



**Universidad Nacional del Sur**

**Tesis**

**Doctora en Bioquímica**

**"CARACTERIZACIÓN DE  
LAS VÍAS DE LA  
FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> EN  
PROCESOS DE  
NEURODEGENERACIÓN  
INDUCIDOS POR ESTRÉS  
OXIDATIVO EN LA RETINA  
BOVINA"**

**Guadalupe Rodríguez Diez**

**Bahía Blanca**

**Argentina**

**2013**



Universidad Nacional del Sur

Tesis

Doctora en Bioquímica

"CARACTERIZACIÓN DE LAS  
VÍAS DE LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub>  
EN PROCESOS DE  
NEURODEGENERACIÓN  
INDUCIDOS POR ESTRÉS  
OXIDATIVO EN LA RETINA  
BOVINA"

Guadalupe Rodríguez Díez

Bahía Blanca

Argentina

2013

Directora de Tesis: Dra. Gabriela A. Salvador

Co-directora: Dra. Norma M. Giusto

## PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctora en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido anteriormente presentada para la obtención de otro título en esta universidad u otra. Contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre el 06 de Octubre de 2009 y el 07 de Octubre de 2013, y ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Gabriela A. Salvador, Profesora Adjunta de la UNS e Investigadora Independiente del CONICET, y de la Dra. Norma M. Giusto, Profesora Emérita de la UNS e Investigadora Principal del CONICET.

Este trabajo de tesis fue financiado con subsidios otorgados por la UNS para Proyectos de Grupos de Investigación (PGI), la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica, el CONICET y la Fundación Florencio Fiorini, instituciones a las que agradezco profundamente.

07 de Octubre de 2013

Guadalupe Rodríguez Diez

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

A Dios, Jehová Jireh

A mi esposo, Alejandro

A nuestra hija, Mia

A mis abuelos, Manuel y Nélica

A mis padres, Manuel y Graciela



## AGRADECIMIENTOS

Considero que el trabajo llevado a cabo para el desarrollo de una tesis doctoral no solo es personal, sino que confluye en él una enormidad de esfuerzos de muchas personas. Por esta razón, quiero agradecer:

A la Dra. Gabriela Salvador, por darme la oportunidad de iniciarme en este “mundo paralelo” que es la ciencia, por guiarme en él, por formarme meticulosamente en el trabajo de mesada, por su compromiso innegable con esta tesis, y por demostrarme día a día su pasión por el quehacer científico...

A la Dra. Norma Giusto, por brindarme su ejemplo, por ser una persona completamente generosa y entregada para con la ciencia, fundamentalmente para con el INIBIBB...

Al INIBIBB, por brindarme el espacio para el desarrollo de las investigaciones presentadas en esta tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), por haber hecho económicamente posibles mis estudios de postgrado.

A todas mis compañeras del laboratorio NMG, por el tiempo compartido, por las charlas, por los consejos...

A mis compañeras del laboratorio GAS: a la Dra. Romina Uranga, por su apoyo en todas las situaciones, por la compañía, por las charlas y los consejos; y a “la tía Sofi”, por brindarme su amistad incondicional, por las horas compartidas, por los mates, por ser tan agradable compañía...

A mis compañeras “vidrio de por medio”: a la futura Dra. Valeria Gili, por recordarme siempre que la vida es sobre todo “amar al prójimo”, y a la Dra. Jorgelina Buschiazzi, por ayudarme cada vez que pedí un consejo tanto personal como científico.

A la Dra. Telma Alonso, por su ejemplo de militancia y de lucha por aquello que consideramos correcto, por mostrarnos que es posible transitar por la vida sin traicionar nuestras convicciones, por guiarme en mis primeros pasos en la política y por estar siempre que la necesité...

Al Dr. Ariel Gandini, por su generosa ayuda en la realización de las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica.

A la Trad. Viviana Soler, por contagiarme su respeto y entusiasmo por esa unidad minúscula que es “la palabra”, por todas sus enseñanzas que me permitieron plasmar una redacción académica apropiada para esta tesis doctoral.

A los integrantes de otros laboratorios, a los técnicos, a los agentes que revistan en la Carrera del Personal de Apoyo en el INIBIBB, por su colaboración cada vez que fue requerida.

Al Dr. Nicolás Cuenca, por compartir gentilmente la imagen exhibida en la portada de esta tesis.

A la Dra. Mónica Mechoud, por estar siempre a mi lado a pesar de las distancias, por abrirse a mí, por brindarme su amistad, su tiempo, sus sonrisas, sus consejos, su ayuda, su guía... Creo que ni ella se imagina lo importante que fue en todo este proceso llamado “tesis doctoral”.

A mis amigos, por estar siempre, por guiarme en lo personal, en lo espiritual y también en lo laboral.

A mi familia...

A mis abuelos, por su amor incondicional, por haberme criado y guiado en el camino de la honestidad, de los buenos modales, de los valores; por ser parte innegable de mi educación, por ser ejemplo del sacrificio necesario para “ser alguien en la vida”...

A mis padres, Manuel y Graciela, por brindarme su amor, su guía, su apoyo; por ayudarme en los proyectos encarados, por permitirme formarme y llegar a ser lo que hoy soy.

A mis hermanos, Jose y Juani, por su paciencia y dedicación, por las horas dedicadas a las imágenes de esta tesis.

A Lidia y Jorge, Tato y Vero, Victorio y Mariela, Enrique y Magdalena, a Nahui y Milo, a Jere, Victoria y Rami, a Cami y Delfi, por aceptarme en la familia, por hacer de Viedma un segundo hogar para mí.

A Alejandro, quien gracias a Dios se convirtió en mi esposo, mi mejor amigo, mi sostén y compañero; por estar a mi lado siempre, en los buenos y en los malos momentos; por elegirme como co-piloto para arriesgarse en este camino que llaman “vida”; por enseñarme lo que es el amor, por contribuir a ser la persona que hoy soy y amarme tal cual soy; por soportarme segundo a segundo... y, en especial, por darme el privilegio de obtener el título más importante y hermoso de todos: ser MAMÁ.



A Mia, por enseñarme a amar de una manera que no creía posible; por enseñarme a amar el sacrificio, la entrega absoluta por un ser tan pequeño e indefenso; por permitirme formarme en el oficio de ser madre.

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	5
INTRODUCCIÓN.....	8
1. La retina: Una ventana del sistema nervioso central.....	8
2. Estados patológicos de la retina. Rol del hierro como generador de estrés oxidativo y fuente de especies reactivas de oxígeno y su relación con la degeneración macular relacionada con la edad.....	12
3. Fosfolipasas A <sub>2</sub> : Rol en el metabolismo de los fosfolípidos y en el estrés oxidativo.....	28
OBJETIVOS.....	43
MATERIALES Y MÉTODOS.....	44
1. Modelo experimental.....	44
2. Materiales.....	44
2.1. Reactivos.....	44
2.2. Equipamiento.....	47
3. Métodos.....	48
3.1. Obtención de las retinas.....	48
3.2. Modelo de estrés oxidativo.....	49
3.2.1. Incubación de las retinas.....	49
3.2.2. Metal de transición: Fe.....	49
3.2.3. Agente oxidante: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> .....	50
3.2.4. Inhibidores.....	50
3.3. Obtención de las distintas fracciones subcelulares a partir de la retina.....	52
3.3.1. Obtención del homogenado total.....	52
3.3.2. Obtención de las distintas fracciones subcelulares de retina: Fracción mitocondrial, fracción microsomal, fracción de membranas, y citosol.....	55
3.3.3. Obtención de las fracciones nucleares y citosólicas.....	58
3.4. Caracterización del modelo de sobrecarga de Fe.....	60
3.4.1. Evaluación de la acumulación de Fe.....	60
3.4.2. Detección de Fe por la tinción de Perls.....	60

3.5. Preparación del tejido para las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica. ....	62
3.5.1. Análisis morfológico por medio de la tinción de hematoxilina & eosina. ....	63
3.5.2. Inmunohistoquímica. ....	63
3.6. Caracterización del estado metabólico de las retinas. ....	65
3.6.1. Ensayo de reducción del MTT. ....	65
3.6.2. Ensayo de la actividad antioxidante. ....	66
3.6.3. Ensayos de dienos y trienos conjugados. ....	67
3.6.4. Ensayo de TBARS. ....	70
3.6.5. Ensayo de liberación de lactato-deshidrogenasa. ....	71
3.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y ensayos de WB. ....	72
3.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. ....	72
3.7.2. WB. ....	73
3.7.2.1. Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF. ....	73
3.7.2.2. Tratamiento de las membranas: bloqueo e incubaciones con anticuerpos. ....	73
3.7.2.3. Detección de la inmunorreactividad. ....	78
3.7.2.4. Detecciones alternativas sobre una misma membrana. ....	79
3.8. Inmunoprecipitaciones. ....	79
3.8.1. Inmunoprecipitación de sPLA <sub>2</sub> . ....	79
3.9. Caracterización de las distintas isoformas de la PLA <sub>2</sub> en el modelo de injuria retiniana. ....	80
3.9.1. Evaluación de la actividad de la isoforma cPLA <sub>2</sub> . ....	80
3.9.2. Evaluación de la actividad de la isoforma iPLA <sub>2</sub> . ....	82
3.10. Evaluación del rol de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa. ....	83
3.11. Evaluación de la actividad de aciltransferasas. ....	84
3.12. Análisis lipídico. ....	85
3.12.1. Extracción de los lípidos. ....	85
3.12.2. Resolución y visualización de los lípidos. ....	87
3.12.2.1. Lípidos neutros. ....	87
3.12.2.2. Lípidos polares. ....	87
3.12.2.3. Prostaglandinas y derivados del AA. ....	88

3.13. Métodos analíticos.....	89
3.13.1. Determinación de proteínas.....	89
3.13.2. Medición de la radioactividad por centelleo líquido.....	89
3.14. Análisis de datos.....	90
RESULTADOS.....	91
Parte I: Modelo de degeneración macular relacionada con la edad en retinas bovinas.....	91
Parte II: Caracterización del modelo de degeneración macular relacionada con la edad en retinas bovinas.....	97
Parte III: Participación de las distintas isoformas de la PLA <sub>2</sub> en los procesos inflamatorios frente al daño inducido por Fe <sup>2+</sup> .....	122
Parte IV: Participación de los procesos de acilación en la respuesta a la injuria oxidativa inducida por Fe <sup>2+</sup> .....	129
DISCUSIÓN.....	132
CONCLUSIONES.....	153
REFERENCIAS.....	156
PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS.....	171
ABREVIATURAS.....	172

## RESUMEN

La acumulación de hierro (Fe) y el estrés oxidativo son eventos patognomónicos de las retinas de pacientes que padecen degeneración macular relacionada con la edad (AMD, del inglés **age-related macular degeneration**). En este trabajo de tesis hemos caracterizado un modelo de sobrecarga de Fe en retinas bovinas incubadas *in vitro* con la finalidad de estudiar los eventos que ocurren en la degeneración retiniana provocada por el estrés oxidativo. Específicamente, hemos estudiado la función de las siguientes isoformas de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>): la isoforma citosólica (cPLA<sub>2</sub>), la isoforma independiente de calcio (iPLA<sub>2</sub>) y la isoforma secretoria (sPLA<sub>2</sub>), durante la toxicidad retiniana inducida por Fe<sup>2+</sup>. También analizamos las implicancias de las diferentes PLA<sub>2</sub>s en la regulación de la ciclooxigenasa (COX)-2, el factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB, del inglés **nuclear factor kappa B**) y las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAKP, del inglés **mitogen-activated protein kinase**).

En retinas enteras aisladas y expuestas a concentraciones crecientes de Fe<sup>2+</sup> (25, 200 o 800 μM) o a su vehículo, logramos determinar cuál es la incorporación efectiva de Fe por medio de técnicas analíticas e histoquímicas (espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo y tinción de Perls). El estrés oxidativo asociado a esta incorporación fue evaluado a través del estudio de diversos parámetros, tales como los niveles de peroxidación lipídica, la generación de dienos conjugados, la funcionalidad mitocondrial, la capacidad antioxidante de la retina, y la integridad de la membrana celular. La incorporación de Fe en las retinas fue dependiente de la concentración de Fe<sup>2+</sup> utilizada en cada incubación. Esta acumulación de Fe produjo un incremento

tiempo- y concentración-dependiente en los niveles de peroxidación lipídica de la retina. Por su parte, la viabilidad mitocondrial solo se vio afectada en menor grado luego de 60 minutos de exposición a la injuria oxidativa. Los niveles de dienos conjugados sufrieron un incremento tiempo-dependiente en tanto que la capacidad de captación de radicales libres solo se vio afectada a altas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$ . En concordancia con estos resultados, se observó que la pérdida de la integridad de la membrana celular evidencia un leve incremento en las retinas expuestas a todas las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  consideradas.

Los niveles de peroxidación lipídica, la viabilidad celular y la pérdida de integridad de la membrana celular también fueron analizados en presencia de inhibidores específicos de las distintas isoformas de la  $\text{PLA}_2$ , a saber araquidonoil trifluorometil cetona (ATK, del inglés *arachidonoyl trifluoromethyl ketone* – inhibidor de la  $\text{cPLA}_2$ –), bromoenol lactona (BEL, del inglés *bromo-enol lactone* – inhibidor de la  $\text{iPLA}_2$ –) e YM 26734 (inhibidor de la  $\text{sPLA}_2$ ). La pre-incubación de las retinas con ATK provocó una disminución de los niveles de peroxidación lipídica y también una inhibición de la activación de las proteínas quinasas reguladas por señal extracelular (ERK1/2, del inglés *extracellular signal-regulated kinase*) a bajas y medianas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$ . Por su parte, el inhibidor BEL provocó un aumento en los niveles de peroxidación lipídica y retrasó la activación de las ERK1/2. En cuanto al inhibidor YM 26743, si bien este no demostró tener efecto alguno en la peroxidación lipídica, sí demostró tener la capacidad de retrasar la activación de las ERK1/2. También fue posible observar que ninguno de estos inhibidores afecta la viabilidad celular ni la permeabilidad de la membrana plasmática.

Se detectó también una liberación diferencial de ácido araquidónico (AA, del inglés *arachidonic acid*) y de ácido palmítico (PAL, del inglés *palmitic acid*) catalizada por la cPLA<sub>2</sub> y la iPLA<sub>2</sub>, respectivamente, en las fracciones microsomales y citosólicas obtenidas a partir de retinas incubadas con Fe<sup>2+</sup>. En el caso de la cPLA<sub>2</sub>, demostramos que, en respuesta a la incubación con Fe<sup>2+</sup>, la forma activa (la forma fosforilada en los residuos de Serina 505) se encuentra asociada principalmente a las fracciones citosólicas y que dicha asociación disminuye en las fracciones microsomales. Fue posible demostrar también que el perfil de liberación de AA producido por la actividad de la cPLA<sub>2</sub> se encuentra regulado por acción de las ERK1/2 ya que la inhibición de estas quinasas por medio del inhibidor U0126 provocó la completa abolición de la liberación diferencial del AA. Por otra parte, observamos que la liberación de AA disminuye a la vez que la asociación de la proteína COX-2 aumenta en los microsomas de las retinas expuestas al Fe<sup>2+</sup>. Se observó también que la sPLA<sub>2</sub> se localiza en la fracción citosólica de manera concentración-dependiente. Mediante ensayos de inmunoprecipitación fue posible observar que aumenta la asociación entre la sPLA<sub>2</sub> y la proteína COX-2 en las retinas expuestas a la sobrecarga de Fe<sup>2+</sup>. Sin embargo, a pesar de la mayor asociación de esta proteína con la sPLA<sub>2</sub>, la generación de prostaglandinas se vio disminuida.

Al estudiar los niveles de p65 (RelA) NF-κB encontramos que estos aumentan en las fracciones nucleares de las retinas expuestas a Fe<sup>2+</sup>. En presencia de los inhibidores ATK e YM 26734, observamos que la localización nuclear de ambas subunidades de NF-κB, p65 y p50, es restaurada a los niveles control en las retinas expuestas al estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup>.



Los mecanismos de reparación de la membrana también fueron analizados mediante el estudio de la participación de las aciltransferasas en la remodelación fosfolípida que ocurre durante el estrés oxidativo sufrido por la retina. Los fosfolípidos ácidos, tales como el fosfatidilinositol (PI) y la fosfatidilserina (PS), mostraron una inhibición en el perfil de acilación en las retinas expuestas a  $Fe^{2+}$  mientras que la fosfatidiletanolamina (PE) mostró resultados opuestos. El uso de inhibidores de la PLA<sub>2</sub> demostró que la PS es activamente deacilada durante el estrés oxidativo inducido por  $Fe^{2+}$ .

Nuestros resultados demuestran que las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> participan en diferentes mecanismos regulatorios en este modelo experimental que mimetiza la DME del siguiente modo: i) la cPLA<sub>2</sub> promueve el daño inducido por el estrés oxidativo dado que cumple una función en la señalización inflamatoria, liberando AA. ii) La iPLA<sub>2</sub> tiene un rol protector debido a que interviene en la remodelación de las membranas mediante la remoción de los ácidos grasos peroxidados, lo cual atenúa los efectos nocivos del  $Fe^{2+}$  sobre las membranas celulares. iii) La sPLA<sub>2</sub> Grupo V tiene múltiples blancos intracelulares relacionados con la respuesta inflamatoria porque participa en la regulación del factor NF- $\kappa$ B y de la proteína COX-2. Los hallazgos aquí presentados aportan nuevos conocimientos acerca de los mecanismos moleculares que operan en la degeneración retiniana inducida por el estrés oxidativo.

## SUMMARY

Iron (Fe) accumulation and oxidative stress are hallmarks of retinas in patients with age-related macular degeneration (AMD). In this thesis work we have characterized an *in vitro* model of iron-overloaded bovine retinas for the study of retinal degeneration during iron-induced oxidative stress. In particular, we have studied the role of the different phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) isoforms, namely cytosolic isoform (cPLA<sub>2</sub>), calcium-independent isoform (iPLA<sub>2</sub>) and secretory isoform (sPLA<sub>2</sub>) during iron-induced retinal toxicity. Furthermore, we have analyzed the implications of PLA<sub>2</sub>s in the regulation of cyclooxygenase (COX)-2, nuclear factor kappa B (NF-κB) and MAPK pathways.

In isolated retinas exposed to increasing Fe<sup>2+</sup> concentrations (25, 200 or 800 μM) or its vehicle, the effective iron incorporation into retinas was analyzed by means of analytical and histochemical techniques (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy and Perls' staining). Oxidative stress associated to this incorporation was also analyzed taking into account several parameters, such as lipid peroxidation and conjugated diene levels, mitochondrial function, anti-oxidant ability and cell membrane integrity. Fe accumulation led to a time- and concentration-dependent increase in retinal lipid peroxidation levels whereas retinal cell viability was only affected after 60 minutes of oxidative injury. Conjugated diene levels underwent a time-dependent increase whereas radical scavenging ability was only affected at high Fe<sup>2+</sup> concentrations. In agreement with these results, cell membrane integrity was slightly increased at all Fe<sup>2+</sup> concentrations.

Retinal lipid peroxidation, cell viability and cell membrane integrity were also analyzed in the presence of specific PLA<sub>2</sub> isoform inhibitors, namely arachidonoyl trifluoromethyl ketone (ATK, cPLA<sub>2</sub> inhibitor), bromoenol lactone (BEL, iPLA<sub>2</sub> inhibitor) and YM 26734 (sPLA<sub>2</sub> inhibitor). ATK was found to decrease lipid peroxidation levels as well as ERK1/2 activation. BEL showed the same effect on ERK1/2 activation but the opposite effect on lipid peroxidation. YM 26743 was observed to have no effect on lipid peroxidation although it demonstrated to have the ability to delay ERK1/2 activation. None of these inhibitors was found to affect either cell viability or cell membrane permeability.

A differential release of arachidonic acid (AA) and palmitic acid (PAL), catalyzed by cPLA<sub>2</sub> and iPLA<sub>2</sub> activities, respectively, was also observed in microsomal and cytosolic fractions obtained from Fe<sup>2+</sup>-incubated retinas. In the case of cPLA<sub>2</sub>, we demonstrated that in response to Fe<sup>2+</sup> incubation, the active form (the phosphorylated form) is associated mainly to the cytosolic fraction whereas this association is lower in the microsomal fraction. We also demonstrated that AA release profile caused by cPLA<sub>2</sub> activity is regulated through ERK1/2 action as shown by the complete abolition of AA differential release through ERK 1/2 inhibition. It was also observed that AA release decreases whereas COX-2 association increases in microsomes of the retinas exposed to Fe<sup>2+</sup>. It could also be observed that sPLA<sub>2</sub> is localized in the cytosolic fraction in a concentration-dependent manner. Via immunoprecipitation assays we demonstrated an increase in the association between sPLA<sub>2</sub> and COX-2 in the retinas exposed to Fe<sup>2+</sup> overload. Furthermore, in spite of the higher association of COX-2 with sPLA<sub>2</sub>, prostaglandins generation was found to decrease.

The analysis of p65 (RelA) NF- $\kappa$ B levels showed that they increased in the nuclear fractions from the retinas exposed to Fe<sup>2+</sup>. In the presence of ATK and YM 26734, the nuclear localization of both p65 and p50 NF- $\kappa$ B subunits was found to be restored to control levels in the retinas exposed to Fe<sup>2+</sup>-induced oxidative stress.

Membrane repair mechanisms were also analyzed by studying the participation of acyltransferases in phospholipid remodeling during retinal oxidative stress. Acidic phospholipids, such as phosphatidylinositol (PI) and phosphatidylserine (PS), were observed to show an inhibited acylation profile in the retinas exposed to Fe<sup>2+</sup> whereas phosphatidylethanolamine (PE) showed exactly the opposite. The use of PLA<sub>2</sub> inhibitors demonstrated that PS is actively deacylated during Fe<sup>2+</sup>-induced oxidative stress.

Our results demonstrate that the PLA<sub>2</sub> isoforms analyzed in this Ph. D. thesis participate in different regulatory mechanisms in our experimental model mimicking AMD. Such participation can be summarized as follows: i) cPLA<sub>2</sub> promotes oxidative stress-induced damage by having a role in inflammatory signaling; ii) iPLA<sub>2</sub> has a protective role by remodeling membranes to remove peroxidated fatty acids, thus attenuating the harmful effects of Fe<sup>2+</sup> on cell membranes; iii) Group V sPLA<sub>2</sub> has multiple intracellular targets related to the inflammatory response by its participation in the regulation of NF- $\kappa$ B and COX-2. The findings herein reported provide new knowledge about the molecular mechanisms operating in retinal degeneration induced by oxidative stress.

## INTRODUCCIÓN

**1. La retina: Una ventana del sistema nervioso central.**

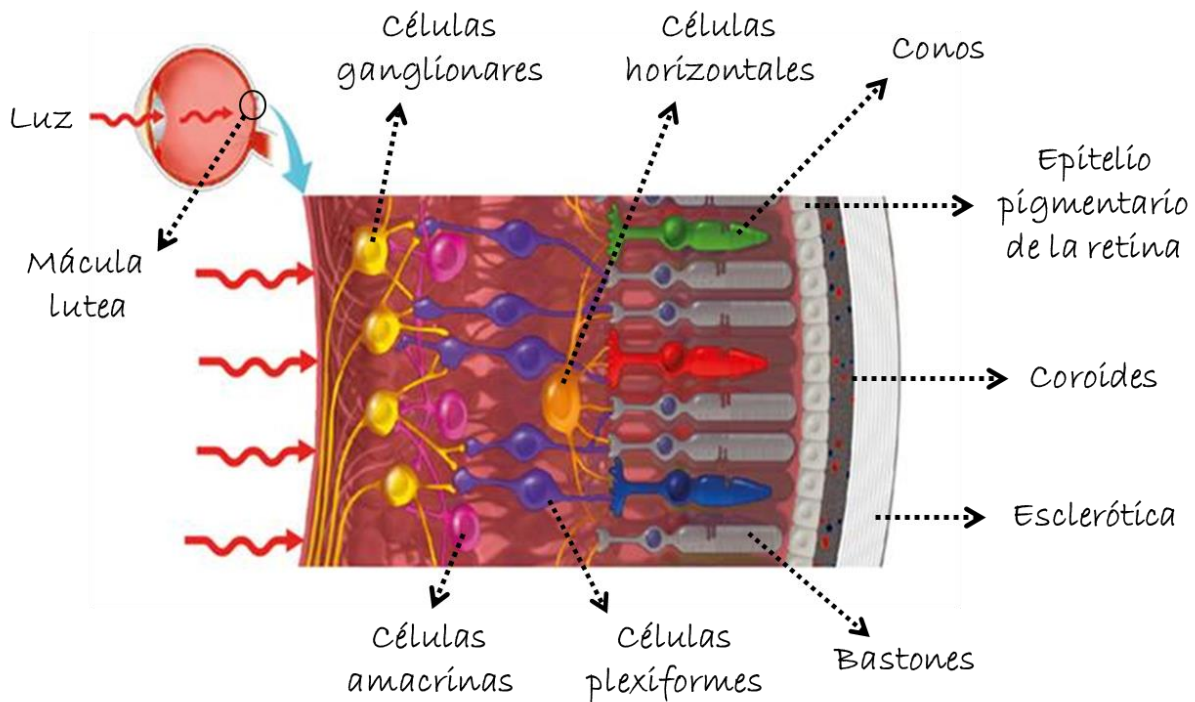
El sistema nervioso (NS, del inglés *nervous system*) es, junto con el sistema hormonal y el sistema inmune, uno de los encargados de controlar todos los procesos que ocurren en nuestro cuerpo. Integra la información que recibe de distintas partes del cuerpo y envía instrucciones para que estas funcionen correctamente. Esto se logra, en parte, porque el NS permite interactuar con el medioambiente al recibir, procesar y almacenar los estímulos captados por los órganos de los sentidos. Todas estas funciones son realizadas por células altamente especializadas: las neuronas, unidades elementales del NS. Dentro de los órganos de los sentidos, el ojo, y particularmente, la retina, revisten especial interés para el estudio del sistema nervioso central (CNS, del inglés *central nervous system*) ya que comparten el mismo origen embrionario. La retina se desarrolla a partir del diencéfalo embrionario, siguiendo el mismo patrón básico de mitosis, migración vertical y diferenciación neuronal. Esto hace que la retina sea considerada por muchos como una “ventana del cerebro”. Por otra parte, la retina es un modelo interesante debido a que es fácil de disecar e ideal para realizar estudios *in vitro*. Además, el hecho de que la retina sea un modelo ultradelgado hace posible la incubación de la totalidad del tejido, logrando que, aun así, todos los componentes del medio de incubación utilizado puedan acceder a las capas de células que componen la retina (Santano Sánchez & Just, 2009).

Varios procesos fisiopatológicos del CNS tienen un “reflejo” en la retina, la cual sufre cambios en paralelo, en muchos casos muy marcados, que conllevan a trastornos visuales. De esta manera, las enfermedades neurodegenerativas como

el Parkinson, la enfermedad de Huntington o la esclerosis múltiple, entre otras, no solo afectan a centros corticales y subcorticales del NS sino que también afectan a la retina, provocando alteraciones en ella y disfunciones visuales asociadas, alteraciones que, si bien probablemente tienen menor relevancia desde el punto de vista clínico con respecto a otros síntomas (como pueden ser la pérdida de memoria o las alteraciones motoras relacionadas con la realización de tareas diarias, por ejemplo), se encuentran estrechamente correlacionados con aquellos cambios del CNS que influyen en el comportamiento, la pérdida de memoria o deficiencias en la realización de tareas tan habituales en la vida cotidiana como leer. Por esta razón, resulta interesante a la vez que importante poder detectar cambios patológicos en la retina a nivel electrofisiológico, ya que las técnicas de diagnóstico oftalmológico, como por ejemplo, el electrorretinograma, la tomografía de coherencia óptica o el examen de fondo de ojo podrían utilizarse como herramientas para determinar la evolución de algunas enfermedades neurodegenerativas y, de esta manera, diagnosticar patologías del CNS por los cambios que aparecen a nivel de la retina, sin necesidad de utilizar técnicas muy invasivas. Por otra parte, la accesibilidad de la retina la convierte no solo en un excelente modelo para estudiar la base molecular y genética de múltiples enfermedades neurodegenerativas, sino también un buen blanco para la investigación y la aplicación de nuevos fármacos y/o terapias en el tratamiento de estas.

La función principal de la retina es recibir las señales lumínicas para después transformarlas en impulsos nerviosos que son enviados al encéfalo a través del nervio óptico. Posee una estructura maravillosamente compleja y, a la vez, relativamente sencilla, debido a la particular arquitectura celular que tiene

ya que engloba una extraordinaria diversidad de tipos celulares (**Esquema 1**). De hecho, en la retina de mamíferos se pueden distinguir varios tipos neuronales en base a sus características morfológicas, bioquímicas y funcionales.



**Esquema 1.** La retina y sus distintas poblaciones celulares. Tomada y modificada de Brooks Cole-Thomson (2005).

La retina se extiende desde el comienzo del nervio óptico hasta la ora serrata. Se encuentra aislada del resto de las estructuras oculares por dos membranas limitantes, la interna (formada por uniones no especializadas entre las células de Müller) y la externa (formada por uniones especializadas entre los segmentos internos de los fotorreceptores –PR, del inglés *photorreceptor*– y las prolongaciones externas de las células de Müller). Por fuera de la membrana limitante externa se encuentran los segmentos externos de los PR, las prolongaciones de las células del epitelio pigmentario de la retina (RPE, del inglés *retinal pigment epithelium*) y las microvellosidades de las células de Müller.



Los cuerpos de las neuronas y de las células gliales de la retina se disponen en tres capas nucleares y sus prolongaciones forman dos capas plexiformes y la capa de fibras del nervio óptico. Estas son:

- Capa nuclear externa en la que se agrupan los cuerpos de los PR que comprenden a conos y bastones. Estos son células altamente especializadas capaces de transformar la energía lumínica en energía química, proceso conocido como fototransducción.
- Capa plexiforme externa formada por los contactos sinápticos entre las prolongaciones internas de los PR y las prolongaciones de las células horizontales, bipolares y plexiformes.
- Capa nuclear interna en la que se encuentran los núcleos de las células horizontales, bipolares, amacrinas, plexiformes, ganglionares y de las células de Müller.
- Capa plexiforme interna en la que se establecen contactos sinápticos entre células bipolares, amacrinas, ganglionares y plexiformes.
- Capa de células ganglionares formada por los cuerpos de las células ganglionares, de algunas células amacrinas y los de las células de Müller.
- Capa de fibras del nervio óptico formada por los axones de todas las células ganglionares.

La estructura celular de la retina no es lo único que la hace un tejido especial. Otra de las particularidades de la retina es su gran exposición a distintas fuentes de estrés oxidativo ya que está expuesta directamente a la luz y posee una alta vascularización por ser un tejido con alto índice metabólico. Para contrarrestar este insulto oxidativo, tiene una batería de enzimas antioxidantes, además de mecanismos no enzimáticos, como por ejemplo, la presencia de los

pigmentos luteína y zeaxantina en grandes cantidades. La zeaxantina se encuentra en el centro de la mácula lútea mientras que la luteína se encuentra en los laterales de la mácula lútea. La importancia de ambos pigmentos radica en que filtran la radiación ultravioleta proveniente del sol.

De todas las células que componen la retina, las únicas sensibles directamente a la luz son los conos y los bastones. La retina humana tiene 6,5 millones de conos (adaptados a situaciones de mucha luminosidad, proporcionan la visión en color) y 120 millones de bastones (que funcionan principalmente en condiciones de baja luminosidad y proporcionan la visión en blanco y negro). Cabe destacar que la zona de la mácula, particularmente la fovea, es más rica en conos que bastones, hallándose aquí la mayor proporción de estos, en una relación cono: célula bipolar: célula ganglionar 1:1:1.

