



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

**Estudio de las secuelas de la adversidad temprana
experimental en el sistema visual adulto**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área

Ciencias Biológicas

Juan Salvador Calanni

Directora de tesis: Dra. Ruth E. Rosenstein

Consejero de Estudios: Dr. Eduardo Cánepa

Lugar de trabajo: Instituto de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales (IQUIBICEN)

Buenos Aires, 2025

Estudio de las secuelas de la adversidad temprana experimental en el sistema visual adulto

El estrés de vida temprana (EVT) tiene profundas consecuencias sobre la salud en la vida adulta. Actualmente se conocen múltiples correlatos neurales de los efectos del EVT en distintas áreas del cerebro; sin embargo, los efectos de la adversidad temprana sobre la retina y el sistema visual no han sido previamente examinados. El objetivo de esta tesis fue analizar los efectos del EVT sobre el sistema visual en un modelo murino de separación materna y destete temprano (SMDT). Se diseñó el Test de Looming con Variación de Contrastes (TLVC), un test comportamental guiado específicamente por la visión con el fin de detectar variaciones en la sensibilidad al contraste. La exposición a SMDT indujo efectos funcionales e histológicos a nivel retiniano en animales adultos, incluyendo una disminución de los niveles de la proteína sinaptofisina en la capa plexiforme interna, una disminución en la función y el número de las células ganglionares retinianas (CGR) y microgliosis en la retina interna. Estos cambios estuvieron acompañados por un déficit en la comunicación de la retina con sus principales blancos sinápticos, así como una pérdida de función en pruebas comportamentales guiadas visualmente, incluido el TLVC. En el día postnatal (DPN) 10 se observó un aumento en los niveles séricos de corticosterona en animales expuestos a SMDT y un tratamiento con mifepristona inyectada cada 3 días desde el DPN 4 al DPN 16, previno los cambios estructurales y funcionales inducidos por la exposición a SMDT, lo que sugiere la participación de glucocorticoides en etapas tempranas en las alteraciones visuales inducidas por EVT en animales adultos. A continuación, se realizó un estudio temporal de las consecuencias retinianas de la exposición a SMDT. En el DPN 35 no se observaron cambios estructurales ni funcionales. En el DPN 45 se detectó una pérdida leve, pero significativa, en la función de las CGR, así como cambios morfológicos en las células microgliales. Para evaluar el papel de la microglía sobre las alteraciones visuales en animales adultos, se indujo farmacológicamente (tratamiento con BLZ945) depleción microglial, que no tuvo efectos *per se* en la función ni en la estructura retiniana, pero previno las alteraciones visuales, así como la alteración del comportamiento guiado por la visión inducido por la exposición a SMDT en animales adultos. Dado que en el DPN45 se observaron signos de daño oxidativo e inflamación en la capa de células ganglionares, animales expuestos a SMDT se trataron con melatonina, que previno las alteraciones funcionales y estructurales de la retina, así como la pérdida de la función visual en animales adultos expuestos a SMDT. Finalmente, se evaluó un paradigma de ambiente enriquecido (AE) como estrategia terapéutica. La exposición a AE entre los DPN35 y DPN60, previno las alteraciones funcionales y estructurales retinianas, así como la pérdida de la función visual en animales adultos expuestos a SMDT. En suma, estos resultados sugieren que un déficit visual podría incluirse entre las amenazas a la calidad de vida inducidas por adversidades infantiles. Además, las alteraciones visuales podrían evitarse o reducirse a través de diferentes tratamientos.

Palabras clave: Estrés de vida temprana, Visión, Retina, Células ganglionares retinianas, microglía.

Study of the Sequelae of Experimental Early Adversity on the Adult Visual System

Early life stress (ELS) has profound consequences on health in adulthood. Currently, multiple neural correlates of the effects of ELS on various brain regions are known; however, the effects of early adversity on the retina and the visual system have not been previously examined. The aim of this thesis was to analyze the effects of ELS on the visual system in a murine model of maternal separation and early weaning (MSEW). The Looming Test with Variation in Contrasts (TLVC), a behavioral test specifically guided by vision, was developed to detect variations in contrast sensitivity. Exposure to MSEW induced functional and histological alterations at retinal level in adult animals, including a decrease in synaptophysin protein levels in the inner plexiform layer, a reduction in the function and number of retinal ganglion cells (RGCs), and microgliosis in the inner retina. These changes were accompanied by a deficit in retinal communication with its main synaptic targets, as well as a loss of function in visually guided behavioral tests, including the LTCV. A significant increase in serum corticosterone levels was observed on postnatal day (PND) 10 in animals exposed to SMDT, and a treatment with mifepristone, injected every 3 days from PND 4 to PND16, prevented structural and functional changes induced by MSEW, suggesting the involvement of glucocorticoids in the early stages of ELS-induced visual alterations in adult animals. A temporal study of the retinal consequences of MSEW was conducted. No functional or structural changes were observed at PND35. At PND45, a mild but significant loss in RGC function was detected, along with morphological changes in microglial cells. To evaluate the role of microglia on visual disturbances in adult animals, microglial depletion was pharmacologically induced (treatment with BLZ945), which showed no effects *per se* on retinal function or structure, but visual alterations, as well as the impairment of the performance in visually guided behavior induced by MSEW in adult animals were present. Since oxidative damage and inflammation signs were observed in the retinal ganglion cell layer at PND45, animals exposed to MSEW were treated with melatonin, which prevented the functional and structural alterations of the retina, as well as the loss of visual function in adult animals exposed to MSEW. Finally, an enriched environment paradigm was evaluated as a therapeutic strategy. Animal exposure to an enriched environment between PND35 and PND60 prevented functional and structural alterations of the retina, as well as the loss of visual function in adult animals exposed to MSEW. In summary, these results suggest that visual impairment could be included among the threats to life quality induced by childhood adversities. Moreover, visual alterations could be avoided or reduced through different treatments.

Keywords: Early life stress, Vision, Retina, Retinal ganglion cells, Microglia.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue financiada enteramente por el estado nacional argentino y es el producto del trabajo colaborativo de muchas personas: En primer lugar, de los integrantes del laboratorio de Neuroquímica Retiniana y Oftalmología Experimental, con quienes pude compartir experimentos, charlas y discusiones científicas de alto voltaje: Ine, Moni, Marcos, Flori, Hernia, Juali, Nathy, Pablito, Diego, Ignacio y col. Damián Dorfman es un ejemplo de obstinación ciega a la hora de defender ideas arriesgadas y de enfrentar una realidad para nada amable. Y, por último, Ruth Rosenstein, quien me dio la oportunidad de ser parte de este equipo, fue en todos los momentos una brújula capaz de llevar cualquier idea descabellada a tierra firme y también creo que es capaz de mostrar el camino para llegar a mejores puertos en un mar hostil.

Otros tres laboratorios fueron fundamentales para esta tesis: El laboratorio de Endocrinología Molecular, dirigido por Cora Cymering, donde pude dar mis primeros pasos en la experimentación científica y en donde conocí a More y a Martín, de quienes también aprendí muchísimas cosas. El Laboratorio de Neuroepigenética y Adversidades Tempranas dirigido por Eduardo Cánepe, en donde pude colaborar con Bruno Berardino, a quien agradezco por brindarme su tiempo con tanta generosidad. El laboratorio de Laura Pasquini también nos brindó generosamente su experiencia y conocimiento para realizar experimentos clave de esta tesis.

Esta aventura me permitió conocer el sistema científico argentino por dentro, así como la voluntad de construir un país mejor de las personas que lo componen. Un espacio maravilloso del cual pude participar fue la Red de Estudiantes de Neurociencias. Espero poder seguir construyendo una ciencia nacional con voluntad de transformar la realidad junto a estas personas en el futuro.

Exactas me proveyó un ambiente mejor del que hubiera podido imaginar para mi desarrollo personal de los últimos 13 años. Entre otras cosas, tuve la suerte de formar parte de un grupo docente sin igual: Exactas Programa. Agradezco particularmente a Mariela Sued y a Esteban Mocskos por sostener y alimentar a este proyecto con un compromiso que excede por mucho a sus responsabilidades como profesores. Espero poder llevar todo lo que aprendí de esta experiencia a otros lugares.

Entre amistades, colegas y compañerxs, Exactas también me dio *tantos hermanos que no los puedo contar*.

Por último, le agradezco a Maia por tanto apoyo y amor, y a mis raíces neuquinas: Mis queridos amigos de La Cumbre, mis primas y primos, mis tíos y tíos, mi abuela, mis hermanos y a Eduardo y Patricia, mi papá y mi mamá que, entre tanto amor infinito, también me dieron el amor por construir un futuro mejor, del cual la mejor expresión que encontré hasta ahora es la Universidad Pública.

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis forman parte de los siguientes artículos:

- Early life stress induces visual dysfunction and retinal structural alterations in adult mice. **Calanni JS**, Dieguez HH, González Fleitas MF, Canepa E, Berardino B, Repetto EM, Villarreal A, Dorfman D, Rosenstein RE. *Journal of Neurochemistry* vol. 165(3):362-378, 2023.
- An ethologically relevant paradigm to assess defensive response to looming visual contrast stimuli. **Calanni JS**, Aranda ML, Dieguez HH, Dorfman D, Schmidt TM, Rosenstein RE. *Scientific Reports* vol. 14, 1 12499, 2024

Y del manuscrito aceptado con correcciones menores en *Scientific Reports* (marzo 2025):

- Microglial depletion prevents visual deficits and retinal ganglion cell loss induced by early life stress in adult animals. **Calanni JS**, Pasquini LA, Dieguez HH, Bernal Aguirre N, Berardino BG, Dorfman D, Rosenstein RE.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS EN INGLÉS UTILIZADOS	8
INTRODUCCIÓN	9
La visión.....	9
Organización estructural de la retina	10
Procesamiento central de la información visual	17
La respuesta al estímulo de looming como indicadora de la función visual en roedores	20
Estrés de vida temprana	22
Participación de mecanismos inflamatorios y oxidativos en los efectos adversos del EVT.....	27
La melatonina	29
Ambiente enriquecido.....	32
OBJETIVOS	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Animales.....	36
Modelo experimental de estrés de vida temprana: Separación Materna y Destete Temprano (SMDT).....	37
Evaluación de los niveles de corticosterona.....	38
Tratamiento con mifepristona	38
Tratamiento con BLZ945.....	39
Tratamiento con melatonina	39
Exposición a ambiente enriquecido	40
Electrorretinografía	41
Comunicación de la retina con sus blancos sinápticos	42
Potenciales visuales evocados (VEPs).....	42
Transporte desde la retina al colículo superior (CS).....	43
Pruebas comportamentales visualmente guiadas	43
Test del abismo visual.....	43
Test de Looming con Variación de Contrastes (TLVC)	44
Evaluación de la expresión de c-fos inducida por estímulo <i>looming</i>	46
Estudios tisulares, celulares y subcelulares de la retina	47
Obtención del tejido	47
Obtención de cortes en parafina.....	48
Estudios histológicos.....	48

Procesamiento de imágenes	51
Cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia en el eje vertical de cortes transversales de retina	51
Cuantificación del número de CGR en retinas en montaje plano.....	51
Análisis morfométrico de células microgliales en retinas en montaje plano.	52
Análisis de la intensidad de fluorescencia de marcadores inflamatorios en células microgliales	53
<i>Western blot</i>	55
Análisis estadístico	56
Modelos lineales mixtos	56
Modelos lineales generalizados mixtos	56
Cálculo de C50	58
RESULTADOS	60
I. Desarrollo de un método para evaluar cuantitativamente la sensibilidad al contraste: Test de <i>Looming</i> con Variación de Contrastes (TLVC)	60
Evaluación del sistema experimental y modelado de los datos	60
Estudio de la influencia del sexo y la edad en la respuesta al TLVC	63
Contribución diferencial de distintos tipos de fotorreceptores en la respuesta al estímulo <i>looming</i>	67
II. Efectos de la exposición a SMDT sobre el sistema visual de ratones adultos	70
Efectos de la exposición a SMDT sobre el peso corporal y tiempo de apertura de ojos	70
Efectos de la exposición a SMDT sobre la función retiniana	72
Efectos de la exposición a SMDT sobre la comunicación de la retina con sus blancos sinápticos	73
Efectos de la exposición a SMDT sobre la estructura retiniana	74
Efectos de la exposición a SMDT sobre el comportamiento guiado visualmente	79
III. Participación de los glucocorticoides en las secuelas del EVT sobre el sistema visual murino	81
IV. Estudio temporal de los efectos de la exposición a SMDT sobre el sistema visual murino.....	84
Perfil inflamatorio de la microglía en el DPN 45.....	87
V. Estudio del rol de la microglía en las alteraciones retinianas inducidas por la exposición a SMDT.....	90
Efecto de la administración de BLZ945 en animales sometidos a SMDT	93
VI. Estudio del estrés oxidativo en la retina de ratones expuestos a SMDT	95

Efectos del tratamiento con melatonina sobre marcadores de estrés oxidativo en el DPN 45	98
Efecto del tratamiento con melatonina sobre la retina y la función visual de animales sometidos a SMDT	99
VII. Efecto de la exposición a ambiente enriquecido sobre la función visual de animales adultos expuestos a SMDT	102
DISCUSIÓN	105
Desarrollo del test de looming con variación de contrastes.....	107
Efecto de la separación materna con destete temprano sobre la función visual en ratones adultos	112
Efecto de los glucocorticoides endógenos sobre las alteraciones visuales inducidas por SMDT en ratones adultos.....	116
Curso temporal de las consecuencias visuales de la exposición a SMDT	117
El rol de la microglía en las secuelas de la exposición a SMDT en el sistema visual	119
Estudio del estrés oxidativo en la retina de animales expuestos a SMDT	122
Efecto de la melatonina sobre las consecuencias visuales de la exposición a SMDT	124
Efecto de la exposición a ambiente enriquecido sobre las consecuencias de la exposición a SMDT	125
Consecuencias del EVT sobre el sistema visual humano	127
CONCLUSIONES.....	129
EPÍLOGO	131
BIBLIOGRAFÍA.....	132

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS EN INGLÉS UTILIZADOS

AA-NAT: Arilalquilamina N-acetil transferasa	GLMM: Modelo Lineal Generalizado Mixto
AE: Ambiente Enriquecido	HPA: Eje Hipotálamo-Hipófiso-Adrenal
AIC: Criterio de Información de Akaike	Iba-1: Proteína ligadora de calcio iónica
AS: Ambiente Estándar	IL-1β: Interleucina 1 beta
BDNF: Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro	IM: Índice de Michelson
BLZ945: Sotuletinib	ipCGR: CGR Intrínsecamente Fotosensibles
Brn3a: Factor de transcripción específico de CGR	LPS: Lipopolisacárido
C3: Proteína del complemento 3	M1: Fenotipo proinflamatorio de la microglía
C50: Contraste necesario para evocar una respuesta del 50% en TLVC	M2: Fenotipo antiinflamatorio de la microglía
CBs: Células Bipolares	NF-κB: Factor nuclear kappa B
CGR: Células Ganglionares de la Retina	NGF: Factor de Crecimiento Nervioso
CHs: Células Horizontales	NO: nervio óptico
CNE: Capa Nuclear Externa	NOS-2: Óxido nítrico sintasa inducible
CNI: Capa Nuclear Interna	PBS: Solución salina tamponada con fosfato
CPE: Capa Plexiforme Externa	POs: Potenciales Oscilatorios
CPI: Capa Plexiforme Interna	PVDF: Fluoruro de polivinilideno
CS: Colículo Superior	REU: Respuesta Escotópica Umbral
CSF1R: Receptor del factor estimulante de colonias 1	RFN: Respuesta Fotópica Negativa
CTB: Subunidad beta de la toxina del cólera	RKO: Knockout de bastones
DPN: Día Postnatal	ROS: Especies Reactivas del Oxígeno
EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético	SMDT: Separación Materna y Destete Temprano
EOx: Estrés Oxidativo	SNC: Sistema Nervioso Central
ERG: Electrorretinograma	TKO: Triple Knockout
EVT: Estrés de Vida Temprana	TLVC: Test de <i>Looming</i> con Variación de Contrastos
GC: Glucocorticoides	TNF-α: Factor de necrosis tumoral alfa
GDNF: Factor de Crecimiento Derivado de Células Gliales	TUNEL: Ensayo de marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa
	VEPs: Potenciales Visuales Evocados
	WT: Wild Type

INTRODUCCIÓN

La visión

La visión es el sentido en el que más confiamos los seres humanos para navegar por el mundo, tomar decisiones y realizar tareas complejas. Entender cómo vemos, por lo tanto, constituye uno de los objetivos fundamentales de las Neurociencias.

Múltiples evidencias indican que la visión de los animales tiene un origen monofilético (Feuda y col., 2012; Gehring & Seimiya, 2010; Plachetzki y col., 2010). Por ejemplo, las opsinas, proteínas que se encuentran en el primer eslabón del procesado visual, ya habrían estado presentes en el último ancestro común de los eumetazoos (Feuda y col., 2012). Además, los ojos de los animales se desarrollan a partir de ortólogos del gen maestro *pax6*, incluso en algunas especies de cnidarios, que no poseen sistema nervioso central (SNC) y en los que la existencia de órganos visuales es poco frecuente (Gehring y col., 2010). El registro fósil indica que la evolución de sistemas visuales complejos fue muy rápida; en el precámbrico predominaban especies poco complejas, sésiles, de simetría radial y sin órganos fotosensibles aparentes. Sin embargo, en la explosión del cámbrico, un período geológicamente breve, la composición del registro fósil cambió drásticamente; surgen especies móviles, más complejas y con sistemas visuales desarrollados (Erwin, 2013). Por ejemplo, los trilobites y otros depredadores de esta época veían el mundo con ojos compuestos muy parecidos a los de los artrópodos actuales (Clarkson y col., 2006; Paterson y col., 2011). Algunos autores proponen que el surgimiento de los primeros sistemas visuales habría generado una especie de “*carrera armamentística*” entre predadores y presas, lo que llevó a desarrollar sistemas de percepción visual complejos para detectar y perseguir presas a unos, y para reconocer y evitar predadores a otros (Parker, 2004; Lamb y col., 2007; Land & Nilsson, 2013). Esto implica tanto el desarrollo de órganos

fotosensibles capaces de recolectar información de la escena visual, como el desarrollo de circuitos capaces de procesar esa información y de mecanismos efectores que permitan modificar el comportamiento en función de las claves visuales disponibles. En efecto, el desarrollo de la visión fue un hito importante en la historia evolutiva de los metazoos, que motorizó no sólo el desarrollo de circuitos neuronales para recolectar y procesar información, sino que también “moldeó los planes corporales” de las especies; por ejemplo, llevándolas a desarrollar mejores sistemas motores para la exploración, la caza, la huida, etc., influyendo en la forma en la que los animales interactúan entre sí y con el ambiente. Esta perspectiva, que posiciona a la visión como un factor clave ubicado en la raíz del árbol evolutivo de los animales, nos puede dar herramientas valiosas para interpretar los estudios en Biología Experimental que involucren al sistema visual.

Organización estructural de la retina

A menudo, el funcionamiento del ojo ha sido comparado con el de una cámara fotográfica. En rigor de verdad, esta analogía es inexacta, ya que en el ojo no se registran imágenes en forma pasiva, sino que es el sitio en el que se produce la primera integración de los patrones luminosos que dan comienzo al procesamiento visual. No obstante, existe cierta similitud de los ojos de vertebrados con una cámara fotográfica, que radica en el hecho de que análogamente a una cámara de fotos, los ojos también tienen una parte óptica que regula la entrada y el foco de la luz (córnea, iris y cristalino), ubicada por delante de una capa fotosensible, la retina. Los componentes principales del ojo de los vertebrados se describen en la Figura 1.

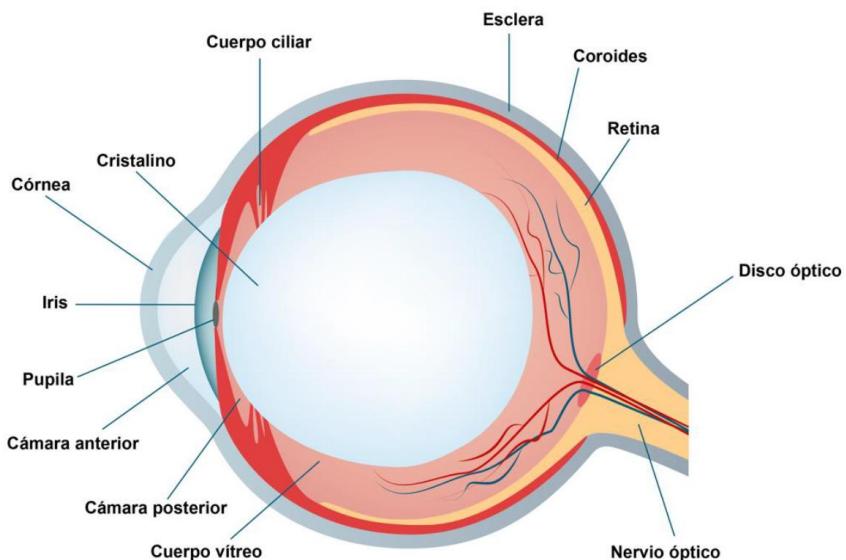


Figura 1. Esquema de un corte transversal del ojo del ratón. La imagen muestra el esquema de un corte transversal de un ojo de ratón, con sus tres túnicas: la externa (esclera y córnea), la media (coroides, cuerpo ciliar e iris) y la interna (retina). Al frente se ubica la córnea, que recubre la cámara anterior; detrás, el iris controla la entrada de luz a través de la pupila, y la cámara posterior alberga al cristalino, suspendido por el cuerpo ciliar. El cuerpo vitreo llena la cavidad principal del globo ocular, en contacto con la retina. La retina está conformada por el epitelio pigmentario y la retina neural, que forma parte del SNC. La coroides se sitúa por detrás de la retina. Finalmente, en la región posterior se distingue el disco óptico, que constituye el origen de los axones que conforman el nervio óptico y se corresponde con el punto ciego en el campo visual.

La retina no sólo transforma la radiación electromagnética en impulsos nerviosos, sino también procesa esa información mediante una compleja red de interneuronas, en la que los diferentes elementos que componen la imagen (intensidad de luz, contraste, color, forma y movimiento) son descifrados y codificados (Masland, 2012). Esta información es luego transmitida hacia centros visuales cerebrales a través del nervio óptico (NO) (Kandel y col., 2000). La retina de los vertebrados está compuesta por el epitelio pigmentario retiniano (EPR) y la retina neural. La retina neural forma parte del SNC e incluye a los fotorreceptores y varios tipos neuronales que funcionan como interneuronas o neuronas de proyección. Desde el punto de vista embriológico, la retina tiene el mismo origen que la corteza cerebral y comparte aspectos clave de su organización sináptica. Los cinco tipos neuronales que la componen se organizan en capas: tres capas nucleares y dos capas sinápticas (plexiformes) (Figura 2) (Kandel y col., 2000).

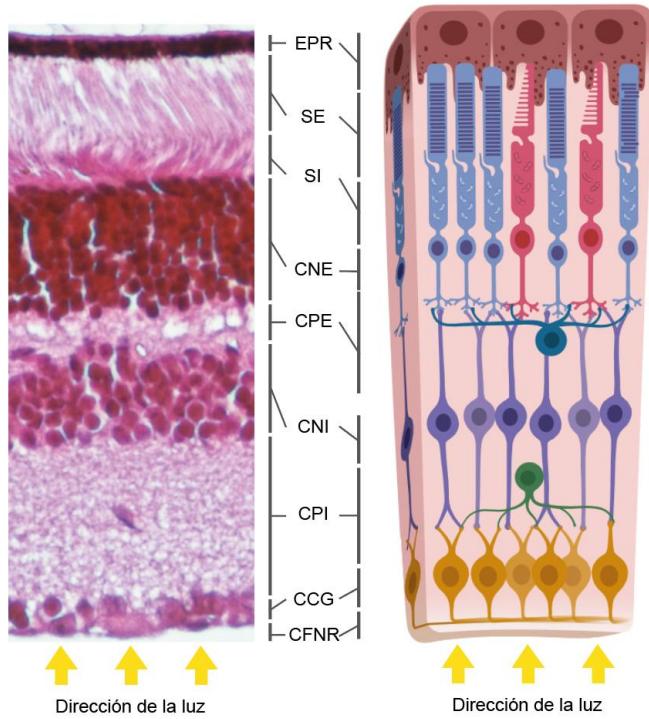


Figura 2. Organización estructural de la retina de ratón. A izquierda, un corte transversal de retina de ratón teñida con hematoxilina-eosina. En la zona más externa (respecto a la entrada de la luz) se localiza el epitelio pigmentario retiniano (EPR). Hacia el interior se distinguen los segmentos externos (SE) y segmentos internos (SI) de los fotorreceptores, seguidos por la capa nuclear externa (CNE), donde se alojan los núcleos de estas células. A continuación, se observa la capa plexiforme externa (CPE), que contiene las sinapsis entre los fotorreceptores y las células bipolares y horizontales, cuyos núcleos se alojan en la capa nuclear interna (CNI). Más internamente, la CPI incluye las sinapsis entre estas células, las células amácrinas y las células ganglionares retinianas (CGR), que se agrupan en la capa de células ganglionares (CCG). Finalmente, los axones de las CGR convergen en la capa de fibras nerviosas de la retina (CFNR), formando el nervio óptico (NO). En el esquema de la derecha se visualiza cada tipo celular: las células del EPR en marrón, los bastones en celeste, los conos en rojo, las células bipolares en violeta, las horizontales en azul, las amácrinas en verde y las ganglionares en amarillo. Para mayor simplicidad de la imagen, éste es un esquema simplificado que contiene sólo las células neuronales retinianas junto al EPR y se omiten las células gliales y los vasos sanguíneos.

La luz atraviesa la capa externa del ojo, llega a la retina y alcanza los segmentos externos de los fotorreceptores (conos y bastones), estructuras especializadas que albergan a las proteínas fotosensibles (opsinas) en discos de membrana. Estas proteínas, a través de una cascada de transducción de señales, desencadenan cambios en la polarización de los fotorreceptores en respuesta a la radiación electromagnética, transformando la señal luminosa en impulsos eléctricos (Kandel y col., 2000; Sanes y col., 2010a). A continuación, en la primera capa sináptica (capa plexiforme externa, (CPE)), en los fotorreceptores se modula la liberación de glutamato, transmitiendo la señal hacia las células bipolares (CBs)

y horizontales (CHs). Las CHs conectan lateralmente tanto con los fotorreceptores como con las CBs. Las CBs, a su vez, proyectan axones cortos a la segunda capa sináptica (capa plexiforme interna, (CPI)), donde establecen contactos con las células amacrinas (CAs) y las CGR. Al igual que las CHs, las CAs extienden conexiones laterales a lo largo de la CPI. Finalmente, las células ganglionares retinianas (CGR) integran la información y la transmiten a núcleos cerebrales a través del NO. En algunas especies, en la capa de células ganglionares (CCG), se localizan CAs desplazadas, en número variable dependiente de la especie (Wässle, 2004).

Todas las neuronas de la retina comparten cierta similitud de marcadores moleculares, lo que sugiere que todas estas células comparten un origen común (Arendt, 2008; Arendt y col., 2016; Lamb y col., 2007). En base a estas evidencias, Arendt y col. (2009) sugieren que las retinas actuales son el producto de procesos de duplicación y diversificación de células fotorreceptoras primitivas que, a través de duplicaciones y pérdida de funciones, dieron lugar a células más especializadas.

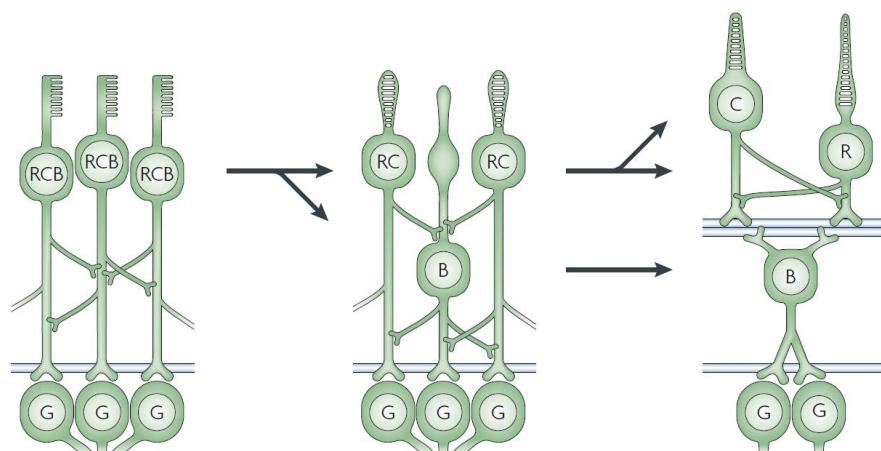


Figura 3. Evolución de los tipos neuronales de la retina por segregación funcional. Se ilustra el proceso evolutivo a través del cual las funciones de los fotorreceptores (bastones y conos) y de las células bipolares se van separando progresivamente hasta conformar tipos celulares especializados. En el panel izquierdo se observa una célula ancestral “RCB” (Rod–Cone–Bipolar) que combina las funciones de bastón, cono y célula bipolar. En el panel central, el precursor bipolar va perdiendo gradualmente la capacidad fotorreceptora, de modo que las células comienzan a especializarse. Finalmente, en el panel derecho, los tres tipos celulares aparecen totalmente segregados: los bastones (R) y los conos (C) como fotorreceptores y las células bipolares (B) conectadas con las células ganglionares (G), que se ubican en la capa más interna de la retina y conforman el nervio óptico. Adaptado de Arendt y col. (2008)

Por ejemplo, algunas células habrían perdido la capacidad de expresar opsinas, pero habrían adquirido otras funciones, como la integración de la información. De esta forma, ciertas células se habrían especializado en la detección de luz y otras en la integración de la información, dando lugar a poblaciones de interneuronas interconectadas. Para tareas aún más complejas, los tipos celulares se habrían especializado en interneuronas de primero y segundo orden, estableciendo “ganglios ópticos”, organizados dentro de un sistema nervioso (Figura 3). Esta estructura básica de la retina está altamente conservada en el enorme grupo filogenético de los vertebrados (Baden y col., 2020) (Figura 4). Los cinco tipos neuronales que componen la retina se dividen, a su vez, en subtipos, cuyo número varía entre los distintos vertebrados y, además, aumenta en la dirección del flujo de información; es decir, menos subtipos de fotorreceptores y más subtipos de CGR. Esto es consistente en todos los vertebrados estudiados y sugiere que la divergencia evolutiva y la selección natural han actuado más intensamente en moldear la salida de información de la retina que su entrada (Hahn y col., 2023).

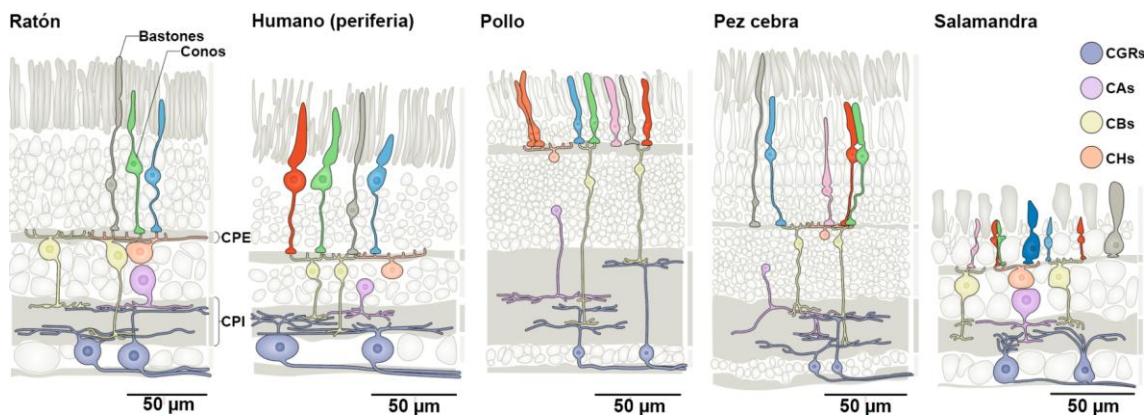


Figura 4. Composición retiniana de distintas especies vertebradas (ratón, humano, pollo, pez cebra y salamandra) a partir de secciones transversales. Se resaltan las capas plexiformes sinápticas (la capa plexiforme externa (CPE) y la capa plexiforme interna (CPI)). A pesar de las variaciones en el número y tipo de fotorreceptores de cada especie, la organización laminar y los mismos tipos neuronales permanecen conservados, lo que demuestra la notable homogeneidad estructural de la retina entre los vertebrados. CGRs: células ganglionares retinianas, CA: células amácrinas, CB: células bipolares, CH: células horizontales. Adaptado de Baden y col. (2020).

La capa de fotorreceptores genera una representación relativamente simple de la información lumínica: las neuronas que reciben luz en el centro de su campo visual se hiperpolarizan, en tanto que aquellos fotorreceptores ubicados en su periferia se despolarizan. Este mecanismo de inhibición lateral es muy similar entre distintos vertebrados (Masland, 2012; Wässle, 2004). Sin embargo, la información que sale de la retina es muy diversa. Los más de 20 subtipos de CGR identificados en retinas de vertebrados transmiten al cerebro información ya procesada de la escena visual (Baden y col., 2016; Sanes & Zipursky, 2010b). De la retina parten aproximadamente 100 veces menos axones que el número de fotorreceptores, llevando información procesada en paralelo por diferentes circuitos retinianos que analizan distintos aspectos de la escena visual, como luminancia, contraste, frecuencia espacio-temporal, movimiento, dirección del movimiento, aproximación de objetos y longitud de onda (Gollisch y col., 2010; Masland, 2012). La importancia relativa de estos elementos coincide con las “necesidades etológicas” de cada especie, lo que sugiere que la configuración detallada de estos circuitos fue moldeada por el entorno específico de cada una (Revisado por Baden y col., 2020).

Además de estos cinco tipos neuronales, la retina cuenta con tres tipos de células gliales: las células de Müller, los astrocitos y la microglía (Vecino y col., 2016). Las células de Müller son un tipo glial especializado, específico de la retina. Su morfología es radial, con sus cuerpos celulares ubicados en la CNI. Sus largos procesos atraviesan casi toda la retina, estableciendo contacto con todos los tipos neuronales (Reichenbach y col., 2013). Los astrocitos son células estrelladas con numerosos procesos citoplasmáticos que se encuentran en la CFNR rodeando los axones de las CGR y los vasos sanguíneos de la retina interna (Vecino y col., 2016).

La microglía se considera parte del sistema fagocítico mononuclear residente en la retina, así como en el resto del SNC. Son células pequeñas, con núcleo denso, escaso citoplasma y prolongaciones finas con pequeñas espinas. Su distribución varía según la especie. En retinas de roedores adultos, la microglía se localiza en la CCG, la CPI y la CNE, mientras que en retinas humanas se distribuye de forma ubicua, aunque con mayor concentración en la CPI y la CPE (Chen y col., 2002; Provis y col., 1995). Generalmente, las células microgliales se encuentran cerca de los vasos sanguíneos y alrededor de la cabeza del NO (Neufeld, 1999). La microglía cumple un papel crucial en la defensa contra enfermedades infecciosas de la retina, en la reparación tisular y en la regulación inmunológica, participando en reacciones inflamatorias, en la presentación de antígenos y en la activación del complemento. Expresan la proteína de unión al calcio (Iba-1), cuyos niveles aumentan en estados activados. Una de las principales funciones asociadas a las células microgliales retinianas es la de remover *debris* celulares y células muertas. La microglía se encuentra en estrecho contacto con las células vecinas, sensa constantemente el ambiente local y participa en el control de la homeostasis (Revisado por Wang y col., 2016). Ante la presencia de agentes patógenos o lesiones, se activan mecanismos de defensa y modulan la respuesta inflamatoria (Karlstetter y col., 2015; Silverman & Wong, 2018). Históricamente, se clasificó a la microglía en dos estados: “en reposo” (morfología ramificada) y “activada” (morfología ameboide), asumiendo que el cambio de morfología implicaba el inicio de su respuesta. Sin embargo, actualmente se considera que la microglía en estado ramificado no es inactiva, sino que responde a múltiples estímulos, integrando información de manera continua (Aguzzi y col., 2013; Hanisch, 2013; Kettenmann y col., 2011). Diversos estudios indican que sus procesos son altamente dinámicos y pueden retrajerse o extenderse (Lee y col., 2008; Nimmerjahn y col., 2005) y sugieren que en condiciones fisiológicas estas

células cumplen un rol en la neurogénesis, la poda sináptica (Huang y col., 2012; Schafer y col., 2012) y el mantenimiento de la estructura y función sináptica (Wang y col., 2016). Debido a evidencia experimental reciente, este concepto de “activación microglial” se ha ampliado para reconocer varios sub-estadíos, definidos en gran medida por su perfil de expresión génica. De esta forma, el espectro de la microglía oscila desde un fenotipo proinflamatorio (M1) hasta uno antiinflamatorio (M2), con múltiples posibles estados intermedios (Cherry y col., 2014; Ransohoff, 2016; Tang & Le, 2016). En este marco, se asume que la denominada “microglía ramificada” representa una forma activa y funcionalmente implicada en la regulación homeostática y en la integración de señales provenientes del entorno retiniano.

En el contexto de enfermedades retinianas neurodegenerativas, resulta cada vez más clara la relevancia de la microglía (revisado por Rathnasamy y col., 2019). Ante una lesión o un proceso de degeneración, estas células pueden proliferar y migrar rápidamente hacia las zonas afectadas (Karlstetter y col., 2010), aunque aún persisten interrogantes sobre si su respuesta agrava o mitiga el daño (Du y col., 2017). En este sentido, se ha propuesto que la depleción de microglía podría tener efectos terapéuticos en determinados contextos neurodegenerativos (Fischer y col., 2015), dado que se reduciría una posible contribución a la inflamación crónica. En todo caso, resulta relevante profundizar en la comprensión de los mecanismos subyacentes, ya que su eliminación también podría alterar la regulación de la homeostasis, generando consecuencias contraproducentes.

Procesamiento central de la información visual

La percepción visual comienza en ambas retinas, que transforman el *input* visual mediante una estrategia de procesamiento paralelo utilizada a lo largo de todo el sistema visual y en otras áreas sensoriales. Podríamos imaginar que la información visual que llega a los

fotorreceptores se discretiza en forma de píxeles sobre una pantalla. Esta información es analizada por circuitos neuronales para extraer unas 20 características, como el contraste luz/oscuridad o la distinción entre colores, entre otras. Estas características son computadas por diferentes poblaciones de circuitos neuronales especializados, que forman módulos de procesamiento independiente y cubren distintas áreas el campo visual. El resultado es que cada punto en el campo visual es procesado por múltiples canales que extraen simultáneamente distintos aspectos de la escena visual. Estas vías de procesamiento paralelo se transmiten al cerebro a través del NO. Si bien la estructura de la retina y el procesamiento paralelo de las distintas características de la escena visual se han mantenido muy conservados en los 300 millones de años de evolución independiente en los vertebrados, las vías de procesamiento de la información visual han sido fuertemente moldeadas por los blancos sinápticos cerebrales, lo que permite satisfacer las necesidades de las distintas especies en sus nichos ecológicos (Baden y col., 2016; Knudsen, 2020; Masland, 2012).

La información visual procesada en el cerebro permite modificar el comportamiento animal en los vertebrados principalmente por dos vías: 1) la vía retino-geniculada-cortical, que transmite la información codificada por las CGR al prosencéfalo a través del tálamo, y 2) la vía retino-tectal, que involucra axones del NO que llegan al tectum óptico (colículo superior, CS) en mamíferos). Desde el tectum óptico, algunas proyecciones también van al tálamo y de ahí al prosencéfalo. Al mismo tiempo, el prosencéfalo proyecta hacia el tectum óptico, por lo que ambas vías están fuertemente interconectadas (Knudsen, 2020; Krauzlis y col., 2018). Estudios comparativos en mamíferos, aves y reptiles han permitido diferenciar dos funciones principales que distinguen estas vías. La vía retino-geniculada-cortical permite un procesamiento de nivel superior, aunque más lento, relacionado con actividades como

el comportamiento voluntario, la navegación espacial, la caza y la interacción social. Por ejemplo, el procesamiento de la binocularidad, que es esencial para la percepción de profundidad y permite a los animales estimar distancias con precisión (un aspecto crucial en depredadores durante la caza), se lleva a cabo principalmente a través de esta vía (Livingstone y col., 1988; Read, 2021). En contraste, la vía retino-tectal está asociada con un procesamiento no consciente de la información visual, dando origen a respuestas inmediatas como la orientación, reacciones rápidas frente a estímulos amenazantes y comportamientos asociados a la alimentación (Knudsen, 2020). Un ejemplo de procesamiento retino-tectal es la percepción de objetos que se aproximan rápidamente (Isa & Hall, 2009; Krauzlis y col., 2018), lo que puede reproducirse experimentalmente en el test de "*looming*", como se describirá más adelante.

A lo largo de la evolución de los vertebrados, la importancia relativa de estas vías de procesamiento visual ha cambiado notablemente. En peces, anfibios y reptiles, la gran mayoría de la información visual se transmite a través de la vía retino-tectal, mientras que la vía retino-geniculada transporta información de una pequeña población de CGR. En aves y mamíferos no primates, la vía retino-tectal aún comprende la mayoría de los axones provenientes de la retina; sin embargo, la vía retino-geniculada está más desarrollada y asociada a estructuras más diferenciadas. En primates, la importancia relativa de estas vías se invierte: la vía retino-geniculada transmite la mayor parte de la información y está asociada a estructuras de mayor tamaño y arquitectónicamente más elaboradas. Por ejemplo, en los homínidos, alrededor del 90% de las CGR proyectan al núcleo geniculado lateral del tálamo, mientras que aproximadamente el 10% restante proyecta al CS (Knudsen, 2020). En contraste, en los roedores (las especies más frecuentemente utilizadas en las neurociencias experimentales), cerca del 90% de los axones que salen de la retina

proyectan al CS, mientras que alrededor del 10% proyecta al núcleo geniculado lateral del tálamo (Ito y col., 2018). En roedores, la mayoría (~ 98%) de los axones de las CGR de cada ojo, luego de converger en el quiasma óptico, cruzan la línea media y proyectan de forma contralateral hacia sus blancos centrales (Nadal-Nicolás y col., 2012).

Además de las vías retino-geniculada y retino-tectal, que reciben e integran la información de manera retinotópica, existen otras proyecciones hacia distintas áreas del cerebro originadas en un tipo particular de CGR: las CGR intrínsecamente fotosensibles (ipCGR). Este tipo particular de CGR son directamente fotosensibles a través de la expresión de un fotopigmento, la melanopsina, y participan en respuestas que dependen de la luz, pero no están implicadas en la formación de imágenes, tales como el reflejo pupilar y la regulación de los ritmos circadianos, mediados por la proyección al núcleo pretectal olivar y a los núcleos supraquiasmáticos del hipotálamo, respectivamente. Por esta razón, el conjunto de respuestas asociadas a las ipCGR (entre un 1% y un 2% del total de CGR) (Hattar y col., 2002; Schmidt y col., 2011), se denomina sistema visual no formador de imagen. Recientemente, también se ha demostrado que el núcleo perihabenular recibe inervación de esta población particular de CGR (Fernandez y col., 2018). Las implicancias de este circuito recién se están comenzando a elucidar. Estudios recientes han demostrado que esta vía es fundamental para el comportamiento afectivo y para el aprendizaje de contextos amenazantes a largo plazo (Aranda y col., 2024; Fernandez y col., 2018).

La respuesta al estímulo de looming como indicadora de la función visual en roedores

El ratón se ha consolidado como el principal modelo de estudio en las neurociencias. Tal como en otras especies, su sistema visual se ha adaptado a sus necesidades etológicas; comprender estas particularidades puede brindar herramientas valiosas para diseñar mejores metodologías experimentales. Desde esta perspectiva, para el estudio de la visión

en estos animales, resulta especialmente pertinente analizar los comportamientos mediados por la vía retino-tectal ya que, como se ha mencionado anteriormente, en los roedores alrededor del 90% de los axones del NO forman parte de esta vía.

La habilidad de detectar eficientemente la aproximación de un depredador es esencial para la supervivencia. Diversas evidencias experimentales demuestran que el CS participa centralmente en el procesamiento de este tipo de estímulos (Cai y col., 2021; Dean y col., 1989; Isa y col., 2021; Oliveira & Yonehara, 2018). Esta capacidad cobra particular importancia en roedores, puesto que ocupan un nivel bajo en la cadena trófica y suelen ser presas de múltiples depredadores, incluidas aves rapaces que atacan desde el aire. Esto ha generado una presión de selección que llevó a estos animales a desarrollar respuestas muy eficientes frente a este tipo de amenazas. Una de ellas es la respuesta que se puede reproducir experimentalmente mediante el estímulo de *looming*, es decir, la simulación de un objeto que se aproxima rápidamente desde arriba. Esta respuesta involucra circuitos neuronales capaces de detectar la aproximación de un objeto desde el campo visual superior que conectan muy rápidamente la información de la retina con los centros motores (Revisado por Wu & Zhang, 2023). El “test de *looming*” es una herramienta experimental diseñada precisamente para estudiar cómo responde un animal ante la aproximación simulada de un depredador aéreo. Este paradigma, introducido originalmente por Yilmaz & Meister (2013), consiste en proyectar sobre el techo de una arena un disco oscuro que aumenta gradualmente de tamaño sobre un fondo gris. Esta proyección simula la sombra de un depredador que se aproxima desde arriba, desencadenando respuestas defensivas innatas, como correr a un refugio, congelarse o adoptar alguna otra comportamiento evasivo. Este paradigma ha permitido describir cómo el CS integra la información sensorial visual y casi simultáneamente, coordina una respuesta motora, actuando como un centro

de control que organiza las estrategias de defensa frente a amenazas únicamente percibidas por el sistema visual (Evans y col., 2018; Shang y col., 2018; Wei y col., 2015; Wu & Zhang, 2023).

Dado la preponderancia de la vía retino-tectal en el sistema visual de los roedores y dado que la respuesta al *looming* involucra centralmente a esta vía, uno de los objetivos de esta tesis fue desarrollar una herramienta para estudiar en forma cuantitativa las variaciones en la respuesta al *looming*, como un indicador de la sensibilidad al contraste en ratones.

Estrés de vida temprana

El fenotipo de los animales adultos es el resultado de la interacción dinámica entre los programas de desarrollo genéticamente determinados y las claves ambientales durante las etapas tempranas de la vida (Gilbert, 2005; Monaghan, 2008; West-Eberhard, 2003). En particular, las claves ambientales estresantes durante el desarrollo, que involucran la activación del eje hipotálamo-hipófiso-adrenal (HPA), tienen efectos profundos y duraderos en el fenotipo adulto (Monaghan, 2007). Este fenómeno no sólo se ha observado en mamíferos, como lo demuestran múltiples líneas de evidencia en roedores (Francis y col., 1999; Meaney, 2001; Weaver y col., 2004) y primates (Sánchez y col., 2001), sino que efectos similares se han documentado en aves (Love y col., 2005; Spencer y col., 2009), reptiles (Meylan y col., 2005; Uller y col., 2006), peces (Giesing y col., 2011) y anfibios (Crespi y col., 2005; Glennemeier y col., 2002). Esta amplia distribución taxonómica sugiere que los cambios fenotípicos inducidos por un ambiente hostil en las crías podrían responder a mecanismos conservados a lo largo de los vertebrados (Crespi y col., 2013; Sheriff y col., 2017).

El estrés de vida temprana (EVT) refiere a un período de trauma severo y/o crónico, así como de privación o negligencia ambiental/social durante las etapas prenatal o postnatal

temprana (Hedges y col., 2011). Si bien varios autores han propuesto que algunas de las alteraciones inducidas por el EVT podrían tener ventajas adaptativas en entornos adversos predecibles (Champagne & Meaney, 2008; Ellis & Del Giudice, 2019; Parent y col., 2005), la mayoría de estos cambios tienen consecuencias negativas para la salud en el largo plazo (Bateson y col., 2014; Danese & Lewis, 2017; Lupien y col., 2009; McEwen, 2008; Teicher y col., 2016). En este sentido, las consecuencias de la exposición a un ambiente estresante durante el desarrollo humano han sido ampliamente estudiadas. En un gran estudio epidemiológico en el que se consultó sobre la experiencia frente a diez formas de EVT, tales como el abuso (físico, sexual y/o emocional), abandono, violencia, adicciones o enfermedades parentales y otras, demostró que las experiencias infantiles adversas están fuertemente asociadas con un alto riesgo de enfermedades “físicas y sociales” durante toda la vida (Felitti y col., 1998). En términos generales, las diversas formas de EVT podrían dividirse en dos categorías que pueden operar sinéricamente: i) riesgos biológicos, e ii) riesgos psicosociales. Los riesgos biológicos perinatales incluyen parto prematuro, bajo peso al nacer, nacer de menor tamaño respecto a la edad gestacional, complicaciones al nacer (por ej., lesión hipóxico-isquémica), desnutrición, enfermedades entéricas o infecciosas (virales o parasitarias), entre otros (Nelson, 2017). Aunque en los países de altos recursos, la carga de morbilidad debida a riesgos biológicos se ha reducido notablemente, en países de bajos/medianos recursos, los logros son considerablemente menores (Jensen y col., 2017). Sin embargo, incluso en nuestro país, se ha alcanzado un éxito considerable en el tratamiento de la retinopatía del prematuro inducida por asfixia perinatal (Retinopatía del Prematuro en Argentina | VISIÓN 2020). En todo caso, aunque las consecuencias duraderas de los riesgos biológicos son relativamente predecibles, resulta más complejo elucidar las secuelas de los riesgos psicosociales tempranos en adultos. Los riesgos

psicosociales, que podrían conceptualizarse como experiencias negativas relacionadas con el entorno psicosocial en los primeros años de vida, se han asociado fuertemente con peores resultados en la salud, incluyendo mayor incidencia de diabetes tipo 2, obesidad, enfermedad cardíaca, depresión, ansiedad, adicción, cáncer, enfermedad pulmonar y hepática, y tasas más altas de deserción escolar, entre otros (Berens y col., 2017; Danese y col., 2009).

Múltiples evidencias demuestran que el desarrollo humano temprano está “moldeado” por la calidad de las relaciones personales (Lally y col., 2017). Entre las muchas formas de adversidad psicosocial que pueden afectar el desarrollo, quizás la más insidiosa sea el abandono materno durante la infancia (Nelson, 2014). En este sentido, la separación materna (SM) a una edad temprana es un poderoso estresor que causa alteraciones permanentes en las funciones cognitivas y comportamentales que persisten en la etapa adulta (Banqueri y col., 2017; Nelson, 2017). El desarrollo cerebral está fuertemente y a menudo irreparablemente comprometido por la crianza institucional temprana, que afecta a un gran número de niños/as. De hecho, para el año 2015, UNICEF estimó que existen ~140 millones de niños/as huérfanos/as, de los cuales ~ 8 millones de niños/as están institucionalizados/as (www.unicef.org/media/media_45279.html), lo que avala fuertemente la relevancia de este “problema médico”.

Considerando su correlato con la situación en humanos, resulta de indudable interés comprender los mecanismos moleculares y biológicos subyacentes a las secuelas del EVT y profundizar el análisis de las modificaciones neurobiológicas y comportamentales causadas por la exposición temprana a la adversidad experimental. Se han desarrollado múltiples paradigmas para estudiar los efectos del EVT en modelos animales, entre los cuales, uno de los más insidiosos es la SM, que ha sido extensivamente utilizado para

analizar las consecuencias de este tipo de experiencias adversas. Este enfoque consiste en separar periódicamente a las crías de sus madres durante el período de lactancia, con duraciones constantes o crecientes hasta el destete. Entre los trabajos seminales en SM, se encuentran los de Kuhn y col. (1990), quienes demostraron por primera vez en ratas que los niveles séricos de corticosterona aumentan en las crías durante el período en el que se encuentran separadas de sus madres. Luego, Plotsky & Meaney (1993) demostraron una activación exacerbada del eje HPA en ratas adultas expuestas a SM. Numerosos trabajos en roedores han demostrado que la separación de las crías de sus madres durante el período de desarrollo afecta drásticamente el desarrollo cerebral y aumenta el riesgo de diversas enfermedades (Lupien y col., 2009; Nishi y col., 2014). Por ejemplo, la SM en etapas tempranas incrementa comportamientos con rasgos depresivos y/o ansiosos en la edad adulta (Jahng y col., 2010; Kalinichev y col., 2002). Este tipo de manipulación también se asoció con alteraciones neuronales y comportamentales de larga duración, que persisten a lo largo de la vida (Gracia-Rubio y col., 2016; Sandi & Haller, 2015). Sin embargo, la variabilidad en la duración y periodicidad de la SM ha llevado a resultados contrapuestos en algunos casos (Banqueri y col., 2017). En este contexto, George y col. (2010) desarrollaron un modelo sólido de EVT basado en un protocolo de SM con destete temprano (SMDT). Este modelo incluye períodos de extensión creciente de SM desde el día postnatal (DPN) 3 hasta el DPN 17, momento en el que las crías son separadas definitivamente de sus madres. Como resultado de este protocolo, se observaron cambios comportamentales significativos en la edad adulta, principalmente comportamientos con rasgos depresivos y ansiosos, sin que se vean afectados parámetros metabólicos como el peso corporal o la glucemia, tanto en etapas tempranas como en la adultez. Estos hallazgos fueron reproducidos por diferentes autores; por ejemplo, Gracia-Rubio y col. (2016) registraron

indicios de neuro-inflamación en el hipocampo de ratones adultos expuestos a SMDT, mientras que Carlyle y col. (2012) describieron alteraciones neuroanatómicas globales, como una menor mielinización cerebral y una reducción en el grosor de la corteza.

