



**DAÑO RETINIANO INDUCIDO POR DIODOS EMISORES DE LUCES COMERCIALES (LED)**

# DAÑO RETINIANO INDUCIDO POR DIODOS EMISORES DE LUZ COMERCIALES (LED)

## RESUMEN

Los espectros de los "LED blancos" se caracterizan por una emisión intensa en la región azul de lo visible espectro, ausente en espectros de luz diurna. Este componente azul y la alta intensidad de emisión son los Principales fuentes de preocupación sobre los riesgos para la salud de los LED con respecto a su toxicidad para los ojos y la retina. El objetivo de nuestro estudio fue dilucidar el papel de la luz azul de los LED en el daño retiniano.

Se utilizaron LED blancos disponibles comercialmente y cuatro LED azules diferentes (507, 473, 467 y 449 nm) para experimentos de exposición en ratas Wistar. Tinción inmunohistoquímica, microscopía electrónica de transmisión, y Western blot se usaron para examinar las retinas. Evaluamos el daño celular de la retina inducido por LED mediante estudiando el estrés oxidativo, las vías de respuesta al estrés y la identificación de las vías de muerte celular. LED La luz causó un estado de sufrimiento de la retina con daño oxidativo y lesión retiniana. Observamos una pérdida de fotorreceptores y la activación de la apoptosis, necroptosis y necrosis independientes de caspasa. UN

Se observó dependencia de la longitud de onda de los efectos. La fototoxicidad de los LED en la retina se caracteriza por un fuerte daño de los fotorreceptores y por la inducción de necrosis.

## INTRODUCCIÓN

Las degeneraciones de la retina, genéticas o no, implican la muerte de fotorreceptores Factores ambientales como fumar, obesidad y la hipertensión es importante en la progresión de las diferentes retinopatías [1]. Además, la exposición a intensa natural o La luz artificial puede ser perjudicial para los tejidos oculares al causar daños fotoquímicos. Se han realizado muchos estudios para evaluar el efecto de la luz sobre la evolución de la retinopatía preexistente [2]. Durante los últimos años, este interés se ha concentrado en la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), una patología líder de los ancianos en los países occidentales [3]. Después de muchos estudios contradictorios, se concluyó que la luz es un factor de riesgo en las primeras etapas de la AMD, aunque no se reconoce como un factor agravante para la patología [4–6]. Los daños retinianos inducidos por la luz dependen de la intensidad de la radiación, la longitud de onda de la radiación y el tiempo de exposición [7,8]. Las lesiones retinianas inducidas por la luz se caracterizan por una degeneración de los segmentos externos de fotorreceptores que conducen a su muerte por apoptosis [9,10]. Recientemente, el uso de nuevas tecnologías en la iluminación doméstica indujo una renovación del interés sobre los efectos de la luz en la retina. Entre estos nuevos dispositivos, los diodos emisores de luz (LED) están en el centro de este interés. Desde un punto de vista técnico, los LED tienen muchas ventajas como bajo consumo de energía, alta mecánica fuerza y, especialmente, larga vida. Una de las principales preocupaciones con El uso de esta tecnología es el espectro de emisión de los LED. El espectro de LED se caracteriza por un componente de luz azul intenso ausente en los espectros de luz del día [11]. En los últimos años, gubernamental agencias como la ANSES (Agencia Francesa de Alimentación, Medio Ambiente y Salud y Seguridad Ocupacional) en 2010 enfatizaron la

necesidad de Amplios estudios experimentales sobre la fototoxicidad de los LED para confirmar o refutar los temores planteados por investigadores, oftalmólogos, y físicos sobre el uso intensivo de estos dispositivos. Realmente, Los LED más utilizados presentan un alto nivel de luminancia y generar una incomodidad visual relacionada con el carácter "puntual" de las superficies emisoras. Además, el desequilibrio espectral de los LED blancos disponible en el mercado, debido a la producción de luz blanca por el El procesamiento de una radiación de alta frecuencia y la reemisión en una longitud de onda complementaria, expone el ojo a radiaciones residuales de onda corta, las más peligrosas para la retina. Este problema podría incrementarse mediante una reducción de la contracción pupilar, timulada a alrededor de 480 nm, una región de baja emisión en el espectro de algunos LED, lo que resulta en un aumento de la exposición a la luz de la retina. En este estudio, investigamos, en ratas, el mecanismo molecular de la degeneración retiniana mediante el uso de cinco LED diferentes: LED blancos, LED verdes (507 nm) y tres LED azules (449, 467, 473 nm) para evaluar el papel del azul radiación en daño celular y la progresión de las lesiones retinianas.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales**

Se compraron ratas Wistar macho de seis semanas de edad en los laboratorios Janvier y se mantuvo 1 semana para la adaptación en nuestras instalaciones de animales en un ciclo de luz de 12 h. Todos los procedimientos cumplieron con el uso de animales y Comité de atención de la Escuela Nacional de Veterinaria de Alfort.

Fuente de luz Utilizamos dos tipos de dispositivos de iluminación contruidos y caracterizados por la División de Iluminación y Electromagnetismo del Centro Científico y Técnico para la onstrucción (CSTB, Saint Martin d'Herès, Francia): el primero contiene solo LED blancos (Xanlite XXX Evolution 5 W ) El segundo dispositivo tiene cuatro tipos de LED con diferentes longitudes de onda en la región azul del espectro: LED verdes (507 nm) y tres LED azules (449, 467, 473 nm) (Tabla 1). Ambos dispositivos poseen un difusor que mejora la uniformidad direccional de la radiación. El CSTB estableció y probó las distribuciones espectrales e intensidades de las fuentes de luz. Los espectros de emisión de los diferentes dispositivos se muestran en la Fig. Suplementaria 1. La construcción del dispositivo azul se ve en la Fig. Suplementaria 2. La dosis de exposición se calculó utilizando un software dedicado desarrollado por el CSTB para estos conjuntos de experimentos. Los cálculos se basaron en mediciones espectrofotométricas in situ y en un modelo de visión y comportamiento de ratas Wistar. Para cada tipo de fuente, se midió la irradiancia espectral y la uniformidad utilizando un espectrofotómetro de fibra óptica con un cabezal difusor (Ocean Optics-R2000b). En el dispositivo de iluminación, solo el techo de la jaula emitía luz. Por lo tanto, en un instante dado, la dosis retiniana de una rata que se movía libremente dependía de la postura de su cabeza. Para la dosis general se estimó que, en promedio, una rata mantiene su cabeza alineada con su cuerpo.