Para el estudio de los efectos del estrés oxidativo, además de las células de la retina, una población con funciones interesantes es la de las células del RPE, las cuales por su tipo de unión, constituyen la barrera hematorretiniana. Estas células cumplen funciones sumamente importantes para la protección contra el estrés oxidativo, como por ejemplo, la fagocitosis y la renovación de los segmentos externos de los PR, el ciclo de la rodopsina, el control de la difusión de gases y el intercambio de nutrientes y desechos con los PR, entre otras.

## **2. Estados patológicos de la retina. Rol del hierro como generador de estrés oxidativo y fuente de especies reactivas de oxígeno y su relación con la degeneración macular relacionada con la edad.**

Para los seres vivos, el hierro (Fe) es un oligoelemento esencial para múltiples procesos metabólicos. Resulta llamativo que las mismas propiedades que hacen a este metal de transición imprescindible para procesos biológicos

vitales –tales como la síntesis del grupo hemo, de los ácidos nucleicos y de algunas proteínas de gran importancia, como del citocromo P450– también lo hacen tóxico pues, mediante la reacción de Fenton, es capaz de generar radicales libres, que provocan daño oxidativo de importantes componentes celulares. Debido a esto, las células intentan que rara vez el Fe se encuentre en su estado libre reducido,  $\text{Fe}^{2+}$ . A través de todo el proceso de absorción, utilización y almacenamiento, el Fe siempre se encuentra ligado a proteínas, de lo contrario podría desencadenar la producción descontrolada de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*).

Para mantener la homeostasia del Fe, los organismos deben ser sensibles a los cambios en sus niveles y regular los procesos de absorción, transporte y almacenamiento del metal. Esto hace que los individuos estén provistos de mecanismos eficaces para mantener las reservas de Fe ya que una respuesta inadecuada a las fluctuaciones fisiológicas de este metal provocaría estados patológicos por deficiencia o sobrecarga. Actualmente, se considera a la hormona hepcidina (Hp, del inglés *hepcidin*) un regulador central del metabolismo del Fe. Se ha observado que la deficiencia o ausencia de Hp conduce a la sobrecarga de Fe y su sobreexpresión a la anemia. La Hp es producida por el hígado y secretada a circulación en respuesta a la inflamación o aumento de reservas hepáticas de Fe, donde disminuye la liberación de este metal mediada por la ferroportina (Fpn, del inglés *ferroportin*) en los enterocitos, los macrófagos y los hepatocitos (Kell, 2009). Dado que el Fe es absorbido a través de la dieta y que no existen mecanismos masivos de excreción del mismo (solo ocurren “pérdidas” del metal por descamación, hemorragias y menstruación en el caso particular de la mujer), el contenido total de Fe en el cuerpo de un individuo tiende a aumentar con la

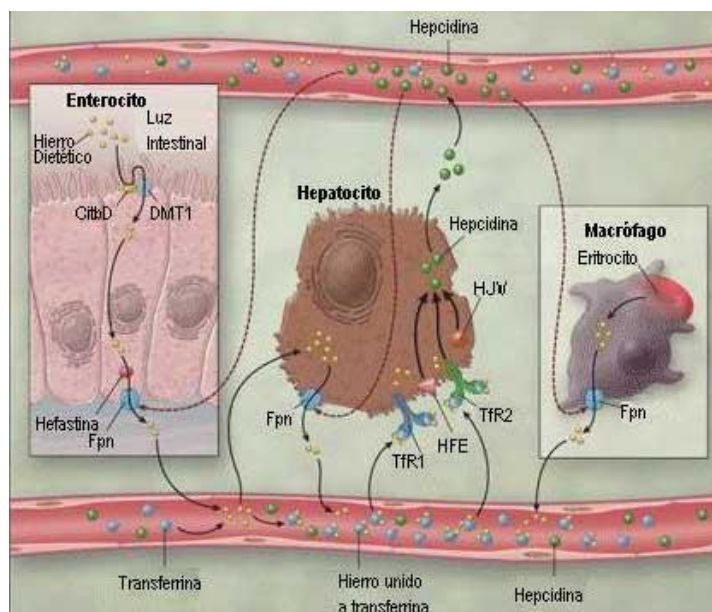
edad. Fundamentalmente, la homeostasia de este mineral dependerá de la retroalimentación establecida entre las necesidades corporales y la absorción intestinal de Fe, retroalimentación en la cual el hígado cumple un papel clave ya que no solo es el sitio de almacenamiento de los depósitos de Fe, sino que es también quien controla el mantenimiento de la homeostasia de este metal pues recibe múltiples señales relacionadas con el balance del Fe y es el responsable del control transcripcional de la Hp y de la mayor parte de las proteínas reguladoras del Fe.

La absorción de Fe ocurre, casi exclusivamente, en el duodeno y es regulada hormonalmente por la Hp. El **Esquema 2** muestra la secuencia de pasos durante su metabolismo (He *et al.*, 2007; Goralska *et al.*, 2009; Kell, 2009).

En primer lugar, debe producirse la reducción del Fe de los alimentos de su estado férrico ( $\text{Fe}^{3+}$ ) a ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) por acción de la actividad ferrireductasa del citocromo b duodenal (DCytb, del inglés **duodenal cytochrome b**). Una vez reducido, el  $\text{Fe}^{2+}$  es transportado desde la luz intestinal a través de la membrana plasmática apical al interior celular por la proteína transportadora de metales bivalentes (DMT-1, del inglés **divalent metal transporter-1**). Además de ser el transportador responsable de la absorción de Fe en el intestino, la proteína DMT-1 participa en la movilización del mineral a partir de los endosomas durante el ciclo de recircularización de la transferrina (Tf, del inglés **transferrin**) donde transporta el Fe liberado hacia el citoplasma de los precursores eritroides. Se ha planteado que el Fe puede ingresar también a la célula como  $\text{Fe}^{3+}$  (a través de la proteína mobilferrina) y como grupo hemo, procedente de la degradación de la hemoglobina contenida en la dieta. El mecanismo molecular de la vía de entrada

del grupo hemo aún no ha sido establecido, aunque se cree que existe un transportador para el grupo hemo. Una vez dentro del enterocito, el hemo será degradado por una hemooxigenasa liberándose el Fe de la estructura pirrólica (Guix *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2005). Una vez en el interior celular, este mineral puede tener dos destinos: ser almacenado en el interior del enterocito como Fe<sup>3+</sup>-ferritina (y posteriormente excretado en las heces cuando se produce la descamación de dichas células senescentes), o bien puede ser transferido a través de la membrana basolateral al plasma por medio de la Fpn, proceso en el que se requiere la actividad ferroxidasa de la hefastina (Hph, del inglés **hephaestin**). La Fpn es una proteína transmembrana multimérica regulada por Fe, que, además de estar encargada de la absorción del mineral por los enterocitos duodenales, regula la liberación de las reservas corporales de Fe por las células reticuloendoteliales. La Hph, proteína que posee sitios de unión al cobre, similar a la ceruloplasmina (Cp, del inglés **ceruloplasmin**) plasmática, actúa al igual que esta como una ferroxidasa necesaria para el egreso de Fe del enterocito a la circulación, por lo que posee un papel crucial en el eflujo de Fe desde estas células al plasma. Luego, en el organismo, el Fe circula unido a su transportador, la Tf. A las demás células del organismo ingresa a través de los receptores de transferrina (TfR, del inglés **transferrin receptor**). Se conocen el Tf<sub>1</sub>R y el Tf<sub>2</sub>R, ambos capaces de transportar Fe unido a la Tf al interior celular.

Como puede observarse, durante todo el proceso el Fe está unido a diversas proteínas, ya sean transportadoras o de depósito. Todas las proteínas que participan en el metabolismo del Fe están reguladas, a su vez, por la concentración de este metal tanto a nivel de la inducción de los genes que las codifican como a nivel de su regulación postranscripcional. Los elementos de respuesta al Fe (IRE, del inglés **iron responsive element**) son estructuras localizadas en las regiones 5' o 3' no traducidas de los ácidos ribonucleicos mensajeros (mRNA, del inglés **messenger ribonucleic acids**) que codifican las proteínas que intervienen en el metabolismo del Fe. Las proteínas de unión a los IRE (IRE-BP, del inglés **iron responsive element-binding protein**) trabajan en conjunto con estos elementos para monitorear y responder a los cambios en la cantidad de Fe quelable en el ambiente intracelular, conocido como compartimiento o *pool* de Fe lábil (LIP, del inglés **labile iron pool**) (Funke *et al.*, 2013; Kell, 2009; Kruszewski, 2003; Kruszewski & Iwanenko, 2003).



**Esquema 2.** Proteínas que participan en el metabolismo y homeostasis del Fe. Tomada de Forrellat Barrios *et al.* (2005).

Particularmente en la retina, se encuentran presentes todas las proteínas anteriormente mencionadas y se observa que tanto la acumulación de Fe como el estrés oxidativo asociado a este metal se presentan en situaciones patológicas en las que fallan los mecanismos regulatorios de las mismas. Por ejemplo, en ratones deficientes de Cp o en modelos animales doble *knockout* (DKO, del inglés ***double knockout***) para Cp y su homóloga, la Hph, se produce sobrecarga de Fe y neurodegeneración asociada a esta condición (Hadziahmetovic *et al.*, 2008). Se cree que estas proteínas facilitan la exportación del Fe de las células al llevar a este metal a su estado férrico. Los ratones deficientes en ambas proteínas desarrollan una sobrecarga de Fe relacionada con la edad y posteriormente una degeneración de la retina (Hadziahmetovic *et al.*, 2008). Los incrementos en la concentración de Fe en las retinas de estos DKO conllevan a valores aumentados de ferritina y niveles disminuidos del TfR, lo cual es una respuesta regulatoria apropiada a la sobrecarga de Fe para prevenir el incremento del LIP en las retinas. Además, en estos modelos se observó acumulación de lipofuscina y neovascularización. Existen evidencias que relacionan estos dos eventos con la activación del complemento, el cual reconoce los productos de fotooxidación, como la lipofuscina, y dispara procesos inflamatorios (Hadziahmetovic *et al.*, 2008).

También se cuenta con abundante evidencia que indica que los cambios neurodegenerativos y los insultos toxicológicos observados en varias enfermedades convergen en un desbalance del Fe (Kell, 2009; Kell, 2010). Todas las condiciones patológicas en las que se produce la acumulación excesiva de Fe en la retina conllevarían entonces a la generación de ROS como consecuencia



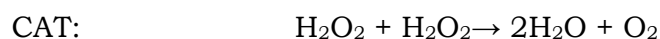
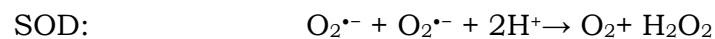
inevitable. La **Tabla 1** muestra cuáles son las principales ROS y algunas de las características más importantes de cada tipo.

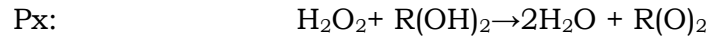
Nombre	Notación	Comentarios
Oxígeno Molecular	O <sub>2</sub>	Forma común del gas oxígeno.
Oxígeno Singulete	<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Formado por radiación UV, fotoinhibición.
Anión Superóxido	O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Formado en reacciones de fotooxidación, en la transferencia de electrones, en la actividad peroxisomal, defensa contra patógenos, oxidación de xenobióticos.
Peróxido de Hidrógeno	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Formado a partir de O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> por dismutación y por descomposición inducida por protones, fotorrespiración, β-oxidación, defensa contra patógenos.
Radical Hidroxilo	OH <sup>•</sup>	Defensa contra patógenos, reacción de Haber-Weiss y de Fenton. Altamente reactivo con todas las macromoléculas.
Radical Peroxilo	O <sub>2</sub> H <sup>•-</sup>	Forma protonada del O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> .
Ozono	O <sub>3</sub>	Formado por radiación UV, reacciones que involucran combustión de productos fósiles.
Ion Perferrilo	Fe-O	Interviene en la etapa de propagación incrementando la velocidad de oxidación de lípidos a través de la conversión de los hidroperóxidos lipídicos (ROOH) en radicales alcoxilos (RO <sup>•</sup> ) o peroxilos (ROO <sup>•</sup> ).
Radical NO	NO <sup>•</sup>	Neurotransmisor, vasodilatador, citotóxico. Al interactuar con el O <sub>2</sub> <sup>•-</sup> forma el peroxinitrito, capaz de producir daño directo a los lípidos, proteínas y ADN.
Radical Nitrito	NO <sub>2</sub> <sup>•</sup>	Poderoso agente nitrante que promueve procesos de peroxidación.

Trióxido de dinitrógeno	$N_2O_3$	Agente capaz de desaminar guanina, citosina y adenina, convirtiéndolas en xantina, uracilo e hipoxantina, respectivamente.
S-nitrosotioles	R-SON	Donante del catión nitrosonio ( $NO^+$ ) y NO para la señalización.
Anión Peroxinitrito	$NO_3^-$	Es producido por la reacción del $O_2^{\bullet-}$ y $NO^{\bullet}$ . Cuando es protonado (pH 6,5, 6,8) se descompone para dar $OH^{\bullet}$ y $NO_2$ .

**Tabla 1.** ROS de interés en el estrés oxidativo. Adaptada de Scandalios (2005) y Kell (2009).

La utilización del oxígeno es un fenómeno inevitable en los seres vivos, pero este proceso acarrea la generación de ROS como intermediarios en la búsqueda por llegar a la forma más reducida e inofensiva con la que puede presentarse el  $O_2$  en nuestros organismos: el  $H_2O$ . Los organismos aeróbicos, con el fin de protegerse de los efectos nocivos de estas ROS generadas, tienen defensas antioxidantes enzimáticas y no enzimáticas (Scandalios, 2005). Las enzimáticas incluyen la acción de las catalasas (CAT, del inglés *catalase*), peroxidasas (Px, del inglés *peroxidase*), superóxido dismutasas (SOD, del inglés *superoxide dismutase*), glutatión S-transferasas (GST, del inglés *glutathion s-transferase*), por ejemplo. En la **Tabla 2** se observan los principales antioxidantes presentes en las células y su localización celular. En particular, cuando la SOD y la CAT actúan en forma conjunta sirven como primera línea de defensa antioxidante, aunque la Px también cumple un rol fundamental al detoxificar las siguientes formas intermedias producidas en el intento de proteger al organismo de la acción de las ROS:

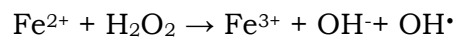




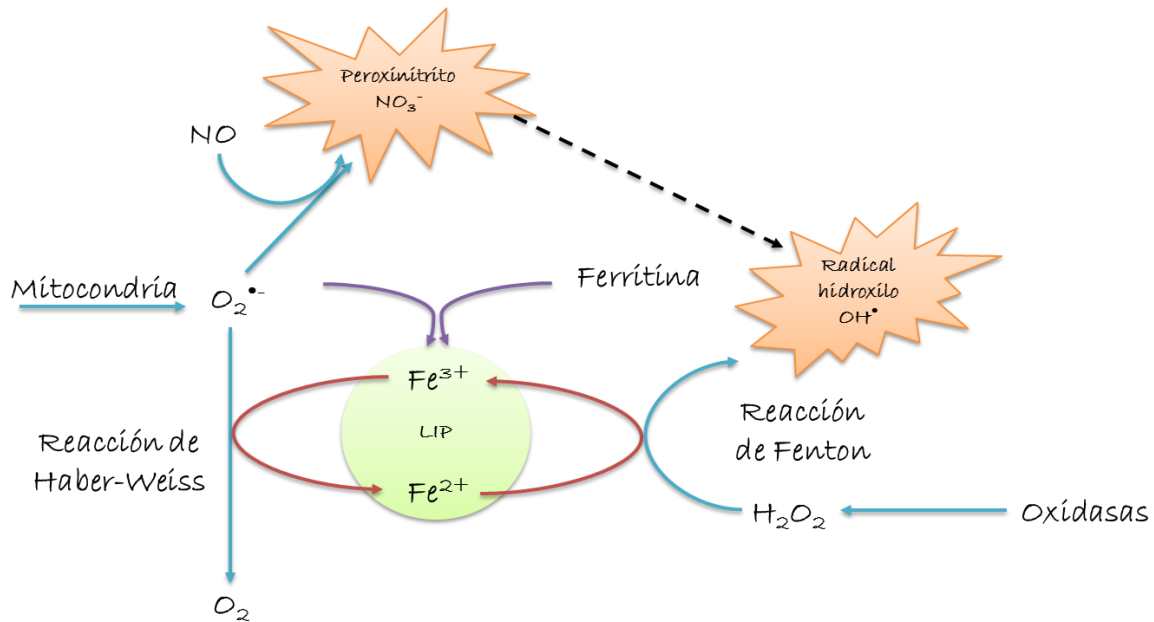
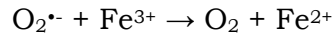
Antioxidantes no enzimáticos	
Moléculas	Localización Subcelular
Ácido ascórbico (Vitamina C)	Exógeno. Citosol.
$\beta$ -Caroteno	Exógeno. Membrana celular, gotas lipídicas.
Glutación reducido (GSH)	Endógeno. Mitocondria, citosol.
$\alpha$ -Tocoferol (Vitamina E)	Exógeno. Membrana celular, gotas lipídicas.
Zeaxantina	Endógeno. Membrana celular, gotas lipídicas.
Licopeno	Exógeno. Membrana celular, gotas lipídicas.
Antioxidantes Enzimáticos (Endógeno)	
Moléculas	Localización Subcelular
Peroxidasa	Citosol.
Catalasa	Peroxisomas, citosol, mitocondria.
Superóxido dismutasa	Citosol (Cu/ZnSOD), mitocondria (MnSOD).
Glutación reductasa	Mitocondria, citosol.
Glutación S-transferasas	Citosol, microsomas.

**Tabla 2:** Antioxidantes naturales de importancia en los seres vivos.

El  $\text{Fe}^{2+}$ , en su estado reducido, puede reaccionar con el peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) producido por la mitocondria o por distintas oxidasas a través de la reacción de Fenton (Lukinova *et al.*, 2009), dando origen al radical hidroxilo ( $\text{OH}\cdot$ ), el cual es sumamente reactivo y dañino:



El anión superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot-}$ , también producido por la mitocondria) puede reaccionar con la forma oxidada del ion, según la reacción de Haber-Weiss, con lo cual se genera nuevamente  $\text{Fe}^{2+}$ , completándose así el ciclo redox del Fe (**Esquema 3**):



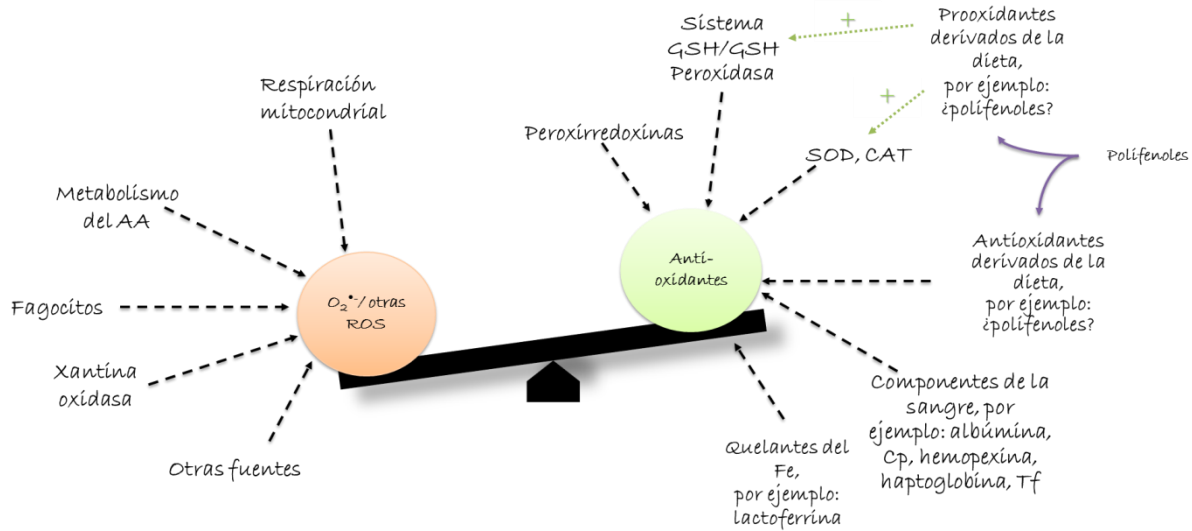
**Esquema 3.** Reacciones de Haber-Weiss y Fenton combinadas, usando el LIP en un ciclo catalítico para producir el tan dañino radical hidroxilo. Adaptado de Kell (2010).

La reducción de Fe<sup>3+</sup> a Fe<sup>2+</sup> también puede ser llevada a cabo por agentes reductores u antioxidantes, tales como el ascorbato (vitamina C). La extrema reactividad del OH<sup>•</sup> le permite sustraer el Fe<sup>2+</sup> de los centros de hierro-azufre (Fe-S) y de otros sitios donde este ion está secuestrado, tales como la ferritina. Este fenómeno tiene la característica de superar cualquier intento de reparación, por lo que la inflamación y el estrés oxidativo son eventos claves en las enfermedades neurodegenerativas. Una reacción relacionada es la producción de peroxinitritos, a partir de la reacción del NO con el superóxido, que puede generar productos tales como la nitrotirosina, o provocar la nitrosilación de ácidos grasos (FA, del inglés *fatty acid*) y proteínas (**Tabla 3**).

Tipo de daño	Ejemplo
Daño oxidativo a los lípidos	Ocurre a través de varios mecanismos por los cuales las ROS reaccionan con los ácidos grasos de la membrana, generando pérdida de la integridad de la membrana y muerte celular.
Daño oxidativo a las proteínas	Modificación de aminoácidos. La oxidación de aminoácidos marca a las proteínas para ser degradadas por proteasas específicas. Fragmentación de la cadena peptídica. Formación de productos de reacción cruzada. Alteración de la carga eléctrica. Aumenta la susceptibilidad a la proteólisis. Oxidación de los centros Fe-S.
Daño oxidativo al DNA	Translocaciones, mutaciones y deleciones del DNA. Rotura de las hebras simples, degradación de bases. Reacción cruzada entre el DNA y las proteínas.

**Tabla 3.** Distintos daños producidos por las ROS. Adaptado de Kell (2010) (DNA, del inglés *desoxiribonucleic acid*).

A pesar de lo dicho anteriormente, las acciones de las ROS no son siempre en perjuicio de nuestro organismo, por lo que no dejarán de producirse. El sistema inmune utiliza los efectos letales de las ROS y las especies reactivas del nitrógeno a nuestro favor al convertirlas en una parte central de su mecanismo para eliminar agentes patógenos. Aunque el uso de estos compuestos altamente reactivos en la respuesta citotóxica de los fagocitos causa daños a los tejidos del organismo, la no especificidad de estos oxidantes es una ventaja ya que así se impide que un agente patógeno escape de esta parte de la respuesta inmunitaria mediante la mutación de un único blanco molecular. Además, varias enzimas necesarias para el normal funcionamiento de las células producen ROS durante su funcionamiento. Por ejemplo, la xantina oxidasa y citocromo P450 son capaces de producir superóxido. El  $H_2O_2$  es producido por una amplia variedad de enzimas incluidas monooxigenasas y oxidasas. Por otra parte, las ROS juegan un papel muy importante en la señalización celular, en un proceso denominado señalización redox (**Esquema 4**):



**Esquema 4.** Balance entre la producción de ROS y defensas antioxidantes. Adaptado de Halliwell (2009).

Los últimos avances en el campo de la metaloneurobiología apuntan a que la importancia del Fe en la generación de ROS radica en la existencia del LIP (donde el Fe se encuentra mayormente como Fe<sup>2+</sup>) (Kell, 2009). Cabe destacar que otros metales, tales como el aluminio (Al<sup>n+</sup>), cromo (Cr<sup>n+</sup>), cobre (Cu<sup>n+</sup>), manganeso (Mn<sup>n+</sup>), selenio (Se<sup>n+</sup>), zinc (Zn<sup>n+</sup>), vanadio (Vn<sup>n+</sup>) y cobalto (Co<sup>n+</sup>) son capaces de participar en ciclos redox similares, en los que un solo electrón puede ser aceptado o donado por el metal. Lo que hace particularmente interesante al Fe<sup>2+</sup> es que este metal, con respecto a los demás metales mencionados, se encuentra en mayor cantidad en los organismos.

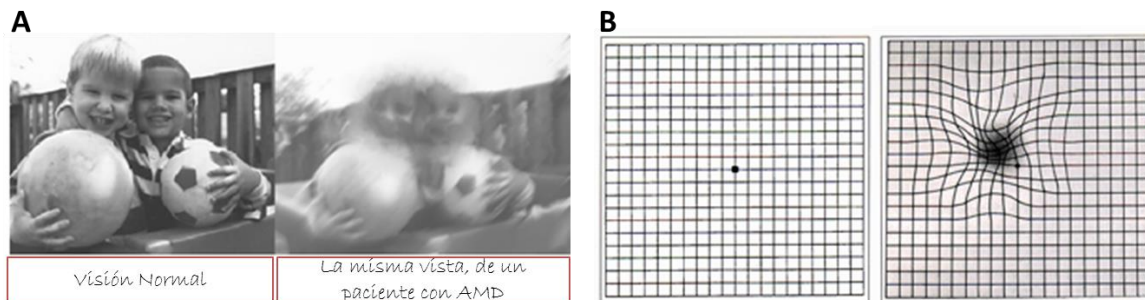
El aumento de ROS asociado a una sobrecarga anormal de Fe sobrepasa estas primeras líneas de defensa mencionadas y se lo relaciona con desórdenes degenerativos de la retina, tales como la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, del inglés *age-related macular degeneration*), el glaucoma, las cataratas, la siderosis ocular, la hemorragia intraocular y las enfermedades hereditarias, tales como la aceruloplasminemia y la neurodegeneración asociada

a la pantotenato quinasa (Dunaief *et al.*, 2005; Dunaief, 2006; Hadziahmetovic *et al.*, 2008; Hahn *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007; Kell, 2010; Scandalios, 2005; Wong *et al.*, 2007; Guo & Mattson, 2000). Por otra parte, los niveles elevados de Fe que se producen en distintos tejidos no solamente se deben a estados patológicos, sino que también se presentan como consecuencia del envejecimiento y pueden exacerbar las patologías relacionadas con este metal debido al aumento de estrés oxidativo sufrido por el tejido (Hadziahmetovic *et al.*, 2011a; Kell, 2009). Estudios *postmortem* han demostrado que la concentración de Fe es mayor en las retinas de pacientes con AMD que en las retinas de pacientes no afectados (Blasiak *et al.*, 2011; Lukinova *et al.*, 2009). Además, el incremento relacionado con la edad de los niveles de Fe en la mácula, la sobreexpresión de Tf en la AMD, el desarrollo de síndromes similares a la AMD en animales con deficiencia de Cp y de Hph, y la asociación entre el polimorfismo de los genes de la homeostasis de Fe fortalecen el posible rol de este metal en la patología de la AMD (Blasiak *et al.*, 2011; Garcia-Castineiras, 2010; Hadziahmetovic *et al.*, 2008; Wong *et al.*, 2007). La hemocromatosis es una enfermedad caracterizada por la excesiva acumulación de Fe. La mayoría de los pacientes con hemocromatosis hereditaria poseen una mutación en el gen de la proteína tipo antígeno leucocitario de histocompatibilidad clase I (llamada HFE) (Feder *et al.*, 1996). Los pacientes con mutaciones en dicho gen evidencian niveles elevados de unión de la Tf a los TfR y, por lo tanto, una mayor internalización de Fe a los tejidos. Este desorden genético también se encuentra asociado a anormalidades de la retina, incluido en algunos casos, la atrofia del RPE o estrías angioides. Más aún, estudios *postmortem* en pacientes también mostraron formación de *drusen* (depósitos de distintas



sustancias que van escapando de los capilares), el hallazgo clínico de la AMD (Dunaief, 2006).

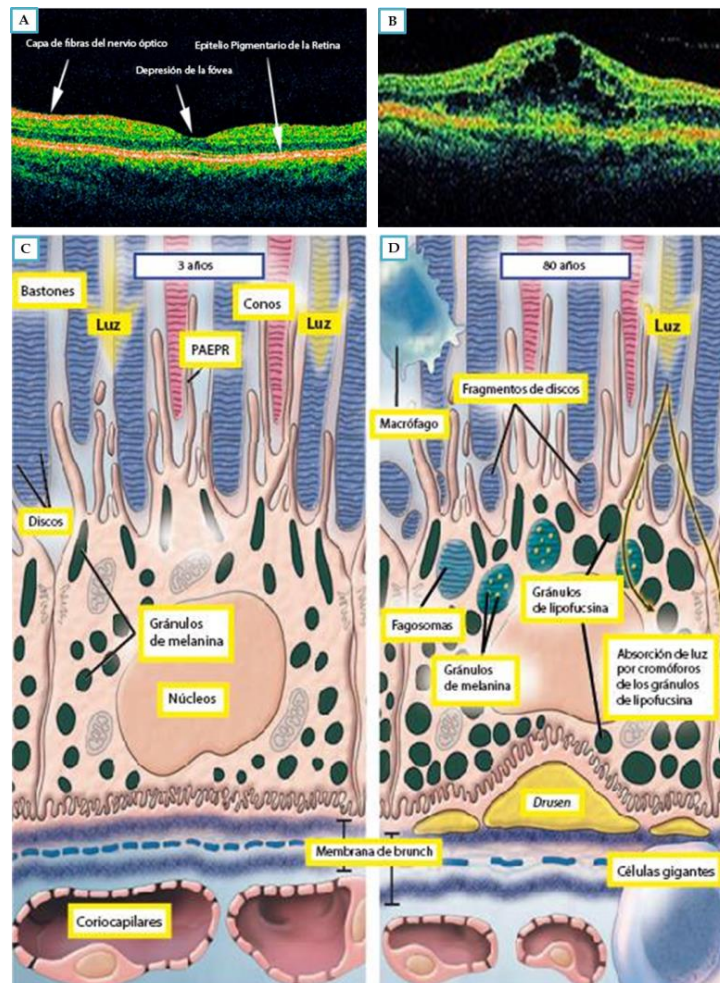
La AMD es una enfermedad degenerativa de la retina, idiopática, que causa una pérdida profunda e irreversible de la visión central y afecta, generalmente, a adultos mayores de cincuenta años en países desarrollados. Es considerada actualmente una de las principales causas de pérdida de la visión en este grupo etario. Esta patología consiste en una degeneración de la zona de la mácula, el sector de mayor agudeza visual, por lo cual, en primer lugar, se deteriora la visión central. Una característica de esta patología en estado avanzado es que el individuo que la padece en dicho estadio puede mantener la visión periférica pero es incapaz de distinguir la parte central de toda imagen que se le presenta, por lo que, por ejemplo, al observar a una persona que tiene en frente, no puede distinguir los rasgos faciales de esa persona (**Esquema 5**).



**Esquema 5.** (A) Ejemplo de la pérdida de visión debido a la AMD. (B) Grilla de Amsler, test utilizado por los especialistas para el diagnóstico de esta patología. Imagen (A) extraída de <http://ocularis.es/blog/?p=90>. Imagen (B) tomada de <http://www.eyesurgeonsofindiana.com/index.php?src=gendocs&ref=MacularDegeneration1&category=Eye%20Conditions>.

Se han encontrado varios componentes similares a los de las placas ateroscleróticas en los *drusen*, una característica de la AMD. La teoría más aceptada actualmente señala que los niveles de Fe en la retina en personas seniles o en pacientes con AMD pueden deberse a la excesiva angiogénesis y al

escape de sangre de los vasos sanguíneos nuevos y frágiles. Además, según estudios previos, el Fe no se intercambia libremente entre la circulación sistémica y la retina. Es necesaria la presencia de proteínas específicas, previamente mencionadas, que transportan este metal desde la circulación sistémica hasta la retina (García-Castineiras, 2010; Picard *et al.*, 2011) (**Esquema 6**).



**Esquema 6.** Tomografía de coherencia óptica de una retina normal (A) y de una retina con AMD (B). Dibujo esquemático de la retina normal (C) y de una retina con AMD (D). Imágenes (A) y (B) tomadas de <http://www.eyesurgeonsofindiana.com/index.php?src=gendocs&ref=MacularDegeneration1&category=Eye%20Conditions>. Imágenes (C) y (D) modificadas de de Jong (2006).