Desde hace ya mucho tiempo, los neurocientíficos han examinado cómo la experiencia impacta el cerebro en desarrollo manipulando la experiencia (por ej., privando al cerebro del “input” visual) o analizando situaciones particulares en las que un/a bebé/niño/a no puede beneficiarse de la experiencia (por ej., cataratas congénitas o pérdida auditiva profunda) (Hubel y col., 1970; Knudsen, 2004; Lewis y col., 2005). El sistema visual ofrece información valiosa a través del estudio de los mecanismos que definen el período crítico. En humanos y otros animales, la deprivación visual de un ojo obstruido tempranamente produce pérdida de agudeza visual (ambliopía) a través de una remodelación anatómica en la corteza visual primaria (Wiesel, 1982). Este efecto de deprivación visual no se observa en el adulto, lo que avala la existencia de un período crítico en el desarrollo para la plasticidad dependiente de la experiencia visual a nivel de la corteza visual. Debido a la falta de plasticidad cerebral suficiente en la edad adulta, la privación monocular no tratada durante la infancia da como resultado una ambliopía de por vida, que afecta al 2-5% de la población (Wu & Hunter, 2006).

El sistema visual murino presenta un período crítico bien definido y que se extiende hasta ~ 1 mes después del nacimiento. La previsibilidad y duración de esta ventana temporal son particularmente útiles para disecar los mecanismos moleculares de la plasticidad de la corteza visual a través de la manipulación genética y/o la intervención ambiental (Hensch, 2005). En este sentido, se ha demostrado que ratas ambliopes transferidas a ambiente enriquecido (AE) durante 3 semanas, inmediatamente después de la remoción de la sutura en el ojo deprivado, recuperan por completo sus funciones visuales, tanto en términos de

agudeza visual, como de visión binocular (Sale y col., 2014). Además, se ha demostrado que el enriquecimiento ambiental materno durante la preñez acelera el desarrollo de la retina del feto (Sale y col., 2007). Si bien estos estudios han aportado información valiosa sobre la plasticidad de la corteza visual y de la retina durante el desarrollo, aún no se han analizado las secuelas de las adversidades psicosociales tempranas sobre la retina en etapa adulta. Muchas actividades que definen la independencia y la productividad social requieren una buena visión y, por lo tanto, una de las consecuencias más devastadoras de la discapacidad visual es la pérdida progresiva de independencia que afecta la calidad de vida del individuo y su entorno (Dhawan y col., 2019). De hecho, la pérdida visual en sus múltiples formas se asocia a mayor incidencia de depresión, ansiedad y trastornos del sueño en individuos adultos, entre otros (Frank y col., 2019; Heesterbeek y col., 2017; Lanzani y col., 2012). En este contexto, el objetivo principal de esta tesis fue identificar las secuelas del EVT en la vía visual de ratones adultos, analizar los mecanismos subyacentes de estas secuelas y explorar estrategias terapéuticas para prevenir las eventuales consecuencias deletéreas del EVT inducidas por la exposición a SMDT.

Participación de mecanismos inflamatorios y oxidativos en los efectos adversos del EVT

La inflamación es esencial para combatir el daño tisular, reparar tejidos y mantener la homeostasis. Sin embargo, su desregulación puede derivar en una inflamación crónica de bajo grado, un estado que incrementa el riesgo de diversas enfermedades (Lawrence y col., 2007). Durante los últimos 20 años, numerosos estudios han identificado al EVT como un modulador clave del sistema inmune, aunque los mecanismos involucrados son complejos y aún no han sido completamente elucidados. Al respecto, predominan dos hipótesis: 1) el EVT provoca cambios epigenéticos que alteran múltiples sistemas fisiológicos en paralelo, incluido el sistema inmune; y 2) las alteraciones en el eje HPA inducidas por el EVT afectan

indirectamente al sistema inmune a través de la producción de glucocorticoides (GC) (Elwenspoek y col., 2017; Fagundes y col., 2013). En cualquier caso, la respuesta inflamatoria parece desempeñar un papel clave en las consecuencias del EVT. Danese & Baldwin (2017) se refieren a este fenómeno como “heridas ocultas” causadas por el EVT, que persisten a lo largo de la vida y que generan un daño similar al de la inflamación crónica a lo largo del tiempo.

Otro factor deletéreo que ha sido vinculado al daño provocado por el EVT es el estrés oxidativo. El metabolismo genera especies reactivas del oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), principalmente a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Frente al daño asociado a estas moléculas reactivas, las células disponen de mecanismos antioxidantes ampliamente conservados en las diferentes formas de vida (Benzie, 2000; Jomova y col., 2023; Korczowska-Łącka y col., 2023). Un desbalance entre la cantidad de ROS y los sistemas antioxidantes provoca daño oxidativo, que afecta a las principales biomoléculas: lípidos, ácidos nucleicos, proteínas y glúcidos. Este fenómeno ha sido implicado en el desarrollo de diversas enfermedades crónicas y parece jugar un papel crucial en los efectos a largo plazo del EVT (Karanikas y col., 2021; Mhillaj y col., 2015). Por ejemplo, en adolescentes con una historia del maltrato infantil se identificaron niveles aumentados de marcadores séricos de EOx en comparación con adolescentes sin historias de maltrato (do Prado y col., 2016). Análogamente, en muestras de sangre de mujeres con una historia de maltrato infantil, se observó un incremento en los niveles de ROS, niveles aumentados de marcadores de EOx y una exacerbada actividad mitocondrial, en una relación “dosis respuesta” positiva respecto a la intensidad del maltrato infantil. Este aumento del EOx y la actividad mitocondrial se asoció con una mayor producción de citoquinas proinflamatorias liberadas por células mononucleares de sangre periférica

(Boeck y col., 2016). En modelos animales, Malcon y col. (2020) describieron la presencia de marcadores de EOx en plasma de ratones macho adultos expuestos a SM. Por otro lado, Soares y col. (2020) observaron mayores niveles de marcadores de EOx en neuronas de la corteza prefrontal y del hipocampo de ratones expuestos a SM. En suma, estos resultados sugieren que el EVT genera un aumento a largo plazo del daño oxidativo, que es evidente tanto en la sangre como en el cerebro, y podría tener una relación causal con los efectos del EVT sobre el SNC.

La melatonina

La melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) es una molécula que se distribuye de forma ubicua en numerosas especies de animales, plantas, hongos y bacterias. De acuerdo con la evidencia disponible, habría surgido hace al menos, unos dos mil millones de años en bacterias como un mecanismo de defensa frente al estrés oxidativo (Korkmaz y col., 2009; Reiter y col., 2024). Su presencia a lo largo de distintos clados sugiere su participación en funciones fisiológicas desde etapas muy tempranas en la evolución de las especies. En vertebrados, es reconocida originalmente por su actividad como neurohormona producida por la glándula pineal (Axelrod, 1974; Lerner y col., 1959). Sin embargo, trabajos posteriores han demostrado que la melatonina no sólo tiene actividad como neurohormona, ni es exclusivamente de producción pineal. También se sintetiza en otros tejidos, incluida la retina (Cardinali & Rosner, 1971; Faillace y col., 1995; Gern & Ralph, 1979; Pang y col., 1993; Quay, 1965), y está involucrada en la regulación de múltiples funciones biológicas, como los ritmos circadianos, la respuesta inmune y la actividad reproductiva. Su alta lipofilicidad facilita la posibilidad de atravesar la barrera hematoencefálica y la barrera hemato-ocular (Bubenik y col., 1978; Cassone y col., 1993), lo que amplifica su acción protectora en el SNC en general y en la retina en particular. Una vez dentro de la célula, la melatonina se distribuye

en todos los compartimientos celulares, con mayor concentración en el núcleo y las mitocondrias (Menendez-Pelaez y col., 1993; Reiter y col., 1997). En la retina, la melatonina se sintetiza principalmente en los fotorreceptores. Estudios utilizando anticuerpos anti-melatonina y anti-N-acetylserotonin localizaron la melatonina en la capa nuclear externa de la retina de rata, donde se encuentran los somas de los fotorreceptores (Bubenik y col., 1974). Además, en cultivos de retinas de pollo, se demostró una alta correlación entre el número de fotorreceptores y la actividad de la arilalquilamina N-acetyl transferasa (AA-NAT), enzima limitante en la síntesis de melatonina (Iuvone, 1990). Sin embargo, trabajos de nuestro laboratorio indican que la melatonina también puede ser sintetizada en CGR de pollo (Garbarino-Pico y col., 2004).

La melatonina posee potentes propiedades antioxidantes. Actúa como un eliminador directo ("scavenger") de ROS y especies reactivas de nitrógeno (ERNs), interactuando virtualmente con todas ellas (Reiter, 1995; Reiter y col., 1997). Esta capacidad le permite proteger a las células del daño oxidativo.

Además de su acción directa, la melatonina ejerce efectos antioxidantes mediados por receptores específicos. Existen varios tipos de receptores de melatonina, que se han localizado en diversas estructuras oculares, incluyendo la córnea, la coroides, la esclera, los fotorreceptores, las CGR y los vasos retinianos (Fujieda y col., 1999; Rada & Wiechmann, 2006; Savaskan y col., 2002; Scher y col., 2002; Wiechmann & Smith, 2001). La activación de estos receptores puede inducir la expresión de enzimas antioxidantes intracelulares, como la superóxido dismutasa y la glutatión peroxidasa, potenciando la defensa antioxidante celular (Siu y col., 2006). La melatonina también exhibe propiedades antiinflamatorias; inhibe la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa inducible (NOS-2) y reduce la producción de citoquinas proinflamatorias (Korkmaz y col., 2009). En nuestro

laboratorio, demostramos que la melatonina modula significativamente la actividad del ciclo glutamato/glutamina, reduciendo las concentraciones sinápticas de glutamato (Sáenz y col., 2004), actúa como un potente antioxidante retiniano (Belforte y col., 2010) y es un antiinflamatorio ocular efectivo. La melatonina previene la ruptura de la barrera hemato-ocular inducida por la inyección intravítreo de lipopolisacárido bacteriano (LPS), así como las consecuencias bioquímicas, funcionales y ultraestructurales de la uveítis inducida por la endotoxina en hámsteres (Sande y col., 2008) y gatos (Del Sole y col., 2012), probablemente a través de la reducción de los niveles del factor nuclear kappa B (NF-κB), TNF-α y óxido nítrico. Además, disminuye los niveles de ciclooxygenasa-2 y la síntesis de prostaglandinas inducidas por LPS (Domínguez Rubio y col., 2017). Asimismo, nuestro grupo ha demostrado que la melatonina tiene potentes efectos terapéuticos en diversos modelos de daño retiniano. González Fleitas y col. (2021) demostraron que la melatonina protege el sistema visual no formador de imagen al prevenir la pérdida de CGR intrínsecamente fotosensibles y alteraciones mitocondriales inducidas por glaucoma experimental en ratas. Aranda y col. (2021) demostraron que la melatonina mitiga el daño funcional y estructural inducido por neuritis óptica experimental en ratas, restaura conexiones visuales alteradas y mejora la respuesta circadiana. Finalmente, Diéguez y col. (2020) demostraron que la melatonina previene la progresión del daño funcional e histológico en un modelo de degeneración macular asociada a la edad no exudativa, probablemente a través de sus propiedades antioxidantes. En suma, estos resultados indican que la melatonina posee potentes propiedades antiinflamatorias y antioxidantes, dos componentes que podrían jugar un rol clave en los efectos deletéreos inducidos por el EVT a largo plazo.

Ambiente enriquecido

Los estudios pioneros de Rosenzweig y colaboradores en la década de 1960 marcaron un hito al demostrar que las experiencias ambientales pueden modificar la neuroquímica cerebral, como la actividad de la enzima acetilcolinesterasa, e incluso alterar el peso y el grosor en algunas áreas de la corteza cerebral en animales adultos (Krech, 1963; Krech y col., 1960). Para explorar este concepto, introdujeron el paradigma del ambiente enriquecido (AE), definido como un entorno que combina estímulos sociales, mayor actividad motora y objetos novedosos (Bennett y col., 1964). Este ambiente incluye materiales para anidar, ruedas para ejercicio, túneles, escaleras y juguetes de diferentes texturas, colores y formas, que se renuevan periódicamente. En este sentido, el AE brinda condiciones óptimas para una mayor actividad exploratoria, sensorial, cognitiva, social y física (Bondi y col., 2014; Sale y col., 2014). Desde sus comienzos hasta la actualidad, el paradigma del AE se ha convertido en uno de los conceptos más exitosos en la biología experimental, dado que permite analizar experimentalmente el vínculo de la plasticidad con la estructura y la función (revisado por Kempermann, 2019). Los efectos de la exposición a AE se han documentado a nivel molecular, celular y comportamental en diversas especies, como ratones, ratas, gatos y monos (van Praag y col., 2000). La exposición a AE induce cambios profundos en la morfología y fisiología del cerebro, potenciando la plasticidad neuronal en diversas áreas y etapas de la vida. Además, ejerce un efecto protector sobre el SNC frente al daño asociado a enfermedades neurodegenerativas experimentales (Consorti y col., 2019). A nivel celular, el AE promueve procesos como la neurogénesis, la gliogénesis, la angiogénesis y la sinaptogénesis (Nithianantharajah & Hannan, 2006). Sin embargo, los efectos del AE no son homogéneos sobre la anatomía del SNC. Por ejemplo, la magnitud de los cambios neuroanatómicos y neuroquímicos es mayor en la corteza occipital y menor en la corteza somatosensorial (Bennett y col., 1964). A nivel molecular, se observan cambios

en las concentraciones de neurotransmisores y neurotrofinas, como el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, del inglés *Brain-Derived Neurotrophic Factor*), cuyos niveles aumentan en el hipocampo y cerebelo de ratas *Wistar* expuestas a AE (Angelucci y col., 2009; Falkenberg y col., 1992). También se ha descripto el incremento en los niveles de otras neurotrofinas, como el factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *Nerve Growth Factor*) y el factor de crecimiento derivado de células gliales (GDNF, del inglés *Glial cell-Derived Neurotrophic Factor*), así como de neurotransmisores tales como glutamato y GABA (Mora y col., 2008). Además, el AE induce modificaciones epigenéticas, como la acetilación de histonas y la remodelación de la cromatina, que pueden influir en la expresión génica (Fischer y col., 2007)

Diversos estudios han descripto efectos del AE sobre el desarrollo del sistema visual. El AE acelera el desarrollo del sistema visual en general (Landi y col., 2007; Sale y col., 2007; 2009) y de la corteza visual en particular (Ciucci y col., 2007). En ratones alojados en AE desde el nacimiento, se observó una mayor agudeza visual en comparación con controles mantenidos en ambiente estándar (AS), lo que sugiere que el rendimiento visual está fuertemente influenciado por la complejidad del entorno (Prusky y col., 2000). Landi y colaboradores (2007) demostraron que el desarrollo de la agudeza visual retiniana es sensible al AE con la misma escala temporal que los cambios corticales. La retina de animales adultos, clásicamente considerada una estructura menos plástica que la corteza cerebral o el hipocampo (los sitios canónicos de plasticidad dependiente de la experiencia), también es sensible al AE. Estudios de nuestro laboratorio demostraron, por primera vez, el efecto protector de la exposición a AE frente a diferentes procesos retinianos degenerativos. En este sentido, se demostró que la exposición de animales adultos a AE evita la pérdida de función en la retina y la muerte celular de las CGR después de un episodio de isquemia-

reperfusión unilateral en ratas adultas (Dorfman y col., 2013). Asimismo, el AE previene y evita la progresión de daño retiniano en un modelo de glaucoma experimental (González Fleitas y col., 2020), en un modelo de diabetes tipo II en ratas adultas (Dorfman y col., 2014) y en un modelo de degeneración macular asociada a la edad no exudativa en ratones adultos (Dieguez y col., 2021). Además, el AE aumenta los niveles de BDNF y de receptores TrkB en retina, CS y corteza visual de animales adultos (Franklin y col., 2006). En suma, el AE podría constituir un tratamiento efectivo para evitar el daño visual inducido por el EVT.

OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis se fundamentó en la siguiente hipótesis:

El estrés durante la vida temprana genera alteraciones en la función visual de animales adultos. En este contexto, se plantearon los siguientes objetivos particulares:

- I. Desarrollar un test comportamental como herramienta para evaluar cuantitativamente el efecto de la SMDT sobre la sensibilidad al contraste;
- II. Explorar los efectos de la exposición a SMDT sobre el sistema visual de ratones adultos;
- III. Estudiar la participación de los glucocorticoides en las consecuencias del EVT sobre el sistema visual murino;
- IV. Describir la evolución temporal de los efectos de la exposición a SMDT sobre la estructura retiniana;
- V. Estudiar el rol de la microglía en las alteraciones retinianas inducidas por la exposición a SMDT;
- VI. Estudiar el rol del estrés oxidativo y el efecto terapéutico de la melatonina sobre las alteraciones retinianas inducidas por la exposición a SMDT;
- VII. Evaluar el efecto terapéutico de la exposición AE sobre la disfunción visual de animales expuestos a SMDT.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Los experimentos incluidos en esta tesis doctoral fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. Se utilizaron ratones C57BL/6J adultos obtenidos en el bioterio central de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de Buenos Aires con una edad de entre 5 y 6 semanas, que fueron adaptados por al menos 4 semanas antes de ser apareados. Para ello, los animales se albergaron en un bioterio estándar con agua y comida *ad libitum*, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura ($21 \pm 2^\circ\text{C}$). El bioterio fue iluminado con luces fluorescentes (200 lux) que se prendieron y apagaron automáticamente cada 12 h (de 8 a.m. a 8 p.m.). Para aquellos ensayos en los que resultó necesario, los animales se anestesiaron con hidrocloruro de ketamina (100 mg/kg) e hidrocloruro de xilacina (1 mg/kg) administradas por vía intramuscular.

Para determinar la contribución específica de los fotorreceptores individuales en la respuesta al estímulo de *looming*, se utilizaron ratones transgénicos originalmente empleados por Altimus y colaboradores (2010), diseñados para eliminar selectivamente bastones, conos y/o ipCGR, sin inducir degeneración retiniana inespecífica. El estudio incluyó genotipos emparejados por sexo y edad, de la siguiente manera: C57Bl/6J *wild type* (*Opn4+/+, Gnat1+/+, Gnat2+/+, Control*), *knockout* de bastones (*Opn4+/+, Gnat1-/-, Gnat2+/+, RKO*), *knockout* de bastones y melanopsina (*Opn4-/-, Gnat1-/-, Gnat2+/+, o solo conos, (C only)*), *knockout* de conos (*Opn4+/+ Gnat1+/+, Gnat2-/-, (CKO)*), *knockout* de conos y melanopsina (*Opn4-/-, Gnat1+/+, Gnat2-/-, o sólo bastones, (R only)*), *knockout* de conos y bastones (*Opn4+/+, Gnat1-/-, Gnat2-/-, o sólo melanopsina, (M only)*), y *knockout* de bastones, conos y melanopsina (*Opn4-/-, Gnat1-/-, Gnat2-/-, o*

triple , TKO). Estos modelos permitieron evaluar el papel individual y/o combinado de los diferentes tipos de fotorreceptores en la respuesta al estímulo de *looming*.

Modelo experimental de estrés de vida temprana: Separación Materna y Destete Temprano (SMDT)

Se utilizó un protocolo de SMDT, desarrollado originalmente por George y col. (2010). Para ello, se aparearon ratones previamente adaptados al bioterio, en grupos de tres hembras y un macho. Los machos se colocaron en jaulas individuales, una semana antes de comenzar con los apareos. Los animales se mantuvieron en las jaulas de apareos durante una semana y se revisó la aparición de tapón mucoso vaginal todos los días. Al finalizar la semana, el macho fue separado de la jaula y las hembras permanecieron en ella hasta el día 15 luego de la aparición del tapón mucoso, momento en el cual se las albergó en una jaula individual con viruta, algodón y papel *tissue* como material de nidificación. En el día post natal (DPN) 0, la jaula fue asignada de manera aleatoria al grupo control o SMDT. En el DPN 3, se determinó el sexo de las crías y se niveló la cantidad de crías a 6 en todas las camadas. Las camadas con menos de 6 crías fueron descartadas. Las madres del grupo de SMDT fueron removidas de sus jaulas a las 12:00 p.m. desde el DPN 4 al DPN 16 y se alojaron temporalmente en jaulas individuales con acceso a agua y comida *ad libitum*. Los tiempos de separación fueron: 2 h en los DPNs 4 - 6, 3 h en los DPNs 7 - 9, 4 h en los DPNs 10 - 12 y 6 h en los DPNs 14 - 16. Al final de cada período de SM, las madres se sometieron a un protocolo de restricción de movimiento en un tubo opaco de polietileno (15 cm de largo x 4,5 cm de diámetro) antes de volver a la jaula con las crías. Finalmente, las crías del grupo de SMDT se destetaron en el DPN 17 a las 12 p.m. En contraste, las camadas del grupo control sólo se manipularon para medir el peso corporal, limpiar las jaulas cada 7 días, y se destetaron en el DPN 21 (Figura 5). Cada camada se consideró una unidad experimental. En el DPN 35, se separaron las camadas en jaulas exclusivas de machos o hembras.

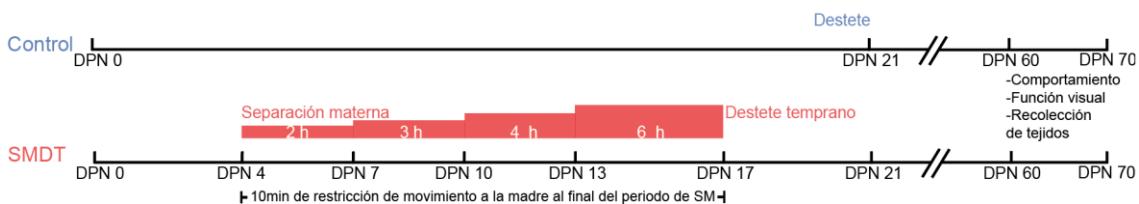


Figura 5. Diagrama temporal ilustrativo del protocolo de SMDT. Los ratones se separaron de sus madres durante 2 horas en los DPNs 4-6, durante 3 horas en los DPNs 7-9, durante 4 horas en los DPNs 10-12, durante 6 horas en los DPNs 13-16, y fueron destetados en el DPN 17. Al final de cada período de separación, las madres se sometieron a restricción de movimiento durante 10 minutos. Las crías del grupo control no fueron perturbadas hasta el destete, en el DPN 21. Los parámetros funcionales y estructurales se evaluaron a diferentes períodos, como se indica en cada caso.

Evaluación de los niveles de corticosterona

Los animales se sacrificaron por decapitación en el DPN 10 entre las 12:00 y las 12:30 h. La sangre del tronco se recolectó en tubos con EDTA, se centrifugó a 4000 g durante 5 minutos, se extrajo el plasma y se almacenó a -80°C. Los niveles de corticosterona en las muestras de plasma se determinaron por radioinmunoensayo, después de la extracción con diclorometano.

Tratamiento con mifepristona

Para analizar el efecto de la mifepristona, las camadas se asignaron aleatoriamente a uno de 4 grupos: control + vehículo, control + mifepristona, SMDT + vehículo, SMDT + mifepristona. Las crías recibieron una inyección intraperitoneal de 10 mg/kg de vehículo (aceite de sésamo) o mifepristona en los DPNs 4, 7, 10, 13 y 16 (Figura 6). La dosis de mifepristona fue seleccionada en base a trabajos de otros autores (Papillooud y col., 2019).

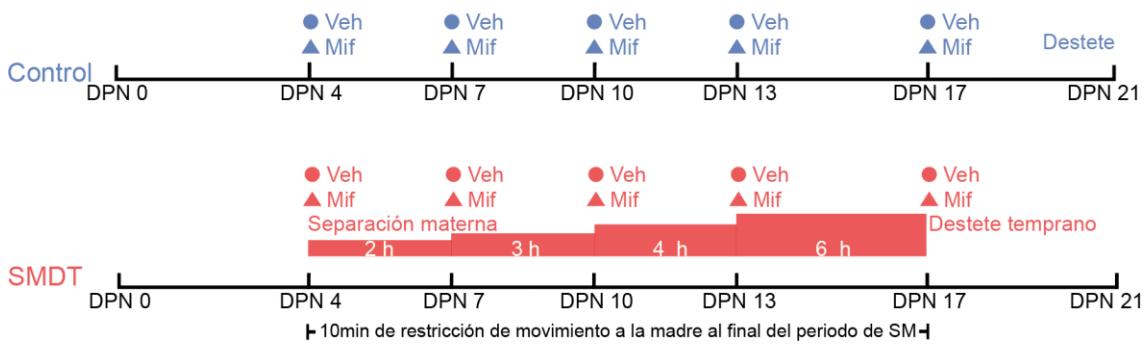


Figura 6. Protocolo de SMDT adaptado para el estudio del efecto de la mifepristona. Las crías recibieron una inyección de 10 mg/kg de vehículo o mifepristona cada 3 ó 4 días (como se indica en el esquema) desde el DPN 4 al DPN 17.

Tratamiento con BLZ945

Para analizar el efecto de la depleción de microglía en las consecuencias de la exposición a SMDT, las camadas se asignaron aleatoriamente a uno de 4 grupos: control + vehículo, control + BLZ945, SMDT + vehículo, SMDT + BLZ945. Desde el DPN 35 al DPN 60, los animales recibieron vehículo (metil-celulosa 0,5%) o 200 mg/kg de BLZ945 una vez al día a través de una sonda intragástrica. Entre los DPN 58 y DPN 60 se realizaron estudios funcionales y comportamentales, así como la recolección de tejidos para su posterior análisis (Figura 7). La dosis de BLZ945 se seleccionó en base al trabajo de Wies Mancini y col. (2019).

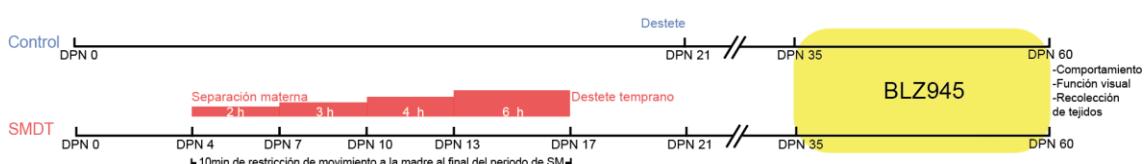


Figura 7. Protocolo experimental para el estudio de la depleción de microglía. Dos semanas más tarde de la finalización del protocolo de SMDT, los animales se trataron oralmente con vehículo o 200 mg/kg/día de BLZ945 hasta el DPN 60.

Tratamiento con melatonina

Las camadas se asignaron aleatoriamente a uno de 4 grupos: control + sham, control + melatonina, SMDT + sham, SMDT + melatonina. En el DPN 35 se implantó en forma subcutánea un *pellet* de melatonina (20 mg con 3% p/v de aceite vegetal) comprimido en un cilindro de 2,5 mm de diámetro y 1 mm de longitud. En el grupo control se realizó una

operación simulada (*sham*) sin implantar el *pellet*. Entre los DPN 58 y DPN 60 se realizaron estudios funcionales y comportamentales, así como la recolección de tejidos para su posterior análisis (Figura 8). La vía de administración y la dosis de melatonina fueron seleccionadas en base a trabajos previos (Sande y col., 2008; Belforte y col., 2010; Salido y col., 2013; Diéguez y col., 2020).



Figura 8. Protocolo experimental para el estudio de los efectos del tratamiento con melatonina. En el DPN 35, los animales recibieron un *pellet* subcutáneo de 20 mg de melatonina o fueron sometidos a una intervención simulada.

Exposición a ambiente enriquecido

Para estudiar el efecto de la exposición a AE, se utilizaron jaulas grandes (60 x 80 x 16 cm) que albergaron 6 animales del mismo sexo y distintas camadas. Para los animales de ambiente estándar (AS), se utilizaron jaulas de tamaño estándar de laboratorio (20 x 35 x 16 cm) que albergaron 3 ó 4 animales de distintas camadas. Las jaulas de AE contenían tubos, rampas y diferentes objetos inanimados como pelotas, cuerdas y figuras de plástico, que fueron reposicionados diariamente y totalmente sustituidos una vez por semana. Las jaulas de AE también contenían varias tolvas de alimento y botellas de agua que fueron reposicionadas diariamente. Los cambios de viruta y el aseo de las jaulas se realizaron de la misma forma y en el mismo momento que las jaulas de ambiente estándar (AS). Se ajustó cuidadosamente la luz del bioriterio de manera que la intensidad lumínica dentro de las jaulas de AE y AS fueran similares. El efecto de la exposición a AE sobre las consecuencias de la exposición a SMDT se inició en dos momentos: desde el DPN 35 al DPN 60 (AE35) y desde el DPN 45 al DPN 60 (AE45). Entre los DPN 58 y DPN 60 se realizaron estudios

funcionales y comportamentales, así como la recolección de tejidos para su posterior análisis (Figura 9).

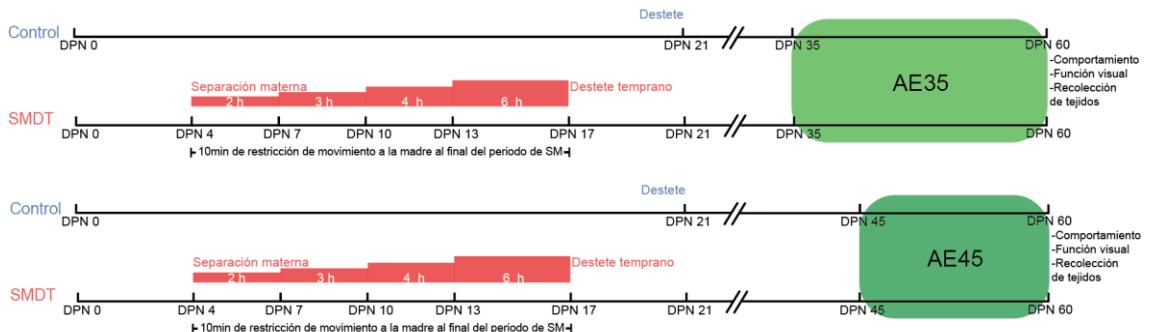


Figura 9. Protocolo experimental para el estudio del efecto de la exposición a AE. Los animales se albergaron en AE a partir del DPN 35 (AE35), o a partir del DPN 45 (AE45).

Electrorretinografía

Los ratones se adaptaron a oscuridad durante toda la noche y luego se anestesiaron, como ya se describió. Para dilatar las pupilas, se aplicó hidrocloruro de fenilefrina al 2,5% y tropicamida al 1% (Laboratorios Alcon, Argentina) y se administró en forma continua solución salina en la córnea, para mantener un registro estable y prevenir la queratopatía. Los animales se colocaron frente a la fuente luminosa, a una distancia de 2 cm. Un electrodo de referencia se colocó en la oreja (ipsilateral), un electrodo de tierra en la porción media de la cola y un electrodo de registro de oro se ubicó en el centro de la córnea. Todo el procedimiento se realizó bajo una luz roja de 15 W, que no afectó la adaptación de los animales a la oscuridad. Los electrorretinogramas (ERGs) de ambos ojos se registraron simultáneamente y en completa oscuridad con un equipo HMsERG 2000 (Ocuscence LLC), equipado con una cúpula Ganzfeld, que cuenta con un diodo emisor de luz blanca situado a una distancia de 2 cm de los ojos. Para la respuesta escotópica umbral (REU), se promediaron 10 destellos de campo completo, separados por un intervalo de 10 segundos (intensidad del destello $3 \cdot 10^{-5}$ cd.s.m $^{-2}$). Para evaluar la onda a, la onda b y los potenciales oscilatorios (POs) del ERG escotópico, se promediaron 15 destellos de campo completo,

separados por un intervalo de 10 segundos (intensidad del destello 10 cd.s.m⁻²). Finalmente, luego de la adaptación a luz (30 cd.s.m⁻² durante 10 minutos), se registraron (en las mismas condiciones fotópicas) las respuestas a 32 destellos de 25 cd.s.m⁻², que luego se promediaron para evaluar la respuesta fotópica negativa (RFN).

Comunicación de la retina con sus blancos sinápticos

Potenciales visuales evocados (VEPs)

Los animales se anestesiaron como ya se mencionó. Bajo control estereotáxico, se implantaron quirúrgicamente dos electrodos de acero inoxidable, que actuaron como electrodos positivos y se ubicaron a 2,3 mm laterales de la sutura interhemisférica y 3,6 mm caudales al bregma, con una penetración de aproximadamente 0,3 mm en la corteza visual primaria. Los electrodos de referencia se colocaron a 2 mm laterales de la línea media y 2 mm por delante de bregma, en la corteza motora. Los electrodos se cubrieron con material acrílico y la piel se suturó con nylon 5/0. Se administraron antibióticos tópicos para evitar infecciones.

Los registros de VEPs se realizaron tres días después de la cirugía, entre las 14:00 y las 15:00 h, utilizando un equipo HMsERG modelo 2000 (Ocuscence LLC), equipado con una cúpula Ganzfeld. El estímulo luminoso se generó con un diodo emisor de luz blanca, colocado a 2 cm del ojo. Todo el sistema estuvo protegido por una jaula de Faraday para minimizar interferencias eléctricas. Tras 6 h de adaptación a la oscuridad, los animales se anestesiaron nuevamente, se dilataron las pupilas y se aplicó proparacaína 0,5 % como anestésico en la córnea, bajo luz roja tenue. Se registró la actividad de cada ojo por separado, bloqueando el ojo contralateral con papel carbón negro y algodón. Se utilizó un protocolo de registro de VEPs incluido en el equipo, obteniéndose un promedio de 30 estímulos luminosos con una intensidad de 3 cd·s·m⁻², aplicados con intervalos de 1 segundo entre cada uno y sucesivamente para cada ojo.

Transporte desde la retina al colículo superior (CS)

Luego de ser anestesiados como ya se describió, los animales recibieron una gota de proparacaína 0,5% de forma tópica en la córnea como anestésico local. Utilizando una jeringa Hamilton con una aguja de calibre 31, se inyectaron 2 µl de una solución de la subunidad β de la toxina del cólera (CTB) al 0,1% conjugada con Alexa 488 (Molecular Probes Inc.) en PBS 0,01 mol/L (pH 7,4) en la cavidad vítreo del ojo derecho. Las inyecciones se aplicaron a 1 mm del limbo, dejando la aguja en el ojo durante 5 segundos para evitar la pérdida de volumen. Tres días después de la inyección, los ratones se perfundieron con solución salina, seguida de una solución fijadora que contenía formaldehído al 4% en PBS 0,01 mol/L (pH 7,4). Tras una cuidadosa extracción, los cerebros se fijaron durante toda la noche a 4°C en paraformaldehído al 4% y luego, se sumergieron en una serie de soluciones de sacarosa de concentración gradualmente creciente para la crioprotección. Usando un crióstato CM1860 (Leica), se realizaron cortes coronales de 40 µm a nivel del CS, siguiendo el atlas de cerebro de ratón de Paxinos y Franklin (2003). Las secciones coronales se observaron bajo un microscopio de epifluorescencia (BX50; Olympus, Tokio, Japón) y se tomaron microfotografías para un análisis cualitativo.

Pruebas comportamentales visualmente guiadas

Test del abismo visual

El test del abismo visual consistió en analizar el comportamiento de los animales en una arena de 30 cm x 40 cm, con un piso de acrílico transparente, debajo del cual había un abismo que dividía a la arena en una mitad superficial y otra mitad profunda. Esta configuración permite analizar el comportamiento ante un abismo sólo perceptible mediante la visión. Para maximizar la percepción del abismo, este fue revestido con un damero blanco y negro. Se colocó una cámara de grabación (Sony DCR-SR60) 1,5 m por encima de la arena para grabar el desplazamiento de los animales. Los ratones se colocaron

cuidadosamente sobre el lado superficial y se los dejó explorar la arena bajo condiciones de luz mesópica (15 lux) durante 7 minutos. Los últimos 5 minutos de exploración fueron analizados con el software DeepLabCut entrenado especialmente para *trackear* el centro de la espalda del ratón en esta arena en particular. Finalmente, se cuantificó la proporción de permanencia en el lado superficial sobre el tiempo total del ensayo.

Test de Looming con Variación de Contrastes (TLVC)

El Test de *looming* con variación de contrastes (TLVC) se diseñó con el objetivo de obtener un test comportamental que permita evaluar en forma individual y cuantitativa la sensibilidad al contraste y el efecto de la SMDT sobre este parámetro. Para ello, se utilizó un *setup* experimental que consistió en una arena construida con una caja de Plexiglás de dimensiones $40 \times 40 \times 40 \text{ cm}^3$. Tres paredes y el suelo de la arena eran opacos, mientras que uno de los lados estaba hecho de Plexiglás transparente para permitir la grabación en video. Un monitor LED colocado en el techo de la arena proyectó los estímulos visuales (Figura 10A). Cada animal recibió múltiples estímulos con diferentes contrastes disco/fondo; se utilizaron 6 niveles de contraste distintos, cada uno repetido 4 veces, lo que resultó en un total de 24 estímulos por animal. Cada estímulo consistió en 3 expansiones sucesivas de un disco oscuro proyectado sobre un fondo gris (con el contraste fijo), una expansión completa del disco se componía de dos fases: (1) el disco se expandía desde un radio inicial ($r = 0$) hasta un radio máximo (15 cm) durante 0,5 segundos; (2) luego, el disco permanecía estático en su expansión máxima durante 0,5 segundos antes de desaparecer. Entre cada expansión del disco, se dejó un intervalo de 0,5 segundos, resultando cada estímulo en una duración total de 4 segundos (Figura 10B). El orden de los 15 estímulos de diferentes contrastes fue aleatorio, y realizado con un programa de computadora de desarrollo propio

diseñado especialmente para este fin y disponible en github.com/SalvadorCalanni/LTCV

(Figura 10C).

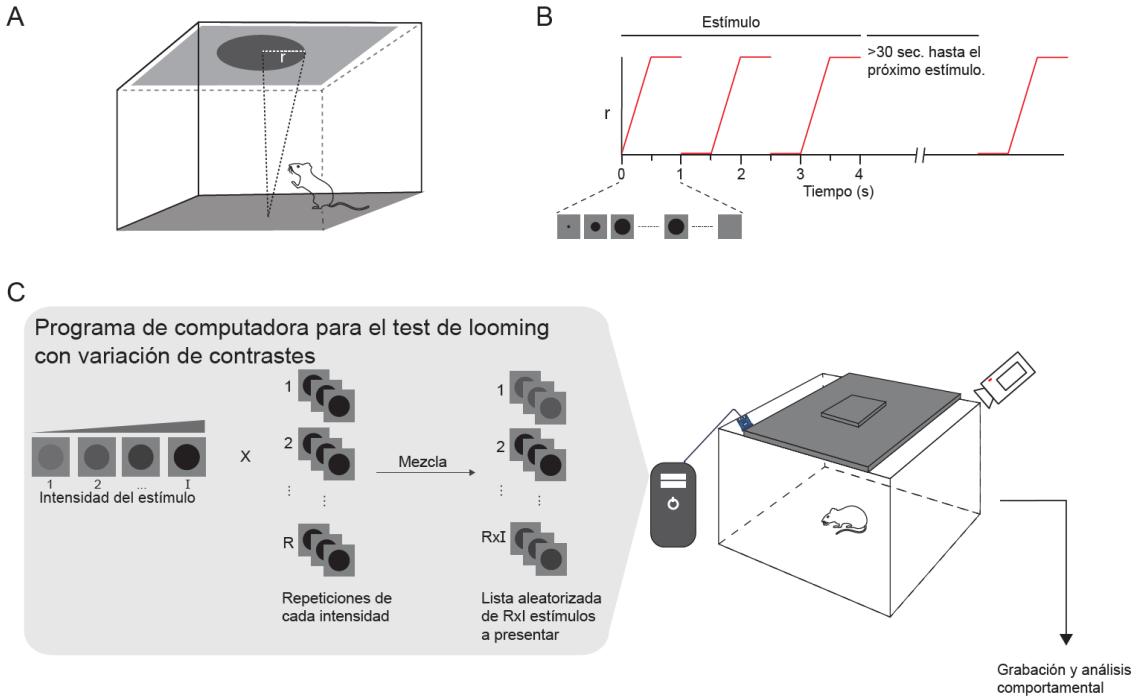


Figura 10. Setup para el estudio de la influencia del contraste en la respuesta al test de looming. A) Representación esquemática de la arena experimental vista en perspectiva. El estímulo *looming* se proyecta desde arriba, en el techo de la caja. El radio (*r*) del disco aumenta con el tiempo, simulando la aproximación de un depredador aéreo. B) Esquema temporal de la presentación del estímulo *looming*. Se muestra cómo *r* creció durante un intervalo determinado, alcanzando un tamaño máximo antes de desaparecer. Un estímulo consistió en tres expansiones consecutivas. Tras un período de al menos 30 segundos sin estímulos, se presentó el siguiente. C) Diagrama del algoritmo de presentación de estímulos con variaciones en el contraste. Se generaron diferentes intensidades de contraste (*I*) entre el disco y el fondo, las que se repitieron varias veces (*R*), resultando en *R x I* estímulos totales. Todos estos estímulos se mezclaron y presentaron en orden aleatorio.

Los contrastes se seleccionaron de tal manera que el más leve evocara una respuesta con una probabilidad menor a 0,05 y que el máximo contraste evocara una respuesta con una probabilidad mayor al 0,95 en ratones macho naïve de entre 60 y 65 días de vida. El nivel de contraste se evaluó midiendo la irradiancia en el centro de la arena mediante un fotómetro. La irradiancia del disco gris completamente expandido (*Id*) se comparó con la irradiancia del fondo (*If*), y se calculó el índice de Michelson (IM) para cuantificar el nivel de contraste utilizando la siguiente fórmula:

$$IM(\%) = (Id - If) * \frac{100}{Id - If}$$

Los animales se habituaron a la sala experimental durante 2 horas sin restricciones de comida ni agua antes de las pruebas. Luego, se colocaron en la arena donde transcurrieron 5 minutos antes de la primera presentación del estímulo. Cada estímulo fue activado manualmente por un operador cuando el animal se encontraba cerca del centro de la arena. Cada sesión experimental (es decir, el tiempo de exploración más la presentación de los 15 estímulos) duró alrededor de 35 minutos. Cada sesión se grabó en video para su posterior análisis. Las grabaciones de las sesiones experimentales fueron analizadas por tres observadores independientes y enmascarados respecto al grupo experimental. El análisis se centró en identificar comportamientos estereotipados en respuesta a los estímulos *looming*.

Evaluación de la expresión de c-fos inducida por estímulo *looming*

Los animales se adaptaron durante 6 horas a la sala experimental con luz tenue; luego se colocaron en la arena del test de *looming*, con el monitor proyectando un fondo gris durante 5 minutos. Este procedimiento se repitió durante 3 días. Al día siguiente, se repitió el mismo procedimiento, pero esta vez, un animal por camada recibió un estímulo *looming* en el máximo contraste al finalizar el período de adaptación de 5 minutos (Figura 11). Una hora después del estímulo, los animales se anestesiaron y perfundieron intracardiacamente. Los cerebros se post-fijaron durante la noche, se crio-protectoron y congelaron, como se describió previamente. Se recolectaron secciones coronales del CS de 40 µm de espesor y se lavaron con PBS, que contenía 0,1% de Triton X-100. Los sitios de unión inespecíficos se bloquearon utilizando suero normal de caballo al 2% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente (23-25°C). Las secciones se incubaron durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-c-fos (1:1000, Millipore). Luego de varios lavados, las secciones se incubaron durante 2 horas con un anticuerpo secundario de burro anti-conejo

conjugado con Alexa 488 (1:500, Invitrogen, Molecular Probes Inc). Los núcleos se tiñeron con Hoechst (1 µg/ml, Sigma Chemical Co.).

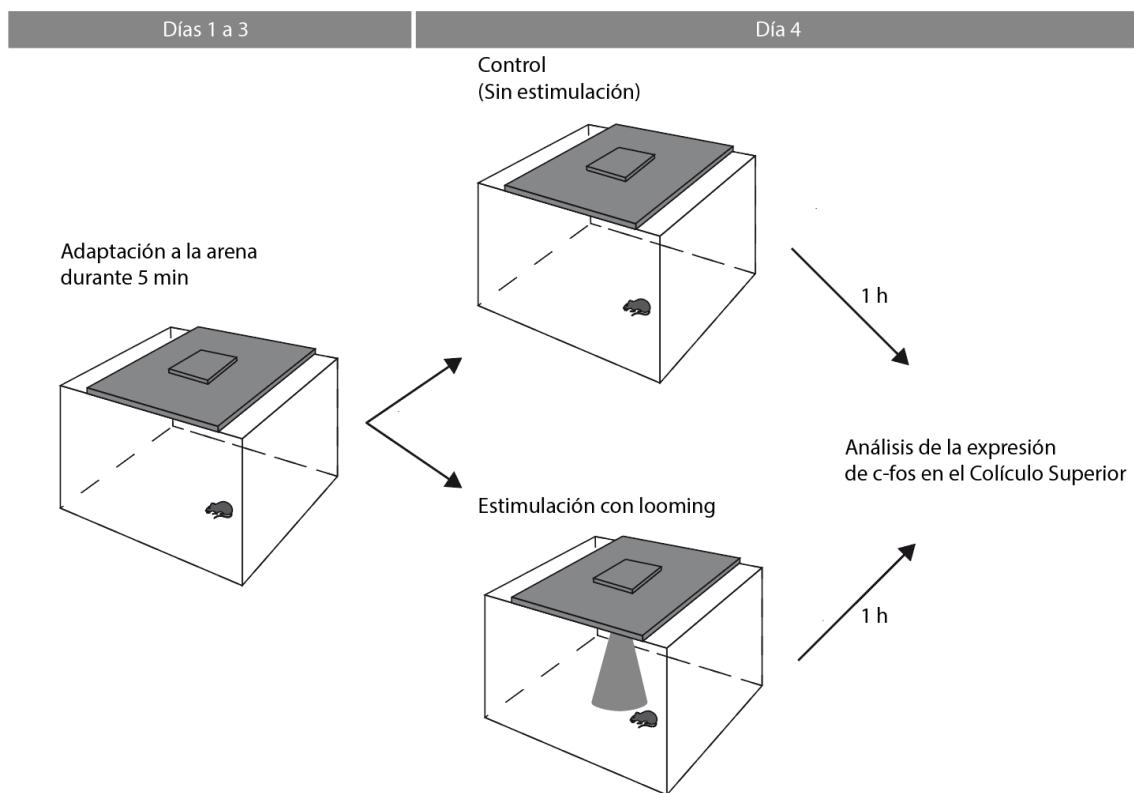


Figura 11. Procedimiento experimental para la evaluación de la expresión de c-fos en el CS de animales sometidos al test de looming. Durante los días 1 a 3, los animales se adaptaron a la arena experimental durante 5 minutos cada día, con el monitor mostrando un fondo gris. En el día 4, los animales se dividieron en dos grupos: un grupo control, que no recibió estimulación, y un grupo que fue expuesto al estímulo al final del período de adaptación de 5 minutos. Una hora después de la exposición al estímulo, se realizó el análisis de la expresión de c-fos en el CS.

Estudios tisulares, celulares y subcelulares de la retina

Obtención del tejido

Bajo anestesia profunda, los animales se perfundieron con 25 ml de solución fisiológica, seguida de 25 ml de solución fijadora (paraformaldehído al 4% en buffer fosfato (PBS) 0,01 M, pH 7,4). Se disecaron cuidadosamente los globos oculares; se realizó una incisión en la córnea para facilitar la difusión de los líquidos y se realizó una post-fijación de 1 hora en la solución fijadora ya mencionada. Posteriormente se disecaron las retinas, separándolas del resto del globo ocular y se realizaron 4 cortes desde la periferia en dirección al NO para

obtener montajes planos. Estas retinas se colocaron sobre papel de aluminio y se congelaron a -80°C hasta su uso en ensayos de inmunomarcación.

Obtención de cortes en parafina

Los globos oculares disecados se post-fijaron en la misma solución fijadora durante toda la noche. Luego, los globos oculares se lavaron en PBS y se deshidrataron a través de pasajes en soluciones crecientes de etanol (70%, 96% y 100%), aclarados en butanol y embebidos en parafina. Se realizaron cortes de 5 µm de espesor en un microtomo Leica, siguiendo el eje sagital. Estos cortes se montaron en portaobjetos con carga electrostática y se utilizaron para tinciones con hematoxilina/eosina, inmunomarcaciones y análisis de células (+) para el ensayo de marcado de final de corte de *dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa* (TUNEL, por sus siglas en inglés).

Estudios histológicos

Inmunofluorescencia en retinas en montaje plano

Luego de extraer las retinas en montaje plano conservadas a -80°C, se removieron cuidadosamente restos de humor vítreo adherido a la retina tras la extracción del cristalino. Las retinas se colocaron en placas de 96 pocillos con un volumen de 200 µl de PBS. Todo el protocolo de inmunomarcación se realizó en la misma placa, manteniéndose las retinas en *free-floating* hasta su montaje. La permeabilización se realizó en Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 30 minutos, seguida de una incubación con solución de bloqueo de sitios inespecíficos, utilizando suero fetal equino normal al 2% durante 60 minutos. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo primario o una combinación de dos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (ver Tabla 1). Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS y se incubó durante 2 horas con un anticuerpo secundario. Luego de otros tres lavados de 10 minutos con PBS, se incubó con

Hoechst 33342 (1 µg/ml, Sigma Chemical Co., EE.UU.) para marcar núcleos. Finalmente, las retinas fueron montadas en portaobjetos con medio de montaje Mowiol.

Inmunofluorescencia en cortes de parafina

Los cortes se trataron con xilol y se rehidrataron en soluciones decrecientes de etanol (100%, 96%, 70%) hasta PBS. La recuperación antigénica se realizó a 90°C durante 30 minutos en buffer citrato (pH 6,3), seguida de una permeabilización con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 20 minutos. Las secciones se incubaron con una solución de bloqueo de sitios inespecíficos utilizando suero fetal equino normal al 2% durante 60 minutos. Luego, se incubaron con un anticuerpo primario o una combinación de dos anticuerpos primarios durante toda la noche a 4°C (Tabla 1). Al día siguiente, se realizaron tres lavados de 10 minutos con PBS y los cortes se incubaron durante 2 h con un anticuerpo secundario. Tras otros tres lavados de 10 minutos con PBS, se agregó Hoechst 33342 (1 µg/ml, Sigma Chemical Co., EE.UU.) para marcar núcleos. Finalmente, se montaron los cortes en portaobjetos con medio de montaje Mowiol.

Anticuerpo	Antígeno	Especie	Dilución	Fabricante	RRID
Sinaptofisina	Sinaptofisina	Conejo	1/500	Abcam Inc.	AB_301417
Brn3a	Factor de transcripción Brn3a	Cabra	1/500	Santa Cruz Biotechnology	AB_2167511
Iba-1	Proteína ligadora de calcio iónico	Conejo	1/1000	Wako Pure Chemical Industri	AB_839504
p65	Subunidad p65 de NF-κB	Ratón	1/200	Santa Cruz Biotechnology	AB_628017
C3	Proteína del complemento 3	Ratón	1/200	Santa Cruz Biotechnology	AB_627277
iNOS	óxido nítrico sintasa	Ratón	1/200	Santa Cruz Biotechnology	AB_627810
IL-1β	interleucina 1 beta	Ratón	1/200	Santa Cruz Biotechnology	AB_627791
4HNE	4-hidroxi-2-nonenal	Ratón	1/200	R&D Systems	AB_664165
Nitrotirosina	Nitrotirosina	Ratón	1/200	R&D Systems	
Anti-cabra	IgG de Cabra	Burro	1/500	Invitrogen Molecular Proves	AB_2534102
Anti-conejo	IgG de Conejo	Burro	1/500	Invitrogen Molecular Proves	AB_2534017
Anti-ratón	IgG de Ratón	Burro	1/500	Invitrogen Molecular Proves	AB_141607

Tabla 1. Tabla de anticuerpos utilizados

Análisis de TUNEL en cortes de parafina

Para la detección de la fragmentación de ADN en células sometidas a apoptosis, se utilizó el kit ApopTag® Fluorescein In Situ Apoptosis Detection (S7110), siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego se incubó con Hoechst 33342 (1 µg/ml, Sigma Chemical Co., EE.UU.) para marcar núcleos. En cada corte de retina se cuantificó el número de células TUNEL (+) a lo largo de toda la retina. Los resultados obtenidos de cuatro secciones independientes por ojo fueron promediados y el valor promedio de seis ojos se registró como el valor representativo para cada grupo experimental.

