



UNIVERSITAT<sub>DE</sub>  
BARCELONA

# Development and characterization of *in vivo* models for Photopharmacology

Alexandre Gomila Juaneda



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

## Desenvolupament i caracterització de models *in vivo* per a fotofarmacologia

### Resum de la tesi.

#### Capítol 1: Introducció

A les xarxes neuronals es constitueixen les interaccions més complexes que poden donar-se en la biologia, i n'és la seva integració i resolució el que determina amb gran precisió qualsevol conducta. L'alteració de la fisiologia cel·lular i neuronal s'ha produït, majoritàriament, mitjançant l'administració de substàncies amb components actius, com fàrmacs o toxines. És la manipulació d'aquesta fisiologia allò que permet produir canvis a tots els nivells de l'estructura biològica, des del nivell molecular fins la integració de xarxes i teixits. L'estudi de l'acció farmacològica arreu de l'organisme, tant a nivell de recerca com per al tractament terapèutic, és el cim de la neurociència. Tant les estructures neuronals com la seva regulació mitjançant neurotransmissors han estat integrades en tot el regne dels vertebrats. La pressió evolutiva de determinats processos és tal que la regulació de comportaments socials mitjançant fàrmacs per a la medicina humana és transversal, sinó idèntica, en models animals tan allunyats com els crustacis.

La conducta humana, com l'animal, està governada per sistemes interconnectats, la unitat dels quals resideix en les neurones. Les cèl·lules neuronals són una munió viva i complexa que integra i resol senyals biològiques mitjançant la seva excitabilitat. Aquesta excitabilitat recau sobre les estructures proteiques de la seva membrana, sensibles química i elèctricament: els receptors i canals iònics. L'activació o inactivació d'aquestes proteïnes ve dictada per missatgers químics, els neurotransmissors, els quals són alliberats a la sinapsis des dels axons neuronals d'una cèl·lula contigua.

La farmacologia clàssica per a la manipulació de les senyals neuronals presenta els inconvenients derivats de la impossibilitat d'un control estricte a nivell espacial i temporal de l'acció del fàrmac, propiciant efectes secundaris no desitjats. El desenvolupament d'eines farmacològiques regulades amb llum ha revolucionat la neurobiologia experimental i la fisiologia mèdica. La manipulació optogenètica es basa en l'expressió de

proteïnes sensibles a la llum, com les rodopsines, mitjançant les quals es pot alterar l'activitat neuronal sota determinades longituds d'ona. No obstant, aquesta tècnica requereix de l'expressió demesia de la proteïna mitjançant teràpia gènica, sovint alterant la fisiologia cel·lular i amb patrons d'expressió en altres tipologies cel·lulars<sup>1</sup>. Una altra eina que es basa en l'ús de la llum és la fotofarmacologia. En termes generals, la fotofarmacologia descriu la incorporació d'un constructe químic sensible a la llum dins una estructura major, des de petites molècules fins pèptids o proteïnes. Sota l'exposició a llum aquest constructe fotosensible indueix un canvi en la conformació global en què està immers, permetent la interacció o modificació de la seva diana farmacològica. La fotofarmacologia clàssica també comparteix amb l'optogenètica la necessitat d'expressar proteïnes modificades. Ara bé, actualment les estratègies fotofarmacològiques opten per la modificació de molècules amb activitat farmacològica que siguin difusibles i/o que puguin conjugar amb l'estructura diana. Podem diferenciar-ne la fotofarmacologia irreversible o compostos engabiats, la qual un cop la molècula encapsulada en una estructura fotodepenent és alliberada per exposició a llum, no és pot recuperar i la seva acció és unidireccional. Seguidament poden definir-se aquelles molècules fotofarmacològics reversibles, com els lligands fotocromics lliures (PCLs, en les sigles en anglès) i els lligands units fotocommutables (PTLs, en anglès)<sup>1,2</sup>.

La fotofarmacologia ha demostrat la seva utilitat en diversos camps de la neurociència. Ha estat emprada per a la regulació del dolor amb major precisió que analgèsics locals<sup>3,4</sup>, també per al control espai-temporal de la neurotransmissió<sup>5,6</sup>, està essent optimitzada per a la recuperació de la visió en models cegs<sup>7,8</sup>, i per la regulació de l'homeòstasi de glucosa *in vivo* per a la diabetes<sup>9</sup>.

Davant el progrés en la recerca de fàrmacs fotofarmacològics són necessaris models animals per a la identificació i el cribratge dels compostos amb potencial terapèutic o de recerca. Les espècies aquàtiques de *Danio rerio* i *Xenopus* compleixen requisits indispensables per al cribratge de nous compostos dependents de llums. En primer lloc, són models animals ben caracteritzats, tant a nivell genètic, fisiològic i conductual, amb gran homologia amb espècies mamíferes, inclosa la humana, i amb un gran percentatge de proteïnes i estructures homòlogues involucrades en patologies humanes<sup>10-13</sup>. En segon terme, són barats en el seu manteniment i en la seva replicació, generant gran quantitat

d'individus en cadascuna de les postes. Finalment, i de capital importància per a la recerca amb compostos sensibles a la llum, les seves formes juvenils són transparents i el seu desenvolupament és conegut i accessible per a la inspecció visual.

Amb tot, l'adaptació de tècniques de cribratge de fàrmacs basades en el trets fenotípics al llarg del desenvolupament i de la conducta de les larves facilita la identificació de compostos en estadis primerencs de la recerca bàsica. L'estudi dels condicionants i de les característiques pròpies d'un i altre organisme en termes conductuals i fisiològics és un pas indispensable per a proposar i caracteritzar assajos de cribratge fotofarmacològic.

Aquest treball vol demostrar com la utilització de peixos zebra i de capgrossos resulta una eina diferencial, indispensable, cost eficient i fiable en la recerca de compostos fotocromics, així com també per a la seva identificació per a futurs estudis transaccionals.

## Objectius

L'objectiu principal d'aquesta tesi és establir i emprar tècniques de cribratge *in vivo* per a identificar i caracteritzar nous compostos fotofarmacològics per a dianes endògenes.