A su vez, la composición lipídica de la retina, es decir, la alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA, del inglés *polyunsaturated fatty acids*) en los segmentos externos de los PR y la baja proporción de colesterol, permiten el movimiento rápido de la rodopsina y de otras proteínas en la membrana, tal

como lo requiere el sistema de traducción visual (Bazan *et al.*, 2011; Fliesler & Anderson, 1983). Pero es esta misma composición lipídica la que hace al tejido tan vulnerable a la peroxidación lipídica en presencia de  $Fe^{2+}$  libre. Esto explica la presencia en la retina de sistemas enzimáticos, mecanismos no enzimáticos y de pigmentos xantofílicos, que trabajan en conjunto para combatir el estrés oxidativo (véase **Tabla 2**) (SanGiovanni & Neuringer, 2012).

En base a criterios clínicos se puede dividir a la AMD en temprana y avanzada. Esta última presenta dos tipos: AMD avanzada húmeda y AMD avanzada seca. La forma avanzada seca no solo es la más común (aproximadamente el 90 % de los casos de AMD) sino que es la que más se relaciona con el estrés oxidativo (de Jong, 2006). La forma húmeda se puede tratar con láser, con una terapia fotodinámica o con inyecciones de anticuerpos contra el factor de crecimiento del endotelio vascular. Por el contrario, para la forma seca avanzada actualmente no hay tratamientos. Sí es posible frenar la progresión si en el estadio intermedio el paciente es medicado con un cóctel de antioxidantes (vitaminas C, A y E), zinc y cobre. Como es de esperar, si bien se han identificado varios genes relacionados con esta patología (de Jong *et al.*, 2001; de Jong, 2006; Hadziahmetovic *et al.*, 2008; Hadziahmetovic *et al.*, 2011b; Hadziahmetovic *et al.*, 2011a; Picard *et al.*, 2011), también está fuertemente asociada a factores ambientales, tales como el hábito de fumar (Janik-Papis *et al.*, 2009), la obesidad, la hipertensión arterial, la diabetes, los niveles elevados de colesterol, etc. (Blasiak *et al.*, 2009; Blasiak *et al.*, 2011; Dunaief *et al.*, 2005; Dunaief, 2006; Hadziahmetovic *et al.*, 2011b; He *et al.*, 2007; Kell, 2010; Loh *et al.*, 2009; Morgan *et al.*, 2006; Wong *et al.*, 2007; Frisardi *et al.*, 2011; Arnal *et al.*, 2010; Marin-Castaño, 2013).

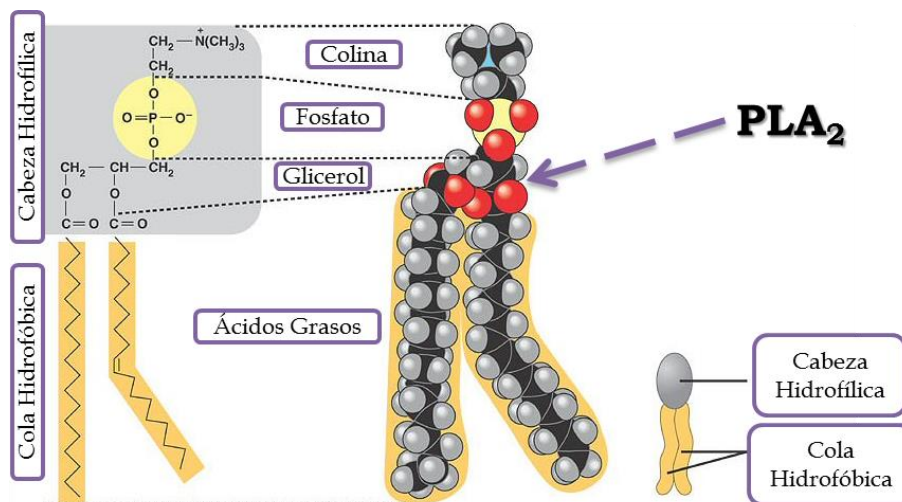
Es sabido que los factores ambientales previamente detallados se asocian a desbalances del Fe (Dunaief, 2006; Garcia-Castineiras, 2010; Goralska *et al.*, 2009; Hahn *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007; Loh *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2007) y se cuenta con evidencias que indican que las terapias de quelación del Fe, factores propios de la dieta (Weikel *et al.*, 2012) y el uso apropiado de antioxidantes (Cano *et al.*, 2010) podrían ayudar a revertir estos procesos patológicos (Voloboueva *et al.*, 2007).

### **3. Fosfolipasas A<sub>2</sub>: Rol en el metabolismo de los fosfolípidos y en el estrés oxidativo.**

Frente al estrés oxidativo, las primeras estructuras en resultar afectadas son las membranas celulares, que rápidamente sufren peroxidación lipídica. Las membranas de las células de la retina tienen una composición lipídica particular. Se caracterizan por poseer PUFA de larga y muy larga cadena (LC- y VLC-PUFA, del inglés *long chain-* y *very long chain-*PUFA, respectivamente), los cuales tienen FA muy propensos a sufrir peroxidación. Cobran particular interés entonces las fosfolipasas A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>, del inglés *phospholipase A<sub>2</sub>*) y las aciltransferasas (AT, del inglés *acyltransferase*), las cuales actúan en conjunto para mantener la composición de FA de los fosfolípidos (PL, del inglés *phospholipids*) de membrana. Estas enzimas, frente al estrés oxidativo, son capaces de recambiar los FA peroxidados por otros que no lo estén, de manera de asegurarle a las células la integridad de membranas necesaria para poder continuar con sus funciones, en el caso particular de los PR y las demás células de la retina, para poder llevar a cabo el proceso de la visión.

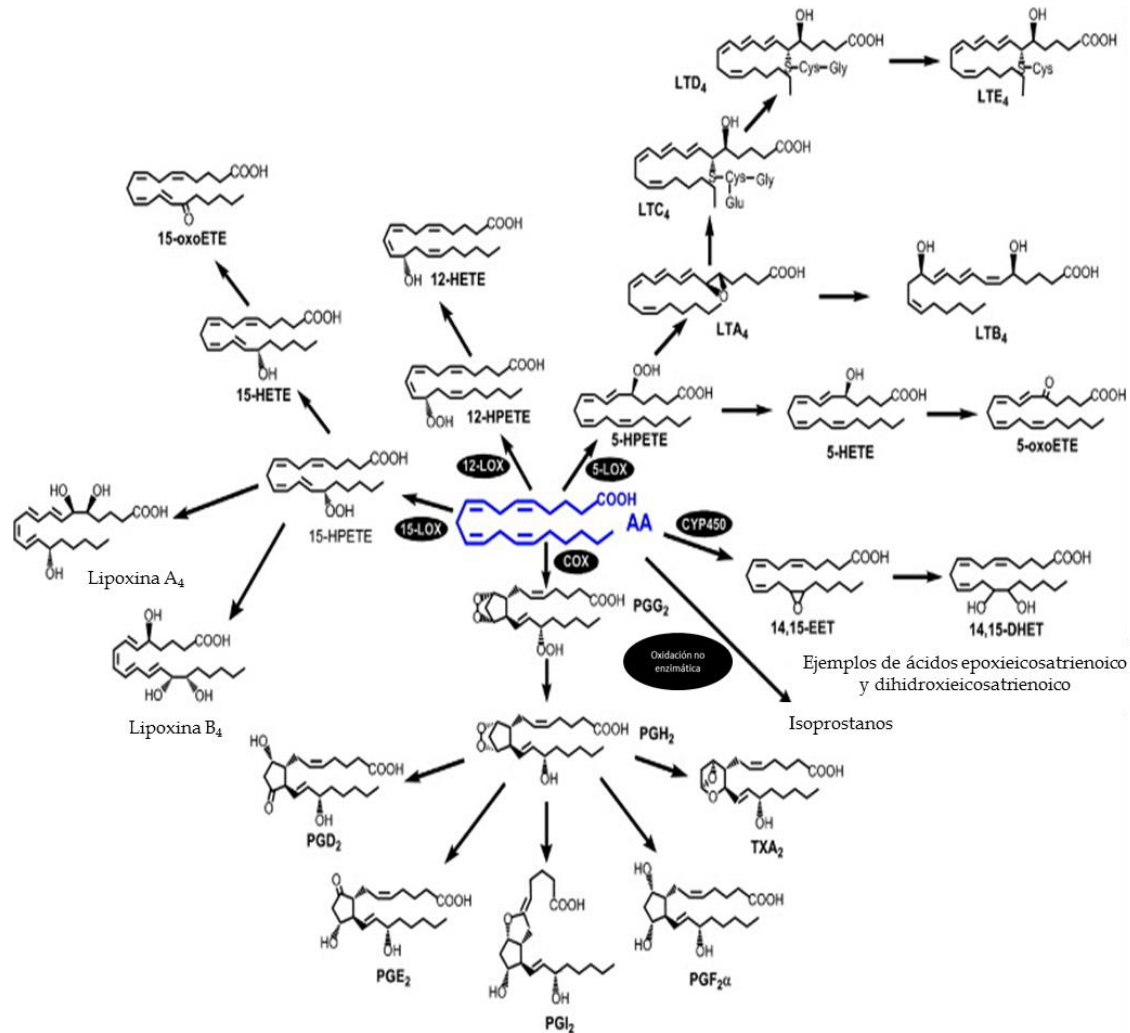
Además de tener un rol estructural fundamental en la membrana plasmática, los PL (**Esquema 7**) actúan en muchos casos como precursores de

moléculas de señalización y de transducción de señales. Son hidrolizados por distintas fosfolipasas en respuesta a diferentes estímulos, como por ejemplo, los neurotransmisores, los factores neurotróficos, las citoquinas, etc. La PLA<sub>2</sub> es una enzima ubicua que tiene un rol de vital importancia en el metabolismo de los lípidos de membrana ya que es capaz de escindir el enlace sn-2 del esqueleto de glicerol de los PL, liberando así el FA esterificado (generalmente, un PUFA, tal como el ácido araquidónico –AA, del inglés *arachidonic acid*- o un VLC-PUFA) y el lisoPL. Una vez generados, estos metabolitos son capaces de activar múltiples vías de señalización celular.



**Esquema 7.** Estructura de un fosfolípido. Sitio de acción de la PLA<sub>2</sub>.

El AA (también llamado ácido 5,8,11,14-eicosatetraenoico, 20:4  $\omega$ -6) es un FA esencial, el cual es obtenido directamente de la dieta o indirectamente a partir de la conversión del ácido linoleico. El AA es precursor de una gran variedad de compuestos bioactivos, los eicosanoides, que son producidos por oxigenación a través de las vías ciclooxigenasa (COX) y la lipoxigenasa (LOX) (**Esquema 8**).



**Esquema 8.** Generación de distintos metabolitos bioactivos a partir del ácido araquidónico. Adaptado de Astudillo *et al.* (2012).

Otro FA esencial, sumamente importante en los procesos inflamatorios es el ácido docosahexaenoico (DHA, del inglés ***docosahexaenoic acid***). Es también llamado ácido *cis*-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico, 22:6 ( $\omega$ -3), el cual es liberado por acción de las PLA<sub>2</sub> y al cual se le ha asignado un rol protector frente a la inflamación ya que es precursor de compuestos de gran importancia biológica, tales como los docosanoideos. Dentro de estos últimos se encuentra el compuesto estereoespecífico, la neuroprotectina D1 (NPD1, también llamada ácido 10R,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoico). Particularmente, en células germinales, en el cerebro y en los conos y los

bastones de la retina el DHA puede llegar a constituir alrededor del 40-60 % de los PUFA. Este FA cumple numerosas funciones en el organismo, entre ellas podemos citar: regulación del sistema inmunológico, posible segundo mensajero, y regulación de la fluidez de las membranas celulares (Valenzuela *et al.*, 2010). Específicamente a nivel del CNS y de la retina, el DHA es necesario para el correcto desarrollo de estos tejidos y está involucrado en la formación de la memoria, excitabilidad de las membranas, biogénesis y función de los PR, señalización neuronal y neuroprotección (Bazan *et al.*, 2005; Bazan, 2009a; Bazan, 2009b; Mukherjee *et al.*, 2004). La síntesis de la NPD1 ocurre por medio de la oxigenación que lleva a cabo la LOX-15 sobre el DHA previamente liberado por la PLA<sub>2</sub>, dando lugar a un intermediario epóxido, el 16,17S-DHA, y se encuentra aumentada en las células del RPE, en las cuales el DHA es necesario para la integridad funcional de las mismas. En estas células, los niveles de DHA libre se encuentran estrictamente regulados por acción conjunta de las PLA<sub>2</sub> y de las AT, y por peroxidación (Bazan, 2009a; Bazan, 2009b). Existen controversias acerca de si alguna de las isoformas de la PLA<sub>2</sub> es la responsable de la liberación de DHA para la producción de NPD1, y se ha demostrado que involucran a varias isoformas de la PLA<sub>2</sub> (Bazan, 2006a; Bazan, 2006b; Bazan, 2006c; Bazan, 2009a; Bazan, 2009b; Farooqui *et al.*, 2007a; Farooqui *et al.*, 2007b; Kolko *et al.*, 2009). La neuroprotectina NPD1 provoca una modificación en el perfil de expresión de los miembros de la familia de proteínas de linfoma-2 de célula B (Bcl-2, del inglés ***B-cell lymphoma 2***). Se ha demostrado que esta neuroprotectina promueve la activación de la expresión de proteínas anti-apoptóticas, tales como la proteína Bcl-2 propiamente dicha y la proteína Bcl-extra grande (Bcl-xL, del inglés ***Bcl-extra large***), a la vez que inactiva la de las proteínas pro-apoptóticas, tales como

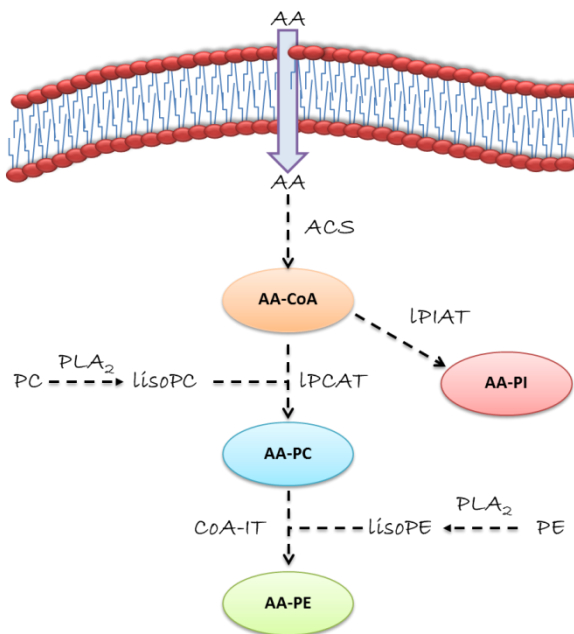


la proteína X asociada a Bcl-2 (Bax, del inglés *Bcl-2 associated X protein*) y la proteína asociada a Bcl-2 promotora de la muerte (Bad, del inglés *Bcl-2 associated death promoter*). Las deficiencias del DHA y/o de las enzimas implicadas en su síntesis se han relacionado con patologías degenerativas del CNS como por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (Bazan *et al.*, 2011). Se cuenta con evidencias que indican que la NPD1 es un potente inhibidor de la apoptosis inducida por estrés oxidativo y que, además, es capaz de inhibir la inducción de la proteína COX-2 que se produce durante la inflamación mediada por citoquinas (Bazan, 2009a; Bazan, 2009b; Serhan *et al.*, 2004; Farooqui *et al.*, 2007b). Cabe destacar que el DHA por sí mismo también es capaz de inhibir la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Bazan, 2006a; Bazan, 2006b; Bazan 2006c).

Los mediadores en señalización derivados de la degradación de PL incluyen a aquellos productos de la acción enzimática (eicosanoides, lisofosfolípidos, factor activador de plaquetas –PAF, del inglés *platelet-activating factor*–, endocannabinoides y docosanoides) y también a aquellos que son producidos de manera no enzimática (como por ejemplo, los isoprostanos, neuroprostanos, isofuranos, neurofuranos, isoquetales, neuroquetales, 4-hidroxinonenal, etc.). Debido a la potente acción biológica de los eicosanoides, las células mantienen los niveles de sus FA precursores muy controlados, mediante la esterificación de los mismos en los lípidos celulares. La disponibilidad de AA libre es descripta como el paso limitante en la generación de eicosanoides en las células de mamífero. Además, el AA libre también cumple funciones de señalización propias como, por ejemplo, inducir la apoptosis. Bajo condiciones fisiológicas, el AA se encuentra generalmente esterificado en la posición sn-2 de la fosfatidilcolina (PC,



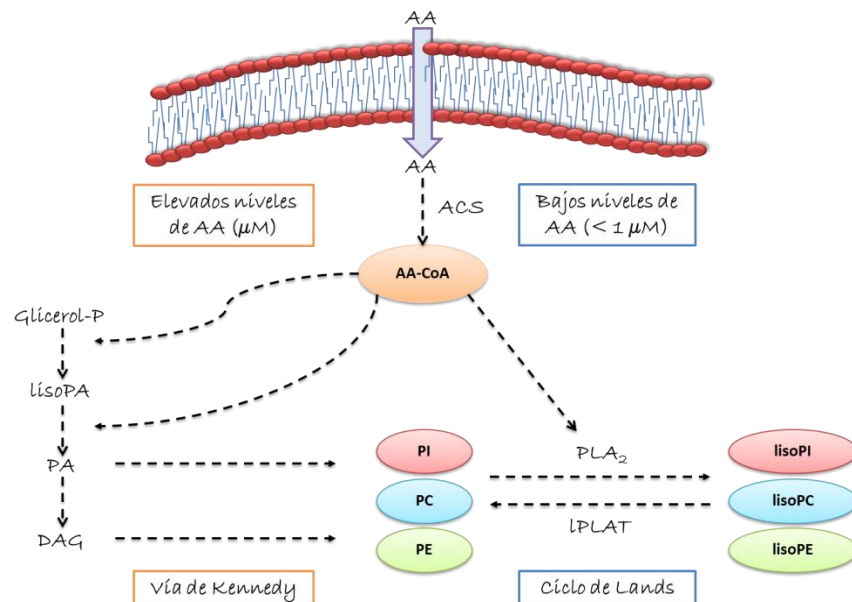
del inglés *phosphatidylcholine*), fosfatidiletanolamina (PE, del inglés *phosphatidylethanolamine*), y fosfatidilinositol (PI, del inglés *phosphatidylinositol*), mayormente. La liberación de AA y, por ende, el remodelamiento de los PL de membrana, es un proceso altamente regulado que representa el balance entre dos reacciones: la deacilación de PL por acción de las PLA<sub>2</sub> y la reacilación y la transferencia del AA entre varios *pools* de PL por acción de las AT y transacilasas (**Esquema 9**), en el llamado Ciclo de Lands.



**Esquema 9:** Acción conjunta de las PLA<sub>2</sub> y las AT en el metabolismo de los PL de membrana. Adaptado de Astudillo *et al.* (2012).

Este mecanismo es indispensable para proteger las membranas de toda clase de daño, incluso de la peroxidación oxidativa que resulta del insulto oxidativo. Dependiendo de las señales recibidas por la célula preponderará una reacción por sobre la otra. Aun así, la reacilación del AA siempre es significativa ya que solo una pequeña fracción del AA liberado por las PLA<sub>2</sub> se encuentra disponible para la síntesis de eicosanoides, mientras que el remanente es

efectivamente incorporado en los PL por acción de las AT (Perez-Chacon *et al.*, 2009). Existen dos vías diferentes para la incorporación inicial de AA. Una es una vía de alta afinidad que incorpora pequeñas concentraciones de AA en los PL por reacciones de acilación catalizadas por AT dependientes de la coenzima A (CoA, del inglés **coenzime A**). Se cree que esta es la vía principal de incorporación de AA a los PL en condiciones fisiológicas por lo que, en este caso, la disponibilidad de lisoPL aceptores mediada por las PLA<sub>2</sub> sería el paso crítico regulador. La segunda vía se manifiesta frente a altos niveles de AA libre, los cuales podrían presentarse en condiciones fisiopatológicas, provocando la incorporación de los FA en primer lugar por la vía *de novo* de síntesis de los PL, con la consecuente acumulación de AA en los triglicéridos y diaraquidonoil-PL. Estas vías de alta y baja capacidad operarían una vez que la vía de deacilación/reacilación ha sido saturada debido a las altas concentraciones de AA. Después de que el AA ha sido incorporado en los PL, las reacciones de remodelación pueden ser llevadas a cabo por las transacilasas independientes de CoA que transfieren AA desde la PC a la PE en un proceso que generalmente tarda varias horas en las células (**Esquema 10**).



**Esquema 10:** Vías de incorporación del AA en los fosfolípidos. Adaptado de Pérez Chacón *et al.* (2009) y Astudillo *et al* (2012).

Se han identificado más de 30 tipos diferentes de PLA<sub>2</sub> en mamíferos y, si bien comparten funciones comunes en la hidrólisis del FA de la posición sn-2 de los PL, cada una de ellas está codificada por un número diverso de genes y son reguladas por diferentes mecanismos. Las clasificaciones recientes incluyen cuatro grupos principales: (i) grupo de la PLA<sub>2</sub> secretoria de bajo peso molecular (sPLA<sub>2</sub>, del inglés *secretory PLA<sub>2</sub>*), el cual incluye los grupos I-III, V y IX-XIV; (ii) grupo de la PLA<sub>2</sub> citosólica, dependiente de calcio, de alto peso molecular (cPLA<sub>2</sub>, del inglés *cytosolic PLA<sub>2</sub>*), el cual incluye los grupos IVA-IVF; (iii) grupo de la PLA<sub>2</sub> independiente de calcio, de alto peso molecular (iPLA<sub>2</sub>, del inglés *calcium-independent PLA<sub>2</sub>*), el cual incluye los grupos VIA-1, VIA-2 y VIB-VIF; y (iv) grupo de las acetilhidrolasas del factor activador de plaquetas (PAF-AH, del inglés PAF *acetylhydrolase*), el cual incluye los grupos VIIA-VIIB y VIIIA-VIIIB (Burke & Dennis, 2009a; Sun *et al.*, 2010; Chakraborti, 2003). El mecanismo general de activación de la PLA<sub>2</sub> involucra su translocación a la región perinuclear y a las membranas del retículo endoplasmático, donde además colocaliza con diversas enzimas claves en el metabolismo del AA (LOX, COX, prostaglandinas -PG, del inglés *prostaglandins*- y leucotrienos sintetasas), permitiendo así que se desencadenen vías metabólicas que culminan en la generación de potentes mediadores de la inflamación (Rajakariar *et al.*, 2006; Burke & Dennis, 2009b; Balsinde *et al.*, 1998). En los últimos años se ha descubierto una importante conexión entre estas enzimas y el estrés oxidativo (Walters *et al.*, 2011; Balboa & Balsinde, 2006; Taha *et al.*, 2012; Holinstat *et al.*, 2011; Adibhatla & Hatcher, 2008).

Se cuenta con abundante evidencia acerca de la participación de las PLA<sub>2</sub> en las enfermedades neurodegenerativas relacionadas con la acumulación de Fe.

Es sabido que varios desórdenes neurodegenerativos con acumulación neuronal de Fe en el cerebro (NBIA, del inglés *neuronal brain iron accumulation*) se asocian con deficiencias en la vía de señalización de la PLA<sub>2</sub>. En esta patología se han reportado mutaciones en el gen PLA2G6 el cual codifica para el Grupo VI PLA<sub>2</sub>, el cual es independiente del calcio (Morgan *et al.*, 2006). Aunque el rol fisiológico de las PLA<sub>2</sub> en la regulación de las funciones de las células neuronales y de la retina no ha sido completamente dilucidado aún, cada vez hay más evidencias que sugieren que están involucradas en la señalización mediada por receptor y las vías transcripcionales que conectan los eventos oxidativos con la respuesta inflamatoria que subyace en varias enfermedades neurodegenerativas (Sun *et al.*, 2007). Estudios previos también han revelado el importante rol de las isoformas cPLA<sub>2</sub>, iPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub> en la modulación de las funciones excitatorias neuronales, de la respuesta inflamatoria y, como se mencionó anteriormente, en los desórdenes neurológicos de la niñez asociados con la NBIA, respectivamente (Farooqui *et al.*, 2006; Morgan *et al.*, 2006; Moses *et al.*, 2006; Svensson *et al.*, 2005). Varios subgrupos de la isoforma sPLA<sub>2</sub> se han encontrado implicados en la regulación de distintos mRNA durante la degeneración retiniana (RD, del inglés *retinal degeneration*) inducida por luz (Tanito *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Además, resultados obtenidos por distintos grupos sugieren que el incremento en la liberación de AA se encuentra involucrado en la patogénesis de la RD (Kashiwagi *et al.*, 2000; Wang & Kolko, 2010).

El grupo de las cPLA<sub>2</sub> comprende enzimas citosólicas de alto peso molecular (85 kDa) que se encuentran de manera ubicua en las células. Estas isoformas tienen características que hacen pensar que se encuentran asociadas con cascadas de señalización activadas por receptor. Por un lado, uno de los

requerimientos para activarse es su fosforilación en el residuo Serina 505 (Burke & Dennis, 2009a; Burke & Dennis, 2009b; Chakraborti, 2003; Ghosh *et al.*, 2006; Kishimoto *et al.*, 2010; Mariggio *et al.*, 2006; Nicotra *et al.*, 2005). La isoforma cPLA<sub>2</sub> puede ser fosforilada en este residuo por las proteínas quinasas reguladas por señal extracelular [ERK 1/2, del inglés, **extracelular signal-regulated kinases**], y también llamadas p42/p44 MAPK (del inglés **mitogen-activated protein kinases**)] o por la p38 MAPK. Otros sitios de fosforilación de la cPLA<sub>2</sub> han sido descritos para la proteína quinasa C, la proteína quinasa A y la calcio-calmodulina quinasa II, pero solo la fosforilación llevada a cabo por las MAPK conlleva a un importante aumento de su actividad. Además, cuando se activa la cPLA<sub>2</sub>, transloca desde el citosol a la membrana nuclear, a la membrana del retículo endoplasmático o la del Golgi (fracción de membranas), a través de un mecanismo dependiente de calcio. Esta translocación está mediada por el dominio N-terminal que posee (CaLB, del inglés *Ca<sup>2+</sup> lipid-binding*) y un dominio catalítico que contiene en su sitio activo residuos de Serina 228 y Serina 549. Este dominio se encuentra presente en otras proteínas que también translocan a la fracción de membranas. Por último, esta enzima parece tener preferencias por aquellos PL que contienen AA en la posición sn-2. Se ha descubierto que esta enzima tiene un dominio con el cual interactúa con el fosfatidilinositol-4,5-bifosfato, interacción que podría facilitar la activación de la enzima. En cuanto a las funciones de la isoforma cPLA<sub>2</sub>, uno de los roles más importantes que cumple es en el campo de la señalización, particularmente en la iniciación del metabolismo del AA (Balsinde *et al.*, 1995; Burke & Dennis, 2009a; Schaloske & Dennis, 2006; Kodavanti, 2011; Perez-Chacon *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2010; Taha *et al.*, 2012; Walters *et al.*, 2011).

Por otro lado, las iPLA<sub>2</sub> conforman un grupo de enzimas de localización citosólica y comparten ciertas características con la sPLA<sub>2</sub> y otras con la cPLA<sub>2</sub>. Al igual que las isoformas sPLA<sub>2</sub>, las iPLA<sub>2</sub> no parecen tener especificidad de sustrato por los PL que contienen AA y no parecen estar sujetas a modificaciones covalentes postraduccionales, mientras que comparten el tamaño, la localización intracelular y, tal vez, los mecanismos catalíticos con las isoformas cPLA<sub>2</sub>. Una característica única de las iPLA<sub>2</sub>, además de su independencia de Ca<sup>2+</sup>, es que contienen 8 motivos anquirina en la mitad N-terminal de la molécula, lo cual permitiría la oligomerización de los monómeros para llevar a cabo la acción catalítica, o bien la unión de esta isoforma a las membranas celulares, particularmente a la del retículo endoplasmático (Kolko *et al.*, 2007; Kolko *et al.*, 2009; Winstead *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2009). La función más reconocida para las iPLA<sub>2</sub> es su contribución para mantener la homeostasis de las membranas celulares, trabajando de manera conjunta con la familia de la AT en una tarea que ha sido denominada *house-keeping* (Balsinde *et al.*, 1995; Burke & Dennis, 2009a; Schaloske & Dennis, 2006). La expresión de las iPLA<sub>2</sub> también se ha relacionado con la proliferación de las células del RPE durante la RD asociada con la AMD (Kolko *et al.*, 2009). La peroxidación lipídica en membranas y lipoproteínas es un fenómeno común que se presenta no solo luego de un evento de estrés oxidativo, sino que también ocurre bajo condiciones normales y se halla controlada por la acción conjunta de diversas enzimas (como por ejemplo, las PLA<sub>2</sub> y las AT) y de sistemas de protección no enzimáticos (como es el caso de los antioxidantes como la vitamina C) que tiene la célula. De todas maneras, la peroxidación lipídica se ve incrementada cuando la producción de radicales libres y otros pro-oxidantes supera la capacidad antioxidante que posee el tejido.

Dentro de las PLA<sub>2</sub>, se cree que las isoformas iPLA<sub>2</sub> juegan un rol en la reparación de las membranas oxidadas (Ong *et al.*, 2010; Kolko *et al.*, 2009; Kinsey *et al.*, 2005). Un sustento de esta hipótesis es el ejemplo de la glutatión peroxidasa, la cual puede detoxificar efectivamente de los FA peroxidados aunque solo después de que estos han sido liberados por la PLA<sub>2</sub>. A su vez, la isoforma iPLA<sub>2</sub> que se encuentra localizada en el retículo endoplasmático es inactivada por los agentes oxidantes mediante un mecanismo que involucra la oxidación en grupos sulfhidrilo, dando origen a un círculo que aumenta cada vez más el grado del daño provocado (Song *et al.*, 2006).

La sPLA<sub>2</sub> es una subclase importante y creciente de la superfamilia de las PLA<sub>2</sub>. Las enzimas comprendidas en este grupo son de bajo peso molecular (14 kDa) con una estructura terciaria muy rígida, con 5 a 8 puentes disulfuro, los cuales les confieren estabilidad contra la proteólisis y resistencia a la desnaturalización, ambos eventos muy probables debido a su localización generalmente extracelular. No demuestra gran selectividad por los FA *in vitro* pero requiere concentraciones milimolares de Ca<sup>2+</sup> para su actividad enzimática. Debido a su estructura y ubicación, las isoformas sPLA<sub>2</sub> son las responsables de la hidrólisis de los PL presentes en las membranas celulares y lipoproteínas plasmáticas, además de la modulación de PL del medio extracelular para producir FA libres y lisoPL, ambos importantes segundos mensajeros en la señalización celular y en la traducción de señales. A la fecha se han identificado en seres humanos seis isoformas de la sPLA<sub>2</sub>, las cuales han sido clasificadas en diferentes grupos (IB, IIA, IID, IIE, V y X), dependiendo de la estructura primaria caracterizada por el número y la posición de los residuos de cisteína (Schaloske & Dennis, 2006).

Uno de los roles conocidos de la isoforma sPLA<sub>2</sub> es el importante papel que juega en varias enfermedades inflamatorias. La primera evidencia al respecto se describió para la isoforma sPLA<sub>2</sub> Grupo IIA, la cual se encuentra presente a altas concentraciones en el fluido sinovial de pacientes con artritis reumatoidea (Seilhamer *et al.*, 1989). Hallazgos posteriores revelaron que la isoforma sPLA<sub>2</sub> es una amplificadora potencial de las cantidades de AA liberado por la isoforma cPLA<sub>2</sub> (Kolko *et al.*, 2003; Murakami & Kudo, 2004). Entre las diferentes isoformas de la sPLA<sub>2</sub>, las pertenecientes al Grupo X se han propuesto como poseedoras de actividad anti-inflamatoria (Curfs *et al.*, 2008). En algunos estudios se ha demostrado que, cuando la cPLA<sub>2</sub> se activa, regula la transcripción de la proteína COX-2 y de la sPLA<sub>2</sub>, la cual, a su vez, también activa la transcripción de la COX-2 (Balboa *et al.*, 2003), lo cual sugiere la existencia de un *cross-talk* particular entre estas dos enzimas. También se han realizado estudios sobre la regulación de la isoforma secretoria del Grupo IIA de la PLA<sub>2</sub> y su participación en la apoptosis neuronal durante la isquemia cerebral (Adibhatla & Hatcher, 2010; Yagami *et al.*, 2002).