Análisis de los niveles de anión superóxido mitocondrial en retinas ex vivo en montaje plano.

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se enuclearon los ojos de inmediato. Se removieron la córnea y el cristalino y la retina se incubó con la sonda MitoSOX Red (5 µM, Molecular Probes, EE.UU.) en buffer Ringer para mamíferos durante 15 minutos a 37°C. Posteriormente, se lavó con 0,01 M de PBS, pH 7,4, durante 5 minutos, y se incubó con Hoechst 33342 (1 µg/ml, Sigma Chemical Co., EE.UU.). Luego, se realizó una fijación con paraformaldehído al 4% en PBS 0,01 M, pH 7,4, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó nuevamente con PBS 0,01 M, pH 7,4, y se disecó la retina, separándola del NO, el epitelio pigmentario y la coroides, realizando 4 cortes desde la periferia hacia el disco óptico para lograr un montaje plano. Las retinas se montaron en portaobjetos utilizando medio de montaje Mowiol. Las muestras se observaron con microscopio confocal entre 2 y 5 horas después del montaje. Para la cuantificación, se asumió que una marca homogénea alrededor de un núcleo correspondía a mitocondrias marcadas de una célula. Se cuantificó la cantidad de células Mitosox (+) cada 100 núcleos.

Procesamiento de imágenes

Cuantificación de la intensidad de inmunofluorescencia en el eje vertical de cortes transversales de retina

Se obtuvieron imágenes confocales a una distancia aproximada de 1 mm del NO. Las imágenes de 1024 x 1024 píxeles, se recortaron de manera que abarcaran desde la capa de células ganglionares (CCG) hasta la capa nuclear externa (CNE). Posteriormente, se utilizó la librería Numpy de Python para calcular la media de la intensidad de fluorescencia a lo largo del eje, generando un perfil de intensidad promedio por fila como se muestra en la Figura 12.

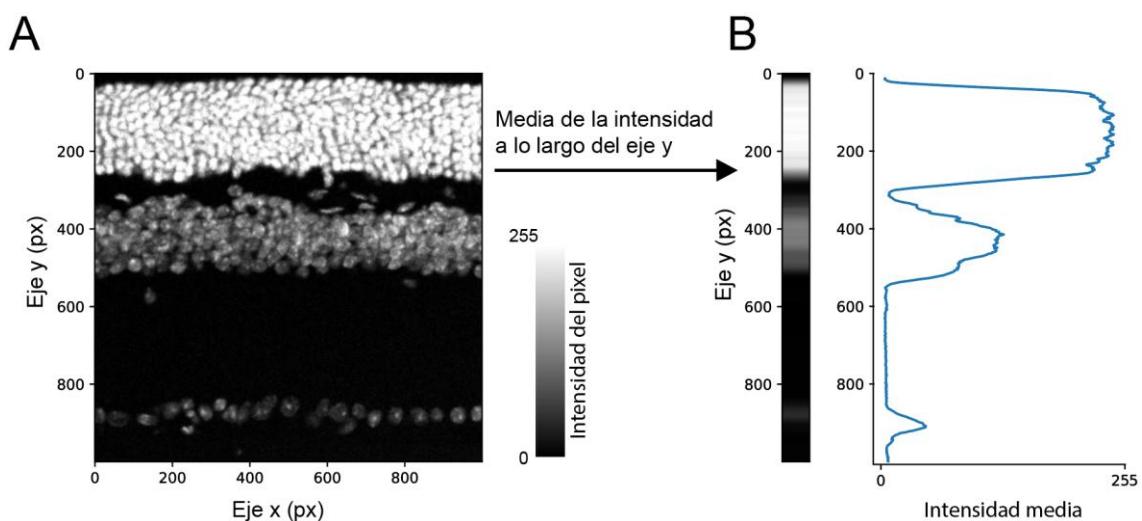


Figura 12. Perfiles de intensidad de fluorescencia en cortes transversales de retina. A) Recorte de una microfotografía confocal de 1024 x 1024 px de un corte transversal de retina teñido con Hoechst. B) Gráfico que representa la media de la intensidad de inmunofluorescencia a lo largo del eje y mostrando la distribución de la intensidad promedio en función de la posición vertical en el corte. Este análisis permite visualizar la variación de la señal de inmunofluorescencia a lo largo del espesor de la retina.

Cuantificación del número de CGR en retinas en montaje plano

Se obtuvieron imágenes de áreas de $0,09 \text{ mm}^2$ de retinas en montaje plano, utilizando un microscopio de epifluorescencia. Las CGR se identificaron con un marcador específico de este tipo celular, el factor de transcripción Brn3a. Se tomaron 4 imágenes equidistantes a 1,2 mm del disco óptico. Para determinar la cantidad de CGR por imagen, se cuantificó manualmente el número de células Brn3a (+) en cada una usando el software ImageJ.

Posteriormente, se calculó el promedio del conteo de las 4 imágenes para obtener un número final. En algunos casos, además de la cantidad de CGR a 1,2 mm del NO, se analizó la cantidad a distancias de 0,2 mm y 2,2 mm, como se indica en la Figura 13.

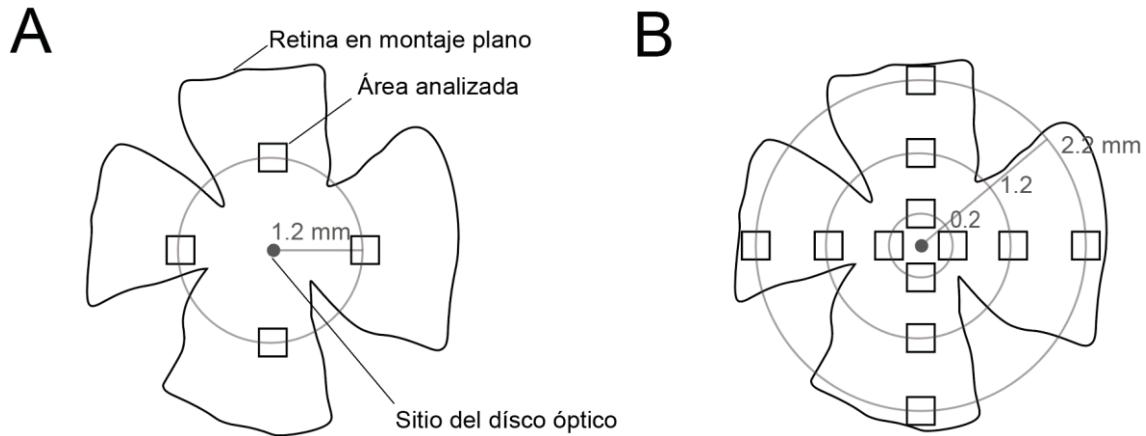


Figura 13. Esquemas de retinas en montaje plano. A) Esquema de una retina en montaje plano que muestra las áreas analizadas para la cuantificación de la densidad de CGR. Las imágenes se tomaron a una distancia de 1,2 mm del disco óptico, en ubicaciones equidistantes alrededor de la retina. Cada área analizada está indicada por un recuadro. B) Diagrama que representa el análisis adicional del número de CGR a diferentes distancias desde el disco óptico. Además de la distancia de 1,2 mm, también se analizaron a distancias de 0,2 mm y 2,2 mm del disco óptico. Los círculos indican las diferentes distancias desde el centro y los recuadros muestran las áreas seleccionadas para la cuantificación de células en cada ubicación.

Análisis morfométrico de células microgliales en retinas en montaje plano.

Se realizaron microfotografías confocales de retinas en montaje plano teñidas con Hoechst e inmunomarcadas con Iba-1. Utilizando la tinción con Hoechst como referencia (Figura 14), se identificó la capa de células ganglionares y se generaron *stacks* de microfotografías confocales desde la aparición de la señal de los núcleos de la capa de células ganglionares hasta la desaparición de dicha señal, cubriendo una profundidad de aproximadamente 15 μm , con una distancia de 1 μm entre *stacks*. Los *stacks* obtenidos se proyectaron, resultando en imágenes que contenían las células Iba-1 (+) presentes en la capa de células ganglionares.

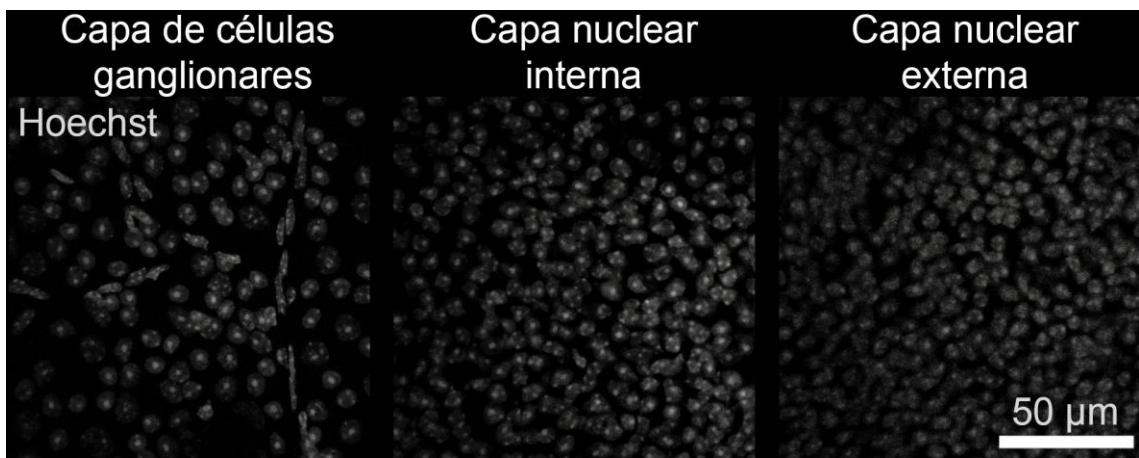


Figura 14. Densidad nuclear característica de cada capa retiniana. Imágenes representativas de la distribución de la tinción con Hoechst en las diferentes capas nucleares de la retina. La imagen muestra la distribución típica de los núcleos en la capa de células ganglionares, la capa nuclear interna y la capa nuclear externa, lo que permitió una correcta identificación de la localización de las imágenes obtenidas.

Para cuantificar el tamaño del soma, la circularidad y realizar el análisis de Sholl, se aplicó un umbral para obtener imágenes binarias y se recortaron las células microgliales, de modo que cada célula pudiera visualizarse individualmente. Para cada célula, se calculó manualmente el área del soma y la circularidad utilizando las herramientas disponibles en el software ImageJ. El análisis de Sholl se llevó a cabo utilizando el *plugin* Neuroanatomy de ImageJ.

Análisis de la intensidad de fluorescencia de marcadores inflamatorios en células microgliales

Para el análisis de marcadores inflamatorios en células microgliales, se utilizaron retinas en montaje plano co-incubadas con anticuerpos anti-Iba-1 y anti-subunidad p65 de NF-κB, C3, óxido nítrico sintasa-2 (NOS-2) o interleuquina (IL)-1 β . Se obtuvieron microfotografías confocales a la altura de la capa de células ganglionares, como se describió en la sección anterior, para reconstruir las células microgliales a partir de los z-stacks. Para cuantificar la intensidad de los marcadores inflamatorios en zonas específicas (Iba-1 (+) o Hoechst (+)) se

crearon máscaras binarias y se analizó la intensidad de marca en estas áreas utilizando la librería Numpy de Python (Figura 15).

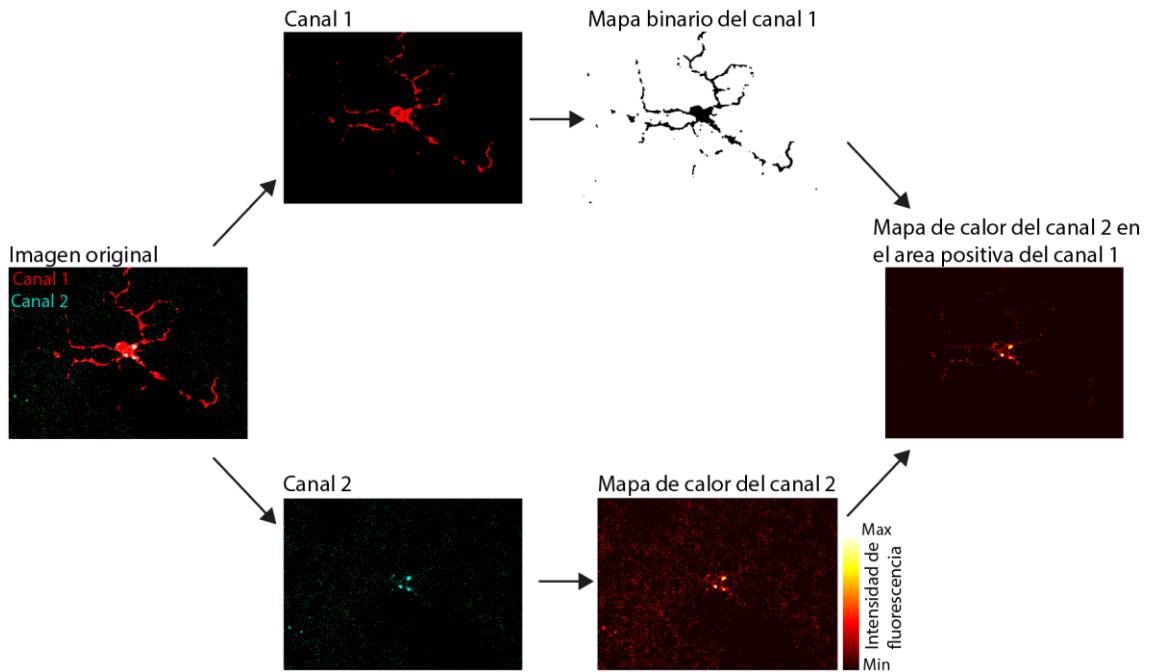


Figura 14. Procedimiento empleado para cuantificar la intensidad de fluorescencia de marcadores inflamatorios en células microgliales. Inicialmente, a partir de la imagen original, se separan los canales correspondientes a los distintos marcadores. Se genera una máscara binaria del canal 1 (Iba-1 o Hoechst), que permite identificar el área positiva para las células microgliales o los núcleos. Luego, la intensidad del canal 2 (marcador inflamatorio) se midió exclusivamente dentro del área definida por la máscara del canal 1. Esta medición se representa mediante un mapa de calor, indicando las zonas con diferente intensidad de fluorescencia.

Para cuantificar los núcleos positivos para p65, se construyó una máscara binaria utilizando el canal de Hoechst y se analizó la intensidad de p65 dentro del área positiva para Hoechst. Sólo se analizaron los núcleos de células Iba-1 (+). Se eligió arbitrariamente un umbral de positividad para los núcleos p65 (+). Para cuantificar la inmunorreactividad de C3, NOS-2 e IL-1 β en células Iba-1 (+), se construyó una máscara binaria utilizando el canal de Iba-1, y la intensidad de los marcadores proinflamatorios se midió exclusivamente en el área positiva para Iba-1 (+).

Western blot

Se sacrificaron los animales y se extrajeron las retinas. Cada retina se homogeneizó en 100 µl de buffer contenido 10 mM de HEPES, 1 mM de EDTA, 1 mM de EGTA, 10 mM de KCl y 0,5% de Tritón (v/v), pH 7,9, con un cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma, EE.UU.). Los homogenatos se incubaron durante 15 minutos a 4°C, se agitaron durante 15 segundos y posteriormente se centrifugaron a 900 g por 10 minutos. Los sobrenadantes se emplearon para la cuantificación de proteínas. Se separaron 100 µg de proteína por muestra por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% con dodecilsulfato sódico. Las proteínas se transfirieron a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF, por sus siglas en inglés) durante 90 minutos a 100 V utilizando un sistema Bio-Rad Trans-Blot SD (Bio-Rad, EE.UU.). Posteriormente, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% en buffer Tris (pH 7,4) con 0,1% de Tween-20 durante 60 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se incubaron a 4°C durante toda la noche con anticuerpos primarios: anti-Brn3a (1:500; Santa Cruz Biotechnology, RRID: AB_2167511) o anti-sinaptofisina (1:500; Abcam Inc., RRID: AB_301417). Luego, se lavaron con buffer Tris (pH 7,4) y 0,1% de Tween-20 e incubaron durante 2 horas con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:2000, Bio-Rad). Las bandas se visualizaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sistema de análisis de Western Blotting (Amersham, Argentina). Para el control interno de carga, los resultados se refirieron a los niveles de β-actina, detectados mediante un anticuerpo policlonal anti-β-actina de conejo (1:2000, Sigma, EE.UU.). Las membranas se escanearon y la intensidad de las bandas se cuantificó con el software ImageJ. Los valores se expresaron como unidades arbitrarias normalizadas a los niveles de β-actina.

La concentración de proteínas se determinó mediante el método de Lowry y col. (1951), utilizando albúmina sérica bovina como estándar.

Análisis estadístico

Modelos lineales mixtos

Para comparar las distintas variables analizadas entre grupos experimentales, se evaluó la normalidad de los datos utilizando el test de Shapiro-Wilks. Posteriormente, se implementaron modelos lineales mixtos utilizando el paquete *lme4* del software R (excepto para el TLVC, cuyo análisis se describe más adelante). Las variables fijas utilizadas fueron: Grupo (control o SMDT), Tratamiento (mifepristona o vehículo; BLZ945 o vehículo; melatonina o sham; AS o AE), sexo y edad. Dado que las variables Grupo y Tratamiento no se comportaron de manera independiente, también se incluyó el término de interacción Grupo*Tratamiento en los modelos utilizados. Cada camada fue considerada una unidad experimental. Para evitar el uso de pseudo-rélicas, en los casos en los que se utilizó más de un animal por camada para medir un mismo parámetro, la camada se incluyó como variable aleatoria. Asimismo, cuando se realizaron múltiples mediciones del mismo parámetro por animal (por ejemplo, un electrorretinograma por ojo o la circularidad de varias células microgliales de la misma retina), el animal también se consideró como variable aleatoria. Se realizaron análisis de la varianza (ANOVA) sobre estos modelos lineales y, para aquellas variables que explicaron una porción significativa de la varianza, se realizaron contrastes entre grupos utilizando el test de Tukey.

Modelos lineales generalizados mixtos

Para evaluar el efecto de la intensidad del contraste y otras variables experimentales en la proporción de respuestas en el TLVC, se utilizó un modelo lineal generalizado mixto (GLMM, por sus siglas en inglés). Dicha respuesta se modeló como una distribución binomial con una función de enlace *logit*. El modelo se construyó utilizando la librería de R *glmmTMB*, que

permite incorporar efectos aleatorios al modelo. Esto fue necesario ya que se evaluó la respuesta de cada animal en múltiples ocasiones. La variable dependiente fue la frecuencia de respuestas, calculada como el cociente de la cantidad de respuestas positivas sobre la cantidad de estímulos de un contrate determinado.

Los efectos fijos considerados fueron:

- Intensidad del contraste (medida independiente), predictor continuo.
- Grupo experimental (control o SMDT), variable categórica.

Y, según el caso:

- Tratamiento (mifepristona, melatonina, BLZ945, AE35 o AE45), variables categóricas representando los diferentes tratamientos utilizados.
- Término de interacción entre el grupo experimental y el tratamiento correspondiente, para tener en cuenta la contribución de las posibles interacciones entre estos factores.

Además, se incluyó a cada animal como un efecto aleatorio, que permite tener en cuenta la variabilidad individual que aporta cada animal a lo largo del ensayo.

Por lo tanto, en términos matemáticos el modelo puede describirse como:

$$\begin{aligned} \text{Logit}(P_i) = & \beta_0 + \beta_{\text{Contraste}} * \text{Contraste}_i + \beta_{\text{Grupo}} * \text{Grupo}_i + \beta_{\text{Sexo}} * \text{Sexo}_i \\ & + \beta_{\text{Tratamiento}} * \text{Tratamiento}_i + \beta_{\text{Grupo}} * \text{Sexo} * (\text{Grupo}_i \\ & * \text{Sexo}_i) + \beta_{\text{Tratamiento}} * \text{Sexo} * (\text{Tratamiento}_i * \text{Sexo}_i) \\ & + u_{\text{animal}_i} \end{aligned}$$

Donde:

- P_i es la probabilidad de respuesta para la observación i .
- β_0 es la constante del modelo (el valor esperado cuando todos los predictores son cero).
- $\beta_{\text{Contraste}}$ es el coeficiente del predictor continuo 'Contraste'.
- β_{Grupo} es el coeficiente asociado al efecto del grupo.

- β_{Sexo} es el coeficiente asociado al sexo del animal.

- $\beta_{\text{Tratamiento}}$ es el coeficiente asociado al tratamiento recibido.

- u_{animal_i} es el término de efecto aleatorio para el animal correspondiente a la observación i , que representa la desviación del animal respecto al valor promedio de la población. Este término modela la variabilidad no explicada entre individuos, asumiendo que dicha variabilidad sigue una distribución normal con media cero y una varianza estimada por el modelo. El modelo se ajustó utilizando el método de máxima verosimilitud, y los supuestos (normalidad de los residuos, homocedasticidad, independencia de los residuos y ajuste del modelo) se evaluaron mediante diagnósticos de residuos utilizando el paquete DHRMa. La selección del mejor modelo se llevó a cabo mediante una estrategia “bottom up”, comenzando con el modelo más simple y añadiendo términos de complejidad, para luego comparar los valores del Criterio de Información de Akaike AIC de los modelos candidatos. Posteriormente, se realizó un ANOVA entre los modelos para evaluar diferencias significativas en la varianza explicada. Finalmente, el mejor modelo se seleccionó con base en estos resultados. Con el modelo seleccionado, se realizaron comparaciones entre grupos utilizando el paquete *emmeans* para detectar posibles diferencias significativas entre ellos.

Cálculo de C50

El valor de C50, es decir, el valor del contraste necesario para evocar una respuesta positiva con un 50% de probabilidad, se calculó para cada animal. En la escala del logit, una probabilidad de 0,5 corresponde a un valor de 0 (porque $\text{logit}(0,5)=0$).

Entonces, para una probabilidad del 50%, la ecuación del modelo se reduce a:

$$\begin{aligned}
0 = & \beta_0 + \beta_{Contraste} * C50 + \beta_{Grupo} * Grupo_i + \beta_{Sexo} * Sexo_i \\
& + \beta_{Tratamiento} * Tratamiento_i + \beta_{Grupo} * Sexo * (Grupo_i \\
& * Sexo_i) + \beta_{Tratamiento} * Sexo * (Tratamiento_i * Sexo_i) \\
& + u_{animal_i}
\end{aligned}$$

Despejando el término C50,

$$\begin{aligned}
C50 = & -(\beta_0 + \beta_{Grupo} * Grupo_i + \beta_{Sexo} * Sexo_i + \beta_{Tratamiento} \\
& * Tratamiento_i + \beta_{Grupo} * Sexo * (Grupo_i * Sexo_i) \\
& + \beta_{Tratamiento} * Sexo * (Tratamiento_i * Sexo_i) \\
& + u_{animal_i}) / \beta_{Contraste}
\end{aligned}$$

RESULTADOS

I. Desarrollo de un método para evaluar cuantitativamente la sensibilidad al contraste: Test de *Looming* con Variación de Contrastes (TLVC)

Desde hace varias décadas, nuestro laboratorio ha estudiado la función visual normal y patológica en diversos modelos experimentales. En todos estos casos, se han utilizado diversas técnicas que de diferentes maneras, permiten obtener información sobre la función retiniana. Sin embargo, la función visual es mucho más compleja que sólo la respuesta de la retina, e involucra centros cerebrales superiores. En este contexto, en el marco del objetivo central de esta tesis, es decir, el estudio del efecto de EVT sobre la función visual, se consideró de interés desarrollar un método basado en un test comportamental dependiente de la visión, que permita obtener resultados cuantitativos de la sensibilidad al contraste, un aspecto central en la visión, considerada en un sentido amplio. Para ello, se realizaron modificaciones al test de *looming*, un test validado en diferentes especies y que, en particular en roedores, permite evaluar la respuesta frente a una amenaza virtual que simula la aproximación de depredadores aéreos y sólo depende de la visión. En este contexto, como se describirá a continuación, se desarrolló el test de *looming* con variación de contrastes (TLVC).

Evaluación del sistema experimental y modelado de los datos

En la sección de Materiales y Métodos se describió la arena utilizada para este ensayo y el método para la aplicación de los estímulos que desencadenan una respuesta comportamental inducida por una amenaza virtual. La Figura 16 muestra la proporción del tipo respuestas de ratones macho adultos jóvenes, visualmente intactos, observadas en función de la variación de contrastes disco/fondo. Los animales exhibieron tres comportamientos estereotipados ante el estímulo de *looming*: *rearing* (levantamiento, el

animal se yergue sobre las patas traseras, adoptando una postura exploratoria hacia el estímulo), *freezing* (inmovilidad, detención súbita de la actividad exploratoria en la arena) y *running* (huida, escape rápido hacia una de las esquinas). Frente a altos niveles de contraste, la respuesta predominante fue el *freezing*, mientras que a contrastes bajos prevaleció el *rearing* (Figura 16).

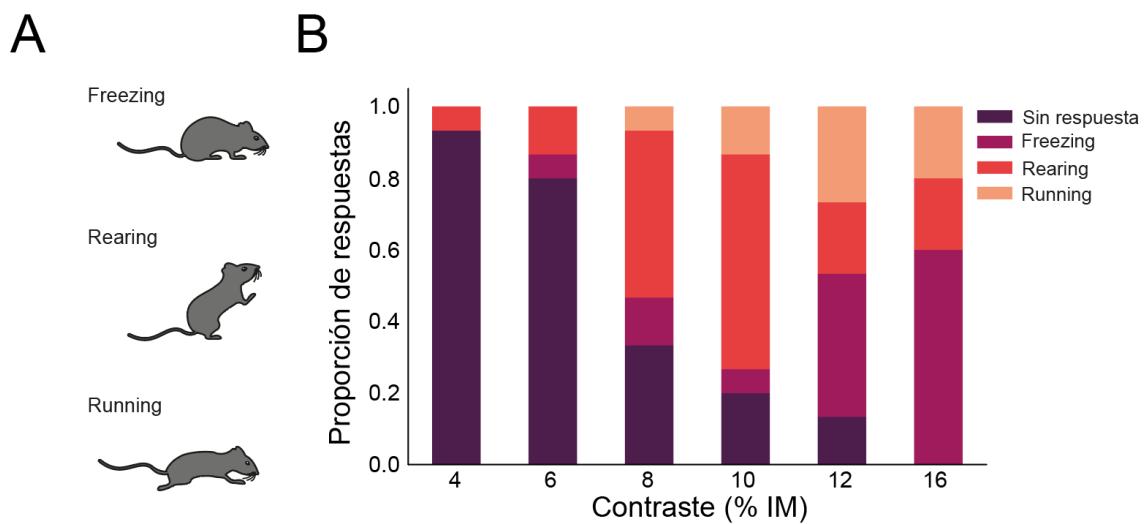


Figura 16. Distribución de la proporción de respuestas estereotipadas observadas en el TLCV. A) Esquema de los distintos tipos de respuestas estereotipadas frente al estímulo *looming*. B) Distribución de la proporción de las respuestas observadas en función de la magnitud del contraste disco/fondo.

Con el fin de estimar la sensibilidad al contraste, utilizamos las respuestas estereotipadas de los animales como indicador de su capacidad para percibir el estímulo. De este modo, si un animal no alteró su comportamiento frente al estímulo, se asumió que no fue capaz de detectarlo. Por el contrario, se consideró que el animal percibió el estímulo cuando respondió adoptando alguna de las comportamientos estereotipados descriptos en la Figura 16. De esta forma, calculamos la frecuencia de respuesta para cada magnitud de contraste. En la Tabla 2 se presenta, a modo de ejemplo, el análisis comportamental obtenido mediante el TLCV para un ratón macho, ilustrando el cálculo de la frecuencia de respuesta ante cada uno de los estímulos.

Réplica	Contraste (% IM)					
	4	6	8	10	12	16
1°	No responde	No responde	No responde	No responde	Running	Freezing
2°	No responde	No responde	No responde	Freezing	No responde	Running
3°	No responde	Rearing	No responde	No responde	Rearing	Freezing
4°	No responde	No responde	Rearing	No responde	Freezing	Freezing
Respuestas	0	1	1	1	3	4
Frecuencia	0	0,25	0,25	0,25	0,75	1

Tabla 2. Datos crudos (ordenados en función de la magnitud del contraste) y frecuencia de respuesta para un ratón macho de 60 días de edad.

Luego de obtener los datos del TLVC y cuantificar la frecuencia de respuesta, se procedió a modelar la sensibilidad al contraste, mediante el ajuste de un GLMM con función de enlace logit (ver Materiales y Métodos). Esta función, propia del modelo logístico, permite mapear el rango de valores de contraste a una probabilidad entre 0 y 1. Dicha probabilidad representa la frecuencia de respuesta observada, de modo que, para niveles muy bajos de contraste, la función tiende a valores cercanos a 0, mientras que se aproxima a 1 para altos contrastes. Por lo tanto, este tipo de modelado proporciona un ajuste matemático apropiado para la relación entre la magnitud del contraste y la frecuencia de respuesta, permitiendo la estimación de los umbrales de sensibilidad al contraste en cada individuo.

Como parámetro de sensibilidad al contraste, se calculó el valor de contraste para el cual la frecuencia de respuesta fuera igual a 0,5 (C50); es decir, el contraste al que la probabilidad de respuesta alcanza el 50%. Para ello, se “aprovechó” la propiedad de la función logit según la cual $\text{logit}(0,5) = 0$. Conociendo los parámetros obtenidos del GLMM, se determinó el C50 para cada animal (como se describe en Materiales y Métodos), como un parámetro que proporciona un índice cuantitativo de la sensibilidad al contraste de cada individuo. En la Figura 17A se muestran datos individuales provenientes de cuatro ratones macho adultos, junto con las predicciones del modelo para cada uno de ellos y para el grupo

en su conjunto. El individuo identificado como “Animal 1” es el mismo ejemplar mostrado en la Tabla 2. Además, en la Figura 17B se representan los valores de C50 calculados para cada animal y para el total del grupo.

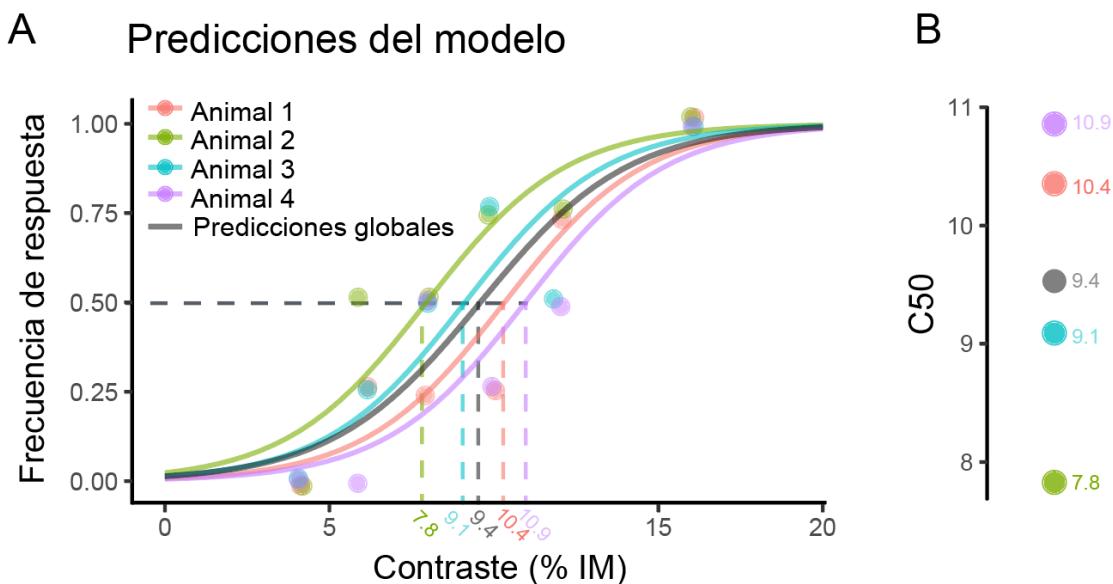


Figura 17. Ejemplos de resultados y análisis de los datos para el TLVC. A) Frecuencia de respuesta en función de la magnitud del contraste para cuatro ratones elegidos al azar. Cada punto representa la frecuencia de respuesta del animal correspondiente a un nivel de contraste particular. Las curvas representan las predicciones del modelo. B) Valores de C50 obtenidos de las curvas representadas en el panel A.

Estudio de la influencia del sexo y la edad en la respuesta al TLVC

Dado que en el estudio de los efectos visuales de la exposición a SMDT se analizarán las respuestas comportamentales guiadas por la visión en ambos性es y diferentes edades, en la siguiente serie de experimentos se analizó si el TLVC resulta suficientemente sensible para revelar variaciones etológicamente relevantes en la sensibilidad al contraste en función de estos parámetros. Para ello, se realizaron ensayos con cuatro grupos de animales: ratones hembra y macho adultos (aproximadamente 60 días de edad) y hembras y machos viejos (alrededor de 180 días de edad). Una vez realizados los ensayos en el TLCV y analizados los videos, se procedió a encontrar el mejor modelo que ajuste a los datos. Luego del proceso de selección de modelos “bottom up”, el GLMM utilizado para describir los datos obtenidos fue el siguiente (ver Materiales y Métodos):

$$Logit(P_i) = \beta_0 + \beta_{Contraste} * Contraste_i + \beta_{Sexo} * Sexo_i + \beta_{Edad} * Edad_i \\ + u_animal_i$$

Inicialmente, se consideró el término de interacción entre las variables sexo y edad, pero su inclusión no mejoró significativamente la capacidad del modelo para explicar la variabilidad en los datos. Por lo tanto, para mantener un modelo más parsimonioso y evitar la complejidad innecesaria, se optó por no incluir dicho término de interacción en el modelo final. Los resultados del proceso de selección de modelos pueden observarse en la Tabla 3.

Selección de modelos "bottom up"						
Construcción del modelo			anova entre modelos (Test: Chisq)			
	Variables	AIC	Modelo	Resid df.	Dev Resid.	df Desviancia Pr(>Chi)
Modelo 1	Contraste	367	Modelo 1	166	200,42	
Modelo 2	Contraste + Sexo	312	Modelo 2	165	192,97	1 7,45 0,006
Modelo 3	Contraste + Sexo + Edad	308	Modelo 3	164	137,34	1 55,63 <0.0001

Tabla 3. Se muestra el proceso de selección de modelos mediante una estrategia “bottom up”, partiendo de un modelo inicial con la menor cantidad de variables y añadiendo gradualmente nuevas variables para mejorar el ajuste. A la izquierda se presentan las variables incluidas en cada modelo, junto con el criterio de Información de Akaike (AIC) de cada modelo, indicando que a medida que se incorporan factores adicionales (sexo y luego edad), el valor de AIC disminuye, sugiriendo un mejor equilibrio entre ajuste y complejidad del modelo. A la derecha, se muestra la comparación entre modelos sucesivos que se llevó a cabo mediante un ANOVA con prueba de chi-cuadrado (Chisq). Se presentan los grados de libertad residuales (Resid df.), la desviancia residual (Dev Resid.) y el resultado de la comparación entre modelos consecutivos (df, Desviancia, Pr(>Chi)). Los valores de *p* indican diferencias significativas entre los modelos al añadir una nueva variable, lo que respalda la inclusión de estas variables en el modelo final. De esta manera, se justifica la selección del modelo más complejo (Modelo 3) debido a un mejor ajuste a los datos.

El mejor modelo seleccionado (modelo 3 de la Tabla 3) se utilizó para analizar las posibles diferencias entre los grupos experimentales en la respuesta al TLVC. Para ello, se realizaron comparaciones entre los grupos, calculando las medias marginales estimadas (*emmeans*, por sus siglas en inglés) y luego se realizaron comparaciones entre las *emmeans* de cada grupo, mediante el test de Tukey (Tablas 4 y 5). La respuesta al TLVC fue significativamente mayor en hembras adultas que en machos adultos, en machos adultos que en machos

envejecidos, y en hembras adultas que en hembras envejecidas, en tanto que no se observaron diferencias entre machos y hembras viejas.

Medias marginales para el mejor modelo					
Efectos fijos		emmean	ES	LCI	UCI
Hembra	Adulta	0,75	0,04	0,68	0,82
Macho	Adulto	0,56	0,05	0,45	0,61
Hembra	Vieja	0,33	0,04	0,25	0,41
Macho	Viejo	0,27	0,03	0,21	0,33

Tabla 4. Medias marginales para el mejor modelo. La Tabla presenta las medias marginales obtenidas para el mejor modelo estadístico, con el que se evaluó la influencia del sexo y la edad sobre el desempeño en el TLVC. Se muestran las medias marginales estimadas (*emmean*), sus errores estándar (ES) y los límites inferior (LCI) y superior (UCI) de los intervalos de confianza al 95%.

Contrastes de las <i>emmeans</i>				
Efectos fijos		Odds. ratio	ES	p
H Adulta	M Adulto	2,05	0,34	0,009
J Adulto	H Vieja	4,79	1,06	<,0001
M Adulto	M Viejo	7,78	2,38	<,0001
M Adulto	H Vieja	2,99	0,9	<,0001
M Adulto	M Viejo	4,79	1,06	<,0001
H Vieja	M Viejo	1,62	0,34	0,09

Tabla 5. Contrastes entre medias marginales. Se muestran los contrastes pareados entre cuatro grupos de ratones definidos por la combinación de sexo (H = hembras, M = machos) y edad (Adulta/o o Vieja/o). En la columna "Efectos fijos" se indica el par de grupos comparados. La columna "odds.ratio" muestra la razón de probabilidades entre dichos grupos: un valor mayor que 1 indica una mayor probabilidad relativa de respuesta en el primer grupo respecto al segundo. La columna error estándar (ES) expresa la incertidumbre en la estimación del odds ratio. El valor de *p* indica el nivel de significación estadística tras el ajuste por comparaciones múltiples (test de Tukey).

La Figura 17 muestra el desempeño de estos grupos experimentales en el TLCV, así como los valores de C50.

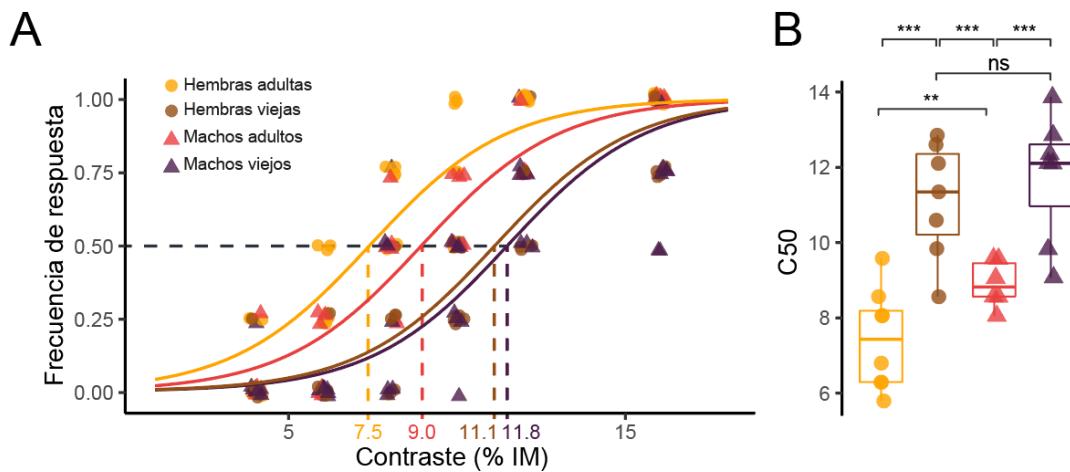


Figura 17. Respuesta al TLCV según sexo y edad. A) Frecuencia de respuesta en función de la magnitud del contraste para ratones macho adultos, hembras adultas, machos viejos y hembras viejas. Cada punto representa la proporción de respuestas de un animal individual para una magnitud de contraste específica y la línea representa las predicciones del GLM para todo el grupo. El C50 grupal también se indica en el gráfico. B) Cada punto representa el C50 de un solo animal. Las comparaciones entre grupos se llevaron a cabo como se indica en la Tabla 4. Los valores de p asociados se presentan sobre los gráficos de C50 para mayor claridad.
** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, $n = 6-7$ ratones/grupo.

La Tabla 6 presenta los valores promedio de C50, acompañados de métricas de dispersión, para los grupos experimentales. Los desvíos estándar (DE) oscilaron entre un 7% (machos adultos) y un 18% (hembras adultas) con respecto a la media de cada grupo. En cuanto a los errores estándar (ES), que cuantifican la precisión de las medias estimadas, se observaron valores entre 0,25 (machos adultos) y 0,64 (machos viejos).

Grupo	Promedio C50	DE	Promedio C50 /DE	ES
H Adulta	7,45	1,33	0,18	0,47
M Adulto	8,92	0,61	0,07	0,25
H Vieja	11,1	1,6	0,14	0,59
M Viejo	11,8	1,7	0,14	0,64

Tabla 6. Promedio y estimadores de dispersión para los grupos experimentales. Se muestran las medias del C50 para cada grupo, el desvío estándar (DE) y la proporción de la media que éste representa. También se muestra el error estándar (ES), un indicador de la precisión de las medias estimadas.

Contribución diferencial de distintos tipos de fotorreceptores en la respuesta al estímulo *looming*

Como se mencionó anteriormente, el estímulo *looming* ha sido un paradigma que contribuyó a identificar circuitos neuronales involucrados en la detección y la respuesta a estímulos amenazantes. Sin embargo, los circuitos neuronales retinianos involucrados en la detección de este estímulo no han sido completamente elucidados. De hecho, se desconoce cuál es la contribución de cada tipo de fotorreceptor retiniano en la detección del estímulo *looming*. Para disecar la contribución de cada uno de los tipos de fotorreceptores en la respuesta innata al estímulo, y en colaboración con el Dr. Marcos Aranda, Departamento de Neurobiología de la Universidad de Northwestern, EE.UU., se analizó el impacto de la eliminación selectiva de diferentes tipos de fotorreceptores en ratones transgénicos. Se emplearon diversas cepas transgénicas que permiten eliminar selectivamente bastones, conos y/o células ipCGR sin inducir degeneraciones retinianas inespecíficas (Altimus y col., 2020). Para ello, se probaron genotipos apareados por sexo y edad:

- WT (control, con bastones, conos e ipCGR intactas)
- RKO (con conos e ipCGR intactas, sin bastones)
- C only (sin bastones ni melanopsina, preservando únicamente conos funcionales)
- CKO (con bastones e ipCGR intactas, sin conos)
- R only (sin conos ni melanopsina, sólo bastones)
- M only (sin conos ni bastones, sólo ipCGR)
- TKO (sin bastones, sin conos y sin ipCGR).

En la Tabla 7 se muestra que la variable genotípica explica una porción significativa de la varianza en la respuesta al TLVC en estos animales.

Selección de modelos "bottom up"						
Construcción del modelo			anova entre modelos (Test: Chisq)			
	Variables	AIC	Modelo	Resid df.	Dev Resid.	df
Modelo 1	Contraste	548	Modelo 1	208	467,62	
Modelo 2	Contraste + Genotipo	262	Modelo 2	202	169,44	6
					298,2	<0,0001

Tabla 7. Proceso de selección de modelos de animales transgénicos. El Modelo 2, que incluye la variable genotipo explica una cantidad significativa de varianza, que justifica su inclusión en el análisis.

En la Tabla 8 se muestran los contrastes entre los distintos genotipos para el mejor modelo (modelo 2, Tabla 7). Los grupos con conos (WT, RKO y sólo Conos) mostraron similares *emmeans*. Los grupos sin conos, pero con bastones (CKO y sólo bastones) mostraron *emmeans* similares entre sí, pero más bajas que los grupos con conos. Finalmente, el grupo sin conos ni bastones, pero con ipCGR presentó una *emmean* aún más baja que los grupos sin conos, pero distinta de cero.

Medias marginales para el mejor modelo					
Efectos fijos		<i>emmean</i>	ES	LCI	UCI
Genotipo	WT	0,67	0,04	0,54	0,78
	RKO	0,66	0,06	0,45	0,81
	C only	0,63	0,04	0,51	0,73
	CKO	0,15	0,06	0,08	0,26
	R only	0,09	0,05	0,03	0,23
	M only	0,01	0,02	0,01	0,03
	TKO	0	-	-	-

Tabla 8. Medias marginales para el mejor modelo. Se muestran las medias marginales obtenidas para el mejor modelo estadístico, con el que se evaluó el efecto del genotipo sobre el desempeño en el TLVC. Se muestran las medias marginales estimadas (*emmeans*), el error estándar ES y los límites inferior (LCI) y superior (UCI) de los intervalos de confianza al 95%.

En la Figura 18 se observan los datos individuales para cada animal junto con las predicciones del modelo y el C50 para cada grupo.

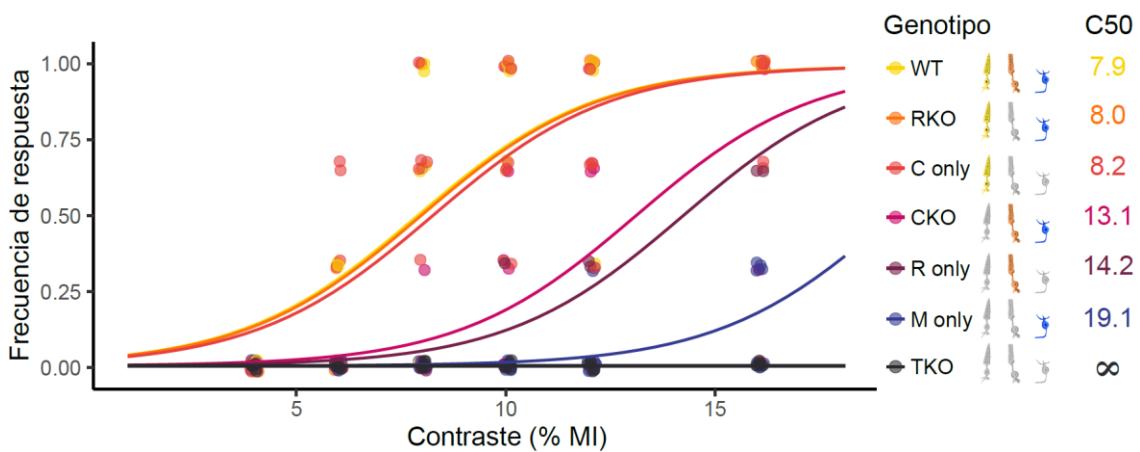


Figura 18. Análisis de la participación de diferentes tipos de fotorreceptores en la respuesta dependiente del contraste. Se muestra la frecuencia de respuesta en función de la magnitud del contraste para ratones con diferentes genotipos. Cada punto representa la proporción de respuestas de un animal para una magnitud de contraste específica y la línea representa las predicciones del GLM para todo el grupo. El C50 grupal se indica numéricamente junto con la referencia del genotipo. Las curvas en los gráficos de frecuencia de respuesta vs. magnitud de contraste representan las predicciones grupales calculadas por el modelo. n = 4–5 ratones/grupo.

Estos resultados respaldan una participación esencial de los conos, complementada por los bastones a niveles más altos de contraste, y un rol residual de las ipCGR únicamente ante contrastes aún más intensos. En ausencia absoluta de fotorreceptores (TKO), los animales no respondieron al estímulo. En suma, estos resultados han permitido desarrollar un nuevo método de evaluación cuantitativa de la sensibilidad al contraste, que como se mencionará más adelante, ha sido una herramienta útil para evaluar los efectos funcionales del EVT y la efectividad de distintos tratamientos, desde una perspectiva más amplia. En esta sección se ha descripto el proceso de construcción y selección del mejor modelo que se ajusta a los datos, así como el análisis de las medias marginales y los contrastes *a posteriori* para comparar entre grupos experimentales. En los próximos capítulos se omitirán estos detalles, asumiendo que los factores utilizados explican significativamente la variabilidad. De este modo, sólo se presentarán los gráficos de frecuencia de respuesta en función del contraste, así como los gráficos de C50. La significación de los contrastes

entre grupos se indicará mediante asteriscos en las Figuras correspondientes, al igual que en la Figura 4.

II. Efectos de la exposición a SMDT sobre el sistema visual de ratones adultos

Como se mencionó en la Introducción, las claves ambientales durante la vida temprana desempeñan un papel fundamental en el desarrollo del cerebro y el comportamiento en la edad adulta. La exposición de neonatos a adversidades psicosociales, tales como la separación materna (SM), afecta drásticamente el desarrollo del cerebro y aumenta el riesgo de un gran número de enfermedades en la etapa adulta. Estudios en roedores demuestran que la separación de las crías de la madre durante un determinado período de la vida temprana aumenta los comportamientos depresivos y/o ansiosos en la adultez. Sin embargo, al inicio de este trabajo de tesis, no se disponía de antecedentes sobre las secuelas de la exposición a SMDT en la función visual de animales adultos. En este contexto, se evaluó el efecto de la exposición a SMDT sobre diversos parámetros funcionales y estructurales de la retina de ratones hembra y macho adultos.

Efectos de la exposición a SMDT sobre el peso corporal y tiempo de apertura de ojos

En una primera serie de experimentos, se evaluó la evolución del peso corporal en animales control o expuestos a SMDT. La Figura 19 muestra el peso corporal promedio de ratones entre los DPNs 10 y 60. A lo largo del estudio, no se observaron diferencias significativas en este parámetro entre los grupos experimentales, tanto en machos como en hembras (Figura 19).

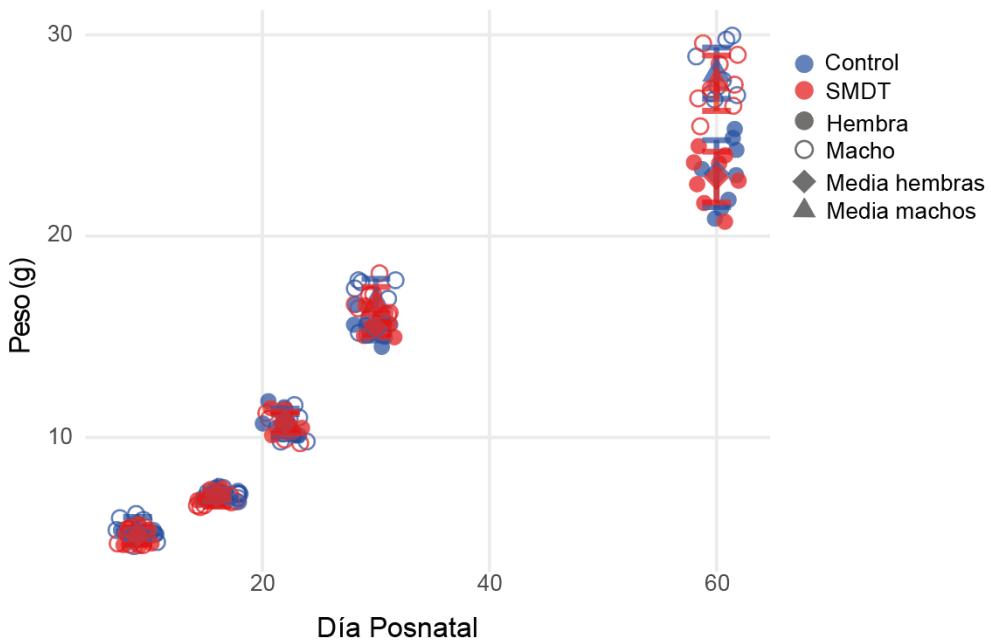


Figura 19. Evolución del peso corporal. La exposición a SMDT no afectó el patrón de peso corporal desde el DPN 10 hasta el DPN 60, tanto en ratones macho como hembra. Cada punto representa el peso promedio de todas las hembras o todos los machos dentro de una camada, n = 8.

No se observaron cambios significativos en el tiempo de apertura de los ojos entre los grupos experimentales. En ambos grupos, ~50% de los animales abrieron los ojos en el día 14 post-parto, en tanto que en el día 15, se alcanzó ~100% de apertura de los ojos en ambos grupos, incluidos machos y hembras (Figura 20).