Per tal de complir aquest objectiu, la tesi s'estructura en tres objectius específics, desenvolupats en les parts i els capítols següents:

### **Objectiu I. Fotomanipulació de l'activitat cardíaca i del desenvolupament de l'organisme (part I).**

- Establir un procediment per a la identificació de compostos fotofarmacològics durant el desenvolupament del peix zebra utilitzant trets fenotípics al llarg de la embriogènesis i l'eclosió de les larves (capítol 2).
- Identificar característiques rellevants a nivell morfològic, anatòmic i organotípic sota l'administració dels fàrmacs originals (capítol 2).
- Comparar els fenotips i els seus marcadors entre les diferents formes del compost fotofarmacològic (capítol 2).
- Desenvolupar una estratègia per a l'enregistrament de l'activitat cardíaca dels capgrossos sota control lumínic (capítol 3).
- Desenvolupar un codi informàtic per extreure i analitzar l'activitat cardíaca (capítol 3).
- Identificar compostos fotocromics amb efectes reversibles en el batec cardíac de capgrossos (capítol 3).

### **Objectiu II. Fotomanipulació de la locomoció (part II).**

- Establir un procediment experimental i analític per a categoritzar diferències en locomoció sota dues longituds d'ona diferents (capítol 4).
- Identificar perfils natatoris lligats a vies inhibidores de la neurotransmissió de larves de peixos zebra durant períodes de fosc i d'il·luminació (capítol 4).
- Aportar una estratègia per al cribratge de compostos fotocromics utilitzant l'activitat de larves de peixos zebra i la seva afectació per canvis lumínics (capítol 4).
- Identificar compostos fotocromics per a receptors GABA<sub>A</sub> amb la locomoció en peixos zebra (capítol 5).

- Identificar perfils natatoris lligats a vies inhibidores de la neurotransmissió durant la locomoció de larves de capgrossos de *Xenopus* durant períodes de fosc i d'il·luminació (capítol 6).
- Identificar i caracteritzar un potenciador fotocromic per a receptors de glicina mitjançant la anàlisi de l'activitat natatòria dels capgrossos (capítol 6).
- Identificar i caracteritzar lligands fotocromics de receptors adrenèrgics basats en la locomoció de larves de peix zebra (capítol 7).
- Identificar i caracteritzar lligands fotocromics de receptors de dopamina basats en la locomoció de larves de peix zebra (capítol 8).

### **Objectiu III. Fotomanipulació de la funció visual (part III).**

- Adaptar el procediment de toxicitat induïda per llum a les larves de peixos zebra per tal de produir degeneració de l'estrat de fotoreceptors en la retina i reduir i/o abolir respostes visuals (capítol 9).
- Identificar i caracteritzar respostes de locomoció en larves cegades en assajos fotofarmacològics (capítol 9).
- Desenvolupar i validar un instrument d'assaig del reflex visual-motor optocinètic per a assajar compostos per a la restauració visual (capítol 9).

## Part I. Cribatge durant els estadis de desenvolupament i el control cardíac amb fotofarmacologia

### Capítol 2. Fotocontrol de la toxicitat i el desenvolupament

La quimioteràpia es basa en l'administració de compostos citotòxics per a eliminar cèl·lules proliferant-se en tumors i, juntament amb la cirurgia, la radioteràpia i la teràpia hormonal, és un dels tractaments més emprats en contra del càncer<sup>14</sup>. No obstant, la seva eficàcia i tolerància està subjecte a una baixa resolució, a efectes no específics en les dianes i a toxicitat elevada fora de la diana terapèutica<sup>15</sup>.

En els darrers anys s'han proposat diverses estratègies per reduir o eliminar aquests desavantatges. La primera és l'ús de fàrmacs que influeixin amb dianes sobreexpressades en cèl·lules tumorals, com poden ser factors de creixement, proteïnes del cicle cel·lular o moduladors apoptòtics. Ara bé, havent progressat enormement, aquestes teràpies estan lligades a la identificació de biomarcadors tumorals, selecció de tractaments personalitzats i costos elevats<sup>16,17</sup>. Una segona estratègia per a reduir la toxicitat enfora de la diana és la millora en els sistemes d'administració dels compostos, mitjançant nanopartícules o liposomes, per tal d'alliberar el fàrmac exclusivament al lloc on vol que s'actui. El descobriment de nous materials i el progrés en el camp de la nanotecnologia ha optimitzat aquest camp però, a dia d'avui, la seva translació cap a la medicina aplicada encara és lluny d'aconseguir-se<sup>15</sup>. Una tercera estratègia és l'activació del fàrmac citotòxic en el seu lloc d'acció desitjat<sup>18</sup>. Un control mil·limètric a nivell espai-temporal permetria reduir la concentració activa del fàrmac dispersat més enllà de la regió diana, permetent augmentar la dosis administrada, millorar-ne l'eficàcia, reduir-ne els efectes tòxics a la resta de teixits i millorar la qualitat de vida dels pacients en tractament.

La utilització de la llum com a mètode de control sobre l'acció farmacològica ofereix aquestes millores doncs es pot concentrar amb precisió a l'espai i en el temps, amb intensitat i seleccionant-ne la longitud d'ona. A més a més, la seva interacció amb teixit biològic és molt baixa, excepte en mecanismes d'escaneig, i la seva toxicitat és negligible<sup>1,19</sup>. Un dels tractaments per al càncer que es basa en l'administració de llum és la teràpia fotodinàmica. Es basa en l'administració d'un compost fotosensible que produeix espècies reactives d'oxigen sota irradiació en el tumor, matant-ne les cèl·lules i produint una resposta inflamatòria<sup>20</sup>. Ara

bé, necessita de la presència d'oxigen molecular i presenta el desavantatge d'induir dolor degut al procés inflamatori<sup>21</sup>. Altres tractament basats en llum són l'ús de compostos engabiats o complexos metàl·lics fotoactivats<sup>22-24</sup>. No obstant, tots produeixen l'activació irreversible de les espècies citotòxiques i la consegüent difusió a regions alienes i, per tant, la pèrdua del control en el lloc d'acció.

Amb tot, al nostre grup proposarem el disseny d'un compost fotocromic basat en el fàrmac metotrexat. Aquest és un compost de la classe d'antimetabòlits per quimioteràpia que mata cèl·lules hiperproliferatives mitjançant la inhibició del dihidrofolat reductasa (DHFR), un enzim necessari en el metabolisme del folat indispensable per a reaccions basades en transferència d'un àtom de carboni, provocant la mort cel·lular<sup>25</sup>. Mitjançant el procés d'*azologació* ("azologization" en anglès) s'introduí un azobenzè a l'estructura del metotrexat, conferint-li la capacitat de fotocommutar, i s'anomenà al compost "Phototrexat" (PHX). La caracterització fotoquímica mostrarà un perfil fotocromic robust en solució aquosa amb fotoconversió ràpida entre les dues configuracions *cis-trans* amb llum ultraviolada (UV, 365 nm), essent la configuració *trans* l'estable i la *cis* dependent d'il·luminació constant.

