitos (44) y junto con las uniones estrechas entre las células endoteliales, forman la barrera hematorretiniana interna (45). Cabe mencionar que las células endoteliales mismas pueden regular el flujo sanguíneo dentro de la retina, modulando la dilatación y constricción de los capilares intraretinianos, a través de mediadores moleculares como son el óxido nítrico, los metabolitos del ácido araquidónico y la proteína endotelina-1 (46). Conjuntamente, las células gliales, las células endoteliales y los pericitos, funcionan para responder ante las demandas de la retina, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (47). Históricamente, estos tipos celulares han sido considerados como accesorios a la función nerviosa, sin embargo, esa visión debe ampliarse, tomando en cuenta que, con las neuronas, las células gliales, endoteliales, los pericitos y el EPR, forman parte de la unidad neurovascular retiniana y son imprescindibles a su función (47). Además, son vectores esenciales de los cambios provocados por enfermedades metabólicas adquiridas, hacia los componentes de los circuitos de la retina (45,48).

Posterior al procesamiento de la luz por la parte óptica del ojo (49), la señal luminosa es transducida en una señal bioeléctrica en los fotorreceptores. Se detallan la fototransducción y otras funciones de la retina, una vez descritos los principales circuitos de la retina.

Figura 1

A



B

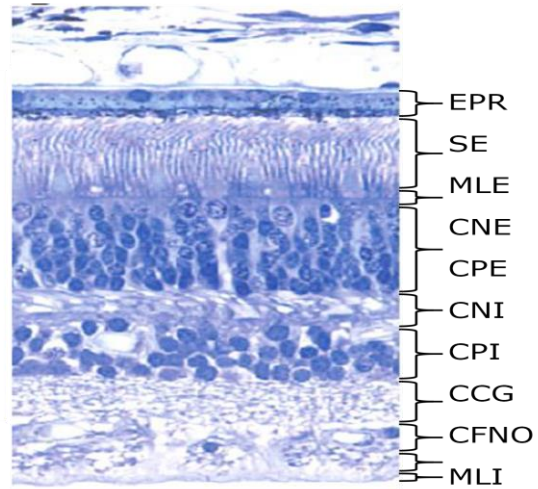


Figura 1: Estructura de la retina y sus componentes.

A) se muestra la localización anatómica de la retina. **B)** Corte transversal de la retina humana teñida con hematoxilina /eosina donde se aprecia la distribución de las distintas capas que la conforman (epitelio pigmentario retiniano (EPR), segmentos externos de los fotorreceptores (SE), membrana limitante externa (MLE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CCG), capas de fibras del nervio óptico (CFNO), membrana limitante interna (MLI)).

I.1.B Principales circuitos neuronales en la retina

Se ha mencionado que la actividad oscilatoria de un circuito neuronal está mediada por las propiedades intrínsecas de las células que lo conforman, la arquitectura de sus conexiones y la dinámica de sus interacciones sinápticas (50). En estas redes intervienen las neuronas excitatorias y juegan un papel fundamental las interneuronas inhibitorias.

Hay diferentes tipos de arreglos neuronales locales o microarreglos (**Figura 2A**, modificado de John H. Byrne (51)):

- la *excitación "feed-forward"*, que permite que una neurona transmita información excitatoria directamente a su vecina;
- la *inhibición "feed-forward"*, se refiere a una célula presináptica que excita una interneurona (neurona interpuesta entre dos neuronas) inhibidora y esta inhibe la siguiente célula seguidora;
- la *excitación divergente*, que permite que una neurona se comuniquen con muchas neuronas seguidoras en una red;
- la *excitación convergente*, que permite que una neurona reciba información de muchas neuronas en una red;
- la *inhibición lateral*, donde una célula presináptica excita las interneuronas inhibidoras que inhiben a su vez, a células inmediatamente adyacentes a la neurona excitatoria de la red.
- la *retro-inhibición o retro-alimentación inhibitoria*, en la cual una célula presináptica se conecta a una célula postsináptica y, a su vez, la célula postsináptica se conecta a una interneurona, que luego inhibe la célula presináptica. Este circuito puede limitar la excitación en una vía. Cierta excitación inicial se apagaría después de que la interneurona se active en respuesta a la excitación inicial.
- la *inhibición recurrente*, donde cada neurona de una cadena cerrada inhibe la neurona a la que está conectada.
- la *retroalimentación excitatoria*, una neurona presináptica excita una neurona postsináptica y esa neurona postsináptica excita la neurona presináptica.
- la *excitación recurrente*, que son variantes de excitación por retroalimentación en las que una neurona presináptica excita una neurona postsináptica, que puede retroalimentar para excitarse a sí misma u otras.

De los cuales, la mayoría existe en la retina (**Figura 2B**).

Figura 2

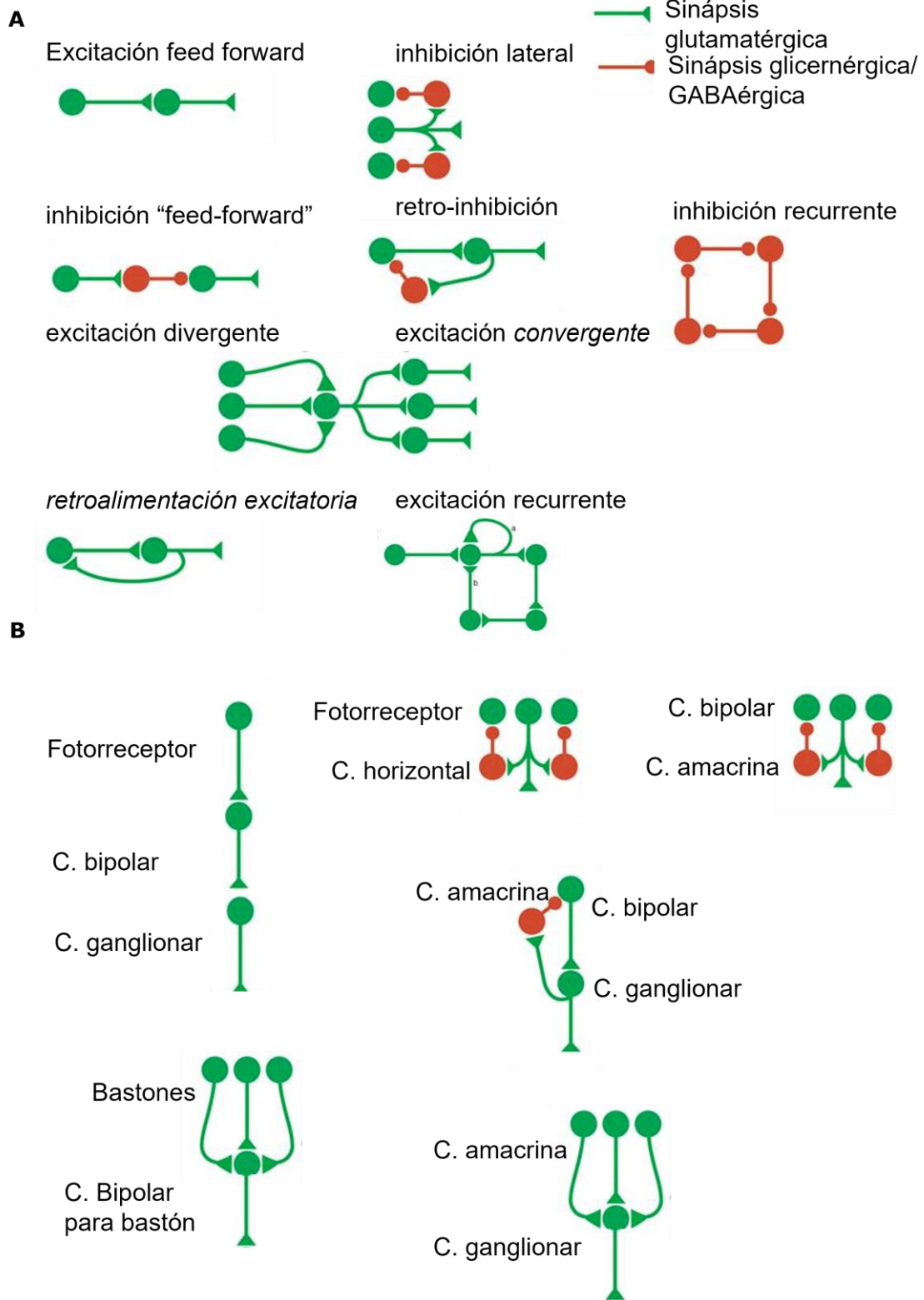


Figura 2: Organización de microcircuitos neuronales. **A)** Tipos de microcircuitos neuronales reportados en el sistema nervioso y **B)** en la retina con las células que los componen. C., célula.

componentes del circuito de la CPE son, las sinapsis químicas que conectan las terminales de los fotorreceptores a las dendritas de las células bipolares y horizontales (37) y los axones inhibidores de las células horizontales que conectan con el cuerpo celular de los fotorreceptores (52). De esta manera, la inhibición de las células horizontales hacia los fotorreceptores, representan mecanismos de retroalimentación negativa (52). Además, se ha descrito un circuito formado por los fotorreceptores de tipo cono, las células bipolares de bastones y las células horizontales que puede dar origen a oscilaciones espontáneas (53). La frecuencia de estas oscilaciones es dependiente de la edad posnatal, por lo que estas oscilaciones podrían usarse como un biomarcador de neurodegeneración (54). Mientras que, el circuito de la CPI está compuesto por los axones de las células bipolares conectados a las células amacrinas y ganglionares (55). En la CPI, las células amacrinas hacen sinapsis con otras células amacrinas, células bipolares y células ganglionares (55). Aquí, las células amacrinas pueden hacer sinapsis recíproca con los axones de las células bipolares, generando una retroalimentación negativa a los axones de las células bipolares (56). Este circuito es importante para la formación de los campos receptivos (38). También las células amacrinas producen inhibición lateral, manteniendo apagadas vías paralelas y pueden generar inhibición vertical, inhibiendo las respuestas de las células ganglionares.

Las células bipolares contribuyen tanto a los circuitos de la CPE como de la CPI, y una subpoblación de células amacrinas, las células interplexiformes, proporcionan una vía intrarretiniana desde la CPE a la CPI (57) ; en sus dendritas hacen sinapsis con células amacrinas y prolongan sus procesos hasta hacer sinapsis con células bipolares de bastones y conos, y directamente en las terminales sinápticas de los conos (58). Las células interplexiformes son GABAérgicas, generando una inhibición en las células con las que hace sinapsis en la CPE (58). De esta forma, las células interplexiformes mantienen una retroalimentación negativa entre las dos capas sinápticas de la retina.

Cabe añadir que también existen redes formadas por sinapsis eléctricas entre los cinco tipos neuronales de la retina : entre fotorreceptores de tipo conos, bastones y conos y bastones entre sí, células horizontales entre sí, células amacrinas de tipo

All entre sí, células All con células bipolares específicas para conos, y células ganglionares entre sí (59). Se ha descrito por ejemplo que las células amacrinas tienen conexión eléctrica con células bipolares, a través de uniones comunicantes o GAP, lo que les permite tener una comunicación bidireccional (**Figura 3**) (31,55,60).

Dichos circuitos son en realidad más complejos, debido a que existen varios subtipos de cada tipo neuronal. De forma resumida, se comenta que 9 a 17 tipos morfológicos de células bipolares, 4 de células horizontales, 22 a 30 de células amacrinas, y 20 de células ganglionares, se han descrito en la retina de vertebrados (35).

Por lo general, los circuitos de la retina les permiten a las vías paralelas enviar información entre ellas, además de modular la respuesta que generan las neuronas al recibir un estímulo.

I.1.C Funciones de la retina y su modulación

La visión es el sentido más importante para desplazarnos en nuestro entorno, en el que están presentes estímulos visuales de diversas naturalezas, como los colores, texturas, objetos en movimiento y ambientes muy oscuros o brillantes. La retina debe ser capaz de detectar todos estos estímulos, adaptando su respuesta en función a los cambios en el ambiente, como, por ejemplo, cuando se cambia drásticamente la luminiscencia ambiental al salir de un cuarto oscuro a la luz del día. Para eso, la retina cuenta con vías y circuitos que responden solo a un tipo de estímulo como el aumento o disminución de la luminiscencia, a colores específicos, incluso es capaz de diferenciar entre un objeto que se está acercando de uno que se desplaza lateralmente.

La integridad de las vías y circuitos retinianos es imprescindible para que la retina pueda realizar sus funciones. La formación de estas vías y estos circuitos sucede durante el desarrollo, incluso antes de que la retina reciba estímulos luminosos, y depende de actividad rítmica espontáneas generadas por la misma retina (7). Además, estímulos físicos y químicos extrínsecos e intrínsecos de la retina, como la luminiscencia ambiental, hormonas proteicas y esteroides y

neurotransmisores, modulan la actividad metabólica de la retina y su función en cuanto al procesamiento de la luz (61–64). En conjunto, estos estímulos están relacionados con ritmos circadianos (64–66).

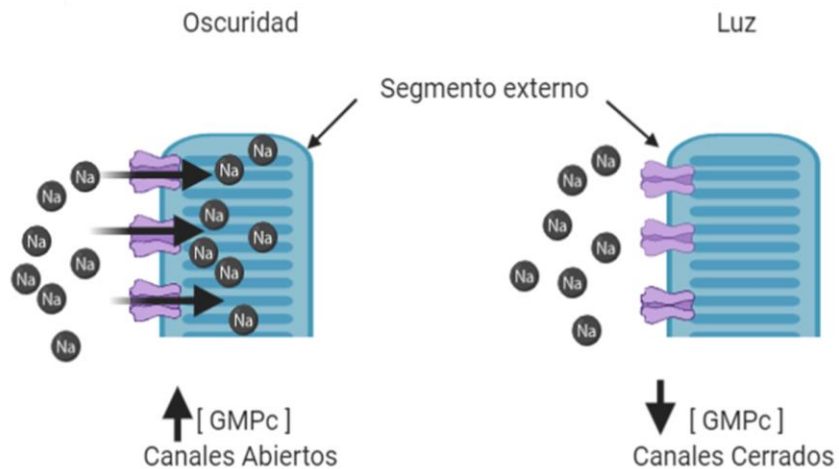
El procesamiento de las señales luminosas en la retina inicia con la fototransducción que sucede en los fotorreceptores; convierten la energía luminosa en cambios en el potencial de membrana que modulan la transmisión sináptica a las células bipolares, horizontales y amacrinas, que convergen en las células ganglionares. Distintas células ganglionares reciben información de distintas vías y circuitos, por lo que cada célula ganglionar responde distinto a un mismo estímulo (67), y el arreglo específico de los circuitos que permiten divergencia en la respuesta, representa el preprocesamiento de los estímulos luminosos antes de llegar al cerebro (27).

I.1.C.A Función receptora de la retina o fototransducción

La fototransducción inicia cuando la opsina, una proteína transmembranal en los discos de los segmentos de los fotorreceptores, es activada por un fotón (68). La opsina contiene un cromóforo, el 11-*cis* retinal, el cual cambia de conformación cuando está en contacto con fotones (69). Este cambio conformacional activa a la proteína G llamada transducina que, a su vez, activa a la proteína fosfodiesterasa que hidroliza el fosfato del guanosín monofosfato cíclico (cGMP por sus siglas en inglés), generando una disminución en la concentración de cGMP de los segmentos externos de los fotorreceptores y el cierre de canales catiónicos activados por cGMP (70). El cierre de estos canales limita la entrada de sodio a los fotorreceptores, induciendo una hiperpolarización (70). Esta hiperpolarización induce una disminución en la liberación del neurotransmisor glutamato en las terminales de los fotorreceptores hacia las células horizontales y bipolares (55). De forma inversa, la ausencia de luz o disminución en la intensidad del estímulo provoca una despolarización de las células horizontales y bipolares. La **Figura 3** esquematiza el estado de los canales catiónicos activados por cGMP en condiciones fotópicas (luz) y escotópicas (oscuridad) y la relación corriente/potencial de membrana correspondiente en los fotorreceptores.

Figura 3

A



B

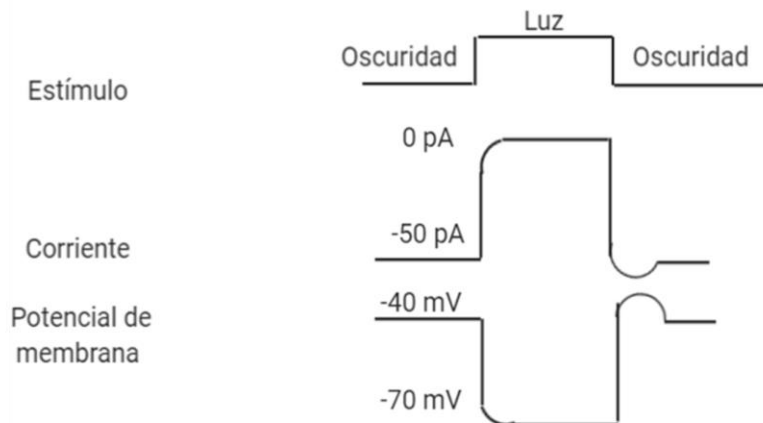


Figura 3: Estado de los canales catiónicos activados por cGMP en condiciones fotópicas (luz) y escotópicas (oscuridad) en los segmentos externos de los fotorreceptores. **A)** La transducción de la luz en los fotorreceptores resulta en una disminución en la concentración intracelular de cGMP que induce el cierre de los canales activados por cGMP. **B)** Una corriente entrante de -50 pA es suprimida por un estímulo de luz, hiperpolarizando la célula fotorreceptora a -70 mV (el potencial de equilibrio para K^+). Modificado del Principles of Neuroscience, 5ta edición, E. Kandel.

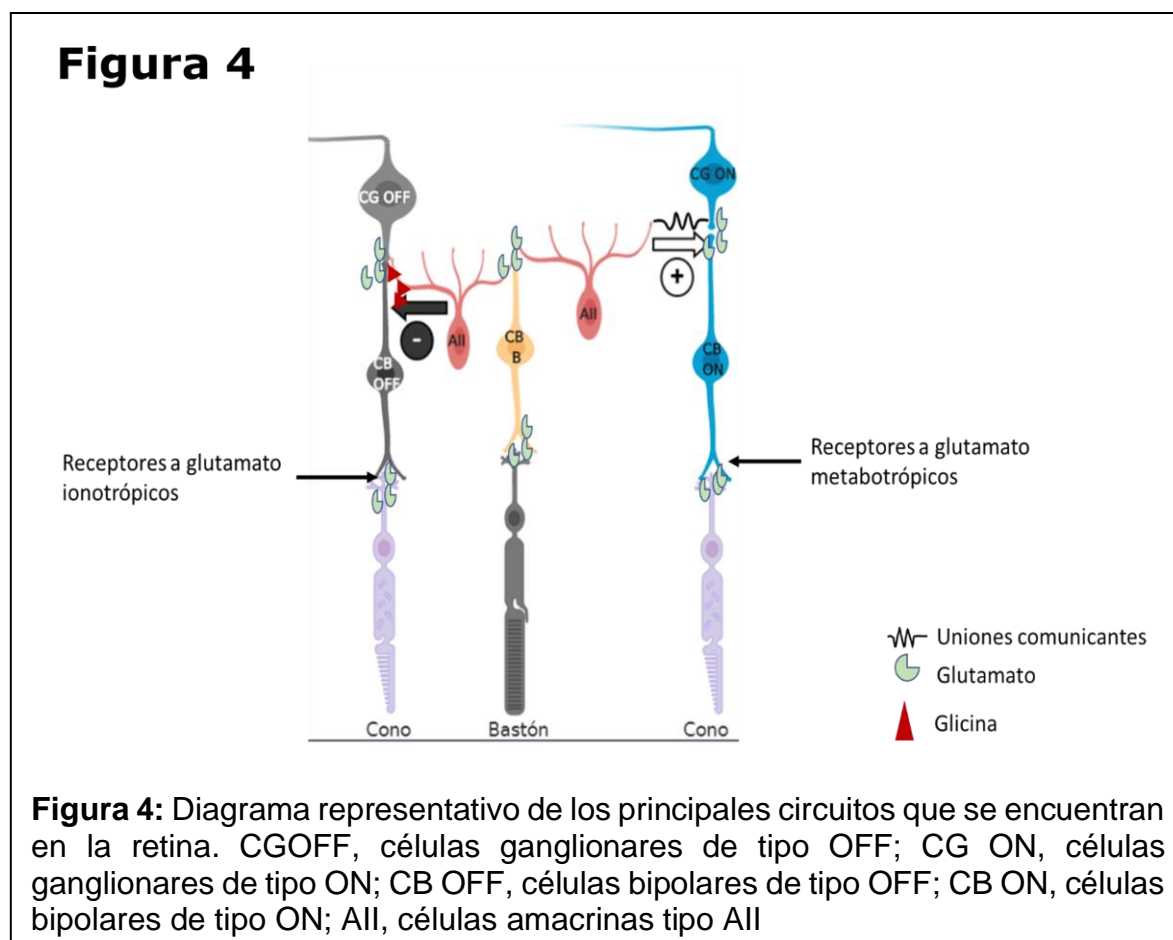
Cabe precisar que los fotorreceptores se dividen en dos tipos principales, los bastones y los conos (68). La mayoría de fotorreceptores son bastones y se encuentran en la retina periférica (71). La opsina de los bastones es la rodopsina, es muy sensible a la luz ya que puede responder a un solo fotón de luz, por lo que los bastones detectan señales en condiciones de baja luminiscencia (68). Cerca del 4 % de los fotorreceptores son conos (72). Su distribución es distinta entre las especies. En algunos mamíferos como los roedores, los conos se encuentran distribuidos a lo largo de la retina mientras que en el humano, están al centro en la macula, la parte de la retina encargada de la visión central o fina (73). Los conos, por sus conopsinas, tienen un umbral de detección de luz mucho más alto que el de los bastones y son sensibles a diferentes longitudes de onda en el espectro de la luz visible, o sea, permiten detectar señales en condiciones de alta luminiscencia y transmitir información sobre el color (68).

I.1.C.B Separación de las señales luminosas en vías ON y OFF

Además de las diferencias antes señaladas, la vía de los bastones es muy convergente; se estima que 75,000 bastones convergen sobre 5,000 células bipolares específicas para bastones y 250 células amacrinas de tipo II se conectan con 1 célula ganglionar, cuando 1 cono se conecta a 1 célula bipolar que, a su vez, se conecta a 1 célula ganglionar (74,75).