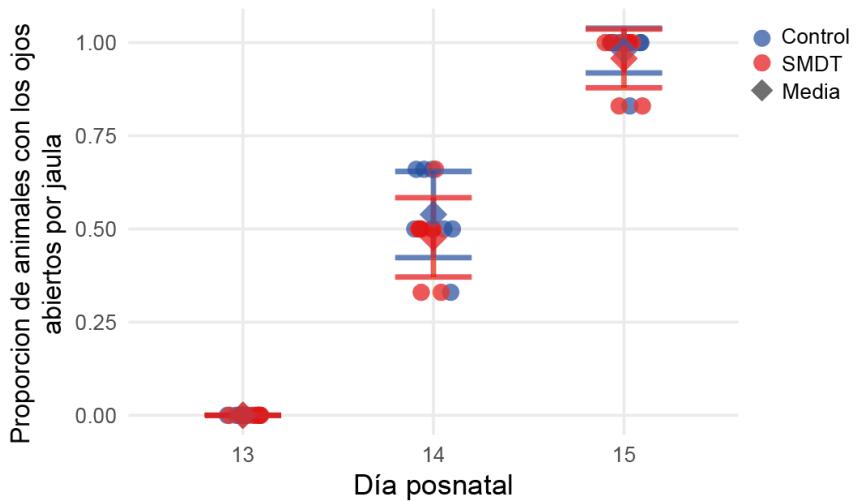


Figura 20. Tiempo de apertura de los ojos. En ambos grupos, aproximadamente el 50% de los animales abrieron los ojos en el DPN 14, mientras que en el DPN 15 se alcanzó aproximadamente el 100% de apertura de los ojos en ambos grupos, incluyendo machos y hembras. Cada punto representa la proporción de animales con los ojos abiertos dentro de una camada, n = 8 camadas.

Efectos de la exposición a SMDT sobre la función retiniana

Con el fin de evaluar los efectos a largo plazo de la exposición a SMDT sobre la función retiniana, se registraron ERG escotópicos en los DPNs 63-65. No se observaron diferencias significativas en la amplitud de las ondas a y b, ni en los potenciales oscilatorios (POs) del ERG entre los grupos experimentales (Figura 21).

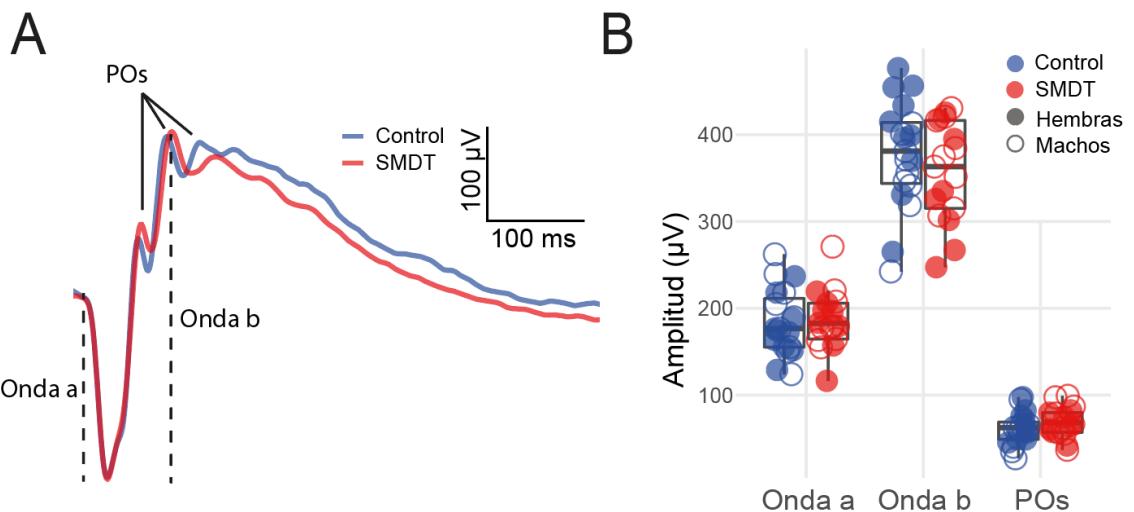


Figura 21. Función de la retina externa. A) Registros representativos de electrotoretinogramas escotópicos a 10 cd en animales control o expuestos a SMDT entre los DPNs 63-65. B) Cuantificaciones de la amplitud de las ondas a, b y de los potenciales oscilatorios (POs). Se registraron un macho y una hembra de cada camada, $n = 8$ camadas. La exposición a SMDT no provocó cambios significativos en la amplitud ni la latencia (datos no mostrados) de las ondas a, b, o POs.

Contrariamente a la respuesta de la retina externa, en los DPNs 63-65, la exposición a SMDT redujo significativamente la función de las CGR en ratones adultos, como lo demostró una disminución significativa en la amplitud de la respuesta escotópica umbral (REU) y de la respuesta fotópica negativa (RFN) (Figura 22B y 22C, respectivamente). Registros escotópicos representativos de REU y de RFN de ratones de control o expuestos a SMDT también se muestran en la Figura 22.

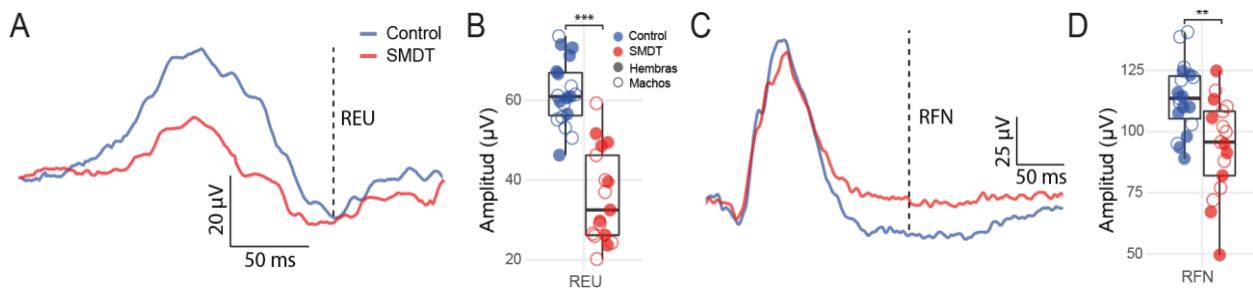


Figura 22. Función de la retina interna. A) Trazados representativos de electrorretinogramas escotópicos a 0,03 mcd en animales control o expuestos a SMDT entre los DPNs 63-65. B) Cuantificación de la REU. C) Registros representativos de ERG fotópicos a 25 cd en animales control o expuestos a SMDT entre los DPNs 63-65. D) Cuantificación de la RFN. Se registró un macho y una hembra de cada camada, n = 8. La exposición a SMDT disminuyó significativamente la amplitud de la REU y la RFN. **p < 0,01, ***p < 0,001.

Efectos de la exposición a SMDT sobre la comunicación de la retina con sus blancos sinápticos

Se registraron VEPs en respuesta a un flash de luz y en condiciones escotópicas; este registro refleja la respuesta de la vía visual desde los fotorreceptores hasta la corteza visual.

La Figura 23 muestra la amplitud de los VEPs registrada en los DPNs 65-70 en animales control o expuestos a SMDT. En la Figura 23 se muestran trazados representativos de los VEPs, así como la cuantificación de la amplitud de los distintos componentes del registro. La exposición a SMDT disminuyó significativamente la amplitud de las ondas P1-N1, P2-N2 y N2-P3, sin cambios en sus respectivas latencias.

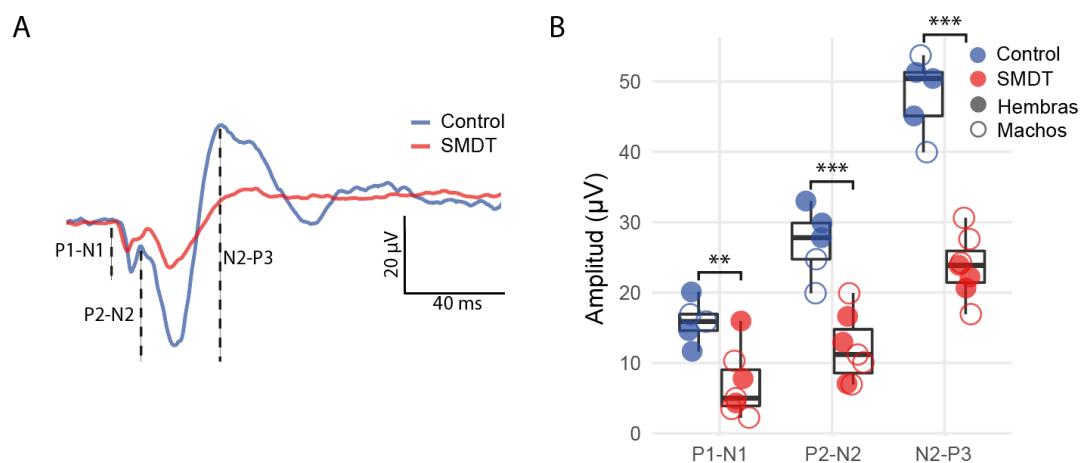


Figura 23. Potenciales Visuales Evocados. A) Trazados representativos de VEPs en animales control o expuestos a SMDT entre los DPNs 65-70. B) Amplitud de los componentes de los VEPs. Se utilizó un animal por camada, n = 5-7. La exposición a SMDT provocó una disminución significativa en la amplitud de las ondas analizadas. ***p < 0,001.

Asimismo, se analizó la comunicación de la retina con su principal blanco sináptico en roedores, el colículo superior (CS), a través del análisis del transporte anterógrado de la subunidad beta de la toxina del cólera (CTB) inyectada por vía intravítreo en el DPN 75. La exposición a SMDT indujo un déficit significativo en la comunicación retina/CS, como lo demuestra la reducción del área CTB (+) en la región retino-receptiva, tanto en machos como hembras expuestas a SMDT (Figura 24).

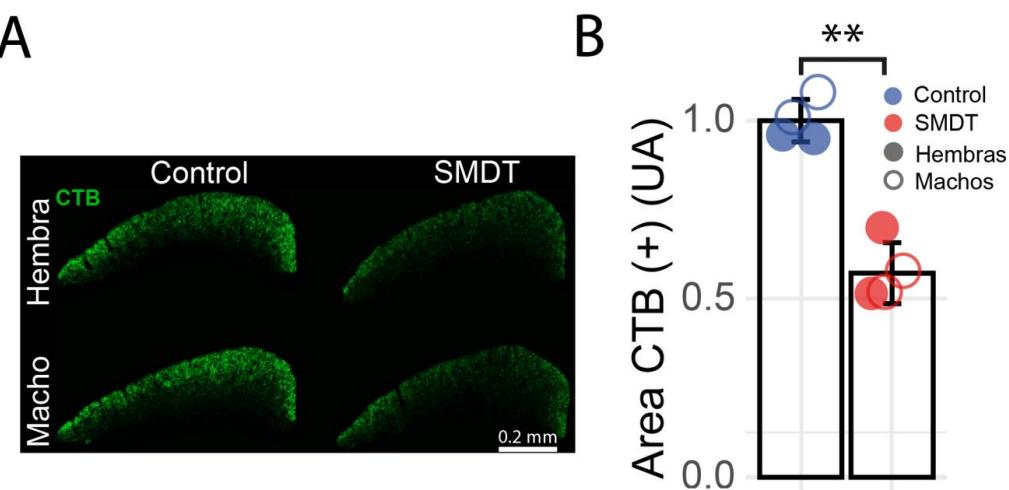
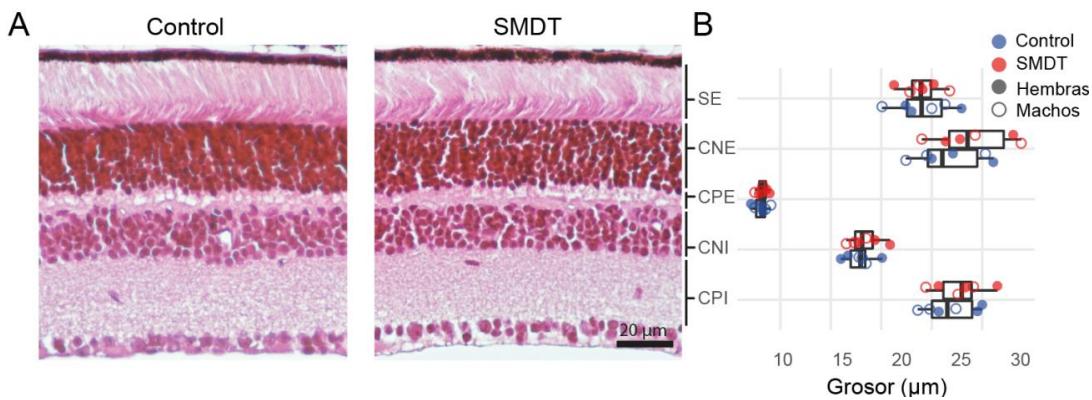


Figura 24. Transporte anterógrado desde la retina al CS. A) Microfotografías representativas del patrón de distribución de CTB en las capas superficiales (capas retino-receptivas) del CS en animales control o expuestos a SMDT que recibieron una inyección intravítreo de CTB. B) Cuantificación del área CTB (+). La exposición a SMDT provocó una disminución en el área CTB (+) en el CS luego de una inyección de CTB en la retina, 3 días antes del sacrificio. Se utilizó un animal por camada, n = 4, **p < 0,01.

Efectos de la exposición a SMDT sobre la estructura retiniana

Para analizar los efectos de la exposición a SMDT sobre la estructura retiniana, los animales se sacrificaron entre los DPNs 70 y 75, los ojos se enuclearon y procesaron de distintas maneras para realizar estudios histológicos. En primer lugar, mediante cortes transversales, se determinó el espesor de las capas retinianas. No se observaron diferencias en el espesor de la capa de segmentos externos de los fotorreceptores (SE), la capa nuclear externa (CNE), la capa plexiforme externa (CPE), la capa nuclear interna (CNI), ni la capa plexiforme interna (CPI), como se muestra en la Figura 25.



Sin embargo, la exposición a SMDT disminuyó significativamente los niveles proteicos de sinaptofisina (Figura 26A y 26B), así como la inmunorreactividad para sinaptofisina en la CPI (pero no en la CPE) (Figura 26C, D y E).

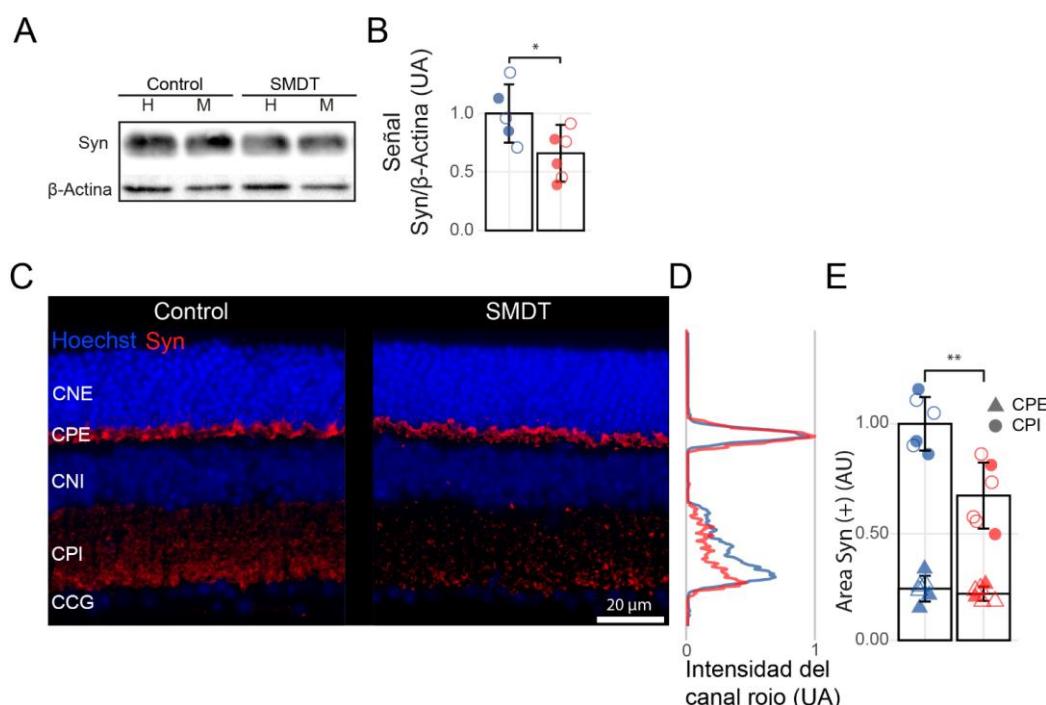


Figura 26. Análisis de sinaptofisina. A) Western blots representativos. B) Cuantificación de los niveles relativos de sinaptofisina retinianos. Se utilizó un animal por camada, n= 5-6. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. B) Microfotografías confocales representativas de la inmunorreactividad para sinaptofisina en cortes transversales de retina. D) Cuantificación de la intensidad de marca de sinaptofisina. E) Cuantificación del área positiva para sinaptofisina en las CPI y la CPE. La exposición a SMDT provocó una disminución significativa en los niveles retinianos de sinaptofisina en la CPI entre los DPNs 70 -75. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna, CCG, capa de células ganglionares.

Por otro lado, en preparados en montaje plano, se observó una disminución significativa en el número de CGR Brn3a (+) en la retina central, media y periférica de animales sometidos a SMDT, como se muestra en la Figura 27B y 27C. Asimismo, los niveles proteicos de Brn3a disminuyeron significativamente en ratones expuestos a SMDT (Figura 27D y 27E).

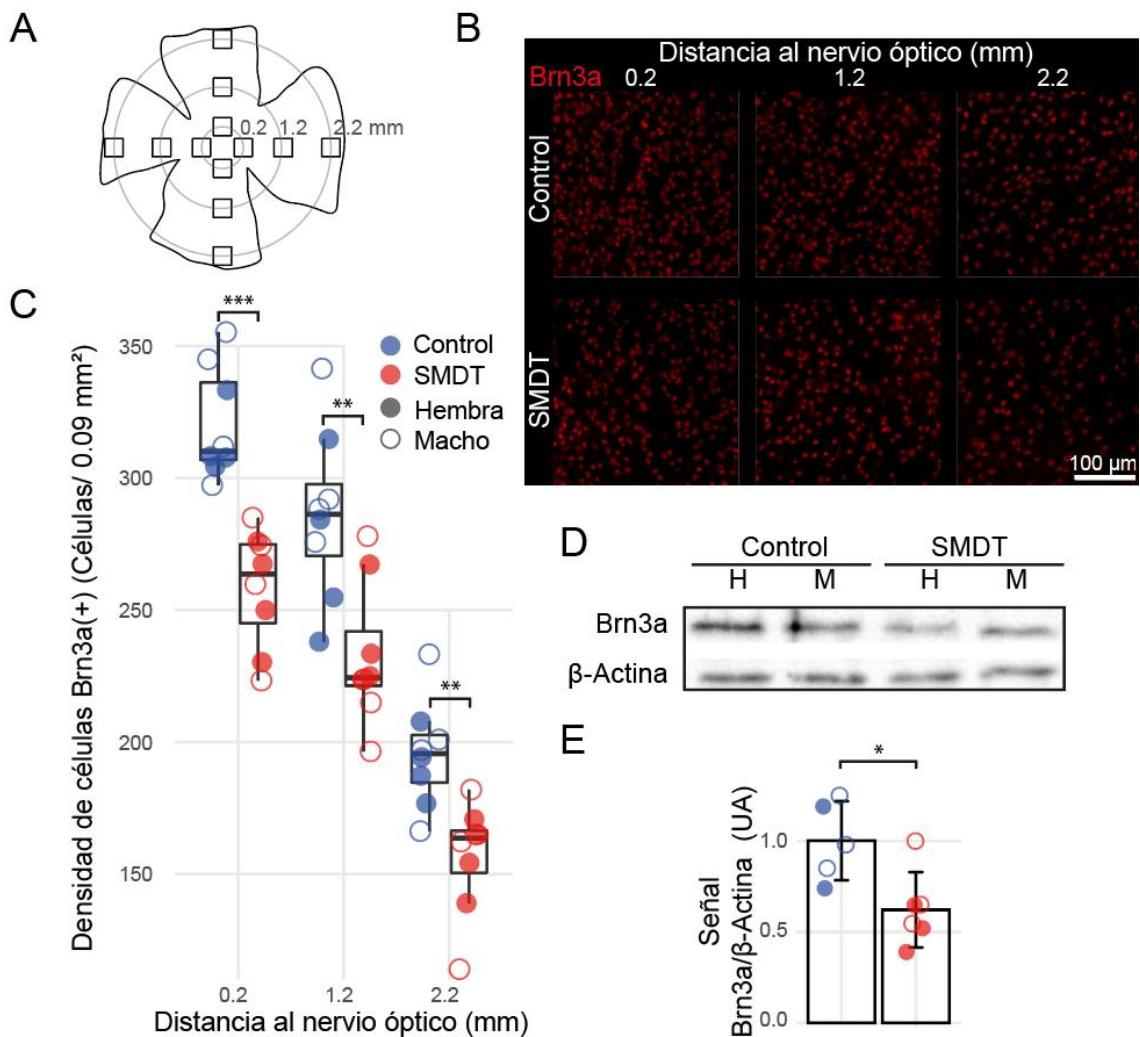


Figura 27. Número de CGR. A) Diagrama de las zonas analizadas. B) Microfotografías confocales representativas de inmunotinciones para Brn3a en las zonas central, media y periférica con respecto al NO en retinas en montaje plano. C) Cuantificación del número de células Brn3a (+) en las diferentes excentricidades analizadas; cada punto representa el promedio de las cuatro microfotografías tomadas en la excentricidad correspondiente para cada retina. Se utilizó un animal por camada, n = 8. D) Western blots. E) Cuantificación de los niveles relativos de Brn3a retinianos. Se utilizó un animal por camada, n = 5-6. La exposición a SMDT provocó una disminución significativa en los niveles de este marcador específico de CGR (Brn3a) entre los DPNs 70 -75. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Con el fin de analizar el mecanismo involucrado en la pérdida de CGR, se evaluó la incidencia de apoptosis en cortes transversales. La exposición a SMDT indujo un aumento en el número de células TUNEL(+), como se muestra en la Figura 28.

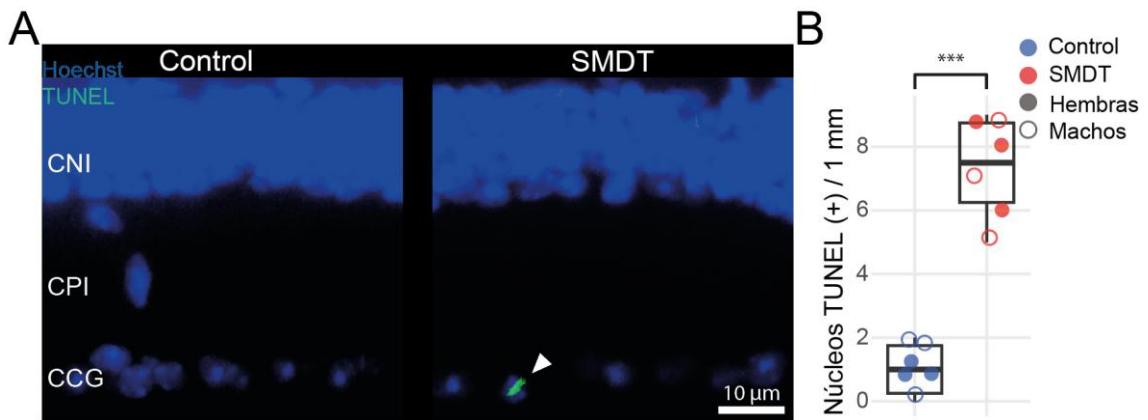


Figura 28. Análisis de células apoptóticas en la retina. A) Microfotografías representativas de cortes de retinas. B) Cuantificación de la cantidad de núcleos TUNEL (+). La exposición a SMDT provocó un aumento significativo de este parámetro en la capa de CGR, entre los DPNs 70 -75. Se utilizó un animal por camada, $n = 6$. *** $p < 0,001$. CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares.

A continuación, se analizó la morfología de la microglía en la retina interna y externa, como se muestra en la Figura 29. No se observaron cambios morfológicos en la microglía de la retina externa/media de animales adultos sometidos a SMDT; en cambio, la exposición a SMDT provocó un aumento en el tamaño somático de las células Iba1 (+) de la retina interna.

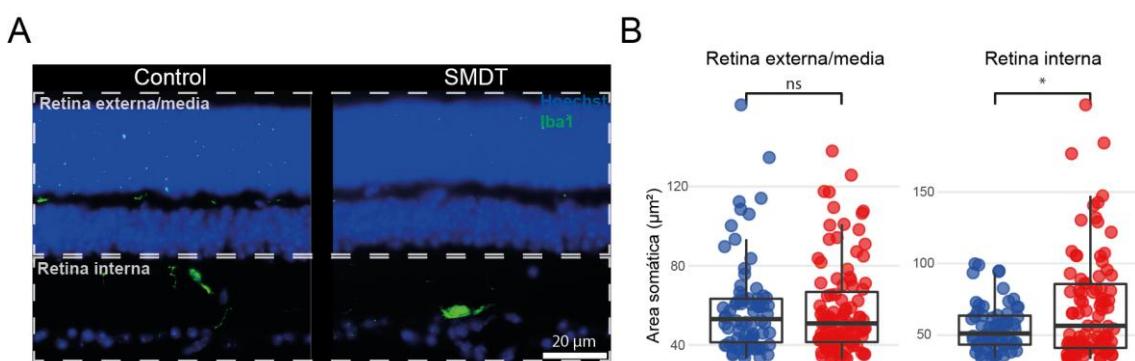


Figura 29. Tamaño somático de las células microgliales retinianas. A) Microfotografías representativas de cortes transversales de retinas inmunomarcadas con Iba-1. B) Comparación del área somática de células Iba-1 (+) entre animales control y expuestos a SMDT, tanto en la retina interna como externa. La exposición a SMDT provocó un aumento en el tamaño somático de las células Iba1 (+) de la retina interna entre los DPNs 70 -75. Se utilizó un animal por camada, $n = 6$. $*p < 0,05$.

A continuación, se realizó un análisis de la morfología microglial por microscopía confocal en la CCG utilizando preparados de retina en montaje plano. Como se muestra en la Figura 30, la exposición a SMDT indujo un aumento significativo del área total y somática de células Iba-1 (+), consistente con un mayor número de células microgliales ameboides y una posible mayor actividad fagocítica, como lo demostró la presencia de núcleos Brn3a (+) dentro de células Iba-1 (+) en una reconstrucción 3D (Figura 30B).

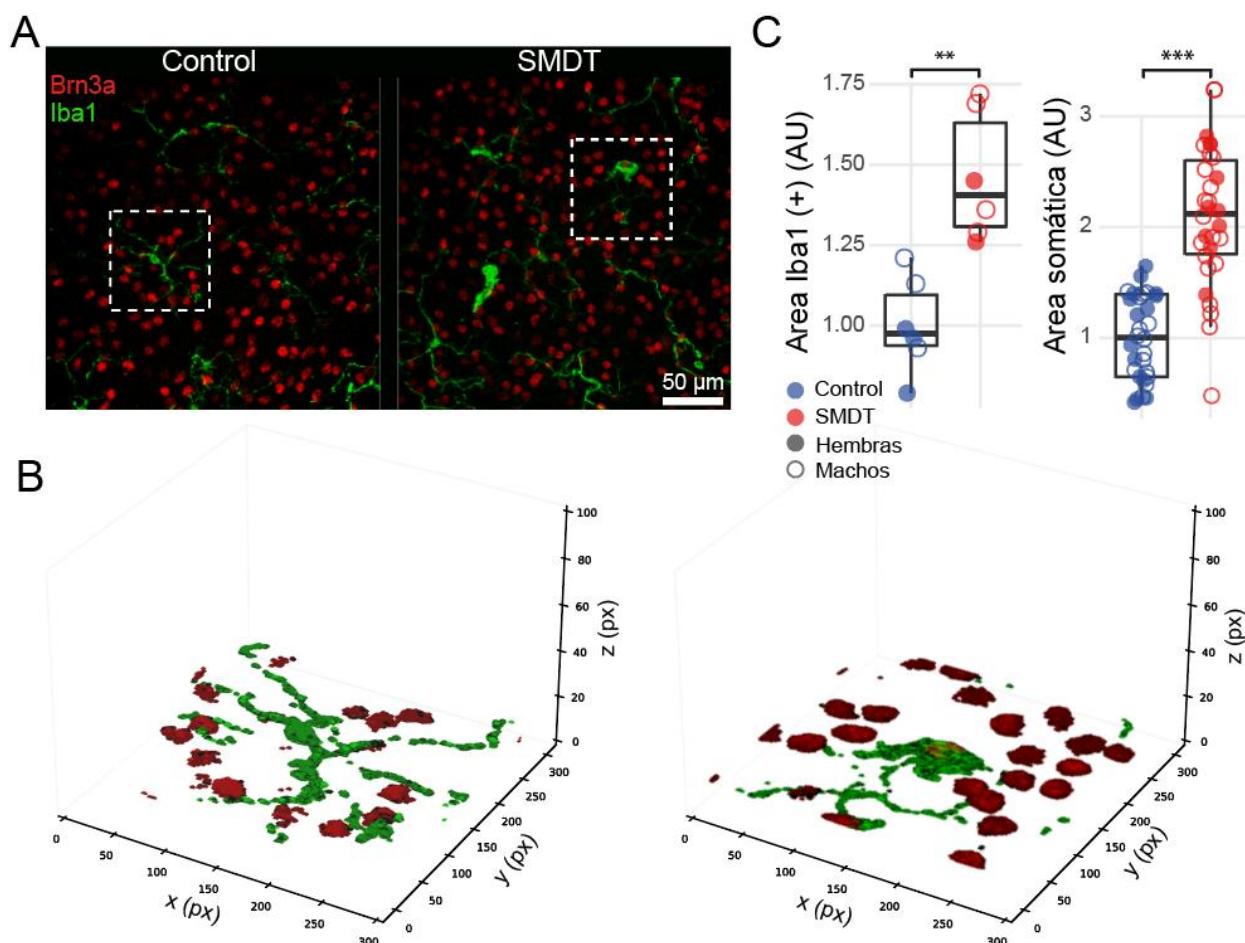


Figura 30. Área y morfología de la microglía en la capa de células ganglionares. A) Microfotografías confocales representativas de retinas en montaje plano inmunomarcadas con Iba-1 y Brn3a. B) Reconstrucciones 3D de las marcas de Iba-1 y Brn3a correspondientes a las áreas marcadas en el panel A. C) Cuantificación del área Iba1 (+) total en las microfotografías y del área somática de cada célula Iba-1. La exposición a SMDT provocó un aumento en el área Iba1 (+), así como en el tamaño del soma de estas células entre los DPNs 70 -75. Se utilizó un animal por camada, n = 6, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Efectos de la exposición a SMDT sobre el comportamiento guiado visualmente

Con el objetivo de evaluar el efecto de la exposición a SMDT sobre las funciones visuales de animales adultos (entre los DPNs 60 y 65) desde una perspectiva más amplia, se utilizaron dos tests de comportamiento guiados por la visión: la prueba del abismo visual y el TLVC (cuyas características se describieron en secciones anteriores).

En el test del abismo visual, la exposición a SMDT redujo significativamente la relación: tiempo de permanencia en el lado superficial/tiempo permanencia en el lado profundo, como se muestra en la Figura 31, en la que también se muestran mapas de calor, representativos del desempeño en la arena del test del abismo visual de un ratón control y un ratón sometido a SMDT.

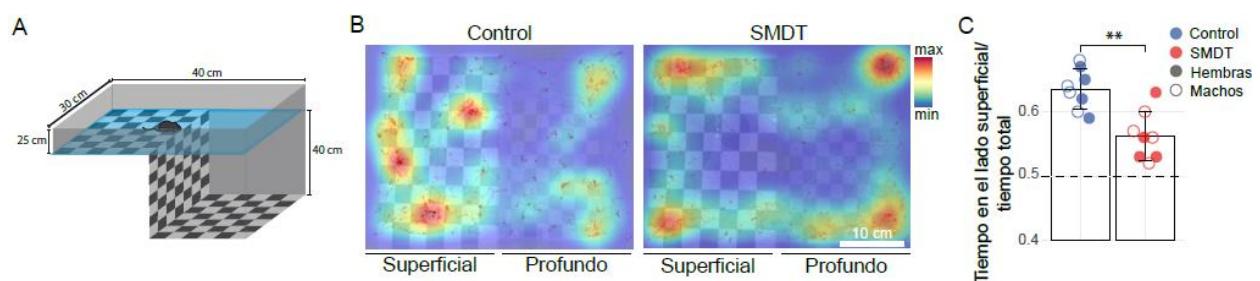


Figura 31. Abismo visual. A) Esquema representativo de la arena del test del abismo visual. B) Mapas de calor representativos de la posición en la arena de un animal control y un animal sometido a SMDT. C) Cuantificación del cociente entre el tiempo de permanencia en el lado superficial y el lado profundo. La exposición a SMDT provocó una disminución en el tiempo en el que los animales permanecieron en el lado superficial de la arena entre los DPNs 60 y 65. Se utilizó un animal por camada, n = 8. ** $p < 0,01$.

En el TLCV, los grupos experimentales exploraron de manera similar la arena en el período de adaptación; sin embargo, los animales sometidos a SMDT requirieron mayores intensidades de contraste en el estímulo de *looming*, para responder con frecuencias similares a los requeridos en animales control, resultando en valores mayores de C50 (Figura 32).

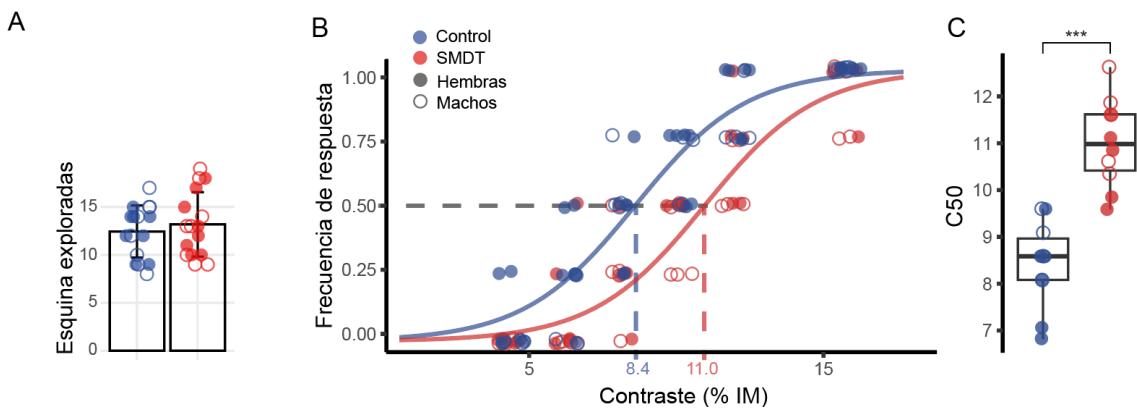


Figura 32. Test de *looming* con variación de contrastes. A) Cantidad de esquinas exploradas durante el período de adaptación a la arena. B) Frecuencia de respuesta en función de la magnitud del contraste. Los puntos representan las frecuencias individuales de cada animal, mientras que las curvas representan las predicciones del modelo para cada grupo experimental. C) Valores de C50. Cada punto representa el valor de C50 correspondiente a un animal. La exposición a SMDT provocó un aumento en el contraste necesario para generar respuestas al estímulo *looming* entre los DPNs 60 y 65. Se utilizó un animal por camada, $n = 8$. *** $p < 0,001$.

Para determinar si la pérdida de función en el TLCV causada por la exposición a SMDT se debió a una disminución en la comunicación retino-colicular, se estudió la activación del CS frente al estímulo *looming*. Como se observa en la Figura 33, el estímulo *looming* causó un aumento en el número de células c-fos (+), tanto en animales control como sometidos a SMDT. Sin embargo, el aumento en el número de células c-fos (+) causado por el estímulo fue significativamente menor en animales expuestos a SMDT que en animales control.

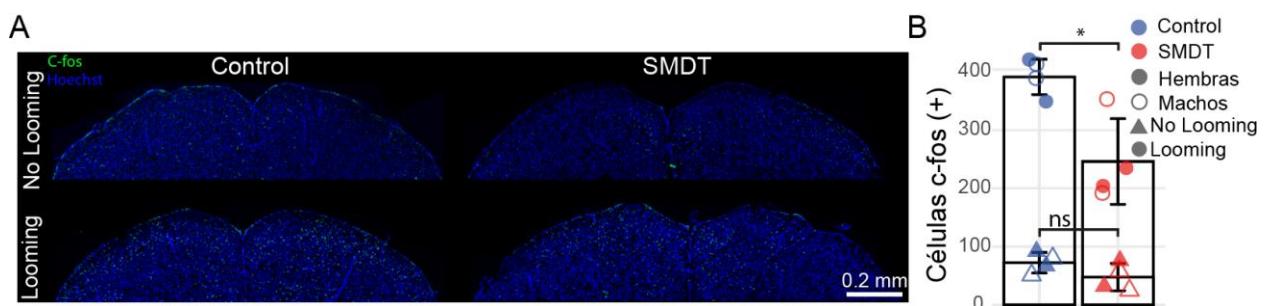


Figura 33. Actividad neuronal en el colículo superior inducida por *looming*. A) Microfotografías representativas de la región retino-receptiva de ambos CS inmunomarcados con c-fos en animales que recibieron (o no) el estímulo de *looming*. B) Cuantificación del número de células c-fos (+). Entre los DPNs 60 y 65, la exposición a SMDT no provocó cambios en el número de células c-fos (+) en condiciones basales, pero disminuyó este parámetro 1 hora después de la aplicación del estímulo. Se utilizó un animal por camada. $n = 4$. * $p < 0,05$.

III. Participación de los glucocorticoides en las secuelas del EVT sobre el sistema visual murino

Múltiples evidencias de las últimas décadas posicionan a los glucocorticoides (GC) como un factor clave en los efectos a largo plazo del EVT. En la siguiente serie de experimentos, se examinó la participación de los GC sobre los efectos a largo plazo de la exposición a SMDT. La exposición a SMDT indujo un aumento significativo en los niveles plasmáticos de corticosterona en el DPN 10 (Figura 34).

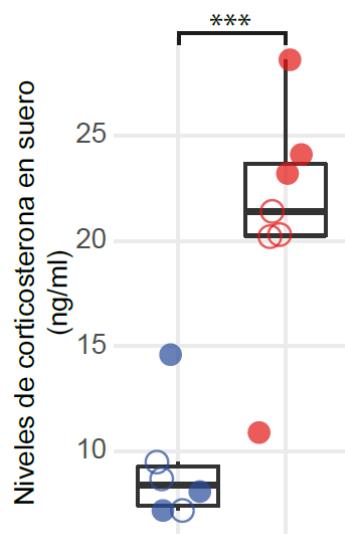


Figura 34. Niveles séricos de corticosterona en el DPN 10. La exposición a SMDT provocó un aumento significativo de este parámetro. Se utilizó un animal por camada, n = 6. *** $p < 0,001$.

A fin de evaluar la participación de los corticoides endógenos en las alteraciones retinianas inducidas por exposición a SMDT, se injectó vehículo o mifepristona en los DPNs 3, 7, 10, 13 y 16 en animales control o estresados tempranamente. La mifepristona no afectó la amplitud de las ondas a y b, ni de los POs del ERG escotópico (datos no mostrados). Asimismo, el tratamiento con mifepristona, que careció de efectos *per se*, previno significativamente el efecto de la exposición a SMDT en la amplitud de la REU y la RFN en animales de entre 63-65 días de edad (Figura 35A y 35B, respectivamente).

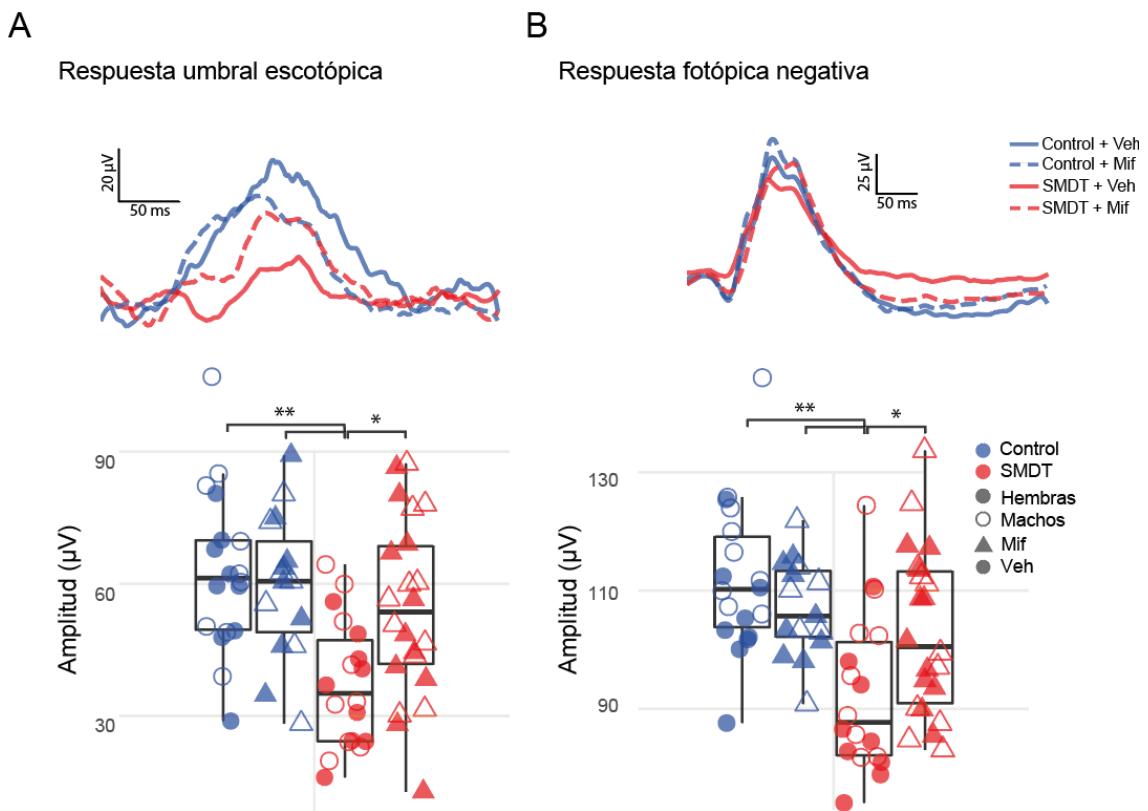


Figura 35. Efecto de la mifepristona (Mif) sobre la función de la retina interna. A) Registros representativos de ERG escotópicos de 0,03 mcd. B) Cuantificación de la REU. C) Registros representativos de ERG de 25 cd. D) Cuantificación de la RFN. El tratamiento con mifepristona previno los cambios inducidos por la exposición a SMDT sobre la amplitud de la REU y la RFN registrada entre los DPNs 63-65. Se registraron dos o tres animales por camada, n = 5. *p < 0,05, **p < 0,01.

A nivel estructural, el tratamiento con mifepristona previno tanto la disminución en el número de células Brn3a (+), como la alteración de la morfología, el área y el tamaño del soma de las células Iba-1 en la retina interna causados por la exposición a SMDT en animales de entre 70-75 días de edad (Figura 36).

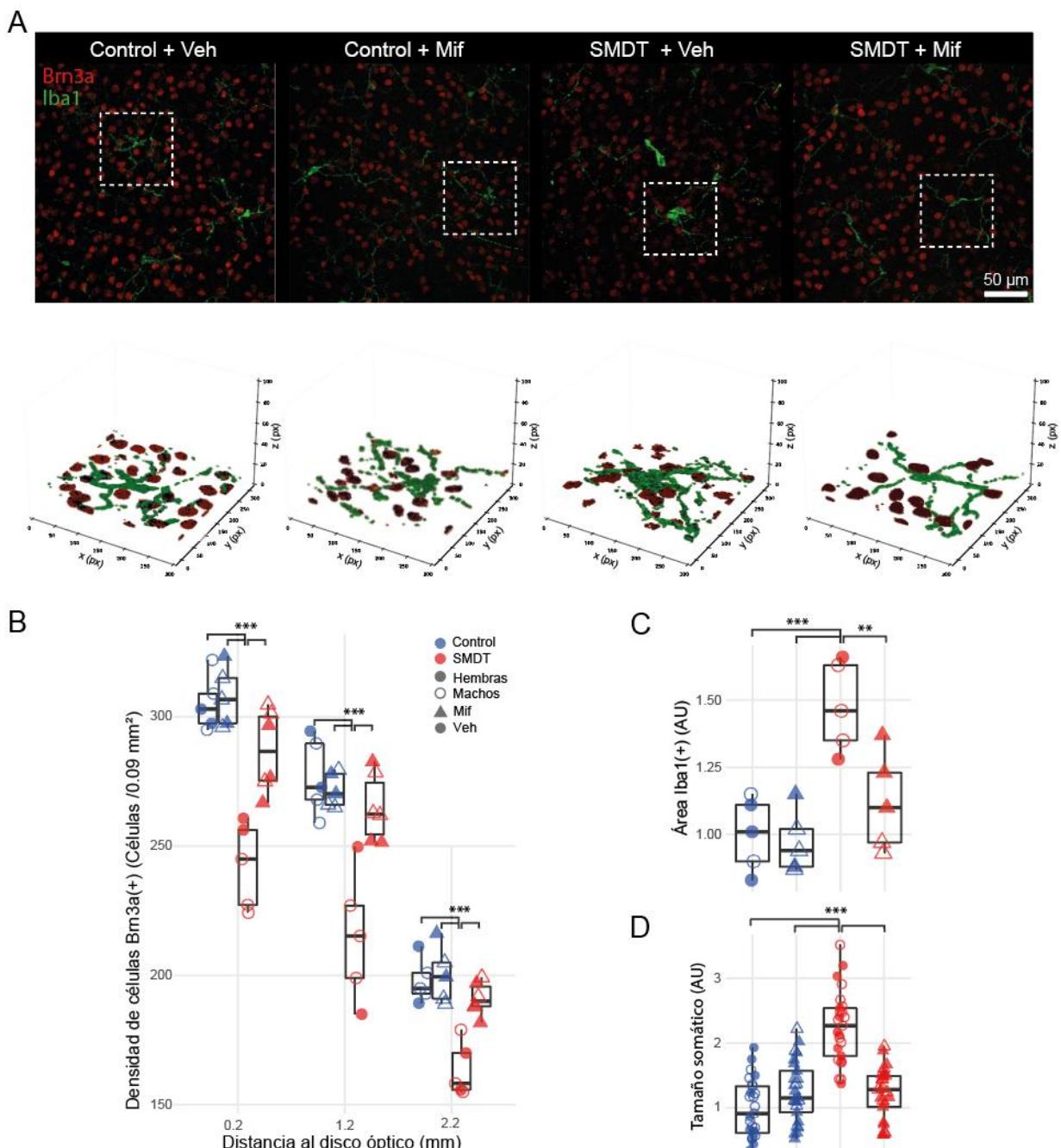


Figura 36. Efectos de la mifepristona sobre la estructura retiniana. A) Microfotografías confocales representativas de retinas en montaje plano inmunomarcadas con Iba-1 y Brn3a. Se muestran reconstrucciones en 3D de la inmunorreactividad para Iba-1 y Brn3a correspondientes a las áreas marcadas sobre las microfotografías. B) Cuantificación del número de células Brn3a (+) en diferentes excentricidades; cada punto representa el promedio de cuatro microfotografías tomadas en la excentricidad correspondiente para una retina. C) Cuantificación del área Iba-1 (+) en las microfotografías y del área somática de cada célula Iba-1 (+). Entre los DPNs 70-75, el tratamiento con mifepristona previno significativamente la disminución en el número de CGR y en el área Iba-1 (+) así como en el tamaño somático de estas células, provocada por la exposición a SMDT. Se utilizó un animal por camada, n = 5. **p < 0,01, ***p < 0,001.

Asimismo, el tratamiento con mifepristona previno parcialmente la alteración en la respuesta al TLCV en animales de entre 60 y 65 días de edad (Figura 37).

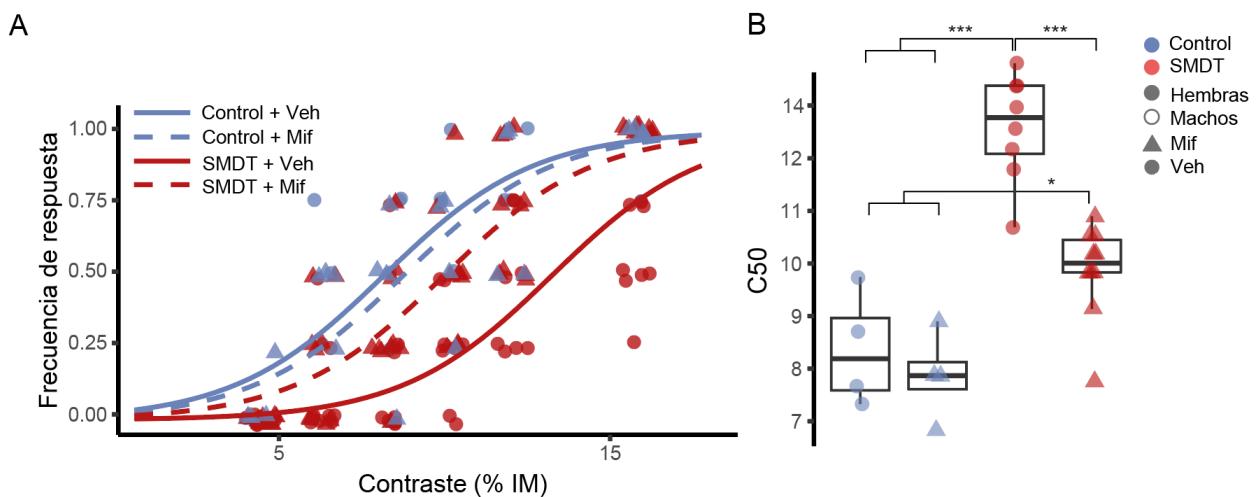


Figura 37. Efecto de la mifepristona sobre la respuesta al TLVC. A) Frecuencia de respuesta en función de la magnitud del contraste. Los puntos representan las frecuencias individuales de cada animal mientras que las curvas representan las predicciones del modelo para cada grupo experimental. B) Valores de C50. El tratamiento con mifepristona previno los cambios en la respuesta al TLVC inducidos por la exposición a SMDT entre los DPNs 60-65. Cada punto representa el valor de C50 correspondiente a un animal, n = 4-8. *p < 0,05, ***p < 0,001.

En suma, este conjunto de resultados demuestra que un tratamiento temprano con mifepristona previno significativamente las secuelas de la exposición a SMDT sobre el sistema visual en ratones adultos.

IV. Estudio temporal de los efectos de la exposición a SMDT sobre el sistema visual murino

Los resultados ya descriptos indican que la exposición a SMDT provocó alteraciones significativas de la función visual y la estructura retiniana en animales adultos (DPNs 60-75). En la siguiente serie de experimentos, evaluamos el curso temporal de estas alteraciones. La Figura 38 muestra trazados de ERG escotópicos registrados en los DPNs 35, 45 y 60 en ratones control o expuestos a SMDT. No se observaron diferencias significativas en la amplitud de la onda a y la onda b del ERG entre los grupos experimentales a lo largo del estudio; en tanto que en el DPN 45, la amplitud de la REU y la RFN disminuyó significativamente en los animales expuestos a SMDT. En el DPN 60, se observó una disminución adicional en ambos parámetros.