Recientemente, se ha descubierto una clase de PLA<sub>2</sub> que se denominó PAF-AH, la cual se cree es otro buen candidato para reparar los PL modificados por oxidación de la membrana. Estas enzimas catalizan la hidrólisis de la unión éster del carbono sn-2 de PAF y de los PL pro-inflamatorios relacionados, atenuando así su bioactividad. Se les conoce, además, la función de frenar la liberación del factor PAF de las células inflamatorias y eliminar los residuos de FA modificados por oxidación y las lipoproteínas. Hay, al menos, 4 isoformas intracelulares de PAF-AH descubiertas a la fecha.



Varias clases de factores de transcripción se han estudiado en mamíferos, en relación con la respuesta frente al estrés oxidativo y a la inflamación, dos de los cuales son el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B, del inglés *nuclear factor kappa B*) y la proteína activadora-1 (AP-1, del inglés *activator protein 1*). Se ha demostrado que regulan la expresión de genes cuyos productos tienen actividad antioxidante (Cindrova-Davies *et al.*, 2007; Oeckinghaus *et al.*, 2011). Por otro lado, se cuenta con resultados que indican que el NF- $\kappa$ B ejerce un control transcripcional sobre la PLA<sub>2</sub> y la COX-2 (Lee *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2013). También se ha demostrado que el estrés oxidativo provoca un aumento de la síntesis de la NPD1 (Mukherjee *et al.*, 2004; Bazan, 2006a) y que esta inhibe la transcripción del NF- $\kappa$ B y de otros genes promotores de la apoptosis, induciendo la expresión de un conjunto de genes neuroprotectivos durante eventos de estrés oxidativo (Bazan 2006a; Farooqui *et al.*, 2007b).

En esta tesis doctoral se procedió al estudio y caracterización de la vía de la PLA<sub>2</sub> en retinas bovinas expuestas a injuria oxidativa inducida por Fe<sup>2+</sup>, con la finalidad de dilucidar parte de los eventos de señalización lipídica implicados en los procesos de neurodegeneración que se producen no solamente en la AMD sino en varias patologías que se han vuelto moneda común en nuestra sociedad. En virtud de que la AMD es una de las primeras causas de disminución de la visión a nivel mundial, es fundamental contribuir al esclarecimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en esta patología con la esperanza de que esto conlleve al descubrimiento futuro de nuevas estrategias terapéuticas. Por último, al tener la retina tantas similitudes con el SNC, todo descubrimiento sobre este tejido puede ser útil para el entendimiento de otras patologías neurodegenerativas.

En las últimas décadas se ha revalorizado la función que cumplen los lípidos en las vías de señalización y, a su vez, en distintas patologías. Queda un amplio camino por recorrer en la comprensión de la AMD y, en particular, del rol de los mediadores lipídicos generados por acción de las PLA<sub>2</sub> ya que las posibles vías desencadenadas a partir de su accionar son varias, y todas muy complejas. Esto se verá en base a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis.

## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis fue estudiar el rol de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> y su participación en los eventos moleculares subyacentes gatillados por estrés oxidativo inducido por Fe.

Los objetivos específicos fueron:

- ☞ Analizar y caracterizar un modelo experimental *in vitro* de AMD, utilizando retinas bovinas incubadas en condiciones de sobrecarga de Fe.
- ☞ Caracterizar el estado de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> en el modelo en estudio.
- ☞ Estudiar la interacción de las isoformas de la PLA<sub>2</sub> con la vía de la COX-2 activada durante eventos de estrés oxidativo desencadenados en el modelo de AMD.
- ☞ Estudiar la interacción de las isoformas de la PLA<sub>2</sub> con las vías de señalización activadas durante eventos de estrés oxidativo, tales como la vía de las MAPK y del factor de transcripción NF-κB.
- ☞ Evaluar la interacción de las isoformas de la PLA<sub>2</sub> con los ciclos de acilación llevados a cabo por las AT.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Modelo experimental.

Para la realización de la presente tesis doctoral, el modelo experimental utilizado consistió en la incubación de retinas bovinas aisladas con distintos agentes oxidantes, tales como el  $\text{FeSO}_4$  o el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . En este sistema experimental se trató de mimetizar los efectos deletéreos que se producen en pacientes con AMD (Dunaief *et al.*, 2005; Dunaief, 2006; Hadziahmetovic *et al.*, 2011a; Hahn *et al.*, 2004; He *et al.*, 2007; Kell, 2010).

En todos los experimentos se utilizaron retinas bovinas obtenidas de ojos provenientes de un matadero local. Los ojos fueron enucleados por personal idóneo y conservados en hielo y oscuridad hasta el momento de la disección (Giusto & Bazan, 1979a; Giusto & Bazan, 1979b).

### 2. Materiales.

#### 2.1. Reactivos.

Los reactivos utilizados para el desarrollo de esta tesis fueron:

- 1-Palmitoil-2-[ $^{14}\text{C}$ ]araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina (38,0 mCi/mmol, [ $^{14}\text{C}$ ]PAPC), 1-[ $^{14}\text{C}$ ]palmitoil-2-[ $^{14}\text{C}$ ]palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina (111,0 mCi/mmol, [ $^{14}\text{C}$ ]DPPC), [ $^{14}\text{C}$ ]oleoil-CoA (54,4 mCi/mmol) y [ $^3\text{H}$ ]ácido araquidónico (79,90Ci/mmol, [ $^3\text{H}$ ]AA) fueron obtenidos de New England Nuclear-Dupont (Boston, MA, Estados Unidos).

- 2-Mercaptoetanol, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético (EGTA), ácido 2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES), adenosina 5'-trifosfato (ATP), aprotinina, azul de

bromo fenol, bromuro de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium (MTT), CaCl<sub>2</sub>, dimetilsulfóxido (DMSO), ditioneitol (DTT), dodecil sulfato de sodio (SDS), fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), leupeptina, MgCl<sub>2</sub>, nonidet P-40 (NP-40), NaVO<sub>4</sub>, pepstatina, persulfato amónico, proteína A sefarosa, sacarosa, seroalbúmina bovina (BSA), Tris, Tritón X-100, yodo y ácido tiobarbitúrico (TBA) fueron obtenidos de Sigma–Aldrich (St. Louis, MO, Estados Unidos).

- *Kit* comercial para determinación de proteínas Bio-Rad Protein Assay, acrilamida, bisacrilamida, de Bio-Rad Laboratories (Estados Unidos).

- FeSO<sub>4</sub>, KCl, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, de J.T. Baker (Estados Unidos).

- Sílica gel 60 H y sílica gel 60 G, de Merck (Alemania).

- Glicerol, de Cicarelli (Argentina).

- Nitrógeno y carbógeno, de AGA (Argentina).

- Glucosa, de Mallinckrodt (Estados Unidos).

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de Química Industrial Bahiense (Argentina).

- Tolueno, cloroformo, metanol (MeOH), acetona, amoniaco, xilol, benceno, dioxano, ácido acético, de Científica Nacional (Argentina).

- Tween 20, ECL Prime, de Amersham-GE Healthcare (Reino Unido).

- Placas radiográficas X-Omat AR, de Eastman Kodak Company (Estados Unidos).

- Membranas de difluoro de polivinilideno (PVDF) para transferencia Western Immobilon-P (0,45 µM) de Millipore Corporation (Temecula, CA, Estados Unidos).

- Leche en polvo descremada Svelty, de Nestlé (Argentina).

- Centelleador Preblended Dry Fluor 2a70, de Research Products International Corp. (Estados Unidos).

- Anticuerpos anti-Bax (N-20) de conejo policlonal, anti-Bcl-2 (N-19) de conejo policlonal, anti- $\beta$ -tubulina de conejo policlonal, anti-calnexina (H-70) de conejo policlonal, anti-citocromo C –Cyt-C, del inglés **cytochrome C**– (H-104) de conejo policlonal, anti-fosfo-Thr180/Tyr182-p38 de conejo policlonal, anti-fosfotirosina – pTyr, del inglés **phosphotyrosine**- (PY20) de conejo policlonal, anti-pTyr (PY99) de ratón monoclonal, anti-fosfo-Tyr204-ERK1/2, anti-gliceraldehido-3-fosfatodehidrogenasa –GAPDH, del inglés **glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase**- (A-3) de ratón policlonal, anti-grupo V PLA<sub>2</sub> (T-20) de cabra policlonal, anti-NF- $\kappa$ B p50 (H-119) de conejo policlonal, anti-NF- $\kappa$ B p65 (A) de conejo policlonal, anti-ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares (hnRNP, del inglés **heterogeneous nuclear ribonucleoproteins**) A1 (4B10) de ratón monoclonal, inmunoglobulina (Ig) G policlonal de bovino anti-cabra conjugado con peroxidasa de rábano (HRP, del inglés **horseradish peroxidase**), IgG policlonal de cabra anti-conejo conjugado con HRP, IgG policlonal de cabra anti-ratón conjugado con HRP, IgG1 de cabra anti-ratón conjugado con HRP, IgG2a de cabra anti-ratón conjugado con HRP, IgG2a policlonal de conejo anti-ERK2, inhibidores de la PLA<sub>2</sub> (araquidonoil trifluorometil cetona –ATK, del inglés **arachidonoyl trifluoromethyl ketone**–, bromoenol lactona –BEL, del inglés **bromo-enol lactone**– e YM 26734), fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, Estados Unidos).

- El anticuerpo policlonal de conejo anti-COX-2 fue obtenido de Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, Estados Unidos).

- El anticuerpo policlonal de conejo anti-cPLA<sub>2</sub> (Ser505) y el inhibidor de las proteínas quinasas de quinasas activadas por mitógenos –MAPKK, del inglés **mitogen-activated protein kinase kinase**, también llamadas MEK (del inglés

*mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase kinase*), 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio]butadieno (U0126)– fueron obtenidos de Cell Signaling Technology (Boston, MA, Estados Unidos).

- Anticuerpo biotinilado anti-cabra IgG (H+L) (BA-5000), de Vector Laboratories (Estados Unidos).
- HCl, de Carlo Erba (Italia).
- *Kit* comercial para determinar la actividad de la enzima lactato deshidrogenasa, *LDH-P UV AA*, gentilmente donado por Wiener Lab. (Argentina).

Todos los demás reactivos y químicos utilizados fueron de la más alta pureza disponible.

## 2.2. Equipamiento.

- Homogeneizador de vidrio con vástago de teflón Thomas Scientific.
- Medidor de pH Altronix, modelo TPX I.
- Fuente de alimentación para electroforesis Bio-Rad, modelo Power Pack Basic.
- Cuba para electroforesis vertical Bio-Rad, modelo Mini-Protean II.
- Cámara de transferencia Bio-Rad, modelo Mini Trans-Blot.
- Centrífuga Beckman, modelos Optima TLX y J2-21.
- Rotores JA-21 y TLA 100.4, Beckman.
- Espectrofotómetro Jasco, modelo V-630.
- Cubetas de vidrio y cuarzo Coler-Parmer Instrument Co.
- Contador de centelleo líquido LKB-Wallac, modelo 1214 Rackbeta.
- Heladera LG.
- Vórtex Mistral.

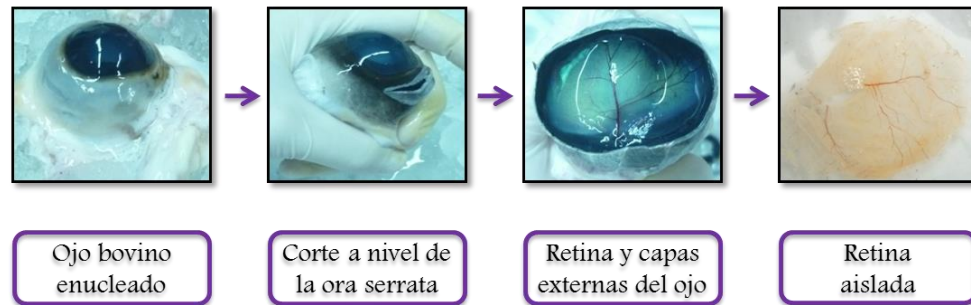
- Balanza de precisión Sartorius, modelo 2006 MP.
- Concentrador evaporador Meyer EVAP Organomotion, modelo 111.
- Microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415 R.
- Centrífuga de mesa Beckman, modelo TJ-6.
- Estufa Köttermann, modelo 2712.
- *Freezer* de -20 °C Gafa, modelo FGV 1650.
- *Freezer* de -80 °C Forma Scientific, modelo 8423.
- Baño termostatzado con agitación horizontal Thermo Electron Corporation.

### 3. Métodos

#### 3.1. Obtención de las retinas.

La disección de las retinas se realizó de acuerdo con un método previamente validado en el laboratorio (Salvador & Giusto, 1998) (**Esquema 11**). En primer lugar, se realizó un corte a nivel de la ora serrata del ojo (límite anterior de la retina). De esta manera, se eliminó la porción anterior del ojo (cámara anterior, cristalino y cámara posterior). Luego se invirtió suavemente la copa del ojo, de manera de vaciarla para descartar el humor vítreo. Mediante un suave lavado utilizando una pizeta con solución salina fisiológica (PSS, del inglés *physiological saline solution*), se desprendió la retina de las capas más externas del ojo, es decir, el RPE, la coroides y la esclerótica. La retina quedó de esta manera suspendida del nervio óptico, debiéndose cortar el mismo para separarla definitivamente del resto de las estructuras del ojo. En los casos en que no fue posible lograr el desprendimiento de la retina mediante el uso de PSS, se utilizó una espátula para desprender la retina de la capa del RPE.





Esquema 11: Protocolo de disección de la retina.

### 3.2. Modelo de estrés oxidativo.

#### 3.2.1. Incubación de las retinas.

En todas las situaciones experimentales que se describen a continuación, se procedió a incubar las retinas, diseccionadas –según se describió anteriormente– en *buffer* de Locke -LB, del inglés **Locke's Buffer**- (NaCl 154 mM; KCl 5,6 mM; NaHCO<sub>3</sub> 3,6 mM; MgCl<sub>2</sub> 1mM; Glucosa 5 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,3 mM; HEPES 5 mM, pH 7,2) (Uranga *et al.*, 2007) a una temperatura de 37 °C, bajo una corriente constante de O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95:5, v/v) y durante diferentes períodos de tiempo (5, 60, 120 minutos). Las incubaciones se llevaron a cabo, según correspondiese, en presencia del agente inductor de daño y/o vehículo (situación control). En los casos así indicados, se realizó una preincubación de las mismas retinas en presencia de los distintos inhibidores y/o sus respectivos vehículos durante 30 minutos.

#### 3.2.2. Metal de transición: Fe.

El agente inductor de daño utilizado en el transcurso de esta tesis doctoral fue el Fe en estado ferroso (Fe<sup>2+</sup>). Se suministró este metal al tejido en forma de una solución de FeSO<sub>4</sub> preparada en agua ultrapura, según lo descrito previamente en el laboratorio (Uranga *et al.*, 2007), de manera de obtener

distintas concentraciones finales del metal en el medio de incubación (10, 25, 50, 200, 800  $\mu\text{M}$ ). La solución madre fue preparada de manera tal que la concentración final deseada en los tubos de incubación con las retinas se lograra por el agregado de un volumen menor o igual al 4 % del volumen total de buffer de incubación utilizado. La concentración de la solución madre utilizada en todos los experimentos realizados fue de 10 mM, la cual se preparó inmediatamente antes de su uso.

### 3.2.3. Agente oxidante: $\text{H}_2\text{O}_2$ .

A los fines comparativos y para poder evaluar el efecto del Fe en la inducción del estrés oxidativo también se utilizó  $\text{H}_2\text{O}_2$  como agente oxidante, el cual fue agregado de manera de obtener una concentración final igual a 0,5 mM en el medio de incubación. Se logró esta concentración mediante la preparación de una solución madre de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en agua ultrapura, según lo descrito previamente en el laboratorio (Uranga *et al.*, 2007) y de manera tal que la concentración final deseada en los tubos de incubación con las retinas se lograra por el agregado de un volumen menor o igual al 4 % del volumen total de *buffer* de incubación utilizado. La solución madre utilizada se preparó a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  comercial de 130 volúmenes, inmediatamente antes de su uso.

### 3.2.4. Inhibidores.

Los inhibidores utilizados para el desarrollo de la presente tesis doctoral fueron los siguientes:

- **U0126**: Inhibidor de proteínas MEK. Se preparó a partir de la droga comercial una solución madre de 20 mM en DMSO 100 %, a partir de la cual, en el momento de uso, se obtuvo una solución submadre de 1400  $\mu\text{M}$ . Al iniciar el

ensayo, se agregó al medio de incubación una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  de dicha submadre para obtener así una concentración del inhibidor en el medio de reacción de 10  $\mu\text{M}$  –también en este caso el volumen adicionado fue equivalente al 4 % del volumen final de *buffer* de incubación–.

• **ATK**: Inhibidor de la isoforma cPLA<sub>2</sub>. Se preparó una solución madre con una concentración de 1 mg/ml en DMSO 0,1 %. A partir de la misma, se procedió a tomar 62,4  $\mu\text{l}$  en el momento de incubación para agregar al medio de incubación –volumen menor o igual al 4 % del volumen final de *buffer* de incubación– y obtener, de esta manera, una concentración en medio de reacción de 50  $\mu\text{M}$ .

• **BEL**: Inhibidor de la isoforma iPLA<sub>2</sub>. Se preparó una solución madre con una concentración de 40 mM en DMSO 100 %. A partir de dicha concentración, en el momento del ensayo e inmediatamente previo a su uso, se preparó una solución submadre de 3500  $\mu\text{M}$  de la cual se procedió a tomar una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  –volumen menor o igual al 4 % del volumen final de *buffer* de incubación– que, al ser agregada al medio de incubación, nos permitió obtener una concentración en el medio de reacción de 25  $\mu\text{M}$ .

• **YM 26734**: Inhibidor de la isoforma sPLA<sub>2</sub>. Se preparó una solución madre con una concentración de 50 mM en DMSO 100 %. A partir de dicha solución e inmediatamente antes de su uso, se preparó una solución submadre de 1400  $\mu\text{M}$  de la cual se procedió a tomar una alícuota de 25  $\mu\text{l}$  –volumen menor o igual al 4 % del volumen final de *buffer* de incubación– que, al ser agregada al medio de incubación nos permitió obtener una concentración en el medio de reacción de 10  $\mu\text{M}$ .

Como se mencionó anteriormente, en el caso de los cuatro inhibidores, las retinas fueron preincubadas con el inhibidor durante un período de 30 minutos a 37 °C y, posteriormente, se indujo el insulto oxidativo mediante la incubación con el agente oxidante.

### 3.3. Obtención de las distintas fracciones subcelulares a partir de la retina.

Inmediatamente después de terminar las incubaciones, se procedió a retirar las retinas de los tubos de incubación y se las enjuagó con PSS para eliminar los restos de inhibidores y/o agentes oxidantes que pudiesen continuar actuando. Inmediatamente después, se procedió a homogeneizar las retinas siguiendo diferentes protocolos en función de las técnicas posteriormente utilizadas y los objetivos establecidos.

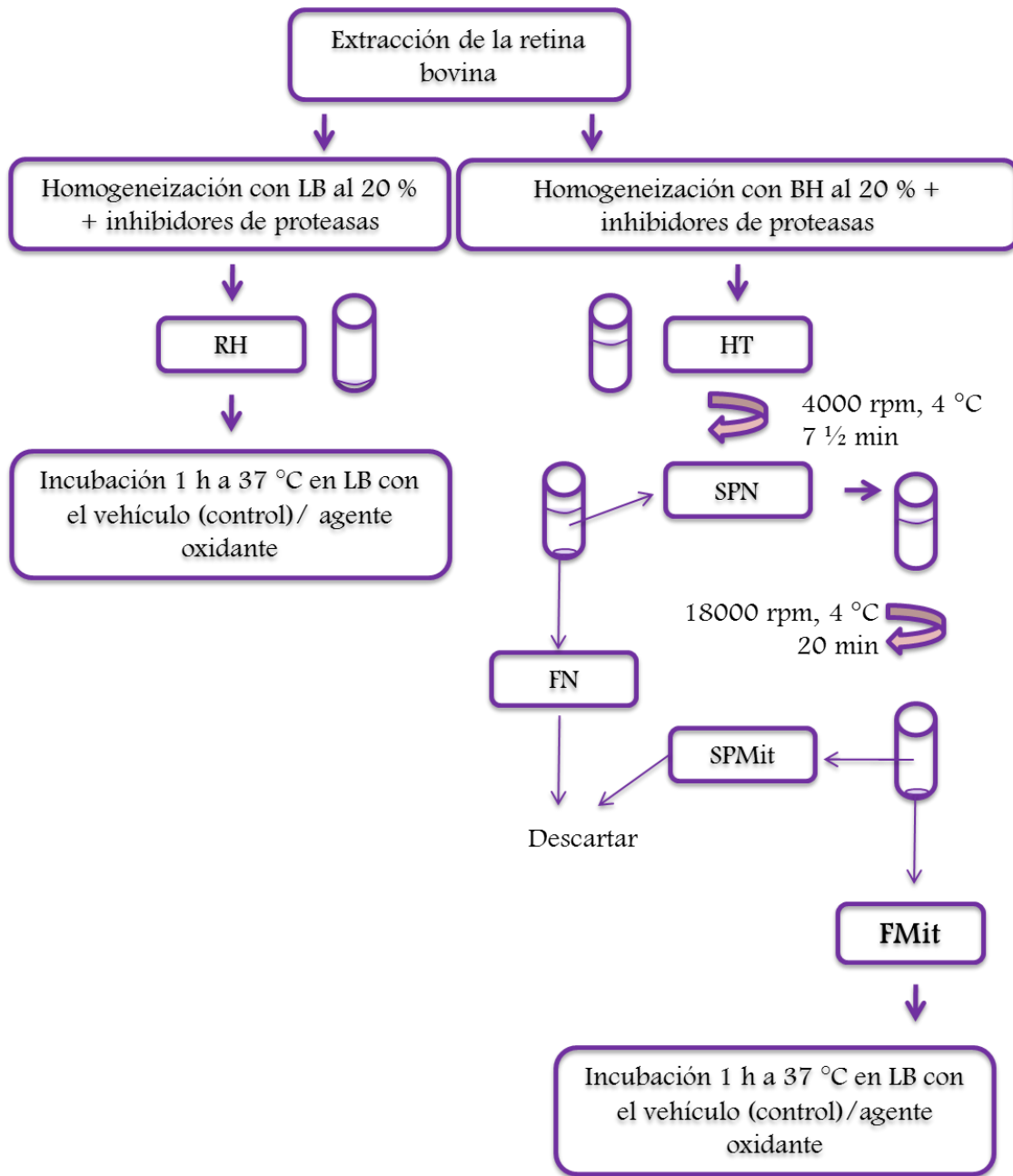
#### 3.3.1. Obtención del homogenado total.

Las retinas se homogeneizaron al 20 % (p/v) con un homogeneizador Thomas, en presencia de LB, con el agregado previo de inhibidores de proteasas (Leupeptina 2 µg/ml; Aprotinina 1 µg/ml; Pepstatina 1 µg/ml; PMSF 0,1 mM; DTT 1 mM), realizándose 10 toques ascendentes y descendentes a 700 rpm. Este protocolo permitió obtener un homogenado total (HT) de retina, el cual se sometió a una centrifugación a 3000 rpm durante 7 ½ minutos, en un rotor JA-21 y una centrífuga Beckman J2-21, obteniendo así un sobrenadante libre de *debris* celular para las técnicas de viabilidad mitocondrial, actividad antioxidante, dienos y trienos conjugados, sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico, *Western blot* (WB), ensayo de las AT y cuantificación de Fe. Durante todo el tiempo la muestra fue mantenida a 4 °C en hielo (**Esquema 12: Protocolo 1A**).



**Esquema 12: Protocolo 1A.** Obtención del homogenado total (HT) con LB a partir de las retinas previamente incubadas en presencia o ausencia del inhibidor, y luego de la incubación con el agente oxidante o su vehículo.

En los casos así indicados, las incubaciones con el agente oxidante se realizaron después de la homogeneización de la retina. Las muestras obtenidas de esta manera se utilizaron para las técnicas de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico y reducción de MTT (**Esquema 13: Protocolo 1B**).



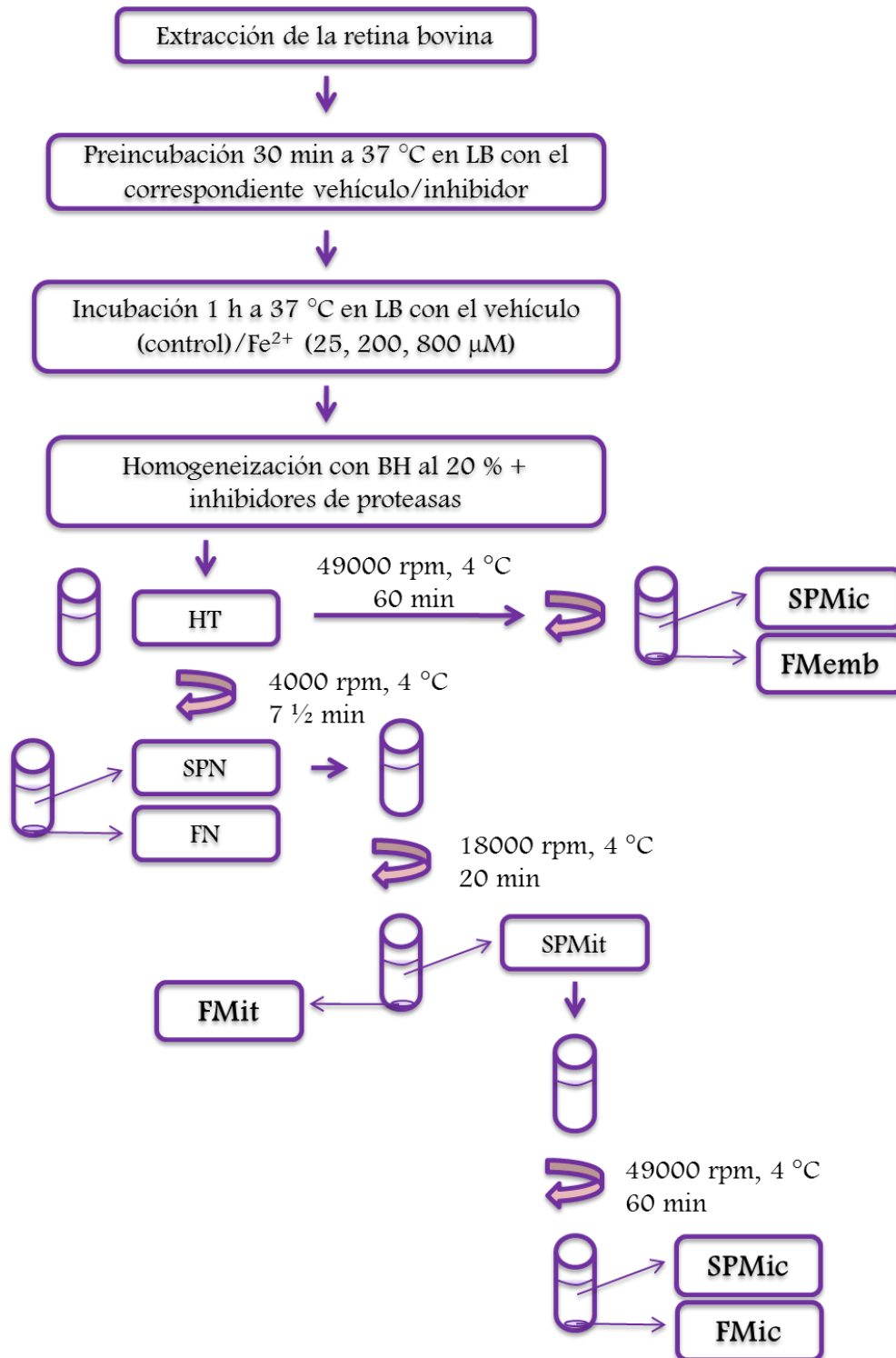
**Esquema 13: Protocolo 1B:** Obtención del homogenado de retina (RH) y de las fracciones mitocondriales (FMit) a partir de la retina. Posteriormente, el RH y la FMit fueron incubados en presencia o ausencia del agente oxidante o su vehículo.

### 3.3.2. Obtención de las distintas fracciones subcelulares de retina: Fracción mitocondrial, fracción microsomal, fracción de membranas, y citosol.

El protocolo de fraccionamiento subcelular se realizó según lo descripto anteriormente en nuestro laboratorio con algunas modificaciones (Salvador & Giusto, 2006). La homogeneización se llevó a cabo al 20 % (p/v) con un homogeneizador Thomas, en presencia de *buffer* de homogeneización para CNS (BH: EDTA 1 mM; Sacarosa 0,32 M; HEPES 10 mM pH 7,4), con el agregado previo de inhibidores de proteasas (Leupeptina 2 µg/ml; Aprotinina 1 µg/ml; Pepstatina 1 µg/ml; PMSF 0,1 µM; DTT 1 mM), realizándose 10 golpes ascendentes y descendentes a 700 rpm. Posteriormente, el volumen total de este homogenado fue sometido a una primera centrifugación a 4000 rpm (1800 x g) durante 7 ½ minutos, utilizando un rotor JA-21 y una centrifuga Beckman J2-21. De este modo, se obtuvieron dos fracciones: un *pellet* compuesto por la fracción nuclear (FN) impurificada, el cual se descartó, y el sobrenadante post-nuclear (SPN). El SPN obtenido de esta manera se centrifugó nuevamente a 18000 rpm (14000 x g) durante 20 minutos para obtener el *pellet* correspondiente a la fracción mitocondrial-sinaptosomal (FMit) y el sobrenadante post-mitocondrial (SPMit). Este sobrenadante fue centrifugado en esta oportunidad a 49000 rpm (100000 x g) durante 60 minutos para obtener la fracción microsomal (FMic) en el *pellet* y el sobrenadante post-microsomal (SPMic) o citosol (Cit). Estas dos últimas centrifugaciones fueron llevadas a cabo en un rotor TLA 100.4 en una ultracentrifuga Beckman Optima TLX. Con las fracciones obtenidas de este modo (FMit, FMic y Cit) se aplicaron las técnicas descriptas de manera más detallada en los siguientes apartados de esta tesis. Se realizó una variante de este procedimiento de centrifugación para obtener una fracción enriquecida en

membranas (FMemb) y su respectivo sobrenadante (Cit), que se utilizaron para llevar a cabo la determinación de los niveles de peroxidación lipídica. Para esto, se sometió al homogenado, obtenido con BH tal como se detalló anteriormente, a una centrifugación a 3000 rpm durante 7 ½ minutos, en un rotor JA-21 y una centrífuga Beckman J2-21, obteniendo así un sobrenadante libre de *debris* celular. Este sobrenadante fue sometido a una sola centrifugación a 49000 rpm (100000 x g) durante 60 minutos para obtener un *pellet* (la FMemb) y el respectivo Cit. Esta centrifugación fue llevada a cabo en un rotor TLA 100.4 en una ultracentrífuga Beckman Optima TLX. Durante todo el procedimiento la muestra se mantuvo a 4 °C en hielo (**Esquema 14: Protocolo 1C**).