Una de las principales funciones de la retina es detectar un aumento o disminución en la luminiscencia ambiental, esta diferenciación inicia en la CPE donde los conos utilizan vías ON y OFF, paralelas, que proporcionan información sobre los aumentos y disminuciones en los niveles de luz, respectivamente (38). La diferenciación de las vías ON y OFF inicia en las sinapsis de la CPE de la retina, esto es debido al tipo de receptor a glutamato expresado en las dendritas de las células bipolares (76). Recordemos que la luz genera una hiperpolarización en el botón sináptico de los fotorreceptores, disminuyendo la liberación de glutamato en la hendidura sináptica entre el fotorreceptor y las células bipolares, mientras que la ausencia de luz provoca una liberación del neurotransmisor glutamato a las

dendritas de las células bipolares. Las células bipolares de la vía ON expresan receptores a glutamato metabotrópico de tipo mGluR6, estos canales despolarizan a las células bipolares en respuesta a una disminución en la liberación de glutamato por parte de los fotorreceptores (76) y las mantienen hiperpolarizadas en condiciones de oscuridad(77). En cambio, las células bipolares pertenecientes a la vía OFF expresan receptores a glutamato ionotrópicos de tipo NMDA, AMPA y kainato (76), que responden con una hiperpolarización a un estímulo luminoso (76). Siguiendo la lógica, en presencia de luz, las células bipolares ON liberan glutamato a las células ganglionares de centro ON, mientras que se reduce la estimulación de las células ganglionares de centro OFF por parte de las células bipolares OFF (Figura 4). En resumen, las células ganglionares retinianas de centro ON y de centro OFF forman dos vías principales que se proyectan a corteza visual desde la retina (32). Esto le permite detectar a la retina contrastes, de lo que se hablará más adelante.



A diferencia de los conos, los bastones hacen sinapsis químicas con un tipo de célula bipolar, específico para bastones que puede considerarse de tipo ON ya que expresa receptores metabotópicos a glutamato (31). Destaca que las células bipolares conectadas a los bastones no se comunican directamente con las células ganglionares, sino que lo hacen a través de células amacrinas que son GABAérgicas, de tipo A11 y A17 principalmente (31). Dichas células reciben glutamato en sus dendritas por parte de las células bipolares asociadas a bastones (31) y al despolarizarse, liberan GABA (31) a las terminales sinápticas de las células bipolares OFF de conos y a través de sinapsis eléctricas, mantienen despolarizadas las terminales sinápticas de las células bipolares ON de conos (**Figura 4**).

I.1.C.C Detección de color

La detección de los distintos patrones de color en el entorno permite a los organismos guiarse, además de permitir el reconocimiento de posibles depredadores, por lo que la detección de colores es esencial para la supervivencia (78). En la retina, la diferenciación de los colores inicia en los fotorreceptores que detectan distintas longitudes de onda (68). Estos se dividen en los fotorreceptores de tipo “Corto” (S en inglés), que detectan la luz azul, tipo “Mediano”, que detectan el verde y de tipo “Largo” que detectan el rojo y corresponden a las longitudes de onda corta, mediana y larga respectivamente (79). Sin embargo, la retina no solo puede detectar y discriminar tres longitudes de onda distintas, sino que puede abstraer las características del espectro. Esto es posible por la oposición del color entre las vías L y M que permiten detectar los colores entre rojo y verde, y S, L, M que permiten detectar los colores entre azul y amarillo (80). Esta oposición de los colores es mediada por los circuitos formados entre las células horizontales y los fotorreceptores. Las células horizontales generan una retroalimentación negativa en las terminales sinápticas de los fotorreceptores (31). Las células horizontales involucradas en la detección de color pueden clasificarse de acuerdo a su respuesta electrofisiológica en tipo “L”, que responden con una hiperpolarización a cualquier longitud de onda del espectro visible; las células horizontales de tipo “C” bifásicas

que responden con una hiperpolarización a longitudes de onda de 410 y 490 nm y con una despolarización a longitudes de onda de 570 y 690 nm; las de tipo “C” trifásicas, que responden con una hiperpolarización a longitudes de onda de 410, 570 y 690 nm y con una despolarización a longitudes de 490 nm (81).

I.1.C.D Detección de contraste

El contraste se define como la capacidad de respuesta de las células ganglionares en relación al ruido en su señal, es decir la capacidad de una célula ganglionar a responder a cambios en la luminiscencia de un objeto en comparación con el entorno. Esta relación señal/ruido de las células ganglionares depende de su balance excitatorio e inhibitorio, controlado por las vías y circuitos que convergen en ellas y que inician desde la CPE (30).

La detección de contraste inicia en la CPE y la inhibición lateral potencia la detección del contraste, lo que permite la detección de bordes (82). Esta inhibición lateral es mediada por las células horizontales que reciben entradas sinápticas químicas de los fotorreceptores, que a su vez reciben retroalimentación de las células horizontales, modulando negativamente la liberación del neurotransmisor glutamato de los fotorreceptores (60). Las sinapsis recíprocas de las células horizontales con los fotorreceptores generan un antagonismo el rededor del campo receptivo de las células bipolares, que se sobrelapa con los campos receptivos de las células bipolares vecinas. Las células horizontales liberan GABA a las terminales de los fotorreceptores, generando una inversión en la señal. Por lo tanto, una hiperpolarización de las células horizontales genera una despolarización en los fotorreceptores y un aumento en la liberación de glutamato hacía las células bipolares (31,83)

Las células horizontales colectan información de los fotorreceptores del rededor del campo receptivo y envían esa información de vuelta a los fotorreceptores del centro del campo receptivo, así cuando los fotorreceptores de la periferia del campo receptivo se hiperpolarizan, los del centro se despolarizan, potenciando el contraste entre dos puntos con diferente luminiscencia que se encuentran dentro del mismo campo receptivo (84). Esta inhibición lateral sucede

tanto en campos receptivos formados por conos, importantes para la agudeza visual a la luz del día, como en los formados por bastones que funcionan condiciones de luminiscencia baja (83).

En la CPI, los campos receptivos son formados por todas las entradas sinápticas que reciben las células ganglionares. Estos campos receptivos ON y OFF, se definen como la activación de una célula ganglionar ON cuando hay un aumento en la luminiscencia en el centro de su campo receptivo, y las células ganglionares con campos receptivos tipo OFF son activadas cuando hay una disminución de luminiscencia en el centro de su campo receptivo.

Por otra parte, existen células ganglionares que presentan una respuesta transitoria a ambos estímulos, las células ganglionares ON-OFF. Éstas células reciben información de las vías ON y OFF proveniente de las células amacrinas y bipolares (30). Esto les permite integrar información del movimiento de un objeto, ya que dentro de su campo receptivo, pueden responder al aumento o disminución de la luminiscencia generada por el desplazamiento de un objeto.

Como conclusión, la vía ON le permite a la retina detectar objetos brillantes sobre fondos poco luminosos, y la vía OFF le permite detectar objetos oscuros sobre fondos más luminoso. Además, debido a que éstas vías son antagonistas entre ellas, es decir cuando se activa una, la contraria es inhibida, la diferencia de luminosidad entre los objetos se contrasta, permitiéndonos por ejemplo, leer letras oscuras en un fondo más claro utilizando la vía OFF (29,30,38).

I.1.C.E Adaptación a la luz

La retina debe adaptarse a los aumentos y disminuciones en la luminiscencia ambiental para evitar la saturación de los fotorreceptores y, por ende, mantener la agudeza visual. Para eso, la retina debe disminuir la sensibilidad a la luz, por una parte, utilizando el sistema de los conos en vez de los bastones (85). La agudeza visual también depende de los campos receptivos de las células ganglionares, que inician en los fotorreceptores enviando información a las células bipolares y ellas a las ganglionares. Cuando dos fotorreceptores están conectados a una misma célula bipolar, esta integra la información de las dos neuronas sensoriales y la envía a una

célula ganglionar (33). Por tanto, si cada fotorreceptor detecta un punto de luz distinto en su campo receptivo, activarán a la misma célula ganglionar, ya que ambos forman parte de su campo receptivo. Por otro lado, los circuitos formados por las neuronas de segundo orden se adaptan en el orden de segundos a los cambios en la luminiscencia ambiental (33). Cuando los fotorreceptores envían información a las células bipolares que hacen sinapsis con las células ganglionares y células amacrinas, las células amacrinas mitigan la función de las células bipolares y ganglionares, liberando GABA o glicina en sus terminaciones sinápticas (56). Las células amacrinas de campo amplio GABAérgicas son las principales en modular la inhibición lateral del rededor al centro de los campos receptivos (86), mientras que las células amacrinas glicinérgicas generan inhibición principalmente en las vías OFF (87). Las células amacrinas glicinérgicas All de la vía de los bastones, están acopladas eléctricamente entre sí, y la intensidad de su acople depende de la luminiscencia ambiental (88). Este cambio en el acoplamiento eléctrico está asociado a la liberación de dopamina en la retina (64). Lo que genera un aumento o disminución en sus campos receptivos, afectando el balance entre la excitabilidad e inhibición de los campos receptivos de las células ganglionares. Esto permite a las células ganglionares afinar su resolución espacial dependiendo de la luminiscencia ambiental, ya que recibirán información de una mayor o menor número de neuronas. Es decir, en condiciones de oscuridad, dos puntos de luz cercanos pueden ser detectados por los campos receptivos de dos células ganglionares, ya que estos campos son grandes y se empalman, disminuyendo la resolución espacial, mientras que, en condiciones de luz, los campos receptivos son más pequeños, aumentando la resolución espacial (62).

I.1.C.F Regulación de los ciclos circadianos en la retina

Los sistemas circadianos son un conjunto de señales fisiológicas sincronizadas que regulan los eventos cíclicos que se repiten cada 24 horas en los organismos vivos. Estos procesos comprenden procesos fisiológicos y bioquímicos, como la síntesis y expresión de proteínas que siguen un ciclo diario, y se modula principalmente por la alternancia de la luz y oscuridad en el ambiente, por lo que la recepción de

señales luminosas del ambiente y su procesamiento en la retina contribuye a los ciclos circadianos (89). En el ojo, la retina cuenta con su propio sistema circadiano que regula el procesamiento de las señales luminosas, la liberación de neurotransmisores y el reciclado de los segmentos externos de los fotorreceptores (66). En el EPR, los ciclos circadianos regulan el reciclado de los segmentos externos de los fotorreceptores (91), además de mantener un estado redox adecuado para el metabolismo energético en los conos (65). La sensibilidad al contraste y la dilatación de la pupila también son reguladas por los ritmos circadianos, por lo que estos ritmos son importantes para la supervivencia y función de la retina (66). Además, la retina utiliza a las células ganglionares intrínsecamente fotosensibles que expresan en su membrana celular el pigmento melanopsina, que, al igual que las opsinas de los fotorreceptores, les confieren la propiedad de detectar fotones (92). Esto les permite también detectar la luminiscencia ambiental directamente, sin recibir información de los fotorreceptores (92). Están implicadas principalmente en regular el ciclo circadiano; al detectar los cambios de oscuridad a luz cuando inicia el día, inducen la liberación del neuromodulador dopamina por parte de las células amacrinas dopaminérgicas (28,64,92). A consecuencia, se produce un aumento o disminución, dependiendo del tipo de receptor a dopamina que presente en las neuronas, en la intensidad del acoplamiento de las sinapsis eléctricas, y por tanto, de la actividad de los circuitos, además de que se controle la contracción de la pupila (64,93).

Antes de abordar la evidencia de que los circuitos neuronales de la retina se alteran en condiciones patológicas, cabe dar nociones sobre uno de los registros clásicos de la función retiniana, que es el electrorretinograma (ERG), y explicar lo que se sabe sobre la actividad intrínseca de la retina en condiciones fisiológicas.

[1.2 El Electrorretinograma \(ERG\) y la actividad intrínseca de la retina](#)

El ERG mide el cambio en el potencial eléctrico de todas las células retinianas en respuesta a un flash de luz (**Figura 5**) (94) y esa respuesta representa el estado funcional de la retina, ya sea en un estado normal o alterado, debido a una patología

o envejecimiento, por nombrar algunos. El ERG se puede dividir en dos ondas fundamentales que inician con una deflexión en el potencial hacia valores más negativos, formando la onda “a” que corresponde a la respuesta poblacional de los fotorreceptores(95), seguido de un aumento del potencial que forma la onda “b”, correspondiente a la función de las células bipolares, ganglionares y células de Müller(95). Sobre la onda “b” se generan potenciales oscilatorios que son de menor amplitud y mayor frecuencia (95), y se atribuyen principalmente a la función de células amacrinas (96).

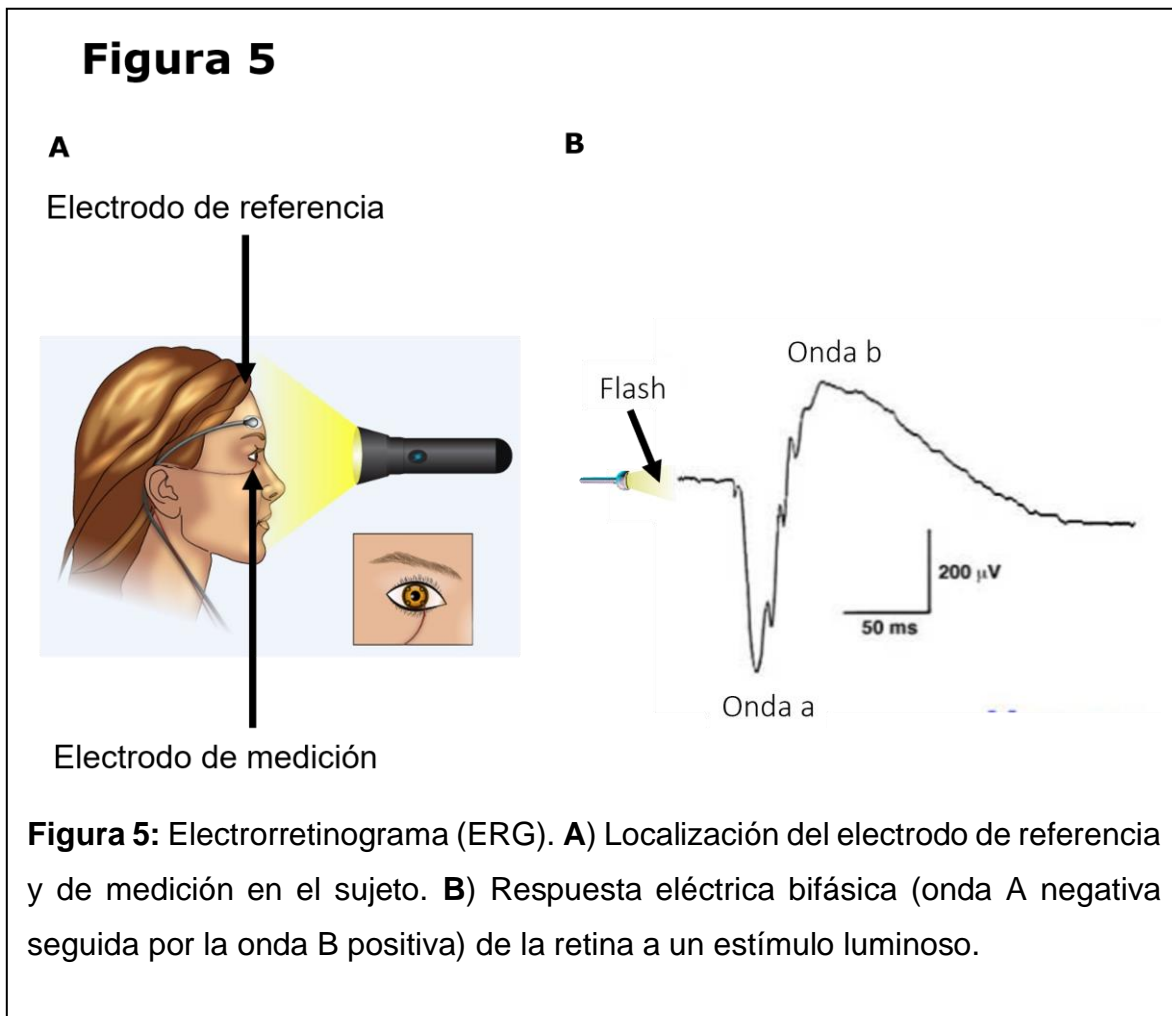
Dependiendo de la información que se busque y el tipo de estímulo que se aplique, existe una diversidad de registros electroretinográficos que son usados tanto por investigadores como clínicos. Estas modalidades incluyen, (i) el ERG de campo completo, mide la respuesta eléctrica de las capas que se encuentran en la retina a partir de un estímulo de luz aplicado directo al ojo, y se utiliza como evaluación diagnóstica de la función global de estas capas. Se puede medir en humanos o animales anestesiados, y se usa a modo de investigación en muchos laboratorios o entornos clínicos, que incluyen el estudio de enfermedades retinianas como la retinitis pigmentosa, retinopatía diabética, etc. (97) (ii) el ERG multifocal (mfERG, por sus siglas en inglés) registra la actividad eléctrica de muchas regiones de la retina simultáneamente. Con esta técnica se generan de 16 a 217 zonas que son estimuladas por una secuencia de destellos independientes. Las respuestas locales se estiman por el cálculo de la correlación inversa entre las respuestas del ERG y la secuencia de estimulación, lo que proporciona una medida topográfica de su actividad (98); (iii). El ERG de patrón (PERG) se obtiene mediante un patrón geométrico de estímulos luminosos que puede ser de tipo tablero de ajedrez o una pantalla a rayas que se alternan en blanco y negro, que va dirigido a la retina central, que cuenta con características de contraste e iluminación, que son controladas, y que tiene un punto de fijación central. La respuesta consta de un componente positivo a 50 ms (P50), seguido de un componente negativo a 95 ms (N95), y finalmente uno pequeño componente que precede al componente P50, que es negativo a 35 ms (N35), y que refleja la función de las células ganlionares que proyectan a la corteza. Las modalidades de ERG mencionadas previamente sirven para medir la actividad eléctrica de la retina *in vivo*, ocupan un electrodo de registro

en la cornea o cutáneo en el párpado inferior, pero también es posible medir esa actividad *ex vivo* (99).

La actividad oscilatoria intrínseca en la retina precede a la apertura del ojo, cuando los fotorreceptores aún no han madurado (100). Las células ganglionares disparan ráfagas de potenciales de acción, que son transmitidas a las células ganglionares vecinas y se propagan en forma de ondas; se presentan en tres estadios durante el desarrollo de la retina (101). En el primer estadio, estas ondas se propagan por el acoplamiento de uniones comunicantes entre células ganglionares y amacrinas (102). En el segundo estadio, la propagación de estas ondas es mediada por la acetilcolina liberada por células amacrinas colinérgicas (103). Finalmente, en el tercer estadio, las ondas son mediadas por receptores a glutamato de tipo ionotrópico (102,103). Esta actividad, además de ser necesaria para la formación de los circuitos en la retina, es importante para la correcta formación de las vías visuales en la corteza cerebral (104). Se sabe que, en etapas adultas, persisten los circuitos responsables de generar esa actividad oscilatoria intrínseca retiniana, pero son silenciados. En efecto, se han registrado oscilaciones intrínsecas en explantes de retina de ratón incubados con bloqueadores de los receptores a glicina y GABA, por lo que, estos receptores mantienen inhibidos a los circuitos generadores de la actividad oscilatoria intrínseca retiniana en el adulto (10,12). Además, se han medido ondas de calcio y oscilaciones de membrana en las células bipolares conectadas a los conos de tipo ON en presencia de bloqueadores de receptores a glicina y GABA (12,105). Asimismo, dichas oscilaciones, ~16 Hz y 10 Hz (11,105), se observan cuando se bloquea la entrada sináptica proveniente de los fotorreceptores (10,105).

En ratones *rd1*, que son un modelo de retinitis pigmentosa (106), la actividad espontánea de las células ganglionares de tipo OFF depende de la activación de los receptores a glicina (8). Además, en gatos se ha observado que las células ganglionares de la retina presentan una actividad espontánea en forma de potenciales de acción con una frecuencia de 25-30 Hz y una actividad poblacional sincronizada de 2-5 Hz (107). Por lo que estas oscilaciones están presentes tanto en condiciones saludables como de enfermedad en distintas especies.

Esta actividad oscilatoria espontánea, no sólo se restringe a las células ganglionares en la retina, también se ha mostrado que está presente en las células amacrinas “starburst”, que generan oscilaciones espontáneas de membrana en frecuencias de 3-4 Hz (105). Diversos estudios se han hecho al respecto para entender cómo estas oscilaciones podrían propagarse a través de las distintas vías de la retina, y modificarse durante la enfermedad. Esto con el fin de entender los posibles mecanismos involucrados, como es el caso de los estudios de las oscilaciones espontáneas en la retinitis pigmentosa. Con respecto a lo anterior, se ha encontrado que las sinapsis eléctricas formadas por las uniones comunicantes, permiten transmitir las oscilaciones dependientes de canales de Na^+ sensibles a tetrodotoxina originadas en las células amacrinas a células vecinas (105). Las células amacrinas de tipo “starburst” generan oscilaciones espontáneas en retina de ratón adulto, y éstas oscilaciones se deben a la liberación periódica de glutamato



dependiente de calcio, proveniente de las terminales sinápticas de las células bipolares, además de que esta actividad oscilatoria espontánea también está presente en otros tipos de células amacrinas (105).

I.3 Impacto de las alteraciones metabólicas en los circuitos de la retina

Existe abundante evidencia de que los circuitos retinianos se alteran en condiciones de neurodegeneración, incluyendo la obesidad y diabetes, pero la información sigue escasa en cuanto a la actividad intrínseca.

La principal condición en la adultez en la que se ha reportado actividad rítmica poblacional intrínseca anómala en la retina, es la retinitis pigmentosa (8,108,109). Es una patología hereditaria caracterizada por la pérdida de los fotorreceptores (110). En modelos experimentales de retinitis pigmentosa, tanto las células bipolares como las amacrinas presentan oscilaciones de membrana (~10–20 Hz) (105,111) y la tasa de disparo espontáneo de las células ganglionares es más alta que en condiciones control (108,112,113).

Dos circuitos han sido propuestos como orígenes de la actividad oscilatoria en la degeneración retiniana:

- (1) los circuitos formados por los fotorreceptores de tipo cono remanentes, las células bipolares de tipo bastón y las células horizontales (114);
- (2) el circuito formado por las conexiones eléctricas entre las células amacrinas All y las células bipolares ON de conos (11).

La desinhibición debida a una disminución o hasta desaparición de las entradas sinápticas provenientes de los fotorreceptores hacia el circuito formado por las células bipolares y células amacrinas, resulta en el aumento en su actividad espontánea del circuito. Y, en efecto, se ha observado que cuando se bloquea el acoplamiento eléctrico entre las células bipolares de tipo ON y células amacrinas All, estas oscilaciones desaparecen en modelo de retinitis pigmentosa (115). También se han podido encender oscilaciones en el circuito de la retina interna en animales sanos, tras inducir una hiperpolarización leve de las células bipolares a

través de bloquear la entrada de los fotorreceptores hacia ellas con bloqueadores de los receptores mGluR6 y AMPA/kainato (10) y mediante blanqueamiento con luz (116).

Cabe mencionar que, se ha propuesto que el entendimiento de la remodelación de los circuitos que generan esta actividad podría ser utilizado para mejorar las estrategias terapéuticas basadas en el uso de implantes que recrean las entradas de los fotorreceptores (115).

En cuanto a la actividad de la retina en presencia de alteraciones metabólicas adquiridas relacionadas principalmente a un descontrol en la ingesta calórica, a saber, el síndrome metabólico (SM), sobrepeso u obesidad y la DM, se han descrito principalmente alteraciones en la actividad evocada de la retina.

Antes de detallarlas, cabe introducir que la DM es una enfermedad que se diagnostica por una hiperglucemia crónica (117). Existen dos tipos principales de DM, la de tipo 1 caracterizada por una ausencia de producción de insulina y la DM tipo 2 causada tanto por la deficiencia en la secreción de insulina y/o el déficit en la acción de esta(117). A nivel ocular, la DM provoca múltiples afecciones, entre las que se encuentran los daños en la microvasculatura de la retina que pueden dar lugar a la retinopatía diabética (RD) (118).