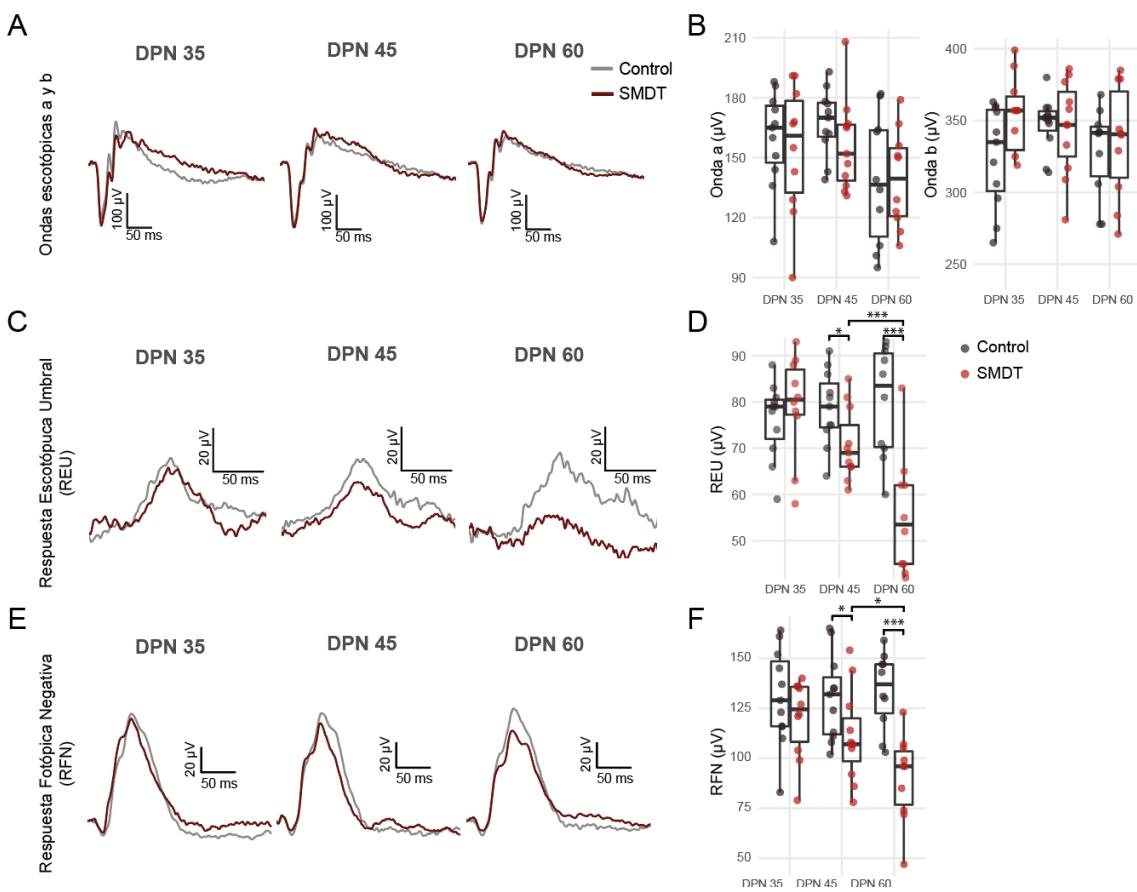


Figura 38. Evolución de la función retiniana. A) Registros representativos de ERGs escotópicos a 10 cd. B) Cuantificación de las amplitudes de las ondas a y b del ERG. C) Registros representativos de ERGs escotópicos a 0,03 mcd. D) Cuantificación de la REU. E) Trazados representativos de ERGs fotópicos a 25 cd. F) Cuantificación de la amplitud de la RFN. La exposición a SMDT no afectó las amplitudes de las ondas a y b respecto al grupo control en ninguno de los intervalos analizados. Sin embargo, se observó una disminución significativa en la amplitud de las REU y RFN en el día DPN 45 (pero no en el DPN 35). La caída en ambos parámetros se acentuó en el DPN 60. Se registraron un macho y una hembra por camada, n = 10-11, *p < 0,05, ***p < 0,001.

Los resultados ya mencionados sugieren una alteración fenotípica de la microglía en la retina interna de animales adultos expuestos a SMDT. A fin de examinar el curso temporal de la activación microglial, se realizaron dos análisis morfométricos en los DPNs 35, 45 y 60 en ratones control o expuestos a SMDT: el índice de Sholl y la circularidad celular, como se muestra en la Figura 39. En el DPN 35, no se evidenciaron diferencias morfométricas entre las células microgliales de la retina de animales control o sometidos a estrés temprano, en tanto que en el DPN 45, la exposición a SMDT indujo un perfil “más reactivo” en las células microgliales de la retina interna, que fue aún más pronunciado en el DPN 60, en comparación con animales control. Consistentemente, el grado de ramificación evaluado a

través del índice de Sholl indicó que las células Iba-1 (+) de la retina interna experimentaron progresivamente un cambio fenotípico a una morfología ameboide que fue evidente en el DPN 45, y aumentó aún más en el DPN 60 (Figura 39). No se evidenciaron cambios en la microglía de la retina externa a lo largo del estudio (datos no mostrados).

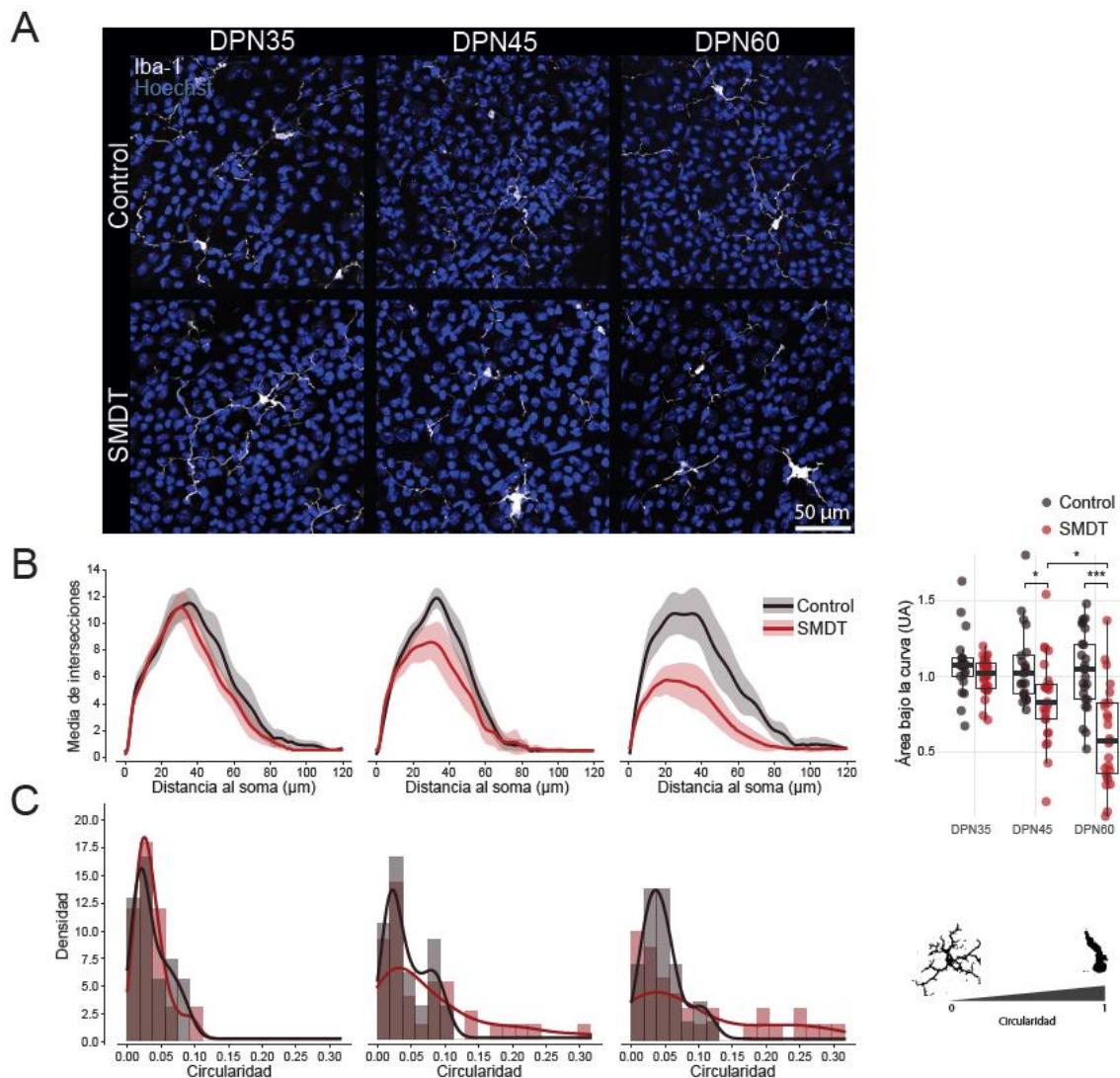


Figura 39. Evolución de la morfología microglial. A) Microfotografías confocales representativas de retinas en montaje plano inmunomarcadas con Iba-1. B) Análisis de Sholl de células microgliales de la capa de células ganglionares. Panel derecho: cuantificación del área bajo la curva para cada punto temporal. Cada punto en el gráfico representa el área bajo la curva para una célula. C) Distribuciones de densidad de la circularidad de células microgliales de la CCG. La exposición a SMDT no provocó cambios en estos parámetros morfológicos en el DPN 35; en cambio, en el DPN 45, la exposición a SMDT provocó una disminución en la media de intersecciones de acuerdo con el análisis de Sholl, así como un aumento en los valores de circularidad de las células microgliales. Este cambio hacia morfologías más ameboides, reflejado por ambos parámetros, se acentuó en el DPN 60. Se utilizó un animal por camada, $n = 6 - 7$, $*p < 0,05$, $***p < 0,001$.

A continuación, se analizó el curso temporal del número de CGR en ambos grupos experimentales. Como se muestra en la Figura 40, el número de CGR Brn3a (+) disminuyó significativamente en el DPN 60. Este parámetro no difirió entre ambos grupos en los DPNs 35 y 45.

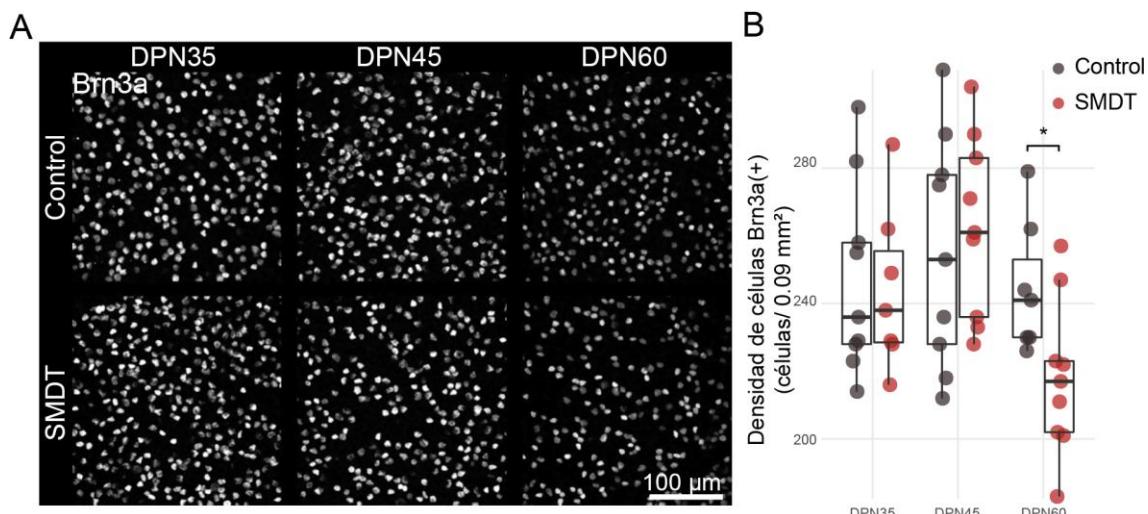


Figura 40. Evolución del número de CGR. A) Microfotografías confocales representativas de inmunotinciones para Brn3a en retinas en montaje plano. B) Cuantificación del número de células Brn3a (+). La exposición a SMDT no afectó este parámetro en los DPN 35 ó 45; sin embargo, se observó una disminución significativa en el número de células Brn3a (+) en el DPN 60. Se utilizó un animal por camada, $n = 7-9$. * $p < 0,05$.

Perfil inflamatorio de la microglía en el DPN 45

En función del cambio fenotípico de las células microgliales en el DPN 45, que precedió a la pérdida de CGR, se examinó el perfil pro-inflamatorio de este tipo celular. En el DPN 45, la exposición a SMDT indujo un aumento en la inmunorreactividad para la subunidad p65 de NF-κB a nivel nuclear, colocalizado con células Iba-1 (+) (Figura 41).

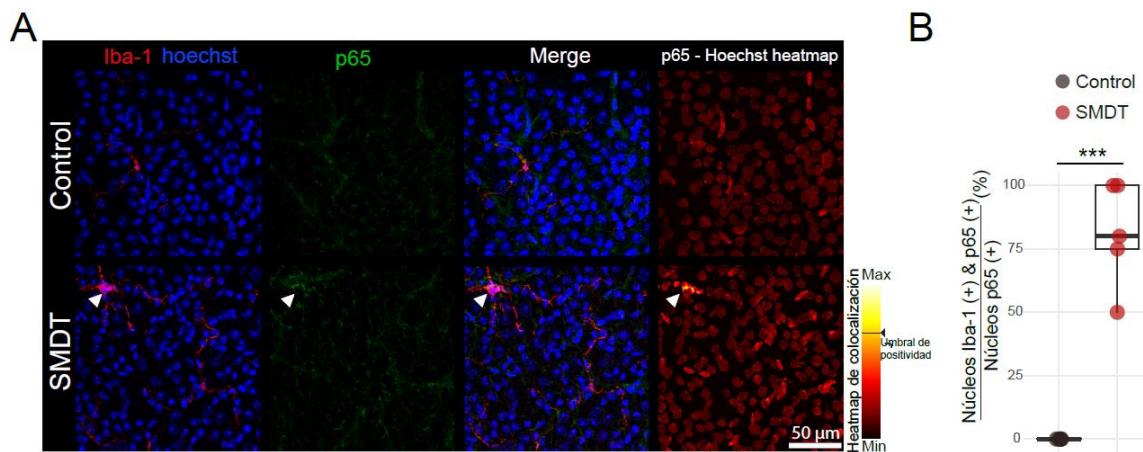


Figura 41. Localización nuclear de la subunidad p65 de NF-κB de células Iba-1 (+). A) Microfotografías confocales representativas de la CCG de retinas en montaje plano inmunomarcadas con Iba-1 y la subunidad p65 de NF-κB. También se muestra un mapa de calor representando la intensidad de marca de p65 en el área Hoechst (+). Se estableció un umbral arbitrario para clasificar a los núcleos marcados con Hoechst como positivos o negativos para la subunidad p65 de NF-κB. La punta de flecha blanca muestra un núcleo por encima del umbral de positividad que corresponde a una célula Iba1 (+). B) Cuantificación de núcleos p65 (+) en células Iba1 (+). La exposición a SMDT provocó un aumento significativo en la cantidad de núcleos p65 (+) en células Iba1 (+). Se utilizó un animal por camada, n = 5. ***p < 0,001.

Asimismo, se analizaron los niveles retinianos de C3 en el DPN 45. La exposición a SMDT indujo un aumento significativo en el contenido de C3 en células microgliales de la retina interna, como se muestra en la Figura 42.

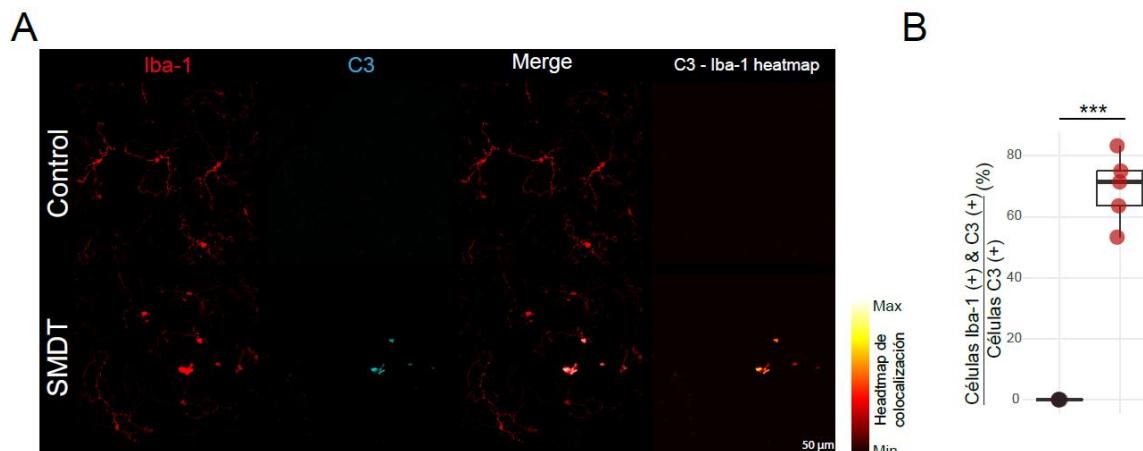


Figura 42. Células microgliales C3 (+) en la capa de células ganglionares. A) Microfotografías confocales representativas de la CCG de retinas en montaje plano inmunomarcadas con Iba-1 y C3. También se muestra un mapa de calor representando la intensidad de marca de C3 en el área Iba-1 (+). B) Cuantificación del porcentaje de células C3 (+) que además son Iba1 (+). La exposición a SMDT provocó un aumento en la cantidad de células C3 (+) en células Iba1 (+). Se utilizó un animal por camada, n = 5. ***p < 0,001.

La exposición a SMDT indujo un aumento significativo en los niveles de NOS-2 en células Iba-1 (+) en el DPN 45, como se muestra en la Figura 43.

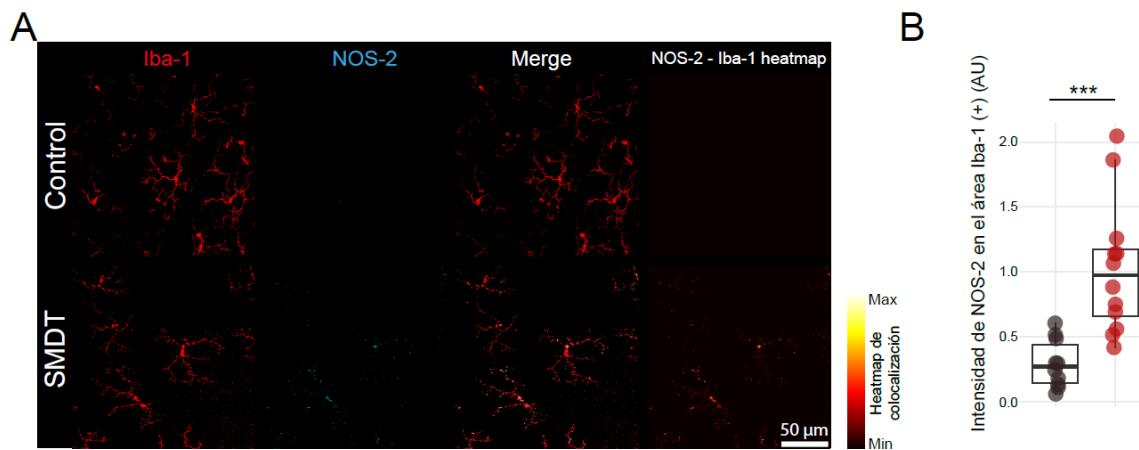


Figura 43. Niveles de NOS-2 en las células microgliales de la capa de células ganglionares. A) Microfotografías confocales representativas de la CCG de retinas en montaje plano inmunomarcadas con Iba-1 y NOS-2. También se muestra un mapa de calor representando la intensidad de la marca de NOS-2 en el área Iba-1 (+). B) Cuantificación de la intensidad de marca de NOS-2 en el área Iba-1 (+). La exposición a SMDT provocó un aumento de los niveles de NOS-2 en células Iba1 (+). Se utilizó un animal por camada, n = 5. *** $p < 0,001$.

En el DPN 45, la exposición a SMDT indujo un aumento de los niveles de IL-1 β en células Iba-1 (+) de la retina interna, como se muestra en la Figura 44.

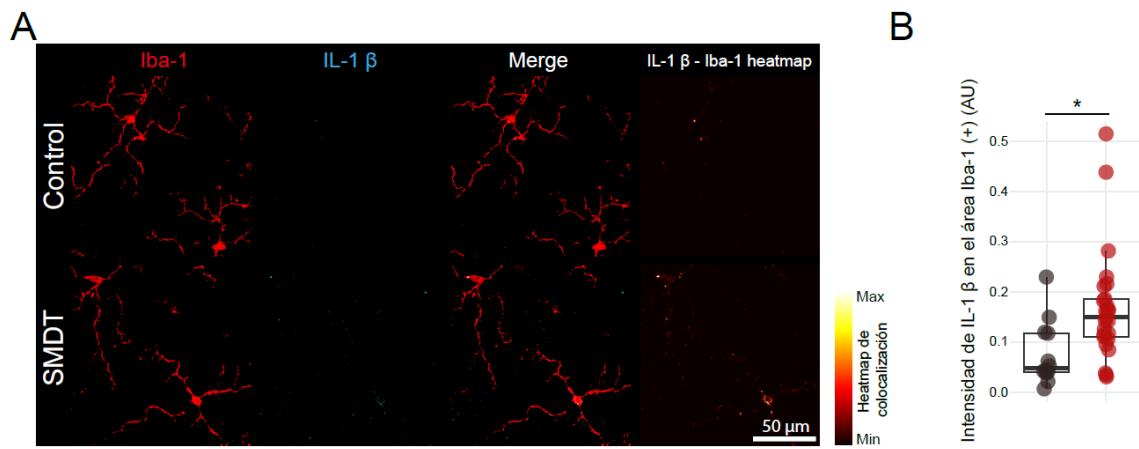


Figura 44. Niveles microgliales de IL-1 β en la capa de células ganglionares. A) Microfotografías confocales representativas de la CCG de retinas en montaje plano inmunomarcadas con Iba-1 e IL-1 β . También se muestra un mapa de calor representando la intensidad de marca de IL-1 β en el área Iba-1 (+). B) Cuantificación de la intensidad de marca de IL-1 β en el área Iba-1 (+). La exposición a SMDT provocó un aumento significativo en los niveles de IL-1 β en las células Iba1 (+). Se utilizó un animal por camada, n = 5. * $p < 0,05$.

En conjunto, estos resultados demuestran que la exposición a SMDT provocó una activación significativa de la microglía retiniana, con cambios en el fenotipo y producción de señales pro-inflamatorias, que anteceden a la pérdida de CRG.

V. Estudio del rol de la microglía en las alteraciones retinianas inducidas por la exposición a SMDT

Con el objeto de analizar el rol de la microglía en las alteraciones funcionales y estructurales retinianas inducidas por exposición a SMDT, se procedió a depletar estas células, a través de la administración de un inhibidor del receptor del factor estimulante de colonias 1 (BLZ945), entre los DPNs 35 y 60. En primer lugar, se analizó la eficacia de la administración de BLZ945 sobre la microglía retiniana, así como sobre las posibles consecuencias en la estructura y la función retiniana en animales naïve. La Figura 45 muestra que la administración de BLZ945 fue efectiva en depletar las células microgliales retinianas en animales control de 60 días de edad.

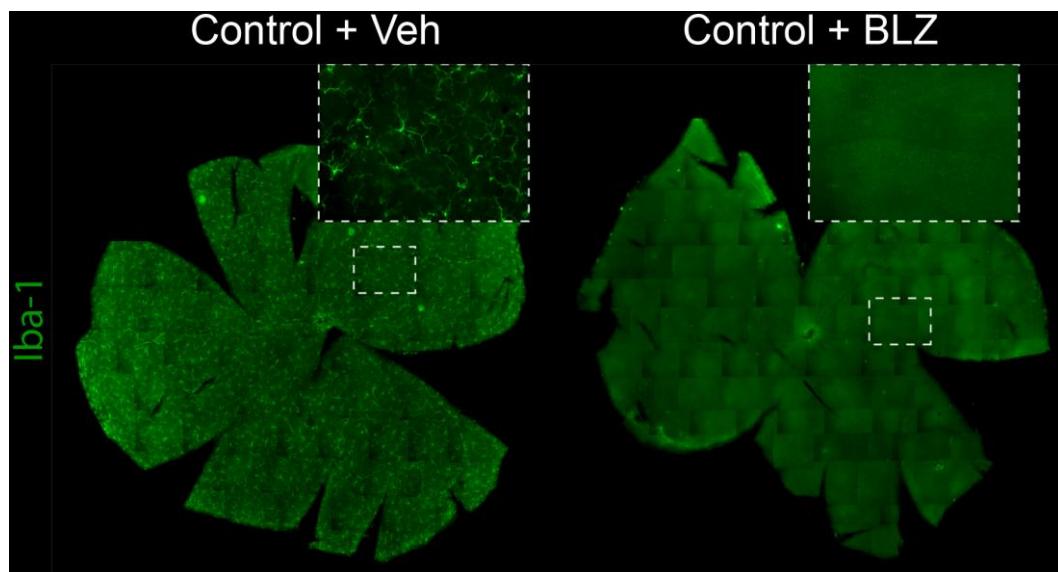


Figura 45. Depleción de células microgliales en retinas de animales tratados con BLZ945. Reconstrucciones (a partir de microfotografías) de retinas inmunomarcadas con Iba-1 de animales control en el DPN 60, tratados con vehículo o BLZ945 entre los DPN 35 a 60. El tratamiento con BLZ945 fue efectivo en depletar la retina de células Iba-1 (+).

Como se muestra en la Figura 46, la depleción de microglía no afectó la función de la retina en el DPN 60, es decir, no modificó la amplitud de las ondas a y b del ERG escotópico, ni la amplitud de la REU y la RFN.

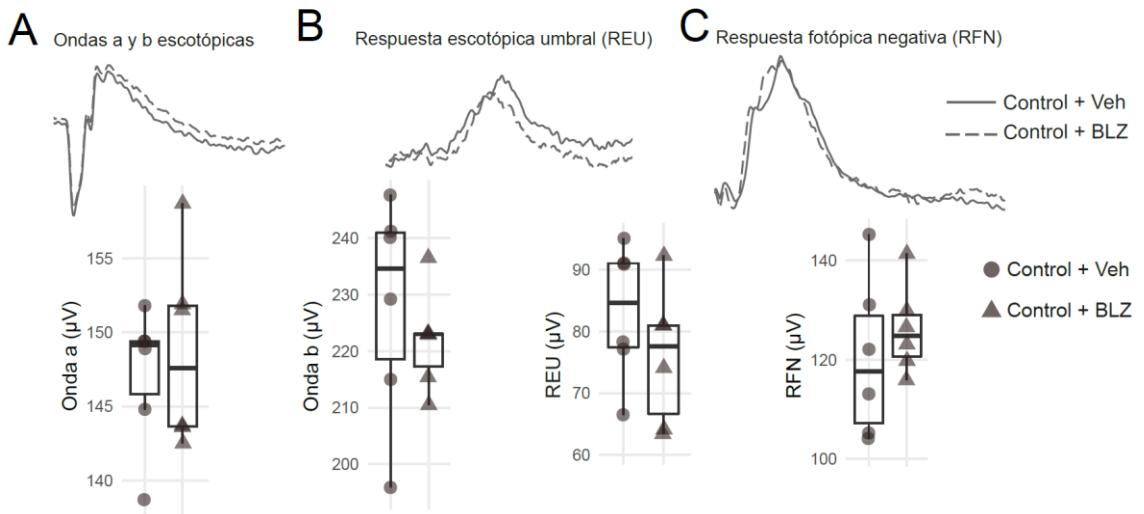


Figura 46. Efecto del tratamiento con BLZ945 sobre la función retiniana de animales control. A) Registros representativos de ERG escotópicos a 10 cd y cuantificación de la amplitud de las ondas a y b. B) Registros representativos de ERG escotópicos a 0.03 mcd y cuantificación de la amplitud de la REU. C) Registros representativos de ERG fotópicos a 25 cd y cuantificación de la amplitud de la RFN. El tratamiento con BLZ945 no produjo alteraciones en ninguno de estos parámetros en animales control en el DPN 60. Se utilizó un animal por camada, n =6.

La depleción de microglía tampoco afectó el número de células Brn3a (+) en el DPN 60, como se muestra en la Figura 47.

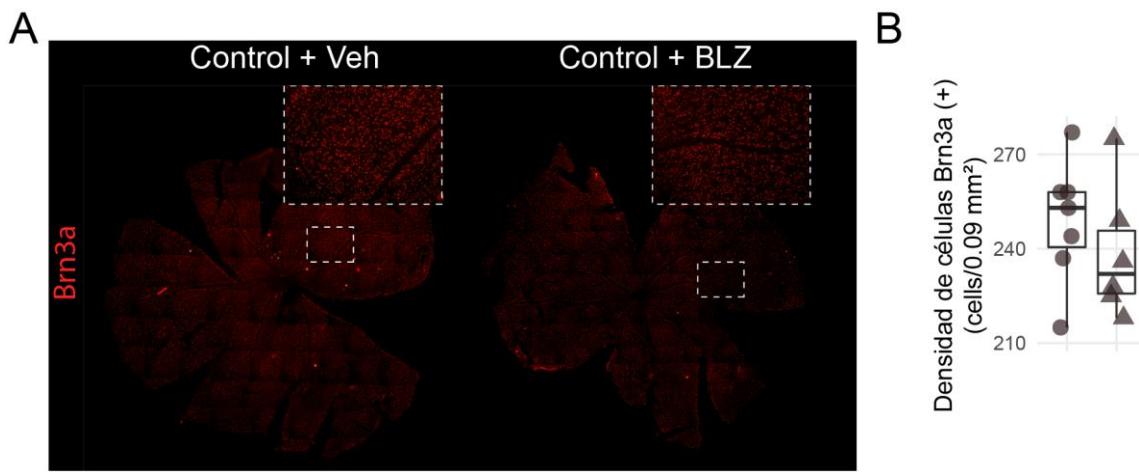


Figura 47. Efecto del tratamiento con BLZ945 sobre el número de células Brn3a (+). A) Reconstrucciones (a partir de microfotografías) de retinas inmunomarcadas con Brn3a de animales control, tratados con vehículo o BLZ945 entre los DPN 35 a 60. B) Cuantificación del número de células Brn3a (+). El tratamiento con BLZ945 no alteró este parámetro en el DPN 60. Se utilizó un animal por camada, n =6.

Finalmente, con el fin de evaluar posibles alteraciones en la función visual causadas por la depleción microglial, se evaluó el desempeño de animales control tratados con BLZ945 entre los DPN 35 a 60 en el TLCV. El tratamiento con BLZ945 no afectó la actividad motora (Figura 48 A, B y C), ni la respuesta al TLCV en el DPN 60.

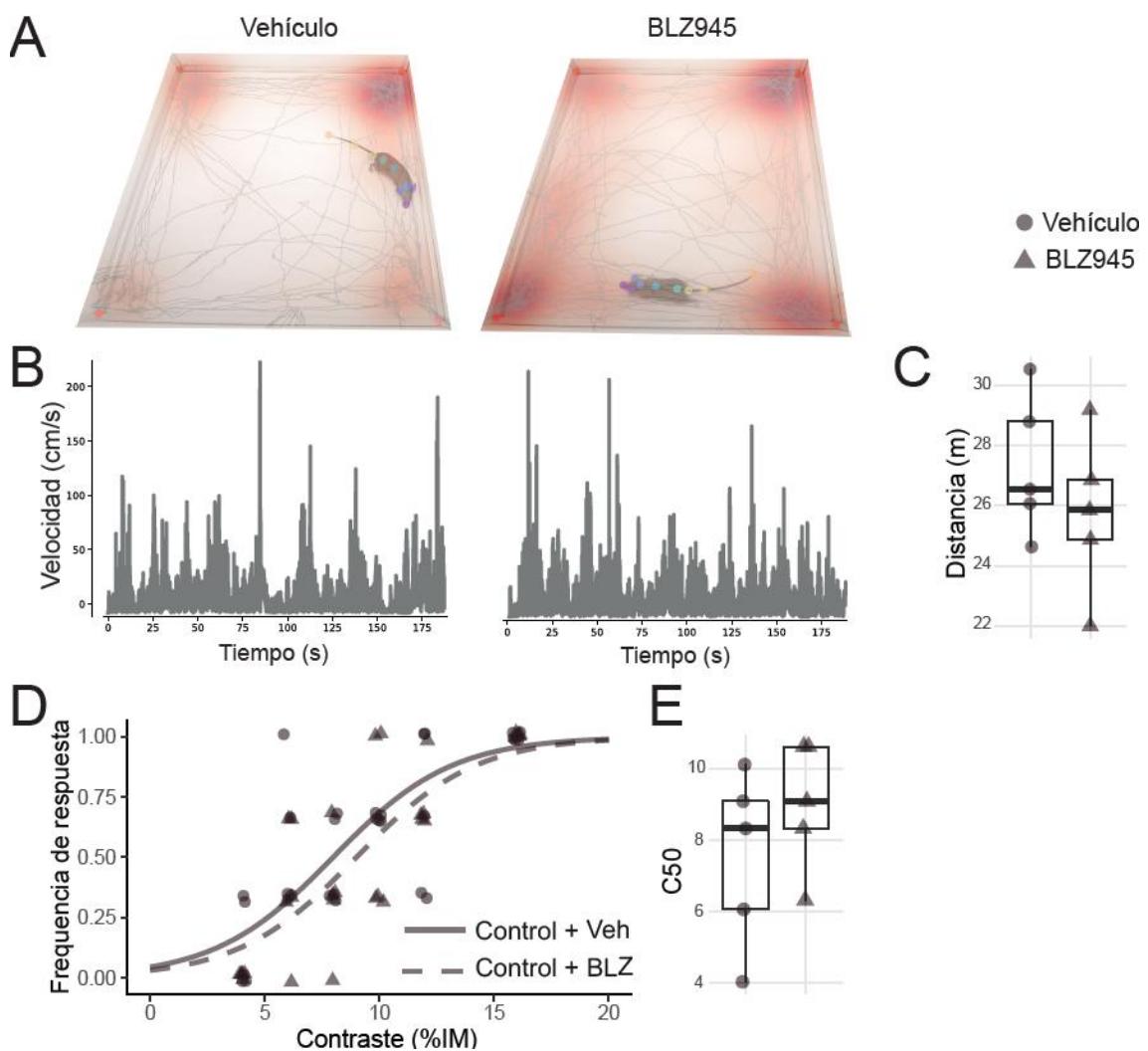


Figura 48. Efecto del tratamiento con BLZ945 sobre la función motora y la respuesta al TLCV en animales control. A) Imágenes representativas de la posición de los animales en la arena experimental durante el período de exploración previo a la aplicación de los estímulos. B) Velocidad de desplazamiento de los animales durante el período de exploración previo a la aplicación de los estímulos. C) Distancia recorrida por los animales durante el período de exploración previo a la aplicación de los estímulos. D) Frecuencia de respuesta en el TLCV. Los puntos representan las frecuencias individuales de cada animal mientras que las curvas representan las predicciones del modelo para cada grupo experimental. E) Valores de C50. Cada punto representa el valor de C50 correspondiente a un animal. El tratamiento con BLZ945 no afectó ninguno de estos parámetros en animales control en el DPN 60. Se utilizó un animal por camada, $n = 5$.

Efecto de la administración de BLZ945 en animales sometidos a SMDT

Habiendo demostrado que la administración de BLZ945 entre los DPN 35 y 60 no afectó la función visual, ni la estructura retiniana en animales control, se examinó el efecto de la depleción microglial en animales expuestos a SMDT. Como se observa en la Figura 49, el tratamiento con BLZ945 también fue efectivo en depletar la microglía en ratones sometidos a SMDT.

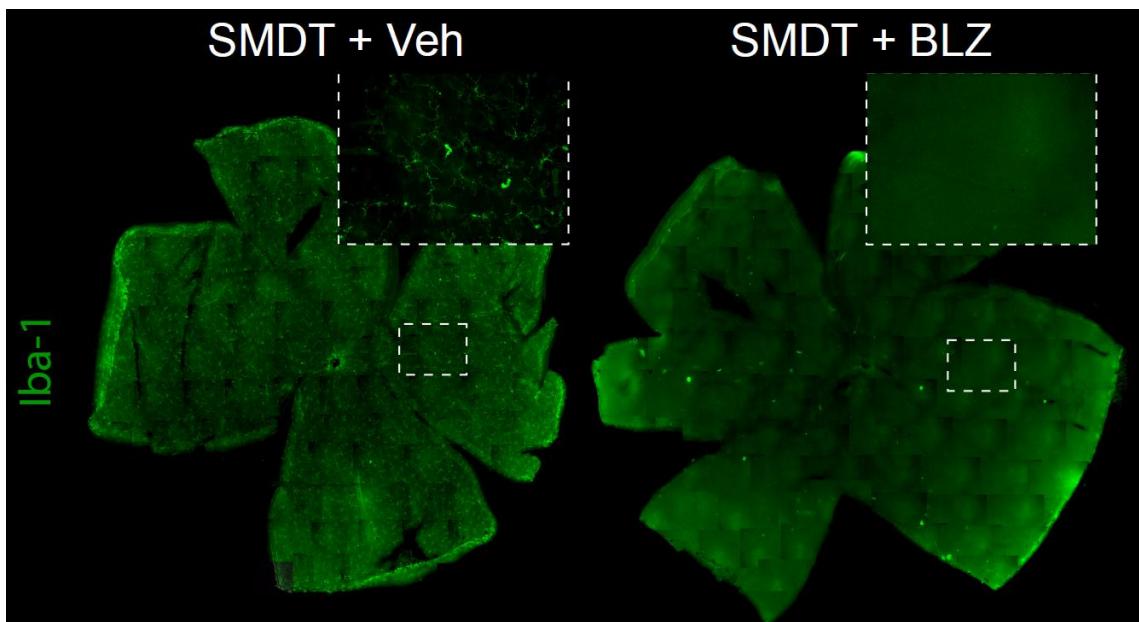


Figura 49. Análisis de células microgliales en retinas de animales expuestos a SMDT y tratados con BLZ945. Reconstrucciones (a partir de microfotografías) de retinas inmunomarcadas con Iba-1 de animales sometidos a SMDT en el DPN 60, tratados con vehículo o BLZ945 entre los DPN 35 a 60. El tratamiento con BLZ945 fue efectivo en depletar las células Iba-1 (+).

En el DPN 60, los animales expuestos a SMDT tratados con BLZ945 exhibieron valores de amplitud de las REU y RFN mayores que los animales expuestos a SMDT tratados con vehículo (Figura 50).

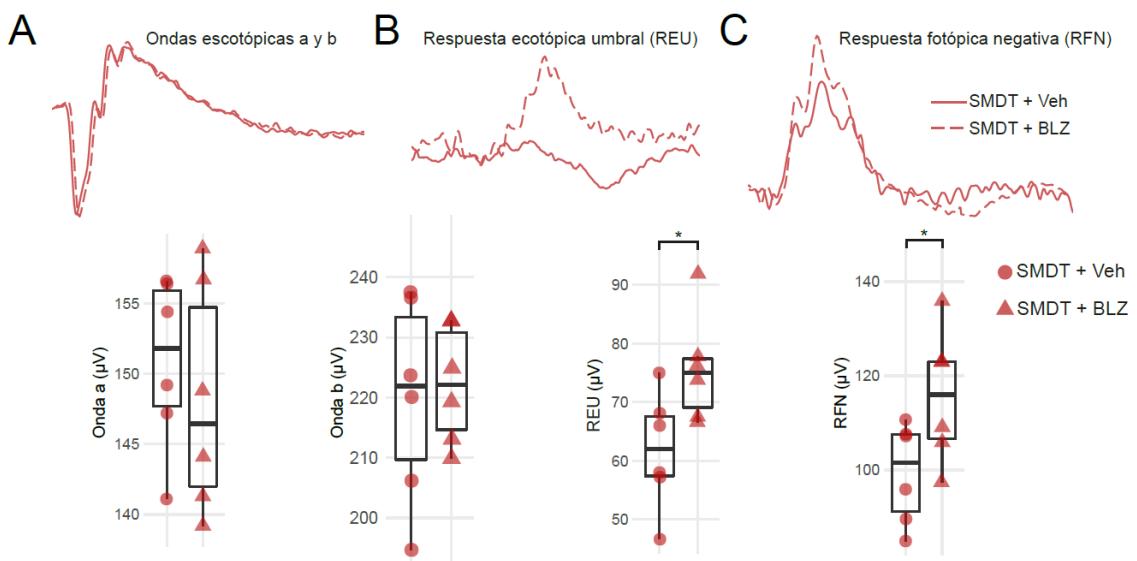


Figura 50. Efecto del tratamiento con BLZ945 sobre la función retiniana de animales expuestos a SMDT.

A) Registros representativos de ERG escotópicos a 10 cd y cuantificación de la amplitud de las ondas a y b. B) Registros representativos de ERG escotópicos a 0.03 mcd y cuantificación de la REU. C) Registros representativos de ERG fotópicos a 25 cd y cuantificación de la RFN. El tratamiento con BLZ945 aumentó la amplitud de la REU y la RFN en el DPN 60, sin modificar las amplitudes de las ondas a y b. Se utilizó un animal por camada, $n = 6$. * $p < 0,05$.

Asimismo, se observó un número mayor de células Brn3a (+) a los 60 días de edad en los animales expuestos a SMDT tratados con BLZ945 (Figura 51).

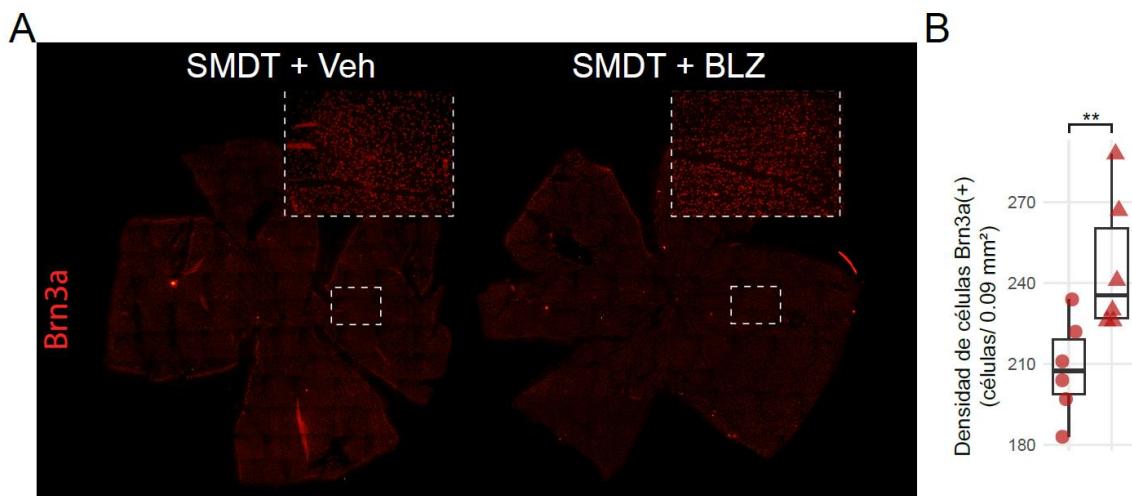


Figura 51. Efecto del tratamiento con BLZ945 sobre el número de células Brn3a (+) en animales expuestos a SMDT. A) Reconstrucciones (a partir de microfotografías) de retinas inmunomarcadas con Brn3a de animales sometidos a SMDT, tratados con vehículo o BLZ945 entre los DPNs 35 a 60. B) Cuantificación del número de células Brn3a (+). El tratamiento con BLZ945 evitó significativamente la caída el número de células Brn3a (+) en el DPN 60 inducida por la exposición a SMDT. Se utilizó un animal por camada, $n = 6$. ** $p < 0,01$.

Finalmente, los animales expuestos a SMDT tratados con BLZ945 mostraron en el DPN 60, un mejor desempeño en el TLCV comparado con los animales expuestos a SMDT tratados con vehículo (Figura 52).

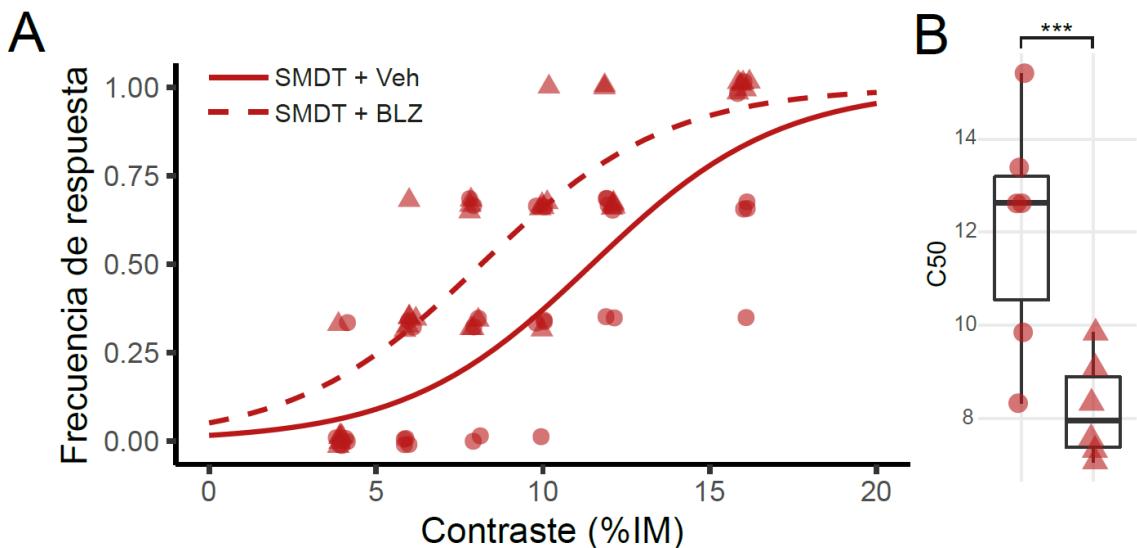


Figura 52. Efecto del tratamiento con BLZ945 sobre la respuesta al TLVC en animales sometidos a SMDT.
A) Frecuencia de respuesta en función de la magnitud del contraste. Los puntos representan las frecuencias individuales de cada animal, mientras que las curvas representan las predicciones del modelo para cada grupo experimental. B) Valores de C50. Cada punto representa el valor de C50 correspondiente a un animal, Los animales tratados con BLZ945 mostraron un mejor desempeño en el TLCV que los animales tratados con vehículo en el DPN 60. Se utilizó un animal por camada, n = 6. ***p < 0,001.

En conjunto, estos resultados demuestran que la depleción de microglía previno significativamente las alteraciones en la retina, así como el déficit en la función visual en ratones adultos sometidos a SMDT.

VI. Estudio del estrés oxidativo en la retina de ratones expuestos a SMDT

Diversas evidencias experimentales propias y de otros grupos sugieren que las CGR son particularmente susceptibles al daño oxidativo (Moreno y col., 2004; Lundmark y col., 2006; Qu y col., 2010). En este contexto, dado que la exposición a SMDT afecta particularmente a las CGR, resultó de interés evaluar la participación del daño oxidativo en las alteraciones

retinianas inducidas por el EVT. En primer lugar, se analizó la presencia de marcadores de estrés oxidativo en cortes transversales de retina de animales sometidos a SMDT y sacrificados en el DPN 45. Particularmente en la CCG, la exposición a SMDT aumentó significativamente la inmunorreactividad para 4-hidroxi-2-nonenal (4HNE), un marcador de peroxidación lipídica, (Figura 53).

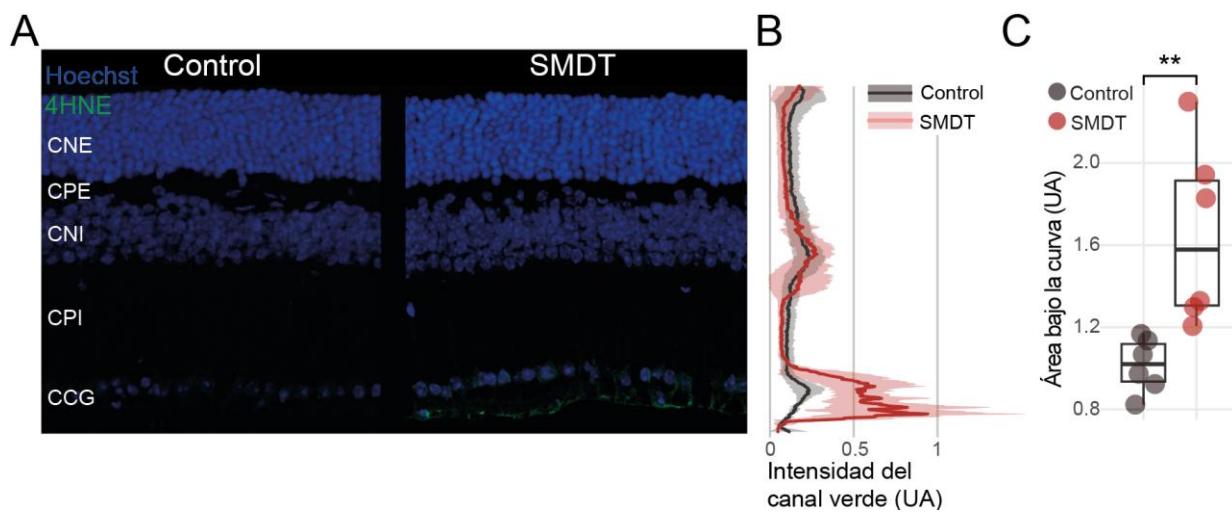


Figura 53. Niveles retinianos de 4HNE en el DPN 45. A) Microfotografías confocales representativas de la inmunorreactividad para 4HNE en cortes transversales de retina. B) Cuantificación de la intensidad de 4HNE. Las líneas sólidas representan el promedio de intensidad de marca por grupo y las sombras el desvío estándar. C) Cuantificación del área bajo las curvas representadas en B. La exposición a SMDT provocó un aumento en la inmunomarcación de 4HNE en la CCG. Se utilizó un animal por camada, $n = 6$. ** $p < 0.01$. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna, CCG, capa de células ganglionares.

Asimismo, la exposición a SMDT aumentó significativamente los niveles de nitrotirosina (marcador de daño nitrosativo) en la CCG, como se muestra en la Figura 54.

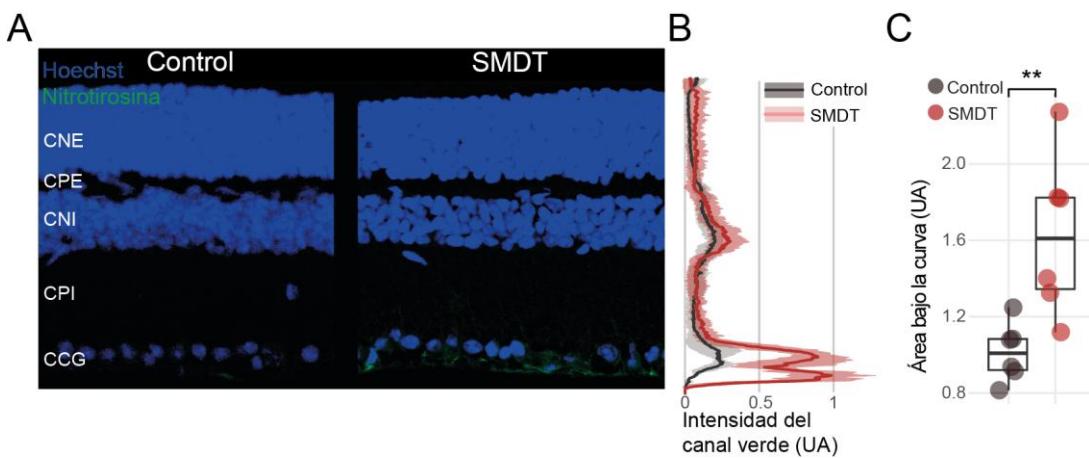


Figura 54. Niveles retinianos de nitrotyrosina en el DPN 45. A) Microfotografías confocales representativas de la inmunorreactividad para nitrotyrosina en cortes transversales. B) Cuantificación de la intensidad de la señal. Las líneas sólidas representan el promedio de intensidad de marca por grupo y las sombras en gris el DE. C) Cuantificación del área bajo las curvas representadas en B. La exposición a SMDT provocó un aumento en la immunomarcación de nitrotyrosina en la capa de CGR. Se utilizó un animal por camada, $n = 6$. ** $p < 0,01$. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CGR, capa de células ganglionares.

A continuación, se analizó el contenido mitocondrial de anión superóxido en la CGR en preparados de montaje plano, mediante el uso de la sonda *MitoSox*, como se muestra en la Figura 55. La exposición a SMDT provocó un marcado aumento en la cantidad de células conteniendo mitocondrias *MitoSox* (+).

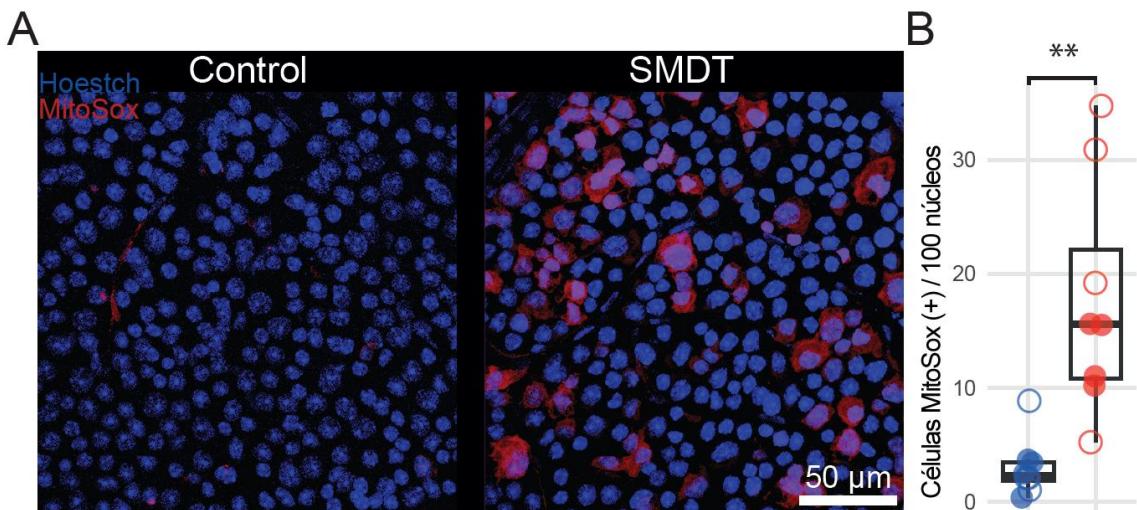


Figura 55. Niveles mitocondriales de anión superóxido en la capa de células ganglionares en el DPN 45. A) Microfotografías confocales representativas de la CGR de retinas en montaje plano incubadas con la sonda *MitoSox*. B) Cuantificación del número de células conteniendo mitocondrias *MitoSox* (+) en relación con la cantidad de núcleos marcados con Hoechst. La exposición a SMDT provocó un aumento significativo en este parámetro. Se utilizó un animal por camada, $n = 8$, ** $p < 0,01$.