Siguiendo los argumentos dados en el artículo de revisión [12], el ojo de una la rata fue modelada como un hemisferio. Todo el formalismo utilizado se describe en la información complementaria 1. Exposición a la luz Las ratas Wistar se mantuvieron en jaulas transparentes colocadas debajo de las fuentes de luz suspendidas 25 cm por encima de la parte superior de las jaulas. Las ratas fueron expuestos a una luz constante durante 6, 12,

18, 24, 48 y 72 h, sin haber sido previamente adaptado a la oscuridad. Después de la iluminación, las ratas fueron sacrificados con pentobarbital sódico (Ceva, La Ballastiere, Francia) a dosis letales por inyección intraperitoneal. Sus ojos eran Inmediatamente enucleado y recién congelado en compuesto de temperatura de corte óptico (compuesto Tissue Tek Sakura) usando líquido nitrógeno y almacenado a 80 1C hasta el corte. Las criosecciones de 10 mm se prepararon utilizando un criostato (Leica CM 3050S) y almacenado a 20 1C hasta el análisis inmunohistoquímico. Alternativamente, para experimentos bioquímicos, se diseccionó neuroretina y congelado inmediatamente a 20 1C.

### **Examen de fondo dilatado**

Después de la exposición, las ratas fueron examinadas por el Dr. S. Chahory (veterinario oftalmológico) utilizando una lente 28D (Heine Optotechnik Herrsching, Alemania).

Inyección intravítrea de yoduro de propidio (PI) Después de la exposición a la luz, las ratas se anestesiaron mediante una inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico a 25 mg / kg. Un local la anestesia se realizó por instilación de tetracaína al 1% (Faure, Novartis Pharma). La inyección intravítrea de propidio. se llevó yoduro (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia)

bajo un microscopio quirúrgico usando una aguja de 30 G montada en una jeringa de insulina (BD Micro-Fine, Becton Dickinson S.A., Le Pont de Claix, Francia). Se inyectó yoduro de propidio a una concentración. de 1 µg por ojo en un volumen de 10 µl de solución salina equilibrada (BSS, Bausch y Lomb). Las ratas se sacrificaron usando pentobarbital de sodio (Ceva, La Ballastiere, Francia) a dosis letales por inyección intraperitoneal. Sus ojos fueron inmediatamente enucleados después matar y fijar en paraformaldehído al 4% durante 2 ha temperatura ambiente, lavar varias veces con PBS y luego incrustar en compuesto de corte óptico para la preparación de criosecciones.

### **Extracción de proteínas de retinas expuestas a la luz.**

Después de descongelar, las retinas se homogeneizaron en un 20% de peso. volumen de reactivo de extracción M-PER (Thermo Scientific, Illkirch, Francia), utilizando un homogeneizador de motor de mortero de pellet (Kontes) en una cama de hielo El homogenado se incubó luego en hielo durante 15 minutos y centrifugado (15,000 g, 4 1C) durante 15 min. Sobrenadante fue recuperado para el análisis de transferencia Western.

### **Western blot**

Después de la extracción de proteínas retinianas, se midió su cantidad con el kit de análisis de proteínas del ácido bicinconínico (BCA) (Thermo Scientific, Illkirch, Francia), según las instrucciones del fabricante. Bovino la albúmina sérica (BSA) se usó como estándar. Tampón de muestra Laemmli fue agregado para el análisis de Western blot. Las proteínas extraídas se separaron en una SDS-PAGE al 12%, inmovilizadas en membrana de nitrocelulosa. (Protan, Whatman, GE Healthcare, Versalles, Francia), y se secó con anticuerpo primario específico a dilución 1/1000: anti-PKC zeta (Santa Cruz sc-216, Clinisciences, Nanterre, Francia), anti-phospho-PKC zeta (Santa Cruz sc-12894R, Clinisciences, Nanterre, Francia), anti-actina (Santa Cruz sc-1616, Clinisciences, Nanterre, Francia), anti-LEI / L-DNasa II (producido en nuestro laboratorio) [13]. Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Vector, Eurobio, Les Ulis, Francia) se utilizaron en una

dilución 1/5000. Finalmente, el sustrato Luminata Forte Western HRP (Millipore, Merck Chimie, Fontenay sous Bois, Francia) se utilizó para revelar la señal.

### **Inmunotransferencia de poli-ADP-ribosa polimerasa (PARP-1)**

Después de enuclear los ojos, se extrajo la retina, se lavó en PBS y homogeneizado en tampón de muestra Laemmli usando un gránulo motor de mortero (Kontes). Las proteínas se midieron como antes y 40 µg.

de proteína se cargó en la parte superior de una SDS-PAGE al 10% y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa ECL de alto límite (Protan, Whatman, GE Asistencia sanitaria, Versailles, Francia). PARP-1 fue desarrollado utilizando el anticuerpo monoclonal C-2-10 (Biovision, Milpitas, EE. UU.) diluido en PBS Tween 0.1% a dilución 1/500. Desarrollo de las bandas etiquetadas.

se realizó mediante el uso de un anticuerpo secundario conjugado con HRP y el Luminata Forte Western HRP sustrato (Millipore, Eurobio, Les Ulis, Francia).