La obesidad, principal factor de riesgo para desarrollar DM tipo 2, se define como el exceso de tejido adiposo en el organismo (119). Durante la obesidad, se presentan alteraciones como, la dislipidemia, la resistencia a la insulina, el aumento de la glucemia en ayuno, la hipertensión arterial y la obesidad visceral y cuando un sujeto presenta al menos tres de estos, se considera con SM (120). El SM es un factor de riesgo para desarrollar DM tipo 2, que como se mencionó, puede causar RD (119).

La RD se define como una neuro/microangiopatía progresiva (119) y se diagnostica de acuerdo con los daños visibles en la vasculatura de la retina, pero se sabe que su patofisiología involucra cambios neuronales tempranos (121–123). Se ha mostrado que los pacientes con DM sin RD clínicamente visible, muestran un retraso en la respuesta a un flash de luz en el ERG en comparación con sujetos sanos (17,18,124) y que un retraso y decremento de la amplitud de los potenciales oscilatorios del ERG puede predecir la aparición de RD en pacientes con diabetes

(19). Asimismo, muy recientemente, se han reportado modificaciones significativas en personas con obesidad, a nivel del ERG evocado, y que son suficientes para estimar el nivel de obesidad en que se encuentra cada paciente (125). En modelos experimentales de obesidad, que presentan resistencia a la insulina e hiperglucemia, se ha reportado que después de doce semanas con dieta alta en grasa, los animales presentan una disminución y un retraso en la respuesta eléctrica a un flash de luz, y esta disfunción está relacionada con la pérdida en la regulación de la homeostasis de calcio, después de 12 semanas con dieta alta en grasa (126). Unos han encontrado que estas alteraciones en la función del retina preceden a las alteraciones vasculares visibles en la retina (118), mientras que otros han encontrado alteraciones en el ERG de ratones alimentados con dieta alta en grasa hasta después de 6 meses con dieta alta en grasa (127).

Relativo a la actividad neuronal intrínseca, se han observado alteraciones en el electroencefalograma (EEG) de pacientes con DM sin RD en comparación con sujetos sanos (128). En particular, los pacientes con microangiopatía diabética muestran una disminución de la actividad espontánea en el EEG asociada con una disfunción en el procesamiento visual y la memoria visual (128), y estas alteraciones en el EEG se asocian a la presencia de RD en pacientes con DM (129). Asimismo, pacientes con obesidad por adicción a la comida, presentan un incremento en la potencia de la onda delta en estado basal en las áreas de Brodmann 8 y 9, así como en la onda teta en los áreas 13 y 47 (130)

Por todo lo anterior, es importante estudiar los estados tanto evocados como espontáneos de la función retiniana en condiciones de obesidad y prediabetes, para entender los procesos funcionales que se alteran en etapas tempranas de la enfermedad. Estos conocimientos pueden impactar positivamente el desarrollo de estrategias de detección de la enfermedad y su tratamiento. Estos aspectos se detallarán más profundamente en la discusión de los resultados.

II. Planteamiento del problema

Dado que 1) estudios preliminares nuestros han revelado que existe una actividad espontánea en la retina de roedores que es independiente del estímulo luminoso y

que se puede medir por ERG y 2) la resistencia a la insulina relacionada a la obesidad se asocia a la modificación de circuitos de actividad espontánea en el cerebro, es relevante caracterizar la actividad espontánea medida por ERG y determinar si se altera en condiciones de obesidad.

III. Hipótesis

La retina genera una actividad intrínseca que se puede medir por el ERG y que se altera en condiciones de obesidad.

IV. Objetivo general

Caracterizar el componente oscilatorio intrínseco de la señal medida por ERG no evocado en condiciones fisiológicas y de obesidad.

IV.1. Objetivos específicos

- 1.- Aproximar la participación de la retina en las oscilaciones intrínsecas medida por ERG no evocado en el ratón.
- 2.- Determinar si las oscilaciones intrínsecas de la retina se modifican en modelos de obesidad en ratón y en pacientes con obesidad.

V. Materiales y métodos

V.1 Ética

Los lineamientos sobre el cuidado y la experimentación de los animales utilizados en este proyecto fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología aceptado con el número 74 de la Universidad Nacional Autónoma de México. Esto, bajo los criterios dictados en la Norma Oficial Mexicana de la

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) clave NOM-062-ZOO-1999. Asimismo, cumplen con lo establecido por las políticas sobre el uso de animales y humanos en la experimentación en neurociencias de la “Society for Neuroscience”. Se obtuvo la aprobación del Comité de Ética de Participantes Humanos del Instituto Mexicano de Oftalmología (IMO) y del Instituto de la Retina del bajío (INDEREB, referencia: CEI/029-1/2015), del Comité Nacional de Ética (referencia: CONBIOÉTICA-09-CEI-006-20170306) y del Comité de Investigación de la Asociación Para Evitar la Ceguera (APEC, 17 CI 09 003 142), y del Comité de Ética en Investigación de la ENES León (referencia: CEI_22_06_S21). Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito. Todos los procedimientos se llevaron a cabo de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki.

V.2 Reactivos

Solución de perfusión Ames (A1420, Sigma Aldrich). Para su preparación, se usaron 1.9 g de NaHCO₃ por cada litro de agua (desionizada tipo II) y enseguida, se agregó el medio pulverizado al NaHCO₃ mezclado en agua desionizada. Este medio está diseñado para proporcionar un pH fisiológico (7.2-7.4) cuando se equilibra con 5 % de CO₂ a 37 °C. Para las distintas condiciones farmacológicas en ERG *ex vivo*, se aplicaron los siguientes fármacos: 10 µM de NBQX (2,3-dioxo-6-nitro-7-sulfamoyl-benzo[f]quinoxaline; N183, Sigma Aldrich) que antagoniza los receptores a glutamato de tipo AMPA, 50 µM L-AP4 (L-2-amino-4-phosphonobutyric acid, A7929, Sigma Aldrich) que antagoniza los receptores a glutamato de tipo mGluR6, 500 µM de ácido meclofenámico (M4531, Sigma Aldrich).

V.3 Animales

Los ratones C57BL/6 (proporción macho: hembra = 1) entre 6 y 8 semanas de edad fueron obtenidos del Bioterio del Instituto de Neurobiología; los ratones *Neotomodon alstoni* delgados (n = 15) y obesos espontáneos (n = 12)(131) fueron regalados por el Dr. Manuel Miranda Anaya de la UMDI Campus UNAM Juriquilla. Los animales

fueron alimentados *ad libitum* y criados en condiciones normales de luz cíclica (ciclo de luz/oscuridad de 12 h), con un nivel de luz ambiental de ~400 lux. Las concentraciones de glucosa en plasma se midieron a partir de una muestra de sangre de la cola usando un glucómetro (Accu-check active, modelo GC).

V.4 Implementación de modelo de obesidad con dieta alta en grasa en ratón

Se utilizaron dos grupos experimentales, un grupo con una dieta alta en grasa (60 % lípidos, D12492, RESEARCH DIETS) y otro con una dieta estándar (30 % lípidos, LabDiet – Rodents, s.f.) para fungir como control, durante 12 semanas (132). El tiempo de 12 semanas fue escogido en base a las alteraciones eléctricas en la retina previamente reportadas a ese tiempo (126). Para corroborar que el modelo de obesidad se desarrolló de forma adecuada, se realizaron pruebas de tolerancia a la glucosa (PTG) y pruebas de resistencia a la insulina (PRI) después de un ayuno de 6 horas (133), para los cuales se administraron 1g de glucosa/kg y 1U de insulina/kg de peso por vía intraperitoneal (i.p.), respectivamente. Se midió la glucemia tomando una muestra de sangre de la cola de los ratones a los minutos 0, 15, 30, 45, 60, 90 de la inyección i.p. de ambas pruebas. Las pruebas se realizaron cada semana, incluyendo la semana 0, es decir justo antes del inicio de la dieta alta en grasa. El peso de los animales fue registrado cada semana.

V.5 Descripción de los datos en humanos.

Un total de 397 sujetos adultos en edades entre 30 y 80 años (media: 45.27 ± 0.82 años, 265 mujeres), metabólicamente sanos o con sobrepeso, obesidad, síndrome metabólico (SM) o diabetes pero sin RD, se inscribieron entre el 26 de febrero de 2015 y el 30 de enero del 2022, en el Instituto mexicana de oftalmología (IMO) de Querétaro (edad promedio: 51.39 ± 1.49 años, 27 mujeres), entre el 20 de diciembre de 2020 y el 6 de enero de 2022, en el Instituto de la retina del bajío (INDEREB) en Querétaro (edad promedio: 32.98 ± 2.07 años, 24 mujeres), entre el 10 de agosto de 2021 y el 20 de diciembre de 2021 en el APEC en la ciudad de México (edad

promedio: 45.77 ± 1.20 años, 119 mujeres), y entre el 10 de agosto de 2021 y el 20 de diciembre de 2021 en la Clínica de Salud Visual (CSV) de la ENES León UNAM en León (edad promedio: 44.96 ± 0.84 años, 96 mujeres). 375 (media de edad: $46,01 \pm 0.98$ años, 157 mujeres) completaron todas las pruebas requeridas para el estudio actual.

Los sujetos se sometieron a una anamnesis y un examen optométrico inicial para asegurar que eran elegibles para participar. Los criterios de exclusión fueron edades fuera del rango de 30 a 80 años, opacidad del cristalino, miopía mayor de 6 dioptrías, glaucoma u otros trastornos oftalmológicos concomitantes, anomalías oculares (p. ej., cirugía, trauma), uso reciente de láser o administración intravítrea de anti angiogénicos y problemas de córnea que interfieren con las grabaciones de ERG. Personal médico calificado recolectó los datos antropométricos en la mañana (8 a.m. a 9 a.m.) después de un ayuno nocturno. La altura se midió con una precisión de 0.5 cm con un estadiómetro (Seca 213; Seca). El peso corporal se midió con sujetos vestidos con ropa ligera y sin zapatos con una precisión de 0.1 kg en una báscula mecánica de columna (Seca 700; Seca). La circunferencia de la cintura se midió en sujetos desnudos en el punto medio entre el margen inferior de la última costilla palpable y la parte superior de la cresta ilíaca mientras el sujeto estaba de pie, después de una espiración moderada, con una cinta no estirable. La presión arterial se midió con un esfigmomanómetro de manguito de mercurio después de que el participante del estudio estuvo sentado en silencio durante ≥ 10 min. Se tomaron muestras de sangre de un catéter intravenoso sin estasis después de un ayuno nocturno de al menos 8 h. Estudios de laboratorio que incluyen glucosa en sangre en ayunas, hemoglobina glucosilada (HbA1c), insulina, triglicéridos (TG), colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL), colesterol de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), colesterol de lipoproteínas de alta densidad (HDL), colesterol total colesterol (CT) y creatinina se realizaron en INTERMEDIC (Querétaro, México) para datos de IMO, IML Laboratorio Médico (Querétaro, México) para datos de INDEREB, Laboratorio clínico Jenner (Ciudad de México, México) para datos del Hospital de la ceguera (APEC) y Laboratorios Salud Digna (León, México) para datos CSV. El modelo de homeostasis del índice de evaluación (HOMA-I) se calculó utilizando los valores de glucosa e insulina en ayunas.

V.6 Explantes de retina

Para la obtención de los explantes de retina, los animales fueron sacrificados con CO₂, posteriormente, se hizo la disección de los ojos. Los ojos son colocados en solución de Ames (Sigma-Aldrich, A1420), burbujeada con carbógeno, a 36 °C. Los ojos son disectados a nivel del limbo esclerocorneal, la córnea y el lente son separados de la parte posterior del ojo, y cuidadosamente se desprende la retina del EPR. Finalmente se corta el nervio óptico.

V.7 Electrorretinograma (ERG)

V.7.1 *In vivo*

Para medir la respuesta masiva a la luz de los bastones y neuronas bipolares tipo ON (94), los ratones fueron adaptados a la oscuridad durante toda la noche. Se considera como ERG evocado mesópico, y no escotópico, dado que hemos medido la luminiscencia ambiental y no es de cero ($-2.0 \log \text{ c.m}^2$). Posteriormente, los animales fueron adaptados durante 15 minutos a la luz (30 cd/m^2) para medir el ERG fotópico que corresponde a la respuesta de los conos y células bipolares tipo OFF (134). Tanto para el ERG mesópico como fotópico, los animales fueron anestesiados con ketamina:xilacina 7:3. Se les aplicó fenilefrina-tropicamida en la córnea para dilatar las pupilas, con el fin de asegurar que cada animal reciba la máxima luz posible. Para el registro, se les coloca un electrodo de plata clorado en la córnea y uno de referencia en el parpado. Para el ERG mesópico, los procedimientos fueron similares, pero bajo luz roja. La señal electrofisiológica registrada fue amplificada x100 y filtrada con un amplificador (Differential AC Amplifier 100, AM Systems, WA, E.U.A) para los ERG y digitalizada con un Dispositivo USB de E/S Multifunción (USB-6008, National Instruments Corporation).

Se utilizó un filtro pasa bajas de 1000 Hz y un filtro pasa altas de 0.1 Hz con una frecuencia de adquisición de 2 kHz para asegurar el registro de todos los eventos posibles. Para los registros utilizados para el análisis de coherencia, se utilizaron dos amplificadores iguales (Pre-amplifier, 7P1G, Grass instruments), con los mismos filtros y frecuencia de muestreo que he descrito previamente.

V.7.2 Ex vivo

Los registros se realizaron con un sistema inspirado de (99). Las retinas fueron transferidas a una cámara de registro con una perfusión constante de solución de Ames, con gaseo contante de carbógeno, mantenida a una temperatura aproximada de 36 °C. Los registros electrofisiológicos se realizaron utilizando micropipetas de borosilicato con una resistencia de 1 MΩ y que fueron llenadas con solución para electrodos. El electrodo de registro fue colocado sobre la capa de células ganglionares con ayuda de un micro manipulador y un microscopio estereoscópico. La señal obtenida del registro se amplificó (Grass Instruments) y filtró con los mismos parámetros que para el ERG *in vivo*.

V.8 Medición de movimientos del ratón

Para registrar los ritmos biológicos no pertenecientes a la retina que generan vibraciones y pueden ser captados por los electrodos corneales, se utilizó un sensor piezoeléctrico de 12 mm de diámetro colocado bajo el abdomen del ratón anestesiado durante la adquisición del ERG, con una frecuencia de adquisición de 2 kHz. La señal no fue filtrada y fue digitalizada con Dispositivo USB de E/S Multifunción, (USB-6008, National Instruments Corporation).

V.9 Análisis de ERG

Para el análisis espectral del ERG humanos y animales, las señales se filtraron inicialmente con un filtro pasa bajas de 1 kHz y un filtro pasa altas de 0.1 y 0.3 Hz para animales y humanos, respectivamente. Se descartaron los registros con

artefactos (que excedían $\pm 100 \mu\text{V}$). Los registros de los dos ojos se analizaron de forma independiente. Las señales ERG sin procesar se normalizaron entre -1 y +1. Los ERG mostraron actividad discontinua, por lo que se utilizó la transformada wavelet (Morlet) para analizarlos. El análisis se llevó a cabo con la paquetería Fieldtrip en MATLAB que implementa el método wavelet(135). Los datos se analizaron mediante scripts de MATLAB personalizados (MATLAB R2018; MathWorks). Las señales espontáneas de ERG en humanos se dividieron en segmentos de 60 s que se analizaron por ventanas aleatorias de 20 segundos. Las resoluciones temporales y espectrales fueron de 0.01 s y 0.05 Hz, respectivamente. Los datos de transformada de wavelet se representaron como escalogramas o espectros de potencia normalizados obtenidos al promediar la transformada de wavelet a lo largo del registro. Estos últimos se promediaron posteriormente en todas las muestras, animales y pacientes para cada condición. El error estándar de la media de los espectros de potencia se calculó entre animales/sujetos.

En el análisis exploratorio, las bandas de frecuencias se consideraron inicialmente entre 0.1 o 0.3 Hz y 1 kHz (no se muestra) en animales y humanos, respectivamente, y luego se refinaron en rangos donde se detectó actividad (0.1-10 Hz y 0.3-40 Hz para animales y humanos, respectivamente).

Los potenciales oscilatorios (PO's) se aislaron digitalmente de la onda B escotópica utilizando un filtro digital de 100-500 y 60-300 Hz para humanos y animales, respectivamente(136)

V.10 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando Matlab (Statistics and Machine Learning Toolbox). Los datos se informan como media \pm s.e.m. \pm 95 % intervalo de confianza. Todos los datos mostraron distribución normal e igualdad de varianza según las pruebas ómnibus de D'Agostino-Pearson y Levene, respectivamente. Por lo tanto, la significación estadística se determinó utilizando la prueba t no pareada o, para comparaciones múltiples, utilizando un ANOVA y post-hoc de Bonferroni. Las métricas humanas se analizaron utilizando el ANOVA de Welch que da cuenta de la heterogeneidad de la varianza.

Para calcular la correlación entre los componentes de frecuencia de oscilaciones espontáneas de varianza mayor (la frecuencia máxima en las bandas de 20-40 Hz y 10-20 Hz y la potencia normalizada de oscilaciones de 0.35, 0.4, 0.45, 0.65, 0.5 Hz), calculamos una puntuación o score para cada paciente combinando linealmente cada coeficiente de variable (PC1) multiplicado por su valor real. El análisis de correlación se realizó mediante el cálculo del coeficiente R de Pearson (función cor en R).

VI. Resultados

Consideramos conveniente explicar la lógica que seguimos para ordenar los resultados. Al considerar los criterios de bioética para la experimentación animal, que contemplan la optimización de recursos con el fin de encontrar el punto medio entre la obtención de conocimiento para la salud y seguridad de las especies, y el respeto a los animales, optamos por determinar primero si nuestro postulado de que la actividad espontánea de la retina medida por ERG se modifica en condiciones de riesgo para la diabetes tipo 2, a saber, la obesidad. Tras validar este punto en dos modelos de obesidad en ratón y en humanos, comparamos este nuevo parámetro con el parámetro funcional de la retina que se sabe, se modifica más tempranamente en pacientes con diabetes, pero sin RD, a saber, los potenciales oscilatorios (PO's)(137), realizamos una serie de experimentos para caracterizar dicha actividad valiéndonos de análisis de correlación y coherencia entre señales medidas simultáneamente *in vivo* y del ERG *ex vivo* en ratón.

VI.1 ¿La actividad espontánea de la retina medida por ERG se modifica en condiciones de obesidad?

VI.1.a. Implementación del modelo de obesidad por dieta alta en grasa en el ratón

Al registrar los pesos de los ratones C57BL/6J cada semana, observamos que el peso del grupo de ratones bajo dieta alta en grasa aumentó un $20 \pm 7 \%$ a partir de la tercera semana, en comparación con el grupo de ratones sometidos a dieta estándar, y que esta diferencia se mantiene hasta la semana doce (**Figura 6AI**). Cabe señalar que la obesidad resulta de un desbalance entre el consumo de alimento, el metabolismo basal y el gasto de energía. Se pueden utilizar modelos animales con dieta alta en grasa(138), para estudiar las complicaciones de la obesidad, por ejemplo, la resistencia a la insulina. Los ratones *Neotomodon Alstoni* que presentaron un aumento significativo en el peso se consideraron como un modelo de obesidad espontánea (**Figura 6BI**). La resistencia a la insulina describe

la falta de sensibilidad a la insulina en un organismo, significando que las células del músculo, del tejido adiposo y del hígado no responden a la hormona adecuadamente para captar la glucosa de la sangre, incluso cuando los niveles de la insulina son altos. Esta falta de aprovechamiento de la glucosa en sangre da lugar inicialmente a un nivel de glucosa en sangre aumentado que luego puede evolucionar en hiperglucemia (>250 mg/dL). Se reportan estudios con periodos de exposición a la dieta alta en grasa muy variables (menor a 2 semanas hasta 12 semanas) (139). Se sabe que bajo esa dieta, los ratones de la cepa C57BL/6J presentan sobrepeso desde la semana 1, hiperinsulinemia a partir de la semana 1 e hiperglucemia a partir de la semana 1 con dieta alta en grasa (140), aunque en mi trabajo, los ratones obesos presentaron un aumento en la glucemia a partir de la quinta semana (**Figura 6AII**).

En ratones sanos de la cepa C57BL/6J con un ayuno de 6 horas, la glucemia promedio reportada es de 148.35 ± 5 mg/dL (126); nosotros encontramos valores de 137.3 ± 5 mg/dL (**Figura 6AI**). Se realizó la medición de glucemia semanalmente por un lapso de 12 semanas, los valores obtenidos (mg/dL) fueron los siguientes: semana 0, delgados (d): 176 ± 15 , DAG (o) : 174 ± 10 ($P > 0.05$), semana 5 d: 156 ± 17 , o: 187 ± 9 ($P < 0.05$); semana 6, d: 137 ± 4 , o: 185 ± 7 ($P < 0.05$) y semana 12, d: 144.2 ± 10 , o: 173.28 ± 14 ($P < 0.05$). A la quinta, sexta y doceava semana, la glucemia en ayuno presenta un aumento de 19 ± 3 %, 35 ± 7 % y 20 ± 10 %, respectivamente, en el grupo de los ratones con DAG con respecto al grupo de ratones delgados, mientras que en la semana 0 no hay diferencias significativas (**Figura 6AII**). Al año de edad, los ratones *Neotomodon Alstoni* que presentaron obesidad espontánea también presentan mayor nivel de glucosa en sangre que los ratones de la misma cepa que se quedaron delgados (**Figura BII**).

Existen varias pruebas para evaluar resistencia a la insulina, una de ellas es la Prueba de Tolerancia a la Glucosa (PTG), para la cual los ratones deben de tener un ayuno de entre 6 horas previo a la administración i.p. de 2 g de glucosa/Kg de peso. Se hacen mediciones de glucemia a los minutos 0, 15, 30, 45, 60 y 90. En un animal sano, la glucemia a los 90 minutos es menor a 192 ± 18 mg/dL (141). Si los valores son mayores, el animal se considera intolerante a la glucosa. Al calcular el área bajo la curva de la respuesta a la glucosa de cada grupo del minuto 0 al 90, se

puede apreciar que el área es mayor en el grupo de los animales obesos en comparación con el grupo de ratones delgados después de 12 semanas con DAG (**Figura 6AIII**) y (**Figura BIII**) para el modelo de obesidad espontánea. Esta intolerancia a la glucosa se observa desde la 5 semana con DAG y la glucemia en ayuno es mayor en los ratones obesos.

Otra prueba es la (PRI) que consiste en administrar una inyección de 1U de insulina/ kg de peso por vía i.p. a los animales y medir la glucemia a los minutos 0, 15, 30, 45, 60 y 90. La respuesta en un animal sano consiste en una disminución en el porcentaje de la glucemia a los 15 minutos (menos 37 ± 1.8 %) y una tendencia a aumentar la glucemia a los 60 y 90 minutos. Si la glucemia al minuto 15 disminuye menos de 37 ± 1.8 %, eso indica resistencia a la insulina. Asimismo, se puede observar que el área bajo la curva a la respuesta a insulina aumentó un 20 ± 1.0 % en el grupo de ratones con DAG en comparación con el grupo de los ratones delgados, después de 12 semanas con dieta alta en grasa (**Figura 6AIV**) y (**Figura BIV**) para el modelo de obesidad espontánea.