Els resultats *in vitro* amb assaigs enzimàtics i de proliferació cel·lular mostraren que la forma irradiada (*cis*) era un potent antifolat, mentre que la seva forma estable en fosc (*trans*) era pràcticament inactiva.

Per tal de comprovar aquests resultats proposarem l'aplicació de PHX en un model animal de peix zebra. Es va optar per aquest animal degut al fet que el seu desenvolupament està àmpliament descrit, els embrions i les larves són transparents i accessibles a la llum, els embrions són fàcils i barats d'aconseguir, i és un model reconegut en l'estudi farmacològic amb una alta semblança fisiològica i molecular a la humana<sup>26,27</sup>.

Es va dissenyar un protocol per a l'estudi de compostos fotofarmacològics en què es pogués comparar el desenvolupament de les larves de peix zebra de cadascuna de les configuracions de PHX amb el desenvolupament amb i sense metotrexat. Primer s'identificaren marcadors morfològics i conductuals al llarg de cinc dies de desenvolupament entre els grups control i els tractats amb metotrexat. Així s'identificaren paràmetres morfològics com l'alineació dorsal i del cap, l'alineació dels ulls i el seu fenotip, i la morfologia de la cavitat toràcica. A més a més, s'observaren distorsions conductuals durant els episodis natatoris degut a



malformacions anatòmiques o d'altres raons no identificades durant l'exploració visual. Finalment, es comprovà la taxa de mortalitat al llarg de tot el procediment.

Amb tot, es comprovà com la configuració *cis*-PHX induïa problemes de desenvolupament talment com els identificats en les larves tractades amb metotrexat. En especial s'identificaven deficiències morfològiques en l'alineació dorsal i posicionament i fenotip dels ulls, així com problemes en la cavitat toràcica, mentre que aquests no es trobaren en els animals amb l'isòmer *trans*-PHX. A més a més, l'isòmer *cis*-PHX provocava la mort de tots els subjectes als cinc dies d'administració, en contraposició a la baixa mortalitat del *trans*-PHX.

En conclusió, al capítol 2, es dissenyà i validà un protocol adaptat per a la recerca de compostos fotofarmacològics citotòxics *in vivo* en el peix zebra emprant un fàrmac conegut en el tractament del càncer i la seva versió fotocromica.

### Capítol 3. Fotocontrol de l'activitat cardíaca

L'activitat cardíaca està regulada pels sistema nerviós parasimpàtic i el simpàtic mitjançant receptors muscarínics i adrenèrgics, respectivament<sup>28</sup>. La majoria de fàrmacs per a la regulació del ritme cardíac es basen en compostos antiarrítmics que actuen en canals iònics. Conseqüentment, provoquen efectes secundaris adversos, com la inducció ventricular arrítmica, reduint-ne la seva eficàcia. Per tal de millorar-ne els tractaments es requereix de la identificació de mecanismes patològics pacient-dependents i solucions farmacològiques personalitzades<sup>29</sup>. La utilització de la llum per a controlar constructes foto-dependents amb aplicació farmacològica és una eina que millora l'acció dels fàrmacs a nivell espai-temporal i redueix els efectes adversos derivats de la difusió dels compostos actius.

Es van dissenyar compostos fotocromics d'un agonista muscarínic (iperoxo) amb o sense moduladors al·lostèrics (com la phtalmida) per tal de fer-los selectius per a receptors muscarínics cardíacs (tipus M2 majoritàriament). Un cop caracteritzats foto-químicament i comprovar que els compostos fotocommutaven sota diferent longituds d'ona (UV i visible) en solució aquosa, així com l'estabilitat dels seus isòmers, es va dissenyar un protocol per al seu cribratge emprant el model animal de *Xenopus tropicalis*.

Aquest model animal presenta certes característiques que li atorguen avantatges per al cribratge i estudi de compostos fotofarmacològics. En primer lloc, els estadis juvenils, els capgrossos, són transparents i el seu desenvolupament està descrit<sup>30</sup>. El seu sistema cardiovascular és molt més proper evolutivament als mamífers que no pas el peix zebra, ja que presenta una estructura de tres cambres (amb un ventricle i dues aurícules) en comptes de dues<sup>31</sup>. El model cardíac de *Xenopus* ha estat validat per a estudis de desenvolupament<sup>32</sup> i per mètodes d'anàlisis d'imatge<sup>33</sup>.

S'estudiaren els efectes dels compostos fotocromics en l'activitat cardíaca dels capgrossos sota diferents protocols d'il·luminació. Es demostrà com el compost PAI, amb un modulador al·lostèric de *phtalmida* en un extrem, l'azobenzè per a la fotoisomerització al centre, i l'agonista muscarínic *iperoxo* a l'altre, permetia el control del ritme cardíac amb llum visible i UV. La forma *trans*-PAI provoca l'arrest de l'activitat cardíaca, mentre que la il·luminació amb UV (*cis*-PAI) recuperava el batec de l'animal.

En resum, en aquest capítol s'optimitzà el protocol per al cribratge de compostos fotofarmacològics amb efectes sobre l'activitat cardíaca (més enllà de compostos muscarínics també s'ha utilitzat per a derivats adrenèrgics i canals iònics). Per al seu disseny fou necessari escriure un codi per a R per a l'anàlisi dels enregistraments d'imatges, així com facilitar l'adaptació de l'enregistrament sota diferents longituds d'ona.

## Part II. Assajos de locomoció per al cribratge de compostos fotofarmacològics.

La generació de moviment o de locomoció està determinada per la integració de senyals neuronals excitants i inhibidòries, les quals són regulades majoritàriament pels neurotransmissors de glutamat i de GABA i glicina, respectivament<sup>34-36</sup>. El seu control arrela en la participació dels receptors neuronals, els quals són subjectes als sentits visual i de tacte, així com al delicat balanç entre les vies excitants i inhibidòries que governen el sistema nerviós central.