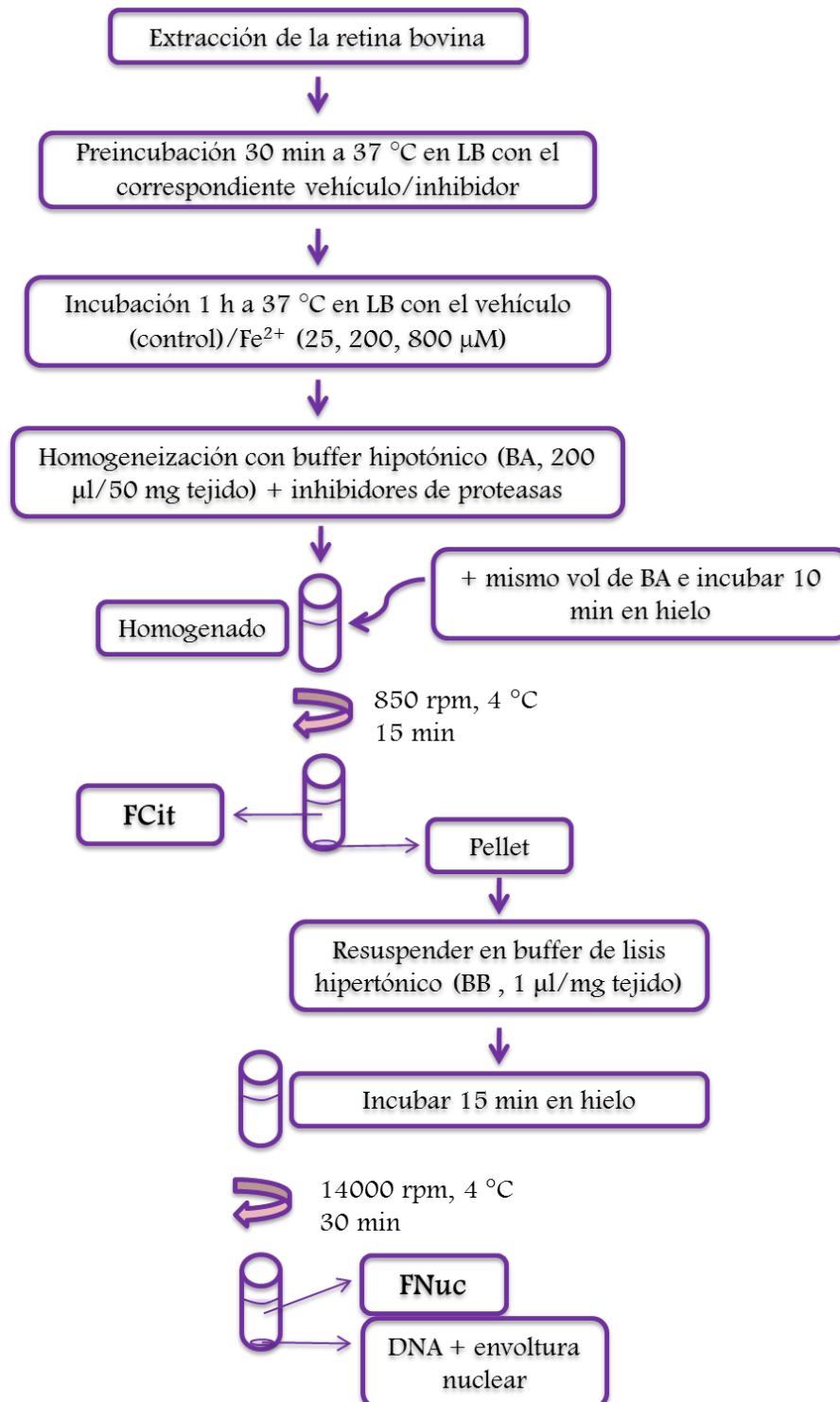


**Esquema 14: Protocolo 1C.** Obtención de las distintas fracciones subcelulares de la retina, luego de la incubación de esta en presencia o ausencia del respectivo inhibidor y posteriormente con el agente oxidante o su vehículo.

### 3.3.3. Obtención de las fracciones nucleares y citosólicas.

La fracción nuclear y la fracción citosólica utilizadas para el estudio de la localización de factores de transcripción fueron obtenidas siguiendo el criterio del método original desarrollado por Osborn *et al.* (1999), el cual fue adaptado a este tipo de tejidos según la versión descrita por Mackenzie y Oteiza (en Mackenzie & Oteiza, 2007; Salvador & Oteiza, 2011). Brevemente, para la obtención de extractos nucleares a partir de las retinas enteras, se procedió a una homogeneización del tejido con un *buffer* hipotónico [*buffer* A o BA: HEPES 10 mM, pH 7,9; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; KCl 10 mM; NP-40 0,10 % (v/v); DTT 0,5 mM; PMSF 0,2 M; leupeptina 2 µg/ml; aprotinina 1 µg/ml; pepstatina 1 µg/ml], la cual se llevó a cabo con un homogeneizador Thomas usando una proporción de 200 µl de BA cada 50 mg de tejido, realizándose 10 toques ascendentes y descendentes a 700 rpm. A este primer homogenado se le adicionó el mismo volumen de BA, se mezcló bien y se incubó durante 10 minutos en hielo. Se procedió luego a centrifugar durante 15 minutos a 850 x g a 4 °C, obteniéndose así la fracción citosólica (FCit) y el *pellet* correspondiente a la fracción nuclear cruda. La FCit se apartó para los ensayos correspondientes en tanto que el *pellet* se resuspendió en un *buffer* de lisis hipertónico [*buffer* B o BB: HEPES 10 mM, pH 7,9; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; NaCl 420 mM; EDTA 0,2 mM; Glicerol 25 % (v/v); DTT 0,5 mM; PMSF 0,5 mM; leupeptina 2 µg/ml; aprotinina 1 µg/ml; pepstatina 1 µg/ml] en una proporción de 1 µl/mg de tejido para liberar la fracción nuclear (FNuc) del ácido desoxirribonucleico (DNA, del inglés ***deoxyribonucleic acid***) y de la envoltura nuclear. Tras una incubación de 15 minutos en hielo y una centrifugación de 30 minutos a 14000 x g a 4 °C, se obtuvo la FNuc purificada. Todas estas centrifugaciones fueron llevadas a cabo en una centrífuga Eppendorf 5415R

**(Esquema 15: Protocolo 1D).** Tanto la FNuc como la FCit se conservaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su uso en los ensayos de WB.



**Esquema 15: Protocolo 1D:** Obtención de la fracción nuclear y la fracción citosólica para el estudio de los factores de transcripción a partir de retinas previamente incubadas en presencia o ausencia del respectivo inhibidor y posteriormente incubadas con el agente oxidante o su vehículo.

### 3.4. Caracterización del modelo de sobrecarga de Fe.

#### 3.4.1. Evaluación de la acumulación de Fe.

Para evaluar la incorporación de Fe que experimentan las retinas incubadas en presencia de las distintas concentraciones de este metal, luego de las respectivas incubaciones, las retinas fueron lavadas con PSS para eliminar los restos del metal, y homogeneizadas en LB –como se mencionó en el apartado 3.3.1 de esta misma sección–. Los homogenados fueron transportados inmediatamente al laboratorio Lanaqui, donde la Ing. Qca. Miryam Crespo y el Dr. Claudio Ferrarello continuaron con el procesamiento de las muestras. El tejido homogenizado fue agitado y vertido en forma de *slurry* al vaso reactor del microondas sobre balanza para medir la masa del volumen. Posteriormente, el homogenado fue digerido en un digestor de microondas MARS-5 (CEM Corporation, Estados Unidos), utilizando ácido nítrico pro-análisis Merck según la norma Standard Reference Material (SRM) 1577A, a una potencia de 400 W, a una presión máxima de 800 psi y a una temperatura máxima de 200 °C durante un período de 15 minutos. Las determinaciones fueron realizadas utilizando un Espectrómetro de Emisión Atómica por Plasma de Acoplamiento Inductivo (ICP-AES, del inglés *inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy*) Shimadzu 9000 Simultáneo de Alta Resolución, según la norma EPA 200.7. Los resultados se expresaron como ppm (mg Fe/Kg de HT de retina) (Salvador & Oteiza, 2011).

#### 3.4.2. Detección de Fe por la tinción de Perls.

Otra técnica utilizada para confirmar la presencia de Fe en el tejido fue la tinción de Perls que nos permitió evaluar, desde el punto de vista histoquímico, la presencia y, por ende, la incorporación de Fe en las retinas.

Como se describe más adelante en esta misma sección, en el apartado 3.5, tras haber sido incubadas con el agente oxidante y lavadas para eliminar excesos de Fe, las retinas fueron fijadas y preparadas para realizar distintas tinciones. En el caso particular de la tinción de Perls, se utilizaron cortes en portaobjetos no polarizados de la misma serie que aquellos a los que se les realizó la tinción de hematoxilina y eosina (H&E) –para evaluar la morfología del tejido–. Para esto, las muestras se sometieron a una desparafinación en xileno durante 30 minutos a 60 °C. Posteriormente, los cortes fueron rehidratados, sumergiéndolos durante 2 minutos en una batería de soluciones de etanol de concentraciones decrecientes (100°, 96° y 70°) y, por último, en agua. Luego, se incubaron los cortes con una solución de ferrocianuro de potasio al 10 % (p/v) durante 4 minutos en cámara húmeda. Inmediatamente después, se los incubó con la solución de trabajo [compuesta por partes iguales de ferrocianuro de potasio al 10 % (p/v) y ácido clorhídrico (HCl) al 2 % (v/v)] durante 10 minutos a temperatura ambiente, en cámara húmeda. En este paso, el ferrocianuro de potasio o prusiato amarillo en presencia de Fe<sup>3+</sup> se transforma en ferrocianuro férrico o azul de Prusia, de color azul, por acción del HCl que actúa como desencadenante de la reacción.



Después de lavar cuidadosamente los preparados con agua destilada, se aumentó la sensibilidad para la detección del Fe<sup>3+</sup> con una tinción de contraste utilizando una solución de rojo nuclear al 0,1 % (p/v) durante 45 segundos a temperatura ambiente, dando lugar a un suave color de contraste rosado. Posteriormente, se procedió a deshidratar nuevamente los cortes, sumergiéndolos durante 1 minuto en una batería de soluciones de etanol de concentraciones

crecientes (70°, 96° y 100°) y, por último, se los sumergió en xileno durante 1 minuto. Se montaron las muestras con Permount (Fisher Scientific) para posteriormente ser analizadas por microscopía con un microscopio Nikon Eclipse Ti-S (Hadziahmetovic *et al.*, 2011b; Loh *et al.*, 2009). En esta técnica, el Fe<sup>3+</sup> y la hemosiderina se observan teñidos de color azul en tanto que los núcleos adquieren una tonalidad roja debido al colorante de contraste utilizado.

### 3.5. Preparación del tejido para las técnicas de histoquímica e inmunohistoquímica.

Luego de haber sido incubadas en presencia o ausencia de Fe, las retinas se fijaron durante 24 horas en formaldehído al 10 % (v/v) preparado en una solución de *buffer* fosfato salino (PBS, del inglés ***phosphate buffer saline***). Posteriormente, los tejidos fueron lavados durante 15 minutos bajo agua corriente para luego ser deshidratados en una batería de soluciones de etanol de concentraciones crecientes (70°, 96° y 100°), durante un período de 90 minutos por cada concentración. A continuación, los tejidos fueron embebidos en xileno a temperatura ambiente durante 90 minutos y luego incluidos en parafina durante 3 horas a 60 °C en estufa. Se procedió posteriormente al armado y secado del taco, tras lo cual cada muestra fue cortada en una serie de cortes de 5 µm y transferida a vidrios histológicos polarizados y no polarizados para realizar las técnicas posteriormente descriptas. Los cortes obtenidos se dejaron asentar durante al menos 24 horas luego de lo cual fueron evaluados, seleccionándose aquellos que estaban correctamente fijados y que tenían una orientación apropiada para realizar las tinciones siguientes (Hadziahmetovic *et al.*, 2011b).

### 3.5.1. Análisis morfológico por medio de la tinción de hematoxilina & eosina.

A una serie de los cortes obtenidos (que habían sido correctamente fijados y que tenían una orientación apropiada) se les realizó, en primer lugar, la tinción de H&E para observar la histología de las retinas. Para ello, se utilizaron los cortes que habían sido fijados sobre portaobjetos no polarizados, los cuales fueron sometidos a una desparafinización en xileno durante 30 minutos a 60 °C en estufa. Posteriormente, para permitir una correcta hidratación, se los sumergió durante 2 minutos en una batería de soluciones de etanol de concentraciones decrecientes (100°, 96° y 70°) y, por último, en agua. Inmediatamente, se procedió a incubarlos en una solución de hematoxilina de Harris durante 20 segundos, se los lavó brevemente con agua corriente, y se los sumergió en una solución de etanol 70° durante 1 minuto. A continuación, los cortes fueron teñidos con eosina, el colorante de contraste, durante 30 segundos para proceder finalmente a deshidratarlos mediante una batería de soluciones de etanol de concentraciones crecientes (70°, 96° y 100°), sumergiéndolos durante 10 segundos en cada solución. Por último, los cortes se sumergieron en xileno durante 1 minuto y se los montó con Permount (Fisher Scientific). Los cortes teñidos de este modo se observaron y, posteriormente, se fotografiaron con un microscopio Nikon Eclipse Ti-S (Hadziahmetovic *et al.*, 2011b; Loh *et al.*, 2009).

### 3.5.2. Inmunohistoquímica.

Para realizar las tinciones de inmunohistoquímica (IHC, del inglés *immunohistochemistry*), se utilizaron cortes de tejidos de la misma serie que los empleados para las tinciones de H&E y Perls, pero que, a diferencia de los mencionados, se encontraban montados en portaobjetos polarizados. Estos cortes

fueron desparafinados en xileno durante 30 minutos a 60 °C y rehidratados sumergiéndolos en una batería de soluciones de etanol de concentraciones decrecientes (100°, 96° y 70°) y, por último, en agua durante 5 minutos en cada una, según lo previamente descrito por Facchinetti *et al.* (2010). Posteriormente, se incubaron en una solución de peróxido de hidrógeno al 3 % (v/v), preparada en etanol 96°, durante 15 minutos para eliminar la actividad de la Px endógena, la cual podría generar falsos positivos en los pasos posteriores. Se lavaron las muestras durante 15 minutos con PBS 1X e inmediatamente se bloquearon los sitios inespecíficos en BSA al 2 % en PBS 1X durante 30 minutos en cámara húmeda y a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes se incubaron durante toda la noche en cámara húmeda a 4 °C con el anticuerpo primario de cabra anti-sPLA<sub>2</sub> -Group V PLA<sub>2</sub> (T-20), sc 55887-. Para esto, se utilizó una dilución 1:50, preparada en BSA al 2 % en PBS 1X. Al finalizar la incubación, las muestras se lavaron en PBS 1X durante 15 minutos, y luego se incubaron durante un período de 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario biotinilado anti-cabra IgG (H+L) (BA-5000, Vector Laboratories). Este anticuerpo se utilizó en una dilución de 1:400 preparada en BSA al 2 % en PBS 1X. Nuevamente se lavaron los cortes en PBS 1X durante 15 minutos y luego se incubaron con el reactivo VECTASTAIN ABC (estresptavidina conjugada con peroxidasa, Vector Laboratories Inc.) durante 30 minutos. Posteriormente, se lavaron los cortes en PBS 1X durante 15 minutos. Paralelamente, se realizaron controles negativos en los que el anticuerpo primario se reemplazó por la IgG específica de isotipo. Luego se procedió a realizar la reacción de la inmunoperoxidasa, en la cual se utilizó como sustrato de dicha enzima, una solución de diaminobenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB, Sigma). La preparación de



este reactivo se realizó inmediatamente antes de que fuese utilizado, y la solución se filtró para evitar la presencia de partículas que, al momento de interpretar la señal, pudieran prestarse a confusión, dando resultados falsos positivos. La incubación con la solución de DAB se llevó a cabo durante un período de entre 0 a 10 minutos, y se procedió a frenarla sumergiendo los cortes en un recipiente con agua corriente, tras lo cual se los lavó con PBS 1X durante 2 minutos. Los tejidos se tiñeron suavemente con una solución de hematoxilina de Harris durante 2 minutos para obtener un contraste que permitiera apreciar mejor la tinción correspondiente a la isoforma sPLA<sub>2</sub>. Posteriormente, los cortes fueron deshidratados a través de una batería de soluciones de etanol de concentraciones crecientes (70°, 96° y 100°) y, por último, en xileno, sumergiéndolos durante un período de 5 minutos en cada una. Por último, las muestras fueron montadas con Permount (Fisher Scientific) y, posteriormente, analizadas con un microscopio Nikon Eclipse Ti-S.

### 3.6. Caracterización del estado metabólico de las retinas.

#### 3.6.1. Ensayo de reducción del MTT.

Dado el conocido efecto deletéreo del Fe sobre las mitocondrias (Keller *et al.*, 1997), la viabilidad mitocondrial y, por ende, la viabilidad de las células del tejido, se evaluó a través del ensayo de reducción del MTT –también conocido como test SDI, del inglés *succinate dehydrogenase inhibition test* o test de inhibición de la succinato deshidrogenasa–. La reducción metabólica del MTT de color amarillo a cristales intracelulares de formazán de color azul es realizada por la enzima mitocondrial succinato-formazán-deshidrogenasa, y es una medida de la capacidad reductora de la célula, independiente de los cambios en la integridad de la membrana plasmática. El método original fue desarrollado por Mosmann

(1983) y posteriormente modificado por Francois Denizot y Rita Lang (1986). El protocolo utilizado en esta tesis fue adaptado a partir del que ya había sido utilizado en nuestro laboratorio (Uranga *et al.*, 2007), el cual presenta algunas modificaciones con respecto a los métodos originales. Para realizar la determinación, el MTT fue disuelto en PBS estéril en una concentración de 5 mg/ml. Las retinas previamente incubadas con el agente oxidante y/o con los inhibidores, según se indica en cada caso particular, fueron homogeneizadas con LB –debido a que se encontraron interferencias con la metodología cuando la homogeneización se realizaba con BH, como consecuencia del alto contenido de sacarosa del mismo– y la reducción de MTT se determinó espectrofotométricamente a 570 nm. Para esto, una alícuota de 0,1 ml de HT se incubó durante 2 horas a 37 °C con agitación suave en oscuridad y en presencia de 10 µl de la solución de 5 mg/ml del reactivo de MTT (1:10, MTT:HT, v/v). Al finalizar el tiempo de incubación con MTT, se agregó *buffer* de solubilización [0,2 ml de SDS 20 % (p/v), pH 4,7] y se agitó vigorosamente para disolver los cristales de formazán. La cuantificación de la reducción de MTT se determinó espectrofotométricamente a 570 nm, restando el valor de la absorbancia a 650 nm correspondiente a proteínas y restos celulares. Los resultados fueron expresados como unidades arbitrarias (UA) o como porcentaje del valor control, según el caso, y se compararon con los valores obtenidos en la condición control.

### 3.6.2. Ensayo de la actividad antioxidante.

El radical estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH<sup>\*</sup>) es ampliamente utilizado para determinar la actividad o capacidad antioxidante de diferentes sistemas biológicos. El ensayo basado en el uso de este radical es un método rápido, simple y económico utilizado para estimar la actividad secuestradora de

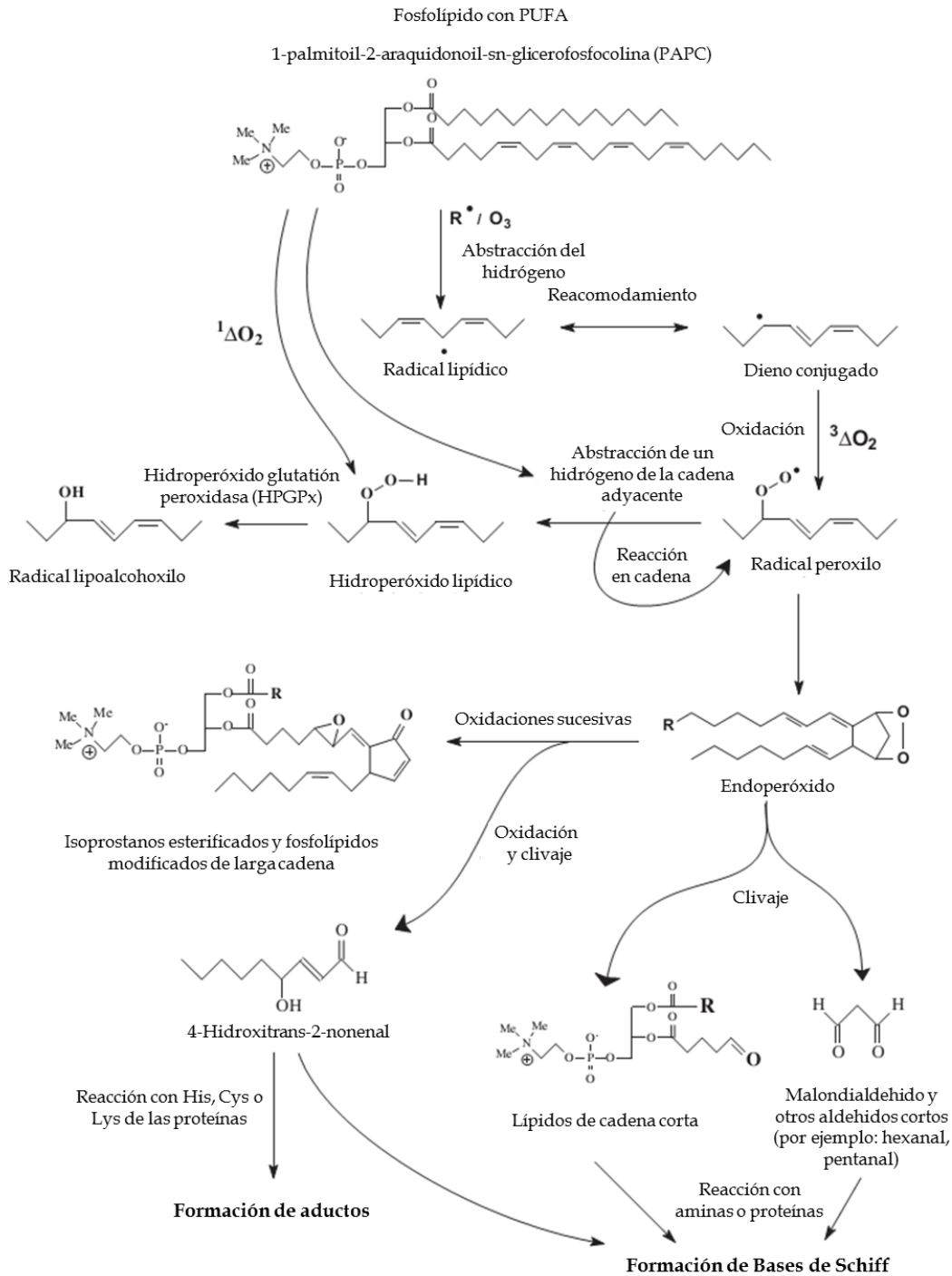
radicales libres que poseen los compuestos específicos o extractos naturales. El fundamento del ensayo es la capacidad de atrapar radicales o donar hidrógenos que tiene el DPPH<sup>•</sup>. Además, el mismo presenta en solución una intensa coloración violeta y un espectro de absorción característico, con un máximo de absorbancia a 520 nm de manera que su concentración se puede determinar espectrofotométricamente. La reducción del DPPH<sup>•</sup> provocada por un antioxidante o por otro radical implica una disminución en su absorbancia a 520 nm, producto de su conversión a DPPH reducido (DPPH). Anteriormente, se creía que el ensayo de DPPH involucraba una reacción de transferencia de un átomo de hidrógeno. Sin embargo, Foti *et al.* (2004) sugirieron que la reacción que tiene lugar corresponde a una transferencia de electrones. En el caso particular de esta tesis, esta técnica nos permitió medir la actividad antioxidante total de la muestra o del sistema. En el ensayo se determina la absorbancia inicial del DPPH<sup>•</sup> en solución en estado puro y se vuelve a determinar la misma una vez agregada a la solución de DPPH<sup>•</sup> una alícuota de la muestra. Por lo tanto, la capacidad antioxidante del sistema se evaluó mediante el agregado de una alícuota de 0,05 ml de HT de retinas obtenido con LB –las cuales fueron previamente incubadas en presencia del agente oxidante, como se mencionó con anterioridad– a 0,05 ml de solución de DPPH<sup>•</sup> (cuya concentración es 0,5 mg/ml). A esto, se le agregó 1 ml de MeOH y se agitó vigorosamente. La reacción fue seguida espectrofotométricamente a 520 nm. Los resultados se expresaron como UA de absorbancia y fueron comparados con la condición control.

### 3.6.3. Ensayos de dienos y trienos conjugados.

Los dienos y trienos conjugados se forman durante la reorganización de los dobles enlaces en el transcurso de las primeras fases de peroxidación de los LC- y

VLC-PUFA. En este proceso, un radical abstrae un hidrógeno del FA y se forma un radical centrado en el carbono, el cual rápidamente se reordena por lo que se desplaza un doble enlace hacia el carbono de un grupo metilénico anexo, con la consecuente formación de un “dieno conjugado” (**Esquema 16**), el cual absorbe energía en el espectro ultravioleta a 230-234 nm (Buege & Aust, 1978). Además, los radicales pueden dar origen directamente a hidroperóxidos de FA, los cuales, por acción de la glutatión peroxidasa de hidroperóxidos (HPGPx, del inglés *hydroperoxide glutathione peroxidase*), pueden convertirse en hidróxidos de FA. La formación de compuestos secundarios de oxidación a partir de los hidroperóxidos de los FA así como a partir de otros compuestos primarios de oxidación, lleva a un conjunto de numerosas especies químicas diferentes. Los trienos conjugados son compuestos secundarios formados por degradación de los peróxidos. Estos compuestos son preferentemente diacetonas etilénicas, alcadienales o cetodienos conjugados que tienen un máximo de absorbancia característico a 270 nm. La generación de estas especies fue evaluada mediante la determinación de las absorbancias a 234 nm (dienos) y a 270 nm (trienos), para lo cual se utilizó el HT de retinas obtenido con LB, tal como se describió en el apartado 3.3.1 de esta sección. A una alícuota de 0,05 ml de HT se le realizó una extracción de lípidos mediante el método de Folch *et al.* (1957), con 2 ml de cloroformo:MeOH (2:1, v/v). La muestra se particionó con 0,2 volúmenes de agua ultrapura y se centrifugó a 1000 x g durante 10 minutos en la centrífuga de mesa Beckman TJ-6. Se descartó la fase acuosa y se procedió a secar la fase orgánica bajo nitrógeno, formando un film. Se le agregó a cada muestra 2 ml de PSS, se vortexó vigorosamente durante 3 minutos y luego se sonicó durante 45 segundos de manera de obtener una suspensión homogénea de liposomas. Por

último, se leyó la absorbancia a 234 y 270 nm. Los resultados se expresaron como UA de absorbancia y fueron comparados con la condición control.



#### 3.6.4. Ensayo de TBARS.

En una fase posterior a la reacción de peroxidación de los FA se generan otros productos de peroxidación lipídica (véase **Esquema 16**), tales como el malondialdehído (MDA), 4-hidroxinonenal, entre otros. Esta reacción ocurre en un paso posterior a la formación de dienos y trienos conjugados. En la determinación de peroxidación lipídica por el ensayo de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS, del inglés *thiobarbituric acid-reactant substances*) se evalúa fundamentalmente la generación de MDA (Adamczyk *et al.*, 2006). Para esto se utilizó el HT de retinas obtenido con LB –ya que se encontraron interferencias con la metodología cuando la homogeneización se realizaba con BH debido al alto contenido de sacarosa del mismo– obtenido tal como se describió en el apartado 3.3.1 de esta sección. Se tomaron alícuotas de 0,1 ml de HT, a las cuales se les agregó inmediatamente 0,5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30 % (p/v) de manera de frenar el proceso de peroxidación enzimática al desnaturalizar las enzimas presentes en la muestra. Se agitó vigorosamente y a continuación se agregó 0,05 ml de HCl 5N y 0,5 ml de TBA al 0,75 % (p/v), luego de lo cual se procedió a agitar nuevamente. Tanto el TCA como el TBA fueron preparados en agua ultrapura y este último se preparó inmediatamente antes de su uso y se lo conservó protegiéndolo de la luz hasta el momento de agregarlo. Los tubos se taparon y fueron llevados a un baño hirviente durante 15 minutos. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 1000 x g durante 10 minutos en la centrifuga de mesa Beckman TJ-6 y se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 535 nm en el espectrofotómetro. Los resultados se expresaron como UA de absorbancia a 535 nm por mg de proteína [UA x mg proteína<sup>-1</sup>] o como porcentaje del valor

control, según el caso, y se compararon con los valores obtenidos en la condición control.

### 3.6.5. Ensayo de liberación de lactato-deshidrogenasa.

Otro marcador de daño oxidativo estudiado fue el aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática por medio de la medición de la liberación de la enzima lactato-deshidrogenasa (LDH, del inglés *lactate dehydrogenase*) al medio de incubación. Esta enzima intracelular es de localización citosólica y se libera al medio de incubación frente a un aumento de permeabilidad de la membrana plasmática. La actividad de la LDH se evaluó espectrofotométricamente utilizando el *kit* LDH-P UV AA (Wiener Lab.). Este método cinético se basa en la medición a 340 nm de la conversión de la forma reducida del dinucleótido de nicotinamida y adenina (NADH, del inglés *nicotinamide adenine dinucleotide*) a la forma oxidada (NAD<sup>+</sup>). Se tomaron alícuotas del medio en el que las retinas habían sido previamente incubadas en presencia del agente oxidante. Dichas alícuotas fueron sometidas a centrifugación para eliminar todos los restos de tejido que pudieran quedar. A partir del sobrenadante obtenido de este modo se realizó, de acuerdo con lo descrito en el inserto del *kit*, una dilución 1/12 (v/v) de la muestra en PSS de manera de obtener concentraciones de la enzima dentro del rango de linealidad determinado por el fabricante. Se procedió con dicha dilución adaptando el protocolo previamente descrito (Uranga *et al.*, 2007). A una alícuota de 33  $\mu$ l de la dilución se le agregó 1 ml del reactivo de uso. Se consideró este momento como el tiempo cero ( $t_0$ ) de la reacción y se registraron los valores de absorbancia a 340 nm a los 30, 90, 150 y 210 segundos a partir del  $t_0$ . Se calcularon los diferenciales de absorbancia, los cuales fueron promediados, multiplicados por el

factor de dilución y por el factor provisto por el fabricante para la temperatura de reacción utilizada (25 °C). Los resultados se expresaron como unidades por litro (U/L) y se compararon con los valores obtenidos en la condición control.

### 3.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y ensayos de WB.

Para los ensayos de WB, las distintas fracciones subcelulares de la retina fueron procesadas según fuese su estado, soluble o particulado. Las fracciones solubles, como por ejemplo, el HT, el Cit, las FNuc y las FCit, se trataron por el simple agregado de un volumen adecuado de *buffer* Laemmli 4X [Tris-HCl 0,25 M pH 6,8; SDS 8 % (p/v); glicerol 40 % (v/v); 2-mercaptoetanol 20 % (v/v); azul de bromofenol 0,05 % (v/v) como indicador del frente de corrida] (Laemmli 1970) y se calentaron en baño de agua a ebullición durante 5 minutos. En cuanto a las fracciones de membrana, como por ejemplo, la FMit y la FMic, estas fueron previamente solubilizadas con el agregado de 0,2 ml de agua ultrapura helada, en presencia de inhibidores de proteasas y luego se les adicionó un volumen adecuado de *buffer* Laemmli 4X. En todos los casos, posteriormente fueron calentadas en baño de agua a ebullición durante 5 minutos.

#### 3.7.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Cantidades equivalentes de proteínas de las distintas fracciones fueron separadas por electroforesis (30 µg de proteína/calle) en condiciones desnaturalizantes en geles homogéneos de poliacrilamida al 10 % con SDS (SDS-PAGE, del inglés *sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) (Laemmli, 1970). Paralelamente, se corrieron marcadores de peso molecular conocido. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (200 V) y amperaje variable durante aproximadamente 1 hora hasta observar la salida del



indicador del frente de corrida en el extremo opuesto del gel, utilizando *buffer* de corrida [Tris 25 mM pH 8,8; glicina 192 mM; SDS 0,1 % (p/v)].