En conjunto, estos resultados muestran que los ratones alimentados durante 12 semanas con dieta alta en grasa desarrollan obesidad asociada a hiperglucemia y resistencia a la insulina, alteraciones metabólicas que también están presentes en los ratones que desarrollan obesidad espontánea, lo cual es conforme a lo descrito previamente(131). Debido a que nos interesa determinar el impacto del desarrollo de la resistencia a la insulina sobre la señal de ERG, cabe precisar que, en nuestras manos, los animales alimentados con DAG muestran, un aumento en la glucemia en ayuno, una intolerancia a la glucosa y una resistencia a la insulina a partir de la semana 5 con dieta alta en grasa y estos efectos se mantienen a las 12 semanas.

Figura 6.

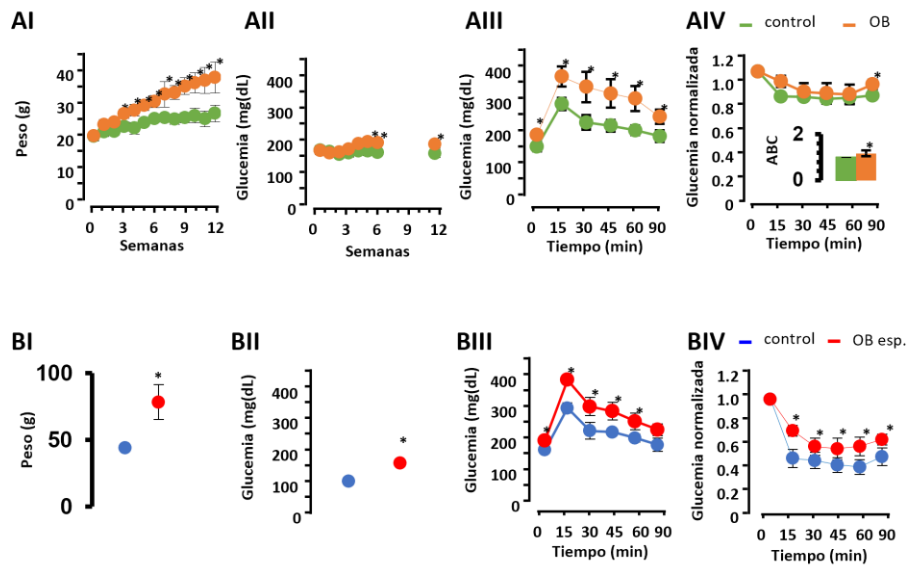


Figura 6: Seguimiento metabólico de los modelos de obesidad por dieta alta en grasa (OB) y obesidad espontánea (OB esp.) en ratones. **AI)** peso corporal; **AII)** glucemia en ayuno; **AIII)** curva de tolerancia a la glucosa; **AIV)** curva de respuesta a la insulina de ratones control (verde) versus ratones con dieta alta en grasa (naranja) a lo largo de 12 semanas. ABC, área bajo la curva. **BI)** peso corporal; **BII)** glucemia en ayuno; **BIII)** curva de tolerancia a la glucosa; **BIV)** curva de respuesta a la insulina de los ratones delgados (azul) versus ratones con obesidad espontánea (rojo). Valores, media \pm s.e.m. * indica valores de $P < 0.05$ (determinado por la prueba t de Student para dos muestras).

VI.1.b Alteraciones de la actividad eléctrica espontánea registrada por ERG en modelos de obesidad en ratón.

Iniciamos con medir ERG's espontáneos en el modelo de obesidad inducida por DAG después de 12 semanas, ya que un estudio previo reportó que este modelo presenta una disminución en los PO's a las 12 semanas de recibir la DAG(126), y en el modelo de obesidad espontánea en ratón *Neotomodon alstoni*.

Los ERG's espontáneos de ratones alimentados por 12 semanas con dieta alta en grasa, que presentan obesidad y resistencia a la insulina, presentan oscilaciones en frecuencias pico de 0.1 – 0.8 Hz (**L**), 1.0 – 1.8 Hz (**M1**) y 2.0 – 4.0 Hz (**M2**) (**Figura 7A**). La banda de frecuencia entre 1.0 – 1.8 Hz muestra una disminución en la frecuencia pico en comparación con el grupo de ratones control, mientras que las bandas de frecuencia de 0.1 – 0.8 y 2.0 – 4.0 Hz no presentan diferencias (**Figura 7B**). En los ERG's espontáneos de ratones *Neotomodon Alstoni* (**Figura 7C**), que presentan obesidad espontánea y resistencia a la insulina, se observa una disminución en la frecuencia pico en la banda de frecuencias de 0.6 – 1.0 Hz, en comparación con los ratones control (**Figura 7D**).

Al medir los ERG's evocados en ratones alimentados con dieta alta en grasa después de 12 semanas, encontramos que los PO's, que se han mostrado, son los primeros componentes en presentar alteraciones en condiciones de obesidad(137), no presentan diferencias en comparación con los ratones control (**Figura 7F**).

Para precisar en qué momento la actividad oscilatoria espontánea medida por ERG se modifica en condiciones de obesidad, realizamos un seguimiento temporal de la actividad de interés en el modelo de obesidad inducida por DAG, enfocándonos en el periodo en el cual éste desarrolla resistencia a la insulina. Además, consideramos que debido a que existen dos circuiterías que se encargan del procesamiento de las señales en condiciones de luz y oscuridad y que, al respecto, se disminuye la sensibilidad al contraste desde etapas muy tempranas de la diabetes(142), debíamos medir la actividad oscilatoria espontánea medida por ERG tanto en condiciones fotópicas como mesópicas.

Figura 7.

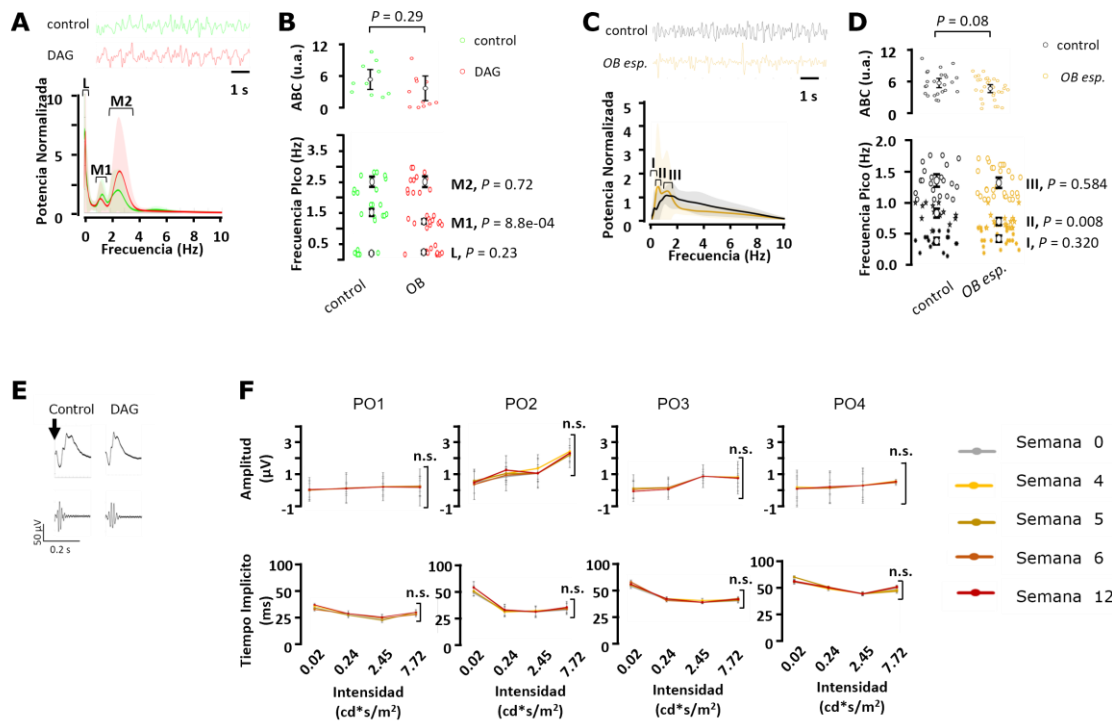


Figura 7. Efecto de la obesidad sobre el ERG espontáneo y evocado en ratones.

A) Trazos representativos de ERG espontáneos de ratones control (verde) y ratones con dieta alta en grasa (DAG, rojo) en condiciones fotópicas. Las señales ERG fueron normalizadas. Los gráficos muestran la potencia media del escalograma \pm s.e.m. correspondiente a registros de 1 minuto entre 0.1 y 10 Hz en el grupo control ($n=12$) y experimental ($n=17$). Los corchetes indican los picos consistentes observados en cada condición control. En el modelo de obesidad inducida por una dieta alta en grasas, se consideraron las bandas de 0.1-0.8 (Baja, L), 1-1.8 (M1, media-baja) y 2-4 Hz (M2, media). **B)** Cuantificación del área bajo la curva (ABC) y frecuencia pico en el rango de frecuencias de 0.1 a 3.5 Hz de los ERG espontáneos de ratones control y DAG. **C)** Trazos representativos de ERG espontáneos de ratones control (negro) y ratones con obesidad espontánea (OB esp., amarillo), y su potencia en el rango de frecuencias de 0.1 a 10 Hz ($n=20$ en el grupo control y $n=20$ en el grupo experimental). El procesamiento fue similar a lo descrito en A. Las bandas de 0.1-0.6 (I), 0.6-1 (II) y 1-1.7 (III) Hz fueron consideradas en el modelo espontáneo de obesidad.

D) Cuantificación del ABC y frecuencia pico, en el rango de frecuencias de 0.1 a 3.5 Hz de los ERG espontáneos de ratones control y OB esp. **E)** Trazos representativos de los ERG's de ratones control y DAG a la semana 12, en respuesta a un flash de luz de 7.72 cd.s/m². **F)** Seguimiento de los potenciales oscilatorios (PO1-4) aislados del ERG evocado (filtro pasa bandas de 60 a 300 Hz) antes y después de recibir DAG por 4,5 ,6 y 12 semanas, a respuesta a flash de luz de intensidad creciente.

VI.1.c Valoración de los componentes espectrales del ERG no evocado a lo largo del tiempo en el modelo de obesidad inducido por dieta alta en grasa

En ratones bajo dieta control, el análisis de los espectros de potencia de los ERG entre condiciones mesópicas (**Figura 8A**) y fotópicas (**Figura 8B**), muestra que la frecuencia pico en condiciones fotópicas (1.30 ± 0.16 Hz) es menor que en condiciones mesópicas (1.52 ± 0.33 Hz), mientras que el área bajo la curva no es diferente (**Figura 8C**). Importantemente, cuando se registró el ERG espontáneo mesópico (**Figura 9A**) y fotópico (**Figura 9B**) durante 12 semanas, se observó que el promedio de la frecuencia pico no es diferente a lo largo del tiempo en el grupo de ratones con dieta control (**Figura 9C**). Los ratones control mantienen la disminución de la frecuencia pico en respuesta a la adaptación a la luz hasta la semana 12 (**Figura 9C**). Los ratones con DAG presentan una disminución significativa en la frecuencia pico en los ERG's mesópicos en comparación con los ratones control, esta disminución es transitoria ya que a la semana 6 y 12 con DAG esta diferencia se pierde (**Figura 9C**). Lo que sugiere que los componentes espectrales de las oscilaciones intrínsecas de la retina son susceptibles a cambios inducidos por una dieta alta en grasa después de 5 semanas, que es cuando se desarrolla la resistencia a la insulina.

Figura 8

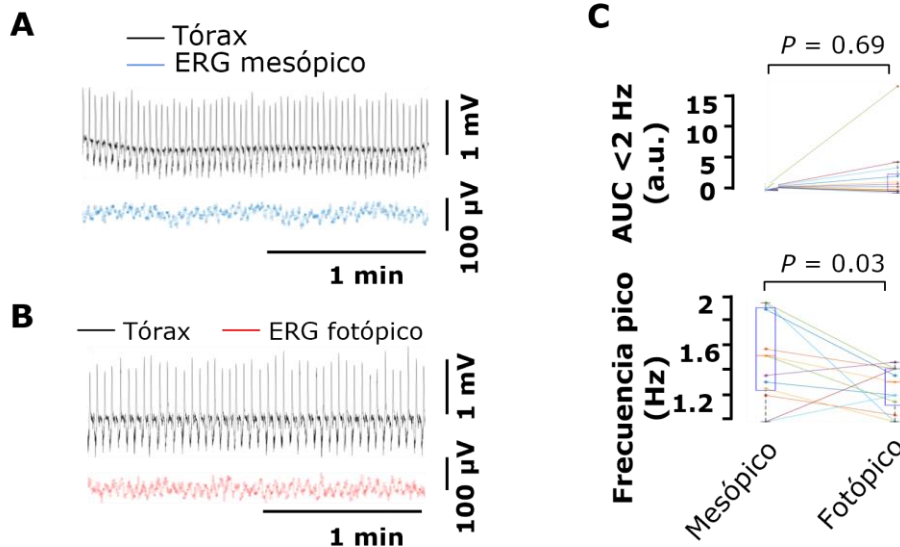


Figura 8: Análisis de la actividad oscilatoria medida por ERG no evocado en condiciones fotópicas y mesópica en ratón. **A)** Trazos representativos de ERG espontáneo *in vivo* y sensor de tórax en ratones C57BL / 6 de 3 meses de edad ($n = 13$) en condiciones mesópico y **B)** fotópicas. **C)** Comparación del área bajo la curva (AUC) y de la frecuencia pico en condiciones mesópico y fotópicas en el rango de frecuencias de 1-2 Hz (los valores de P se determinaron mediante una prueba t de Student). El AUC se normalizó a los valores de condición mesópica.

Figura 9

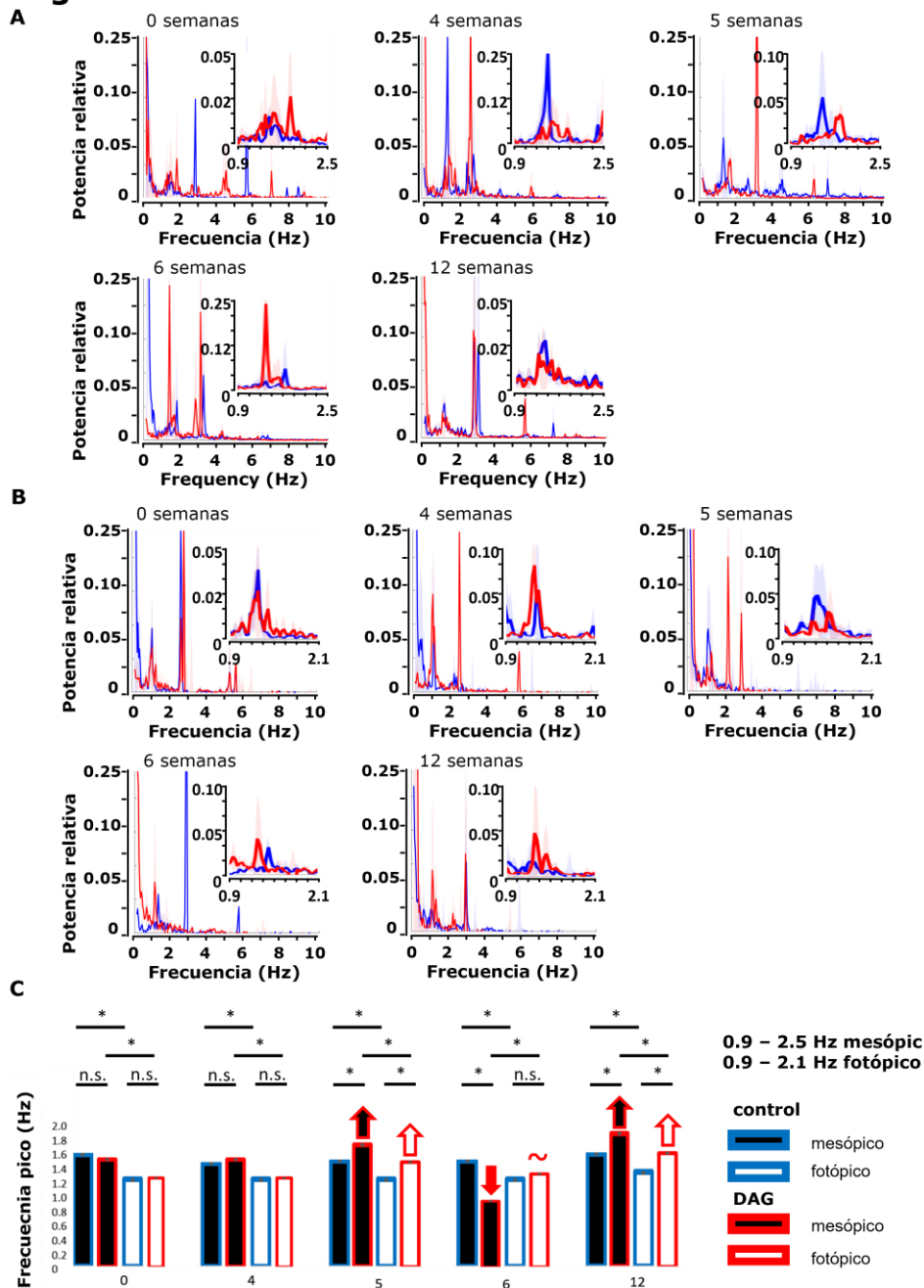


Figura 9: Seguimiento temporal del efecto de la dieta alta en grasa en las oscilaciones espontáneas lentas en el ERG de ratón. **A)** Espectros de potencia de ERG no evocados (media \pm s.e.m) de ratones sometidos a dieta control (azul, n=4) y alta en grasa (rojo, n=4) de 0 a 12 semanas en condiciones mesópicas y **B)** fotópicas. La gráfica principal muestra la actividad de 0.1 a 10 Hz y en inset, una ampliación entre 0.1-2 Hz. **C)** Comparación de la frecuencia pico (Hz) en la banda de 1-2 Hz entre ratones control y sometidos a DAG las semanas 0, 4, 5, 6 y 12. * indica $P < 0.05$, ANOVA de medidas repetidas con Bonferroni. n.s., no significativo.

VI.1.d Alteraciones de la actividad eléctrica espontánea registrada por ERG en asociación con factores de riesgo para la diabetes tipo 2 en el humano

Para evaluar la relevancia clínica de nuestro enfoque, creamos una base de datos humana de ERG espontáneos a partir de 99 sujetos adultos metabólicamente sanos (45 ojos), 59 pacientes con sobrepeso (28 ojos), 24 pacientes con obesidad (10 ojos), 97 pacientes con síndrome metabólico, pero sin diabetes (47 ojos) y 96 pacientes con diabetes, pero sin DR (43 ojos) (**Tabla 1**), que acudieron a las clínicas de oftalmología IMO e INDEREB para un chequeo ocular general. En nuestra cohorte, los participantes con SM tienen mayor edad que los controles (mediana de

Tabla 1.

	CONTROL	SOBREPESO	OBESIDAD	SÍNDROME METABÓLICO	DIABETES SIN RD	p
n	99	59	24	97	96	
Edad (años)	39.59 ± 1.96 ^c	41.63 ± 2.03 ^{bc}	39.75 ± 2.80 ^{bc}	47.45 ± 1.94 ^b	55.10 ± 1.58 ^a	<0.0001
DM1	-	-	-	-	7	
DM2	-	-	-	-	56	
Duración de DM (años)	-	-	-	-	7.98 ± 1.00 ^b	0.011
Peso corporal (Kg)	57.44 ± 1.29 ^d	71.82 ± 1.30 ^{abc}	76.91 ± 3.77 ^{ab}	79.13 ± 2.03 ^a	75.70 ± 1.98 ^{ab}	<0.0001
Circunferencia cintura (cm)	82.44 ± 1.34 ^c	95.21 ± 1.49 ^{ab}	103.06 ± 3.99 ^a	102.50 ± 1.34 ^a	101.50 ± 1.69 ^a	<0.0001
Circunferencia cadera (cm)	80.68 ± 1.22 ^c	94.28 ± 1.26 ^b	98.43 ± 3.52 ^{ab}	100.12 ± 1.61 ^{ab}	102.44 ± 1.27 ^a	<0.0001
IMC (kg/m ²)	21.83 ± 0.28 ^c	26.93 ± 0.25 ^{ab}	29.56 ± 1.64 ^a	29.29 ± 0.58 ^a	29.68 ± 0.68 ^a	<0.0001
Glucemia (mg/dl)	85.40 ± 0.96 ^c	88.03 ± 1.11 ^c	92.25 ± 2.68 ^c	90.70 ± 1.68 ^c	143.94 ± 6.57 ^b	<0.0001
HbA1c (%)	5.31 ± 0.04 ^d	5.44 ± 0.04 ^d	5.35 ± 0.09 ^d	5.61 ± 0.05 ^d	7.63 ± 0.23 ^c	<0.0001
Insulinemia (µl/ml)	7.02 ± 0.44 ^c	10.13 ± 1.00 ^{bc}	11.23 ± 1.52 ^{abc}	13.91 ± 1.07 ^{abc}	18.43 ± 2.43 ^{ab}	<0.0001
HOMA-I	1.57 ± 0.09 ^c	2.19 ± 0.22 ^c	2.66 ± 0.43 ^{bc}	3.15 ± 0.27 ^{bc}	7.27 ± 1.01 ^{ab}	<0.0001
TG	107.00 ± 5.69 ^c	105.19 ± 6.12 ^c	120.63 ± 13.51 ^{bc}	207.96 ± 15.04 ^{ab}	180.18 ± 10.47 ^b	<0.0001
CT (mg/dl)	183.66 ± 3.91 ^a	182.78 ± 4.57 ^a	190.78 ± 6.78 ^a	201.21 ± 4.87 ^a	182.67 ± 3.93 ^a	0.042
HDL (mg/dl)	57.81 ± 2.12 ^a	54.64 ± 1.66 ^{ab}	55.43 ± 3.14 ^{ab}	45.23 ± 1.21 ^c	47.17 ± 1.50 ^{bc}	<0.0001
LDL (mg/dl)	106.82 ± 3.31 ^a	114.50 ± 3.98 ^a	117.39 ± 6.75 ^a	122.47 ± 4.10 ^a	105.75 ± 3.50 ^a	0.048
VLDL (mg/dl)	17.02 ± 1.10 ^b	18.43 ± 1.94 ^b	17.92 ± 2.14 ^b	33.19 ± 2.47 ^a	31.70 ± 2.45 ^a	<0.0001
Creatinina (mg/dl)	0.73 ± 0.03 ^a	0.77 ± 0.03 ^a	0.76 ± 0.03 ^a	0.94 ± 0.09 ^a	0.73 ± 0.05 ^a	0.401
Presión arterial sistólica (mmHg)	109.71 ± 2.29 ^d	116.10 ± 2.73 ^{cd}	124.56 ± 6.62 ^{bcd}	131.15 ± 2.40 ^b	128.95 ± 3.41 ^{bc}	<0.0001
Presión arterial diastólica (mmHg)	69.95 ± 1.35 ^d	74.02 ± 1.63 ^{cd}	75.00 ± 2.82 ^{bcd}	84.62 ± 1.02 ^a	81.98 ± 2.10 ^{abc}	<0.0001

47.45 años versus 39.59 años, $P < 0,001$) y los pacientes con diabetes son más viejos que todos los demás grupos (mediana de 55.1 años versus 42.1 años, $P < 0,001$), y son más propensos a ser mujeres (77.7 % versus 22.2%, $P < 0,0001$) (**Tabla 1**).