Amb la irrupció de compostos fotofarmacològics per a dianes biològiques, amb especial rellevància en la neurotransmissió i els neuro-receptors, es fa indispensable l'ús de assajos fiables, reproduïbles i de baix cost per al cribratge de llibreries farmacològiques.

En aquest sentit, per a cada bateria de compostos dissenyats s'estudià la seva aplicabilitat i la possible incidència sobre l'activitat natatòria de les espècies juvenils de peix zebra i de capgrossos de *Xenopus*. Els perfils d'activitat durant episodis de locomoció descriuen comportament dels animals, influïts no tan sols pels efectes farmacològics, també per les seves capacitats d'adaptació a condicions canviats o de estrès, com n'és la utilització d'estímuls lumínics. L'ús d'aquests models animals ha estat descrit per a l'estudi de patologies humanes que afecten a la locomoció, com el Parkinson o l'Alzheimer, també en comportament, així com en models d'ansietat o depressió<sup>37-43</sup>.

En base a la literatura i la diana farmacològica dels compostos, s'optà per un o altre model i s'optimitzaren els protocols d'il·luminació amb les longituds d'ona apropiades en cada cas. També s'examinà el perfil d'activitat dels animals no tractats per estimar trets conductuals de control i d'adaptabilitat que permeteren extreure'n les variables més rellevants per al cribratge dels compostos.

#### Capítol 4. Fotocontrol *in vivo* de receptors endògens de glicina

Els receptors glicinèrgics i els gabaèrgics són indispensables per a mantenir el balanç entre excitació i inhibició dels circuits neuronals. Ambdós receptors pertanyen a la superfamília de receptors pentamèrics Cys-loop, juntament amb els canals activats de zinc, els receptors nicotínics d'acetilcolina i els receptors de serotonina tipus 3<sup>44</sup>. Els receptors gabaèrgics i de glicina comparteixen la mateixa composició estructural, el mateix mecanisme inhibitori per l'obertura del por a ions de clor, i també el mateix mecanisme de desensitització degut a residus homòlegs de la regió transmembrana. La desregulació de la neurotransmissió inhibitoria ha estat lligada a multitud de malalties neurològiques, com epilèpsia, autisme o esquizofrènia<sup>45,46</sup>. En particular, la regulació glicinèrgica és molt rellevant en la majoria de reflexes i conductes motores com la locomoció o la respiració, i el seu desequilibri comporta disfuncions motores o l'excés de respostes reflexes, com la hiperekplexia<sup>47,48</sup>.

Es van dissenyar compostos basats en l'estructura de les benzodiazepines, integrant-hi l'estructura fotosensible de l'azobenzè per tal de produir compostos fotofarmacològics que poguessin afectar receptors gabaèrgics. De sorpresa, vam identificar un compost selectiu de receptors de glicina amb modulació al·lostèrica negativa fotocromàtica, anomenat "Glyght".

S'assajaren els diferents compostos sintetitzats amb larves de peix zebra sota diferents protocols lumínics. Emprant la locomoció dels peixos per avaluar les diferències entre l'activitat sota els diferents estímuls lumínics, es van categoritzar els compostos. Dos produïren diferències significatives entre els seus isòmers sobre l'activitat dels peixos.

Un d'ells, l'"Azo-NZ1" resultà ser un blocant del canal dels receptors GABA<sub>A</sub> i amb capacitat selectiva sobre receptors tipus 2 de glicina, tot i que els seus efectes en la locomoció dels peixos no foren destacats. L'altre, el "Glyght", mostrà un fotocontrol estable en el temps i sobre la regulació de l'activitat natatòria en els peixos. Aquests presentaven perfils d'activitat molt per sobre dels controls quan eren exposats a llum UV, on es potenciava l'efecte de l'isòmer *cis*-Glyght. Oposadament, quan s'il·luminava amb llum visible, l'activitat tornava a nivells normals i es perdria l'efecte excitant.

En aquest capítol, es proposà un protocol flexible per al cribratge de compostos fotofarmacològics que afectin la locomoció del peix zebra, així com també un paràmetre per a categoritzar i avaluar les diferències en els compostos i l'acció dels seus isòmers.

Capítol 5. Control òptic de receptors de GABA<sub>A</sub> amb un potenciador de fulgimida.

Seguint el capítol anterior, es dissenyaren i avaluaren compostos fotocromics per als receptors de GABA<sub>A</sub> basats també en l'estructura de les benzodiazepines. Diferencialment a la incorporació del constructe d'azobenzè anterior, en aquesta ocasió es volgué estudiar la incorporació de ditieniletens, els quals presenten estadis fotoestacionaris elevats i fan que els dos isòmers siguin tèrmicament estables en el temps (distingint l'estat obert del tancat)<sup>49</sup>.

Un dels derivats, anomenat "Fulgazepam", tenia capacitat per isomeritzar en resposta a la llum i amb activitat potenciadora sobre receptors de GABA<sub>A</sub> *in vitro* i *in vivo*. Fou estudiat en larves de peix zebra sota diferents protocols lumínics i adaptats a les característiques d'estabilitat d'ambdues configuracions del compost. Es comprovà que la seva administració en l'estat tancat (UV) induïa, després de cicles d'il·luminació UV, un augment constant i dependent de dosi en l'activitat dels peixos, i era contrarestada amb la il·luminació de llum visible (verda). Per contra, l'administració de l'estat obert no produïa cap canvi en l'activitat locomotora dels peixos, a

excepció de ser il·luminats amb UV i promovent l'estat tancat del compost, i per tant la seva configuració activa.

En resum, emprant els estudis anteriors s'adaptà l'assaig per al cribratge de compostos fotofarmacològics amb estadis tèrmicament estables i amb efectes sobre vies neuronals inhibidores.

## Capítol 6. Un potenciador de receptors de glicina fotocontrolable amb llum

Es van dissenyar tres derivats fotocromics per a receptors de glicina, emprant l'estructura d'un fàrmac potenciador de glicina<sup>50</sup> com a punt de partida. A partir de l'anàlisi computacional dels diferents derivats i tenint present les capacitats de solubilitat i fotoquímiques de cadascun, es va avaluar la seva activitat per electrofisiologia i *in vivo* en peix zebra i *Xenopus tropicalis*.