### **Inmunohistoquímica**

Las criosecciones de los ojos se lavaron dos veces con PBS que contenía Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>, fijados en paraformaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente.

temperatura (todos los pasos se realizaron a temperatura ambiente) y luego se lavó dos veces con PBS. La permeabilización se realizó con 0.3% Triton X-100 por 20 min. Luego, las criosecciones fueron lavadas dos veces con PBS, y los sitios de unión a proteínas inespecíficos fueron bloqueados por 1 h de incubación en un tampón de bloqueo que contiene 1% de leche descremada en PBS. Las muestras fueron incubadas con anticuerpos primarios específicos.

en 0.1% de leche descremada en PBS diluido a 1/100 por 1 h. Unas listas completas de los anticuerpos utilizados se muestran en la Tabla 2. Esto fue seguido por dos lavas con PBS e incubación durante 1 h con una dilución 1/500 de anticuerpos secundarios específicos (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, Francia). Las muestras se lavaron dos veces con PBS, se incubaron durante 5 min con 4,6-diaminidino-2-fenil indolecloruro (DAPI 1/5000) (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia), y luego se lavó de nuevo tres veces con PBS. Finalmente, las criosecciones se cubrieron con Fluoromount (Sigma, Saint-Quentin Fallavier, Francia). La inmunoreactividad se visualizó usando microscopía de fluorescencia con un Microscopio Olympus BX51 (Olympus Francia, Rungis, Francia) o un

### **Microscopio confocal Zeiss LSM 710.**

Terminal transferase dUTP nick end etiquetado (TUNEL) Las criosecciones se secaron al aire y se fijaron en paraformaldehído al 4%. 15 min a temperatura ambiente y se lavó dos veces con PBS. Después permeabilización con 0,3% de Triton X-100 en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente temperatura y un lavado adicional de PBS, el ensayo TUNEL fue realizado utilizando dos protocolos diferentes. Para el protocolo clásico, Las criosecciones se incubaron con la mezcla de reacción TUNEL (Roche Molecular Biochemical's, Meylan, Francia) según el Instrucciones del fabricante. Para el segundo protocolo, las secciones fueron previamente incubados durante 30 minutos con alcalinos intestinal fosfatasa 6.66 U / sección (Invitrogen, Life Technologies, Saint Aubin, Francia) en

37 1C. En ambos casos, los tejidos se enjuagaron tres veces después de la reacción TUNEL con PBS e incubado con DAPI 1 / 5000. Finalmente, después de tres lavados con PBS, las criosecciones se cubrieron con fluoromount (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, Francia). La inmunoreactividad se visualizó usando una Olympus BX51 microscopio de fluorescencia (Olympus Francia, Rungis, Francia) o un Zeiss Microscopio confocal LSM 710.

### **Análisis de microscopía electrónica de transmisión (TEM)**

TEM se realizó en retinas no expuestas y en retinas expuesto 18 h a los LED blancos. Después de la enucleación, los ojos estaban fijado en tampón de cacodilato de glutaraldehído al 4% (0,1 M, pH 7,4) durante 5 h.

Las muestras se fijaron adicionalmente en tetróxido de osmio al 1% en tampón de cacodilato (0.2 M, pH 7.4) y deshidratado progresivamente en solución graduada de etanol (50, 70, 95 y 100%) y luego en óxido de propileno. Cada área de interés se separó en cuatro muestras, incluidas en resina epoxi, y orientadas. Secciones Semithin (500 nm) se obtuvieron con un ultramicrotomo (LEICA Ultracut UCT, Austria) y teñido con azul de toluidina. Secciones ultrafinas (60 nm) se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y analizado con un microscopio electrónico de transmisión (Philips CM10, Países Bajos) con una cámara GATAN ES100W (EE. UU.).

### **Resultados**

El examen del fondo dilatado (DFE) no mostró blanqueamiento de la retina DFE es un rocedimiento de diagnóstico utilizado para evaluar el ocular interno.

salud. Hasta hoy, las regulaciones de toxicidad a la luz en la retina tienen ELV establecido (valores límite de exposición) [14]. Estos ELV se basan en un estudio de examen de fondo de ojo después de una sola exposición a la luz para 8 h. Establecen que la luz es tóxica para los ojos cuando hay un

blanqueamiento de la retina. En nuestro estudio, el DFE se realizó justo después exposición por un oftalmólogo veterinario y dos asistentes. No se detectó blanqueamiento de la retina en ratas expuestas durante 12 h a 3 días con los diferentes tipos de LED utilizados en este estudio. Sin embargo, una quemosis importante, que indica un edema de los tejidos oculares, estuvo presente en casi todos los animales durante las primeras 24 h de exposición (Fig. suplementaria 3), desapareciendo posteriormente.

### **Daños y signos de estrés oxidativo inducido por LED**

Para explorar las lesiones fotoquímicas en la retina, estudiamos signos de inflamación que pueden estar asociados con quemosis y edema inducido por la exposición del LED blanco. Secciones semitinas de retina mostraron un edema interfotorreceptor importante (figura complementaria 4). Tinción inmunohistoquímica (IHC) de CD11b (integrina  $\alpha$ M) y Adaptador de unión a calcio ionizado molécula 1 (Iba 1) en retina expuesta durante 1 y 2 días mostró una activación de microglia y macrófagos infiltración en la retina que revela inflamación retiniana (Fig. 1).

Los signos de estrés oxidativo en el ADN / ARN fueron investigados por Tinción con 8-hidroxi-guanosina (HGN) (Fig. 2 y suplementaria Fig. 5). La oxidación de proteínas se evaluó

mediante nitrotirosina (N-Tyr) tinción (Fig. 2, N-Tyr y la Fig. 5 suplementaria). El LED expuesto