La presencia de salud metabólica, sobrepeso, obesidad, SM, diabetes mellitus y sin DR fue establecida por expertos utilizando criterios aceptados internacionalmente, como se hace referencia en los Métodos. Es importante destacar que los parámetros de PO's en los grupos de sobrepeso, obesidad y SM permanecen sin cambios en comparación con el grupo de control y, en general, tampoco mostraron diferencias en el grupo de diabetes sin DR (**Figura 10**).

La **Figura 11A** muestra trazos representativos de los ERGs espontáneos en condiciones de luz en nuestros grupos de estudio. La actividad espontánea se observa entre 0.3 y 40 Hz (**Figura 11B**), con picos principales en las bandas de 0.3-2, 10-20 y 20-40 Hz (**Figura 11B**, recuadros).

La gran variabilidad en nuestro conjunto de datos que supusimos fue confirmada por la ausencia de diferencias estadísticas en el área bajo la curva y la frecuencia pico entre los grupos en las bandas mencionadas anteriormente (**Figura 11B**). Por lo tanto, agrupamos los espectros de potencia provenientes de los ERG espontáneos de participantes con alguna alteración en su peso corporal o parámetros metabólicos en un solo grupo "enfermo" y encontramos un aumento de la frecuencia pico en la banda de 20-40 Hz en el grupo de enfermedad (**Figura 11C**).

Figura 10.

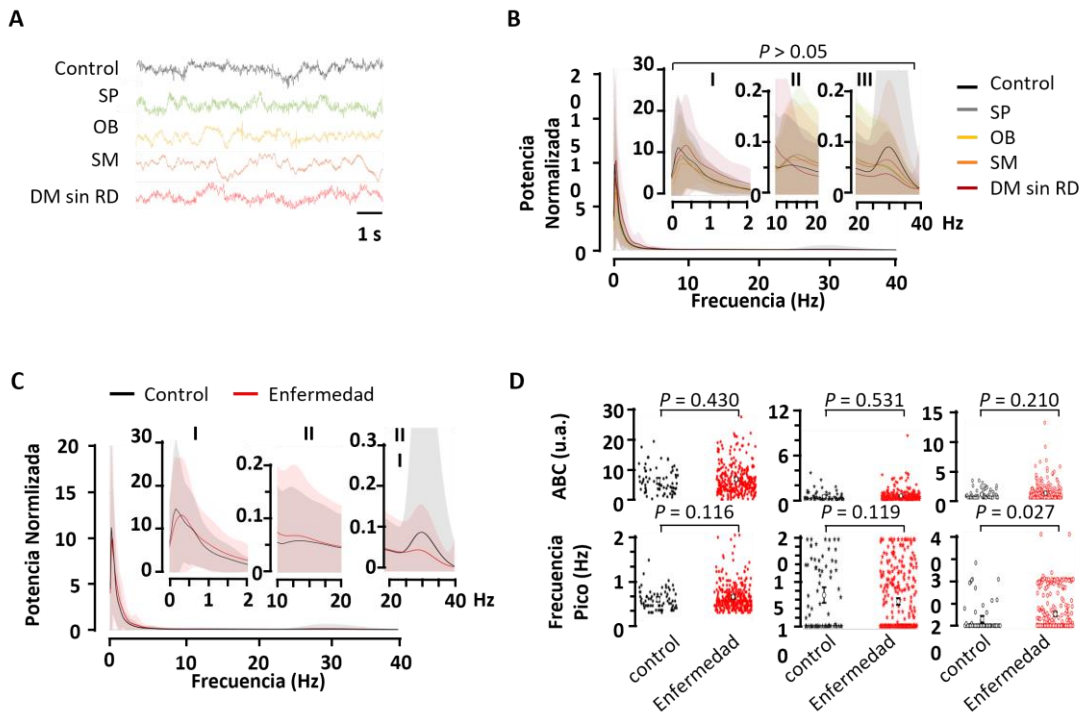


Figura 10. Análisis de los potenciales oscilatorios (PO's) en condiciones de riesgo para la diabetes tipo 2 en humanos. **A)** Trazo representativo de PO's de un sujeto control que muestra los picos negativos (N1 y N2) y positivos (P1 y P2) característicos de los PO's en respuesta a un flash de luz en condiciones de oscuridad (ver métodos). **B)** Comparación de la amplitud y **C)** tiempo implícito de N1-P1 y P1-N2 entre sujetos control (negro), con sobrepeso (SP, verde), obesidad (OB, amarillo), síndrome metabólico (SM, naranja) y Diabetes Mellitus sin retinopatía diabética (DM sin RD, rojo). Los valores de P se determinaron mediante ANOVA (control, $n=8$; SP, $n=5$; OB, $n=2$; SM, $n=6$; DM sin RD, $n=18$).

No se observaron diferencias significativas en el área bajo la curva y la frecuencia pico en las bandas de 0.3-2 y 10-20 Hz (**Figura 11C**).

Dado que encontramos indicios de que la actividad oscilatoria espontánea se modifica en asociación con factores de riesgo para la diabetes tipo 2 en el humano, quisimos averiguar si estos cambios se correlacionan con los cambios en los PO's

que se consideran como los marcadores tempranos de la RD, antes que esta sea clínicamente detectable. Para ello, calculamos una puntuación o “score” que refleje los componentes espectrales del ERG espontáneo. A grandes rasgos, se generó una base de datos con los valores de las potencias del espectro para cada participante, con una resolución de 0.05 Hz, y los valores de su frecuencia pico en los tres rangos con mayor actividad (0.3-2, 10-20 y 20-40 Hz). Se calculó la varianza de cada variable y se realizó un análisis de componentes principales con las variables de mayor varianza (potencias entre 0.35 y 0.7 Hz y frecuencia pico en los tres rangos) (**no mostrado**). En el componente 1, se obtuvieron los pesos específicos para cada variable seleccionada y el score se calculó por combinación lineal de los pesos antes citados con el valor de potencia o frecuencia pico real para cada variable. Encontramos que el score de los componentes espectrales del ERG no evocado no correlaciona con ninguno de los parámetros de los PO's, en ninguno de nuestros grupos de interés (**Figura 12**).

Figura 11.

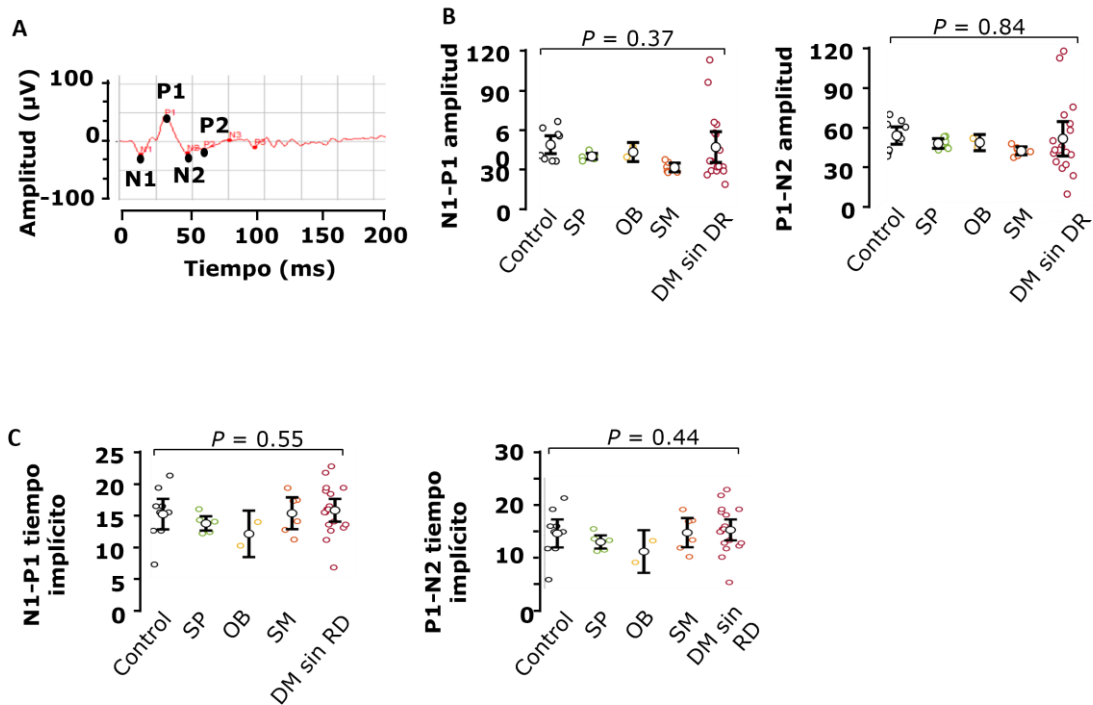


Figura 11. Análisis de las oscilaciones medidas por ERG's espontáneos en humano con un enfoque en condiciones de riesgo para la diabetes tipo 2. **A)** Trazos representativos de ERG's espontáneos en sujetos control (negro), con sobrepeso (SP, verde), obesidad (OB, amarillo), síndrome metabólico (SM, naranja) y Diabetes Mellitus sin retinopatía diabética (DM sin RD, rojo). Análisis de Wavelet para **B)** cada grupo por separado y **C)** combinando todas las condiciones de enfermedad en un solo grupo. Los grupos se definen en los Métodos y sus características se indican en la **Tabla 1**. Los gráficos muestran la potencia media del escalograma \pm s.e.m. en registros de 20 segundos de duración entre 0.3-40 Hz (gráfica principal) y 0.3-2 (I), 10-20 (II) y 20-40 (III) Hz (gráficos insertados), donde se observaron picos consistentes en el grupo de control. **D)** Análisis del área bajo la curva (AUC) y frecuencia pico en las bandas I, II y III de espectros de potencia en los grupos control (negro) y enfermos (rojo). Los valores de P se determinaron mediante la prueba t de Student no apareada (control, n=62; SP, n=41; OB, n=16; SM, n=55; DM sin RD, n=63). Los gráficos muestran la media \pm el intervalo de confianza

Figura 12.

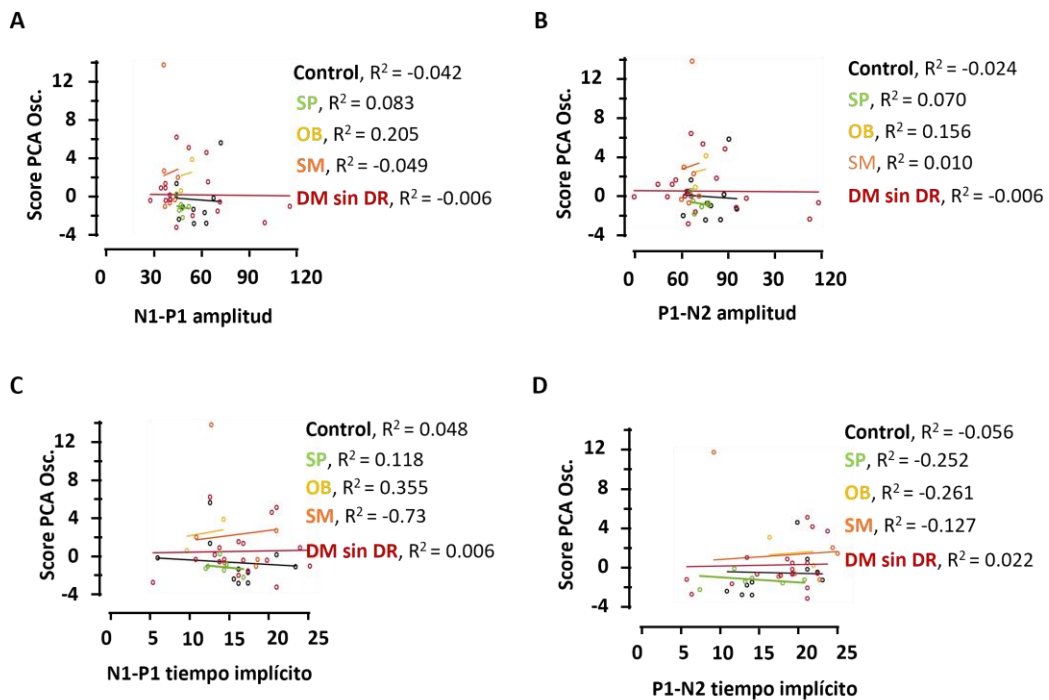


Figura 12. Análisis de la relación entre los potenciales oscilatorios del ERG evocado con las oscilaciones medidas por ERG no evocado. regresión lineal entre los PO's y PCA score de las oscilaciones espontáneas en humanos (Score PCA Osc.). Análisis de correlación entre el score resultante del análisis de componentes principales (PCA) de las características relativas a las oscilaciones espontáneas medidas por ERG que presentan mayor varianza (score PCA Osc.) y la amplitud de **A)** N1-P1, **B)** P1-N2 y el tiempo implícito de **C)** N1-P1 y **D)** P1-N2 de los PO's sujetos control (negro), con sobrepeso (SP, verde), obesidad (OB, amarillo), síndrome metabólico (SM, naranja) y Diabetes Mellitus sin retinopatía diabética (DM sin RD, rojo). R², coeficiente de correlación de Pearson (control, n=8; SP, n=5; OB, n=2; SM, n=6; DM sin RD, n=18).

VI.2 Aproximación de las características de la actividad espontánea de la retina medida por ERG

A raíz de los hallazgos antes descritos, otras personas en el grupo de trabajo desarrollaron un método diagnóstico predictivo para los principales factores de riesgo de la DM2, a saber, sobrepeso y obesidad, basado en el registro no invasivo de oscilaciones espontáneas por ERG. Si bien se encontró en el humano, que las ondas entre 0.3 y 40 Hz poseen alto valor predictivo (métricas AUC, exactitud, precisión, sensibilidad y especificidad > 0.8) y que, en animales, las ondas entre 0.1-10Hz permiten discriminar entre casos control y enfermos, se desconoce bastante sobre la naturaleza de esta señal. Por lo que, a continuación, realizamos análisis de correlación y coherencia entre señales medidas simultáneamente *in vivo* y ERG *ex vivo* en ratón, para entender más sobre esta señal.

Dado que el ERG se registra *in vivo*, las bandas de frecuencia pueden pertenecer a actividad que no provenga de la retina, por lo que es necesario desarrollar controles que permitan explorar la fuente de dicha actividad.

Las señales del ERG es posible que provengan del cerebro, de la respiración y/o de la actividad cardíaca. Dentro de la banda 0.1-10 Hz, los componentes espectrales mayores a 5 Hz podrían ser generados por los latidos del corazón, dado que, cuando los ratones son anestesiados con ketamina : xilacina, presentan una frecuencia cardíaca superior a 5 Hz (143). Hemos medido los movimientos de la caja torácica del ratón simultáneamente con el ERG espontáneo (**Figura 13A**). La actividad registrada por el sensor piezoeléctrico permite observar dos bandas de frecuencia, una de mayor potencia con frecuencia pico de 2.5 Hz y otra que puede ser de resonancia, ya que oscila a 5 Hz (**Figura 13B**), las cuales corresponden a la actividad respiratoria. Debajo de 2 Hz, el sensor piezoeléctrico no mide ninguna actividad (**Figura 13B**). La sobreposición de los componentes espectrales derivados del ERG y de la señal del sensor de tórax muestra que sólo las oscilaciones de baja (0.1 – 0.8 Hz) y media-baja (1.0 – 1.8 Hz) frecuencia del ERG, no se superpusieron con los componentes relacionados con la respiración (**Figura 13C**, $P < 0.05$). Además, observamos que los picos de frecuencia baja y media-baja del ERG espontáneo no correlacionaron con la frecuencia respiratoria, mientras que los picos de frecuencia media y media-alta sí lo hicieron (**Figura 13D**). Asimismo,

Figura 13.

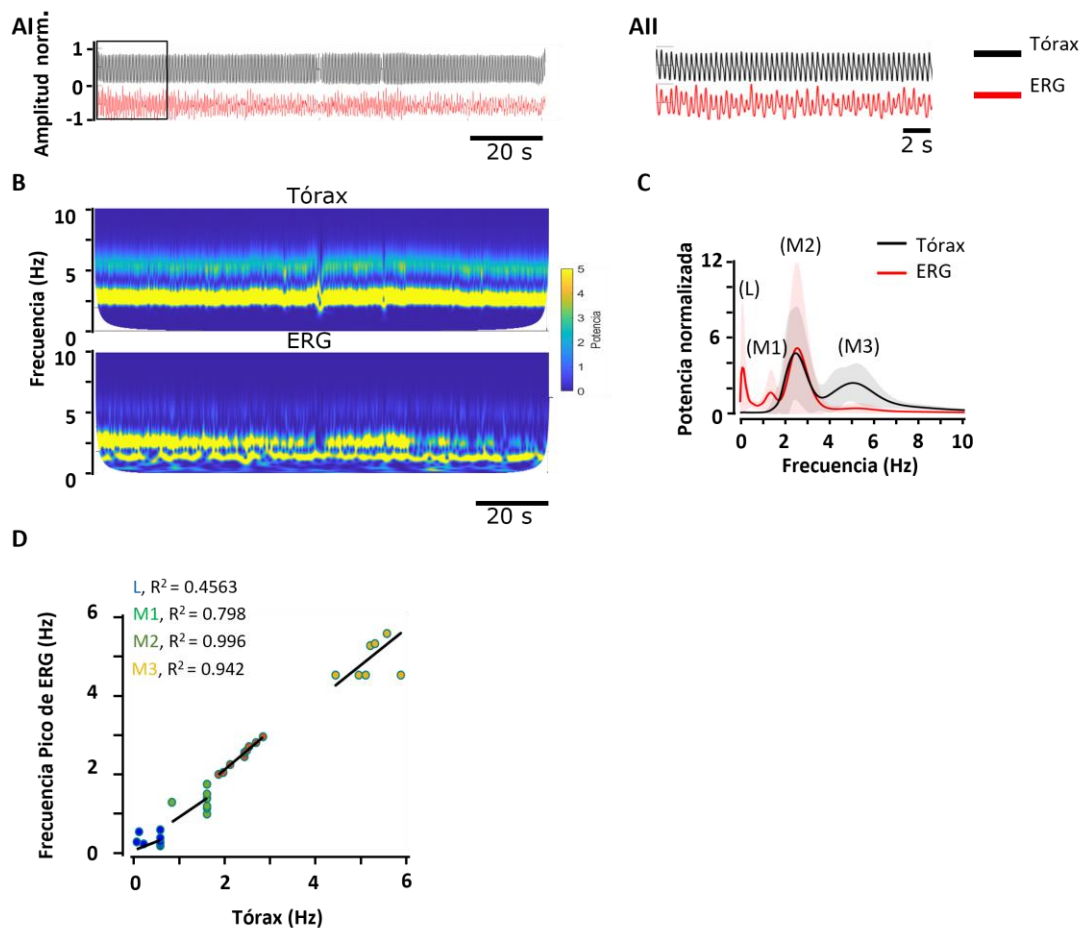
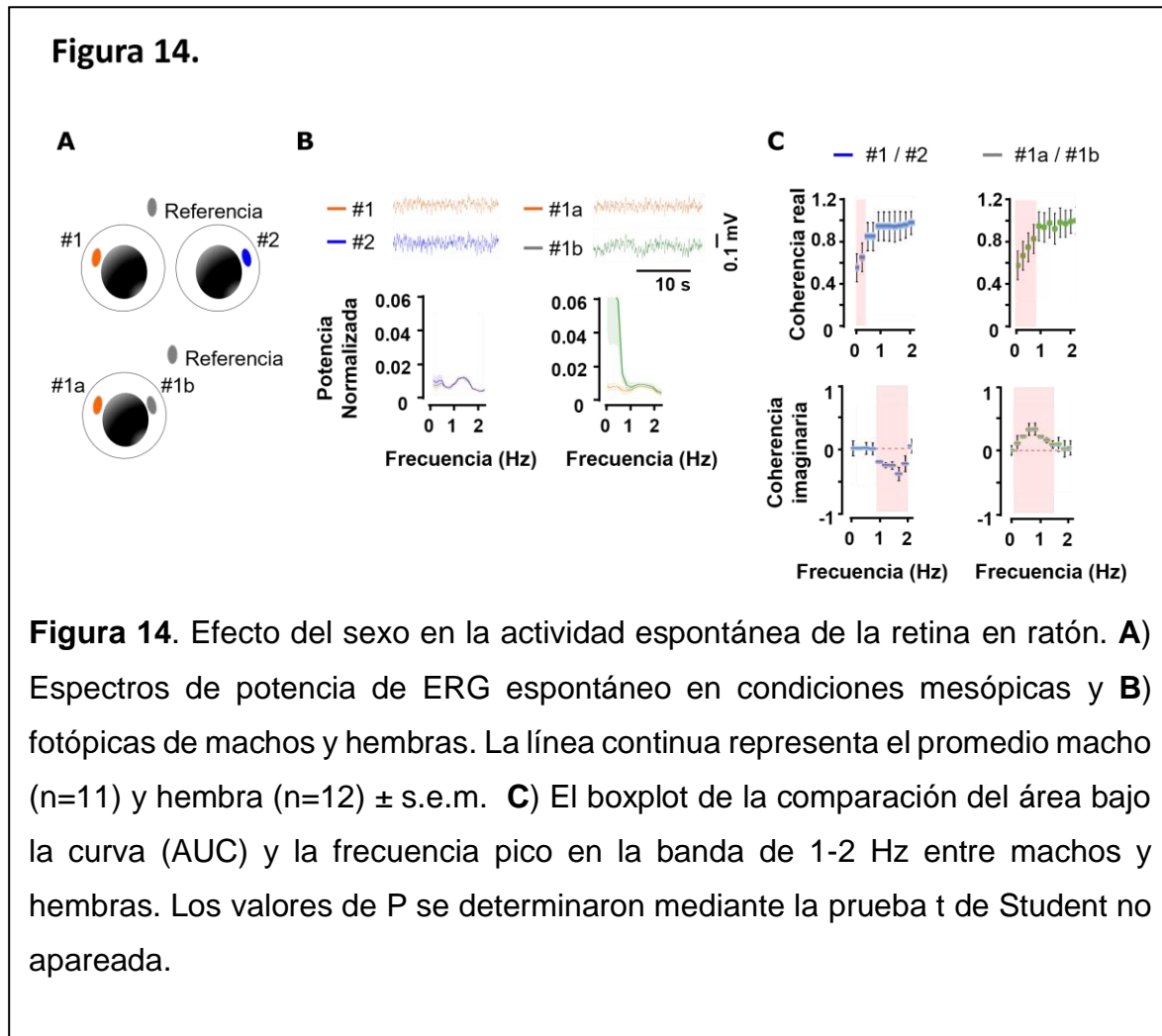


Figura 13. Evaluación de la participación de la actividad cardiorrespiratoria en la actividad oscilatoria espontánea de ERG en ratón. **AI)** Trazo crudo ilustrativo de ERG espontáneo y registro simultáneo del sensor de tórax en ratón. **AII)** Ampliación en el tiempo de las dos señales correspondientes a **AI**. **B)** Escalogramas ilustrativos del ERG espontáneo y registro del tórax en un ratón. **C)** Análisis wavelet de ERG espontáneo in vivo y sensor de tórax registrados simultáneamente en ratones C57BL6 en condiciones fotópicas. Los gráficos muestran la potencia media del escalograma \pm s.e.m. a lo largo del minuto de registro ($n = 13$ ojos). Se detectaron consistentemente tres picos (L, M1 y M2) en los componentes espectrales de los ERG espontáneos de ratón. **D)** Análisis de correlación entre la frecuencia pico de los diferentes componentes entre ERG no evocado y tórax. Los componentes de frecuencia media (M2) y media alta (M3) están altamente correlacionados con la actividad del sensor de tórax ($R^2 = 0.996$ y $R^2 = 0.942$, respectivamente), mientras que los componentes de frecuencia media baja (L) y primera frecuencia media (M1) no lo son ($R^2 = 0.45$ y $R^2 = 0.798$, respectivamente).

curva ni en la frecuencia pico de la actividad oscilatoria espontánea medida en condiciones de luz y oscuridad (**Figura 14A-C**). Por lo que, concluimos que el sexo no interviene en la actividad de interés y que, arriba de 1.8 Hz, es muy probable que el ERG mida actividad respiratoria. Por lo que posteriormente, nos enfocamos a la señal debajo de este valor.