Arrel del cribratge en peix zebra, s'observà com un dels compostos induïa un patró d'activitat diferencial en resposta a la llum i amb concordança amb els efectes d'un potenciador de glicina, reduint-ne la locomoció<sup>51</sup>. Per aprofundir en el fenotip natatori es proposà caracteritzar-ne la resposta en *Xenopus tropicalis* ja que aquest model animal presenta respostes de bloqueig d'activitat durant els estadis juvenils que deriven de respostes gabaèrgiques. Aquestes corrents inhibidores de l'activitat es maximitzen arrel de contactar amb les superfícies sòlides mentre l'animal neda, provocant una parada quasi immediata i total de l'activitat, que es pot reprendre quan s'estimula amb llum, majoritàriament degut a l'acció de la glàndula pineal i dels senyals visuals<sup>52-54</sup>.

La hipòtesi d'estudi fou què com l'activitat dels capgrossos dins dels pous seria reduïda degut a l'acció constant de les rutes gabaèrgiques lligades a cèl·lules mecanosensores, i que seria revertida sota estimulació lumínica, si el compost fotocromic potenciava rutes glicinèrgiques, amb gran presència en els generadors del ritme motor de l'espina dorsal, la seva capacitat natatòria es veuria truncada i no es recuperaria tot i l'estímul lumínic.

Amb tot, s'observà com el compost 13 aturava la capacitat de nedar dels capgrossos sota UV (potenciant l'isòmer *cis*), mantenint el període d'inactivat en la foscor, fins a il·luminar amb llum visible, potenciant el isòmer *trans*, i recuperant l'activitat normal dels vehicles.

En aquest capítol es demostrà la funcionalitat dels estudis de locomoció en ambdós models animals i la identificació de fenotips lligats a rutes glicinèrgiques que foren modulats amb un derivat fotocromic d'un potenciador de receptors de glicina descrit.

#### Capítol 7. Modulació adrenèrgica amb lligands fotocromics.

Els receptors adrenèrgics controlen un gran nombre de funcions, des del ritme cardíac, la respiració, la midriasi o la contracció muscular<sup>55</sup>. Es van dissenyar compostos fotocromics derivats de l'estructura de la clonidina (un lligand adrenèrgic) introduint-ne l'azobenzè com a constructe fotosensible.

Primer es va procedir al cribratge dels diferents compostos i les seves accions emprant el model descrit de peix zebra. El cribratge de cada compost es va realitzar sota les longituds d'ona òptimes per a cadascun d'ells i sota diferents protocols de llum. En un primer cribratge es va comprovar que tres dels quatre compostos induïen fenotips natatoris diferents als del vehicle i al control amb clonidina. El perfil dels animals tractats amb clonidina mostrà una reducció paulatina de l'activitat al llarg del temps, que no podia ser recuperada tampoc amb l'estimulació lumínica. Amb tot, s'optà pel compost amb una major activitat fotocromica ("Adrenoswitch-1"). S'observà com aquest era capaç de revertir la pèrdua d'activitat en els peixos en relació al temps d'exposició a la llum UV.

Per tal de comprovar-ne l'efecte es dissenyà un protocol en què la meitat dels animals tractats eren coberts amb un filtre d'infraroig (IR) que permetia seguir enregistrant-ne l'activitat però filtrava les longituds d'ona menors als 780 nm (incloent la llum UV). Com la relaxació de l'adrenoswitch-1 és molt ràpida i no era necessari una segona longitud d'ona per la reconversió a la configuració *trans*, sols s'utilitzà un període llarg (20 minuts) d'il·luminació UV per potenciar l'isòmer *cis*. Es comprovà com, els animals tractats amb el compost fotocromic i exposats a UV presentaven al cap de 15 minuts el mateix perfil d'activitat que aquells tractats amb clonidina. Per contra, els animals tractats amb adrenoswitch-1 sota el filtre IR, els quals no s'havien exposat a la isomerització *cis*, mantenien la mateixa activitat que els controls tractats amb aigua.

En conclusió, en aquets capítol es continuà advocant pel cribratge de compostos fotofarmacològics *in vivo* en les larves de peix zebra i es

proposà un nou protocol per separar les respostes de locomoció en compostos de ràpida relaxació mitjançant el filtre IR.

Capítol 8. Fotocontrol reversible de transmissió dopaminèrgica en animals.

El rol de la transmissió dopaminèrgica és fonamental per a les funcions fisiològiques i la seva deficiència comporta greus malalties neurològiques com la depressió, el Parkinson, i l'esquizofrènia, entre d'altres<sup>56</sup>. Malauradament, les eines moleculars per a la seva regulació són limitades i l'existència de diferents tipus de receptors dopaminèrgics així com la seva localització i composició heteromèrica al conjunt del sistema nerviós fa que el seu estudi sigui enormement complicat<sup>57</sup>.

Com a punt de partida per a la síntesis química, es proposà l'estructura de l'apomorfina, un dels fàrmacs dopaminèrgics més emprats i el primer per al tractament de Parkinson<sup>58</sup>. En aquesta estructura farmacològica, maximitzant els llocs d'interacció molecular observats en el modelatge computacional de l'apomorfina, s'introduí l'estructura fotocromica de l'azobenzè, i s'obtingué el derivat fotocromic anomenat "Azodopa". Aquest commutava sota llum UV i es relaxava ràpidament en la foscor.

Arrel de la literatura disponible en peix zebra en estudis de la farmacologia de compostos dopaminèrgics i els seus perfils d'activitat al llarg del temps<sup>59,60</sup>, es va estudiar l'afectació del derivat fotocommutable amb els protocols establerts al nostre grup.

Es demostrà que l'isòmer estable *trans*-azodopa induïa el perfil clàssic d'augment de l'activitat en agonistes dopaminèrgics<sup>59</sup>, en línia amb els resultats *in vitro* obtinguts prèviament. Aquest augment d'activitat es mantenia sempre i quan no s'il·luminés amb llum UV, amb la què l'activitat dels peixos es reduïa al nivell dels controls. Per comprovar si l'efecte farmacològic observat era tipus-dependent del receptor, s'administrà conjuntament un antagonista del receptor tipus 1 de dopamina, i s'observà que l'efecte excitant era contrarestat durant els períodes de foscor. Finalment, per eliminar la possible activitat derivada de l'estimulació lumínica, es va repetir el protocol amb peixos encegat (descrits al capítol 9), i s'obtingueren els mateixos perfils d'activitat i natatoris que amb els peixos visualment normals.