las ratas presentaron un aumento de la inmunotinción de HGN principalmente en la capa nuclear interna (INL) y en la capa de células ganglionares de la retina expuesto durante 18 h (125 J / cm<sup>2</sup>), aunque un leve aumento en él. También se observó el etiquetado de la capa nuclear externa (ONL). Para el mismo tiempo de exposición, la inmunotinción de N-Tyr fue mayor en todas las capas de retina en comparación con ratas mantenidas en luz de ciclo normal (NE) (Fig. 2 y Fig. Complementaria 5). Sin embargo, encontramos un sorprendente aumento del etiquetado en segmentos exteriores de fotorreceptores (POS) y en fotorreceptores segmentos internos (PIS). Además, un examen más detallado de la ONL mostró un etiquetado radial que se prolongó en algunos casos a la capa plexiforme interna (IPL) y la nuclear interna capa (INL), lo que sugiere un etiquetado (parcial y no exclusivo) de la Células de Müller. Estos resultados revelaron que la luz emitida por los LED disponibles en el mercado indujo daños oxidativos en toda retina, a los niveles de ADN y proteínas. Este daño desencadenó respuestas de estrés clásicas al aumentar la expresión de p62 (también llamado secuestrosoma) en todas las capas nucleares de la retina (Fig. 2, p62). Como era de esperar, también se observó una reacción de estrés en la célula de Müller nivel caracterizado por un aumento del filamento intermedio glial proteína ácida fibrilar (GFAP) (Fig. 2). Curiosamente, esta respuesta de las células de Müller llegaron bastante temprano, ya que lo vimos después de 12 h de exposición (Figura 5 suplementaria, dosis: 81 J / cm<sup>2</sup>) GFAP, un marcador de la activación de las células de Müller [15] se restringió, en la retina normal, a la base de las células de Müller. Después de 12 h de exposición al LED blanco, aumentó. Se detectó inmunotinción de GFAP en la membrana limitante interna. A las 18 h (125 J / cm<sup>2</sup>), algunos procesos de células de Müller extendidos desde la capa plexiforme externa (OPL) hasta la capa de células ganglionares (GCL). El aumento de la tinción GFAP fue prominente en toda la retina después de 24 h (151 J / cm<sup>2</sup>) de exposición a los LED blancos. Estos resultados sugirieron una gliosis reactiva que abarca toda la retina después de la célula de Müller. activación.

### **Degeneración retiniana inducida por LED**

Para investigar si la luz LED indujo la muerte celular de la retina, la tinción DAPI se utilizó para revelar cambios morfológicos en el núcleo de células de retina expuestas a LED en comparación con no expuestas retina (Figura complementaria 6). Observamos desorganización y un espesor reducido de la ONL. La disminución en el grosor de ONL fue dependiente del tiempo de exposición y fue máximo a los 3 días (453 J / cm<sup>2</sup>) Tenga en cuenta que GNL e INL parecían conservados.

### **Muerte celular retiniana inducida por LED**

La disminución en el grosor de ONL indicó degeneración retiniana y sugirió la presencia de desaparición celular. Para investigar esto emitir un ensayo TUNEL se utilizó. Como se ve en la Fig. 3A, muchos apoptóticos Se detectaron células después de 18 h de exposición a LED blancos, pero células apoptóticas también se detectaron a partir de entonces (suplementario Fig. 7), con un máximo a las 48 h de exposición (303 J / cm<sup>2</sup>) Estudiar las implicaciones de la apoptosis clásica en la célula fotorreceptora. muerte, investigamos la activación de caspasa 3. Para hacer esto utilizamos un anticuerpo dirigido contra la caspasa 3 activada (Fig. 3A). Contrariamente a lo que se esperaba, no observamos un aumento

masivo en la actividad inmunotinción de caspasa 3, lo que sugiere que esta vía apoptótica no estuvo involucrado en la muerte celular. Este resultado llevó nuestra atención a la activación de vías independientes de caspasa. Investigamos primero la activación del factor inductor de apoptosis (AIF) (Fig. 3A). Esta vía se activa mediante la liberación de AIF desde las mitocondrias al núcleo, donde desencadena la condensación de cromatina [16]. El análisis de inmunohistoquímica de las retinas expuestas a LED mostró un aumento de la tinción de AIF en ONL y también en INL (Fig. 3A y Fig. suplementaria 8). Sin embargo, aunque las capas nucleares de la retina estaban más manchadas que el control, no estaba claro, debido a la pequeña cantidad de citoplasma en fotorreceptores, si la tinción fue realmente nuclear. Para resolver este punto, contrarrestamos nuestras diapositivas con un

anticuerpo contra lamina B, una proteína de la envoltura nuclear, y nosotros analizó la sección por microscopía confocal. Como se ve en la Fig. 3B, panel superior, en retinas expuestas a la luz AIF se encuentra dentro de los núcleos donde forma pequeños agregados, lo que sugiere la activación de esta ruta.

Anteriormente hemos demostrado que en la degeneración retiniana inducida por la luz (LIRD) con bombillas fluorescentes blancas, las caspasas no eran activado [17]. En cambio, una vía de muerte celular independiente de caspasa, el LEI / L-DNasa II, estuvo involucrado en la degeneración de fotorreceptores [18] La activación de esta vía implica escisión, por específico proteasas, del inhibidor citoplasmático de elastasa de leucocitos (LEI), y su transformación en L-DNasa II, una proteína nuclear [19]. La translocación nuclear de esta molécula se investigó como se ve en Fig. 3A (y complementaria Fig. 8). Lo mismo que para AIF, el se aumentó la tinción de las capas nucleares de la retina, pero la translocación nuclear no estaba clara. En cuanto a AIF, examinamos las secciones después de la tinción con lamina B. Aquí de nuevo (Fig. 3B, panel inferior) después de la exposición del LED blanco, la L-DNasa II fue nuclearizada, pero fue mantenido en la periferia de la cromatina condensada del fotorreceptor. El alto número de células marcadas por el ensayo TUNEL y la leve activación de efectores dependientes de caspasa e independientes de caspasa de la muerte celular nos llevó a investigar otro mecanismo que podría ser involucrado en la desaparición de fotorreceptores, particularmente aquellas formas de células