Para determinar si las oscilaciones debajo de 1.8 Hz (**Figura 13C**), son generadas localmente en la retina o por campos conducidos por volumen generados fuera de la retina, se procedió a un análisis de coherencia entre registros simultáneos de ambos ojos o doble registro en un mismo ojo de ratones. Se calculó la coherencia real y la imaginaria entre las señales medidas por dos sensores

ubicados (i) en corneas diferentes o (ii) en la misma cornea de un animal (**Figura 15A**). En ambas condiciones aparecen oscilaciones entre 0.1 y 2 Hz (**Figura 15B**), cuyos valores de coherencia real muestran alta coherencia en amplitud arriba de 0.9 Hz (**Figura 15C**). Estas oscilaciones se encuentran fuera de fase (coherencia imaginaria diferente a 0 arriba de 1 Hz) cuando se registran los dos ojos simultáneamente (**Figura 15C**), lo que sugiere que las oscilaciones en 0.9/1 y 2 Hz se generan localmente en cada retina, y cuando se colocan los dos electrodos en un mismo ojo, hay un desfase en las oscilaciones entre 0.1 a 1.5 Hz (coherencia imaginaria diferente a 0 de 0.1-1.5 Hz), lo que sugiere que hay distintos generadores en cada una de las retinas (**Figura 15C**).

Por último, averiguamos si las retinas aisladas producen oscilaciones espontáneas en el rango de frecuencia de interés. El análisis espectral de ERG espontáneos en explantes retinianos de ratón control (**Figura 16A**) confirmó la presencia de oscilaciones rítmicas (**Figura 16B**) de 0.1-5 Hz (**Figura 16C**), cuando las entradas de fotorreceptores a las células bipolares están bloqueadas farmacológicamente con NBQX y L-AP4. La frecuencia pico es de 2.0 ± 0.1 Hz (**Figura 16C**). Pruebas farmacológicas mostraron que, además de ser inhibidas por la lidocaína, las oscilaciones espontáneas del potencial de campo retiniano son sensibles a la nifedipina (**no mostrado**) y al ácido meclofenámico (**Figura 16D**), lo que indica que esta actividad se basa en la permeabilidad a Na^+ , los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la actividad mediada por la unión comunicantes. Estos experimentos que muestran que las oscilaciones espontáneas son generadas por la actividad de las células retinianas que están cascada abajo de la sinapsis de células fotorreceptoras-bipolares y son inhibidas por GABA y la señalización glicinérgica, son consistentes con los déficits retinianos internos detectados al inicio de la diabetes(144).

Figura 15.

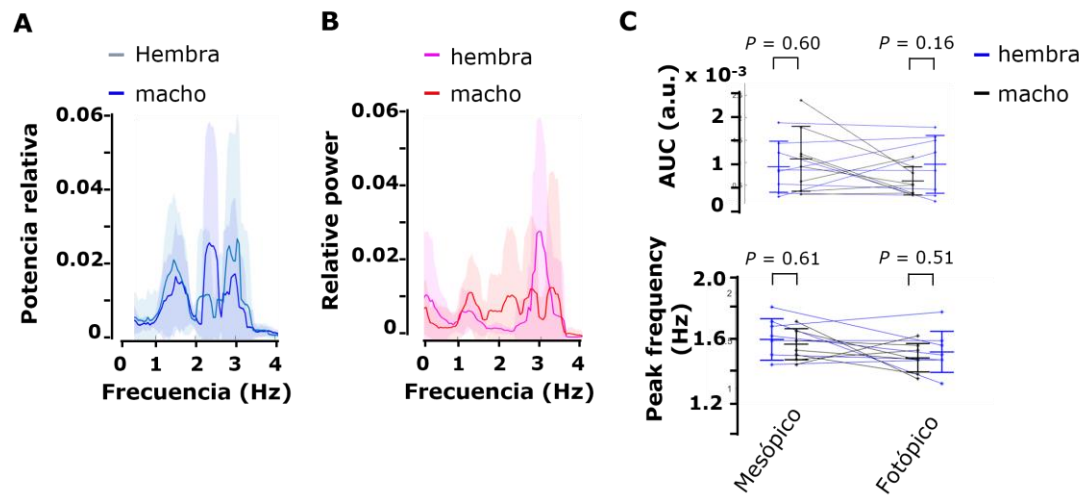


Figura 15. Análisis de coherencia de las oscilaciones espontáneas medidas por ERG en ratón. **A)** Representación esquemática de las posiciones de los electrodos corneales durante el registro simultáneo del mismo ojo (electrodos #1a y #1b) o ambos ojos (electrodos #1 y #2) con el electrodo referencia. **B)** Trazos representativos de ERG fotópico de los electrodos #1a, #1b, #1 y #2, y sus respectivos espectros de potencia. **C)** Valores de coherencia real y coherencia imaginaria de los conjuntos de electrodos #1a / #1b y #1 / #2, promediados entre 0.1-4 Hz, para tres ratones. Valores, media \pm d.s. Las áreas sombreadas en rojo indican el rango en el que la coherencia y la coherencia imaginaria son significativamente diferentes de 1 y 0, respectivamente. Los valores de P se determinaron mediante la prueba t de Student no apareada. Además, se precisa que la coherencia real e imaginaria son significativamente diferentes para la señal registrada por el conjunto de electrodos #1a / #1b en comparación con la medida por el conjunto de electrodos #1 / #2 entre 0.1 y 2 Hz.

Figura 16.

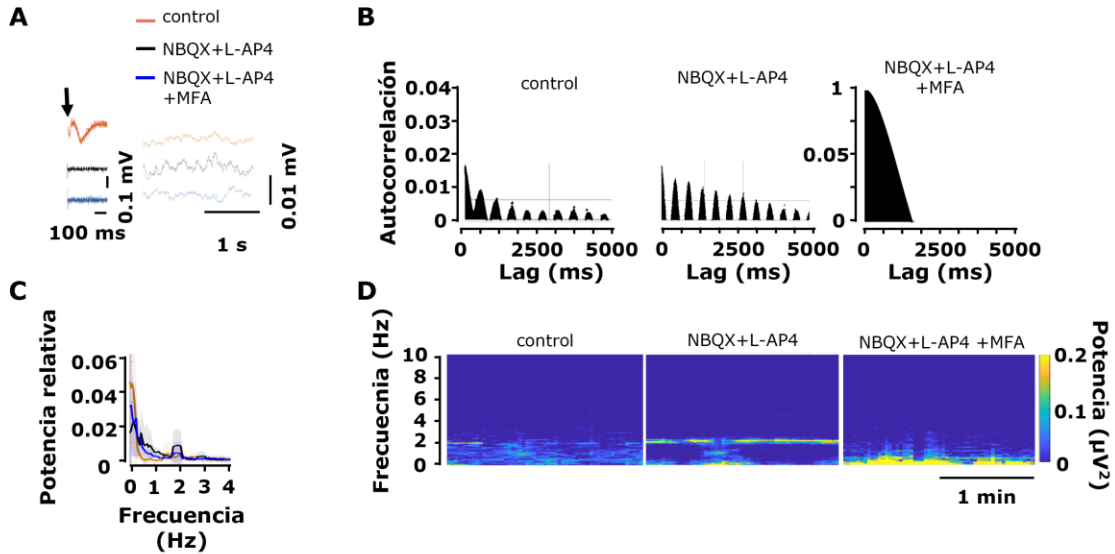


Figura 16. Análisis de la actividad oscilatoria espontánea en explantes de retina de ratón. **A)** Trazos representativos del registro del ERG evocado y espontáneo en un explante de retina de ratón, incubado en solución de Ames (control) adicionado con 10 μM de NBQX y 50 μM de L-AP4 (NBQX + L-AP4), combinado o no con ácido meclofenámico (MFA) a 500 μM . La flecha indica el flash de luz (7.72 $cd.s/m^2$). **B)** Espectro de potencia relativa (media \pm s.e.m.), **C)** autocorrelograma y **D)** escalogramas correspondientes a los componentes espectrales entre 0.1-10 Hz del ERG espontáneo en 3 explantes de retina de ratón en condiciones fotópicas.

VII. Discusión

La comunidad clínica está experimentando un cambio drástico en el (tele)diagnóstico guiado por aprendizaje automático, particularmente en el contexto

de la detección de RD que requiere tratamiento, y el impacto positivo en la atención médica se está haciendo evidente(145,146). Existen también algoritmos de predicción para la diabetes (147), pero no existe tal enfoque para los principales factores de riesgo de la diabetes tipo 2, es decir, el sobrepeso, la obesidad y el SM sin DM, que se pueden considerarse como factores de riesgo muy tempranos de la RD. El propósito de la detección de tales condiciones consiste en prevenir la DM, con la adopción de hábitos saludables (148). Es importante precisar que las personas de peso normal, no siempre son metabólicamente sanas (149) y el fenotipo de obesidad puede no asociarse con ninguna o poca evidencia de disfunción metabólica. Por lo anterior, queda clara la necesidad de un método diagnóstico temprano que identifique a los pacientes con riesgo de desarrollar DM2 y, por ende, enfermedades retinianas, aun sin presentar signos y síntomas. Es en este sentido que los hallazgos aquí presentados son importantes, ya que, si bien no he trabajado directamente con modelos de predicción, mis experimentos han evidenciado un impacto muy temprano de los cambios metabólicos sistémicos en las señales espontáneas medibles por ERG, que, en parte son generados por la retina, y que estos han mostrado tener poder predictivo para identificar la obesidad. Además, estos resultados se suman a la creciente lista de evidencia que muestran a la neurodegeneración de la retina como un evento temprano en la patogénesis de la RD(150).

Las alteraciones en las oscilaciones espontáneas medidas por ERG no se acompañaron de cambios en los PO's en ratones alimentados con dieta alta en grasa y en personas con sobrepeso, obesidad y SM. Estas observaciones son consistentes con estudios previos en modelos animales(127), pero contrastan con datos que muestran una amplitud de los PO's reducida en ratones alimentados con dieta alta en grasa (151) o en ratones ob / ob(152). Estas discrepancias pueden deberse a los diferentes mecanismos que causan la obesidad, conocidos por dar lugar a modelos con características propias(153). Particularmente, nuestra dieta alta en grasa está más enriquecida en lípidos que en hidratos de carbono, lo que difiere del estudio de Rajagopal y *col.* dónde su dieta está más enriquecida en hidratos de carbono (152).

Mientras que la onda B del ERG evocado se ve afectada en pacientes con obesidad (154) no existe un informe previo del efecto de la obesidad en los PO's en humanos. En nuestro grupo de pacientes con diabetes, pero sin RD, la amplitud y el tiempo implícito de los PO's tienden a disminuir y aumentar, respectivamente, como se ha reportado anteriormente (96). En general, estos datos concuerdan con la idea de que la actividad espontánea de la retina podría llegar a sustituir los PO's (137), como el parámetro funcional que más tempranamente se altera en estadios prediabéticos. De acuerdo con ello, está nuestro hallazgo de que el score obtenido por PCA del componente espontáneo del ERG, no se correlaciona con los parámetros de los PO's.

Se considera que los PO's reflejan la función de la retina interna y son sensibles a los cambios en la circulación retiniana (96). En este sentido, uno puede preguntarse acerca de la naturaleza de las oscilaciones espontáneas medidas por ERG no evocado. Si el ERG se entiende, clásicamente, como la suma de las actividades sinápticas e intrínsecas locales de las células de la retina, las oscilaciones de baja amplitud y frecuencia lenta registradas en el modo no evocado, pueden estar contaminadas por fuentes distintas de la retina. El potencial de campo oscilatorio de bajo rango que describimos se observa en retinas aisladas e in vivo, pero ignoramos si corresponden al mismo fenómeno. La oscilación espontánea del ERG *in vivo* ocurre en un rango de frecuencia similar en ratones (0.1-2.1 Hz) y humanos, para el componente más lento (0.3-2.5 Hz), pero se pueden registrar otros ritmos fisiológicos en estos anchos de banda. En humanos, la respiración reportada es demasiado lenta (~ 0.2-0.3 Hz) (155) para ser detectada por el ERG en nuestras condiciones de registro, al igual que el movimiento ocular (0.26 Hz) (155), pero la actividad cardíaca (0.9-1.4 Hz) (155) y las actividades cerebrales, sí podrían estar siendo registradas por el ERG. Además, en ratones anestesiados de manera estable, la respiración se encuentra en el rango de 0.9-1.08 Hz, mientras que el ritmo cardíaco se encuentra entre 5 y 7.5 Hz. De manera llamativa, en ratas anestesiadas con ketamina-xilasina, el movimiento ocular muestra dos componentes de frecuencia, 1 y 12.2 Hz, el primero correlacionándose con la frecuencia respiratoria (155). Quedaría por medir los movimientos oculares del ratón

y valorar la correlación de su(s) frecuencia(s) con las del ERG no evocado. Con nuestras aproximaciones, no podemos asegurar que el rango completo de oscilaciones espontáneas medidas por ERG no evocado se origine en la retina, pero es plausible que al menos parte de estas señales provengan de la retina, ya que, en retinas adultas sanas, se ha reportado que varios tipos de neuronas oscilan espontáneamente, y esto, dentro de un rango de frecuencias de 0.7 a más de 10 Hz. En particular, se han registrado oscilaciones espontáneas de membrana dependientes de Ca^{2+} en terminales axonales de células bipolares (111,156,157), que produce una liberación de neurotransmisores a neuronas postsinápticas, incluidas, las células amacrinas y ganglionares (158,159). Además, células amacrinas también son capaces de producir actividad oscilatoria intrínseca, entre ellas, las células amacrinas de tipo starburst (158,160,161).

En conjunto, el hecho de que células individuales pueden generar actividad intrínseca y, (157–159,161), el hecho de que las neuronas retinianas pueden acoplarse eléctricamente, (162) generando interacciones de red a gran escala, es lógico pensar en la generación de fluctuaciones espontáneas del potencial de campo (163) en la retina. De manera notable, hemos encontrado que se pueden medir fluctuaciones del potencial de campo en explantes de retina de ratón cuando se bloquea la entrada sináptica de los fotorreceptores, tanto de la vía ON como OFF. Esto concuerda con estudios previos que muestran que, al aplicar los fármacos NBQX y L-AP4, en el baño de perfusión de retina de ratones silvestres, se induce una actividad espontánea en las células ganglionares, amacrinas y bipolares similar a la de retina de ratones con retinitis pigmentosa (enfermedad donde hay una neurodegeneración en los fotorreceptores (164)). Asimismo, encontramos que dicha actividad es inhibida por el ácido meclofenámico que bloquea las uniones comunicantes que forman las sinapsis eléctricas entre las neuronas. Nuestra interpretación de este resultado, es, que las oscilaciones intrínsecas en la retina involucran a uniones comunicantes, que pueden ser las uniones entre neuronas, células gliales o hasta endoteliales (162). Al respecto, un estudio del 2012 reportó que arteriolas grandes de la retina oscilan espontáneamente en frecuencias lentas a altas, con un espectro de potencia muy similar al registrado por ERG no evocado en nuestro estudio. (165). Por todo lo anterior, concluimos que, si bien nuestros

diferentes análisis de datos *in vivo* no pueden probar que el ERG no evocado provenga de la retina del ratón, los explantes de retina muestran oscilaciones espontáneas de bajo frecuencia, lo que indica que la actividad retiniana local está embebida en la oscilación espontánea medida por ERG no evocado *in vivo*.

A continuación, quisiera discutir más a fondo por qué consideramos que no se ha reportado potencial de campo oscilatorio en retinas de ratones silvestres. Antes que todo, hay el argumento que, por ser parte del sistema visual, se ha prestado mucha más atención a la función retiniana en respuesta a estímulos luminosos. El interés por la actividad espontánea ha sido más enfocado en la retina en desarrollo.

En general, se han detectado oscilaciones retinianas espontáneas bajo condiciones donde está reducida la entrada sináptica asociada a la luz, pero no así en condiciones fisiológicas (166–170). La razón principal por la cual no se ha observado fluctuaciones en el potencial de campo en retinas de ratones silvestres, es porque la mayoría de los estudios es porque la mayoría de los estudios se centran en la actividad evocada de la retina. El único estudio que midió potencial de campo retiniana sin estímulo (9), registró retinas distróficas. Por lo tanto, discutimos nuestros resultados en el contexto de resultados con registros individuales de neuronas retinianas o de las células ganglionares con multi arreglo en condiciones espontáneas.

Nuestros datos muestran claramente que oscilaciones espontáneas en el potencial de campo retiniano son discontinuas, de baja frecuencia y baja potencia. En este contexto, las condiciones de registro y análisis de estudios previos no son adaptados para detectar esta actividad. Por ejemplo, Yee *et al* (167). consideraron que las células ganglionares de la retina con una tasa de disparo superior a 2 desviaciones estándar por encima de la media de disparo oscilan, y aquellas con picos más bajos no. Sin embargo, algunas células ganglionares de tipo silvestre muestran oscilaciones discontinuas lentas (0.2-2 Hz) (ver Figura 6A-C de Yee 2012 (167)) y se puede interpretar que las oscilaciones grandes y lentas a 0.7 ± 0.5 Hz que aparecen cuando se bloquea las interneuronas inhibitorias con estricnina, TPMPA, y gabazina, pueden ser la actividad discontinua que gana en sincronidad cuando se suprimen las entradas inhibitorias (171). Este escenario potencial se ve

respaldado por la falta de relación entre las oscilaciones rápidas y lentas en las retinas distróficas (172). Además, en el análisis de regresión entre células ganglionares retinianas silvestres y distróficas (ver Fig. 6C de Yee 2012 (172)), se puede apreciar que dos de cada veintiuna células ganglionares retinianas de ratones silvestres (i.e., 9.5 %) oscilan a aproximadamente 2 Hz y ocho de veintiuna (i.e., 38 %) oscilan más lentamente. Lo que sugiere que estas células, que generalmente no se consideran, pueden contribuir a una oscilación lenta del potencial de campo retiniano.

Del mismo modo, Margolis y *col.* (53) consideraron que las oscilaciones en el potencial de membrana de las células ganglionares subyacentes a sus disparos en reposo en condiciones de distrofia, no estaban presentes en retinas de ratones silvestres (53). Sin embargo, una inspección visual minuciosa de la Fig. 2B (53), muestra la presencia de fluctuaciones rítmicas de baja amplitud, de frecuencias distintas, que no coinciden con los disparos de las ganglionares en retinas de ratones silvestres. Los autores de este trabajo reportaron que los disparos de las ganglionares, fueron acompañados por corrientes de membrana que fueron calificadas como ruido sináptico basal de baja amplitud con pocos eventos resolubles (ver Fig. 3B Margolis 2008 (53)). En otros trabajos, oscilaciones sinusoidales (53) o señales de baja frecuencia (53,172) se eliminaron del análisis. Además, nunca se encontraron fluctuaciones rítmicas del potencial local de campo en retinas de ratones silvestres, utilizando filtros de paso bajo (1-60 Hz) (datos no mostrados de Menzler y Zeck (53)). Es posible que no se observaran señales lentas y de baja amplitud, ya que el estudio se centró en el potencial local de campo oscilatorio rápido (frecuencia media de 7 a 10 Hz), típica de las retinas distróficas.

Además, la naturaleza discontinua del potencial de campo oscilatorio de la retina apunta a una pobre sincronización entre los conjuntos de células retinianas responsables de esta actividad. De hecho, la sincronización y la actividad oscilatoria en la retina son procesos mutuamente dependientes (173). Por lo tanto, si los osciladores retinianos intrínsecos oscilan a diferentes frecuencias (células bipolares a 3-4 Hz (105), las células ganglionares de la retina <10 Hz (172,174); y no están sincronizados, la probabilidad de detectar oscilaciones de campo es baja. En este sentido, varias evidencias apuntan diferencias de fase individuales relativamente

grandes e irregulares entre la actividad de las neuronas de la retina. En nuestra banda de frecuencia de interés, el correlograma de la actividad oscilatoria lenta (1-5 Hz) medida en las células ganglionares de la retina, muestra picos amplios que a menudo se desvían del retraso de fase cero, lo que indica grandes rotaciones de fase y mala sincronización (173). Que la liberación espontánea de glutamato por las células bipolares de la retina no siempre es suficiente para activar la entrada inhibitoria de las células amacrinas (105), es una prueba más de la pobre sincronización en retinas en reposo.

A la luz de estas consideraciones, nuestros datos sugieren que la obesidad produce cambios que han de influir sobre los patrones oscilatorios espontáneos de ERG, quizá a través de modificar las propias subunidades oscilatorias, su acoplamiento, y/o la conectividad de la red. En este contexto, durante la obesidad hay un aumento en los niveles séricos de, triglicéridos, colesterol, lipoproteínas de baja densidad, insulina en ratones como en humanos (175,176), además de una inflamación sistémica (177), lo que promueve el debilitamiento de la BHR que en condiciones de salud, regula el paso de las moléculas mencionadas previamente. Estudios muestran que el daño en la BHR ocasionado por la obesidad, facilita el paso de estas moléculas al interior de la retina (178,179).

Hemos mostrado que la actividad espontánea está alterada en los modelos de obesidad inducida por dieta alta en grasa y obesidad espontánea, lo que concuerda con el hecho que en etapas tempranas de la diabetes, las oscilaciones intrínsecas de células bipolares y amacrinas se alteran en etapas tempranas de la diabetes. En general, encontramos frecuencias pico reducidas el rango de 0.2-2.5 Hz, que se relaciona con una disminución de la inhibición en la retina en etapas tempranas de la diabetes (180–183). Apoyando la idea de que, las oscilaciones espontáneas detectadas por el ERG no evocado que se producen en la retina, está el reciente hallazgo de que la RD puede ser detectada por aprendizaje automático de la señal del electrooculograma (EOG), que mide el potencial eléctrico entre la córnea y retina (184).