En conjunto, estos resultados demuestran la presencia de marcadores de estrés oxidativo en la retina interna de animales sometidos a SMDT en el DPN 45, que precede a la pérdida de células CGR Brn3a (+).

Efectos del tratamiento con melatonina sobre marcadores de estrés oxidativo en el DPN 45

Como se mencionó en la Introducción, trabajos previos de nuestro grupo y de otros laboratorios han demostrado que la melatonina es un efectivo antiinflamatorio y antioxidante ocular. Sobre la base de las propiedades antioxidantes y antiinflamatorias de la melatonina, y considerando los antecedentes mencionados en la Introducción sobre la participación del daño oxidativo y la inflamación en el daño inducido por EVT, junto con los resultados descriptos en la sección anterior, se decidió analizar el efecto de la melatonina en el contexto del daño visual inducido por la exposición a SMDT en animales adultos. Para ello, se administró un *pellet* subcutáneo de melatonina o un tratamiento simulado en el DPN 35 (ver Materiales y Métodos) y se evaluaron diversos aspectos de la función visual. En el DPN 45, la melatonina, que careció de efecto *per se*, redujo significativamente la inmunorreactividad de 4HNE en cortes transversales de retina (Figura 56).

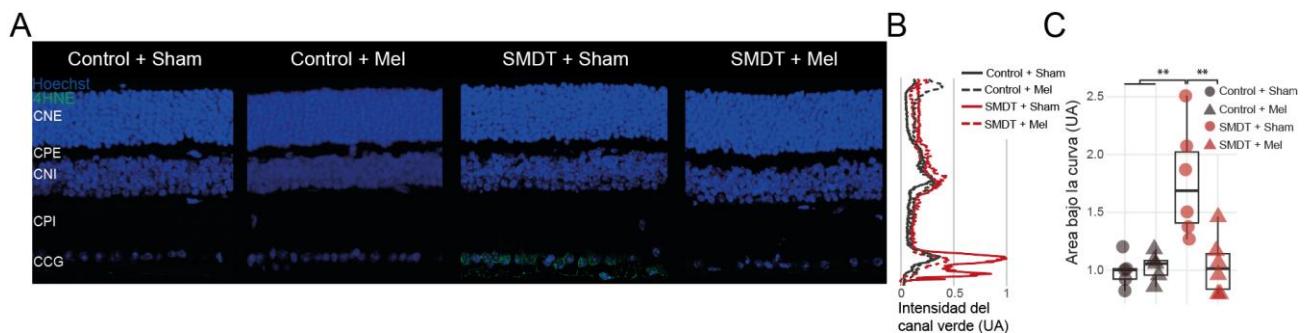


Figura 56. Efectos del tratamiento con melatonina sobre los niveles retinianos de 4HNE en el DPN 45. A) Microfotografías confocales representativas de la inmunorreactividad de 4HNE en cortes transversales de retina. B) Cuantificación de la intensidad de 4HNE. Las líneas representan el promedio de la intensidad de marca por grupo. C) Cuantificación del área bajo la curva de las curvas representadas en B. El tratamiento con melatonina previno el aumento en la immunomarcación de 4HNE provocado por la exposición SMDT. Se utilizó un animal por camada, n = 5. **p < 0,01. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares.

Asimismo, el tratamiento con melatonina redujo significativamente la inmunorreactividad para nitrotyrosina en cortes transversales de retina (Figura 57).

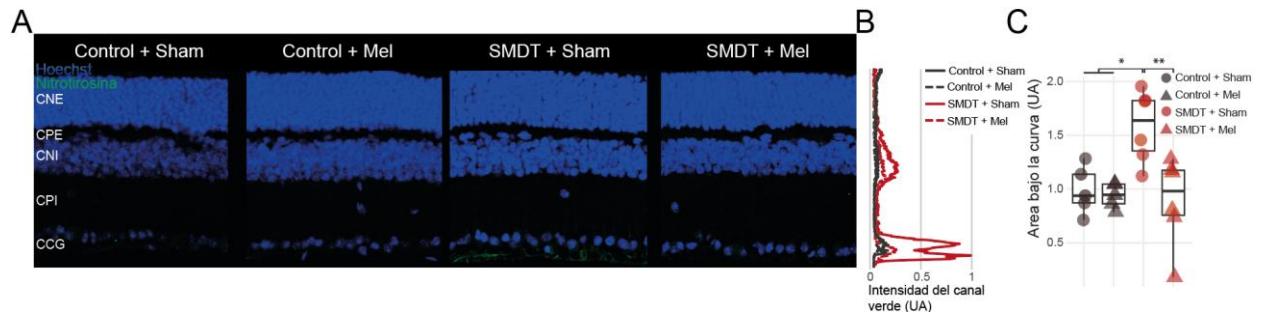


Figura 57. Efecto del tratamiento con melatonina sobre los niveles retinianos de nitrotyrosina en el DPN 45. Microfotografías confocales representativas de inmunorreactividad de nitrotyrosina en cortes transversales. B) Cuantificación de la intensidad de la marca de nitrotyrosina. Las líneas representan el promedio de intensidad de marca por grupo. C) Cuantificación del área bajo las curvas representadas en B. El tratamiento con melatonina previno el aumento en la inmunomarcación para nitrotyrosina provocado por la exposición a SMDT. Se utilizó un animal por camada, $n = 5$. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares.

La melatonina también previno el aumento en la cantidad de células conteniendo mitocondrias MitoSox (+), como se muestra en la Figura 58.

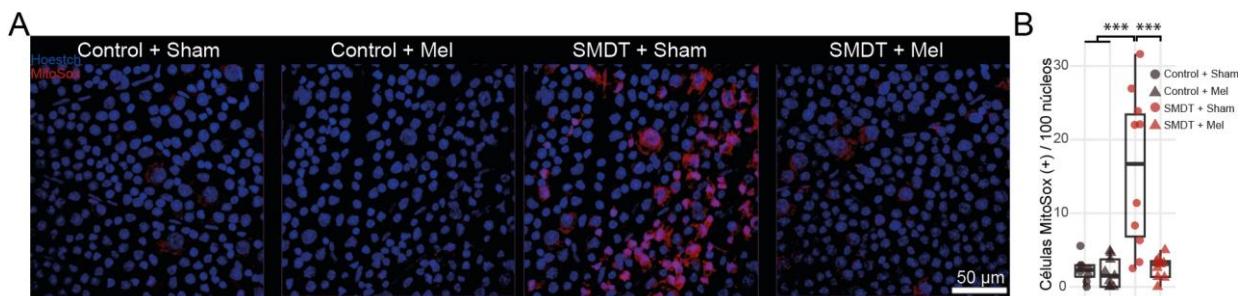


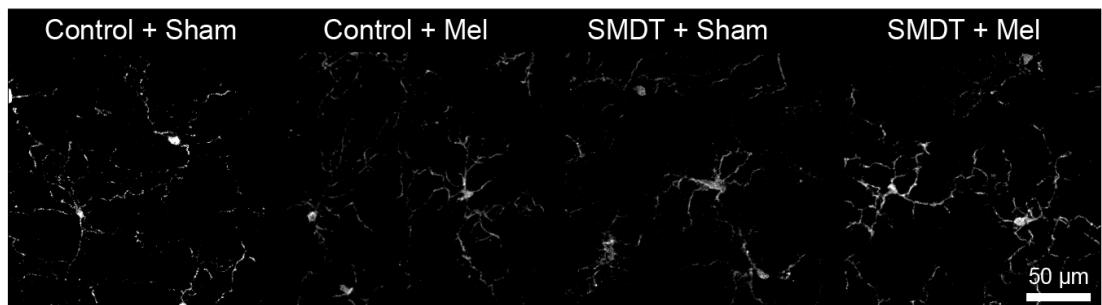
Figura 58. Efectos del tratamiento con melatonina sobre los niveles mitocondriales de superóxido en el DPN 45. A) Microfotografías confocales representativas de la CCG en retinas en montaje plano, incubadas con la sonda MitoSox. B) Cuantificación del número de células con mitocondrias MitoSox (+) en relación con la cantidad de núcleos marcados con Hoechst. El tratamiento con melatonina previno el aumento en el número de células conteniendo mitocondrias MitoSox (+) inducido por la exposición a SMDT. Se utilizó un animal por camada, $n = 8-10$. *** $p < 0,001$.

Efecto del tratamiento con melatonina sobre la retina y la función visual de animales sometidos a SMDT

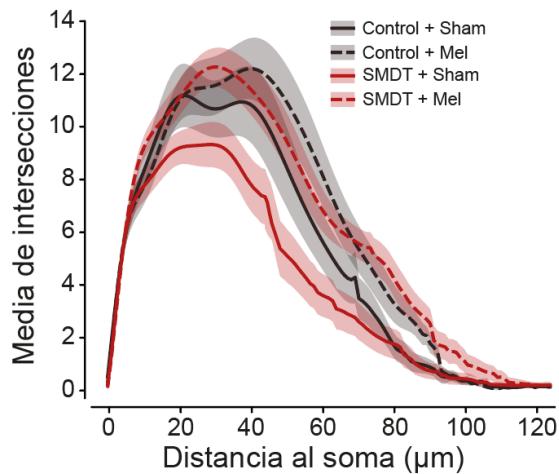
A continuación, se analizó el efecto del tratamiento con melatonina sobre la morfología de las células microgliales en la CCG. En el DPN 60, el tratamiento con melatonina previno los

cambios morfológicos microgliales observados en la retina interna de animales expuestos a SMDT (Figura 59).

A



B



C

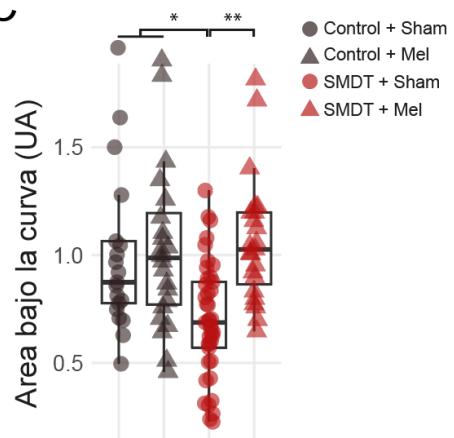


Figura 59. Efecto de la melatonina sobre la morfología de la microglía retiniana en el DPN 60. A) Microfotografías confocales representativas de retinas en montaje plano, inmunomarcadas con Iba-1. B) Análisis de Sholl de células microgliales en la capa de CGR. C) Área bajo las curvas representadas en B; cada punto representa una célula. La melatonina previno significativamente el cambio morfológico microglial provocado por la exposición a SMDT. Se utilizó un animal por camada, n = 6 - 7. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

A nivel funcional, el tratamiento con melatonina previno significativamente la disfunción de las CGR, como lo demuestra la preservación de la amplitud de la REU y la RFN en el DPN 60 (Figura 60). La melatonina no afectó la amplitud de las ondas a y b ni de los POs (datos no mostrados).

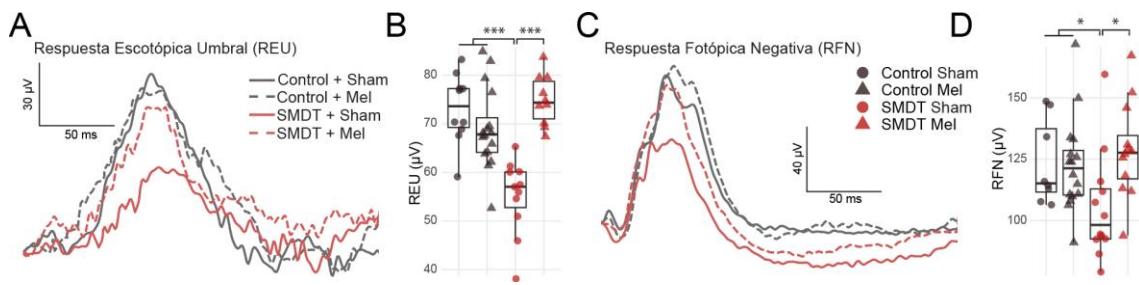


Figura 60. Efecto del tratamiento con melatonina sobre la función retiniana en el DPN 60. A) Registros representativos de ERG escotópicos a 0,03 mcd. B) Cuantificación de la amplitud de la REU. C) Registros representativos de ERG fotópicos a 25 cd. D) Cuantificación de la amplitud de la RFN. El tratamiento con melatonina previno la disfunción de las CGR inducida por exposición a SMDT. Se utilizó un animal por camada, n = 6. *p < 0,05; **p < 0,01.

Asimismo, el tratamiento con melatonina, que careció de efecto *per se*, previno significativamente el aumento en el C50 inducido por la exposición a SMDT (Figura 61)

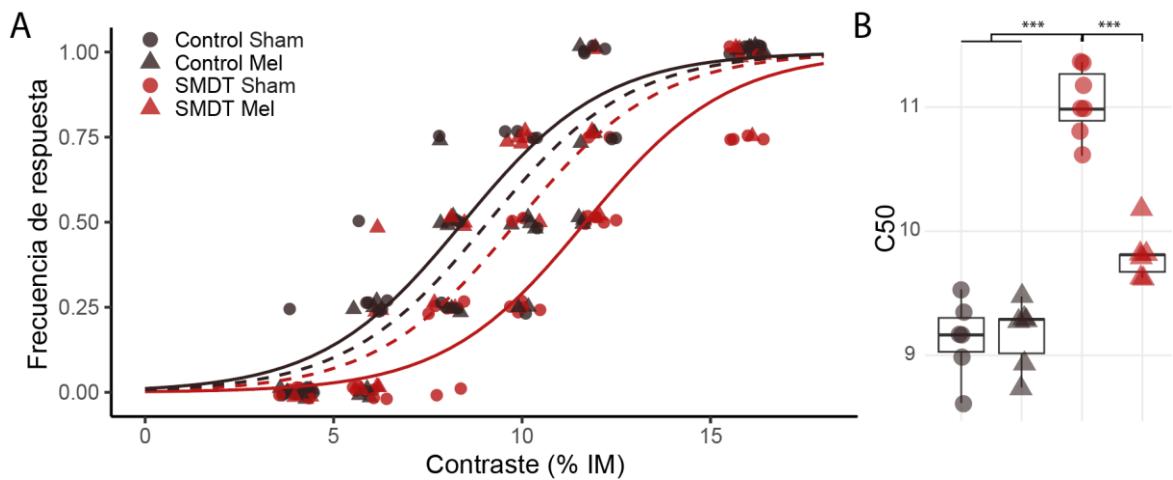


Figura 61. Efecto del tratamiento con melatonina sobre la respuesta al TLVC. A) Frecuencia de respuesta en el TLVC en el DPN 60. Los puntos representan las frecuencias individuales de cada animal, en tanto que las curvas representan las predicciones del modelo para cada grupo experimental. B) Valores de C50. Cada punto representa el valor de C50 correspondiente a un animal. El tratamiento con melatonina previno el aumento del C50 inducido por exposición a SMDT. Se utilizó un animal por camada, n = 5 - 8. ***p < 0.001.

En este mismo sentido, el tratamiento con melatonina previno significativamente la pérdida de CGR Brn3a (+), como se muestra en la Figura 62.

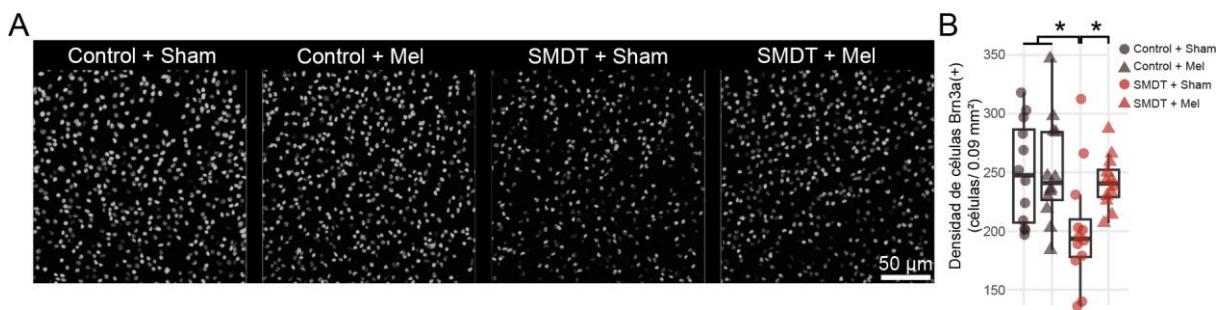


Figura 62. Efecto del tratamiento con melatonina sobre número de CGR Brn3a (+) en el DPN 60. A) Microfotografías confocales representativas de la inmunorreactividad para Brn3a en retinas en montaje plano. B) Cuantificación del número de células Brn3a (+). El tratamiento con melatonina previno significativamente la disminución en el número de CGR Brn3a (+) inducida por exposición a SMDT. Se utilizaron dos animales por camada, n = 5 - 6. *p < 0,05.

En suma, estos resultados demuestran que un tratamiento con melatonina previno las alteraciones de las funciones visuales y del número de CGR, presumiblemente a través de mecanismos antioxidantes y de preservación de la morfología de las células microgliales.

VII. Efecto de la exposición a ambiente enriquecido sobre la función visual de animales adultos expuestos a SMDT

Como se mencionó en la Introducción, en nuestro laboratorio se ha demostrado que la exposición a AE es una terapia efectiva en múltiples modelos de daño retiniano, actuando posiblemente a través de mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios. En este contexto, se analizó el efecto de la exposición a AE sobre los efectos de la SMDT en ratones adultos. Los resultados obtenidos demuestran que la exposición a AE a partir del DPN 35 (AE35) evitó la caída en la amplitud de la REU y la RFN en animales expuestos a SMDT en el DPN 60. Animales expuestos a SMDT albergados en AE a partir del DPN 45 (AE45) no mostraron cambios en estos parámetros con respecto a animales expuestos a SMDT que permanecieron en ambiente estándar (AS) (Figura 63). La exposición a AE35 no afectó las amplitudes de las ondas a, y b ni de los POs (datos no mostrados).

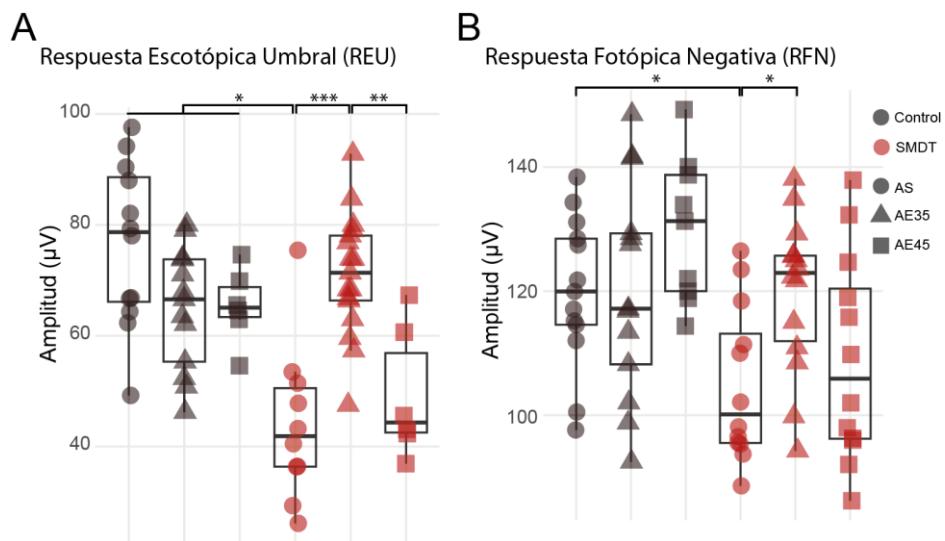


Figura 63. Efecto de la exposición a AE sobre la función retiniana. A) Cuantificación de la REU. B) Cuantificación de la RFN. La exposición a AE iniciada en el DPN 35 previno la disminución en las amplitudes de la REU y la RFN inducidas por la exposición a SMDT. La exposición a AE iniciado en el DPN 45 careció de efecto sobre ambos parámetros. Se utilizó un animal por camada, n = 6-7. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

La exposición a AE35 (pero no a AE45) previno la disminución en la sensibilidad al contraste (es decir, el aumento del C50) inducido por la exposición a SMDT en el DPN 60 (Figura 64).

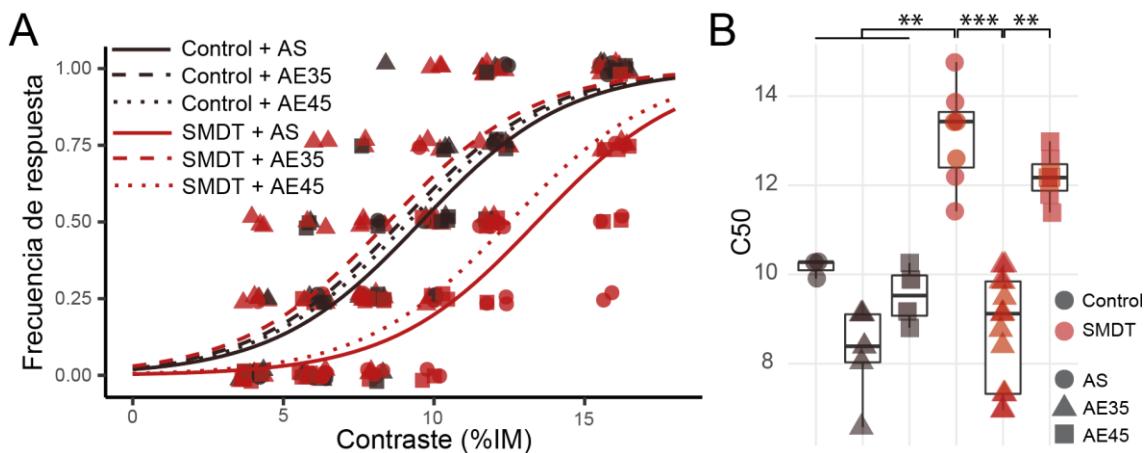


Figura 64. Efecto de la exposición a AE sobre la respuesta al TLVC. A) Frecuencia de respuesta en el TLVC. Los puntos representan las frecuencias individuales de cada animal mientras que las curvas representan las predicciones del modelo para cada grupo experimental. B) Valores de C50. Cada punto representa el valor de C50 correspondiente a un animal. El AE previno el aumento en el C50 inducido por exposición a SMDT cuando se inició partir del DPN 35, pero no a partir del DPN 45. Se utilizó un animal por camada, n = 4 - 8. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Consistentemente con la protección funcional, la exposición a AE35 (pero a AE45 previno la pérdida de CGR inducida por la exposición a SMDT en el DPN 60, como se muestra en la

Figura 65.

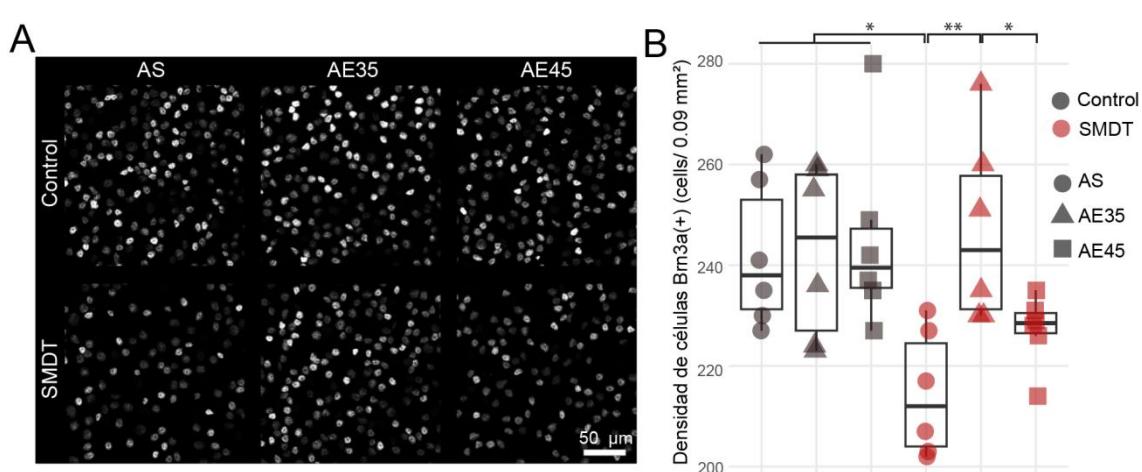


Figura 65. Efecto de la exposición a AE sobre el número de CGR. A) Microfotografías confocales representativas de la inmunorreactividad para Brn3a en retinas en montaje plano. B) Cuantificación de células Brn3a. La exposición a AE previno la disminución en el número de CGR Brn3a (+) inducida por la exposición a SMDT, cuando se inició a partir del DPN 35. Se utilizó un animal por camada, n = 6. *p < 0,05, **p < 0,01.

Estos resultados demuestran que la exposición a AE previno los efectos de la exposición a SMDT en el sistema visual de ratones adultos. Asimismo, estos resultados sugieren la existencia de una ventana temporal, para el efecto terapéutico de la exposición a AE frente al daño visual inducido por la exposición a SMDT.

DISCUSIÓN

En el período crítico durante el desarrollo, el estrés (en sus distintas variantes) puede producir efectos adversos en numerosas funciones fisiológicas, comportamentales y psicológicas, causando impactos permanentes en la salud (Endo y col., 2021; Nishi y col., 2014). Entre los sistemas afectados por el EVT, el SNC es particularmente susceptible. El cerebro humano madura y se “organiza” rápidamente durante el período perinatal (Semple y col., 2013), lo que lo hace particularmente vulnerable a las experiencias negativas durante esta etapa (Levine, 2005). El período postnatal se caracteriza por una alta plasticidad neuronal y de la organización sináptica, lo que confiere al cerebro la capacidad de remodelación inducida por factores ambientales, como la exposición a la adversidad (tanto biológica como psicosocial), que pueden imprimir cambios neuroquímicos, neuroendócrinos, morfológicos y comportamentales significativos que persisten en la etapa adulta (Di Segni y col., 2018). A diferencias de otras estructuras sensoriales como la cóclea o los receptores sensitivos de la piel, la retina no es una estructura periférica, sino que forma parte del SNC. Por lo tanto, la vía visual en general y la retina en particular, podrían constituir blancos significativos de los efectos persistentes del EVT, análogamente a lo descripto en otras áreas del SNC. La visión no sólo está relacionada con la percepción de la escena visual, sino que también regula funciones neuroconductuales críticas, como los ciclos circadianos y diversos procesos metabólicos fundamentales que contribuyen a mantener la homeostasis (Bass y col., 2010; Golombok y col., 2010). Estudios en modelos animales han demostrado que deficiencias visuales pueden provocar un aumento en la intensidad del estrés y la ansiedad, así como comportamientos de tipo depresivo y déficits en el aprendizaje (LeGates y col., 2012). Estos hallazgos subrayan la importancia de la integridad del sistema visual no sólo para la percepción del entorno, sino también para el

mantenimiento de un equilibrio emocional y cognitivo. A pesar de los profundos efectos del EVT en el SNC y la importancia central de la visión, al inicio de esta tesis no se disponía de datos sobre las consecuencias del EVT a nivel del sistema visual. En este contexto, la hipótesis central de esta tesis es que la alteración de las funciones visuales y/o el aumento de la vulnerabilidad retiniana frente a la adversidad temprana podrían formar parte del conjunto de las múltiples secuelas del EVT, e incidir desfavorablemente en la vida adulta. Para analizar la viabilidad de esta hipótesis es esencial el uso de modelos experimentales dado que el estudio del efecto del EVT en humanos enfrenta diversas limitaciones: i) una gran variabilidad en el momento en que comienza el estrés, así como el tipo, la duración, y la intensidad del estrés, etc. ii) los estudios longitudinales implican muy altos costos; e iii) los resultados dependen en gran medida de la memoria de los individuos sobre los eventos que ocurrieron en la infancia, siendo muy comunes los falsos recuerdos, sobre todo los “recuerdos emocionales” (Banqueri y col., 2017). En cambio, los modelos animales de EVT permiten controlar la duración, la intensidad y el tipo de estrés. Además, el desarrollo ontogénico de los roedores es más corto, lo que hace más accesible el estudio de los efectos a largo plazo. Con el fin de evaluar la viabilidad de esta hipótesis, se puso a punto un protocolo de SMDT en ratones y se evaluaron las secuelas sobre la función y la estructura retinianas, así como la conexión con sus blancos sinápticos. Los efectos a largo plazo de la exposición a SMDT se analizaron en ratones adultos, mayoritariamente a partir del DPN 60. Según los trabajos de Finlay & Darlington (1995) y Semple y col. (2013), que estudian la cronometría de las especies, los últimos pasos importantes en el desarrollo cerebral de los ratones se producen alrededor de los 14 días después de la concepción, o DPN 14 (definiendo el día de nacimiento como DPN 0), la menstruación suele empezar entre los DPNs 25 y 40 y el crecimiento corporal se completa aproximadamente en el DPN 50. En esta

línea, los ratones entre la edad de DPN 0 y DPN 24 se denominan juveniles, los ratones entre DPN 25 y DPN 49 se denominan adultos tempranos y, a partir de entonces, los ratones son adultos. Además, según Dutta y col. (2016), la madurez sexual en los ratones, que coincide con el aumento en los títulos de gonadotrofina circulante, se alcanza a las 4 semanas de edad. Según Noailles y col. (2019), la retina del ratón está completamente desarrollada en el DPN 30. Por lo tanto, en este trabajo, se utilizó el DPN 60 como definición de ratón adulto, ya que se trata de un estándar razonable, que ha sido también utilizado por muchos otros autores (Chen y col., 2022; van Heijningen y col., 2022; Wang y col., 2022; Ferrer-Martín y col., 2014; y Manno y col., 2022).

Para obtener una herramienta que permita estudiar las secuelas de la exposición a SMDT sobre la visión en un sentido “más holístico”, se desarrolló el TLCV, un método que permite evaluar la sensibilidad al contraste y que aventaja a otras herramientas preexistentes de evaluación visual, como se discutirá a continuación.

Desarrollo del test de looming con variación de contrastes

Como se mencionó en la Introducción, el estímulo *looming* ha sido exitosamente utilizado para describir los circuitos neuronales involucrados en la detección de estímulos amenazantes y en los comportamientos innatos de defensa asociados (revisado por Wu & Zhang, 2023). Asimismo, este test ofrece una potencialidad adicional que no había sido previamente advertida; considerando que el estímulo consiste en un disco oscuro proyectándose sobre un fondo gris, este método podría utilizarse para determinar la sensibilidad al contraste disco/fondo. Aunque la influencia del tamaño angular y la velocidad de expansión del estímulo *looming* sobre el comportamiento evasivo ha sido previamente examinada (De Franceschi y col., 2016; Yang y col., 2020; Yilmaz & Meister, 2013), no se disponía de información sobre la respuesta dependiente del contraste en

roedores. Con el objetivo de aprovechar esta potencialidad, en esta tesis se propuso una adaptación del paradigma original: el test de *looming* con variación de contrastes (TLVC). Esta versión modifica sistemáticamente el contraste entre el disco oscuro y el fondo gris, lo que permitió determinar la sensibilidad al contraste de cada animal de manera cuantitativa. La sensibilidad al contraste es un aspecto fundamental de la visión. En general, a los humanos y a otros animales no les “interesa” especialmente la luminancia absoluta de los objetos, sino las diferencias de luminancia entre los componentes de la escena visual. Necesitamos poder reconocer los objetos por lo que son en una amplia gama de condiciones de iluminación, por lo que el nivel de luz absoluta en realidad debe eliminarse a medida que se procesa la información visual. La característica de los objetos que necesitamos registrar es su contraste, que es una medida del grado en que una parte difiere de otra. La “belleza del contraste” definido de esta manera, es que es una propiedad del objeto que estamos mirando, no de las condiciones de iluminación. Una serie de procesos en las retinas de los animales garantizan que veamos contrastes en lugar de luminancias puras. Mecanismos de adaptación de diversos tipos hacen que la señal que se transmite al cerebro sea más o menos independiente del nivel general de luz. La organización centro-periferia de las CGR es responsable de señalar diferencias de brillo entre partes adyacentes de la imagen, en lugar de valores de intensidad absolutos. Si bien algunas neuronas miden la intensidad luminosa para “informarnos” si es de noche o de día, no es ésa la función principal de la visión (Kandel y col., 2000; Land & Nilsson, 2013). En este contexto, la evaluación cuantitativa de la sensibilidad al contraste adquiere un valor biológico de relevancia.

Los ratones respondieron al estímulo *looming* con tres comportamientos estereotipados: *rearing*, *freezing* y *running*. El tipo de respuesta fue dependiente de la intensidad del

contraste: en contrastes medios la respuesta más frecuente fue el *rearing*, mientras que a altos contrastes predominó el *freezing*, en concordancia con la percepción de una mayor proximidad (es decir, mayor peligro) de una amenaza aérea. Consistentemente con estos resultados, se ha demostrado que la información de contraste del estímulo *looming* sesga el tipo de comportamiento defensivo también en peces dorados (*goldfish, Carassius auratus*) (Otero Coronel y col., 2020). En el caso de los ratones, al analizar estos comportamientos de manera binaria (es decir, como la capacidad de percibir el estímulo o la incapacidad de hacerlo de acuerdo a la ausencia de cualquiera de estas respuestas), observamos una relación sigmoidea entre la frecuencia de respuesta y la intensidad del contraste. Con modelos multivariados de tipo GLMM, utilizamos esta dependencia para analizar la contribución de otras variables a la frecuencia de respuesta. Se ha descripto que la sensibilidad al contraste en ratones difiere en función del sexo y la edad (van Alphen y col., 2009). Al analizar ratones de distintos sexos y edades en el TLVC, los datos indican que el contraste umbral para inducir una respuesta con una probabilidad del 50% ocurrió en el siguiente orden: machos viejos = hembras viejas > machos adultos > hembras adultas. En cuanto a la dispersión de los datos, el desvío estándar osciló entre el 7% (machos adultos) y el 18% (hembras adultas) de la media del C50. Basado en el enfoque de potencia estadística propuesto por Cohen (1988), para detectar una diferencia del 10% en la media del C50 entre dos poblaciones, por ejemplo, de machos adultos, con una potencia del 95%, se requiere un tamaño muestral de sólo 5 animales por grupo. Esto sugiere que el TLVC es un método altamente sensible, capaz de identificar diferencias pequeñas en la sensibilidad al contraste, incluso con tamaños muestrales reducidos. Desde una perspectiva ética y práctica, esta característica lo convierte en una herramienta valiosa para cumplir con el principio de reducción del uso de animales, sin comprometer la robustez estadística.

Se ha demostrado que la aplicación sistémica de N-metil-N-nitrosourea que elimina los fotorreceptores de la retina, provoca la desaparición del comportamiento innato frente al estímulo *looming* en ratones (Wang y col., 2021), pero no se disponía de información sobre qué tipo/s de fotorreceptor/es de la retina están involucrados en esta respuesta. Con esta nueva técnica fue posible disecar la contribución de las distintas células fotorreceptoras a la percepción del estímulo *looming*. Para ello, utilizamos líneas transgénicas en las cuales las distintas células fotorreceptoras fueron específicamente eliminadas. Los resultados indican que los distintos fotorreceptores contribuyeron a la respuesta de la siguiente manera: conos > bastones >> ipCGR. Estos resultados aportan información sobre cómo la retina integra señales visuales para generar respuestas innatas defensivas. En el ratón, existen dos tipos de conos: uno que expresa una opsina sensible a longitudes de onda cortas (S-opsina), y el otro, a longitudes de onda medias y largas (L-opsina), aunque la mayoría de los conos co-expresan ambas opsinas (Applebury y col., 2000; Chang y col., 2013; Lyubarsky y col., 1999). Los conos duales amplían el rango espectral al que un cono es sensible, permitiendo una mejor visión en composiciones espectrales variadas de luz ambiental (Peichl, 2005). La S-opsina codifica preferentemente el contraste en oscuridad (azul); de esta forma, los conos que expresan S-opsinas, cuyas densidades más altas se localizan en la retina ventral, podrían ser sensores del cielo para detectar presas aéreas, mientras que la L-opsina en la retina dorsal se utiliza para ver el suelo (Ortín-Martínez y col., 2014). Dado que la retina del ratón está dominada por bastones, consistentemente con su mayor actividad en la fase de oscuridad, el rol predominante de los conos en la respuesta al TLCV resultó sorprendente. Sin embargo, es importante considerar que el estímulo *looming* se presenta en rangos de iluminación mesópicos, un entorno donde tanto conos como bastones pueden contribuir a la visión. Además, la ubicación de los conos, y la co-

expresión de opsina S (sensibles en el rango del azul) y opsina L (sensibles en el rango verde-amarillo) en estos fotorreceptores, puede conferir una flexibilidad espectral que mejore la detección de depredadores aéreos en contraste con el cielo, característica que podría ser etológicamente relevante. El procesamiento de señales en las vías retinianas centradas en conos, con antagonismo centro-periferia, podría proporcionar las condiciones necesarias para detectar cambios sutiles en el contraste del estímulo respecto a su entorno. En comparación con otros métodos para la evaluación de la integridad de la función visual, varios aspectos respaldan las ventajas TLVC: 1) a diferencia del ERG, no requiere anestesia; 2) a diferencia del reflejo optocinético, no necesita cirugía para implantar un dispositivo de fijación al cráneo (Cahill y col., 2008); 3) a diferencia de la respuesta optomotora, no requiere entrenamiento del experimentador para detectar subjetivamente movimientos sutiles de la cabeza del ratón (Douglas y col., 2005); 4) a diferencia del *visual water task* (tarea visual en una piscina con una plataforma) (Prusky y col., 2000), los roedores no requieren una fase de aprendizaje/entrenamiento; 5) tiene un bajo costo y requiere una configuración muy sencilla, en la que los estímulos visuales son fáciles de generar, son precisos y altamente controlables; 6) los animales pueden evaluarse individualmente en un plazo relativamente corto, proporciona una medición cuantitativa (es decir, el C50) con baja dispersión, que puede utilizarse como índice de sensibilidad al contraste. Por tanto, el TLVC podría ser una herramienta no invasiva para probar nuevos modelos experimentales de discapacidad visual en roedores, así como para evaluar la eficacia de tratamientos terapéuticos.

En suma, estos resultados han permitido desarrollar un nuevo método para medir la sensibilidad al contraste en ratones, mediante la respuesta innata al estímulo *looming*, que

fue dependiente del sexo y la edad y requirió de la participación diferencial de distintos fotorreceptores retinianos.

Efecto de la separación materna con destete temprano sobre la función visual en ratones adultos

En primer lugar, evaluamos medidas morfométricas como el peso corporal o el momento de apertura de ojos. Si bien se ha demostrado que el EVT aumenta el riesgo de desarrollar obesidad (Leachman y col., 2020), en nuestro entorno experimental, el peso corporal aumentó progresivamente hasta la edad adulta, indistintamente entre ambos grupos. Por otro lado, no se observó pérdida de peso en los animales sometidos a SMDT, posiblemente porque la SM ocurrió en la fase de luz, en tanto que los ratones se alimentan en la fase de oscuridad. No se observaron alteraciones tampoco en el momento de apertura de los ojos en animales sometidos a SMDT.

Para analizar cambios funcionales de la retina, se registraron ERG de flash, una prueba que también se utiliza en humanos con fines diagnósticos y mide la actividad eléctrica de la retina en respuesta a un flash luminoso de muy corta duración. La onda a del ERG es ampliamente reconocida como un índice de la actividad de conos y bastones, la onda b es generada por una combinación de la actividad de las células bipolares y de Müller y se estima que los POs se originan principalmente en las células amácrinas (Wachtmeister, 1998). Los resultados indicaron que las funciones de la retina externa y media se conservaron en animales sometidos a SMDT. En contraste, la exposición a SMDT indujo una disminución significativa en la amplitud de la REU y la RFN, que son índices de la función de las CGR, tanto en roedores como en humanos (Botelho y col., 2021; Bui & Fortune, 2004).

Para analizar si estos cambios en la respuesta funcional de la retina podrían impactar al sistema visual a nivel central, se analizó la conectividad de la retina con sus principales blancos sinápticos. Los VEPs reflejan la actividad de todas las células en la vía

fotorreceptores-corteza visual y, como tales, son reconocidos como una herramienta útil para investigar la función de la vía visual en su conjunto. La exposición a SMDT indujo una disminución en la amplitud de los VEPs, lo que podría correlacionarse con una disfunción de las CGR y/o con alteraciones post-retinianas. En esta línea, la exposición a SMDT indujo una clara reducción en el transporte anterógrado de CTB desde la retina al CS, el principal blanco sináptico de las CGR en ratones. Este resultado respalda que la exposición a SMDT provocó no sólo una disfunción de las CGR, sino también un déficit en la conexión de la retina con su principal blanco central.

En cuanto al análisis estructural, en consonancia con los resultados de las ondas a y b del ERG, el análisis histológico demostró una preservación de la estructura de la retina externa/media, en tanto que consistentemente con los resultados de la amplitud de las REU y RFN, la exposición a SMDT indujo una disminución significativa en el número de CGR en ratones adultos. Además, la exposición a SMDT redujo los niveles de sinaptofisina (una proteína integral de membrana localizada en las vesículas sinápticas) en la capa plexiforme interna (pero no externa). La SMDT aumentó el área positiva para Iba-1 (un índice de la densidad de microglía/macrófagos), así como el tamaño del soma de las células Iba-1 (+) (sólo en la retina interna), lo que sugiere un aumento en la reactividad y/o infiltración de microglía/macrófagos, así como cambios en su fenotipo, de una morfología ramificada a una ameboide. En concordancia, se ha demostrado que la exposición a SMDT disminuye la expresión de sinaptofisina y aumenta la activación microglial en el hipocampo y la corteza prefrontal de ratones (Bachiller y col., 2020; Reshetnikov y col., 2020).

Para analizar más “holísticamente” la función visual se examinó el comportamiento de los animales sometidos a SMDT en tests comportamentales guiados visualmente. Aunque el EVT afecta el rendimiento en varias pruebas comportamentales en la etapa adulta, como la

prueba de campo abierto, el laberinto elevado en cruz, el test de preferencia por sacarosa o de nado forzado y la prueba de suspensión por la cola, entre otras (Bian y col., 2021; Han y col., 2019; Qin y col., 2021), el efecto de la exposición a SMDT en pruebas comportamentales basadas específicamente en la visión no había sido previamente analizado. La prueba del abismo visual evalúa la percepción binocular de profundidad como resultado de la integridad funcional de la vía retino-genículo-cortical (Fox, 1965), y como ya se mencionó, la respuesta al estímulo *looming* utilizado en el TLCV, es un reflejo que también depende exclusivamente de señales visuales y de la integridad de la vía retino-colicular (Yilmaz y col., 2013). La exposición a SMDT alteró el rendimiento en ambas pruebas comportamentales, lo que sugiere que animales sometidos a SMDT tienen una percepción de profundidad y contraste alterada. Dado que la exposición a SMDT no afectó la actividad locomotora (evaluada antes de la aplicación de los estímulos en el TLVC), la disminución en el rendimiento en estas pruebas puede atribuirse a un déficit en el *input* visual. Si bien la única forma de percibir el estímulo de *looming* es a través de la visión, también podría argumentarse que las diferencias en la respuesta se deben a cambios en otras áreas cerebrales, por ejemplo, a diferencias en los circuitos que evalúan el riesgo asociado a este estímulo. Para asegurar que la disminución en la respuesta al TLVC involucra una deficiencia en la percepción visual, se evaluó la regulación del gen inmediato-temprano c-fos (un indicador de actividad neuronal) inducida por el estímulo *looming* en la zona superficial del CS, donde se ubican la capa retino-receptiva. Consistentemente con el transporte anterógrado disminuido desde la retina hasta el CS, la activación de c-fos inducida por el estímulo fue menor en animales adultos expuestos a SMDT que en sus respectivos controles. Este resultado, junto al hecho de que la respuesta al *looming* depende de la comunicación retina-CS (Wu y col., 2023), respalda que la pérdida de la

función en el TLVC puede atribuirse a una disminución en la entrada de información visual.

No obstante, aún no podemos descartar la posibilidad de que la exposición a SMDT, como consecuencia de la disfunción de las CGR o como un epifenómeno, afecte también la estructural neuroglial del CS o la corteza visual, aspectos relevantes que serán objeto de estudios futuros.

Muchas líneas de evidencia indican que el EVT tiene efectos diferenciales entre los distintos sexos (Knox y col., 2021; Loi y col., 2017; Nishi y col., 2014). Sin embargo, en ninguno de los resultados que forman parte de esta tesis, se observaron efectos diferenciales de la exposición a SMDT en función del sexo. En el TLVC, donde el sexo influye en la respuesta como ya se discutió, el término de interacción entre las variables sexo y SMDT no explicó porciones significativas de la varianza, lo que indica que la exposición a SMDT afectó por igual la respuesta de machos y hembras.

Para un ratón en busca de alimento, un estímulo en expansión rápida desde arriba indica la aproximación de un depredador que lo ha detectado (De Franceschi y col., 2016). Para evitar ser capturado, los ratones suelen quedarse inmóviles o huir hacia un refugio disponible (Yilmaz y col., 2013). Suponiendo que estos resultados pudieran extrapolarse a ratones silvestres, estos datos sugieren que el riesgo de ser detectado por un depredador aéreo podría ser mayor en ratones sometidos a SMDT, reduciendo de esta forma sus posibilidades de supervivencia. Por otra parte, dado que el desempeño de los ratones en tareas comportamentales puede depender de la capacidad visual (Robinson y col., 2001), los presentes resultados sugieren que al estudiar el desempeño de ratones sometidos a EVT en comportamientos ansiosos y/o depresivos en la etapa adulta, se debe tener en cuenta la contribución de las alteraciones visuales.

Efecto de los glucocorticoides endógenos sobre las alteraciones visuales inducidas por SMDT en ratones adultos

Se ha demostrado que la SM aumenta los niveles de corticosterona en las crías (Revisado por Nishi, 2020) y se estima que el cortisol y el eje HPA median los efectos de la adversidad en la vida temprana sobre el desarrollo (Worthman y col., 2005). Los roedores exhiben una baja actividad del eje HPA durante los primeros días postnatales (Walker y col., 1991), en cambio, cuando son expuestos a EVT muestran mayores respuestas al estrés debido a una mayor actividad del eje HPA (Lippmann y col., 2007; Marais y col., 2008). Se ha demostrado que períodos largos de SM (3-6 horas diarias durante las dos primeras semanas de vida (de Souza y col., 2022), o una única SM de 24 h en el DPN 9 (Avishai-Eliner y col., 1995) aumentan los niveles de corticoides. Además, utilizando diferentes modelos experimentales, se ha demostrado que el EVT aumenta los niveles de corticosterona de las crías en una etapa postnatal temprana (Laguna y col., 2022; Liao y col., 2014), pero no en animales adultos (Candemir y col., 2019; Laguna y col., 2022). En concordancia con trabajos de otros autores (Kuhn y col., 1990; Liu y col., 1997; Meaney, 2001), la exposición a SMDT indujo un aumento significativo en los niveles séricos de corticosterona en el DPN 10. Para evaluar la participación de los glucocorticoides (GC) endógenos en las secuelas de la exposición a SMDT, se realizó un tratamiento con mifepristona, un bloqueante selectivo del receptor de GC, que se inyectó cada 3 días entre los DPNs 4 y 16. En animales adultos, el tratamiento con mifepristona previno significativamente los efectos de la exposición a SMDT sobre los parámetros funcionales (amplitud de las REU y RFN y rendimiento en el TLVC) y estructurales (inmunorreactividad de Iba-1, tamaño del soma y morfología de las células microgliales, así como el número de CGR), lo que sugiere que el aumento en los niveles de corticoides endógenos durante el período de EVT podría desempeñar un rol central en las secuelas de largo plazo inducidas por la exposición a SMDT. En este mismo

sentido, se ha demostrado que el bloqueo de receptores de GC rescata los efectos tardíos del EVT, incluido el rendimiento cognitivo en un modelo experimental de enfermedad de Alzheimer (Lesuis y coly col., 2018), y que un tratamiento prepuberal transitorio con mifepristona normaliza los déficits de memoria contextual/aprendizaje espacial dependientes del hipocampo-estriado en ratas macho expuestas a adversidad en la vida temprana (Loi y col., 2017).

Curso temporal de las consecuencias visuales de la exposición a SMDT

En primer lugar, se analizó la progresividad de los cambios en la función retiniana y se observó que la función de la retina externa/media (ondas a y b del ERG) no se afectaron en los DPNs 35 ni 45. En el DPN 45, se observó una reducción significativa en la función de la retina interna (REU y RFN), que no fue evidente en el DPN 35. En el DPN 60 estos cambios ocurrieron en el mismo sentido que en el DPN 45, pero con mayor intensidad. Esto sugiere una progresividad en la pérdida de función de la retina interna, evidente después del DPN 35. Luego, se analizó la evolución temporal de la morfología de la microglía retiniana. Para ello, se realizaron dos análisis morfométricos: el índice de Sholl, que evalúa tanto la complejidad de las ramificaciones microgliales como el territorio que ocupan, y la circularidad celular. La morfología de la microglía permaneció sin cambios en el DPN 35; sin embargo, en el DPN 45, el análisis de Sholl demostró una reducción en el área bajo la curva en los gráficos de intersecciones vs. distancia al soma, en la retina interna de los animales expuestos a SMDT, lo que indica una menor complejidad en las ramificaciones y menor territorio ocupado. Consistentemente, el análisis de circularidad celular reveló que la microglía en las retinas de los ratones expuestos a SMDT presentó un perfil activado, caracterizado por procesos más cortos, somas celulares más grandes o ausencia de procesos (forma ameboide), en comparación con la microglía en estado de reposo (cuerpos

pequeños y altamente ramificados) observada en los ratones control. Este perfil reactivo de la microglía se acentuó aún más en el DPN 60. Al igual que con los parámetros de la función de la retina interna, estos resultados sugieren que los cambios en la microglía son progresivos y podrían comenzar luego del DPN 35. Por otro lado, el número de CGR Brn3a (+) permaneció sin cambios en animales expuestos a SMDT comparados con animales control tanto en los DPNs 35 y 45, pero se redujo significativamente en el DPN 60. En suma, estos resultados indican que el cambio de la morfología microglial, así como el déficit de la función de las CGR precede a la disminución en el número de estas últimas.

En las últimas dos décadas, diversos estudios que exploraron la heterogeneidad en la morfología microglial, sugieren que la activación de estas células no puede simplificarse únicamente como una transición estructural entre la forma ramificada y la ameboide (revisado por Vidal-Itriago y col., 2022). En este sentido, y considerando que los cambios morfológicos observados en las retinas de los animales expuestos a SMDT en el DPN 45 preceden a la muerte de las CGR, se decidió explorar el perfil pro-inflamatorio de la microglía de la retina interna. En el DPN 45, la variación en la morfología microglial fue consistente con un aumento en la expresión de señales pro-inflamatorias localizadas en células Iba-1 (+), es decir, mayor translocación nuclear de la subunidad p65 de NF-κB, así como en la inmunorreactividad de C3, NOS-2 e IL-1 β , que aumentaron significativamente en las células Iba-1 (+) de la retina interna de ratones expuestos a SMDT. La activación de NF-κB en la microglía está críticamente asociada con efectos perjudiciales en la retina en el marco de diversas condiciones patológicas, como la retinopatía diabética, la excitotoxicidad y la lesión del NO, entre otras (Panda y col., 2023; Sato y col., 2021; Tang y col., 2020). Por lo tanto, las respuestas inflamatorias desreguladas como consecuencia de la activación microglial, incluyendo los depósitos de complemento C3, podrían estar

implicadas en la disfunción retiniana y la pérdida de CGR inducida por SMDT. La expresión de C3 en la retina se ha atribuido tradicionalmente a los astrocitos (Harder y col., 2017) y a las células del epitelio pigmentario de la retina (Luo y col., 2013). Sin embargo, en condiciones no fisiológicas, como la retinitis pigmentosa experimental (RP, retina rd10), en muestras humanas de RP, frente al daño retiniano inducido por NMDA (Kuehn y col., 2018), en la lesión de fotorreceptores inducida por luz (Rutar y col., 2011) y en la retina de ratones con deficiencia de leptina (ob/ob), la microglía activada constituye la principal fuente de C3 (Natoli y col., 2018). De esta forma, la presencia de C3 en la microglía podría resultar un aval indirecto de la afectación retiniana inducida por el EVT.