muerte que podría dar etiquetado TUNEL-positivo. Analizamos entonces la activación de necrosis programada. Esta forma de muerte celular es promovido y controlado por RIP quinasas (proteína que interactúa con el receptor), una familia de proteínas que se ha demostrado que controla y para promover la necrosis [20]. Mostramos que RIP 1 y RIP 3 eran aumentado en condiciones de exposición continua a la luz (Fig. 3A), sugiriendo una activación de necrosis. Para verificar esto analizamos el patrón de degradación de la poli-ADP-ribosa polimerasa 1 (Fig. 3C). Durante la apoptosis, la escisión de PARP-1 por las caspasas 3 y 7 produjo dos fragmentos de 89 y 24 kDa [21]. Durante la necrosis, sin embargo, un fragmento de 62 kDa se produce [22, 23]. Un fragmento de 44 kDa tiene también se ha descrito como el producto de la escisión de PARP-1 por calpaína o catepsina D [24]. En nuestros experimentos, después de la exposición a LED blancos (18 h, 125 J / cm<sup>2</sup>), se vio claramente el fragmento de 62 kDa, así como el fragmento de 44 kDa. Por otra parte, un claro aumento de la PARP-1 Se observó expresión en retinas expuestas a la luz. Esto fue concomitante con un aumento de auto-ADP ribosilado PARP-1 (Fig. 3C, 250 kDa banda). Tomados en conjunto, estos datos estaban de acuerdo con la activación de necrosis Para documentar aún más la activación de la necrosis, se realizaron estudios de



microscopía electrónica de histología y transmisión (TEM) realizado para validar estos hallazgos y explorar la morfología anormalidades de los fotorreceptores. El examen histológico de secciones retinianas de semitina mostró que la retina expuesta a LED blancos para 18 h ( $125 \text{ J / cm}^2$ ) desarrollaron espacios intersticiales prominentes entre núcleos fotorreceptores y a través de la ONL (Figura 4 complementaria). TEM mostró una alteración diferente de los fotorreceptores según el área explorada (Fig. 4). En el nivel POS (segmento exterior del fotorreceptor) Se observó una desorganización completa de la estructura ordenada después Exposición LED. A nivel del núcleo se registraron varias alteraciones. Se incrementó la dilatación del espacio interfotorreceptor (blanco punta de flecha), núcleos condensados típicos, que recuerdan a los núcleos apoptóticos fueron vistos (flecha negra), así como núcleos dilatados que recuerdan necróticas celdas (flechas blancas). También se Encontraron alteraciones en el PIS (segmentos internos del fotorreceptor): edema del PIS, alteración de las mitocondrias (punta de flecha) y edema del retículo endoplásmico (flecha).

Estas son características típicas de las células necróticas.

### **Implicación de la radiación azul en daños inducidos por LED**

Como se ve en la figura complementaria 1, panel superior, los LED blancos utilizados para los experimentos descritos tienen una emisión importante en la región azul del espectro. Para evaluar el efecto de esta luz azul llevamos a cabo un nuevo conjunto de experimentos donde las ratas eran

expuesto a LED azules. Se utilizaron cuatro LED disponibles comercialmente:

el LED azul y el LED azul-verde de Nichia Corporation (que llamaremos en adelante Nichia azul y Nichia azul-verde, respectivamente), y el LED azul y el LED azul real de Cree Industries (llamado en adelante Cree blue y Cree royal blue). Los cuatro LED fueron montado en grupos de cuatro en el dispositivo descrito en Complementario Fig. 2, diseñada y construida para los experimentos previstos. Para los LED azules, casi los mismos parámetros que para los LED blancos fueron evaluado, sin embargo, las lesiones encontradas fueron más importantes para que Limitamos la exposición a 24 h. La figura 5 muestra resultados representativos.

e inducción de estrés oxidativo obtenida después de 18 h de exposición a la diferentes LEDs. El aumento del etiquetado de HGN fue comparable al uno obtenido después de la exposición al LED blanco, aunque la dosis de La exposición fue bastante diferente. Sin embargo, los LED azules reales de Cree parecían para aumentar este marcador de estrés oxidativo, principalmente en el INL.

En cuanto a N-Tyr, solo los LED Cree azul real produjeron lo mismo grado de modificación de las proteínas a nivel RIS y ROS a medida que LEDs blancos. Como la inmunofluorescencia no es un ensayo cuantitativo, investigó la diferencia en los niveles de N-Tyr por Western blot (Fig. 5B).

Como se ve en la Fig. 5, los diodos azules (pero no Nichia azul-verde) aumentaron La oxidación nítrica de las tirosinas. El azul real Cree presentó el Mayor cantidad de proteínas nitrosiladas. Sobre el estrés respuesta, como con el LED blanco, también encontramos un aumento de p62. En

para comparar los diferentes diodos entre ellos evaluamos p62 por Western blot después de 18 h de exposición (Fig. 6A). Vimos un global aumento de p62 pero, como se puede ver en la Fig. 6A, la tasa de escisión de p62 se incrementa en Cree LED (CRB y CB). Este escote es pensado para interrumpir los procesos de protección de la autofagia y la activación de NFkB [25] Investigamos entonces la activación de ambos NFkB y PKC zeta (Fig. 6B y C, y complementaria Fig. 9). PKC zeta es una corriente arriba activadora de NFkB que ya hemos visto activado en LIRD [59]. La activación de PKC zeta, como se materializa por su fosforilada La forma, parecía activada en todos los LED azul-verde de Nichia. Esto es también el caso de phospho-NFkB, lo que sugiere que el estrés inducido por los LED azules puros eran diferentes del estrés inducido por un casi dispositivo verde Es interesante notar que el patrón PKC zeta era completamente diferente cuando las ratas fueron expuestas a Nichia azul-verde radiación. Esta fue la única situación en la que una escisión del Se observó enzima (Fig. 6B). Tomados en conjunto, estos resultados indican que la luz rica en azul indujo un estrés celular más profundo, que afecta principalmente a los fotorreceptores. Este estrés celular indujo una respuesta celular proporcional.

Luego investigamos la toxicidad de los LED azules al examinar muerte celular, como antes. El etiquetado de TUNEL indica la presencia de fotorreceptores moribundos en todas las situaciones (Fig. 7). Curiosamente, cuando buscamos la activación de caspasa 3, el etiquetado de caspasa 3 cortado fue solo se encuentra en INL después de la exposición al LED azul. Esto era diferente de

LED blanco, donde no se encontró la activación de la caspasa 3 (Fig. 3). Además, fue sorprendente ver una activación tan importante de caspasa 3 sin una sola célula TUNEL-positiva en la capa INL. Siguiendo el mismo esquema que para los LED blancos, evaluamos Vías independientes de caspasa. Esto se hizo después de 18 h de LED exposición. Los resultados se ven en la Fig. 8. AIF parecía activarse solo en Nichia LED azul-verde, como lo indica la presencia de AIF truncado

(Fig. 8A, panel superior, punta de flecha). La L-DNasa II también se activa (Fig. 8A, panel central) pero de una manera diferente, como se ve en la figura 8A. Panel inferior muestra la cuantificación de la relación L-DNasa II / LEI. L-DNasa II es activado en LED ricos en azul (CRB, CB y NB), y esta activación es Lo más importante en Cree azul real LED.