### 3.7.2. WB.

#### 3.7.2.1. Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF.

A continuación, las proteínas de las muestras se transfirieron a una membrana de PVDF, utilizando una cámara de transferencia (Bio-Rad, modelo Mini Trans-Blot, Bio-Rad Life Science Group, California) durante 2 horas a amperaje constante (350 mA) y voltaje variable, embebiendo tanto la membrana como el gel en *buffer* de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 mM).

#### 3.7.2.2. Tratamiento de las membranas: bloqueo e incubaciones con anticuerpos.

Previo a la incubación con los anticuerpos de interés, las membranas de PVDF se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente (excepto que se indicase lo contrario) en *buffer* tris salino con *tween* 20 (TBS-T, del inglés **tris-buffered saline with tween 20**) [tris-HCl 20 mM pH 7,4; NaCl 150 mM; *tween* 20 0,1 % (p/v)] conteniendo 5 % (p/v) de leche descremada en polvo para bloquear sitios de ligado inespecífico de las membranas. Posteriormente, se lavaron las membranas en TBS-T durante 5 minutos, repitiendo este procedimiento 3 veces.

Luego se procedió a incubar las membranas ya bloqueadas con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios. Las diluciones de estos anticuerpos se prepararon en TBS-T conteniendo 0,5 % (p/v) de BSA, salvo especificación en contrario, y se indican, en cada caso, entre paréntesis. En todos los casos, los anticuerpos secundarios utilizados se encuentran conjugados a peroxidasa.

El anticuerpo primario anti-pERK [(1:500, v/v), E-4, sc 7383 o sc 81492] fue incubado durante 16 horas a 4 °C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del anticuerpo primario e inmediatamente fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-ratón (1:2000, v/v) durante un período de 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del mismo y finalmente ser incubadas con los reactivos de quimioluminiscencia.

Los anticuerpos primarios que se detallan a continuación fueron incubados durante 16 horas a 4 °C:

\* Anti-pp38 [(1:1000, v/v), Thr 180/Tyr 182, sc-17852-R],

\* Anti-COX-2, [(1:1000, v/v), Cayman 160107],

\* Anti-calnexina [(1:2000, v/v), H-70, sc 11397],

\* Anti-NF-κB p65 (A) [(1:500, v/v), sc 109],

\* Anti-NF-κB p50 [(1:500, v/v), H-119, sc 7178],

\* Anti-Bcl-2 [(1:500, v/v), N-19, sc-492],

\* Anti-Bax [(1:300, v/v), N-20, sc 493],

\* Anti-Cyt-C [(1:1000, v/v), H-104, sc 7159],

\* Anti-pcPLA<sub>2</sub> [(1:100, v/v), Ser505, cs 2831]. Este anticuerpo precisó de una serie de lavados diferente a lo previamente mencionado. En este caso en particular, después de la incubación con el anticuerpo primario, la membrana fue lavada 3 veces durante 5 minutos con TBS-T y 3 veces durante 5 minutos con TBS-T conteniendo 5 % (p/v) de leche descremada en polvo. Luego se realizó la

incubación con el anticuerpo secundario y se procedió a lavar dicho anticuerpo 3 veces durante 5 minutos con TBS-T conteniendo 5 % (p/v) de leche descremada en polvo y 3 veces durante 5 minutos con TBS-T. De esta manera, se logró aumentar la señal específica y disminuir la señal del fondo que interfería en la posterior visualización.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del mismo e inmediatamente fueron incubadas con el anticuerpo secundario anti-conejo (1:2000, v/v) durante un período de 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del mismo y finalmente ser incubadas con los reactivos de quimioluminiscencia.

El anticuerpo primario anti-Group V PLA<sub>2</sub> [(1:200, v/v), T-20, sc-55887] fue incubado durante 16 horas a 4 °C. Posteriormente, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del anticuerpo primario y posteriormente incubadas con anticuerpo secundario anti-cabra (1:2000, v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del mismo, y para, finalmente, ser incubadas con los reactivos de quimioluminiscencia.

El anticuerpo primario anti-ERK [(1:2000, v/v), c-16, sc-93; y anti-ERK c-14, sc-154] y el anticuerpo anti- $\beta$ -tubulina fueron incubados durante 3 horas a

temperatura ambiente. Luego, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del anticuerpo primario. Posteriormente, fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo (1:2000, v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente, tras lo cual las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del mismo y para ser finalmente incubadas con los reactivos de quimioluminiscencia.

Los anticuerpos primarios que se detallan a continuación fueron incubados durante 3 horas a temperatura ambiente:

- \* anti-GAPDH [(1:1000, v/v), A-3, sc-137179],
- \* anti-hnRNP A1 [(1:500, v/v), 4B10, sc 32301],
- \* anti-pTyr [(1:750, v/v); pY99, sc 7020 y pY20, sc 508]. A diferencia de pY20, la membrana utilizada para pY99 fue bloqueada durante 16 horas a 4 °C.

Luego de la incubación con el anticuerpo primario, las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del mismo y posteriormente fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-ratón (1:2000, v/v) durante 2 horas a temperatura ambiente. Seguidamente, las membranas fueron nuevamente lavadas 3 veces con TBS-T durante 5 minutos a temperatura ambiente para eliminar el exceso del mismo y para ser finalmente incubadas con los reactivos de quimioluminiscencia.

A continuación se detallan los anticuerpos secundarios utilizados:

- \* IgG-HRP policlonal de bovino anti-cabra, sc-2004.
- \* IgG-HRP policlonal de cabra anti-conejo, sc-2384.

- \* IgG-HRP policlonal de cabra anti-ratón, sc-2005.
- \* IgG1-HRP policlonal de cabra anti-ratón, sc-2969.
- \* IgG2a-HRP policlonal de cabra anti-ratón, sc-2970.

Para estudiar la presencia de la cPLA<sub>2</sub> activada se utilizó un anticuerpo específico policlonal dirigido contra la forma activa de esta enzima, fosforilada en el residuo serina 505, el cual no da reacción cruzada con la isoforma sPLA<sub>2</sub> ni con la isoforma iPLA<sub>2</sub>. Para estudiar la presencia de la sPLA<sub>2</sub> se utilizó un anticuerpo específico policlonal dirigido contra una región interna de la misma. Para estudiar la presencia de la enzima COX-2 se utilizó un anticuerpo específico policlonal dirigido contra una secuencia aminoacídica específica de la misma. Estas enzimas se evaluaron en las distintas fracciones subcelulares de la retina. Para determinar la pureza de estas fracciones se utilizaron distintos anticuerpos considerados marcadores de las mismas. Como marcadores citosólicos se utilizaron anticuerpos contra proteínas del citoesqueleto, como por ejemplo, la  $\beta$ -tubulina. Además, se utilizó un anticuerpo monoclonal que reconoce la secuencia completa de la enzima GAPDH, de localización citosólica. Como marcador de la fracción microsomal, se utilizó el anticuerpo policlonal anti-calnexina, proteína residente del retículo endoplasmático.

Se estudió, por otra parte, la fosforilación de las quinasas ERK1/2 con un anticuerpo monoclonal dirigido contra el residuo tirosina 204 fosforilado y los niveles totales de ERK2 fueron estudiados con un anticuerpo que reconoce específicamente a la proteína, fosforilada o no. El estudio de fosforilación en tirosinas se realizó con pY99 y pY20, dos anticuerpos que reconocen residuos de tirosinas fosforilados.

Se estudió también la fosforilación de las quinasas p38 utilizando un anticuerpo policlonal que reconoce una secuencia aminoacídica corta que contiene los residuos treonina 180 y tirosina 182 fosforilados.

Para estudiar el estado de la vía del factor NF- $\kappa$ B, se utilizaron anticuerpos contra las subunidades p50 y p65. En ambos casos, los anticuerpos reconocen secuencias N-terminal específicas de dichas proteínas. Para evaluar la pureza de la fracción nuclear y de la fracción citosólica, al determinar la localización del factor NF- $\kappa$ B, se utilizó el anticuerpo monoclonal que reconoce secuencias específicas de la proteína hnRNP, la cual se localiza en núcleo.

Se estudiaron también varias proteínas relacionadas con la muerte celular por apoptosis. Para esto, se utilizó un anticuerpo policlonal que reconoce, de manera específica, la secuencia completa de la proteína de la cadena de transporte de electrones, Cyt-C. Además, se utilizó un anticuerpo contra una de las proteínas claves en la regulación de la apoptosis, como lo es la Bcl-2. Este anticuerpo policlonal reconoce de manera específica el segmento N-terminal de dicha proteína anti-apoptótica. También se evaluó la expresión de una proteína pro-apoptótica, Bax, a través del uso de un anticuerpo policlonal contra un segmento N-terminal de dicha proteína.

### 3.7.2.3. Detección de la inmunorreactividad.

Tras la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios, las proteínas de interés fueron visualizadas luego de una incubación de las membranas con un *kit* comercial de quimioluminiscencia (ECL Prime) y tras exponerlas a placas autorradiográficas (Kodak X-Omat AR). Las bandas inmunorreactivas fueron cuantificadas con un programa de análisis de imágenes

(Image J, aplicación disponible libremente y de dominio público para el análisis y procesamiento de imágenes, desarrollada y mantenida por Wayne Rasband en el área Research Services Branch del National Institute of Mental Health, Estados Unidos).

#### 3.7.2.4. Detecciones alternativas sobre una misma membrana.

En aquellos casos en los que se realizaron determinaciones sucesivas sobre una misma membrana, esta fue sometida a un *stripping* de 30 minutos a 60 °C con agitación, incubando las mismas con *buffer* de *stripping* [Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2 % (p/v), 2-mercaptoetanol 50 mM). A continuación, las membranas fueron lavadas, por lo menos, 6 veces durante 5 minutos con TBS-T para eliminar los rastros de dicho *buffer*, y posteriormente se procedió a bloquear nuevamente la membrana (según lo anteriormente descrito) y a incubar con otros anticuerpos de interés, diferentes a los ensayados previamente.

### 3.8. Inmunoprecipitaciones.

#### 3.8.1. Inmunoprecipitación de sPLA<sub>2</sub>.

La isoforma sPLA<sub>2</sub> fue inmunoprecipitada de acuerdo con el método descrito por Uranga *et al.* (2007), con modificaciones menores. Tras haber sido incubadas en presencia de Fe<sup>2+</sup>, las retinas fueron homogeneizadas y solubilizadas en el *buffer* de lisis Tritón X-100 [Tris 20 mM, pH 8,0; Tritón X-100 1 % (p/v); NaCl 137 mM; glicerol 10 % (p/v); EGTA 1 mM; MgCl<sub>2</sub> 1 mM; Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,2 mM; DTT 1 mM; leupeptina 2 µg/ml; aprotinina 1 µg/ml; pepstatina 1 µg/ml; PMSF 0,1 mM], respetando una relación de 2 ml de *buffer*/retina. El material insoluble fue removido por centrifugación a 17000 x g durante 20 minutos. Trescientos microlitros de los homogenados totales solubilizados de las retinas

fueron preclareados por incubación con 20  $\mu$ l de proteína A sefarosa hidratada (3 mg) durante 30 minutos y centrifugados brevemente a 500 x g. El sobrenadante fue luego incubado durante 16 horas en presencia de un anticuerpo (10  $\mu$ l/inmunoprecipitado) que reconoce específicamente la isoforma sPLA<sub>2</sub> y posteriormente mezclado con 50  $\mu$ l de proteína A sefarosa hidratada (6 mg) e incubado durante 4 horas. Todas las incubaciones mencionadas en la descripción de esta técnica fueron realizadas a 4 °C y con agitación constante. Después de una breve centrifugación a baja velocidad, los inmunoprecipitados (IP) fueron lavados tres veces con PBS. Los IP finalmente obtenidos fueron resuspendidos en 70  $\mu$ l de *buffer* de ensayo para llevar a cabo el ensayo enzimático de la COX-2 o en 30  $\mu$ l de *buffer* de Laemmli (Laemmli, 1970) para realizar los estudios de WB.

### 3.9. Caracterización de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> en el modelo de injuria retiniana.

#### 3.9.1. Evaluación de la actividad de la isoforma cPLA<sub>2</sub>.

Para evaluar la actividad de la isoforma cPLA<sub>2</sub> se midió la liberación de [<sup>14</sup>C]AA de la posición sn-2 del sustrato exógeno [<sup>14</sup>C]PAPC. Para ello, se realizaron vesículas lipídicas conteniendo [<sup>14</sup>C]PAPC y 1-palmitoil-2-oleo-sn-glicero-3-fosfolina (POPC) frío para lograr una concentración final de 60000 dpm (0,100 mM) (600 dpm/micromol) por ensayo. Estas vesículas fueron preparadas en *buffer* de liposomas (Tritón X-100 800  $\mu$ M; HEPES 100 mM, pH 7,5) (Svensson *et al.*, 2005), para lo cual a un volumen determinado de [<sup>14</sup>C]PAPC se le adicionó el volumen de POPC fría y se llevó la mezcla a sequedad bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>. Posteriormente, la mezcla fue resuspendida en éter etílico y luego del secado bajo una atmósfera de N<sub>2</sub> se resuspendió en *buffer* de liposomas. Las fracciones subcelulares fueron preparadas en el *buffer* de ensayo para la



isoforma cPLA<sub>2</sub> (Tritón X-100 0,025 %; CaCl<sub>2</sub> 0,16 mM; BSA 0,2 mg/ml; DTT 4 mM; HEPES 100 mM, pH 7,5) (Svensson *et al.*, 2005). En el caso de las FMic, cada una de las ellas fue resuspendida en 300 µl de *buffer* de ensayo para la cPLA<sub>2</sub> (2X) mediante agitación vigorosa. En el caso de los Cit, a 225 µl de las mismas se les adicionó 75 µl de *buffer* de ensayo para la cPLA<sub>2</sub> (8X) mediante agitación vigorosa. De esta manera, en ambos casos, se obtuvo una concentración de reactivos 2X al solubilizar ambas fracciones, de modo que la concentración final de los mismos en el volumen de reacción fuese la adecuada para la actividad de la enzima. Setenta y cinco microlitros de vesícula lipídica fueron adicionados a 75 µl de las fracciones subcelulares obtenidas de las retinas incubadas como se describió anteriormente, de manera tal de obtener 150 µg de proteína en un volumen final de 150 µl. Para evaluar la participación de la actividad de la fosfolipasa A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>, del inglés *phospholipase A<sub>1</sub>*) y de la lisoPLA<sub>2</sub> en la generación de AA, la formación de lisoPL a partir de [<sup>14</sup>C]PAPC fue medida en las mismas condiciones experimentales usadas para evaluar la actividad de la isoforma cPLA<sub>2</sub>. Estos ensayos fueron realizados en presencia o ausencia de PMSF 2 mM (utilizado como un inhibidor de la lisoPLA<sub>2</sub>) (Pete *et al.*, 1996). Todas las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo a 37 °C durante 20 minutos, con agitación suave, y fueron detenidas por el agregado de 5 ml de cloroformo/MeOH (2:1, v/v). Los blancos de reacción se prepararon de la misma manera, excepto que el cloroformo/MeOH fue adicionado a las membranas antes de iniciar la incubación con el sustrato radiactivo. Los lípidos se procesaron tal como se describe en la sección “Análisis Lipídico”.

### 3.9.2. Evaluación de la actividad de la isoforma iPLA<sub>2</sub>.

La hidrólisis del FA de la posición sn-2 se determinó realizando vesículas lipídicas conteniendo [<sup>14</sup>C]DPPC y DPPC frío para lograr 60000 dpm (0,100 mM) (600 dpm/micromol) por ensayo. Estas vesículas fueron preparadas en el *buffer* de liposomas (Tritón X-100 800 µM; HEPES 100 mM, pH 7,5) (Svensson *et al.*, 2005), para lo cual a un volumen determinado de [<sup>14</sup>C]DPPC se le adicionó el volumen de DPPC frío y se llevó la mezcla a sequedad bajo una atmósfera de N<sub>2</sub>, para posteriormente ser resuspendida en el volumen adecuado de *buffer* de liposomas. Las fracciones subcelulares fueron preparadas en el *buffer* de ensayo para la isoforma iPLA<sub>2</sub> [Tritón X-100 0,025 %; EDTA 10 mM; ATP 2 mM; HEPES 100 mM, pH 7,5] (Svensson *et al.*, 2005). De manera similar a lo explicado anteriormente en relación con el ensayo de la cPLA<sub>2</sub>, para este ensayo, cada una de las FMic fue resuspendida en 300 µl de *buffer* de ensayo para la isoforma iPLA<sub>2</sub> (2X) mediante agitación vigorosa. En el caso de los Cit, a 225 µl de las mismas se le adicionó 75 µl de *buffer* de ensayo para la iPLA<sub>2</sub> (8X) mediante agitación vigorosa. De esta manera, en ambos casos, se obtuvo una concentración de reactivos 2X al solubilizar ambas fracciones de manera que la concentración final de los mismos en el volumen de reacción fuese la adecuada para la actividad de la enzima. Setenta y cinco microlitros de vesícula lipídica fueron adicionados a 75 µl de las fracciones subcelulares obtenidas de las retinas incubadas como se describió anteriormente, de manera tal de obtener 150 µg de proteína en un volumen final de 150 µl. Todas las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo a 37 °C durante 20 minutos, con agitación suave, y fueron detenidas por el agregado de 5 ml de cloroformo/MeOH (2:1, v/v). Los blancos de reacción se prepararon de la misma manera, excepto que el cloroformo/MeOH fue

adicionado a las membranas antes de iniciar la incubación con el sustrato radiactivo. Los lípidos se procesaron tal como se describe en la sección “Análisis Lipídico”.

### 3.10. Evaluación del rol de la ciclooxigenasa y de la lipooxigenasa.

La generación de productos de las enzimas COX-2 y LOX se evaluó a través de la cuantificación de distintas PG [prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) y prostaglandina F<sub>2</sub> (PGF<sub>2</sub>)] y de los hidroxiácidos, según Franchi *et al.* (2000), con algunas modificaciones. La generación de derivados del AA se determinó incubando las distintas fracciones subcelulares de la retina con vesículas lipídicas conteniendo [<sup>3</sup>H]AA de manera tal de alcanzar 60000 dpm (0,100 mM) por ensayo. Estas vesículas fueron preparadas en el *buffer* de liposomas (Svensson *et al.*, 2005) mediante agitación vigorosa y sonicando la mezcla durante 45 segundos en un baño sonicador. Las FMic se solubilizaron en el *buffer* de ensayo para la isoforma cPLA<sub>2</sub> de manera similar a lo anteriormente descrito para el ensayo enzimático de la cPLA<sub>2</sub>. Setenta y cinco microlitros de vesícula lipídica fueron adicionados a cada microsoma obtenido de las retinas incubadas según se describió anteriormente de modo de obtener 150 µg de proteína, en un volumen final de 150 µl. Se agitó vigorosamente esta suspensión y se la sonicó en un baño sonicador para una correcta homogeneización. El ensayo enzimático se llevó a cabo durante 20 minutos, a 37 °C con agitación suave. Pasado este tiempo, se detuvo la reacción enzimática mediante el agregado de 2 ml de acetato de etilo. Los blancos de reacción se prepararon de la misma manera, excepto que el acetato de etilo fue adicionado a las muestras antes de iniciar la incubación con el sustrato radiactivo.

Por otro lado, la generación de  $\text{PGF}_2$  y  $\text{PGE}_2$  se evaluó en suspensiones lipídicas conteniendo  $[\text{^3H}]\text{AA}$  (en las mismas condiciones de ensayo anteriormente descritas) utilizando la proteína COX-2 obtenida en los IP de la isoforma sPLA<sub>2</sub>, como fuente de enzima. Los productos se procesaron tal como se describe en la sección “Análisis Lipídico”.

### 3.11. Evaluación de la actividad de aciltransferasas.

Para determinar la actividad de las AT del tejido, se realizaron ensayos según lo previamente descrito por Castagnet y Giusto (1997), con modificaciones menores. Esta determinación fue gentilmente llevada a cabo por la Bioq. Sofía Sánchez Campos. Las retinas fueron incubadas en presencia o en ausencia de  $\text{Fe}^{2+}$  a 200  $\mu\text{M}$  durante 60 minutos para estudiar el efecto del estrés oxidativo sobre la actividad de las AT. Además, los ensayos se llevaron a cabo en presencia y ausencia de los inhibidores de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> para evaluar la actividad de la AT en estas condiciones. Por tal razón, las retinas fueron preincubadas durante 30 minutos en presencia o ausencia del inhibidor BEL (concentración final en el volumen de incubación: 25  $\mu\text{M}$ ), en presencia o ausencia del inhibidor ATK (concentración final en el volumen de incubación: 50  $\mu\text{M}$ ) y en presencia o ausencia del inhibidor YM 26734 (concentración final en el volumen de incubación: 10  $\mu\text{M}$ ). De manera inmediata, las retinas fueron sometidas durante 60 minutos al insulto oxidativo por medio de una incubación en presencia o en ausencia de  $\text{Fe}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$ . La actividad de las AT fue analizada midiendo la incorporación de  $[\text{^{14}C}]\text{ácido oleico}$  a partir de  $[\text{^{14}C}]\text{oleoil-CoA}$  a los lisoPL de la retina. Para esto, se realizaron vesículas lipídicas conteniendo  $[\text{^{14}C}]\text{oleoil-CoA}$  y  $\text{oleoil-CoA}$  a 20  $\mu\text{M}$  frío de manera de obtener 90000 dpm (0,100 mM) (900 dpm/micromol) por ensayo. Estas vesículas fueron preparadas en el

*buffer* de ensayo para AT ( $\text{MgCl}_2$  10 mM, ATP 1 mM, CoA 75 mM, Tris-acetato 60 mM, pH 7,8). Setenta y cinco microlitros de vesícula lipídica fueron adicionados a 75  $\mu\text{l}$  de HT de retina obtenido a partir de las retinas incubadas como se describió previamente (volumen equivalente a 400  $\mu\text{g}$  de proteína) de manera tal de obtener 400  $\mu\text{g}$  de proteína, en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ . La reacción se inició con el agregado de 50  $\mu\text{l}$  del sustrato radiomarcado, [ $^{14}\text{C}$ ]oleoil-CoA, en un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ . El sustrato radioactivo fue preparado resuspendiendo [ $^{14}\text{C}$ ]oleoil-CoA en el *buffer* de ensayo y sonicando esta suspensión durante 1 minuto en un baño sonicador. Las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo a 37 °C durante 20 minutos, con agitación suave, y fueron detenidas por el agregado de 5 ml de cloroformo/MeOH (2:1, v/v). Los blancos de reacción se prepararon de la misma manera excepto que el cloroformo/MeOH fue adicionado a las membranas antes de agregar el sustrato. Los lípidos se procesaron tal como se describe en la sección “Análisis Lipídico”.

### 3.12. Análisis lipídico.

#### 3.12.1. Extracción de los lípidos.

En el caso de los ensayos enzimáticos de las isoformas cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>, los lípidos fueron extraídos según la técnica de Folch *et al.* (1957). Tal como se mencionara anteriormente al describir estos ensayos, la reacción enzimática fue detenida por el agregado de 5 ml de cloroformo/ MeOH (2:1, v/v). El extracto lipídico obtenido de este modo fue posteriormente lavado con 0,2 volúmenes de  $\text{CaCl}_2$  0,05 % (p/v) y agitado vigorosamente. Se centrifugaron las muestras a 900 x g en la centrífuga de mesa Beckman TJ-6 durante 5 minutos para obtener una fase superior acuosa, la cual fue descartada, y una fase inferior orgánica conteniendo los lípidos de interés. Esta fase se secó bajo una corriente de  $\text{N}_2$ , se

resuspendió en 0,2 ml de cloroformo/MeOH (2:1 v/v) y fue conservada a -20 °C hasta el momento de sembrarla en placas para cromatografía en capa fina (TLC, del inglés *thin-layer chromatography*) para la separación de los distintos lípidos.

En el caso de los ensayos enzimáticos de las proteínas COX-2 y LOX, se procedió según lo descrito por Franchi *et al.* (2000). Tras frenar el ensayo enzimático por el agregado de acetato de etilo, los productos de la LOX se extrajeron 3 veces con 2 ml de acetato de etilo a pH 7, se reunieron los extractos orgánicos y los tubos se secaron bajo una corriente de N<sub>2</sub>. El residuo obtenido de esta manera se resuspendió en 0,2 ml de cloroformo/MeOH (2:1 v/v) y fue conservado a -20 °C hasta el momento de sembrarlo en placas para TLC para la separación de los productos del ensayo enzimático.

Para la extracción y separación de las PG, se procedió a partir de la fase acuosa remanente de la extracción de los productos de la LOX, según lo descrito por Franchi *et al.* (2000). La misma se llevó a cabo a un pH 3-3,5 mediante el agregado de HCl 1N. Luego se particionó nuevamente cada muestra con 2 ml de acetato de etilo, en 3 ocasiones, para extraer las PG del solvente. Los extractos orgánicos obtenidos de este modo se secaron bajo una corriente de N<sub>2</sub>, se resuspendieron en 0,2 ml de MeOH y se conservaron a -20 °C hasta el momento de sembrarlos en placas para TLC para la separación de los productos del ensayo enzimático.

En el caso del ensayo enzimático de las AT, se procedió según lo descrito previamente por Folch *et al.* (1957), con algunas modificaciones. Tras detener la reacción enzimática por el agregado de 5 ml de cloroformo/MeOH (2:1, v/v), el extracto lipídico obtenido de este modo fue lavado 3 veces con 0,2 volúmenes de

fase superior teórica, compuesta por cloroformo/MeOH/agua (3:48:47, v/v). El extracto lipídico obtenido se secó bajo N<sub>2</sub>, se resuspendió en 0,2 ml de cloroformo/MeOH (2:1, v/v) y fue conservado a -20 °C hasta el momento de sembrarlo en placas para TLC para la separación de los distintos lípidos polares.

### 3.12.2. Resolución y visualización de los lípidos.

#### 3.12.2.1. Lípidos neutros.

En el caso de los ensayos enzimáticos de las isoformas cPLA<sub>2</sub> e iPLA<sub>2</sub>, los lípidos neutros monoacilglicerol, diacilglicerol, y los ácidos grasos libres fueron separados por TLC monodimensional utilizando placas de sílica gel G (Merck) y una fase móvil compuesta por hexano/dietil éter/ácido acético (50:50:2,6, v/v). DPPC y PAPC, al igual que el resto de los fosfolípidos de la retina fueron retenidos en el punto de siembra. Los lípidos se visualizaron por exposición de la placa a vapores de yodo. Todas las manchas correspondientes a los lípidos neutros y las de los fosfolípidos fueron raspadas y cuantificadas por centelleo líquido.

#### 3.12.2.2. Lípidos polares.

En el caso del ensayo enzimático de las AT, los lípidos polares fueron separados por TLC bidimensional utilizando placas de sílica gel H (Merck). Las placas se desarrollaron en una primera fase móvil compuesta por cloroformo/MeOH/amoníaco (65:25:5, v/v) y luego se dejaron secar bajo una corriente de N<sub>2</sub> hasta la evaporación completa del amoníaco. Posteriormente, se desarrollaron en una segunda dimensión, utilizando un segundo sistema de solventes compuesto por cloroformo/acetona/MeOH/ácido acético/agua (30:40:10:10:4, v/v). Nuevamente se dejaron secar las placas y luego se visualizaron los lípidos por exposición de las mismas a vapores de yodo. Las

manchas correspondientes a PC, PE, fosfatidilserina (PS), PI, ácido fosfatídico (PA) y cardiolipina (CL) fueron raspadas y cuantificadas por centelleo líquido. La radioactividad correspondiente a las manchas de lípidos de los blancos (típicamente menos que 100 dpm) se sustrajo de la correspondiente a la radioactividad de las muestras. La actividad de la AT se expresó en dpm por hora por miligramo de proteína.

#### 3.12.2.3. Prostaglandinas y derivados del AA.

Para medir los productos de la LOX, fundamentalmente el ácido 5-hidroxi eicosatetraenoico (5-HETE), los residuos obtenidos luego de la extracción que habían sido resuspendidos en 0,2 ml de cloroformo/MeOH (2:1 v/v) se sembraron y fueron separados por TLC monodimensional utilizando placas de sílica gel G (Merck) y una fase móvil compuesta por acetato de etilo/isooctano/ácido acético/agua (76:67:20:100, v/v). Las placas se desarrollaron hasta que el frente del solvente alcanzó 1 cm de la placa. Las manchas se visualizaron con vapores de yodo. Se sembró estándar de AA y los RF para el AA y 5-HETE fueron 0,85 y 0,70, respectivamente (Franchi *et al.*, 2000). Todas las manchas correspondientes a los HETE fueron raspadas y cuantificadas por centelleo líquido.

En el caso de las PG, los residuos resuspendidos en 0,2 ml de MeOH se sembraron y fueron separados por TLC monodimensional utilizando placas de sílica gel G (Merck) y una fase móvil compuesta por benceno/dioxano/ácido acético (60:30:3, v/v). Las manchas se visualizaron con vapores de yodo. Se sembró estándar de AA, PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub>. Todas las manchas correspondientes a las PG fueron raspadas y cuantificadas por centelleo líquido.



### 3.13. Métodos analíticos.

#### 3.13.1. Determinación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se llevó a cabo empleando el *kit* Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad), el cual está basado en el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Las proteínas fueron solubilizadas en SDS al 10 % [concentración final de SDS 5 % (p/v), compatible con el método], diluidas de manera adecuada para lograr una concentración compatible con el método, siguiendo las instrucciones del *kit*. El método de Lowry es un método colorimétrico de dos etapas. En la primera, los iones cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) en medio alcalino forman un complejo con el nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos  $\text{Cu}^{2+}$ -proteína tienen un color azul claro y provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiendo los residuos fenólicos de las tirosinas y de los triptófanos. En la segunda etapa de la reacción, el reactivo de Folin-Ciocalteu (ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo) es reducido por los grupos fenólicos dando un color azul intenso. Después de una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente, se realizaron las lecturas de absorbancia a 750 nm. Paralelamente se realizó una curva de calibrado utilizando como estándar una solución de BSA 2 mg/ml.

#### 3.13.2. Medición de la radioactividad por centelleo líquido.

Las manchas correspondientes a los lípidos de interés resueltos por TLC se rasparon y transfirieron a viales. A cada una de ellas se le agregó 0,3 ml de agua ultrapura con el fin de desactivar la sílica. A continuación, se agregaron 5,5 ml de líquido de centelleo compuesto por Preblended dry fluor 2a70 4 % (98 % PPO y 2 % bis-MSB, Research Products International Corp. Estados Unidos) en

tolueno/Arkopal N-100 (4:1, v/v). La determinación de radioactividad se realizó con un contador de centelleo líquido Wallak Oy, modelo 1214 Rackbeta.

#### 3.14. Análisis de datos.

La significancia estadística de los datos obtenidos se analizó utilizando el test  $t$  de Student o ANOVA, según correspondiera. Los valores de  $p$  menores a 0,05 se consideraron estadísticamente significativos. Cada experimento se repitió un mínimo de tres veces, realizándose por duplicado cada determinación. Los datos graficados corresponden a la media  $\pm$  SD de seis muestras.

## RESULTADOS

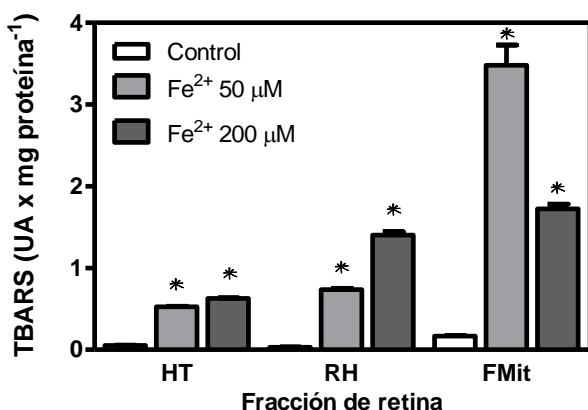
### **Parte I: Modelo de degeneración macular relacionada con la edad en retinas bovinas.**

Se cuenta con abundante evidencia acerca de la correlación existente entre la acumulación de Fe en la retina y del consiguiente desarrollo de cuadros patológicos, tales como la AMD. A continuación presentaremos los resultados de este trabajo de tesis que sustentan esta hipótesis.