El rol de la microglía en las secuelas de la exposición a SMDT en el sistema visual

Evidencias crecientes indican que las células microgliales están implicadas en el desarrollo de las secuelas del EVT (Orso y col., 2023; Ozdamar Unal y col., 2024; Reemst y col., 2022; Sequeira & Bolton, 2023). De esta forma, la microglía podría ser un mediador celular central en la relación entre la exposición a estresores tempranos y los trastornos de la salud en la edad adulta. En animales adultos, un metaanálisis sugiere que el EVT induce un aumento pronunciado en la densidad microglial y el tamaño del soma, sin cambios en los astrocitos (Orso y col., 2023). Además, algunos estudios han asociado las alteraciones inducidas por el EVT con un estado inflamatorio crónico, que podría ser provocado por la reactividad microglial (Catale y col., 2020; Ozdamar Unal y col., 2024). Análogamente a nuestros hallazgos, Reemst y colaboradores (2022) demostraron que en un modelo de EVT, la microglía hipocampal presenta tanto alteraciones morfológicas como cambios en su transcriptoma, coincidentes con un perfil proinflamatorio presente en la adultez, pero no en etapas inmediatamente posteriores al EVT. A la luz de estos resultados, que demuestran que la activación microglial en la retina interna precede a la muerte de las CGR, junto con

la evidencia reciente que sugiere una relación causal entre la activación microglial y las consecuencias a largo plazo del EVT, se decidió analizar las consecuencias de la depleción microglial sobre las alteraciones retinianas inducidas por la exposición a SMDT.

A pesar de su baja especificidad (es decir, efectos sobre otras células inmunes, efectos sutiles sobre la activación astroglial, mecanismo de acción controvertido y posibles efectos sobre la microbiota), la minociclina se ha utilizado ampliamente en el pasado (y aún en el presente) para demostrar la afectación microglial, gracias a sus favorables propiedades cinéticas y su costo relativamente bajo. En este sentido, se ha demostrado que el EVT induce alteraciones en la morfología de las neuronas dopaminérgicas, reduce la expresión del transportador de dopamina y de la tirosina hidroxilasa, que son inhibidas por la minociclina(Catale y col., 2022) , que también previene alteraciones axogliales tempranas del NO en un modelo experimental de glaucoma (Bordone y col., 2017). Para investigar los efectos de la depleción y repoblación de la microglía retiniana en forma más específica, se ha utilizado PLX3397, un inhibidor del receptor del factor estimulante de colonias 1 (CSF1R).

El CSF1R es un nodo de señalización clave en la biología de la microglía y los macrófagos. De hecho, la señalización del CSF1R no sólo es necesaria para el correcto desarrollo de estas poblaciones celulares, sino que también es un regulador crucial de su homeostasis en la edad adulta (Chitu y col., 2017). En particular, la señalización del CSF1R modula la proliferación, migración, diferenciación y supervivencia de la microglía y los macrófagos en condiciones de salud y enfermedad (Elmore y col., 2014; Hawley y col., 2018). Sin embargo, el uso de PLX3397 arrojó resultados contradictorios en diferentes entornos experimentales.

Por ejemplo, se ha demostrado que, tras la suspensión de PLX3397, la repoblación microglial atenúa la neovascularización coroidea y la senescencia celular en un modelo de degeneración macular asociada a la edad exudativa (Song y col., 2024) y mejora

significativamente la estructura de la capa nuclear externa de la retina, la respuesta electrorretinográfica y el comportamiento visual en ratones rd10 (Cheng y col., 2023). Laudenberg y col. (2024) demostraron que la depleción de la microglía inducida por PLX3397 disminuye la expresión de varios factores proinflamatorios clave, pero no influye en el grado de degeneración retiniana en un modelo murino de degeneración retiniana inducida por luz. Por otro lado, Karg y col. (2023) demostraron que ratones C57Bl/6 de edad avanzada, alimentados durante 6 semanas con *pellets* conteniendo PLX5622, otro inhibidor de CSF1R que también depleta la microglía retiniana, presentan una pérdida significativa de la función visual, con una reducida sensibilidad al contraste y un deterioro de la función del epitelio pigmentario retiniano. La depleción de la microglía con PLX3397 o PLX5622 causa un deterioro funcional de los conos y bastones en un modelo de rata con retinosis pigmentaria (He y col., 2022). Hasta donde sabemos, éste es el primer estudio que analiza el efecto de la depleción de la microglía retiniana inducida por BLZ945 en ratones de control. El tratamiento con BLZ945 desde el DPN 35 hasta el DPN 60 no afectó *per se* la función de la retina externa, media ni interna (amplitudes de la onda a, onda b, REU y RFN), ni el número de CGR en ratones adultos control. El tratamiento con BLZ945 tampoco afectó la actividad locomotora evaluada antes del TLVC, ni alteró la sensibilidad al contraste. Una vez descartados los efectos de la depleción microglial en animales control, se procedió a analizar las consecuencias de esta manipulación en animales sometidos a SMDT. En estos animales, el tratamiento con BLZ945 desde el DPN 35 hasta el DPN 60, que también eliminó la microglía, indujo una mejora en la función de las CGR, sin afectar la función de la retina externa. Asimismo, la depleción microglial a través del tratamiento con BLZ945 mejoró la sensibilidad al contraste en el TLVC, es decir, disminuyó el C50 en ratones adultos sometidos a SMDT. Consistentemente con estos cambios en la función visual, el

tratamiento con BLZ945 previno la caída en el número de CGR en retinas de animales expuestos a SMDT. En suma, estos resultados demuestran una participación central de la activación microglial en los efectos a largo plazo de la exposición a SMDT sobre el sistema visual murino.

Estudio del estrés oxidativo en la retina de animales expuestos a SMDT

Como se mencionó en la Introducción, el estrés oxidativo (EOx) parece ser uno de los factores clave asociados a los efectos deletéreos del EVT. Grigoruta y col. (2020) demostraron que la SM induce un aumento en la actividad mitocondrial en células mononucleares de sangre periférica, así como una mayor sensibilidad al EOx en muestras de sangre de ratas de 45 y 90 días de edad. Estos cambios estuvieron acompañados por un aumento en la inmunomarcación para una proteína del sistema anti-oxidante (DJ-1) en retinas de ratas de 45 días, pero no de 90 días. Estas alteraciones correlacionaron con cambios comportamentales típicos de tipo ansioso, descriptos en este tipo de modelos animales. Se ha demostrado que la SM induce disfunción mitocondrial y aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en el núcleo dorsal del rafe (Park y col., 2019) y el hipocampo (Amini-Khoei y col., 2019), así como aumento en la peroxidación lipídica y disminución de la actividad del sistema antioxidante endógeno en la corteza cerebral (Almeida y col., 2018) y en la amígdala (Diehl y col., 2014) de animales adultos.

La retina es una estructura particularmente susceptible al daño oxidativo por su alto consumo de oxígeno (Alder y col., 1983), su alta proporción de ácidos grasos poliinsaturados (Militante y col., 2004) y su exposición directa a luz visible (Cruickshanks, 1993; Dorey y col., 1990; Yusifov y col., 2000). De hecho, el daño oxidativo ha sido involucrado en diversas enfermedades retinianas. En modelos de diabetes, se ha observado una disminución de la actividad de enzimas que protegen contra el daño inducido por ROS

(Dene y col., 2005), así como un aumento de la peroxidación lipídica y ruptura mitocondrial con liberación de citocromo C y de proteínas proapoptóticas (Kowluru y col., 2003). En la retinopatía del prematuro se observó una disminución en los niveles de glutatión reducido (Papp y col., 1999) y de vitamina E (Chan y col., 1999). En trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos una disminución de la actividad del sistema antioxidante endógeno y un aumento de la peroxidación lipídica en un modelo experimental de glaucoma (Moreno y col., 2004). Se ha demostrado que, entre las células de la retina, las CGR son particularmente vulnerables al daño oxidativo debido a su alta demanda energética (Jarrett y col., 2008; Osborne y col., 2014). En este contexto, se analizó la presencia de marcadores de EOx en retinas de animales expuestos a SMDT en el DPN 45. El 4-HNE es un producto de la peroxidación lipídica, que se genera principalmente en las mitocondrias bajo condiciones de EOx. Este aldehído reactivo es un marcador clave del daño oxidativo a los lípidos de las membranas celulares y se asocia con una disfunción mitocondrial y la patogénesis de diversas enfermedades neurodegenerativas (revisado por Zarkovic, 2003). Por otro lado, la nitrotirosina es un producto de la nitración de residuos de tirosina, mediada por especies reactivas de nitrógeno y se considera un marcador específico del EOx dependiente de óxido nítrico (revisado por Pacher y col., 2007). La exposición a SMDT indujo un aumento significativo en la inmunorreactividad de 4-HNE y nitrotirosina en cortes transversales de retina, específicamente a nivel de la retina interna, mientras que las capas más externas permanecieron sin cambios significativos. La sonda MitoSOX es un marcador fluorescente específico, utilizado para evaluar el contenido mitocondrial de anión superóxido (O_2^-). En imágenes confocales de retinas ex-vivo en montaje plano incubadas con MitoSOX, se detectó un aumento en la cantidad de células con marca positiva para esta sonda en la capa de CGR. Cabe señalar que, en este trabajo de tesis por primera vez, se analizó el contenido

de anión superóxido mitocondrial mediante este método, en preparaciones *ex vivo* de CGR en retinas en montaje plano. En suma, si bien aún no hemos identificado específicamente el/los tipo/s celulares afectados, estos resultados indican que la exposición a SMDT induce EOx a nivel de la retina interna y la acumulación de superóxido en mitocondrias de CGR, que podría contribuir a la pérdida de la función y el número de estas células, procesos que han sido también documentados en modelos preclínicos de glaucoma y retinopatía diabética (Moreno y col., 2004; Duraisamy y col., 2018; Tezel y col., 2005).

Efecto de la melatonina sobre las consecuencias visuales de la exposición a SMDT

Como se describió en la Introducción, la melatonina es un potente antioxidante y anti-inflamatorio, que ha resultado particularmente efectivo en múltiples modelos de daño retiniano (Aranda y col., 2021; Belforte y col., 2010; Del Sole y col., 2012; Diéguez y col., 2020; González Fleitas y col., 2021; Sande y col., 2008). Los resultados de esta tesis sugieren que mecanismos inflamatorios y prooxidantes podrían estar implicados en el daño visual inducido por SMDT. Por lo tanto, resultó de interés evaluar la potencialidad terapéutica de la melatonina en este modelo experimental. Con este objetivo, se implantó un *pellet* subcutáneo de melatonina en animales control o expuestos a SMDT y se evaluaron los marcadores de EOx en el DPN 45. La melatonina previno tanto el aumento en la inmunorreactividad de 4-HNE como de nitrotyrosina, así como en el número de células positivas para MitoSOX en la retina interna de animales expuestos a SMDT. Asimismo, en animales expuestos a SMDT que recibieron un *pellet* subcutáneo de melatonina a partir del DPN 35, se realizaron estudios estructurales y funcionales en el DPN 60. El tratamiento con melatonina previno la pérdida de función de las CGR, el cambio morfológico de la microglía, el déficit funcional en el TLVC y la pérdida de CGR. Estos resultados indican que la melatonina, administrada a partir del DPN 35, resultó efectiva en prevenir los efectos a

largo plazo de la exposición a SMDT en ratones adultos, posiblemente actuando a través de mecanismos antioxidantes y antiinflamatorios. Aunque por diversas limitaciones, no resultó posible evaluar el efecto de la melatonina sobre los niveles de marcadores inflamatorios (aspecto que se analizará a la brevedad), la recuperación de la morfología microglial podría considerarse un aval (aunque indirecto) del efecto antiinflamatorio de la melatonina en este modelo experimental. En concordancia con estos resultados, se demostró que la melatonina previene el daño hipocampal (Tugyan y col., 2006) e induce proliferación celular en el giro dentado del hipocampo de ratas expuestas a SM (Kim y col., 2004). Cabe señalar que en los trabajos mencionados, la melatonina se administró durante el período de SM, en tanto que en nuestras condiciones experimentales, el tratamiento se inició en animales jóvenes, 18 días después de terminado el EVT (DPN 35), lo que amplifica su valor traslacional, si bien queda aún pendiente la exploración de tratamientos más tardíos, idealmente en una etapa más adulta, pero antes de la muerte de CGR. Una ventaja adicional, es que la melatonina probablemente carece de efectos tóxicos aún en altas concentraciones incluso en humanos (Andersen y col., 2016).

Efecto de la exposición a ambiente enriquecido sobre las consecuencias de la exposición a SMDT

Como se mencionó en la Introducción, la exposición a AE provoca efectos beneficiosos en diversos contextos neurodegenerativos. Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado la efectividad terapéutica del AE a nivel retiniano y del NO en diversos modelos de daño retiniano (Aranda y col., 2019; Dieguez y col., 2021; Dorfman y col., 2013, 2014; González Fleitas y col., 2020). Se ha demostrado que la SM entre los DPN 2 y 20 en ratas interrumpe transitoriamente la expresión de varios genes relacionados con neuronas excitatorias e inhibitorias en la corteza prefrontal medial y reduce el número de interneuronas en la corteza prefrontal ventromedial. La exposición a AE entre los DPN 21 y 35, revirtió estas

alteraciones, restaurando los niveles de interneuronas a valores similares a los del grupo control (Irie y col., 2024). Huang y col. (2021) demostraron que luego de un protocolo de SM, la exposición a AE revierte los cambios comportamentales y la reducción en los niveles de BDNF en el hipocampo. Estos autores iniciaron la exposición a AE inmediatamente después del período de SM o a las 8 semanas de edad. La capacidad del AE para revertir los efectos de la SM fue significativamente mayor cuando se aplicó inmediatamente después del período de SM, en comparación con su aplicación en la etapa adulta. En nuestras condiciones experimentales, la exposición a AE iniciado en el DPN 35 hasta el DPN 60 previno los cambios en la función de la retina interna (REU y RFN), así como el déficit funcional en el TLVC y la disminución en el número de CGR Brn3a (+) en ratones adultos. Sin embargo, la exposición a AE partir del DPN 45 careció de efectos frente al daño inducido por la exposición a SMDT, lo que sugiere la existencia de una ventana temporal para el beneficio terapéutico de la exposición a AE. En este mismo sentido, cabe señalar que en un modelo de neuritis óptica experimental inducido por la inyección de LPS en el NO de ratas, se demostró que la exposición a AE tuvo un efecto terapéutico funcional y estructural significativo cuando se inició a los 4 días, pero no a los 7 días post-LPS (Aranda y col., 2019), lo que sugiere que la ventana del efecto terapéutico del AE podía extenderse a otras situaciones experimentales y podría depender del tipo de daño y de la especie. Si bien los mecanismos a través de los cuales el AE previene los efectos de la exposición a SMDT sobre el sistema visual de ratones permanecen inexplorados, en trabajos previos de nuestro laboratorio demostramos que la exposición a AE reduce el daño oxidativo, disminuye los niveles de señales inflamatorias, evita la caída en los niveles retinianos de BDNF y protege la integridad de la barrera hemato-retiniana en modelos experimentales de daño visual (Dieguez y col., 2021; Dorfman y col., 2013; 2014; González Fleitas y col., 2020),

mecanismos que podrían también ser efectivos en el daño inducido por la exposición a SMDT.

Consecuencias del EVT sobre el sistema visual humano

Como ya se mencionó, al inicio de esta tesis los efectos del EVT sobre la visión en general y la retina en particular se encontraban totalmente inexplorados. Sin embargo, trabajos publicados en el transcurso de esta tesis sugieren que nuestros hallazgos podrían ser también evidentes en humanos. En el estudio de neuroimágenes pediátricas más grande realizado hasta la fecha, que abarca ocho centros colaboradores en cuatro países y se enfoca en el período transcurrido desde el nacimiento hasta los 6 años de edad, se demostró que varias formas de EVT, como el nacimiento prematuro, el bajo peso al nacer, la baja educación materna y los bajos ingresos familiares, redujeron significativamente métricas de percepción visual (Alex y col., 2023). Por otro lado, Yao y col. (2024) demostraron que niños y adolescentes de 9 a 18 años que habían sido sometidos a experiencias de maltrato temprano, presentaban un adelgazamiento de la retina interna; en particular a nivel de la capa de fibras nerviosas, consistentemente con una menor cantidad de CGR, sin diferencias significativas en otras regiones retinianas o en la microvasculatura. Los resultados aún incipientes en humanos, paralelos con nuestros propios hallazgos experimentales, avalan que los fenómenos de pérdida de función y muerte de CGR podrían ocurrir también en individuos expuestos a EVT. Por lo tanto, incluso considerando las diferencias bien conocidas entre ratones y humanos, estos resultados sugieren que un déficit visual podría incluirse entre las amenazas a la calidad de vida inducidas por adversidades infantiles. Además, dado que se ha demostrado que la depresión y la ansiedad son elevadas entre personas con discapacidad visual (Choi y col., 2018; Demmin & Silverstein, 2020), es posible especular que las alteraciones visuales inducidas por el EVT

podrían contribuir a problemas psiquiátricos en personas con experiencias adversas en la infancia, y viceversa, ya que la ansiedad/depresión en sí mismas pueden afectar las funciones visuales (atención visual, aprendizaje y memoria visual, y memoria de trabajo visual) (Kalogerakou y col., 2015), parece posible que la coexistencia de alteraciones psiquiátricas y visuales podría empeorar las alteraciones duraderas inducidas por EVT. Un estudio de la asociación entre discapacidad visual y función cognitiva en adultos mayores (entre 65 y 84 años), demostró que la discapacidad visual se asocia con un deterioro cognitivo (Zheng y col., 2018). Aunque en este estudio no es posible determinar si la pérdida cognitiva es una consecuencia de la pérdida visual o si ambas son causadas por factores subyacentes similares, los resultados de este trabajo sugieren que la pérdida visual tiene un efecto más importante sobre el deterioro cognitivo que viceversa, es decir, que la pérdida visual podría ser un factor principal en la relación entre visión y cognición. En esta línea, utilizando técnicas cuantitativas basadas en resonancia magnética multimodal, Frezzotti y col. (2014) estudiaron la conectividad estructural y funcional tanto en áreas visuales como no visuales del cerebro de pacientes con glaucoma primario de ángulo abierto avanzado (una enfermedad caracterizada por la pérdida de CGR), sin otras alteraciones oftalmológicas o desórdenes neurológicos. Los pacientes con glaucoma mostraron importantes cambios estructurales y funcionales, incluyendo alteraciones en los tractos de la materia blanca y una reducción en el volumen de la materia gris no sólo en áreas típicamente visuales, sino también en áreas relacionadas con el procesamiento cognitivo, como el hipocampo, la corteza orbitofrontal y el lóbulo parietal superior. Como sugieren estos trabajos, la pérdida de la función visual puede tener profundos efectos en el funcionamiento del cerebro, más allá del procesamiento sensorial. Si bien nuestros experimentos no permiten determinar si la pérdida visual es “*la puerta de entrada*” al resto

del cerebro del daño inducido por el EVT, algunas evidencias fragmentarias permiten especular que el cuidado de la función visual puede ser un blanco terapéutico que contribuya a prevenir/mitigar los efectos del EVT en el SNC.

CONCLUSIONES

En función de los objetivos propuestos, en esta tesis se demostró que el estrés de vida temprana, específicamente a través del modelo de separación materna con destete temprano, genera alteraciones significativas en la función visual de ratones adultos. A continuación, se resumen los hallazgos centrales respecto los objetivos específicos:

- I. Desarrollo del test de *looming* con variación de contrastes (TLVC): Se desarrolló un método innovador para evaluar cuantitativamente la sensibilidad al contraste, que resultó una herramienta sensible, no invasiva y eficaz. Este test permitió detectar alteraciones visuales de manera precisa y reproducible.
- II. Efectos de la separación materna con destete temprano sobre el sistema visual: La separación materna con destete temprano indujo alteraciones funcionales y estructurales en la retina, incluyendo una disminución en la amplitud de las respuestas electrofisiológicas (respuesta escotópica umbral, respuesta fotópica negativa y potenciales visuales evocados), cambios en la morfología microglial y una reducción en el número de células ganglionares retinianas (CGR). Estos cambios se correlacionaron con un deterioro en pruebas comportamentales guiadas visualmente, como el abismo visual y el TLVC.
- III. Participación de los glucocorticoides: El aumento de los niveles de corticosterona durante el estrés de vida temprana podría desempeñar un papel central en las alteraciones visuales inducidas por la separación materna con destete temprano,

dado que el bloqueo de los receptores de glucocorticoides con mifepristona previno los cambios visuales inducidos por el EVT en ratones adultos.

- IV. Evolución temporal de los efectos de la exposición a separación materna con destete temprano: Los cambios en la función y estructura retiniana fueron progresivos. No se observaron cambios en el DPN 35, pero se observó una pérdida de función de las CGR y una activación microglial a partir del DPN 45, seguidas de una disminución más marcada de estos parámetros, junto con pérdida en el número de CGR en el DPN 60.
- V. Rol de la microglía: La activación microglial precedió a la pérdida de CGR, y la depleción microglial con BLZ945 (que no afectó la visión en animales control) mejoró la función visual y redujo la pérdida de CGR, lo que señala a la microglía como un posible mediador en las alteraciones retinianas inducidas por el estrés de vida temprana.
- VI. Estrés oxidativo y melatonina: La separación materna con destete temprano indujo estrés oxidativo en la retina, y el tratamiento con melatonina previno tanto el daño oxidativo como las alteraciones funcionales y estructurales inducidas por EVT.
- VII. Ambiente enriquecido: La exposición a AE desde el DPN 35 previno las alteraciones visuales inducidas por la exposición a SMDT en ratones adultos.

En resumen, esta tesis aporta evidencia de que el EVT tiene efectos profundos y duraderos en el sistema visual. Evidencias recientes sugieren que estos hallazgos podrían ser relevantes también en humanos expuestos a adversidades tempranas. Además, los resultados avalan la efectividad de estrategias terapéuticas (la melatonina y la exposición a AE), que podrían ser útiles para prevenir las secuelas visuales del EVT.

EPÍLOGO

Nuestras experiencias en edades tempranas “dan forma” a nuestro comportamiento presente y futuro, y dejan una “huella duradera” en nuestros cerebros, alterando los circuitos neuronales que median el comportamiento y contribuyen a nuestras diferencias individuales. Más del 50% de los niños del mundo están expuestos a estrés (Fenoglio y col., 2006). Cada año, 1 de cada 10 niños nacidos en Occidente sufre abuso emocional (van Harmelen y col., 2010) y aproximadamente 8 millones de niños viven en instituciones en todo el mundo (www.unicef.org/media/media_45279.html; Desmond y col., 2020). Fue un objetivo central de esta tesis responder al interrogante de cómo y en qué medida el entorno en que vivimos en nuestra infancia impacta la calidad de la visión en nuestra vida adulta. A pesar del apotegma de Sigmund Freud: “infancia es destino”, según el cual los adultos estamos predestinados por las circunstancias que marcaron nuestra infancia, es nuestra aspiración que en un futuro próximo sea posible “sanar” las consecuencias deletéreas (incluidas las visuales) de una infancia expuesta a la adversidad. En todo caso, más allá del esfuerzo intelectual y económico que se invierta en la búsqueda de estrategias terapéuticas para el tratamiento del déficit visual inducido por el EVT, “una infancia feliz” (en el sentido más amplio del término), seguramente podría asegurarnos una mejor visión del mundo que nos rodea, junto con una mejor calidad de vida. *De otro modo es inútil, de otro modo es absurdo ensayar en la tierra la alegría y el canto, porque de nada vale si hay un niño en la calle* (Hay un niño en la calle, Armando Tejada Gomez/Ángel Ritro).

BIBLIOGRAFÍA

- Aguzzi, A., Barres, B. A., & Bennett, M. L. (2013). Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else? *Science*, 339(6116), 156–161. doi: 10.1126/science.1227901
- Alder, V. A., Cringle, S. J., & Constable, I. J. (1983). The retinal oxygen profile in cats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 24(1), 30–36.
- Alex, A. M., Buss, C., Davis, E. P., Campos, G. de los, Donald, K. A., Fair, D. A., Gaab, N., Gao, W., Gilmore, J. H., Girault, J. B., Grewen, K., Groenewold, N. A., Hankin, B. L., Ipser, J., Kapoor, S., Kim, P., Lin, W., Luo, S., Norton, E. S., ... Knickmeyer, R. (2023). Genetic Influences on the Developing Young Brain and Risk for Neuropsychiatric Disorders. *Biological Psychiatry*, 93(10), 905–920. doi: 10.1016/j.biopsych.2023.01.013
- Altimus, C. M., Güler, A. D., Alam, N. M., Arman, A. C., Prusky, G. T., Sampath, A. P., & Hattar, S. (2010). Rod photoreceptors drive circadian photoentrainment across a wide range of light intensities. *Nature Neuroscience*, 13(9), 1107–1112. doi: 10.1038/nn.2617
- Amini-Khoei, H., Haghani-Samani, E., Beigi, M., Soltani, A., Mobini, G. R., Balali-Dehkordi, S., Haj-Mirzaian, A., Rafieian-Kopaei, M., Alizadeh, A., Hojjati, M. R., & Validi, M. (2019). On the role of corticosterone in behavioral disorders, microbiota composition alteration and neuroimmune response in adult male mice subjected to maternal separation stress. *International Immunopharmacology*, 66, 242–250. doi: 10.1016/j.intimp.2018.11.037
- Andersen, L. P. H., Gögenur, I., Rosenberg, J., & Reiter, R. J. (2016). The Safety of Melatonin in Humans. *Clinical Drug Investigation*, 36(3), 169–175. doi: 10.1007/s40261-015-0368-5
- Angelucci, F., De Bartolo, P., Gelfo, F., Foti, F., Cutuli, D., Bossù, P., Caltagirone, C., & Petrosini, L. (2009). Increased Concentrations of Nerve Growth Factor and Brain-Derived Neurotrophic Factor in the Rat Cerebellum After Exposure to Environmental Enrichment. *The Cerebellum*, 8(4), 499–506. doi: 10.1007/s12311-009-0129-1
- Applebury, M. L., Antoch, M. P., Baxter, L. C., Chun, L. L. Y., Falk, J. D., Farhangfar, F., Kage, K., Krzystolik, M. G., Lyass, L. A., & Robbins, J. T. (2000). The Murine Cone Photoreceptor. *Neuron*, 27(3), 513–523. doi: 10.1016/S0896-6273(00)00062-3
- Aranda, M. L., González Fleitas, M. F., Dieguez, H. H., Milne, G. A., Devouassoux, J. D., Keller Sarmiento, M. I., Chianelli, M., Sande, P. H., Dorfman, D., & Rosenstein, R. E. (2019). Therapeutic benefit of environmental enrichment on optic neuritis. *Neuropharmacology*, 145, 87–98. doi: 10.1016/j.neuropharm.2017.12.017
- Aranda, M. L., Min, E., Liu, L. T., Schipma, A. E., & Schmidt, T. M. (2024). *Light tunes a novel long-term threat avoidance behavior*. doi: 10.1101/2024.10.28.620706
- Aranda, M. L., Narvaez, O., Altschuler, F., Calanni, J. S., González Fleitas, M. F., Sande, P. H., Dorfman, D., Concha, L., & Rosenstein, R. E. (2021). Chronobiotic effect of melatonin in experimental optic neuritis. *Neuropharmacology*, 182, 108401. doi: 10.1016/j.neuropharm.2020.108401

- Arendt, D. (2008). The evolution of cell types in animals: Emerging principles from molecular studies. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 9, Issue 11, pp. 868–882). doi: 10.1038/nrg2416
- Arendt, D., Hausen, H., & Purschke, G. (2009). The “division of labour” model of eye evolution. In *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* (Vol. 364, Issue 1531, pp. 2809–2817). Royal Society. doi: 10.1098/rstb.2009.0104
- Arendt, D., Musser, J. M., Baker, C. V. H., Bergman, A., Cepko, C., Erwin, D. H., Pavlicev, M., Schlosser, G., Widder, S., Laubichler, M. D., & Wagner, G. P. (2016). The origin and evolution of cell types. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 17, Issue 12, pp. 744–757). Nature Publishing Group. doi: 10.1038/nrg.2016.127
- Avishai-Eliner, S., Yi, S.-J., Newth, C. J. L., & Baram, T. Z. (1995). Effects of maternal and sibling deprivation on basal and stress induced hypothalamic-pituitary-adrenal components in the infant rat. *Neuroscience Letters*, 192(1), 49–52. doi: 10.1016/0304-3940(95)11606-W
- Axelrod, J. (1974). The Pineal Gland: A Neurochemical Transducer. *Science*, 184(4144), 1341–1348. doi: 10.1126/science.184.4144.1341
- Bachiller, S., Paulus, A., Vázquez-Reyes, S., García-Domínguez, I., & Deierborg, T. (2020). Maternal separation leads to regional hippocampal microglial activation and alters the behavior in the adolescence in a sex-specific manner. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 9, 100142. doi: 10.1016/j.bbih.2020.100142
- Baden, T., Berens, P., Franke, K., Román Rosón, M., Bethge, M., & Euler, T. (2016). The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse. *Nature*, 529(7586), 345–350. doi: 10.1038/nature16468
- Baden, T., Euler, T., & Berens, P. (2020). Understanding the retinal basis of vision across species. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 21, Issue 1, pp. 5–20). Nature Research. doi: 10.1038/s41583-019-0242-1
- Banqueri, M., Méndez, M., & Arias, J. L. (2017). Impact of stress in childhood: Psychobiological alterations. *Psicothema*, 29(1), 18–22. doi: 10.7334/psicothema2016.264
- Bass, J., & Takahashi, J. S. (2010). Circadian Integration of Metabolism and Energetics. *Science*, 330(6009), 1349–1354. doi: 10.1126/science.1195027
- Bateson, P., Gluckman, P., & Hanson, M. (2014). The biology of developmental plasticity and the Predictive Adaptive Response hypothesis. *The Journal of Physiology*, 592(11), 2357–2368. doi: 10.1113/jphysiol.2014.271460
- Belforte, N. A., Moreno, M. C., de Zavalía, N., Sande, P. H., Chianelli, M. S., Keller Sarmiento, M. I., & Rosenstein, R. E. (2010). Melatonin: a novel neuroprotectant for the treatment of glaucoma. *Journal of Pineal Research*, 48(4), 353–364. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00762.x
- BENNETT, E. L., KRECH, D., & ROSENZWEIG, M. R. (1964). RELIABILITY AND REGIONAL SPECIFICITY OF CEREBRAL EFFECTS OF ENVIRONMENTAL COMPLEXITY AND TRAINING. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 57, 440–441. doi: 10.1037/h0048207

- Benzie, I. F. F. (2000). Evolution of antioxidant defence mechanisms. *European Journal of Nutrition*, 39(2), 53–61. doi: 10.1007/s003940070030
- Berens, A. E., Jensen, S. K. G., & Nelson, C. A. (2017). Biological embedding of childhood adversity: from physiological mechanisms to clinical implications. *BMC Medicine*, 15(1), 135. doi: 10.1186/s12916-017-0895-4
- Bian, Y., Ma, Y., Ma, Q., Yang, L., Zhu, Q., Li, W., & Meng, L. (2021). Prolonged Maternal Separation Induces the Depression-Like Behavior Susceptibility to Chronic Unpredictable Mild Stress Exposure in Mice. *BioMed Research International*, 2021, 1–11. doi: 10.1155/2021/6681397
- Bondi, C. O., Klitsch, K. C., Leary, J. B., & Kline, A. E. (2014). Environmental enrichment as a viable neurorehabilitation strategy for experimental traumatic brain injury. *Journal of Neurotrauma*, 31(10), 873–888. doi: 10.1089/neu.2014.3328
- Bordone, M. P., González Fleitas, M. F., Pasquini, L. A., Bosco, A., Sande, P. H., Rosenstein, R. E., & Dorfman, D. (2017). Involvement of microglia in early axoglial alterations of the optic nerve induced by experimental glaucoma. *Journal of Neurochemistry*, 142(2), 323–337. doi: 10.1111/jnc.14070
- Botelho, G. I. S., Salomão, S. R., Tengan, C. H., Karanjia, R., Moura, F. V., Rocha, D. M., Silva, P. B. E. da, Fernandes, A. G., Watanabe, S. E. S., Sacai, P. Y., Belfort, R., Carelli, V., Sadun, A. A., & Berezovsky, A. (2021). Impaired Ganglion Cell Function Objectively Assessed by the Photopic Negative Response in Affected and Asymptomatic Members From Brazilian Families With Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Frontiers in Neurology*, 11. doi: 10.3389/fneur.2020.628014
- Bubenik, G. A., Brown, G. M., Uhlič, I., & Grota, L. J. (1974). Immunohistological localization of N-acetyllindolealkylamines in pineal gland, retina and cerebellum. *Brain Research*, 81(2), 233–242. doi: 10.1016/0006-8993(74)90938-x
- Bubenik, G. A., Purtill, R. A., Brown, G. M., & Grota, L. J. (1978). Melatonin in the retina and the Harderian gland. Ontogeny, diurnal variations and melatonin treatment. *Experimental Eye Research*, 27(3), 323–333. doi: 10.1016/0014-4835(78)90166-5
- Bui, B. V., & Fortune, B. (2004). Ganglion cell contributions to the rat full-field electroretinogram. *The Journal of Physiology*, 555(1), 153–173. doi: 10.1113/jphysiol.2003.052738
- Cahill, H., & Nathans, J. (2008). The Optokinetic Reflex as a Tool for Quantitative Analyses of Nervous System Function in Mice: Application to Genetic and Drug-Induced Variation. *PLoS ONE*, 3(4), e2055. doi: 10.1371/journal.pone.0002055
- Cai, D., Luo, X., Shen, K., & Shen, Y. (2021). GABAergic retinal ganglion cells regulate innate defensive responses. *NeuroReport*, 32(7), 643–649. doi: 10.1097/WNR.0000000000001652
- Candemir, E., Post, A., Dischinger, U. S., Palme, R., Slattery, D. A., O'Leary, A., & Reif, A. (2019). Limited effects of early life manipulations on sex-specific gene expression and behavior in adulthood. *Behavioural Brain Research*, 369, 111927. doi: 10.1016/j.bbr.2019.111927

- Cardinali, D. P., & Rosner, J. M. (1971). Metabolism of serotonin by the rat retina *in vitro*. *Journal of Neurochemistry*, 18(9), 1769–1770. doi: 10.1111/j.1471-4159.1971.tb03752.x
- Carlyle, B. C., Duque, A., Kitchen, R. R., Bordner, K. A., Coman, D., Doolittle, E., Papademetris, X., Hyder, F., Taylor, J. R., & Simen, A. A. (2012). Maternal separation with early weaning: A rodent model providing novel insights into neglect associated developmental deficits. *Development and Psychopathology*, 24(4), 1401–1416. doi: 10.1017/S095457941200079X
- Cassone, V. M., Warren, W. S., Brooks, D. S., & Lu, J. (1993). Melatonin, the pineal gland, and circadian rhythms. *Journal of Biological Rhythms*, 8 Suppl, S73-81.
- Catale, C., Gironda, S., Lo Iacono, L., & Carola, V. (2020). Microglial Function in the Effects of Early-Life Stress on Brain and Behavioral Development. *Journal of Clinical Medicine*, 9(2), 468. doi: 10.3390/jcm9020468
- Catale, C., Lo Iacono, L., Martini, A., Heil, C., Guatteo, E., Mercuri, N. B., Visconti, M. T., Palacios, D., & Carola, V. (2022). Early Life Social Stress Causes Sex- and Region-Dependent Dopaminergic Changes that Are Prevented by Minocycline. *Molecular Neurobiology*, 59(6), 3913–3932. doi: 10.1007/s12035-022-02830-6
- Champagne, F. A., & Meaney, M. J. (2008). “Transgenerational effects of social environment on variations in maternal care and behavioral response to novelty”: Correction to Champagne and Meaney (2007). *Behavioral Neuroscience*, 122(2), 266–266. doi: 10.1037/0735-7044.122.2.266
- Chan, W.-H., Yu, J.-S., & Yang, S.-D. (1999). PAK2 is cleaved and activated during hyperosmotic shock-induced apoptosis via a caspase-dependent mechanism: Evidence for the involvement of oxidative stress. *Journal of Cellular Physiology*, 178(3), 397–408. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(199903)178:3<397::AID-JCP14>3.0.CO;2-2
- Chang, L., Breuninger, T., & Euler, T. (2013). Chromatic Coding from Cone-type Unselective Circuits in the Mouse Retina. *Neuron*, 77(3), 559–571. doi: 10.1016/j.neuron.2012.12.012
- Chen, L., Yang, P., & Kijlstra, A. (2002). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. *Ocular Immunology and Inflammation*, 10(1), 27–39. doi: 10.1076/ocii.10.1.27.10328
- Cheng, X., Gao, H., Tao, Z., Yin, Z., Cha, Z., Huang, X., Zhang, Y., Zeng, Y., He, J., Ge, L., A, L., Xu, H., & Peng, G.-H. (2023). Repopulated retinal microglia promote Müller glia reprogramming and preserve visual function in retinal degenerative mice. *Theranostics*, 13(5), 1698–1715. doi: 10.7150/thno.79538
- Cherry, J. D., Olschowka, J. A., & O’Banion, M. K. (2014). Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed. *Journal of Neuroinflammation*, 11(1), 98. doi: 10.1186/1742-2094-11-98
- Chitu, V., & Stanley, E. R. (2017). *Regulation of Embryonic and Postnatal Development by the CSF-1 Receptor* (pp. 229–275). doi: 10.1016/bs.ctdb.2016.10.004

- Choi, H. G., Lee, M. J., & Lee, S.-M. (2018). Visual impairment and risk of depression: A longitudinal follow-up study using a national sample cohort. *Scientific Reports*, 8(1), 2083. doi: 10.1038/s41598-018-20374-5
- Ciucci, F., Putignano, E., Baroncelli, L., Landi, S., Berardi, N., & Maffei, L. (2007). Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Mediates the Effects of Enriched Environment (EE) on Visual Cortical Development. *PLoS ONE*, 2(5), e475. doi: 10.1371/journal.pone.0000475
- Clarkson, E., Levi-Setti, R., & Horváth, G. (2006). The eyes of trilobites: The oldest preserved visual system. *Arthropod Structure & Development*, 35(4), 247–259. doi: 10.1016/j.asd.2006.08.002
- Cohen, J. (1988). *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences* (N. Hillsdale, Ed.; 2nd ed.). Lawrence Erlbaum Associates.
- Consorti, A., Sansevero, G., Torelli, C., Berardi, N., & Sale, A. (2019). From Basic Visual Science to Neurodevelopmental Disorders: The Voyage of Environmental Enrichment-Like Stimulation. *Neural Plasticity*, 2019, 1–9. doi: 10.1155/2019/5653180
- Crespi, E. J., & Denver, R. J. (2005). Roles of stress hormones in food intake regulation in anuran amphibians throughout the life cycle. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(4), 381–390. doi: 10.1016/j.cbpb.2004.12.007
- Crespi, E. J., Williams, T. D., Jessop, T. S., & Delehanty, B. (2013). Life history and the ecology of stress: how do glucocorticoid hormones influence life-history variation in animals? *Functional Ecology*, 27(1), 93–106. doi: 10.1111/1365-2435.12009
- Cruickshanks, K. J. (1993). Sunlight and Age-Related Macular Degeneration. *Archives of Ophthalmology*, 111(4), 514. doi: 10.1001/archopht.1993.01090040106042
- Danese, A., & Baldwin, J. R. (2017). Hidden Wounds? Inflammatory Links Between Childhood Trauma and Psychopathology. *Annual Review of Psychology*, 68, 517–544. doi: 10.1146/annurev-psych-010416-044208
- Danese, A., & J Lewis, S. (2017). Psychoneuroimmunology of Early-Life Stress: The Hidden Wounds of Childhood Trauma? *Neuropsychopharmacology : Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(1), 99–114. doi: 10.1038/npp.2016.198
- Danese, A., Moffitt, T. E., Harrington, H., Milne, B. J., Polanczyk, G., Pariante, C. M., Poulton, R., & Caspi, A. (2009). Adverse Childhood Experiences and Adult Risk Factors for Age-Related Disease. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, 163(12). doi: 10.1001/archpediatrics.2009.214
- de Souza, J. A., da Silva, M. C., de Souza Ferraz Junior, J. C., de Souza, F. L., & de Souza, S. L. (2022). Maternal separation in the light or dark phase of the circadian cycle has different effects on the corticosterone levels and anxiety-like behavior in male adult rats. *Physiology & Behavior*, 247, 113725. doi: 10.1016/j.physbeh.2022.113725

- Dean, P., Redgrave, P., & Westby, G. W. M. (1989). Event or emergency? Two response systems in the mammalian superior colliculus. *Trends in Neurosciences*, 12(4), 137–147. doi: 10.1016/0166-2236(89)90052-0
- De Franceschi, G., Vivattanasarn, T., Saleem, A. B., & Solomon, S. G. (2016). Vision Guides Selection of Freeze or Flight Defense Strategies in Mice. *Current Biology*, 26(16), 2150–2154. doi: 10.1016/j.cub.2016.06.006
- Del Sole, M. J., Sande, P. H., Fernandez, D. C., Sarmiento, M. I. K., Aba, M. A., & Rosenstein, R. E. (2012). Therapeutic benefit of melatonin in experimental feline uveitis. *Journal of Pineal Research*, 52(1), 29–37. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00913.x
- Demmin, D. L., & Silverstein, S. M. (2020). <p>Visual Impairment and Mental Health: Unmet Needs and Treatment Options</p>. *Clinical Ophthalmology*, Volume 14, 4229–4251. doi: 10.2147/OPTH.S258783
- Dene, B. A., Maritim, A. C., Sanders, R. A., & Watkins, J. B. (2005). Effects of Antioxidant Treatment on Normal and Diabetic Rat Retinal Enzyme Activities. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*, 21(1), 28–35. doi: 10.1089/jop.2005.21.28
- Desmond, C., Watt, K., Saha, A., Huang, J., & Lu, C. (2020). Prevalence and number of children living in institutional care: global, regional, and country estimates. *The Lancet Child & Adolescent Health*, 4(5), 370–377. doi: 10.1016/S2352-4642(20)30022-5
- Dhawan, M., Hans, T., Sandhu, P. S., & Midha, N. (2019). Evaluation of Vision-related Quality of Life in Patients with Glaucoma: A Hospital-based Study. *Journal of Current Glaucoma Practice*, 13(1), 9–15. doi: 10.5005/jp-journals-10078-1242
- Di Segni, M., Andolina, D., & Ventura, R. (2018). Long-term effects of early environment on the brain: Lesson from rodent models. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 77, 81–92. doi: 10.1016/j.semcdb.2017.09.039
- Dieguez, H. H., Calanni, J. S., Romeo, H. E., Alaimo, A., González Fleitas, M. F., Iaquiniandi, A., Chianelli, M. S., Keller Sarmiento, M. I., Sande, P. H., Rosenstein, R. E., & Dorfman, D. (2021). Enriched environment and visual stimuli protect the retinal pigment epithelium and photoreceptors in a mouse model of non-exudative age-related macular degeneration. *Cell Death & Disease*, 12(12), 1128. doi: 10.1038/s41419-021-04412-1
- Diéguez, H. H., González Fleitas, M. F., Aranda, M. L., Calanni, J. S., Keller Sarmiento, M. I., Chianelli, M. S., Alaimo, A., Sande, P. H., Romeo, H. E., Rosenstein, R. E., & Dorfman, D. (2020). Melatonin protects the retina from experimental nonexudative age-related macular degeneration in mice. *Journal of Pineal Research*, 68(4), e12643. doi: 10.1111/jpi.12643
- Diehl, L. A., Pereira, N. de S. C., Laureano, D. P., Benitz, A. N. D., Noschang, C., Ferreira, A. G. K., Scherer, E. B., Machado, F. R., Henriques, T. P., Wyse, A. T. S., Molina, V., & Dalmaz, C. (2014). Contextual Fear Conditioning in Maternal Separated Rats: The Amygdala as a Site for Alterations. *Neurochemical Research*, 39(2), 384–393. doi: 10.1007/s11064-013-1230-x

- do Prado, C. H., Grassi-Oliveira, R., Wieck, A., Zaparte, A., Filho, L. D., da Silva Morrone, M., Moreira, J. C., & Bauer, M. E. (2016). The impact of childhood maltreatment on redox state: Relationship with oxidative damage and antioxidant defenses in adolescents with no psychiatric disorder. *Neuroscience Letters*, 617, 173–177. doi: 10.1016/j.neulet.2016.01.062
- Domínguez Rubio, A. P., Correa, F., Aisemberg, J., Dorfman, D., Bariani, M. V., Rosenstein, R. E., Zorrilla Zubilete, M., & Franchi, A. M. (2017). Maternal administration of melatonin exerts short- and long-term neuroprotective effects on the offspring from lipopolysaccharide-treated mice. *Journal of Pineal Research*, 63(4). doi: 10.1111/jpi.12439
- Dorey, C. K., Delori, F. C., & Akeo, K. (1990). Growth of cultured RPE and endothelial cells is inhibited by blue light but not green or red light. *Current Eye Research*, 9(6), 549–559. doi: 10.3109/02713689008999595
- Dorfman, D., Aranda, M. L., González Fleitas, M. F., Chianelli, M. S., Fernandez, D. C., Sande, P. H., & Rosenstein, R. E. (2014). Environmental Enrichment Protects the Retina from Early Diabetic Damage in Adult Rats. *PLoS ONE*, 9(7), e101829. doi: 10.1371/journal.pone.0101829
- Dorfman, D., Fernandez, D. C., Chianelli, M., Miranda, M., Aranda, M. L., & Rosenstein, R. E. (2013). Post-ischemic environmental enrichment protects the retina from ischemic damage in adult rats. *Experimental Neurology*, 240, 146–156. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.11.017
- DOUGLAS, R. M., ALAM, N. M., SILVER, B. D., MCGILL, T. J., TSCHETTER, W. W., & PRUSKY, G. T. (2005). Independent visual threshold measurements in the two eyes of freely moving rats and mice using a virtual-reality optokinetic system. *Visual Neuroscience*, 22(5), 677–684. doi: 10.1017/S0952523805225166
- Du, L., Zhang, Y., Chen, Y., Zhu, J., Yang, Y., & Zhang, H.-L. (2017). Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Molecular Neurobiology*, 54(10), 7567–7584. doi: 10.1007/s12035-016-0245-0
- Duraisamy, A. J., Mishra, M., Kowluru, A., & Kowluru, R. A. (2018). Epigenetics and Regulation of Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 59(12), 4831. doi: 10.1167/iovs.18-24548
- Dutta, S., & Sengupta, P. (2016). Men and mice: Relating their ages. *Life Sciences*, 152, 244–248. doi: 10.1016/j.lfs.2015.10.025
- Ellis, B. J., & Del Giudice, M. (2019). Developmental Adaptation to Stress: An Evolutionary Perspective. *Annual Review of Psychology*, 70(1), 111–139. doi: 10.1146/annurev-psych-122216-011732
- Elmore, M. R. P., Najafi, A. R., Koike, M. A., Dagher, N. N., Spangenberg, E. E., Rice, R. A., Kitazawa, M., Matusow, B., Nguyen, H., West, B. L., & Green, K. N. (2014). Colony-Stimulating Factor 1 Receptor Signaling Is Necessary for Microglia Viability, Unmasking a Microglia Progenitor Cell in the Adult Brain. *Neuron*, 82(2), 380–397. doi: 10.1016/j.neuron.2014.02.040
- Elwenspoek, M. M. C., Kuehn, A., Muller, C. P., & Turner, J. D. (2017). The effects of early life adversity on the immune system. *Psychoneuroendocrinology*, 82, 140–154. doi: 10.1016/j.psyneuen.2017.05.012

- Endo, N., Makinodan, M., Mannari-Sasagawa, T., Horii-Hayashi, N., Somayama, N., Komori, T., Kishimoto, T., & Nishi, M. (2021). The effects of maternal separation on behaviours under social-housing environments in adult male C57BL/6 mice. *Scientific Reports*, 11(1), 527. doi: 10.1038/s41598-020-80206-3
- Erwin, D. H. ; V. J. W. (2013). *The Cambrian Explosion: The Reconstruction of Animal Biodiversity*.
- Evans, D. A., Stempel, A. V., Vale, R., Ruehle, S., Lefler, Y., & Branco, T. (2018). A synaptic threshold mechanism for computing escape decisions. *Nature*, 558(7711), 590–594. doi: 10.1038/s41586-018-0244-6
- Fagundes, C. P., Glaser, R., & Kiecolt-Glaser, J. K. (2013). Stressful early life experiences and immune dysregulation across the lifespan. *Brain, Behavior, and Immunity*, 27(1), 8–12. doi: 10.1016/j.bbi.2012.06.014
- Faillace, M. P., Cutrera, R., Sarmiento, M. I., & Rosenstein, R. E. (1995). Evidence for local synthesis of melatonin in golden hamster retina. *Neuroreport*, 6(15), 2093–2095. doi: 10.1097/00001756-199510010-00033
- Falkenberg, T., Mohammed, A. K., Henriksson, B., Persson, H., Winblad, B., & Lindfors, N. (1992). Increased expression of brain-derived neurotrophic factor mRNA in rat hippocampus is associated with improved spatial memory and enriched environment. *Neuroscience Letters*, 138(1), 153–156. doi: 10.1016/0304-3940(92)90494-r
- Felitti, V. J., Anda, R. F., Nordenberg, D., Williamson, D. F., Spitz, A. M., Edwards, V., Koss, M. P., & Marks, J. S. (1998). Relationship of Childhood Abuse and Household Dysfunction to Many of the Leading Causes of Death in Adults. *American Journal of Preventive Medicine*, 14(4), 245–258. doi: 10.1016/S0749-3797(98)00017-8
- FENOGLIO, K., BRUNSON, K., & BARAM, T. (2006). Hippocampal neuroplasticity induced by early-life stress: Functional and molecular aspects. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 27(2), 180–192. doi: 10.1016/j.yfrne.2006.02.001
- Fernandez, D. C., Fogerson, P. M., Lazzerini Ospri, L., Thomsen, M. B., Layne, R. M., Severin, D., Zhan, J., Singer, J. H., Kirkwood, A., Zhao, H., Berson, D. M., & Hattar, S. (2018). Light Affects Mood and Learning through Distinct Retina-Brain Pathways. *Cell*, 175(1), 71-84.e18. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.004
- Feuda, R., Hamilton, S. C., McInerney, J. O., & Pisani, D. (2012). Metazoan opsin evolution reveals a simple route to animal vision. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(46), 18868–18872. doi: 10.1073/pnas.1204609109
- Finlay, B. L., & Darlington, R. B. (1995). Linked Regularities in the Development and Evolution of Mammalian Brains. *Science*, 268(5217), 1578–1584. doi: 10.1126/science.7777856
- Fischer, A. J., Zelinka, C., & Milani-Nejad, N. (2015). Reactive retinal microglia, neuronal survival, and the formation of retinal folds and detachments. *Glia*, 63(2), 313–327. doi: 10.1002/glia.22752
- Fischer, A., Sananbenesi, F., Wang, X., Dobbin, M., & Tsai, L.-H. (2007). Recovery of learning and memory is associated with chromatin remodelling. *Nature*, 447(7141), 178–182. doi: 10.1038/nature05772

- Fox, M. W. (1965). The visual cliff test for the study of visual depth perception in the mouse. *Animal Behaviour*, 13(2–3), 232–IN3. doi: 10.1016/0003-3472(65)90040-0
- Francis, D., Diorio, J., Liu, D., & Meaney, M. J. (1999). Nongenomic Transmission Across Generations of Maternal Behavior and Stress Responses in the Rat. *Science*, 286(5442), 1155–1158. doi: 10.1126/science.286.5442.1155
- Frank, C. R., Xiang, X., Stagg, B. C., & Ehrlich, J. R. (2019). Longitudinal Associations of Self-reported Vision Impairment With Symptoms of Anxiety and Depression Among Older Adults in the United States. *JAMA Ophthalmology*, 137(7), 793–800. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2019.1085
- Franklin, T. B., Murphy, J. A., Myers, T. L., Clarke, D. B., & Currie, R. W. (2006). Enriched environment during adolescence changes brain-derived neurotrophic factor and TrkB levels in the rat visual system but does not offer neuroprotection to retinal ganglion cells following axotomy. *Brain Research*, 1095(1), 1–11. doi: 10.1016/j.brainres.2006.04.025
- Frezzotti, P., Giorgio, A., Motolese, I., De Leucio, A., Lester, M., Motolese, E., Federico, A., & De Stefano, N. (2014). Structural and Functional Brain Changes beyond Visual System in Patients with Advanced Glaucoma. *PLoS ONE*, 9(8), e105931. doi: 10.1371/journal.pone.0105931
- Fujieda, H., Hamadanizadeh, S. A., Wankiewicz, E., Pang, S. F., & Brown, G. M. (1999). Expression of mt1 melatonin receptor in rat retina: evidence for multiple cell targets for melatonin. *Neuroscience*, 93(2), 793–799. doi: 10.1016/s0306-4522(99)00111-6
- Garbarino-Pico, E., Carpentieri, A. R., Contin, M. A., Sarmiento, M. I. K., Brocco, M. A., Panzetta, P., Rosenstein, R. E., Caputto, B. L., & Guido, M. E. (2004). Retinal ganglion cells are autonomous circadian oscillators synthesizing N-acetylserotonin during the day. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(49), 51172–51181. doi: 10.1074/jbc.M309248200
- Gehring, W., & Seimiya, M. (2010). Eye evolution and the origin of Darwin's eye prototype. *Italian Journal of Zoology*, 77(2), 124–136. doi: 10.1080/11250001003795350
- George, E. D., Bordner, K. A., Elwafi, H. M., & Simen, A. A. (2010). Maternal separation with early weaning: a novel mouse model of early life neglect. *BMC Neuroscience*, 11(1), 123. doi: 10.1186/1471-2202-11-123
- Gern, W. A., & Ralph, C. L. (1979). Melatonin Synthesis by the Retina. *Science*, 204(4389), 183–184. doi: 10.1126/science.432640
- Giesing, E. R., Suski, C. D., Warner, R. E., & Bell, A. M. (2011). Female sticklebacks transfer information via eggs: effects of maternal experience with predators on offspring. *Proceedings. Biological Sciences*, 278(1712), 1753–1759. doi: 10.1098/rspb.2010.1819
- Gilbert, S. F. (2005). Mechanisms for the environmental regulation of gene expression: Ecological aspects of animal development. *Journal of Biosciences*, 30(1), 65–74. doi: 10.1007/BF02705151