Para evaluar la presencia de necrosis, estudiamos RIP 1 y RIP 3 después de 18 h de exposición a los LED. RIP 1 se escindió al usar Dispositivos Cree, que indican la presencia de necrosis, mientras que RIP 3 fue claramente escindido cuando las ratas fueron expuestas a la luz azul-verde de Nichia. Como este fragmento generalmente es producido por la caspasa 8 buscamos la activación de esta enzima. El panel inferior de la Fig. 8B muestra un experimento representativo de este estudio en el que la banda superior representa la procaspasa 8, mientras que la banda inferior (punta de flecha)

representa la caspasa activa 8. Tomados en conjunto, estos resultados indican La activación por la luz azul de las vías independientes de caspasa, pero principalmente la activación de la necrosis.

La activación de esta forma de muerte celular es rara en la luz inducida degeneración retiniana; así, tratamos de demostrar que la necrosis era realmente que tiene lugar en las retinas de ratas expuestas. Para hacer esto usamos la propiedad del yoduro de propidio (PI) para etiquetar los núcleos de una célula que tiene Perdió la integridad de su membrana.

Para etiquetar fotorreceptores nosotros inyectado intravítreamente una solución de PI después de la exposición al LED, algunos minutos antes del sacrificio Los ojos fueron enucleados e inmediatamente

fija, montada, crioccionada y observada con fluorescencia microscopio sin ningún otro tipo de tratamiento o tinción. Fig. 8C muestra un resultado representativo de estos experimentos. Retinas expuestas muestra un número muy alto de células marcadas situadas en la parte interna de

la ONL. La combinación de esta técnica con una tinción TUNEL (Fig. 8C panel inferior) muestra claramente la presencia de TUNEL-positivo, Células PI negativas. Estas fueron células apoptóticas y células PI-positivas que eran células necróticas, fueran o no TUNEL positivas. Estos datos confirmaron la degeneración inducida por la luz LED encendida la retina, lo que indica una pérdida estructural de fotorreceptores y la activación de dos vías de muerte celular: apoptosis y necrosis.

El análisis de Western blot de retinas blancas expuestas a LED (18 h, 125 J / cm<sup>2</sup> ) muestra patrones de los marcadores moleculares estudiados anteriormente correspondiente a Nichia azul-verde y Nichia azul LED, lo que indica que estas formas de desaparición celular también son activadas por el blanco LED (Fig. 8D)

## **Discusión**

En este artículo analizamos los efectos del llamado "blanco LED "y LED enriquecidos en azul en la retina. Mostramos un daño importante de la capa de fotorreceptores después de 18 h de exposición.

Más importante aún, el análisis, a nivel molecular, de la Los efectores de la muerte celular muestran una activación de la muerte celular necrótica, Un evento raro en este tipo de degeneración.

La regulación actual [26] establece que la luz es tóxica para los ojos. cuando hay un blanqueamiento de la retina como se ve por fundoscopia. En nuestro análisis macroscópico los ojos de las ratas expuestas a la luz LED no muestran blanqueamiento, pero una quemosis importante. Esto indica un edema de los tejidos oculares, un signo de irritación ocular, probablemente debido a la exudación de capilares anormalmente permeables y una vasodilatación conjuntival. Es sorprendente e inesperado que el ojo expuesto al LED sufre de un

edema importante sin daño detectable a la retina por el fondo examen. Esto también sugiere que probablemente hay invisibles Lesiones fotoquímicas. En realidad, nuestro estudio muestra la presencia de Daño oxidativo importante, que involucra proteínas y ácidos nucleicos, como así como una cantidad importante de muerte celular. En 2001, el estudio Dawson mostró que los LED azules (460 nm) y el láser de argón (458 nm) conducen a mismas lesiones retinianas con irradiancia corneal de 10 J / cm<sup>2</sup> [27]. Estas Los resultados fueron confirmados por el equipo de Ueda que mostró daños en la retina en la mácula con LED azules (465 nm) [28]. En todos los casos el usado los dispositivos fueron casi experimentales, mientras que en el presente estudio utiliza fuentes disponibles comercialmente. Además, los flujos de irradiancia fueron aproximadamente 1/20 de los utilizados en los experimentos de Dawson (nuestros LED inducen una irradiancia corneal de aproximadamente 0.0026 W / cm<sup>2</sup> ) Recientemente, un estudio de Mukai et al. mostró

que las retinas de los monos expuestos a la luz LED durante 8 h presentar vacuolas intracelulares en los segmentos externos de fotorreceptores, una característica también vista en nuestro estudio. Este estudio también muestra que estas lesiones estructurales se acompañan de alteraciones funcionales reveladas por un estudio ERG que muestra una disminución de la respuesta de bastones y conos [29], pero los mecanismos de la toxicidad no fueron analizados.

En este estudio analizamos los mecanismos moleculares de la retina. dañan. Utilizamos el modelo habitual de ratas albinas. Aunque la pertinencia de este modelo y la traducción de los resultados a los seres humanos son temas de discusión, es útil tener una idea del tipo de lesiones encontradas con estos nuevos dispositivos en comparación con otros ya investigados en nuestro laboratorio [17,18]. La fototoxicidad depende principalmente de la intensidad de la radiación, su tiempo de exposición y su espectro, como lo demostró el equipo de Knels que usó dos tipos de LED (411 nm azul y 470 nm verde) en una línea de células retinianas R28 [30]. Este estudio in vitro reveló la activación de El sistema antioxidante que implica glutatión en las células iluminadas independientemente de la exposición, el espectro y la potencia de los LED. En nuestro modelo también encontramos signos de estrés oxidativo, como lo revela el aumento del etiquetado en HGN y N-Tyr, lo que refleja la oxidación de ADN / ARN y proteínas, respectivamente. Este estrés oxidativo parece Ser más importante con la luz azul. En nuestras manos el Real Cree Los LED azules produjeron un mayor grado de oxidación de proteínas (como se ve por N-Tyr Western blot) que los otros LED azules, aunque el las dosis de exposición fueron bastante similares (por ejemplo, 42.3 J / cm<sup>2</sup> para Nichia azul y 34.2 para Cree azul real).