En conclusió, es demostrà l'efectivitat de l'azodopa com a fàrmac fotofarmacològicament actiu per a la manipulació de la neurotransmissió

dopaminèrgica i del control de l'activitat en el peix zebra, tant en peixos normals com en peixos engegats i no responsius a la llum.

### Part III. Assajos fotofarmacològics per a la recuperació de la visió

#### Capítol 9. El peix zebra com a model fotofarmacològic per a la restauració de la capacitat visual

La degeneració retinal és un dels motius més comuns en la pèrdua de la visió, com succeeix en la degeneració macular o la retinitis pigmentosa<sup>61,62</sup>. Ambdues condicions neurodegeneratives s'inicien per la pèrdua de l'estrat de fotoreceptors -neurons altament especialitzades que reben els fotons i inicien la transmissió neurològica visual. La pèrdua d'aquests comporta a la llarga la degeneració completa de tota la retina, impossibilitant la recuperació visual. Ara bé, en els estadis primerencs d'aquestes malalties, tot i no tenir fotoreceptors, les cèl·lules neuronals contigües implicades en la neurotransmissió de les senyals visuals encara són vives i funcionals, capaces d'iniciar respostes visuals en la cadena neuronal i transmetre-les al còrtex visual. Per tant, la seva excitació permet produir patrons visuals molt simplificats, com els fosfens o la visió per contrast<sup>63</sup>.

Basant-nos en aquest principi s'adaptà un protocol per induir l'apoptosi de l'estrat de fotoreceptors en larves del peix zebra<sup>64</sup>. Es comprovà si els peixos engegats presentaven canvis en els perfils natatoris i sota l'exposició a diferents longituds d'ona, com els observats en larves genèticament cegues<sup>65</sup>. Paral·lelament s'adaptà un aparell per induir el reflex optocinètic (OKR, de les sigles en anglès)<sup>66</sup> en peixos que fos adaptable per a compostos fotofarmacològics, per tal d'analitzar-ne la resposta visual. Es dissenyà un con emmirallat capaç de projectar al seu centre dues longituds d'ona diferents. El peix es situava en el punt on ambdues ones coincidien i formaven un patró de bandes lumíniques estables. Amb la rotació de l'estructura cònica, aquest patró es desplaçava en un marc horitzontal, creant l'efecte de moviment en el rerefons de la retina dels peixos.

Amb tot, es determinà que els peixos presentaven un pic de degeneració cap a les quinze hores posteriors al tractament degeneratiu per fototoxicitat, i les seves respostes motores i optocinètiques diferien de les larves no lesionades fins a les vint hores.



Finalment, per estudiar la capacitat de recuperació visual s'utilitzaren dos compostos fotocromics desenvolupats al nostre grup. Un era un derivat per a la manipulació de receptors glutamatèrgics tipus 6, molt presents a les cèl·lules ganglionars de la retina. L'altre era el derivat Azo-NZ1 del projecte de les benzodiazepines (capítol 4), el qual tenia especificitat en receptors glicinèrgics, però actuava com a blocant de canals gabaèrgics, també majoritaris en la neurotransmissió retinal.

S'observà com els peixos encegats recuperaven la percepció visual en els experiments optocinètics per als dos compostos, amb una recuperació quasi total al nivell dels controls amb el compost fotocromic de glutamat.

En resum, en aquest capítol es dissenyà i optimitzà la tècnica descrita per induir la degeneració dels fotoreceptors en larves de peix zebra. Es proposaren protocols d'assaig de la locomoció per als peixos encegats i la seva recuperació visual al llarg del temps. Es dissenyà un aparell optocinètic específic per al cribratge de compostos fotofarmacològics amb capacitat d'alteració de les respostes visuals i per a la identificació d'aquells amb potencial terapèutic per a la recuperació de la visió en un model animal cec.

## Conclusions

Les principals conclusions obtingudes a partir d'aquest treball són:

- S'ha adaptat i caracteritzat l'estudi de les formes juvenils i embriològiques del peix zebra com a model per a la identificació de compostos fotofarmacològics amb afectació sobre el seu desenvolupament.
- S'ha adaptat el model de *Xenopus tropicalis* per a l'anàlisi de l'activitat i la fisiologia cardíaca amb compostos fotofarmacològics.
- L'assaig cardíac ha identificat un derivat fotocromic muscarínic capaç de modular el ritme cardíac amb la llum.
- L'activitat durant els episodis natatoris de les larves de peix zebra permet la identificació de compostos fotofarmacològics.
- Es proposa un paràmetre per a categoritzar i identificar els compostos basat en el rati d'activitat sota diferents longituds d'ona. Dos dels compostos amb els majors valors d'aquest rati han estat identificats com a blocant dels canals de GABA i com el primer modulador de corrents glicinèrgics.
- S'identifica un derivat fulgimida fotocromic d'un potenciador de corrents de GABA ha estat identificat mitjançant l'activitat dels peixos zebra i els seus perfils diferencials amb l'exposició a la llum.
- L'activitat de capgrossos ha validat la identificació d'un potenciador de glicina.
- L'activitat del peix zebra ha permès identificar un derivat fotocromic per a la modulació adrenèrgica amb potencial oftalmològic, així com també un altre compost per al fotocontrol de les vies dopaminèrgiques.
- L'adaptació de la tècnica de degeneració de fotoreceptors en la retina de larves de peix zebra ha permès identificar activitats en locomoció similars als mutants genètics cecs durant una finestra de vint hores abans que s'iniciï la regeneració natural.
- Es dissenya i s'adequa la tècnica de reflex optocinètic específicament per al cribratge i la caracterització de compostos fotofarmacològics per a la restauració visual.