- Glennemeier, K. A., & Denver, R. J. (2002). Role for corticoids in mediating the response of *Rana pipiens* tadpoles to intraspecific competition. *Journal of Experimental Zoology*, 292(1), 32–40. doi: 10.1002/jez.1140
- Gollisch, T., & Meister, M. (2010). Eye Smarter than Scientists Believed: Neural Computations in Circuits of the Retina. *Neuron*, 65(2), 150–164. doi: 10.1016/j.neuron.2009.12.009
- Golombek, D. A., & Rosenstein, R. E. (2010). Physiology of Circadian Entrainment. *Physiological Reviews*, 90(3), 1063–1102. doi: 10.1152/physrev.00009.2009
- González Fleitas, M. F., Devouassoux, J., Aranda, M. L., Dieguez, H. H., Calanni, J. S., Iaquinandi, A., Sande, P. H., Dorfman, D., & Rosenstein, R. E. (2021). Melatonin Prevents Non-image-Forming Visual System Alterations Induced by Experimental Glaucoma in Rats. *Molecular Neurobiology*, 58(8), 3653–3664. doi: 10.1007/s12035-021-02374-1
- González Fleitas, M. F., Devouassoux, J. D., Aranda, M. L., Calanni, J. S., Chianelli, M. S., Dorfman, D., & Rosenstein, R. E. (2020). Enriched environment provides neuroprotection against experimental glaucoma. *Journal of Neurochemistry*, 152(1), 103–121. doi: 10.1111/jnc.14885
- Gracia-Rubio, I., Moscoso-Castro, M., Pozo, O. J., Marcos, J., Nadal, R., & Valverde, O. (2016). Maternal separation induces neuroinflammation and long-lasting emotional alterations in mice. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*, 65, 104–117. doi: 10.1016/j.pnpbp.2015.09.003
- Grigoruta, M., Chavez-Solano, M., Varela-Ramirez, A., Sierra-Fonseca, J. A., Orozco-Lucero, E., Hamdan, J. N., Gosselink, K. L., & Martinez-Martinez, A. (2020). Maternal separation induces retinal and peripheral blood mononuclear cell alterations across the lifespan of female rats. *Brain Research*, 1749, 147117. doi: 10.1016/j.brainres.2020.147117
- Hahn, J., Monavarfeshani, A., Qiao, M., Kao, A. H., Kölsch, Y., Kumar, A., Kunze, V. P., Rasys, A. M., Richardson, R., Wechselblatt, J. B., Baier, H., Lucas, R. J., Li, W., Meister, M., Trachtenberg, J. T., Yan, W., Peng, Y. R., Sanes, J. R., & Shekhar, K. (2023). Evolution of neuronal cell classes and types in the vertebrate retina. *Nature*, 624(7991), 415–424. doi: 10.1038/s41586-023-06638-9
- Han, Y., Zhang, L., Wang, Q., Zhang, D., Zhao, Q., Zhang, J., Xie, L., Liu, G., & You, Z. (2019). Minocycline inhibits microglial activation and alleviates depressive-like behaviors in male adolescent mice subjected to maternal separation. *Psychoneuroendocrinology*, 107, 37–45. doi: 10.1016/j.psyneuen.2019.04.021
- Hanisch, U.-K. (2013). Proteins in Microglial Activation - Inputs and Outputs by Subsets. *Current Protein & Peptide Science*, 14(1), 3–15. doi: 10.2174/1389203711314010003
- Harder, J. M., Braine, C. E., Williams, P. A., Zhu, X., MacNicoll, K. H., Sousa, G. L., Buchanan, R. A., Smith, R. S., Libby, R. T., Howell, G. R., & John, S. W. M. (2017). Early immune responses are independent of RGC dysfunction in glaucoma with complement component C3 being protective. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(19). doi: 10.1073/pnas.1608769114

- Hattar, S., Liao, H.-W., Takao, M., Berson, D. M., & Yau, K.-W. (2002). Melanopsin-Containing Retinal Ganglion Cells: Architecture, Projections, and Intrinsic Photosensitivity. *Science*, 295(5557), 1065–1070. doi: 10.1126/science.1069609
- Hawley, C. A., Rojo, R., Raper, A., Sauter, K. A., Lisowski, Z. M., Grabert, K., Bain, C. C., Davis, G. M., Louwe, P. A., Ostrowski, M. C., Hume, D. A., Pridans, C., & Jenkins, S. J. (2018). *Csf1r*-mApple Transgene Expression and Ligand Binding In Vivo Reveal Dynamics of CSF1R Expression within the Mononuclear Phagocyte System. *The Journal of Immunology*, 200(6), 2209–2223. doi: 10.4049/jimmunol.1701488
- He, J., Fu, Y., Ge, L., Dai, J., Fang, Y., Li, Y., Gu, X., Tao, Z., Zou, T., Li, M., Liu, Y., Xu, H., & Yin, Z. Q. (2022). Disease-associated microglial activation prevents photoreceptor degeneration by suppressing the accumulation of cell debris and neutrophils in degenerating rat retinas. *Theranostics*, 12(6), 2687–2706. doi: 10.7150/thno.67954
- Hedges, D. W., & Woon, F. L. (2011). Early-life stress and cognitive outcome. *Psychopharmacology*, 214(1), 121–130. doi: 10.1007/s00213-010-2090-6
- Heesterbeek, T. J., van der Aa, H. P. A., van Rens, G. H. M. B., Twisk, J. W. R., & van Nispen, R. M. A. (2017). The incidence and predictors of depressive and anxiety symptoms in older adults with vision impairment: a longitudinal prospective cohort study. *Ophthalmic & Physiological Optics : The Journal of the British College of Ophthalmic Opticians (Optometrists)*, 37(4), 385–398. doi: 10.1111/opq.12388
- Hensch, T. K. (2005). Critical period plasticity in local cortical circuits. *Nature Reviews Neuroscience*, 6(11), 877–888. doi: 10.1038/nrn1787
- Huang, H., Wang, Q., Guan, X., Zhang, X., Zhang, Y., Cao, J., & Li, X. (2021). Effects of enriched environment on depression and anxiety-like behavior induced by early life stress: A comparison between different periods. *Behavioural Brain Research*, 411, 113389. doi: 10.1016/j.bbr.2021.113389
- Huang, T., Cui, J., Li, L., Hitchcock, P. F., & Li, Y. (2012). The role of microglia in the neurogenesis of zebrafish retina. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 421(2), 214–220. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.03.139
- Hubel, D. H., & Wiesel, T. N. (1970). The period of susceptibility to the physiological effects of unilateral eye closure in kittens. *The Journal of Physiology*, 206(2), 419–436. doi: 10.1113/jphysiol.1970.sp009022
- Irie, K., Ohta, K., Ujihara, H., Araki, C., Honda, K., Suzuki, S., Warita, K., Otabi, H., Kumei, H., Nakamura, S., Koyano, K., Miki, T., & Kusaka, T. (2024). An enriched environment ameliorates the reduction of parvalbumin-positive interneurons in the medial prefrontal cortex caused by maternal separation early in life. *Frontiers in Neuroscience*, 17. doi: 10.3389/fnins.2023.1308368
- Isa, T., & Hall, W. C. (2009). Exploring the Superior Colliculus In Vitro. *Journal of Neurophysiology*, 102(5), 2581–2593. doi: 10.1152/jn.00498.2009
- Isa, T., Marquez-Legorreta, E., Grillner, S., & Scott, E. K. (2021). The tectum/superior colliculus as the vertebrate solution for spatial sensory

- integration and action. *Current Biology*, 31(11), R741–R762. doi: 10.1016/j.cub.2021.04.001
- Ito, S., & Feldheim, D. A. (2018). The Mouse Superior Colliculus: An Emerging Model for Studying Circuit Formation and Function. *Frontiers in Neural Circuits*, 12. doi: 10.3389/fncir.2018.00010
- Iuvone, P. M. (1990). Development of melatonin synthesis in chicken retina: regulation of serotonin N-acetyltransferase activity by light, circadian oscillators, and cyclic AMP. *Journal of Neurochemistry*, 54(5), 1562–1568. doi: 10.1111/j.1471-4159.1990.tb01205.x
- Jahng, J. W., Ryu, V., Yoo, S. B., Noh, S. J., Kim, J. Y., & Lee, J. H. (2010). Mesolimbic dopaminergic activity responding to acute stress is blunted in adolescent rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience*, 171(1), 144–152. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.08.063
- JARRETT, S., LIN, H., GODLEY, B., & BOULTON, M. (2008). Mitochondrial DNA damage and its potential role in retinal degeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(6), 596–607. doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.09.001
- Jensen, S. K. G., Berens, A. E., & Nelson, C. A. (2017). Effects of poverty on interacting biological systems underlying child development. *The Lancet. Child & Adolescent Health*, 1(3), 225–239. doi: 10.1016/S2352-4642(17)30024-X
- Jomova, K., Raptova, R., Alomar, S. Y., Alwasel, S. H., Nepovimova, E., Kuca, K., & Valko, M. (2023). Reactive oxygen species, toxicity, oxidative stress, and antioxidants: chronic diseases and aging. *Archives of Toxicology*, 97(10), 2499–2574. doi: 10.1007/s00204-023-03562-9
- Kalinichev, M., Easterling, K. W., Plotsky, P. M., & Holtzman, S. G. (2002). Long-lasting changes in stress-induced corticosterone response and anxiety-like behaviors as a consequence of neonatal maternal separation in Long-Evans rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 73(1), 131–140. doi: 10.1016/S0091-3057(02)00781-5
- Kalogerakou, S., Oulis, P., Anyfandi, E., Konstantakopoulos, G., Papakosta, V.-M., Kontis, D., Theochari, E., Angelopoulos, E., Zervas, I. M., Mellon, R. C., Papageorgiou, C. C., & Tsaltas, E. (2015). Episodic Visual Learning/Memory and Attentional Flexibility in Patients With Major Depressive Disorder After Clinically Effective Electroconvulsive Therapy. *The Journal of ECT*, 31(4), 246–252. doi: 10.1097/YCT.0000000000000238
- Kandel, E. R. (2000). *Principles of Neural Science*.
- Karanikas, E., Daskalakis, N. P., & Agorastos, A. (2021). Oxidative Dysregulation in Early Life Stress and Posttraumatic Stress Disorder: A Comprehensive Review. *Brain Sciences*, 11(6). doi: 10.3390/brainsci11060723
- Karg, M. M., Moorefield, M., Hoffmann, E., Philipose, H., Krasniqi, D., Hoppe, C., Shu, D. Y., Shirahama, S., Ksander, B. R., & Saint-Geniez, M. (2023). Microglia preserve visual function in the aging retina by supporting retinal pigment epithelial health. *Immunity & Ageing*, 20(1), 53. doi: 10.1186/s12979-023-00358-4

- Karlstetter, M., Ebert, S., & Langmann, T. (2010). Microglia in the healthy and degenerating retina: Insights from novel mouse models. *Immunobiology*, 215(9–10), 685–691. doi: 10.1016/j.imbio.2010.05.010
- Karlstetter, M., Scholz, R., Rutar, M., Wong, W. T., Provis, J. M., & Langmann, T. (2015). Retinal microglia: Just bystander or target for therapy? *Progress in Retinal and Eye Research*, 45, 30–57. doi: 10.1016/j.preteyeres.2014.11.004
- Kempermann, G. (2019). Environmental enrichment, new neurons and the neurobiology of individuality. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(4), 235–245. doi: 10.1038/s41583-019-0120-x
- Kettenmann, H., Hanisch, U.-K., Noda, M., & Verkhratsky, A. (2011). Physiology of microglia. *Physiological Reviews*, 91(2), 461–553. doi: 10.1152/physrev.00011.2010
- Kim, M., Kim, H. K., Kim, B., & Yim, S. (2004). Melatonin increases cell proliferation in the dentate gyrus of maternally separated rats. *Journal of Pineal Research*, 37(3), 193–197. doi: 10.1111/j.1600-079X.2004.00157.x
- Knox, D., Stout-Oswald, S. A., Tan, M., George, S. A., & Liberzon, I. (2021). Maternal Separation Induces Sex-Specific Differences in Sensitivity to Traumatic Stress. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 15. doi: 10.3389/fnbeh.2021.766505
- Knudsen, E. I. (2004). Sensitive Periods in the Development of the Brain and Behavior. *Journal of Cognitive Neuroscience*, 16(8), 1412–1425. doi: 10.1162/0898929042304796
- Knudsen, E. I. (2020). Evolution of neural processing for visual perception in vertebrates. In Journal of Comparative Neurology (Vol. 528, Issue 17, pp. 2888–2901). Wiley-Liss Inc. doi: 10.1002/cne.24871
- Korczowska-Łącka, I., Słowiński, B., Piekut, T., Hurła, M., Banaszek, N., Szymanowicz, O., Jagodziński, P. P., Kozubski, W., Permoda-Pachuta, A., & Dorszewska, J. (2023). Disorders of Endogenous and Exogenous Antioxidants in Neurological Diseases. *Antioxidants*, 12(10), 1811. doi: 10.3390/antiox12101811
- Korkmaz, A., Reiter, R. J., Topal, T., Manchester, L. C., Oter, S., & Tan, D.-X. (2009). Melatonin: an established antioxidant worthy of use in clinical trials. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 15(1–2), 43–50. doi: 10.2119/molmed.2008.00117
- Kowluru, R. A., & Abbas, S. N. (2003). Diabetes-Induced Mitochondrial Dysfunction in the Retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(12), 5327. doi: 10.1167/iovs.03-0353
- Krauzlis, R. J., Bogadhi, A. R., Herman, J. P., & Bollimunta, A. (2018). Selective attention without a neocortex. *Cortex*, 102, 161–175. doi: 10.1016/j.cortex.2017.08.026
- KRECH, D. (1963). Effects of Complex Environment and Blindness on Rat Brain. *Archives of Neurology*, 8(4), 403. doi: 10.1001/archneur.1963.00460040073007
- KRECH, D., ROSENZWEIG, M. R., & BENNETT, E. L. (1960). Effects of environmental complexity and training on brain chemistry. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 53, 509–519. doi: 10.1037/h0045402

- Kuehn, S., Reinehr, S., Stute, G., Rodust, C., Grotegut, P., Hensel, A.-T., Dick, H. B., & Joachim, S. C. (2018). Interaction of complement system and microglia activation in retina and optic nerve in a NMDA damage model. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 89, 95–106. doi: 10.1016/j.mcn.2018.05.001
- Kuhn, C. M., Pauk, J., & Schanberg, S. M. (1990). Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Developmental Psychobiology*, 23(5), 395–410. doi: 10.1002/dev.420230503
- Laguna, A., Lajud, N., Juárez, J., & Sanz-Martin, A. (2022). Chronic early-life stress increases cognitive impulsivity and D2 immunoreactivity in the nucleus accumbens of adult rats. *Developmental Psychobiology*, 64(4). doi: 10.1002/dev.22259
- Lally, J. R., & Mangione, P. (2017). Caring Relationships: The Heart of Early Brain Development. In Source: YC Young Children (Vol. 72, Issue 2).
- Lamb, T. D., Collin, S. P., & Pugh, E. N. (2007). Evolution of the vertebrate eye: opsins, photoreceptors, retina and eye cup. *Nature Reviews Neuroscience*, 8(12), 960–976. doi: 10.1038/nrn2283
- Land Michel F., N. D.-E. (2013). *Animal eyes*.
- Landi, S., Sale, A., Berardi, N., Viegi, A., Maffei, L., & Cenni, M. C. (2007). Retinal functional development is sensitive to environmental enrichment: a role for BDNF. *The FASEB Journal*, 21(1), 130–139. doi: 10.1096/fj.06-6083com
- Lanzani, M. F., de Zavalía, N., Fontana, H., Sarmiento, M. I. K., Golombek, D., & Rosenstein, R. E. (2012). Alterations of locomotor activity rhythm and sleep parameters in patients with advanced glaucoma. *Chronobiology International*, 29(7), 911–919. doi: 10.3109/07420528.2012.691146
- Laudenbergs, N., Kinuthia, U. M., & Langmann, T. (2024). Microglia depletion/repopulation does not affect light-induced retinal degeneration in mice. *Frontiers in Immunology*, 14. doi: 10.3389/fimmu.2023.1345382
- Lawrence, T., & Gilroy, D. W. (2007). Chronic inflammation: a failure of resolution? *International Journal of Experimental Pathology*, 88(2), 85–94. doi: 10.1111/j.1365-2613.2006.00507.x
- Leachman, J. R., Rea, M. D., Cohn, D. M., Xu, X., Fondufe-Mittendorf, Y. N., & Loria, A. S. (2020). Exacerbated obesogenic response in female mice exposed to early life stress is linked to fat depot-specific upregulation of leptin protein expression. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 319(5), E852–E862. doi: 10.1152/ajpendo.00243.2020
- Lee, J. E., Liang, K. J., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2008). Ex Vivo Dynamic Imaging of Retinal Microglia Using Time-Lapse Confocal Microscopy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(9), 4169–4176. doi: 10.1167/iovs.08-2076
- LeGates, T. A., Altimus, C. M., Wang, H., Lee, H.-K., Yang, S., Zhao, H., Kirkwood, A., Weber, E. T., & Hattar, S. (2012). Aberrant light directly impairs mood and learning through melanopsin-expressing neurons. *Nature*, 491(7425), 594–598. doi: 10.1038/nature11673
- LERNER, A. B., CASE, J. D., MORI, W., & WRIGHT, M. R. (1959). Melatonin in Peripheral Nerve. *Nature*, 183(4678), 1821–1821. doi: 10.1038/1831821a0

- Lesuis, S. L., Hoeijmakers, L., Korosi, A., de Rooij, S. R., Swaab, D. F., Kessels, H. W., Lucassen, P. J., & Krugers, H. J. (2018). Vulnerability and resilience to Alzheimer's disease: early life conditions modulate neuropathology and determine cognitive reserve. *Alzheimer's Research & Therapy*, 10(1), 95. doi: 10.1186/s13195-018-0422-7
- Levine, S. (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology*, 30(10), 939–946. doi: 10.1016/j.psyneuen.2005.03.013
- Lewis, T. L., & Maurer, D. (2005). Multiple sensitive periods in human visual development: Evidence from visually deprived children. *Developmental Psychobiology*, 46(3), 163–183. doi: 10.1002/dev.20055
- Liao, X., Yang, X., Jia, J., Li, J., Xie, X., Su, Y., Schmidt, M. V., Si, T., & Wang, X. (2014). Blockade of corticotropin-releasing hormone receptor 1 attenuates early-life stress-induced synaptic abnormalities in the neonatal hippocampus. *Hippocampus*, 24(5), 528–540. doi: 10.1002/hipo.22254
- Lippmann, M., Bress, A., Nemeroff, C. B., Plotsky, P. M., & Monteggia, L. M. (2007). Long-term behavioural and molecular alterations associated with maternal separation in rats. *European Journal of Neuroscience*, 25(10), 3091–3098. doi: 10.1111/j.1460-9568.2007.05522.x
- Liu, D., Diorio, J., Tannenbaum, B., Caldji, C., Francis, D., Freedman, A., Sharma, S., Pearson, D., Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1997). Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science (New York, N.Y.)*, 277(5332), 1659–1662. doi: 10.1126/science.277.5332.1659
- Livingstone, M., & Hubel, D. (1988). Segregation of Form, Color, Movement, and Depth: Anatomy, Physiology, and Perception. *Science*, 240(4853), 740–749. doi: 10.1126/science.3283936
- Loi, M., Sarabdjitsingh, R. A., Tsouli, A., Trinh, S., Arp, M., Krugers, H. J., Karst, H., van den Bos, R., & Joëls, M. (2017). Transient Prepubertal Mifepristone Treatment Normalizes Deficits in Contextual Memory and Neuronal Activity of Adult Male Rats Exposed to Maternal Deprivation. *Eneuro*, 4(5), ENEURO.0253-17.2017. doi: 10.1523/ENEURO.0253-17.2017
- Love, O. P., Chin, E. H., Wynne-Edwards, K. E., & Williams, T. D. (2005). Stress Hormones: A Link between Maternal Condition and Sex-Biased Reproductive Investment. *The American Naturalist*, 166(6), 751–766. doi: 10.1086/497440
- Luo, C., Zhao, J., Madden, A., Chen, M., & Xu, H. (2013). Complement expression in retinal pigment epithelial cells is modulated by activated macrophages. *Experimental Eye Research*, 112, 93–101. doi: 10.1016/j.exer.2013.04.016
- Lupien, S. J., McEwen, B. S., Gunnar, M. R., & Heim, C. (2009). Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nature Reviews Neuroscience*, 10(6), 434–445. doi: 10.1038/nrn2639
- Lyubarsky, A. L., Falsini, B., Pennesi, M. E., Valentini, P., & Pugh, E. N. (1999). UV- and Midwave-Sensitive Cone-Driven Retinal Responses of the Mouse: A Possible Phenotype for Coexpression of Cone Photopigments. *The Journal of Neuroscience*, 19(1), 442–455. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-01-00442.1999

- Malcon, L. M. C., Wearick-Silva, L. E., Zaparte, A., Orso, R., Luft, C., Trachtenberg, S. G., Donadio, M. V. F., de Oliveira, J. R., & Grassi-Oliveira, R. (2020). Maternal separation induces long-term oxidative stress alterations and increases anxiety-like behavior of male Balb/cJ mice. *Experimental Brain Research*, 238(9), 2097–2107. doi: 10.1007/s00221-020-05859-y
- Marais, L., van Rensburg, S. J., van Zyl, J. M., Stein, D. J., & Daniels, W. M. U. (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neuroscience Research*, 61(1), 106–112. doi: 10.1016/j.neures.2008.01.011
- Masland, R. H. (2012). The Neuronal Organization of the Retina. *Neuron*, 76(2), 266–280. doi: 10.1016/j.neuron.2012.10.002
- McEwen, B. S. (2008). Understanding the potency of stressful early life experiences on brain and body function. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 57 Suppl 2(Suppl 2), S11-5. doi: 10.1016/j.metabol.2008.07.006
- Meaney, M. J. (2001). Maternal Care, Gene Expression, and the Transmission of Individual Differences in Stress Reactivity Across Generations. *Annual Review of Neuroscience*, 24(1), 1161–1192. doi: 10.1146/annurev.neuro.24.1.1161
- Menendez-Pelaez, A., Poeggeler, B., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L., Pablos, M. I., & Tan, D. (1993). Nuclear localization of melatonin in different mammalian tissues: Immunocytochemical and radioimmunoassay evidence. *Journal of Cellular Biochemistry*, 53(4), 373–382. doi: 10.1002/jcb.240530415
- Meylan, S., & Clobert, J. (2005). Is corticosterone-mediated phenotype development adaptive? Maternal corticosterone treatment enhances survival in male lizards. *Hormones and Behavior*, 48(1), 44–52. doi: 10.1016/j.yhbeh.2004.11.022
- Mhillaj, E., Morgese, M., & Trabace, L. (2015). Early Life and Oxidative Stress in Psychiatric Disorders: What Can we Learn From Animal Models? *Current Pharmaceutical Design*, 21(11), 1396–1403. doi: 10.2174/1381612821666150105122422
- Militante, J., & Lombardini, J. B. (2004). Age-Related Retinal Degeneration in Animal Models of Aging: Possible Involvement of Taurine Deficiency and Oxidative Stress. *Neurochemical Research*, 29(1), 151–160. doi: 10.1023/B:NERE.0000010444.97959.1b
- Monaghan, P. (2008). Early growth conditions, phenotypic development and environmental change. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1497), 1635–1645. doi: 10.1098/rstb.2007.0011
- Mora, F., Segovia, G., & del Arco, A. (2008). Glutamate–dopamine–GABA interactions in the aging basal ganglia. *Brain Research Reviews*, 58(2), 340–353. doi: 10.1016/j.brainresrev.2007.10.006
- Moreno, M. C., Sande, P., Marcos, H. A., De Zavalía, N., Sarmiento, M. I. K., & Rosenstein, R. E. (2005). Effect of glaucoma on the retinal glutamate/glutamine cycle activity. *The FASEB Journal*, 19(9), 1161–1162. doi: 10.1096/fj.04-3313fje

- Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Salinas-Navarro, M., Sobrado-Calvo, P., Alburquerque-Béjar, J. J., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2012). Whole Number, Distribution and Co-Expression of Brn3 Transcription Factors in Retinal Ganglion Cells of Adult Albino and Pigmented Rats. *PLoS ONE*, 7(11), e49830. doi: 10.1371/journal.pone.0049830
- Natoli, R., Fernando, N., Dahlenburg, T., Jiao, H., Aggio-Bruce, R., Barnett, N. L., Chao de la Barca, J. M., Tcherkez, G., Reynier, P., Fang, J., Chu-Tan, J. A., Valter, K., Provis, J., & Rutar, M. (2018). Obesity-induced metabolic disturbance drives oxidative stress and complement activation in the retinal environment. *Molecular Vision*, 24, 201–217.
- Nelson, C. A. (2014). *Romania's Abandoned Children*. Harvard University Press. doi: 10.4159/harvard.9780674726079
- Nelson, C. A. (2017). Hazards to Early Development: The Biological Embedding of Early Life Adversity. *Neuron*, 96(2), 262–266. doi: 10.1016/j.neuron.2017.09.027
- Neufeld, A. H. (1999). Microglia in the Optic Nerve Head and the Region of Parapapillary Chorioretinal Atrophy in Glaucoma. *Archives of Ophthalmology*, 117(8), 1050. doi: 10.1001/archopht.117.8.1050
- Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., & Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, 308(5726), 1314–1318. doi: 10.1126/science.1110647
- Nishi, M. (2020). Effects of Early-Life Stress on the Brain and Behaviors: Implications of Early Maternal Separation in Rodents. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7212. doi: 10.3390/ijms21197212
- Nishi, M., Horii-Hayashi, N., & Sasagawa, T. (2014). Effects of early life adverse experiences on the brain: implications from maternal separation models in rodents. *Frontiers in Neuroscience*, 8. doi: 10.3389/fnins.2014.00166
- Nithianantharajah, J., & Hannan, A. J. (2006). Enriched environments, experience-dependent plasticity and disorders of the nervous system. *Nature Reviews Neuroscience*, 7(9), 697–709. doi: 10.1038/nrn1970
- Noailles, A., Kutsyr, O., Maneu, V., Ortuño-Lizarán, I., Campello, L., de Juan, E., Gómez-Vicente, V., Cuenca, N., & Lax, P. (2019). The Absence of Toll-Like Receptor 4 Mildly Affects the Structure and Function in the Adult Mouse Retina. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. doi: 10.3389/fncel.2019.00059
- Oliveira, A. F., & Yonehara, K. (2018). The Mouse Superior Colliculus as a Model System for Investigating Cell Type-Based Mechanisms of Visual Motor Transformation. *Frontiers in Neural Circuits*, 12. doi: 10.3389/fncir.2018.00059
- Orso, R., Creutzberg, K. C., Lumertz, F. S., Kestering-Ferreira, E., Stocchero, B. A., Perrone, M. K., Begni, V., Grassi-Oliveira, R., Riva, M. A., & Viola, T. W. (2023). A systematic review and multilevel meta-analysis of the prenatal and early life stress effects on rodent microglia, astrocyte, and oligodendrocyte density and morphology. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 150, 105202. doi: 10.1016/j.neubiorev.2023.105202

- Ortín-Martínez, A., Nadal-Nicolás, F. M., Jiménez-López, M., Alburquerque-Béjar, J. J., Nieto-López, L., García-Ayuso, D., Villegas-Pérez, M. P., Vidal-Sanz, M., & Agudo-Barriuso, M. (2014). Number and Distribution of Mouse Retinal Cone Photoreceptors: Differences between an Albino (Swiss) and a Pigmented (C57/BL6) Strain. *PLoS ONE*, 9(7), e102392. doi: 10.1371/journal.pone.0102392
- Osborne, N. N., Núñez-Álvarez, C., & del Olmo-Aguado, S. (2014). The effect of visual blue light on mitochondrial function associated with retinal ganglion cells. *Experimental Eye Research*, 128, 8–14. doi: 10.1016/j.exer.2014.08.012
- Otero Coronel, S., Martorell, N., Beron de Astrada, M., & Medan, V. (2020). Stimulus Contrast Information Modulates Sensorimotor Decision Making in Goldfish. *Frontiers in Neural Circuits*, 14. doi: 10.3389/fncir.2020.00023
- Ozdamar Unal, G., Kumbul, D., Hekimler Ozturk, K., Erkilinc, G., Donmez, F., Dogan Kiran, E., & Yuceer, R. O. (2024). The effect of Vortioxetine on the NLRP3 pathway and microglial activity in the prefrontal cortex in an experimental model of depression. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 46(2), 264–275. doi: 10.1080/08923973.2024.2308268
- Pacher, P., Beckman, J. S., & Liaudet, L. (2007). Nitric Oxide and Peroxynitrite in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 87(1), 315–424. doi: 10.1152/physrev.00029.2006
- Panda, S. P., Reddy, P. H., Gorla, U. S., & Prasanth, D. (2023). Neuroinflammation and neovascularization in diabetic eye diseases (DEDs): identification of potential pharmacotherapeutic targets. *Molecular Biology Reports*, 50(2), 1857–1869. doi: 10.1007/s11033-022-08113-6
- Pang, S. F., Dubocovich, M. L., & Brown, G. M. (1993). Melatonin receptors in peripheral tissues: a new area of melatonin research. *Biological Signals*, 2(4), 177–180. doi: 10.1159/000109490
- Papilloud, A., Veenit, V., Tzanoulinou, S., Riccio, O., Zanoletti, O., Guillot de Suduiraut, I., Grosse, J., & Sandi, C. (2019). Peripubertal stress-induced heightened aggression: modulation of the glucocorticoid receptor in the central amygdala and normalization by mifepristone treatment. *Neuropsychopharmacology*, 44(4), 674–682. doi: 10.1038/s41386-018-0110-0
- Papp, A., Németh, I., Karg, E., & Papp, E. (1999). Glutathione status in retinopathy of prematurity. *Free Radical Biology and Medicine*, 27(7–8), 738–743. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00041-6
- Parent, C., Zhang, T.-Y., Caldji, C., Bagot, R., Champagne, F. A., Pruessner, J., & Meaney, M. J. (2005). Maternal Care and Individual Differences in Defensive Responses. *Current Directions in Psychological Science*, 14(5), 229–233. doi: 10.1111/j.0963-7214.2005.00370.x
- Park, S.-S., Park, H.-S., Kim, C.-J., Baek, S.-S., & Kim, T.-W. (2019). Exercise attenuates maternal separation-induced mood disorder-like behaviors by enhancing mitochondrial functions and neuroplasticity in the dorsal raphe. *Behavioural Brain Research*, 372, 112049. doi: 10.1016/j.bbr.2019.112049
- Parker, A. (2004). *In The Blink Of An Eye: How Vision Sparked The Big Bang Of Evolution.*

- Paterson, J. R., García-Bellido, D. C., Lee, M. S. Y., Brock, G. A., Jago, J. B., & Edgecombe, G. D. (2011). Acute vision in the giant Cambrian predator Anomalocaris and the origin of compound eyes. *Nature*, 480(7376), 237–240. doi: 10.1038/nature10689
- Peichl, L. (2005). Diversity of mammalian photoreceptor properties: Adaptations to habitat and lifestyle? *The Anatomical Record Part A: Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*, 287A(1), 1001–1012. doi: 10.1002/ar.a.20262
- Plachetzki, D. C., Fong, C. R., & Oakley, T. H. (2010). The evolution of phototransduction from an ancestral cyclic nucleotide gated pathway. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1690), 1963–1969. doi: 10.1098/rspb.2009.1797
- Plotsky, P. M., & Meaney, M. J. (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 18(3), 195–200. doi: 10.1016/0169-328X(93)90189-V
- Provis, J. M., Penfold, P. L., Edwards, A. J., & van Driel, D. (1995). Human retinal microglia: Expression of immune markers and relationship to the *Glia limitans*. *Glia*, 14(4), 243–256. doi: 10.1002/glia.440140402
- Prusky, G. T., Reidel, C., & Douglas, R. M. (2000). Environmental enrichment from birth enhances visual acuity but not place learning in mice. *Behavioural Brain Research*, 114(1–2), 11–15. doi: 10.1016/S0166-4328(00)00186-8
- Prusky, G. T., West, P. W. R., & Douglas, R. M. (2000). Behavioral assessment of visual acuity in mice and rats. *Vision Research*, 40(16), 2201–2209. doi: 10.1016/S0042-6989(00)00081-X
- Qin, X., Liu, X.-X., Wang, Y., Wang, D., Song, Y., Zou, J.-X., Pan, H.-Q., Zhai, X.-Z., Zhang, Y.-M., Zhang, Y.-B., Hu, P., & Zhang, W.-H. (2021). Early life stress induces anxiety-like behavior during adulthood through dysregulation of neuronal plasticity in the basolateral amygdala. *Life Sciences*, 285, 119959. doi: 10.1016/j.lfs.2021.119959
- Quay, W. B. (1965). Indole derivatives of pineal and related neural and retinal tissues. *Pharmacological Reviews*, 17(3), 321–345.
- Rada, J. A. S., & Wiechmann, A. F. (2006). Melatonin receptors in chick ocular tissues: implications for a role of melatonin in ocular growth regulation. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 47(1), 25–33. doi: 10.1167/iovs.05-0195
- Ransohoff, R. M. (2016). A polarizing question: do M1 and M2 microglia exist? *Nature Neuroscience*, 19(8), 987–991. doi: 10.1038/nn.4338
- Rathnasamy, G., Foulds, W. S., Ling, E.-A., & Kaur, C. (2019). Retinal microglia – A key player in healthy and diseased retina. *Progress in Neurobiology*, 173, 18–40. doi: 10.1016/j.pneurobio.2018.05.006
- Read, J. C. A. (2021). Binocular Vision and Stereopsis Across the Animal Kingdom. *Annual Review of Vision Science*, 7(1), 389–415. doi: 10.1146/annurev-vision-093019-113212

- Reemst, K., Kracht, L., Kotah, J. M., Rahimian, R., van Irsen, A. A. S., Congrains Sotomayor, G., Verboon, L. N., Brouwer, N., Simard, S., Turecki, G., Mechawar, N., Kooistra, S. M., Eggen, B. J. L., & Korosi, A. (2022). Early-life stress lastingly impacts microglial transcriptome and function under basal and immune-challenged conditions. *Translational Psychiatry*, 12(1), 507. doi: 10.1038/s41398-022-02265-6
- Reichenbach, A., & Bringmann, A. (2013). New functions of Müller cells. *Glia*, 61(5), 651–678. doi: 10.1002/glia.22477
- Reiter, R J. (1995). Functional pleiotropy of the neurohormone melatonin: antioxidant protection and neuroendocrine regulation. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 16(4), 383–415. doi: 10.1006/frne.1995.1014
- Reiter, R J, Guerrero, J. M., Escames, G., Pappolla, M. A., & Acuña-Castroviejo, D. (1997). Prophylactic actions of melatonin in oxidative neurotoxicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 825, 70–78. doi: 10.1111/j.1749-6632.1997.tb48415.x
- Reiter, Russel J, Sharma, R., Tan, D.-X., Chuffa, L. G. de A., da Silva, D. G. H., Slominski, A. T., Steinbrink, K., & Kleszczynski, K. (2024). Dual sources of melatonin and evidence for different primary functions. *Frontiers in Endocrinology*, 15, 1414463. doi: 10.3389/fendo.2024.1414463
- Reshetnikov, V. V., Kovner, A. V., Lepeshko, A. A., Pavlov, K. S., Grinkevich, L. N., & Bondar, N. P. (2020). Stress early in life leads to cognitive impairments, reduced numbers of CA3 neurons and altered maternal behavior in adult female mice. *Genes, Brain and Behavior*, 19(3). doi: 10.1111/gbb.12541
- Robinson, L., Bridge, H., & Riedel, G. (2001). Visual discrimination learning in the water maze: a novel test for visual acuity. *Behavioural Brain Research*, 119(1), 77–84. doi: 10.1016/S0166-4328(00)00334-X
- Rutar, M., Natoli, R., Kozulin, P., Valter, K., Gatenby, P., & Provis, J. M. (2011). Analysis of Complement Expression in Light-Induced Retinal Degeneration: Synthesis and Deposition of C3 by Microglia/Macrophages Is Associated with Focal Photoreceptor Degeneration. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(8), 5347. doi: 10.1167/iovs.10-7119
- Sáenz, D. A., Goldin, A. P., Mince, L., Chianelli, M., Sarmiento, M. I. K., & Rosenstein, R. E. (2004). Effect of melatonin on the retinal glutamate/glutamine cycle in the golden hamster retina. *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(15), 1912–1913. doi: 10.1096/fj.04-2062fje
- Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2009). Enrich the environment to empower the brain. *Trends in Neurosciences*, 32(4), 233–239. doi: 10.1016/j.tins.2008.12.004
- Sale, A., Berardi, N., & Maffei, L. (2014). Environment and Brain Plasticity: Towards an Endogenous Pharmacotherapy. *Physiological Reviews*, 94(1), 189–234. doi: 10.1152/physrev.00036.2012
- Sale, A., Cenni, M. C., Ciucci, F., Putignano, E., Chierzi, S., & Maffei, L. (2007). Maternal enrichment during pregnancy accelerates retinal development of the fetus. *PloS One*, 2(11), e1160. doi: 10.1371/journal.pone.0001160

- Salido, E. M., Bordone, M., De Laurentiis, A., Chianelli, M., Keller Sarmiento, M. I., Dorfman, D., & Rosenstein, R. E. (2013). Therapeutic efficacy of melatonin in reducing retinal damage in an experimental model of early type 2 diabetes in rats. *Journal of Pineal Research*, 54(2), 179–189. doi: 10.1111/jpi.12008
- SÁNCHEZ, M. M., LADD, C. O., & PLOTSKY, P. M. (2001). Early adverse experience as a developmental risk factor for later psychopathology: Evidence from rodent and primate models. *Development and Psychopathology*, 13(3), 419–449. doi: 10.1017/S0954579401003029
- Sande, P. H., Fernandez, D. C., Aldana Marcos, H. J., Chianelli, M. S., Aisemberg, J., Silberman, D. M., Sáenz, D. A., & Rosenstein, R. E. (2008). Therapeutic effect of melatonin in experimental uveitis. *The American Journal of Pathology*, 173(6), 1702–1713. doi: 10.2353/ajpath.2008.080518
- Sandi, C., & Haller, J. (2015). Stress and the social brain: behavioural effects and neurobiological mechanisms. *Nature Reviews. Neuroscience*, 16(5), 290–304. doi: 10.1038/nrn3918
- Sanes, J. R., & Zipursky, S. L. (2010a). Design Principles of Insect and Vertebrate Visual Systems. *Neuron*, 66(1), 15–36. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.018
- Sanes, J. R., & Zipursky, S. L. (2010b). Design Principles of Insect and Vertebrate Visual Systems. *Neuron*, 66(1), 15–36. doi: 10.1016/j.neuron.2010.01.018
- Sato, K., Sato, T., Ohno-Oishi, M., Ozawa, M., Maekawa, S., Shiga, Y., Yabana, T., Yasuda, M., Himori, N., Omodaka, K., Fujita, K., Nishiguchi, K. M., Ge, S., & Nakazawa, T. (2021). CHOP deletion and anti-neuroinflammation treatment with hesperidin synergistically attenuate NMDA retinal injury in mice. *Experimental Eye Research*, 213, 108826. doi: 10.1016/j.exer.2021.108826
- Savaskan, E., Wirz-Justice, A., Olivieri, G., Pache, M., Kräuchi, K., Brydon, L., Jockers, R., Müller-Spahn, F., & Meyer, P. (2002). Distribution of melatonin MT1 receptor immunoreactivity in human retina. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry : Official Journal of the Histochemistry Society*, 50(4), 519–526. doi: 10.1177/002215540205000408
- Schafer, D. P., Lehrman, E. K., Kautzman, A. G., Koyama, R., Mardinly, A. R., Yamasaki, R., Ransohoff, R. M., Greenberg, M. E., Barres, B. A., & Stevens, B. (2012). Microglia Sculpt Postnatal Neural Circuits in an Activity and Complement-Dependent Manner. *Neuron*, 74(4), 691–705. doi: 10.1016/j.neuron.2012.03.026
- Scher, J., Wankiewicz, E., Brown, G. M., & Fujieda, H. (2002). MT(1) melatonin receptor in the human retina: expression and localization. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 43(3), 889–897.
- Schmidt, T. M., Do, M. T. H., Dacey, D., Lucas, R., Hattar, S., & Matynia, A. (2011). Melanopsin-Positive Intrinsically Photosensitive Retinal Ganglion Cells: From Form to Function. *The Journal of Neuroscience*, 31(45), 16094–16101. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4132-11.2011
- Semple, B. D., Blomgren, K., Gimlin, K., Ferriero, D. M., & Noble-Haeusslein, L. J. (2013). Brain development in rodents and humans: Identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. *Progress in Neurobiology*, 106–107, 1–16. doi: 10.1016/j.pneurobio.2013.04.001

- Sequeira, M. K., & Bolton, J. L. (2023). Stressed Microglia: Neuroendocrine–Neuroimmune Interactions in the Stress Response. *Endocrinology*, 164(7). doi: 10.1210/endocr/bqad088
- Shang, C., Chen, Z., Liu, A., Li, Y., Zhang, J., Qu, B., Yan, F., Zhang, Y., Liu, W., Liu, Z., Guo, X., Li, D., Wang, Y., & Cao, P. (2018). Divergent midbrain circuits orchestrate escape and freezing responses to looming stimuli in mice. *Nature Communications*, 9(1), 1232. doi: 10.1038/s41467-018-03580-7
- Sheriff, M. J., Bell, A., Boonstra, R., Dantzer, B., Lavergne, S. G., McGhee, K. E., MacLeod, K. J., Winandy, L., Zimmer, C., & Love, O. P. (2017). Integrating Ecological and Evolutionary Context in the Study of Maternal Stress. *Integrative and Comparative Biology*, 57(3), 437–449. doi: 10.1093/icb/icx105
- Silverman, S. M., & Wong, W. T. (2018). Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annual Review of Vision Science*, 4(1), 45–77. doi: 10.1146/annurev-vision-091517-034425
- Siu, A. W., Maldonado, M., Sanchez-Hidalgo, M., Tan, D.-X., & Reiter, R. J. (2006). Protective effects of melatonin in experimental free radical-related ocular diseases. *Journal of Pineal Research*, 40(2), 101–109. doi: 10.1111/j.1600-079X.2005.00304.x
- Soares, A. R., Gildawie, K. R., Honeycutt, J. A., & Brenhouse, H. C. (2020). Region-specific effects of maternal separation on oxidative stress accumulation in parvalbumin neurons of male and female rats. *Behavioural Brain Research*, 388, 112658. doi: 10.1016/j.bbr.2020.112658
- Song, Y., Liao, Y., Liu, T., Chen, Y., Wang, F., Zhou, Z., Zhang, W., & Li, J. (2024). Microglial repopulation restricts ocular inflammation and choroidal neovascularization in mice. *Frontiers in Immunology*, 15. doi: 10.3389/fimmu.2024.1366841
- Spencer, K. A., Evans, N. P., & Monaghan, P. (2009). Postnatal Stress in Birds: A Novel Model of Glucocorticoid Programming of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis. *Endocrinology*, 150(4), 1931–1934. doi: 10.1210/en.2008-1471
- Tang, F., Xu, F., Cui, L., Huang, W., Jiang, L., Chen, L., Yan, W., He, W., Shen, C., Huang, H., Lv, J., Zhao, X., Zeng, S., Li, M., Ouyang, Y., Guo, X., Zhong, H., & Zhang, M. (2020). The expression and role of PIDD in retina after optic nerve crush. *Journal of Molecular Histology*, 51(1), 89–97. doi: 10.1007/s10735-020-09860-1
- Tang, Y., & Le, W. (2016). Differential Roles of M1 and M2 Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Molecular Neurobiology*, 53(2), 1181–1194. doi: 10.1007/s12035-014-9070-5
- Teicher, M. H., Samson, J. A., Anderson, C. M., & Ohashi, K. (2016). The effects of childhood maltreatment on brain structure, function and connectivity. *Nature Reviews. Neuroscience*, 17(10), 652–666. doi: 10.1038/nrn.2016.111
- Tezel, G., Yang, X., & Cai, J. (2005). Proteomic Identification of Oxidatively Modified Retinal Proteins in a Chronic Pressure-Induced Rat Model of Glaucoma. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 46(9), 3177. doi: 10.1167/iovs.05-0208

- Tugyan, K., Uysal, N., Ozdemir, D., Sonmez, U., Pekcetin, C., Erbil, G., & Sonmez, A. (2006). Protective effect of melatonin against maternal deprivation-induced acute hippocampal damage in infant rats. *Neuroscience Letters*, 398(1–2), 145–150. doi: 10.1016/j.neulet.2005.12.090
- Uller, T., & Olsson, M. (2006). Direct Exposure to Corticosterone During Embryonic Development Influences Behaviour in an Ovoviparous Lizard. *Ethology*, 112(4), 390–397. doi: 10.1111/j.1439-0310.2006.01164.x
- van Alphen, B., Winkelman, B. H. J., & Frens, M. A. (2009). Age- and Sex-Related Differences in Contrast Sensitivity in C57BL/6 Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(5), 2451. doi: 10.1167/iovs.08-2594
- van Harmelen, A.-L., de Jong, P. J., Glashouwer, K. A., Spinhoven, P., Penninx, B. W. J. H., & Elzinga, B. M. (2010). Child abuse and negative explicit and automatic self-associations: The cognitive scars of emotional maltreatment. *Behaviour Research and Therapy*, 48(6), 486–494. doi: 10.1016/j.brat.2010.02.003
- van Praag, H., Kempermann, G., & Gage, F. H. (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience*, 1(3), 191–198. doi: 10.1038/35044558
- Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., & Sharma, S. C. (2016). Glia–neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 51, 1–40. doi: 10.1016/j.preteyeres.2015.06.003
- Vidal-Itriago, A., Radford, R. A. W., Aramideh, J. A., Maurel, C., Scherer, N. M., Don, E. K., Lee, A., Chung, R. S., Graeber, M. B., & Morsch, M. (2022). Microglia morphophysiological diversity and its implications for the CNS. *Frontiers in Immunology*, 13. doi: 10.3389/fimmu.2022.997786
- Wachtmeister, L. (1998). Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Progress in Retinal and Eye Research*, 17(4), 485–521. doi: 10.1016/S1350-9462(98)00006-8
- WALKER, C.-D., SCRIBNER, K. A., CASCIO, C. S., & DALLMAN, M. F. (1991). The Pituitary-Adrenocortical System of Neonatal Rats Is Responsive to Stress throughout Development in a Time-Dependent and Stressor-Specific Fashion*. *Endocrinology*, 128(3), 1385–1395. doi: 10.1210/endo-128-3-1385
- Wang, F., Li, E., De, L., Wu, Q., & Zhang, Y. (2021). OFF-transient alpha RGCs mediate looming triggered innate defensive response. *Current Biology*, 31(11), 2263–2273.e3. doi: 10.1016/j.cub.2021.03.025
- Wang, X., Zhao, L., Zhang, J., Fariss, R. N., Ma, W., Kretschmer, F., Wang, M., Qian, H. hua, Badea, T. C., Diamond, J. S., Gan, W.-B., Roger, J. E., & Wong, W. T. (2016). Requirement for Microglia for the Maintenance of Synaptic Function and Integrity in the Mature Retina. *The Journal of Neuroscience*, 36(9), 2827–2842. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3575-15.2016
- Wässle, H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. *Nature Reviews Neuroscience*, 5(10), 747–757. doi: 10.1038/nrn1497
- Weaver, I. C. G., Cervoni, N., Champagne, F. A., D'Alessio, A. C., Sharma, S., Seckl, J. R., Dymov, S., Szyf, M., & Meaney, M. J. (2004). Epigenetic programming by maternal behavior. *Nature Neuroscience*, 7(8), 847–854. doi: 10.1038/nn1276

- Wei, P., Liu, N., Zhang, Z., Liu, X., Tang, Y., He, X., Wu, B., Zhou, Z., Liu, Y., Li, J., Zhang, Y., Zhou, X., Xu, L., Chen, L., Bi, G., Hu, X., Xu, F., & Wang, L. (2015). Processing of visually evoked innate fear by a non-canonical thalamic pathway. *Nature Communications*, 6(1), 6756. doi: 10.1038/ncomms7756
- West-Eberhard, M. J. (2003). *Developmental Plasticity and Evolution*.
- Wiechmann, A. F., & Smith, A. R. (2001). Melatonin receptor RNA is expressed in photoreceptors and displays a diurnal rhythm in *Xenopus* retina. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 91(1–2), 104–111. doi: 10.1016/s0169-328x(01)00134-6
- Wies Mancini, V. S. B., Pasquini, J. M., Correale, J. D., & Pasquini, L. A. (2019). Microglial modulation through colony-stimulating factor-1 receptor inhibition attenuates demyelination. *Glia*, 67(2), 291–308. doi: 10.1002/glia.23540
- Wiesel, T. N. (1982). Postnatal development of the visual cortex and the influence of environment. *Nature*, 299(5884), 583–591. doi: 10.1038/299583a0
- Worthman, C. M., & Kuzara, J. (2005). Life history and the early origins of health differentials. *American Journal of Human Biology*, 17(1), 95–112. doi: 10.1002/ajhb.20096
- Wu, C., & Hunter, D. G. (2006). Amblyopia: diagnostic and therapeutic options. *American Journal of Ophthalmology*, 141(1), 175–184. doi: 10.1016/j.ajo.2005.07.060
- Wu, Q., & Zhang, Y. (2023). Neural Circuit Mechanisms Involved in Animals' Detection of and Response to Visual Threats. *Neuroscience Bulletin*, 39(6), 994–1008. doi: 10.1007/s12264-023-01021-0
- Yang, X., Liu, Q., Zhong, J., Song, R., Zhang, L., & Wang, L. (2020). A simple threat-detection strategy in mice. *BMC Biology*, 18(1), 93. doi: 10.1186/s12915-020-00825-0
- Yao, A., Nishitani, S., Yamada, Y., Oshima, H., Sugihara, Y., Makita, K., Takiguchi, S., Kawata, N. Y. S., Fujisawa, T. X., Okazawa, H., Inatani, M., & Tomoda, A. (2024). Subclinical structural atypicality of retinal thickness and its association with gray matter volume in the visual cortex of maltreated children. *Scientific Reports*, 14(1), 11465. doi: 10.1038/s41598-024-62392-6
- Yilmaz, M., & Meister, M. (2013). Rapid Innate Defensive Responses of Mice to Looming Visual Stimuli. *Current Biology*, 23(20), 2011–2015. doi: 10.1016/j.cub.2013.08.015
- Yusifov, E. Y., Kerimova, A. A., Atalay, M., & Kerimov, T. M. (2000). Light exposure induces antioxidant enzyme activities in eye tissues of frogs. *Pathophysiology*, 7(3), 203–207. doi: 10.1016/S0928-4680(00)00051-1
- Zarkovic, N. (2003). 4-Hydroxynonenal as a bioactive marker of pathophysiological processes. *Molecular Aspects of Medicine*, 24(4–5), 281–291. doi: 10.1016/S0098-2997(03)00023-2
- Zheng, D. D., Swenor, B. K., Christ, S. L., West, S. K., Lam, B. L., & Lee, D. J. (2018). Longitudinal Associations Between Visual Impairment and Cognitive Functioning. *JAMA Ophthalmology*, 136(9), 989. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2018.2493