Aunque los estudios de la actividad retiniana espontánea son pocos en el adulto y su papel funcional aún no se ha entendido completamente (185), nuestros resultados apoyan la idea de que, la actividad de 0.3-40 Hz es relevante para el proceso de la enfermedad. Respecto a esto, cabe mencionar que, en paralelo a mi trabajo, se desarrolló un modelo basado en algoritmo de aprendizaje supervisado de tipo Random Forest que es capaz de distinguir los casos de enfermedad de los casos de control en los dos modelos de obesidad y en nuestro grupo de pacientes. Esto sugiere que el contenido predictivo de las señales espontáneas de ERG se conserva en mamíferos y es robusto.

Por todo lo anterior, queda claro que los hallazgos de este trabajo tienen implicaciones clínicas. La información clínicamente relevante a la que contribuye el sistema de diagnóstico predictivo, es detectar personas con factores de riesgo prevenibles para la RD. El Programa de Prevención de la Diabetes por parte de la asociación americana de diabetes, informó recientemente que las intervenciones que retrasan el desarrollo de la DM2 en las personas en riesgo (sobrepeso / obesidad con alteraciones en la glucemia) no reducen la prevalencia posterior de RD (186), pero esto se refiere a las personas que han progresado a diabetes. En los casos en que la intervención intensiva en el estilo de vida y la metformina lograron prevenir la progresión a la DM2, la RD no ocurre(186). En este sentido, es importante reconocer que las intervenciones en el estilo de vida se logran a través de una implicación considerable de los médicos y que lograr concientizar los pacientes y sus familiares es un desafío, pero no deja de ser el mejor camino para evitar la DM2 y sus complicaciones, notablemente en la visión.

VIII. Conclusiones

- El ERG espontáneo en ratones muestra oscilaciones entre 0.1-10 Hz con picos en las bandas de 0.1 – 0.8, 1.0 – 1.8 y 2.0 – 4.0 Hz, mientras que, en humanos, son entre 0.3 y 40 Hz, con picos principales en las bandas de 0.3-2, 10-20 y 20-40 Hz.
- En los ratones, las frecuencias menores 1.8 Hz son propias de la retina y las mayores a esta, pueden ser generadas por la actividad cardio respiratoria.
- En los ratones, la frecuencia pico de las oscilaciones < 1.8 Hz es más lentas en condiciones fotópicas que mesópicas.
- La retina genera oscilaciones espontáneas lentas que dependen de las uniones comunicantes y se producen en la retina interna.
- Evidencias sugieren que, en el ratón, las oscilaciones <1.8 Hz están constituidas por dos componentes, uno lento (0.1 – 1.5 Hz) y uno más rápido (1.5 – 2.1 Hz), el lento siendo generado por distintos circuitos en una misma retina.
- Las oscilaciones lentas medidas por ERG no evocado, no se modifican de acuerdo con el sexo, en ratón.
- La actividad oscilatoria espontánea medida por ERG se modifica en condiciones de obesidad:
 - Las oscilaciones del ERG espontáneo presentan una ralentización en la banda de 1.0 – 1.8 y 0.6 – 1.0 Hz en el modelo de obesidad por dieta alta en grasa y de obesidad espontánea, respectivamente, en comparación con sus respectivos grupos control, mientras que los PO's no se modifican.
 - En los ratones alimentados con DAG por 5 semanas, la disminución en la frecuencia pico asociada a las condiciones fotópicas se pierde, debido a que la frecuencia pico aumenta en la banda de 0.9 – 2.5 y 0.9 – 2.1 Hz en condiciones mesópicas y fotópicas, respectivamente. Este efecto es transitorio, ya que desaparece a la semana 12.
 - En humano, hay un aumento de la frecuencia pico en la banda de 20-40 Hz en el grupo enfermo (sobrepeso, obesidad, SM y DM sin RD) en comparación con el grupo de sujetos sanos.

- Los parámetros de los PO's en los grupos de sobrepeso, obesidad y SM permanecen sin cambios en comparación con el grupo de sujetos control.

IX. Bibliografia.

1. Moutard C, Dehaene S, Malach R. Spontaneous Fluctuations and Non-linear Ignitions: Two Dynamic Faces of Cortical Recurrent Loops. *Neuron* [Internet]. 2015;88(1):194–206. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26447581>
2. Buzsáki G, Draguhn A. Neuronal oscillations in cortical networks. Vol. 304, *Science*. 2004. p. 1926–9.
3. Buzsáki G, Ponomareff GL, Bayardo F, Ruiz R, Gage FH. Neuronal activity in the subcortically denervated hippocampus: A chronic model for epilepsy. *Neuroscience* [Internet]. 1989 [cited 2021 Jun 13];28(3):527–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2710328/>
4. Orgy Buzs G. Hippocampal Sharp Wave-Ripple: A Cognitive Biomarker for Episodic Memory and Planning.
5. Blankenship AG, Feller MB. Mechanisms underlying spontaneous patterned activity in developing neural circuits. Vol. 11, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2010. p. 18–29.
6. Ackman JB, Burbridge TJ, Crair MC. Retinal waves coordinate patterned activity throughout the developing visual system. *Nature* [Internet]. 2012;490(7419):219–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23060192>
7. Wong RO. Retinal waves and visual system development. *Annu Rev Neurosci* [Internet]. 1999;22:29–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10202531>
8. Poria D, Dhingra NK. Spontaneous oscillatory activity in rd1 mouse retina is transferred from ON pathway to OFF pathway via glycinergic synapse. <https://doi.org/10.1152/jn.00702.2014> [Internet]. 2015 Jan 15 [cited 2021 Sep 15];113(2):420–5. Available from: <https://journals.physiology.org/doi/abs/10.1152/jn.00702.2014>
9. Goo YS, Ahn KN, Song YJ, Ahn SH, Han SK, Ryu SB, et al. Spontaneous oscillatory rhythm in retinal activities of two retinal degeneration (rd1 and rd10) mice. *Korean J Physiol Pharmacol*. 2011 Dec;15(6):415–22.

10. Trenholm S, Borowska J, Zhang J, Hoggarth A, Johnson K, Barnes S, et al. Intrinsic oscillatory activity arising within the electrically coupled All amacrine-ON cone bipolar cell network is driven by voltage-gated Na⁺ channels. *J Physiol* [Internet]. 2012 May 15 [cited 2019 Nov 26];590(10):2501–17. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.2011.225060>
11. Borowska J, Trenholm S, Awatramani GB. An intrinsic neural oscillator in the degenerating mouse retina. *J Neurosci*. 2011 Mar 30;31(13):5000–12.
12. Toychiev AH, Yee CW, Sagdullaev BT. Correlated spontaneous activity persists in adult retina and is suppressed by inhibitory inputs. *PLoS One*. 2013;8(10).
13. Trenholm S, Awatramani GB. Origins of spontaneous activity in the degenerating retina. *Front Cell Neurosci*. 2015 Jul 29;9(JULY).
14. Shirao Y, Kawasaki K. Electrical responses from diabetic retina. *Prog Retin Eye Res*. 1998;17(1):59–76.
15. Tzekov R, Arden GB. The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol* [Internet]. 1999;44(1):53–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10466588>
16. Luu CD, Szental JA, Lee SY, Lavanya R, Wong TY. Correlation between retinal oscillatory potentials and retinal vascular caliber in type 2 diabetes. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2010 Jan 1;51(1):482–6.
17. Bresnick GH, Korth K, Groo A, Palta M. Electroretinographic Oscillatory Potentials Predict Progression of Diabetic Retinopathy: Preliminary Report. *Arch Ophthalmol*. 1984 Sep 1;102(9):1307–11.
18. Fortune B, Schneck ME, Adams AJ. Multifocal electroretinogram delays reveal local retinal dysfunction in early diabetic retinopathy. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 1999 Oct;40(11):2638–51.
19. Harrison WW, Bearse Jr. MA, Ng JS, Jewell NP, Barez S, Burger D, et al. Multifocal electroretinograms predict onset of diabetic retinopathy in adult patients with diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2011;52(2):772–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20926810>
20. Calbiague VM, Vielma AH, Cadiz B, Paquet-Durand F, Schmachtenberg O.

- Physiological assessment of high glucose neurotoxicity in mouse and rat retinal explants. *J Comp Neurol*. 2020 Apr 1;528(6):989–1002.
21. Castilho Á, Ambrósio AF, Hartveit E, Veruki ML. Disruption of a neural microcircuit in the rod pathway of the mammalian retina by diabetes mellitus. *J Neurosci*. 2015 Apr 1;35(13):5422–33.
 22. Sicree R, Shaw J. Type 2 diabetes: An epidemic or not, and why it is happening. *Diabetes Metab Syndr Clin Res Rev [Internet]*. 2007 Jun [cited 2015 Oct 1];1(2):75–81. Available from:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1871402106000130>
 23. Fatima Perez Heredia SGM. Chronic and degenerative diseases Obesity, inflammation and the immune system. *Proceedings Nutr Soc*. 2012;71(02):332–8.
 24. Winzell MS, Ahrén B. The High-Fat Diet–Fed Mouse. *Diabetes [Internet]*. 2004 [cited 2017 May 26];53(suppl 3). Available from:
http://diabetes.diabetesjournals.org/content/53/suppl_3/S215.long
 25. Julius D, Nathans J. Signaling by sensory receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jan 1;4(1):a005991.
 26. Marzvanyan A, Alhawaj AF. Physiology, Sensory Receptors [Internet]. StatPearls. StatPearls Publishing; 2019 [cited 2020 Mar 9]. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30969683>
 27. Hillier D, Fiscella M, Drinnenberg A, Trenholm S, Rompani SB, Raics Z, et al. Causal evidence for retina-dependent and -independent visual motion computations in mouse cortex. *Nat Neurosci*. 2017 Jun 27;20(7):960–8.
 28. Zele AJ, Feigl B, Smith SS, Markwell EL. The Circadian Response of Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells. Dryer S, editor. *PLoS One [Internet]*. 2011 Mar 14 [cited 2020 Apr 30];6(3):e17860. Available from:
<https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0017860>
 29. Wässle H. Parallel processing in the mammalian retina. Vol. 5, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Publishing Group; 2004. p. 747–57.
 30. Lee BB, Sun H. Contrast sensitivity and retinal ganglion cell responses in the primate. *Psychol Neurosci*. 2011 Jan;4(1):11–8.
 31. Demb JB, Singer JH. Functional Circuitry of the Retina. *Annu Rev Vis Sci*.

- 2015 Nov 24;1(1):263–89.
32. De Moraes CG. Anatomy of the Visual Pathways. *J Glaucoma* [Internet]. 2013 Jun [cited 2020 Mar 16];22(5 SUPPL.1):S2–7. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00061198-201306001-00004>
 33. Kolb H. Simple Anatomy of the Retina [Internet]. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center; 1995 [cited 2020 Mar 9]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21413391>
 34. Wässle H, Puller C, Müller F, Haverkamp S. Cone contacts, mosaics, and territories of bipolar cells in the mouse retina. *J Neurosci*. 2009 Jan 7;29(1):106–17.
 35. Vlasits AL, Euler T, Franke K. Function first: classifying cell types and circuits of the retina. *Curr Opin Neurobiol* [Internet]. 2019 Jun 1 [cited 2019 May 16];56:8–15. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S095943881830179X?via%3Dihub>
 36. Masland RH. The Neuronal Organization of the Retina. Vol. 76, *Neuron*. NIH Public Access; 2012. p. 266–80.
 37. Kolb H. Organization of the outer plexiform layer of the primate retina: electron microscopy of Golgi-impregnated cells. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. 1970 May 7 [cited 2020 Mar 9];258(823):261–83. Available from: <https://royalsocietypublishing.org/doi/10.1098/rstb.1970.0036>
 38. Hoshi H, Liu WL, Massey SC, Mills SL. ON inputs to the OFF layer: Bipolar cells that break the stratification rules of the retina. *J Neurosci*. 2009 Jul 15;29(28):8875–83.
 39. Piccolino M, Strettoi E, Laurenzi E. Santiago Ramón y Cajal, the retina and the neuron theory. *Doc Ophthalmol* [Internet]. 1989 Feb [cited 2020 Apr 8];71(2):123–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2663394>
 40. R. Sparrow J, Hicks D, P. Hamel C. The Retinal Pigment Epithelium in Health and Disease. *Curr Mol Med*. 2010 Dec 21;10(9):802–23.

41. Vecino E, Rodriguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. Vol. 51, Progress in Retinal and Eye Research. Elsevier Ltd; 2016. p. 1–40.
42. Holländer H, Makarov F, Dreher Z, van Driel D, Chan-Ling T, Stone J. Structure of the macroglia of the retina: Sharing and division of labour between astrocytes and Müller cells. J Comp Neurol [Internet]. 1991 Nov 22 [cited 2020 Apr 15];313(4):587–603. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.903130405>
43. Reichenbach A, Wurm A, Pannicke T, Landiev I, Wiedemann P, Bringmann A. Müller cells as players in retinal degeneration and edema. Vol. 245, Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. Springer; 2007. p. 627–36.
44. van der Wijk AE, Vogels IMC, van Veen HA, van Noorden CJF, Schlingemann RO, Klaassen I. Spatial and temporal recruitment of the neurovascular unit during development of the mouse blood-retinal barrier. Tissue Cell. 2018 Jun 1;52:42–50.
45. Cunha-Vaz J, Bernardes R, Lobo C. Blood-retinal barrier. Eur J Ophthalmol [Internet]. 2011 [cited 2020 Apr 15];21(SUPPL.6):3–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23264323>
46. Pournaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. Vol. 27, Progress in Retinal and Eye Research. Pergamon; 2008. p. 284–330.
47. Nakahara T, Mori A, Kurauchi Y, Sakamoto K, Ishii K. Neurovascular interactions in the retina: Physiological and pathological roles. Vol. 123, Journal of Pharmacological Sciences. 2013. p. 79–84.
48. Pournaras CJ, Rungger-Brändle E, Riva CE, Hardarson SH, Stefansson E. Regulation of retinal blood flow in health and disease. Vol. 27, Progress in Retinal and Eye Research. 2008. p. 284–330.
49. Mccaa CS. The Eye and Visual Nervous System: Anatomy, Physiology and Toxicology. Vol. 44, Environmental Health Perspectives. 1982.
50. Treviño, Mario, & Gutiérrez R. Las bases celulares de las oscilaciones neuronales. Salud Ment [Internet]. 2007 [cited 2021 Sep 9];11–8. Available

from: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0185-33252007000200011&lng=es&nrm=iso

51. Introduction to Neurons and Neuronal Networks | Section 1, Intro Chapter | Neuroscience Online: An Electronic Textbook for the Neurosciences | Department of Neurobiology and Anatomy - The University of Texas Medical School at Houston [Internet]. [cited 2021 Sep 9]. Available from: <https://nba.uth.tmc.edu/neuroscience/m/s1/introduction.html>
52. Chaya T, Matsumoto A, Sugita Y, Watanabe S, Kuwahara R, Tachibana M, et al. Versatile functional roles of horizontal cells in the retinal circuit. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1):1–15.
53. Euler T, Schubert T. Multiple independent oscillatory networks in the degenerating retina [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Cellular Neuroscience*. Frontiers Research Foundation; 2015 [cited 2021 Jun 13]. p. 444. Available from: www.frontiersin.org
54. Sook Goo Y, Jin Park D, Ryul Ahn J, Senok SS, Stasheff SF. Spontaneous Oscillatory Rhythms in the Degenerating Mouse Retina Modulate Retinal Ganglion Cell Responses to Electrical Stimulation. 2016 [cited 2019 Dec 12]; Available from: www.frontiersin.org
55. Oycott BBB. Organization of the prim ate retina: electron microscopy.
56. Kolb H. Amacrine cells of the mammalian retina: Neurocircuitry and functional roles. Vol. 11, *Eye*. Nature Publishing Group; 1997. p. 904–23.
57. Werblin F. Synaptic connections, receptive fields, and patterns of activity in the tiger salamander retina. A simulation of patterns of activity formed at each cellular level from photoreceptors to ganglion cells [the Friedenwald lecture]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 1991 Mar [cited 2020 Mar 25];32(3):459–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2001922>
58. Kolb H, West RW. Synaptic connections of the interplexiform cell in the retina of the cat. *J Neurocytol* [Internet]. 1977 Apr [cited 2020 May 14];6(2):155–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/853310>
59. Bloomfield SA, Völgyi B. The diverse functional roles and regulation of neuronal gap junctions in the retina. Vol. 10, *Nature Reviews Neuroscience*.

- Nature Publishing Group; 2009. p. 495–506.
60. Thoreson WB, Mangel SC. Lateral interactions in the outer retina. Vol. 31, Progress in Retinal and Eye Research. Prog Retin Eye Res; 2012. p. 407–41.
 61. Besharse JC. Chapter 3 The daily light-dark cycle and rhythmic metabolism in the photoreceptor—Pigment epithelial complex. Prog Retin Res. 1982 Jan 1;1(C):81–124.
 62. Farrow K, Teixeira M, Szikra T, Viney TJ, Balint K, Yonehara K, et al. Ambient Illumination Toggles a Neuronal Circuit Switch in the Retina and Visual Perception at Cone Threshold. Neuron. 2013 Apr 24;78(2):325–38.
 63. Middleton TP, Huang JY, Protti DA. Cannabinoids Modulate Light Signaling in ON-Sustained Retinal Ganglion Cells of the Mouse. Front Neural Circuits [Internet]. 2019 May 21 [cited 2020 May 15];13:37. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fncir.2019.00037/full>
 64. Witkovsky P. Dopamine and retinal function. Vol. 108, Documenta Ophthalmologica. Springer Netherlands; 2004. p. 17–39.
 65. Baba K, Ribelayga CP, Michael Iuvone P, Tosini G. The retinal circadian clock and photoreceptor viability. In: Advances in Experimental Medicine and Biology. Springer New York LLC; 2018. p. 345–50.
 66. Tosini G, Pozdeyev N, Sakamoto K, Iuvone PM. The circadian clock system in the mammalian retina. Vol. 30, BioEssays. NIH Public Access; 2008. p. 624–33.
 67. Roska B, Werblin F. Vertical interactions across ten parallel, stacked representations in the mammalian retina. Nature. 2001 Mar 29;410(6828):583–7.
 68. Bowmaker JK, Dartnall HJ. Visual pigments of rods and cones in a human retina. J Physiol [Internet]. 1980 Jan 1 [cited 2020 Mar 25];298(1):501–11. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1113/jphysiol.1980.sp013097>
 69. Hargrave PA, McDowell JH, Feldmann RJ, Atkinson PH, Mohana Rao JK, Argos P. Rhodopsin's protein and carbohydrate structure: Selected aspects. Vision Res. 1984 Jan 1;24(11):1487–99.
 70. Hargrave PA, McDowell JH. Rhodopsin and Phototransduction. Int Rev

- Cytol. 1993 Jan 1;137:49–97.
71. Curcio CA, Sloan KR, Packer O, Hendrickson AE, Kalina RE. Distribution of cones in human and monkey retina: Individual variability and radial asymmetry. *Science* (80-). 1987;236(4801):579–82.
 72. The Distribution of Cones in the Primate Retina - Advances in Photoreception - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2020 Apr 9]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK235556/>
 73. Baden T, Euler T, Berens P. Understanding the retinal basis of vision across species. Vol. 21, *Nature Reviews Neuroscience*. Nature Research; 2020. p. 5–20.
 74. Kolb H, Nelson R. Off-alpha and OFF-beta ganglion cells in cat retina: II. Neural circuitry as revealed by electron microscopy of HRP stains. *J Comp Neurol* [Internet]. 1993 Mar 1 [cited 2020 May 7];329(1):85–110. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/cne.903290107>
 75. Sterling P, Cohen E, Freed MA, Smith RG. Microcircuitry of the ON-beta ganglion cell in daylight, twilight, and starlight. *Neurosci Res Suppl*. 1987 Jan 1;6(C):S269–85.
 76. Brandstätter JH, Hack I. Localization of glutamate receptors at a complex synapse: The mammalian photoreceptor synapse. Vol. 303, *Cell and Tissue Research*. Springer; 2001. p. 1–14.
 77. Slaughter MM, Miller RF. 2-Amino-4-Phosphonobutyric Acid: A New Pharmacological Tool for Retina Research. *Science* (80-) [Internet]. 1981 [cited 2021 Oct 20];211(4478):182–5. Available from: <https://www.science.org/doi/abs/10.1126/science.6255566>
 78. Gerl EJ, Morris MR. The Causes and Consequences of Color Vision. *Evol Educ Outreach* [Internet]. 2008 Oct 23 [cited 2020 May 15];1(4):476–86. Available from: <https://evolution-outreach.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12052-008-0088-x>
 79. Kolb H. Anatomical pathways for color vision in the human retina. *Vis Neurosci*. 1991;7(1–2):61–74.
 80. Thoreson WB, Dacey DM. Diverse cell types, circuits, and mechanisms for color vision in the vertebrate retina. *Physiol Rev*. 2019 Jul 1;99(3):1527–73.