En el modelo propuesto, que consistió en incubar retinas en un medio que contiene  $\text{Fe}^{2+}$ , se midieron distintos parámetros para caracterizar el daño inducido por el estrés oxidativo, tales como –entre otros– la viabilidad mitocondrial, la peroxidación lipídica y la permeabilidad de membrana. En particular, tanto el ensayo de reducción de MTT como el de TBARS fueron analizados en las distintas fracciones subcelulares de la retina y a distintos tiempos de incubación con la finalidad de poder optar por las condiciones más adecuadas y representativas de un modelo de AMD.

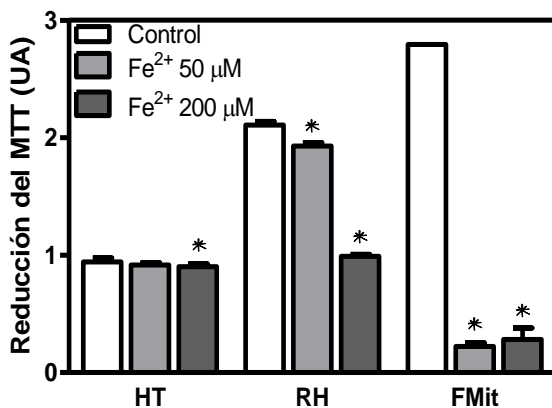
Con el fin de comprobar si las condiciones de incubación efectivamente producen estrés oxidativo en la retina, se procedió a estudiar por medio de la técnica de TBARS, los niveles de peroxidación lipídica provocados por la exposición al metal. Por tal motivo, las retinas fueron incubadas en LB en presencia de un rango de concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  (50 y 200  $\mu\text{M}$ ) o su vehículo (control), a 37 °C con agitación suave, bajo una corriente constante de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$ , durante 60 minutos y luego se procedió a determinar la formación de TBARS en distintas fracciones de la retina, según se describe en el apartado 3.6.4 de la sección “Materiales y métodos”. Por un lado, las retinas frescas fueron

homogeneizadas (fracción denominada “retina homogeneizada” o RH) y posteriormente incubadas con el agente oxidante. Por otra parte, retinas frescas que mantenían la integridad del tejido, fueron incubadas previamente con el metal y posteriormente fueron homogeneizadas, obteniendo de este modo la fracción correspondiente al HT y a la FMit, según los **protocolos 1A y 1B** descriptos en el apartado 3.3 de la sección “Materiales y métodos”. La **Figura 1** muestra un aumento de la peroxidación lipídica en las condiciones experimentales con respecto a la condición control y también indica que este efecto es mayor cuando aumenta la concentración de  $\text{FeSO}_4$  utilizada. Es importante destacar que la generación de peróxidos lipídicos se pudo observar tanto en la RH (aquella que fue homogeneizada antes de ser incubada con el agente oxidante) como en el HT (en este caso, las retinas previamente se incubaron con el metal y posteriormente fueron homogeneizadas) y la FMit (obtenida por fraccionamiento subcelular a partir del HT y luego incubada con el metal). La generación de peróxidos lipídicos en la RH o en sus fracciones subcelulares fue mayor que en el HT obtenido a partir de la retina entera. Por lo tanto, podemos afirmar que, cuando la retina íntegra (como tejido, HT) es expuesta al  $\text{Fe}^{2+}$ , también sufre –aunque en menor grado– el efecto deletéreo de este metal.



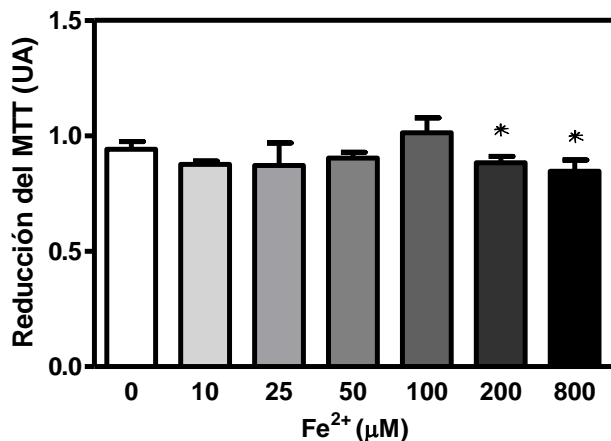
**Figura 1. Caracterización del daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Determinación de los niveles de peroxidación lipídica mediante la técnica de TBARS en distintas fracciones (homogenado de retina previamente expuesta al metal, HT; retina homogenada previamente a la exposición, RH; fracción mitocondrial de retina, FMit) de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  (50 y 200  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Para comprobar si estos niveles de peróxidos lipídicos afectan la funcionalidad mitocondrial de la retina, realizamos el ensayo de reducción del MTT. Las retinas fueron incubadas en LB en presencia de un rango de concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  o su vehículo (control), a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  con agitación suave y bajo una corriente constante de  $\text{O}_2/\text{CO}_2$  durante 60 minutos. Luego se procedió a determinar la reducción del MTT, según se describió en el apartado 3.6.1 de la sección “Materiales y métodos”. Se obtuvieron distintas fracciones de retina (véanse los **protocolos 1A y 1B** previamente mencionados), y se estudió en ellas la viabilidad mitocondrial con la expectativa de determinar cómo respondía cada una de ellas al estrés oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ . Por esta razón, se llevó a cabo durante 60 minutos este ensayo con el HT obtenido de la retina y con las fracciones RH y FMit en presencia de dos concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  (50 y  $200\text{ }\mu\text{M}$ ). Finalizadas las incubaciones, se procedió a evaluar el efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  sobre la viabilidad mitocondrial. De la comparación entre la condición control y la condición experimental que muestra la **Figura 2** surge con claridad el daño que provoca el  $\text{Fe}^{2+}$ . El nivel de daño se vio incrementado al aumentar la concentración del agente oxidante y fue mayor aun cuando se incubaban las fracciones subcelulares (RH y FMit) en presencia del metal.



**Figura 2. Caracterización del daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Determinación de la reducción del MTT en distintas fracciones (homogenado de retina previamente expuesta al metal, HT; retina homogenada previamente a la exposición, RH; fracción mitocondrial de retina, FMit) de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  (50 y  $200\text{ }\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

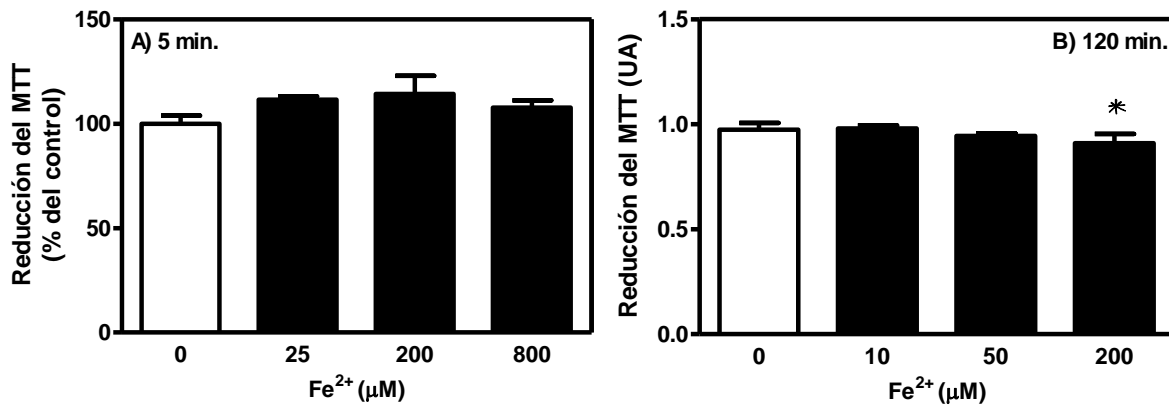
Por otra parte, se realizó un estudio de las distintas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  a utilizar con la finalidad de identificar aquella que fuese acorde a lo que se deseaba estudiar en esta tesis, es decir, a un modelo de sobrecarga aguda con el fin de provocar distintos grados de injuria oxidativa. La **Figura 3** muestra los resultados obtenidos del análisis de la reducción del MTT en el HT. Se puede observar que la capacidad reductora normal de las mitocondrias disminuyó significativamente a los 60 minutos de incubación para las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  200 y 800  $\mu\text{M}$ . Esto demuestra que para estos tiempos de incubación, son necesarias altas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  para provocar la aparición de signos de injuria oxidativa.



**Figura 3. Caracterización del daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Determinación de la reducción del MTT en el HT de retinas expuestas a distintas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  (10, 25, 50, 100, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

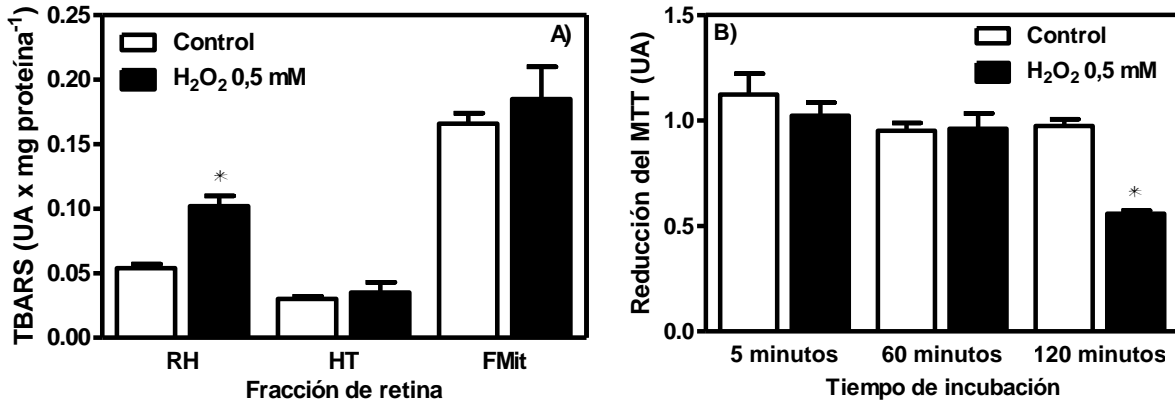
Se estudió también el efecto de otras concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  a distintos tiempos de incubación. Se eligieron las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu\text{M}$  para analizar el efecto sobre la viabilidad mitocondrial a tiempos cortos de incubación, mientras que los tiempos prolongados fueron analizados con las siguientes concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$ : 10, 50 y 200  $\mu\text{M}$ . La **Figura 4** indica que las concentraciones altas de  $\text{Fe}^{2+}$  no producen cambios significativos en la reducción del MTT a tiempos cortos (5 minutos) de incubación (**Figura 4A**), mientras que de las concentraciones bajas analizadas a tiempos prolongados (120 minutos) de

incubación (**Figura 4B**) solamente la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  provoca cambios significativos sobre la capacidad reductora de las células de la retina.



**Figura 4. Caracterización del daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Determinación de la reducción del MTT en el HT de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 5 minutos (**A**) y en el HT de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  (10, 50 y 200  $\mu\text{M}$ ) durante 120 minutos (**B**). \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

En virtud de que la AMD se encuentra asociada al estrés oxidativo, otro de los agentes oxidantes utilizados en esta tesis para provocar el modelo de AMD fue el  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Se realizaron ensayos de TBARS y de reducción del MTT en presencia de este agente en las mismas fracciones anteriormente mencionadas (HT, RH y FMit) y a distintos tiempos de incubación (5, 60 y 120 minutos). En la **Figura 5A** se puede observar el efecto del  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 mM) sobre las distintas fracciones de retina estudiadas. Se pudo constatar mediante la técnica de TBARS que cuando las fracciones de retina (RH y FMit) son incubadas con el agente oxidante, el daño peroxidativo sufrido es mayor que cuando la retina entera es incubada con el mismo agente y posteriormente homogeneizada para medir el grado de peroxidación (HT). La **Figura 5B** muestra los resultados obtenidos al incubar las retinas enteras en presencia y ausencia de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (0,5 mM). En el caso de este agente oxidante, se observó que los cambios son significativos solamente durante períodos prolongados de incubación.



**Figura 5. Caracterización del daño oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.** (A) Determinación de los niveles de peroxidación lipídica mediante la técnica de TBARS en distintas fracciones de retinas previamente expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) durante 60 minutos (B). Determinación de la capacidad reductora de la mitocondria mediante la técnica de reducción del MTT en los HT obtenidos de retinas expuestas a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,5 mM) durante distintos períodos de tiempo (5, 60 y 120 minutos). \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo (p<0,05, ANOVA).

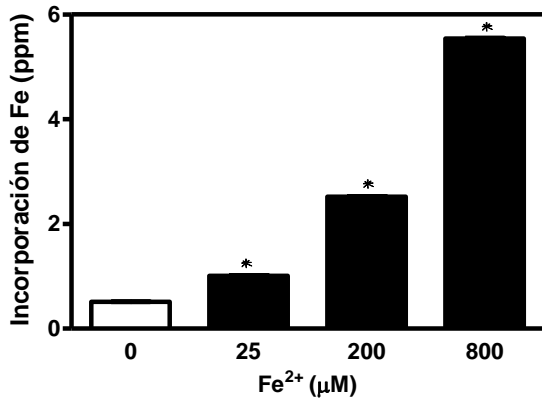
Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, para la caracterización y los estudios que se describirán a continuación se resolvió utilizar las siguientes concentraciones de Fe<sup>2+</sup>: 25, 200 y 800 μM, a dos tiempos de incubación (5 y 60 minutos). Dicha decisión respondió al hecho de que uno de los objetivos de esta tesis era mimetizar un modelo de AMD por sobrecarga aguda con Fe y trabajar con distintos grados de injuria oxidativa, es decir, leve, mediano y severo.



## **Parte II: Caracterización del modelo de degeneración macular relacionada con la edad en retinas bovinas.**

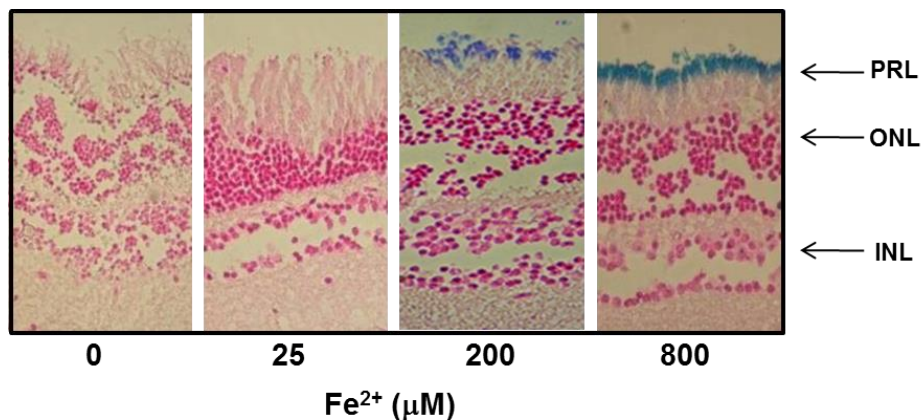
Con el fin de comprobar si las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizadas provocan el modelo de sobrecarga deseado en las retinas, se determinaron los niveles de dicho metal presentes en el tejido luego de la incubación de las retinas en las distintas condiciones experimentales. La cinética de incorporación del Fe se realizó mediante la técnica de ICP-AES y también se caracterizó por técnicas histoquímicas, mediante el uso de la tinción de Perls.

Como puede observarse en la **Figura 6**, en este modelo de sobrecarga de  $\text{Fe}^{2+}$  dicho metal se incorpora al tejido desde el medio de incubación que lo contiene. Esta incorporación se vio incrementada de manera dependiente de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  en un 98, 400 y 1100 % en las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en relación a la condición control, luego de 60 minutos de incubación. Esta acumulación diferencial de Fe mimetiza la acumulación que se produce en diferentes condiciones fisiológicas y fisiopatológicas. Cuando se incuban las retinas con  $\text{Fe}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  se observan en el tejido niveles de Fe superiores a los de la condición control pero similares a los encontrados en pacientes de la tercera edad. En las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  200 y 800  $\mu\text{M}$ , la incorporación es similar a la acumulación que ocurre en las retinas de pacientes con distintas patologías que involucran la falta de homeostasis de este metal (Garcia-Castineiras, 2010; Hahn *et al.*, 2004; Hahn *et al.*, 2003b; Hahn *et al.*, 2006). Cabe destacar que esta técnica nos permite asegurar que hay incorporación de dicho metal a nivel del tejido aunque no es posible determinar a nivel celular dónde se produce esta acumulación, ni en qué estado de oxidación se encuentra el metal.



**Figura 6. Caracterización del modelo de sobrecarga inducido por Fe<sup>2+</sup>.** Evaluación de la incorporación de Fe en las células de la retina, mediante la técnica de ICP-AES aplicada en el HT de retinas expuestas a Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 μM) durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Con la finalidad de localizar la acumulación de Fe, se aplicó la técnica de tinción de Perls. Como puede observarse en la **Figura 7**, el Azul de Prusia, un indicador de la presencia de Fe<sup>3+</sup>, se encontró ligeramente aumentado en la concentración de Fe<sup>2+</sup> 200 μM, y significativamente aumentado en la concentración de Fe<sup>2+</sup> 800 μM. Esto respalda los resultados obtenidos con la técnica de ICP-AES, a la vez que nos permite demostrar que la incorporación de Fe en las condiciones de estudio de este modelo de AMD se produce fundamentalmente en la zona de los segmentos externos de los PR de la retina.



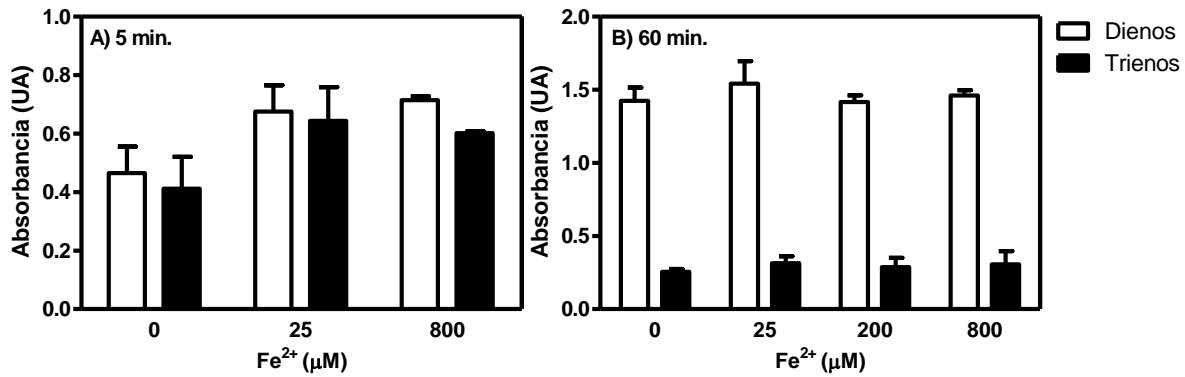
**Figura 7. Caracterización del modelo de sobrecarga inducido por Fe<sup>2+</sup>.** Determinación de la presencia de Fe en el tejido mediante tinción de Perls en retinas expuestas a Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 μM) durante 60 minutos. Imágenes representativas de, al menos, tres experimentos diferentes.

Habiendo comprobado la incorporación de Fe en las retinas, se procedió a la caracterización total del daño inducido por la incubación en presencia de este

metal de transición. La caracterización del daño retiniano inducido por  $\text{Fe}^{2+}$  se llevó a cabo mediante la determinación de los niveles de formación de dienos y trienos conjugados y de TBARS (como medida de peroxidación lipídica), reducción del MTT (como medida de viabilidad celular), capacidad antioxidante del sistema (como medida de las reservas antioxidantes del tejido) y permeabilidad de la membrana plasmática (como medida de necrosis celular).

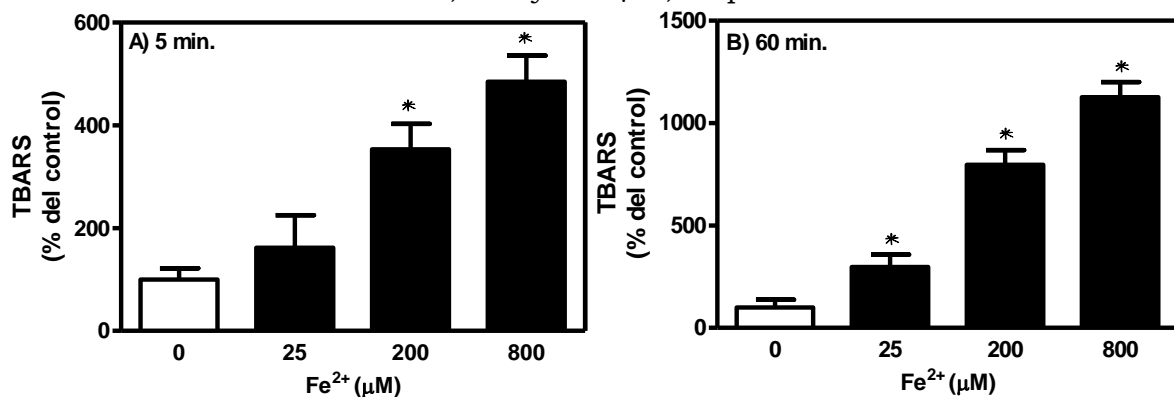
### **Peroxidación lipídica.**

La determinación espectrofotométrica de la formación de dienos y trienos conjugados se llevó a cabo mediante el registro de absorbancias a 234 nm (formación de dienos conjugados) y a 270 nm (formación de trienos conjugados). La **Figura 8** muestra la generación de estos productos tempranos de peroxidación lipídica en respuesta al estrés oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ . La **Figura 8A** muestra la formación de dienos y trienos tras la exposición de las retinas a distintas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  durante 5 minutos, no encontrándose diferencias significativas. La **Figura 8B** muestra la formación de dienos y trienos conjugados después de 60 minutos de incubación de la retina con el agente oxidante, no encontrándose tampoco diferencias significativas. Se puede observar que los niveles de formación de dienos conjugados son de mayor orden de magnitud a los 60 minutos.



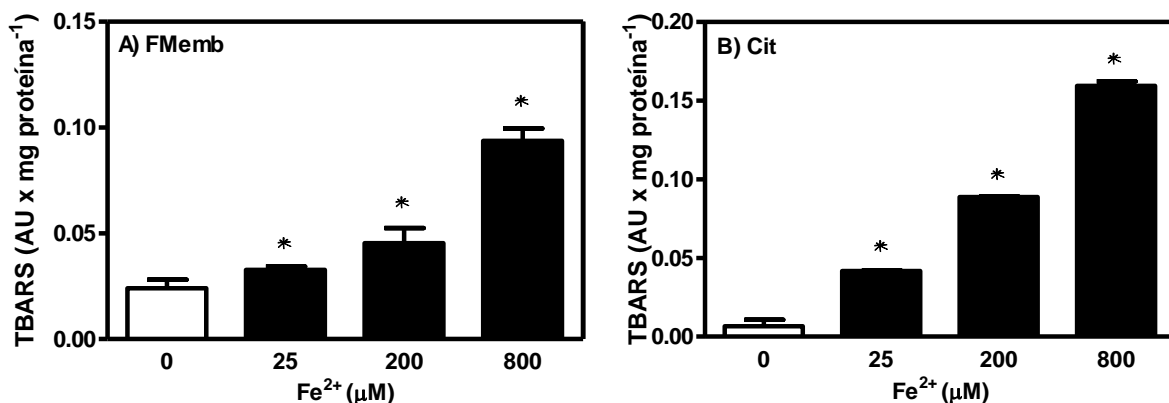
**Figura 8. Caracterización del daño oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup>.** Determinación de la formación de dienos y trienos conjugados, en el HT de retinas expuestas a Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 µM) durante un período de 5 (A) y 60 (B) minutos, respectivamente. No se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Para evaluar la generación de peróxidos lipídicos inducida por la incubación con Fe<sup>2+</sup>, se realizó el ensayo de TBARS. El incremento en los productos de la peroxidación lipídica se pudo observar rápidamente. La **Figura 9A** muestra cómo, luego de 5 minutos de exposición al metal, los niveles de TBARS aumentaron 0,6, 2,2 y 3,6 veces con respecto al control en las condiciones de Fe<sup>2+</sup> 25, 200 y 800 µM, respectivamente. Sin embargo, la máxima generación de malondialdehído se observó luego de 60 minutos de exposición al Fe<sup>2+</sup>, como puede observarse en la **Figura 9B**. Bajo estas condiciones experimentales, los niveles de TBARS fueron 1,8, 6,5 y 9 veces más elevados que los del control en las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> 25, 200 y 800 µM, respectivamente.



**Figura 9. Caracterización del daño oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup>.** Determinación de los niveles de TBARS por medio de la determinación de los niveles de malondialdehído en el HT de retinas expuestas a Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 µM) durante un período de 5 (A) y 60 (B) minutos, respectivamente. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Por otra parte, también se evaluó el daño provocado por incubación durante 60 minutos con este metal en la fracción de membrana (FMemb) y en el Cit. Como se observa en la **Figura 10A**, el nivel del daño provocado por la exposición al metal en la FMemb es dependiente de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizada. Los niveles de TBARS aumentaron 0,3, 0,8 y 3 veces con respecto al control en las condiciones de  $\text{Fe}^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Resultados similares se obtuvieron al evaluar la peroxidación lipídica en el Cit, como puede verse en la **Figura 10B**. En este caso, se puede observar que en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  a concentraciones de 25, 200 y 800  $\mu\text{M}$  los niveles de TBARS experimentaron un aumento de 5, 12 y 22 veces, respectivamente, en comparación con la condición.

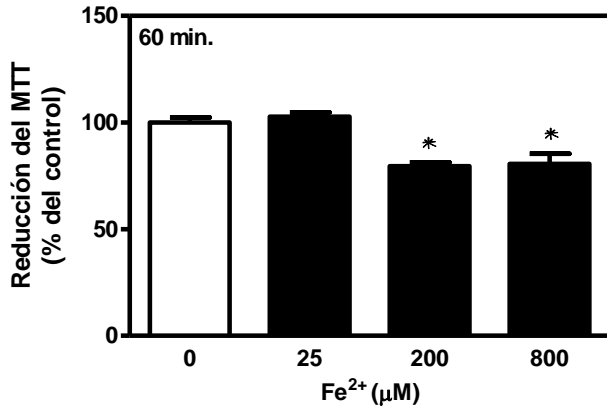


**Figura 10. Caracterización del daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Determinación de los niveles de las TBARS en la FMemb (A) y en el Cit (B) de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

### Deterioro de la función mitocondrial.

La viabilidad celular no se vio afectada después de 5 minutos de incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu\text{M}$  (véase **Figura 4A**). Tras 60 minutos de incubación con el metal, la viabilidad celular solo se vio afectada en las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  200 y 800  $\mu\text{M}$ , sufriendo una disminución del 20 % en comparación con los controles (**Figura 11**). Esto demuestra que durante este

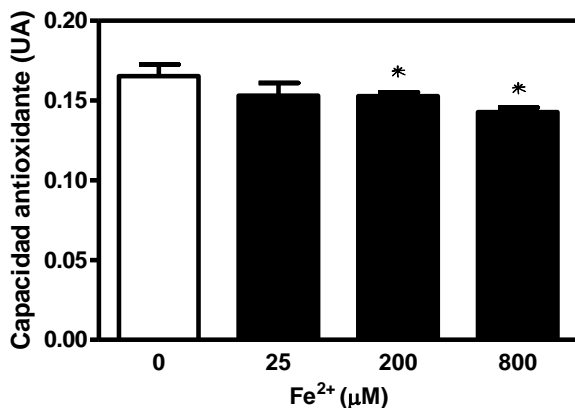
tiempo de incubación la pérdida de funcionalidad resultante de la injuria oxidativa en las mitocondrias es evidente solamente a altas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura 11. Caracterización del daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Determinación de la reducción del MTT en el HT de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

### Capacidad antioxidante del sistema.

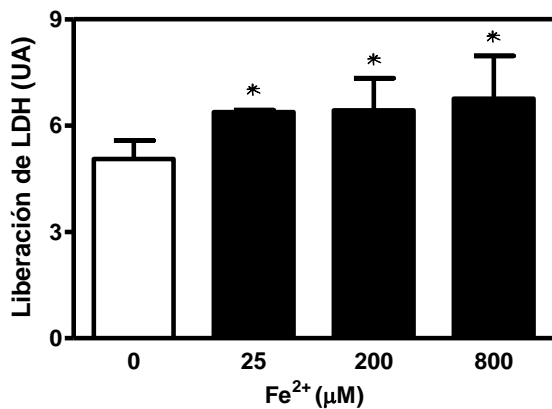
Con la finalidad de determinar la capacidad antioxidante del sistema, se analizó la capacidad secuestradora de radicales. El ensayo de DPPH es una técnica espectrofotométrica que permite determinar la actividad o capacidad antioxidante en sistemas biológicos. La **Figura 12** muestra una disminución leve, no obstante significativa, de la capacidad antioxidante del HT de retina (7 y 13 %) en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (200 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Estos resultados concuerdan con los niveles bajos de la pérdida de viabilidad mitocondrial (20 %) observada en las mismas concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$ .



**Figura 12. Caracterización del daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Evaluación de la capacidad antioxidante del tejido mediante la técnica del radical DPPH aplicada en el HT de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

### **Pérdida de la integridad de la membrana plasmática de las células de la retina.**

Como parte de la caracterización realizada, también se determinó la liberación de LDH al medio de incubación, como una medida del aumento de permeabilidad de la membrana plasmática. Esta determinación se llevó a cabo midiendo la actividad de dicha enzima en una alícuota del medio de incubación de las retinas, una vez que estas fueron incubadas durante 60 minutos en presencia del metal y retiradas del mismo. De acuerdo con la **Figura 13**, el  $\text{Fe}^{2+}$  produce un leve incremento en la liberación de LDH al medio del 26, 27 y 34 % con respecto al control en las condiciones de  $\text{Fe}^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente. Mediante esta técnica fue posible comprobar que el efecto nocivo del  $\text{Fe}^{2+}$  no solo altera el estado redox de las mitocondrias sino que, además, provoca una leve alteración en la integridad de la membrana plasmática de las células del tejido.

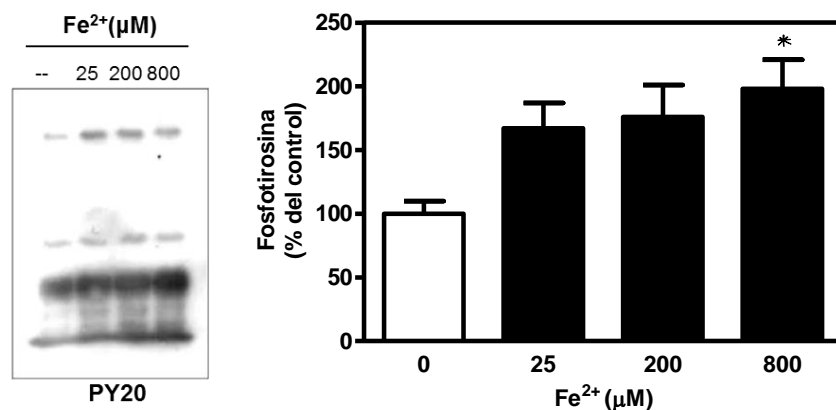


**Figura 13. Caracterización del daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Evaluación de la pérdida de integridad de la membrana plasmática de las células de la retina mediante la liberación de LDH en el medio de incubación de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

### Caracterización de las vías de señalización involucradas en la respuesta a la injuria oxidativa desencadenada por el Fe<sup>2+</sup>.