1. Brieke, C., Rohrbach, F., Gottschalk, A., Mayer, G. & Heckel, A. Light-controlled tools. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 8446–8476 (2012).
2. Kienzler, M. A. & Isacoff, E. Y. Precise modulation of neuronal activity with synthetic photoswitchable ligands. *Curr. Opin. Neurobiol.* **45**, 202–209 (2017).
3. Leippe, P., Winter, N., Sumser, M. P. & Trauner, D. Optical Control of a Delayed Rectifier and a Two-Pore Potassium Channel with a Photoswitchable Bupivacaine. *ACS Chem. Neurosci.* **9**, 2886–2891 (2018).
4. Mourot, A., Herold, C., Kienzler, M. A. & Kramer, R. H. Understanding and improving photo-control of ion channels in nociceptors with azobenzene photo-switches. *Br. J. Pharmacol.* **175**, 2296–2311 (2018).
5. Stein, M. *et al.* Azo-propofols: Photochromic potentiators of GABAA receptors. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 10500–10504 (2012).
6. Yang, X., Rode, D. L., Peterka, D. S., Yuste, R. & Rothman, S. M. Optical control of focal epilepsy in vivo with caged  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Ann. Neurol.* **71**, 68–75 (2012).
7. Marc, R., Pfeiffer, R. & Jones, B. Retinal prosthetics, optogenetics, and chemical photoswitches. *ACS Chem. Neurosci.* **5**, 895–901 (2014).
8. Hüll, K. *et al.* Photopharmacologic Vision Restoration Reduces Pathological Rhythmic Field Potentials in Blind Mouse Retina. *Sci. Rep.* **9**, 1–12 (2019).
9. Mehta, Z. B. *et al.* Remote control of glucose homeostasis in vivo using photopharmacology. *Sci. Rep.* **7**, 1–11 (2017).
10. Jacobs, A. Use of nontraditional animals for evaluation of pharmaceutical products. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2**, 345–349 (2006).
11. Blum, M. & Ott, T. Xenopus: An Undervalued Model Organism to Study and Model Human Genetic Disease. *Cells Tissues Organs* **205**, 303–313 (2018).
12. Wheeler, G. N. & Brändli, A. W. Simple vertebrate models for

- chemical genetics and drug discovery screens: Lessons from zebrafish and *Xenopus*. *Dev. Dyn.* **238**, 1287–1308 (2009).
13. White, D. T., Saxena, M. T. & Mumm, J. S. Let's get small (and smaller): Combining zebrafish and nanomedicine to advance neuroregenerative therapeutics. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **148**, 344–359 (2019).
  14. Miller, K. D. *et al.* Cancer treatment and survivorship statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* (2016) doi:10.3322/caac.21349.
  15. Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S. & Maiti, P. Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance. *Signal Transduction and Targeted Therapy* (2018) doi:10.1038/s41392-017-0004-3.
  16. Sawyers, C. L. The cancer biomarker problem. *Nature* (2008) doi:10.1038/nature06913.
  17. Saijo, N. Present status and problems on molecular targeted therapy of cancer. *Cancer Res. Treat.* (2012) doi:10.4143/crt.2012.44.1.1.
  18. Reeßing, F. & Szymanski, W. Beyond Photodynamic Therapy: Light-Activated Cancer Chemotherapy. *Curr. Med. Chem.* **24**, 4905–4950 (2016).
  19. Szymański, W., Beierle, J. M., Kistemaker, H. A. V., Velema, W. A. & Feringa, B. L. Reversible photocontrol of biological systems by the incorporation of molecular photoswitches. *Chemical Reviews* (2013) doi:10.1021/cr300179f.
  20. Agostinis, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: An update. *CA. Cancer J. Clin.* (2011) doi:10.3322/caac.20114.
  21. Fink, C., Uhlmann, L., Enk, A. & Gholam, P. Pain management in photodynamic therapy using a nitrous oxide/oxygen mixture: a prospective, within-patient, controlled clinical trial. *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* (2017) doi:10.1111/jdv.13788.
  22. Zhang, P. & Sadler, P. J. Redox-Active Metal Complexes for Anticancer Therapy. *European Journal of Inorganic Chemistry* (2017) doi:10.1002/ejic.201600908.
  23. Bio, M. *et al.* Site-specific and far-red-light-activatable prodrug of combretastatin A-4 using photo-unclick chemistry. *J. Med. Chem.*

- (2013) doi:10.1021/jm400139w.
24. Ciesiński, K. L. *et al.* A photo-caged platinum(II) complex that increases cytotoxicity upon light activation. *Eur. J. Inorg. Chem.* (2010) doi:10.1002/ejic.201000098.
  25. Kanarek, N. *et al.* Histidine catabolism is a major determinant of methotrexate sensitivity. *Nature* (2018) doi:10.1038/s41586-018-0316-7.
  26. Basnet, R. M., Zizioli, D., Taweedet, S., Finazzi, D. & Memo, M. Zebrafish larvae as a behavioral model in neuropharmacology. *Biomedicines* (2019) doi:10.3390/BIOMEDICINES7010023.
  27. Cassar, S. *et al.* Use of Zebrafish in Drug Discovery Toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **33**, 95–118 (2020).
  28. Brodde, O. E. & Michel, M. C. Adrenergic and muscarinic receptors in the human heart. *Pharmacol. Rev.* **51**, 651–90 (1999).
  29. Fabritz, L. *et al.* Expert consensus document: Defining the major health modifiers causing atrial fibrillation: A roadmap to underpin personalized prevention and treatment. *Nature Reviews Cardiology* (2016) doi:10.1038/nrcardio.2015.194.
  30. Nieuwkoop, P. D., & Faber, J. *Normal table of Xenopus laevis (Daudin): A Systematical and Chronological Survey of the Development from the Fertilized Egg till the end of Metamorphosis.* (1994).
  31. Hempel, A. & Kühn, M. A Matter of the Heart: The African Clawed Frog *Xenopus* as a Model for Studying Vertebrate Cardiogenesis and Congenital Heart Defects. *J. Cardiovasc. Dev. Dis.* **3**, 21 (2016).
  32. Kaltenbrun, E. *et al.* *Xenopus*: An emerging model for studying congenital heart disease. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* **91**, 495–510 (2011).
  33. Eckelt, K., Masanas, H., Llobet, A. & Gorostiza, P. Automated high-throughput measurement of body movements and cardiac activity of *Xenopus tropicalis* tadpoles. *J. Biol. Methods* **1**, 9 (2014).
  34. Currie, S. P. & Sillar, K. T. Developmental changes in spinal neuronal properties, motor network configuration, and neuromodulation at free-swimming stages of *xenopus* tadpoles. *J. Neurophysiol.* **119**, 786–795 (2018).