El estrés oxidativo induce una respuesta retiniana no revelada por un reacción de las células de Müller a través de la mayor expresión de GFAP, un signo bien conocido de estrés retiniano (Fig. 2 y Fig. complementaria 5). Se cree que el aumento de la expresión de GFAP ayuda a mantener La integridad de la red macrogliar en condiciones de estrés. [31] El estrés que genera esta reacción podría ser el oxidativo. estrés per se, pero también un estrés mecánico generado por el edema intercelular que describimos (Figura complementaria 4). Otra respuesta al estrés se refiere a la proteína p62 (secuestrosoma 1). Este es un andamio multifuncional de unión a ubiquitina proteína implicada en la autofagia y también en el estrés oxidativo [32]. Es se cree que es una proteína de respuesta al estrés proteotóxica [33]. Dieciocho horas de exposición al LED blanco indujeron una inmunotinción nuclear de p62 especialmente en INL pero también en ONL y GCL. Este nuclear la translocación de p62 se describió como una interrupción de la transferencia nuclear-citoplasmática de p62 [34]. Para investigar El papel de la parte azul del espectro de luz en la expresión de p62, Utilizamos análisis de transferencia Western de retina iluminada después de 18 h de exposición LED con LED verde y azul. Observamos un aumento de la forma completa de p62 con LED azules (449, 467 y 473 nm), a diferencia de los LED verdes (507 nm) y la retina no expuesta. Además, observamos la escisión de p62 revelada por dos nuevas bandas con pesos moleculares aparentes de 46 y 37 kDa. Estas Los fragmentos N-terminales de p62 corresponden a la escisión por caspasa 8, que parece ocurrir cuando hay deterioro de la autofagia, un estado que promueve la apoptosis [35] o la muerte celular autofágica [36] Las bandas inmunorreactivas correspondientes a la escindida. los fragmentos son más intensos en las retinas iluminadas con azul LED (449, 467 y 473 nm) con respecto a los LED verdes (507 nm), sugiriendo una alteración más fuerte de la autofagia basal y una más fuerte promoción de la muerte celular. El estrés generado por la exposición al LED induce el estrés

celular. respuestas discutidas anteriormente, concomitantemente con la promoción de la supervivencia señales Entre las posibles respuestas de las células de la retina investigamos el eje PKC zeta-NFκB, porque se demostró que era en gran medida involucrado en otras respuestas al daño retiniano, como en la retinopatía diabética [37] e incluso en el daño leve (resultados no publicados). Siguiendo estrés, PKC zeta activado fosforila IKK (Ikappa quinasa B), que fosforila IκB que conduce a la liberación de NFκB y su nuclear translocación [38]. NFκB promueve la transcripción de antiapoptóticos genes como Bcl-2, IAP y TRAF1 / 2 (factores asociados al receptor de TNF) [39] Dieciocho horas de exposición a LED indujeron una inmunotinción nuclear de fosfo-NFκB en el INL y GCL ausente en la retina no expuesta.

La tinción nuclear parece ser más intensa en INL después del iluminación con LED azules (NB, CRB CB). Este resultado fue confirmado por análisis de transferencia Western usando el mismo anticuerpo que reconoce la forma de serina 311 fosforilada de NFκB, que es un sustrato específico de la ruta PKC zeta [40]. PKC zeta normalmente tiene una respuesta bifásica, que es protectora cuando se activa y promueve la muerte celular cuando se escinde. La escisión de PKC zeta corresponde a una forma activada constitutiva de PKC zeta mediada por la caspasa camino [41,42]. La fosforilación de treonina 410 de PKC zeta corresponde a la enzima activada que a su vez induce una cascada de fosforilación de otras proteínas para transducir señales de estrés. Western blot usando el anticuerpo fosfo-PKC zeta reveló un aumento de la PKC zeta fosforilada (banda de 72 kDa) en la retina expuesta a LED azules (449, 467 y 473 nm) en comparación con la retina no expuesta, sugiriendo la participación de la vía PKC zeta en la respuesta al estrés después de la exposición Para tener en cuenta, la exposición a los LED azul-verde de Nichia produce una reacción diferente con una escisión de la enzima no vista bajo las otras condiciones. Este hecho, junto con la presencia de muchas células TUNEL-positivas, sugiere que las señales protectoras son abrumado, desencadenando la muerte celular

Entre las diferentes formas de muerte celular, la apoptosis es la mejor conocida y ha estado involucrado en gran medida en la degeneración de la retina [9,10]. Aunque nuestro grupo y otros han demostrado la falta de caspasa activación en la degeneración retiniana inducida por la luz [17, 43], la presencia del fragmento PKC zeta sugirió la activación de caspasa. Investigamos este problema mediante el uso de un anticuerpo anti-activo-caspasa 3. Sorprendentemente, no se encontró ninguna etiqueta en el ONL, la capa donde se acumulan las células TUNEL-positivas, pero en el INL, donde no se vio una sola célula TUNEL-positiva en todos los experimentos que hemos realizado, no incluso cuando se usan tiempos de exposición muy largos. Tenemos entonces células que están muriendo, debido a su positividad TUNEL, pero que son activas-caspasa 3 negativas. Este tipo de situación puede ser encontrado en la apoptosis independiente de caspasa, en necroptosis o en necrosis. Para obtener más información sobre este problema, investigamos el estado de PARP-1. PARP-1 es conocido por su papel en la reparación del ADN [44]. Durante la apoptosis, La escisión de PARP-1 por las caspasas 3 y 7 se ha convertido en un sello distintivo útil de este tipo de muerte celular [21]. La escisión de caspasa de PARP-1 genera un fragmento catalítico de 89 y un fragmento de 24 kDa correspondiente al dominio de unión al ADN. Curiosamente, PARP-1 también es escindido durante la necrosis pero en esta situación genera un fragmento de 62 kD [22]. Después de 18 h de exposición a LED blancos, Western blot El análisis mostró diferentes patrones entre expuestos y no expuestos ratas Observamos una banda con muy alto peso molecular (250 kDa) correspondiente al PARP-