81. Twigg G, Levy H, Perlman I. Color opponency in horizontal cells of the vertebrate retina. Vol. 22, Progress in Retinal and Eye Research. Pergamon; 2003. p. 31–68.
82. Campbell FW, Robson JG. Application of fourier analysis to the visibility of gratings. *J Physiol*. 1968 Aug 1;197(3):551–66.
83. Thoreson WB, Babai N, Bartoletti TM. Feedback from horizontal cells to rod photoreceptors in vertebrate retina. *J Neurosci*. 2008 May 28;28(22):5691–5.
84. Baylor DA, Fuortes MGF, O'Bryan PM. Receptive fields of cones in the retina of the turtle. *J Physiol*. 1971 Apr 1;214(2):265–94.
85. Kalloniatis M, Luu C. Light and Dark Adaptation. *Australas J Optom* [Internet]. 2007 Jul 9 [cited 2021 Oct 21];18(8):384–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK11525/>
86. Dacey D, Packer OS, Diller L, Brainard D, Peterson B, Lee B. Center surround receptive field structure of cone bipolar cells in primate retina. *Vision Res*. 2000 Jun;40(14):1801–11.
87. Mazade RE, Eggers ED. Light adaptation alters the source of inhibition to the mouse retinal OFF pathway. *J Neurophysiol*. 2013 Nov 1;110(9):2113–28.
88. Bloomfield SA, Xin D, Osborne T. Light-induced modulation of coupling between All amacrine cells in the rabbit retina. *Vis Neurosci*. 1997;14(3):565–76.
89. Bass J, Takahashi JS. Circadian integration of metabolism and energetics. Vol. 330, *Science*. NIH Public Access; 2010. p. 1349–54.
90. Witkovsky P, Veisenberger E, LeSauter J, Yan L, Johnson M, Zhang DQ, et al. Cellular location and circadian rhythm of expression of the biological clock gene *Period 1* in the mouse retina. *J Neurosci*. 2003 Aug 20;23(20):7670–6.
91. Bobu C, Hicks D. Regulation of retinal photoreceptor phagocytosis in a diurnal mammal by circadian clocks and ambient lighting. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(7):3495–502.
92. Do MTH, Yau KW. Intrinsically photosensitive retinal ganglion cells. Vol. 90, *Physiological Reviews*. NIH Public Access; 2010. p. 1547–81.
93. Spiers ASD, Calne DB. Action of dopamine on the human iris. *Br Med J* [Internet]. 1969 Nov 8 [cited 2021 Oct 21];4(5679):333–5. Available from:

- <https://www.bmj.com/content/4/5679/333>
94. Frishman LJ. Electroretinography. In: The Curated Reference Collection in Neuroscience and Biobehavioral Psychology [Internet]. Elsevier Science Ltd.; 2016 [cited 2020 Apr 30]. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128093245024548>
 95. Tsang SH, Sharma T. Electroretinography. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2018 [cited 2021 Oct 21];1085:17–20. Available from:
https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-319-95046-4_5
 96. Wachtmeister L. Oscillatory potentials in the retina: What do they reveal. Prog Retin Eye Res [Internet]. 1998 Oct [cited 2021 Jun 13];17(4):485–521. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9777648/>
 97. McCulloch DL, Marmor MF, Brigell MG, Hamilton R, Holder GE, Tzekov R, et al. ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography (2015 update). Doc Ophthalmol. 2015 Jan 22;130(1).
 98. García EP, Echevarría OH, Martín YR, González JG. Obtaining, interpreting and using the multifocal electroretinogram. Rev Cuba Oftalmol [Internet]. 2016 Mar 28 [cited 2021 Oct 21];29(1):105–23. Available from:
<http://scielo.sld.cu>
 99. Vinberg F, Kolesnikov A V., Kefalov VJ. Ex vivo ERG analysis of photoreceptors using an in vivo ERG system. Vision Res [Internet]. 2014 [cited 2021 Jun 14];101:108–17. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24959652/>
 100. Wong WT, Myhr KL, Miller ED, Wong ROL. Developmental changes in the neurotransmitter regulation of correlated spontaneous retinal activity. J Neurosci. 2000 Jan 1;20(1):351–60.
 101. Maccione A, Hennig MH, Gandolfo M, Muthmann O, van Coppenhagen J, Eglen SJ, et al. Following the ontogeny of retinal waves: Pan-retinal recordings of population dynamics in the neonatal mouse. J Physiol [Internet]. 2014 Apr 1 [cited 2020 Aug 27];592(7):1545–63. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24366261/>
 102. Syed MM, Lee S, Zheng J, Zhou ZJ. Stage-dependent dynamics and modulation of spontaneous waves in the developing rabbit retina. J Physiol

- [Internet]. 2004 Oct 15 [cited 2020 Aug 27];560(2):533–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15308679/>
103. Wong ROL, Meister M, Shatz CJ. Transient period of correlated bursting activity during development of the mammalian retina. *Neuron* [Internet]. 1993 [cited 2020 Aug 27];11(5):923–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8240814/>
 104. Feller MB. The role of nAChR-mediated spontaneous retinal activity in visual system development. *J Neurobiol.* 2002 Dec 1;53(4):556–67.
 105. Petit-Jacques J, Völgyi B, Rudy B, Bloomfield S. Spontaneous oscillatory activity of starburst amacrine cells in the mouse retina. *J Neurophysiol.* 2005 Sep;94(3):1770–80.
 106. C B, T L, M D, LC B, ML A, DB F. Retinal degeneration in the rd mouse is caused by a defect in the beta subunit of rod cGMP-phosphodiesterase. *Nature* [Internet]. 1990 [cited 2021 Nov 3];347(6294):677–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1977087/>
 107. Neuenschwander S, Castelo-Branco M, Singer W. Synchronous oscillations in the cat retina. *Vision Res.* 1999 Jul 1;39(15):2485–97.
 108. SF S. Emergence of sustained spontaneous hyperactivity and temporary preservation of OFF responses in ganglion cells of the retinal degeneration (rd1) mouse. *J Neurophysiol* [Internet]. 2008 Mar [cited 2021 Sep 15];99(3):1408–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18216234/>
 109. Borowska J, Trenholm S, Awatramani GB. An intrinsic neural oscillator in the degenerating mouse retina. *J Neurosci.* 2011 Mar 30;31(13):5000–12.
 110. Strettoi E, Pignatelli V. Modifications of retinal neurons in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000 Sep 26;97(20):11020–5.
 111. Burrone J, Lagnado L. Electrical resonance and Ca²⁺ influx in the synaptic terminal of depolarizing bipolar cells from the Goldfish retina. *J Physiol* [Internet]. 1997 Dec 15 [cited 2020 Apr 30];505(3):571–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1469-7793.1997.571ba.x>
 112. Menzler J, Zeck G. Network Oscillations in Rod-Degenerated Mouse

- Retinas. *J Neurosci* [Internet]. 2011 Feb 9 [cited 2021 Sep 15];31(6):2280. Available from: [/pmc/articles/PMC6633031/](#)
113. Margolis DJ, Newkirk G, Euler T, Detwiler PB. Functional Stability of Retinal Ganglion Cells after Degeneration-Induced Changes in Synaptic Input. *J Neurosci* [Internet]. 2008 Jun 18 [cited 2021 Sep 15];28(25):6526. Available from: [/pmc/articles/PMC3050548/](#)
114. W H, B A-G, E Z, T E, T S. Synaptic remodeling generates synchronous oscillations in the degenerated outer mouse retina. *Front Neural Circuits* [Internet]. 2014 [cited 2021 Sep 15];8:108. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25249942/>
115. Toychiev AH, Ivanova E, Yee CW, Sagdullaev BT. Block of gap junctions eliminates aberrant activity and restores light responses during retinal degeneration. *J Neurosci*. 2013 Aug 28;33(35):13972–7.
116. Menzler J, Channappa L, Zeck G. Rhythmic ganglion cell activity in bleached and blind adult mouse retinas. *PLoS One*. 2014 Aug 25;9(8).
117. American Diabetes Association. 2. Classification and Diagnosis of Diabetes. *Diabetes Care* [Internet]. 2014 Dec 23 [cited 2014 Dec 25];38(Supplement_1):S8–16. Available from: <http://care.diabetesjournals.org/cgi/doi/10.2337/dc15-S005>
118. Gupta N, Mansoor S, Sharma A, Sapkal A, Sheth J, Falatoonzadeh P, et al. Diabetic retinopathy and VEGF. *Open Ophthalmol J* [Internet]. 2013 Jan [cited 2015 Nov 20];7:4–10. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3580758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
119. Mbata O, El-Magd NFA, El-Remessy AB. Obesity, metabolic syndrome and diabetic retinopathy: Beyond hyperglycemia. *World J Diabetes*. 2017;8(7):317.
120. Lanktree MB, Hegele RA. Metabolic Syndrome. In: *Genomic and Precision Medicine: Primary Care: Third Edition*. Elsevier Inc.; 2017. p. 283–99.
121. Wong TY, Cheung CMG, Larsen M, Sharma S, Simó R. Diabetic retinopathy. *Nat Rev Dis Prim*. 2016 Mar 17;2(1):1–17.

122. Kadłubowska J, Malaguarnera L, Wł P, Zorena K. Neurodegeneration and Neuroinflammation in Diabetic Retinopathy: Potential Approaches to Delay Neuronal Loss. *Curr Neuropharmacol*. 2016 Jun 18;14(8):831–9.
123. Verma A, Rani PK, Raman R, Pal SS, Laxmi G, Gupta M, et al. Is neuronal dysfunction an early sign of diabetic retinopathy? Microperimetry and Spectral domain Optical Coherence Tomography (SD-OCT) Study in individuals with diabetes, but no diabetic retinopathy. *Eye*. 2009 Jul 24;23(9):1824–30.
124. Lung JCY, Swann PG, Wong DSH, Chan HHL. Global flash multifocal electroretinogram: early detection of local functional changes and its correlations with optical coherence tomography and visual field tests in diabetic eyes. *Doc Ophthalmol*. 2012 Oct 25;125(2):123–35.
125. Yapıcı İS, Erkeymaz O, Arslan RU. A hybrid intelligent classifier to estimate obesity levels based on ERG signals. *Phys Lett A*. 2021 May 28;399:127281.
126. Chang RC-A, Shi L, Huang CC-Y, Kim AJ, Ko ML, Zhou B, et al. High-Fat Diet–Induced Retinal Dysfunction. *Investig Ophthalmology Vis Sci* [Internet]. 2015 Apr 22 [cited 2017 May 30];56(4):2367. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25788653>
127. Asare-Bediako B, Noothi SK, Calzi SL, Athmanathan B, Vieira CP, Adu-Agyeiwaah Y, et al. Characterizing the Retinal Phenotype in the High-Fat Diet and Western Diet Mouse Models of Prediabetes. *Cells* 2020, Vol 9, Page 464 [Internet]. 2020 Feb 18 [cited 2021 Sep 30];9(2):464. Available from: <https://www.mdpi.com/2073-4409/9/2/464/htm>
128. Peng J, Qu H, Peng J, Luo TY, Lv FJ, Chen L, et al. Abnormal spontaneous brain activity in type 2 diabetes with and without microangiopathy revealed by regional homogeneity. *Eur J Radiol* [Internet]. 2016;85(3):607–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26860674>
129. Inui K, Sannan H, Ota H, Uji Y, Nomura S, Kaige H, et al. EEG findings in diabetic patients with and without retinopathy. *Acta Neurol Scand* [Internet]. 1998 Feb 1 [cited 2021 Jun 13];97(2):107–9. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0404.1998.tb00618.x>
130. C I, M F, M I, B F, M I Q, D A L, et al. Modification of EEG functional

- connectivity and EEG power spectra in overweight and obese patients with food addiction: An eLORETA study. *Brain Imaging Behav* [Internet]. 2015 Dec 1 [cited 2021 Oct 21];9(4):703–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25332109/>
131. Miranda-Anaya M, Pérez-Mendoza M, Juárez-Tapia CR, Carmona-Castro A. The volcano mouse *Neotomodon alstoni* of central Mexico, a biological model in the study of breeding, obesity and circadian rhythms. *Gen Comp Endocrinol*. 2019 Mar 1;273:61–6.
 132. Heydemann A, Ahlke. An Overview of Murine High Fat Diet as a Model for Type 2 Diabetes Mellitus. *J Diabetes Res* [Internet]. 2016 [cited 2017 May 22];2016:1–14. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/jdr/2016/2902351/>
 133. Han BG, Hao CM, Tchekneva EE, Wang YY, Chieh AL, Ebrahim B, et al. Markers of glycemic control in the mouse: Comparisons of 6-h-and overnight-fasted blood glucoses to Hb A1c. *Am J Physiol - Endocrinol Metab*. 2008 Oct;295(4).
 134. Wassle H, Boycott BB. Functional architecture of the mammalian retina. *Physiol Rev* [Internet]. 1991 [cited 2017 May 25];71(2). Available from: <http://physrev.physiology.org/content/71/2/447>
 135. Oostenveld R, Fries P, Maris E, Schoffelen JM. FieldTrip: Open source software for advanced analysis of MEG, EEG, and invasive electrophysiological data. *Comput Intell Neurosci*. 2011;2011.
 136. Lei B, Yao G, Zhang K, Hofeldt KJ, Chang B. Study of Rod- and Cone-Driven Oscillatory Potentials in Mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 Jun 1;47(6):2732–8.
 137. Midená E, Torresin T, Longhin E, Midená G, Pilotto E, Frizziero L. Early Microvascular and Oscillatory Potentials Changes in Human Diabetic Retina: Amacrine Cells and the Intraretinal Neurovascular Crosstalk. *J Clin Med* [Internet]. 2021 Sep 1 [cited 2022 Jun 17];10(18):4035. Available from: </pmc/articles/PMC8466765/>
 138. Buettner R, Schölmerich J, Bollheimer LC. High-fat Diets: Modeling the Metabolic Disorders of Human Obesity in Rodents. *Obesity* [Internet]. 2007

- Apr 1 [cited 2022 Jun 17];15(4):798–808. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/oby.2007.608>
139. Auvinen H, Romijn J, Biermasz N, Havekes L, Smit JW, Rensen PC, et al. Effects of High Fat Diet on the Basal Activity of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis in Mice: A Systematic Review. *Horm Metab Res* [Internet]. 2011 Dec 8 [cited 2018 May 23];43(13):899–906. Available from:
<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0031-1291305>
 140. Sö Rhede Winzell M, Ahré B. The High-Fat Diet–Fed Mouse A Model for Studying Mechanisms and Treatment of Impaired Glucose Tolerance and Type 2 Diabetes. [cited 2018 May 24]; Available from:
http://diabetes.diabetesjournals.org/content/53/suppl_3/S215.full-text.pdf
 141. Winzell MS, Ahrén B. The high-fat diet-fed mouse: A model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. In: *Diabetes*. 2004.
 142. McAnany JJ, Park JC. Reduced Contrast Sensitivity is Associated With Elevated Equivalent Intrinsic Noise in Type 2 Diabetics Who Have Mild or No Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2018 May 1 [cited 2022 Jun 17];59(6):2652–8. Available from: <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24151>
 143. Xu Q, Ming Z, Dart AM, Du X-J. OPTIMIZING DOSAGE OF KETAMINE AND XYLAZINE IN MURINE ECHOCARDIOGRAPHY. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 2007 May 1 [cited 2017 Nov 29];34(5–6):499–507. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1681.2007.04601.x>
 144. Moore-Dotson JM, Beckman JJ, Mazade RE, Hoon M, Bernstein AS, Romero-Aleshire MJ, et al. Early Retinal Neuronal Dysfunction in Diabetic Mice: Reduced Light-Evoked Inhibition Increases Rod Pathway Signaling. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2016 Mar 1 [cited 2022 Jun 17];57(3):1418. Available from: </pmc/articles/PMC4819579/>
 145. Mathenge W, Whitestone N, Nkurikiye J, Patnaik JL, Piyasena P, Uwaliraye P, et al. Impact of artificial intelligence assessment of diabetic retinopathy on referral service uptake in a low resource setting: The RAIDERS randomized trial. *Ophthalmol Sci*. 2022 Apr 30;100168.
 146. Yuan A, Lee AY. Artificial intelligence deployment in diabetic retinopathy: the

- last step of the translation continuum. *Lancet Digit Heal* [Internet]. 2022 Apr 1 [cited 2022 Jun 17];4(4):e208–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35272973/>
147. H B, AM E, AS B, CM B, D B, MA C, et al. Development and validation of a patient self-assessment score for diabetes risk. *Ann Intern Med* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2022 Jun 17];151(11):775. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19949143/>
 148. Pérez-Martínez P, Mikhailidis DP, Athyros VG, Bullo M, Couture P, Covas MI, et al. Lifestyle recommendations for the prevention and management of metabolic syndrome: an international panel recommendation. *Nutr Rev* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Jun 17];75(5):307. Available from: </pmc/articles/PMC5914407/>
 149. Pluta W, Dudzińska W, Lubkowska A. Metabolic Obesity in People with Normal Body Weight (MONW)—Review of Diagnostic Criteria. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2022 Jun 17];19(2):624. Available from: </pmc/articles/PMC8776153/>
 150. Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? Vol. 61, *Diabetologia*. Springer Verlag; 2018. p. 1902–12.
 151. R R, GW B, S Z, L Y, P L, CF S. Functional Deficits Precede Structural Lesions in Mice With High-Fat Diet-Induced Diabetic Retinopathy. *Diabetes* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2021 Sep 15];65(4):1072–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26740595/>
 152. Lee VK, Hosking BM, Holeniewska J, Kubala EC, von Leithner PL, Gardner PJ, et al. BTBR ob/ob mouse model of type 2 diabetes exhibits early loss of retinal function and retinal inflammation followed by late vascular changes. *Diabetologia*. 2018;61(11):2422–32.
 153. King AJF. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. 2012;166(3):877–94.
 154. ErKaymaz O, Yapici ÍS, Arslan RU. Effects of obesity on time-frequency components of electroretinogram signal using continuous wavelet transform. *Biomed Signal Process Control*. 2021;66:102398.

155. Zelano C, Jiang H, Zhou G, Arora N, Schuele S, Rosenow J, et al. Nasal respiration entrains human limbic oscillations and modulates cognitive function. *J Neurosci*. 2016;36(49):12448–67.
156. Ma Y-P, Pan Z-H. Spontaneous regenerative activity in mammalian retinal bipolar cells: roles of multiple subtypes of voltage-dependent Ca^{2+} channels. *Vis Neurosci*. 2003;20(2):131–9.
157. Zenisek D, Matthews G. Calcium action potentials in retinal bipolar neurons. 1998.
158. Petit-Jacques J, Völgyi B, Rudy B, Bloomfield S. Spontaneous oscillatory activity of starburst amacrine cells in the mouse retina. *J Neurophysiol*. 2005;94(3):1770–80.
159. Vigh J, Solessio E, Morgans CW, Lasater EM. Ionic mechanisms mediating oscillatory membrane potentials in wide-field retinal amacrine cells. *J Neurophysiol*. 2003;90(1):431–43.
160. Solessio E, Vigh J, Cuenca N, Rapp K, Lasater EM. Membrane properties of an unusual intrinsically oscillating, wide-field teleost retinal amacrine cell. *J Physiol [Internet]*. 2002;544(3):831–47. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1113/jphysiol.2002.021899>
161. Feigenspan A, Gustincich S, Bean BP, Raviola E. Spontaneous activity of solitary dopaminergic cells of the retina. *J Neurosci*. 1998;18(17):6776–89.
162. Trenholm S, Awatramani GB. Myriad roles for gap junctions in retinal circuits [Internet]. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. University of Utah Health Sciences Center; 1995. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31765113>
163. Hutcheon B, Yarom Y. Resonance, oscillation and the intrinsic frequency preferences of neurons. Vol. 23, *Trends in Neurosciences*. Elsevier Ltd; 2000. p. 216–22.
164. Menzler J, Zeck G. Network oscillations in rod-degenerated mouse retinas. *J Neurosci Off J Soc Neurosci*. 2011;31(6):2280–91.
165. T B, P J, Jk K. Spontaneous high frequency diameter oscillations of larger retinal arterioles are reduced in type 2 diabetes mellitus [Internet]. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2013. Available from:

- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23258153/>
166. Pang JJ, Gao F, Wu SM. Light-evoked excitatory and inhibitory synaptic inputs to ON and OFF α ganglion cells in the mouse retina. *J Neurosci*. 2003;23(14):6063–73.
 167. Yee CW, Toychiev AH, Sagdullaev BT. Network deficiency exacerbates impairment in a mouse model of retinal degeneration. *Front Syst Neurosci*. 2012;6:8.
 168. Margolis DJ, Detwiler PB. Different mechanisms generate maintained activity in ON and OFF retinal ganglion cells. *J Neurosci*. 2007;27(22):5994–6005.
 169. Goo YS, Park DJ, Ahn JR, Senok SS. Spontaneous Oscillatory Rhythms in the Degenerating Mouse Retina Modulate Retinal Ganglion Cell Responses to Electrical Stimulation. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2016;9(JAN2016):512. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00512/abstract>
 170. Euler T, Schubert T. Multiple Independent Oscillatory Networks in the Degenerating Retina. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015;9(NOVEMBER):444. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fncel.2015.00444/abstract>
 171. Isaacson JS, Scanziani M. How inhibition shapes cortical activity. *Neuron* [Internet]. 2011 Oct 20 [cited 2022 Jun 17];72(2):231–43. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22017986/>
 172. Yee CW, Toychiev A, Sagdullaev BT. Network deficiency exacerbates impairment in a mouse model of retinal degeneration. *Front Syst Neurosci*. 2012;(FEBRUARY 2012).
 173. Neuenschwander S, Castelo-Branco M, Singer W. Synchronous oscillations in the cat retina. Vol. 39, *Vision Research*. 1999. p. 2485–97.
 174. Margolis DJ, Gartland AJ, Singer JH, Detwiler PB. Network oscillations drive correlated spiking of ON and OFF ganglion cells in the rd1 mouse model of retinal degeneration. *PLoS One*. 2014;9(1):e86253.
 175. Bao L, Yang C, Shi Z, Wang Z, Jiang D. Analysis of Serum Metabolomics in Obese Mice Induced by High-Fat Diet. *Diabetes, Metab Syndr Obes Targets Ther* [Internet]. 2021 [cited 2022 Jun 17];14:4671. Available from:

/pmc/articles/PMC8643162/

176. Wallace M, Morris C, O'Grada CM, Ryan M, Dillon ET, Coleman E, et al. Relationship between the lipidome, inflammatory markers and insulin resistance. *Mol Biosyst* [Internet]. 2014 [cited 2022 Jun 17];10(6):1586–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24714806/>
177. Zatterale F, Longo M, Naderi J, Raciti GA, Desiderio A, Miele C, et al. Chronic Adipose Tissue Inflammation Linking Obesity to Insulin Resistance and Type 2 Diabetes. *Front Physiol*. 2020 Jan 29;10:1607.
178. Acharya NK, Qi X, Goldwasser EL, Godsey GA, Wu H, Kosciuk MC, et al. Retinal pathology is associated with increased blood-retina barrier permeability in a diabetic and hypercholesterolaemic pig model: Beneficial effects of the LpPLA2 inhibitor Darapladib. *Diabetes Vasc Dis Res* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2022 Jun 17];14(3):200–13. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1479164116683149>
179. Salameh TS, Mortell WG, Logsdon AF, Butterfield DA, Banks WA. Disruption of the hippocampal and hypothalamic blood–brain barrier in a diet-induced obese model of type II diabetes: prevention and treatment by the mitochondrial carbonic anhydrase inhibitor, topiramate. *Fluids Barriers CNS* [Internet]. 2019 Jan 8 [cited 2022 Jun 17];16(1):1. Available from: </pmc/articles/PMC6323732/>
180. Eggers ED, Carreon TA. The effects of early diabetes on inner retinal neurons. Vol. 37, *Visual Neuroscience*. Cambridge University Press; 2020.
181. Moore-Dotson JM, Eggers ED. Reductions in calcium signaling limit inhibition to diabetic retinal rod bipolar cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2019;60(12):4063–73.
182. Nishimura C, Kuriyama K. Alterations in the Retinal Dopaminergic Neuronal System in Rats with Streptozotocin-Induced Diabetes. *J Neurochem* [Internet]. 1985;45(2):448–55. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-4159.1985.tb04008.x>
183. Castilho Á, Madsen E, Ambrósio AF, Veruki ML, Hartveit E. Diabetic hyperglycemia reduces Ca²⁺ permeability of extrasynaptic AMPA receptors in All amacrine cells. *J Neurophysiol* [Internet]. 2015;114(3):1545–53.

Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/jn.00295.2015>

184. Archana R, Rajalakshmi T, Sai PV. Non-invasive technique to detect diabetic retinopathy based on Electrooculography signal using machine learning classifiers. *Proc Inst Mech Eng Part H J Eng Med.* 2022;095441192210854.
185. Wainio-Theberge S, Wolff A, Northoff G. Dynamic relationships between spontaneous and evoked electrophysiological activity. *Commun Biol.* 2021;4(1):1–17.
186. White NH, Pan Q, Knowler WC, Schroeder EB, Dabelea D, Chew EY, et al. The Effect of Interventions to Prevent Type 2 Diabetes on the Development of Diabetic Retinopathy: The DPP/DPPOS Experience. *Diabetes Care* [Internet]. 2022; Available from: <https://diabetesjournals.org/care/article/doi/10.2337/dc21-2417/147007/The-Effect-of-Interventions-to-Prevent-Type-2>