35. Nishino, A., Okamura, Y., Piscopo, S. & Brown, E. R. A glycine receptor is involved in the organization of swimming movements in an invertebrate chordate. *BMC Neurosci.* **11**, (2010).
36. Bertuzzi, M., Chang, W. & Ampatzis, K. Adult spinal motoneurons change their neurotransmitter phenotype to control locomotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **115**, E9926–E9933 (2018).
37. Shams, S., Rihel, J., Ortiz, J. G. & Gerlai, R. The zebrafish as a promising tool for modeling human brain disorders: A review based upon an IBNS Symposium. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **85**, 176–190 (2018).
38. Viczian, A. S. & Zuber, M. E. A simple behavioral assay for testing visual function in *Xenopus laevis*. *J. Vis. Exp.* 1–7 (2014) doi:10.3791/51726.
39. Kalueff, A. V., Stewart, A. M. & Gerlai, R. Zebrafish as an emerging model for studying complex brain disorders. *Trends Pharmacol. Sci.* **35**, 63–75 (2014).
40. Wong, K. *et al.* Analyzing habituation responses to novelty in zebrafish (*Danio rerio*). *Behav. Brain Res.* **208**, 450–457 (2010).
41. Roberts, A., Li, W. C. & Soffe, S. R. How neurons generate behavior in a hatchling amphibian tadpole: An outline. *Front. Behav. Neurosci.* **4**, (2010).
42. Sillar, K. T., Reith, C. A. & McDearmid, J. R. Development and Aminergic Neuromodulation of a Spinal Locomotor Network Controlling Swimming in *Xenopus* Larvae. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **860**, 318–332 (1998).
43. Vaz, R. L., Outeiro, T. F. & Ferreira, J. J. Zebrafish as an animal model for drug discovery in Parkinson’s disease and other movement disorders: A systematic review. *Front. Neurol.* **9**, (2018).
44. Lemoine, D. *et al.* Ligand-gated ion channels: New insights into neurological disorders and ligand recognition. *Chem. Rev.* **112**, 6285–6318 (2012).
45. Solomon, V. R., Tallapragada, V. J., Chebib, M., Johnston, G. A. R. & Hanrahan, J. R. GABA allosteric modulators: An overview of recent developments in non-benzodiazepine modulators. *Eur. J. Med. Chem.* **171**, 434–461 (2019).

46. Leacock, S. *et al.* Structure/Function Studies of the  $\alpha 4$  Subunit Reveal Evolutionary Loss of a GlyR Subtype Involved in Startle and Escape Responses. *Front. Mol. Neurosci.* **11**, 1–19 (2018).
47. Betz, H. & Laube, B. Glycine receptors: Recent insights into their structural organization and functional diversity. *J. Neurochem.* **97**, 1600–1610 (2006).
48. Lynch, J. W., Zhang, Y., Talwar, S. & Estrada-Mondragon, A. Glycine Receptor Drug Discovery. in *Advances in Pharmacology* vol. 79 225–253 (Elsevier Inc., 2017).
49. Szymański, W., Beierle, J. M., Kistemaker, H. A. V., Velema, W. A. & Feringa, B. L. Reversible Photocontrol of Biological Systems by the Incorporation of Molecular Photoswitches. *Chem. Rev.* **113**, 6114–6178 (2013).
50. Bregman, H. *et al.* The Discovery and Hit-to-Lead Optimization of Tricyclic Sulfonamides as Potent and Efficacious Potentiators of Glycine Receptors. *J. Med. Chem.* (2017) doi:10.1021/acs.jmedchem.6b01496.
51. Du, W., Chen, X., Shi, M., Bian, F. & Zhao, Z. Ethanol affects behavior and HPA axis activity during development in zebrafish larvae. *Sci. Rep.* **10**, 1–8 (2020).
52. Jamieson, D. & Roberts, A. Responses of young *Xenopus laevis* tadpoles to light dimming: Possible roles for the pineal eye. *J. Exp. Biol.* **203**, 1857–1867 (2000).
53. Pshennikova, E. S. & Voronina, A. S. Cement gland as the adhesion organ in *Xenopus laevis* embryos. *Russ. J. Dev. Biol.* **43**, 1–11 (2012).
54. Lambert, T. D. Mechanisms and significance of reduced activity and responsiveness in resting frog tadpoles Lambert, T. D. (2004). Mechanisms and significance of reduced activity and responsiveness in resting frog tadpoles. *Journal of Experimental Biology*, 207(7), 1113–11. *J. Exp. Biol.* **207**, 1113–1125 (2004).
55. Tank, A. W. & Wong, D. L. Peripheral and central effects of circulating catecholamines. *Compr. Physiol.* (2015) doi:10.1002/cphy.c140007.
56. Tritsch, N. X. & Sabatini, B. L. Dopaminergic Modulation of Synaptic Transmission in Cortex and Striatum. *Neuron* (2012)

doi:10.1016/j.neuron.2012.09.023.

57. Beaulieu, J. M. & Gainetdinov, R. R. The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors. *Pharmacological Reviews* (2011) doi:10.1124/pr.110.002642.
58. Ul Haq, I., Lewitt, P. A. & Fernandez, H. H. Apomorphine therapy in parkinson's disease: A review. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* (2007) doi:10.1517/14656566.8.16.2799.
59. Irons, T. D., Kelly, P. E., Hunter, D. L., MacPhail, R. C. & Padilla, S. Acute administration of dopaminergic drugs has differential effects on locomotion in larval zebrafish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **103**, 792–813 (2013).
60. Ek, F. *et al.* Behavioral Analysis of Dopaminergic Activation in Zebrafish and Rats Reveals Similar Phenotypes. *ACS Chem. Neurosci.* **7**, 633–646 (2016).
61. Ferrari, S. *et al.* Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr. Genomics* **12**, 238–49 (2011).
62. Bowes Rickman, C., Farsiu, S., Toth, C. A. & Klingeborn, M. Dry age-related macular degeneration: Mechanisms, therapeutic targets, and imaging. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, (2013).
63. Cohen, E. D. Retinal Prostheses. in *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet]*. (ed. Kolb H, Fernandez E, N. R.) 1–24 (2018).
64. Taylor, S., Chen, J., Luo, J. & Hitchcock, P. Light-Induced Photoreceptor Degeneration in the Retina of the Zebrafish. in *Retinal Development* 247–254 (2012). doi:10.1007/978-1-61779-848-1\_17.
65. Viringipurampeer, I. A. *et al.* Rip3 knockdown rescues photoreceptor cell death in blind pde6c zebrafish. *Cell Death Differ.* **21**, 665–675 (2014).
66. Brockerhoff, S. E. Measuring the optokinetic response of zebrafish larvae. *Nat. Protoc.* (2006) doi:10.1038/nprot.2006.255.