1 automodificado. Automodificación de PARP-1 por poli (ADP-ribosa) está involucrado en su interacción con ADN dañado y se cree que regula al alza el complejo NFkB / ADN [45]. La expresión de PARP-1 (113 kDa) también se incrementa. Además, encontramos el fragmento de 62 kDa, lo que sugiere la existencia de un necrótico muerte celular después de la exposición a LED. Además, se observa una banda de aproximadamente 44/42 kDa que podría ser el fragmento generado después de la escisión de PARP-1 por calpaína o catepsina D, según lo descrito por Chaitanya y col. [24]. Estos elementos apoyan la muerte celular por necrosis. Para validar la existencia de necrosis y evaluar el peso de luz azul en su activación analizamos la expresión de RIP 1 y RIP 3 quinasa por transferencia Western (Fig. 8). Tanto RIP 1 como RIP 3 fueron ligeramente aumentado en todas las retinas expuestas. Los dobletes de 42/40 kDa observados fueron descritos como la porción que contiene el dominio de muerte C-terminal de RIP 1 quinasa [46]. La escisión de RIP 1 quinasa elimina su efecto antiapoptótico al afectar su capacidad para inducir NFkB [47]. Los El estudio de RIP 3 quinasa también reveló una forma escindida de 39 kDa en la retina expuesto a LED verdes (NBG). Este es un producto de caspasa 8 que también es activado (Fig. 8). Es importante tener en cuenta que la escisión de RIP 3 por

la caspasa 8 inactiva esta proteína debido a la pérdida de su dominio quinasa y su capacidad para formar el necrosoma, una etapa clave de la necrosis [48]. Debido a su interacción con los receptores de muerte y su capacidad para formar el necrosoma, RIP 1 y RIP 3 quinasa controlan el cambio entre muerte celular apoptótica y necrótica [49]. Tomados en conjunto estos resultados indican que los LED más verdes (NBG) tienden a inducir células apoptóticas muerte, mientras que la radiación azul tiende a inducir la muerte celular necrótica (CRB y CB). Exploramos aún más este punto mediante el análisis de efectores de muerte celular independientes de caspasas como AIF [16] y LEI / L-DNasa II [50]. Ambos efectores se activaron modestamente en ONL durante la exposición temprana, mientras que la L-DNasa II parece activarse masivamente en momentos posteriores (24 h). Esto no es sorprendente ya que este sistema generalmente se activa por estrés metabólico [51]. También es interesante observar que AIF y L-DNasa II la activación puede estar mediada por la activación de calpaína 1, la primera directamente, por escisión y liberación de la membrana interna mitocondrial [52,53], la segunda indirectamente, por permeabilización de lisosomas y liberando catepsina D [54]. Además, aunque estos efectores tienen originalmente descrita como mediadora de la apoptosis, se ha demostrado que AIF para mediar en la necroptosis [55] y LEI / L-DNasa II, debido a su activación por enzimas lisosomales, podrían ser también un efector de necrosis [56]. Investigamos aún más la presencia de necrosis por tinción de células con PI. Este colorante de unión al ADN es muy útil para caracterizar células muerte. Se usa rutinariamente en citometría de flujo debido a su capacidad para ingresar a la célula y etiquetar el ADN cuando la membrana plasmática esté dañado. Luego realizamos una inyección intravítrea de este tinte unos minutos antes del sacrificio del animal. Curiosamente, un muy alto número de fotorreceptores fueron etiquetados, mucho más que fotorreceptores que son TUNEL positivos, lo que indica que la permeabilización de la membrana plasmática precede a la degradación del ADN.

La existencia de esta necrosis explica fácilmente la presencia de edema retiniano visto en las secciones histológicas, un edema que no es subretiniano pero intersticial. Esto también podría explicar la presencia de una reacción inflamatoria temprana, probablemente debido a la liberación de DAMPS (moléculas de patrones moleculares asociadas al daño) [57] que

pueden También sea responsable de la quemosis observada en las ratas expuestas. Usando un conjunto comparable de experimentos, el equipo de Shang recientemente muestran que los LED blancos conducen a la muerte de fotorreceptores [58], con un importante estrés oxidativo, como confirmamos en este artículo; sin embargo, según nuestros datos, la apoptosis no es la vía principal involucrado en la desaparición de fotorreceptores. En realidad, lo experimental diseño de Shang et al. tiene varias diferencias con las nuestras pero dos las diferencias son muy importantes: primero usan animales adaptados a la oscuridad, un procedimiento que aumenta la sensibilidad retiniana a la luz. Segundo, evalúan el daño retiniano después de un período de recuperación, permitiendo el tejido para eventualmente reparar. En nuestra configuración experimental nosotros analizó los ojos justo después de la exposición para investigar el mecanismo de muerte celular activado durante la degeneración. En conjunto, estos datos indican que el componente azul de El LED es la principal causa de daño en la retina, como ha sido previamente predicho [12]. Además, la normativa vigente establece que para un exposición mayor a 10,000 s, ELV, expresada en términos de luz azul luminosidad, es de unos  $100 \text{ W} / \text{m}^2 / \text{sr}$  [14], en gran medida por las radiaciones utilizadas en este estudio (Tabla 1), lo que sugiere que estas regulaciones deben ser reevaluado mediante la transposición de nuestros resultados al ojo humano. Además, el tamaño reducido de los LED permite la producción de Fuentes compuestas de muy alta luminosidad. Esto introduce un nota de precaución sobre su uso en iluminación doméstica que necesita

estar extremadamente controlado para permanecer seguro para la visión.