Es sabido que la fosforilación en residuos de tirosinas es un evento provocado por el estrés oxidativo. Específicamente, las MAPK ERK1/2 y p38 son activadas por el estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup> en tejidos neuronales y no-neuronales (Salvador & Oteiza, 2011; Uranga *et al.*, 2009; Son *et al.*, 2013; Supanji *et al.*, 2013). Por lo tanto, decidimos investigar la posible activación de las tirosina quinasas y las MAPK ERK1/2 y p38 en el modelo de estudio.

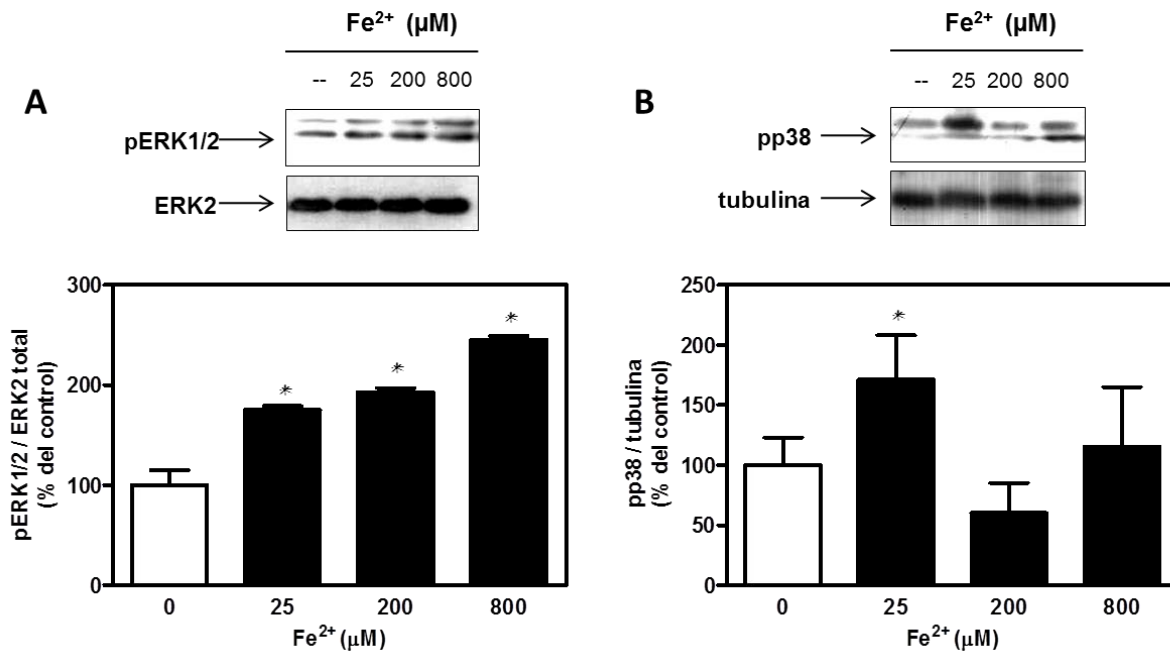
El perfil de fosforilación en tirosinas también fue analizado en las retinas expuestas al Fe<sup>2+</sup> durante 60 minutos. Para esto se utilizaron dos anticuerpos anti-pTyr diferentes (PY20 y PY99). Tal como se observa en la **Figura 14**, la injuria oxidativa generada por el Fe<sup>2+</sup> dio lugar a un marcado incremento en los niveles de fosforilación en tirosinas de varias proteínas de la retina, alcanzando un máximo del 98 % en la condición de 800 μM.



**Figura 14. Caracterización de las vías de señalización involucradas en la respuesta a la injuria oxidativa inducida por Fe<sup>2+</sup>.** Evaluación del estado de fosforilación en tirosinas de las proteínas de la retina frente al estrés oxidativo inducido por incubación del tejido con Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 μM) durante 60 minutos, mediante la técnica de WB. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo (p<0,05, ANOVA).



Por otra parte, la **Figura 15A** muestra cómo la exposición al  $\text{Fe}^{2+}$  produce un incremento en la fosforilación de las ERK1/2 después de 60 minutos de incubación. Los niveles de fosforilación de las ERK1/2 aumentaron significativamente en todas las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  ensayadas. Dicho aumento fue del 75, 100 y 145 % con respecto a la condición control en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente. En la **Figura 15B** se observa el incremento en la fosforilación de p38, el cual solamente fue evidente en la condición de  $\text{Fe}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  (71 %) en un tiempo de incubación igual al anteriormente mencionado.

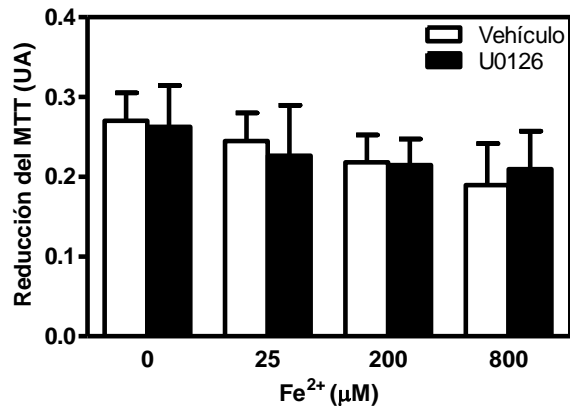


**Figura 15. Caracterización de las vías de señalización involucradas en la respuesta a la injuria oxidativa inducida por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Evaluación, mediante la técnica de WB, del estado de las vías de las MAPK frente al estrés oxidativo inducido por incubación de la retina con  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. Estado de la vía de las ERK1/2 (**A**) y de p38 (**B**). Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

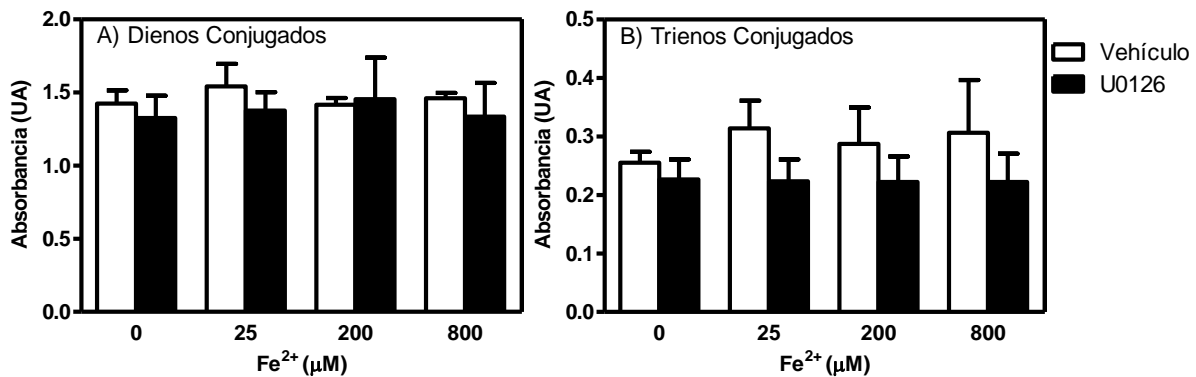
Para determinar las implicancias que la vía de las MAPK tiene en nuestro modelo experimental, se investigaron distintos parámetros de daño tisular inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ , en presencia y ausencia de un inhibidor específico de las

MAPKK (MEK), U0126 (10  $\mu\text{M}$ ). Por tal razón, se midió la reducción del MTT en presencia del inhibidor mencionado. Se observó que el inhibidor U0126 no modifica los niveles de viabilidad celular de la retina en ninguna de las condiciones experimentales consideradas (**Figura 16**).

**Figura 16. Evaluación de la participación de la vía de las MAPK en el daño inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ .** Pérdida de viabilidad sufrida por la retina tras su exposición al estrés oxidativo inducido por incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. No se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).



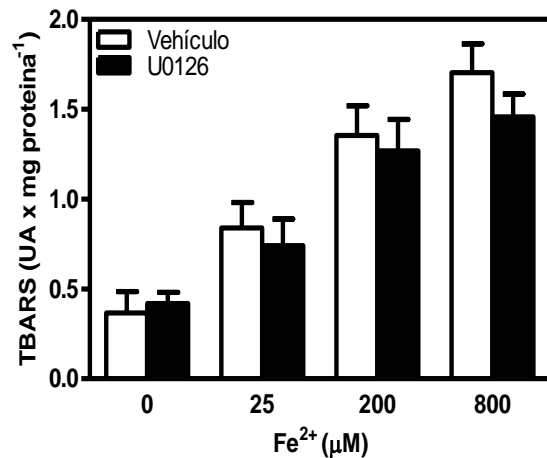
La **Figura 17** muestra la formación de dienos y trienos conjugados tras la exposición de las retinas al insulto oxidativo, previa incubación con el inhibidor de la vía de las MAPK. La formación de dienos y trienos conjugados tras 60 minutos de incubación de la retina con el agente oxidante no sufrió cambios cuando las retinas fueron incubadas previamente con el inhibidor.



**Figura 17. Evaluación de la participación de la vía de las MAPK en la peroxidación lipídica.** Formación de dienos y trienos conjugados en la retina tras su exposición –durante 60 minutos– al estrés oxidativo inducido por incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ). (A) Dienos y (B) Trienos conjugados. No se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Por otro lado, al realizar el ensayo de TBARS en presencia del inhibidor U0126, se pudo evaluar la participación de la vía de las MAPK en la generación de productos tardíos de peroxidación lipídica. En este caso, se observó que el uso del inhibidor no provoca cambios significativos en la generación de TBARS en ninguna de las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  consideradas (**Figura 18**).

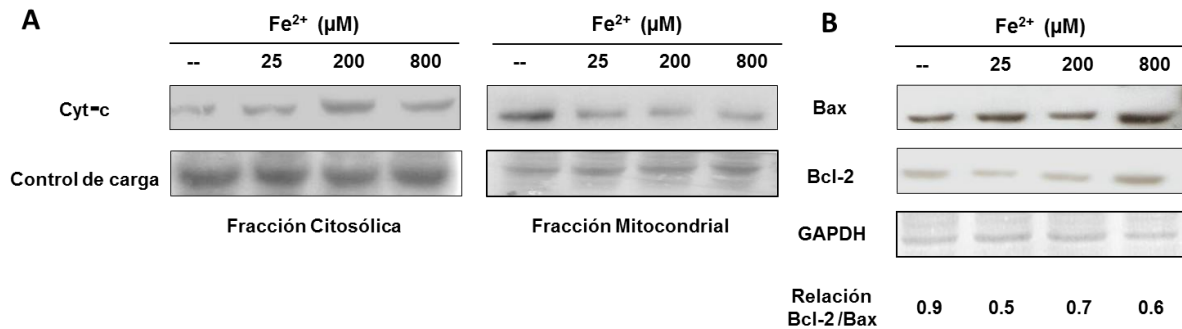
**Figura 18. Evaluación de la participación de la vía de las MAPK en la peroxidación lipídica en retina.** Determinación de los niveles de TBARS en retinas previamente expuestas durante 60 minutos a estrés oxidativo inducido por incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ). No se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).



#### Evaluación del estado de las vías apoptóticas.

El Cyt-C, Bax y BCl-2 son proteínas que están involucradas en las vías de señalización que se activan durante la muerte celular programada (Gross *et al.*, 1999; Hahn *et al.*, 2003a). Por lo tanto, para evaluar el estado de las vías apoptóticas en nuestro modelo analizamos la expresión de las proteínas citadas en las fracciones mitocondriales y citosólicas de retinas obtenidas según lo descrito anteriormente en la sección de “Materiales y métodos”. En la **Figura 19A** se puede observar que el Cyt-C incrementa su expresión en el Cit en función de las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) utilizadas. En cuanto a los niveles de expresión en la fracción mitocondrial se observó que estos disminuyen con respecto a la condición control. También se determinó la relación Bcl-2/Bax. A través de la **Figura 19B** es posible observar que dicha relación disminuye en

función de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$ . En cuanto a los niveles de expresión de GAPDH, estos fueron determinados como control de carga y proteína marcadora de fracción.



**Figura 19. Evaluación de la expresión de las proteínas Cyt-C, Bcl-2 y Bax en fracciones mitocondriales y citosólicas.** Esta evaluación se realizó en FMit y Cit obtenidas de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. **(A)** Evaluación de la expresión del Cyt-C en FMit y Cit obtenidas a partir de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por  $\text{Fe}^{2+}$  durante 60 minutos. **(B)** Evaluación de la expresión de Bcl-2 y Bax en Cit obtenidos a partir de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por  $\text{Fe}^{2+}$  durante 60 minutos. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes.

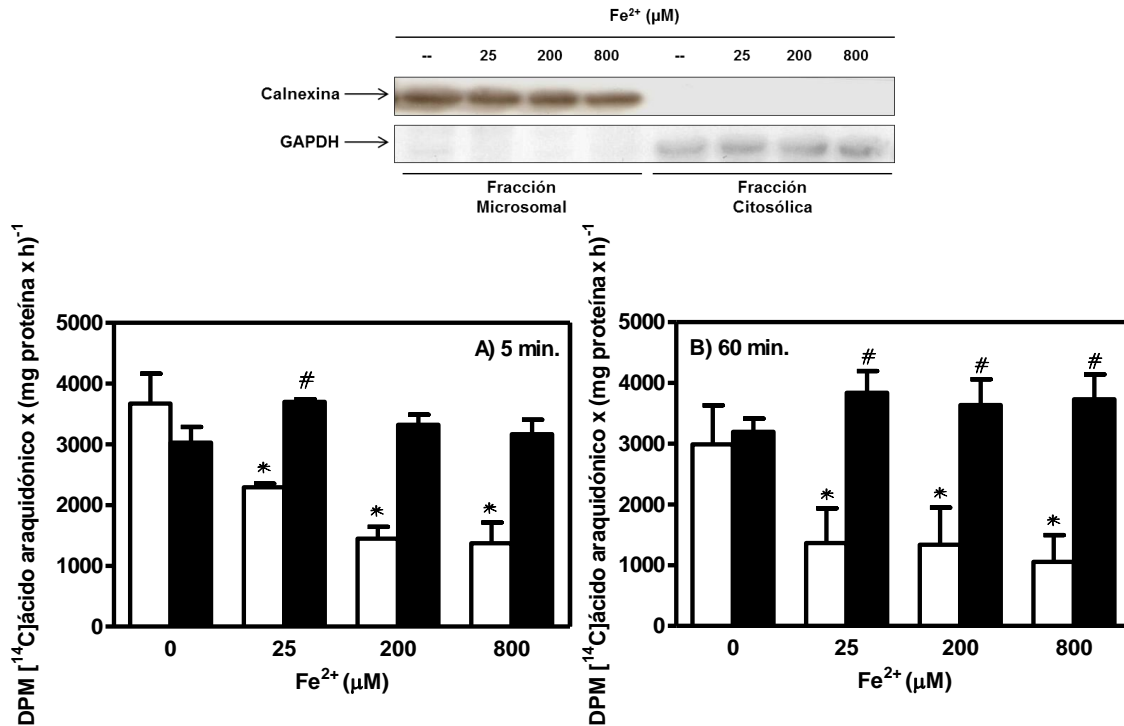
### Caracterización del rol de las distintas isoformas de la $\text{PLA}_2$ .

Dado que uno de los objetivos principales del presente trabajo de tesis incluía evaluar la participación de la  $\text{PLA}_2$  en los procesos de injuria oxidativa en la retina, se procedió, en primer lugar, a establecer las condiciones óptimas para analizar la actividad enzimática de las distintas isoformas de esta enzima. Por tal razón, se realizaron ensayos pilotos preliminares, en condiciones acotadas que permitieran elegir las fracciones subcelulares y condiciones de reacción más adecuadas para evaluar la actividad de las isoformas  $\text{cPLA}_2$  e  $\text{iPLA}_2$ . Se evaluó la actividad de ambas isoformas mediante la determinación de la liberación de  $[^{14}\text{C}]\text{AA}$  y de  $[^{14}\text{C}]\text{PAL}$ , respectivamente, tal como se indicó en el apartado 3.9 de la sección “Materiales y métodos”, basándonos en la bibliografía disponible (Svensson *et al.*, 2005). En base a los resultados obtenidos, se utilizaron como

fuentes de enzima las fracciones enriquecidas, FMit y Cit (**Figura 20C**), obtenidas según se indica en el apartado 3.3.2 de la sección “Materiales y métodos” a partir de la retina incubada en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (véase el **protocolo 1C**).

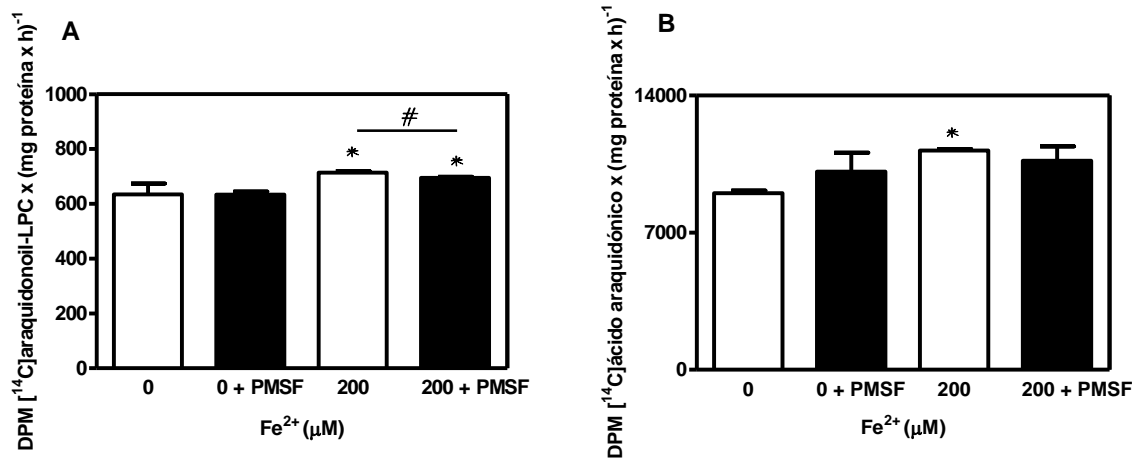
### **PLA<sub>2</sub> citosólica dependiente de calcio (cPLA<sub>2</sub>).**

Para determinar la participación de la cPLA<sub>2</sub> en este modelo, se analizó la actividad de esta isoforma por medio de la medición de la liberación de [<sup>14</sup>C]AA a partir del sustrato exógeno [<sup>14</sup>C]PAPC en presencia de un *buffer* con concentración adecuada de calcio ( $\text{CaCl}_2$  0,16 mM) en las FMic y en los Cit de la retina. En la **Figura 20** se muestra la liberación de [<sup>14</sup>C]AA en dichas fracciones luego de la incubación de la retina con  $\text{Fe}^{2+}$  durante 5 (**Figura 20A**) y 60 minutos (**Figura 20B**). Tras 5 minutos de incubación se observó una importante inhibición de la actividad microsomal de la cPLA<sub>2</sub> (38, 61 y 63 % para las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente) y un pequeño incremento en la liberación de [<sup>14</sup>C]AA (22 %) en el Cit en la condición de  $\text{Fe}^{2+}$  a 25  $\mu\text{M}$ . Tras 60 minutos de incubación, se observó un patrón de liberación de [<sup>14</sup>C]AA similar pero con disminuciones en la liberación de [<sup>14</sup>C]AA del 55, 56 y 65 % para las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ , respectivamente, en la FMic. En el Cit se observó un leve incremento de aproximadamente un 20 % en la liberación de [<sup>14</sup>C]AA en todas las concentraciones analizadas. En la condición control, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de [<sup>14</sup>C]AA liberado. La detección de [<sup>14</sup>C]AA en el Cit fue mayor (aproximadamente un 100-200 %) que los niveles medidos en las FMic, en ambos tiempos de incubación.



**Figura 20. Liberación de [<sup>14</sup>C]AA en las fracciones microsomal y citosólica de la retina.** Evaluación realizada en retinas expuestas durante 5 **(A)** y 60 minutos **(B)** al estrés oxidativo inducido por incubación con Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 μM) en FMic (□) y Cit (■) de la retina. \*Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control del grupo de las muestras microsomales (p<0,05, ANOVA). #Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control del grupo de las muestras citosólicas (p<0,05, ANOVA). **WB** de FMic y Cit enriquecidas y obtenidas mediante el **Protocolo 1C** de fraccionamiento subcelular, descrito en el apartado 3.3.2 de la sección de “Materiales y métodos”. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes.

Dado que la generación de [<sup>14</sup>C]AA a partir del PAPC podría resultar también de la acción secuencial de la PLA<sub>1</sub> y la lisoPLA<sub>2</sub>, se realizaron ensayos para descartar esta posibilidad. La 2-araquidonoil-lisoPC generada por la PLA<sub>1</sub> podría ser hidrolizada por la lisoPLA<sub>2</sub> dando lugar al AA. En nuestras condiciones experimentales, la generación de 2-araquidonoil-lisoPC fue prácticamente indetectable (**Figura 21A**) en todas las condiciones ensayadas. En presencia de PMSF 2 mM (usado como inhibidor de la lisoPLA<sub>2</sub>), no se observaron cambios en el incremento de la generación de [<sup>14</sup>C]AA inducido por Fe<sup>2+</sup> (**Figura 21B**).



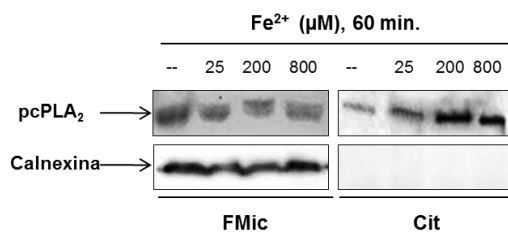
**Figura 21. Actividad de la PLA<sub>1</sub> y LPLA<sub>2</sub> en la liberación de [<sup>14</sup>C]AA en las fracciones microsomal y citosólica de la retina.** Evaluación realizada en retinas expuestas durante 60 minutos al estrés oxidativo inducido por incubación con Fe<sup>2+</sup> (200 μM). **(A)** Generación de [<sup>14</sup>C]araquidonil-LPC en microsomas. **(B)** Generación de [<sup>14</sup>C]AA en Cit. \*Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo (p<0,05, ANOVA). #Se observan diferencias significativas con respecto a la condición indicada (p<0,05, ANOVA).

De acuerdo con lo evidenciado por los experimentos realizados, podemos inferir que la vía de generación de [<sup>14</sup>C]AA en retinas expuestas al estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup> es, principalmente, a través de la acción de la PLA<sub>2</sub>.

### **Cross-talk entre la isoforma cPLA<sub>2</sub> y la vía de las MAPK en el modelo de AMD.**

Dado que uno de los mecanismos más comunes de activación de la isoforma cPLA<sub>2</sub> es su fosforilación por acción de las quinasas ERK1/2 (Chakraborti, 2003; Ghosh *et al.*, 2006; Leslie, 1997; Mariggio *et al.*, 2006; Nicotra *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2001), se procedió a investigar el estado de fosforilación de esta isoforma. Por tal razón, se realizaron ensayos de WB de las fracciones FMic y Cit de retinas expuestas a Fe<sup>2+</sup> durante 60 minutos. La fosforilación de la cPLA<sub>2</sub> en la Serina 505 se encontró inhibida en las FMic e

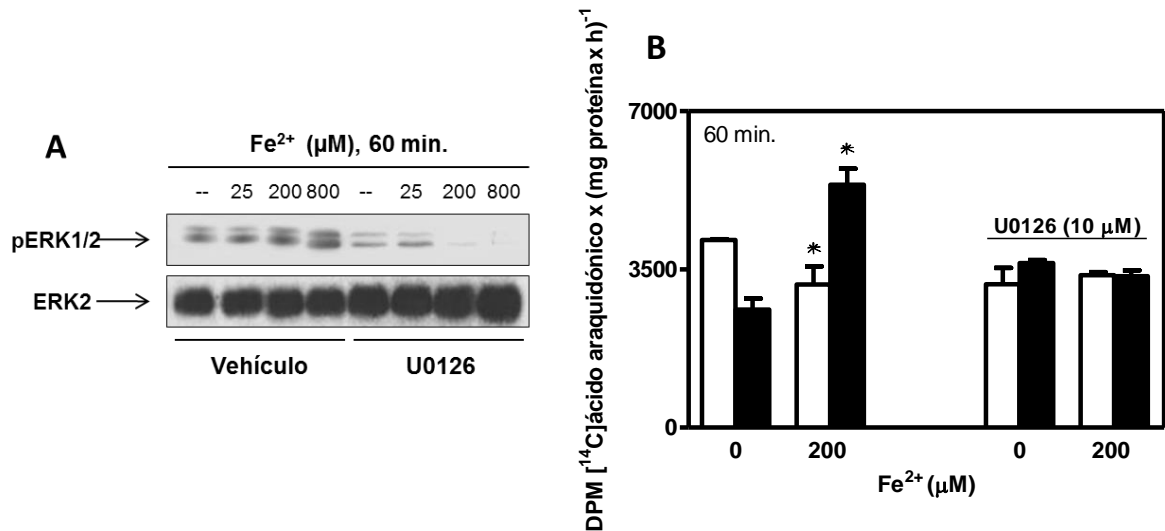
incrementada en los Cit de dichas retinas (**Figura 22**), lo cual es congruente con los niveles obtenidos en la liberación de AA (véase **Figura 20**).



**Figura 22. Evaluación del estado de fosforilación de la cPLA<sub>2</sub> en fracciones microsomales y citosólicas.** Estas fracciones se obtuvieron de las retinas expuestas a insulto oxidativo mediado por Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 μM) durante 60 minutos. La calnexina se utilizó como control de carga y proteína marcadora de fracción. Se muestra una imagen de WB representativa de, al menos, tres experimentos independientes.

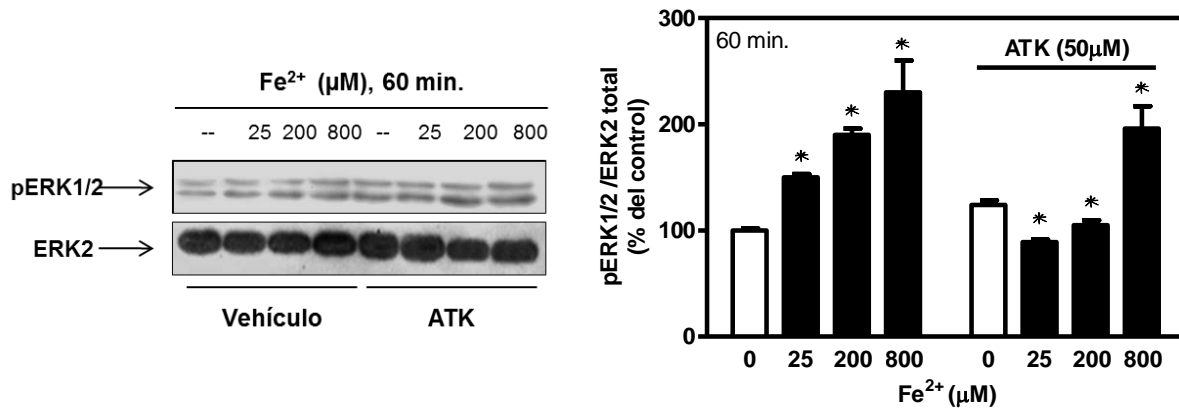
Para establecer la correlación existente entre la activación de las quinasas ERK1/2 y la liberación diferencial de AA durante el estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup>, se analizó la actividad de la cPLA<sub>2</sub> en retinas preincubadas con el inhibidor de las MEK, U0126. En presencia de dicho inhibidor, la fosforilación de las quinasas ERK1/2 se vio inhibida en todas las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> consideradas (**Figura 23A**). Bajo estas mismas condiciones experimentales, se analizó la liberación de AA en estas fracciones. Se encontró que el perfil diferencial de liberación de [<sup>14</sup>C]AA observado entre las fracciones FMic y Cit en ausencia del inhibidor (véase **Figura 20**) queda completamente abolido cuando las retinas fueron preincubadas con U0126. Es decir que, cuando las proteínas MAPK están inhibidas no hay inhibición de la liberación de AA en las FMic y tampoco hay incremento en las Cit provocado por la exposición al Fe<sup>2+</sup> (200 μM) (**Figura 23B**).





**Figura 23. Evaluación del *cross-talk* entre la  $cPLA_2$  y la vía de las quinasas ERK1/2.** Esta evaluación se realizó en retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por  $Fe^{2+}$  durante 60 minutos. **(A)** Evaluación de la fosforilación de las ERK1/2 mediante el ensayo de WB en el HT en presencia del inhibidor de las MEK, U0126. Se muestra una imagen de WB representativa de, al menos, tres experimentos independientes. **(B)** Evaluación de la actividad de la isoforma  $cPLA_2$  en presencia del inhibidor U0126 en FMic (□) y en Cit (■). Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

También se estudió el estado de fosforilación de las quinasas ERK1/2 en presencia del inhibidor de la isoforma  $cPLA_2$ , ATK, fue capaz de inhibir el incremento en la fosforilación de las quinasas ERK1/2 previamente observado en las concentraciones de  $Fe^{2+}$  25 y 200  $\mu M$  (**Figura 24**). En la concentración de  $Fe^{2+}$  800  $\mu M$ , la activación de ERK1/2 no se vio afectada por la presencia del inhibidor ATK. Esto demuestra que existe una regulación recíproca de ambas vías que es particularmente activa durante la injuria oxidativa inducida por  $Fe^{2+}$  a concentraciones bajas e intermedias.

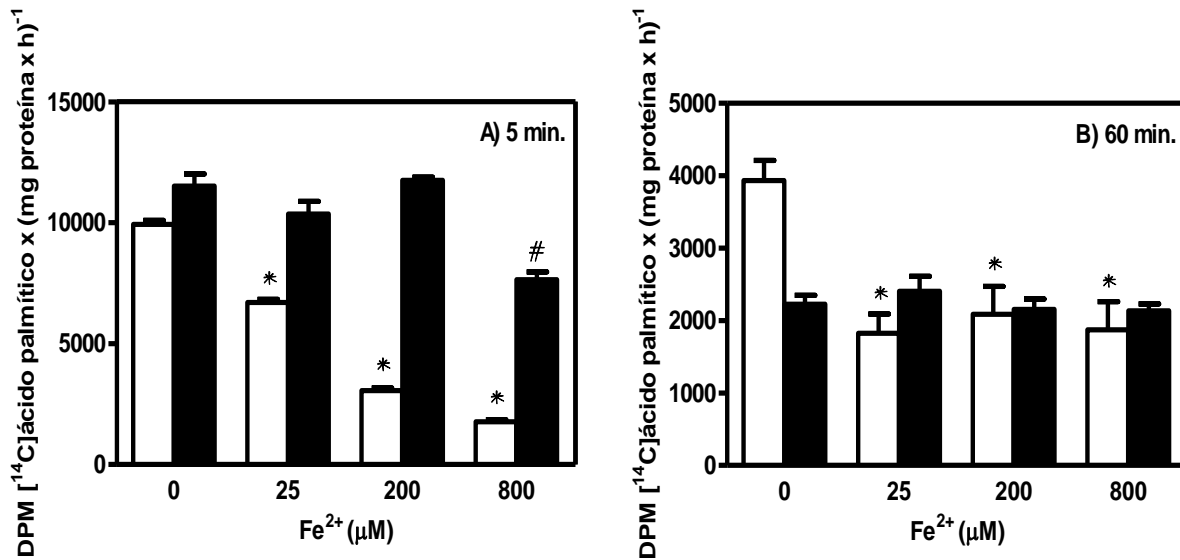


**Figura 24. Evaluación del *cross-talk* entre la  $cPLA_2$  y la vía de las quinasas ERK1/2.** Esta evaluación se realizó en el HT obtenido a partir de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por  $Fe^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu M$ ) durante 60 minutos. Estado de fosforilación de las quinasas ERK1/2 analizado mediante ensayos de WB en presencia de ATK, inhibidor de la isoforma  $cPLA_2$ , y su respectiva cuantificación. Se muestra una imagen de WB representativa de, al menos, tres experimentos independientes. Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada grupo ( $p < 0,05$ , ANOVA).

#### **PLA<sub>2</sub> independiente de calcio (iPLA<sub>2</sub>).**

La actividad de la isoforma iPLA<sub>2</sub> fue analizada en presencia de [<sup>14</sup>C]DPPC exógeno como sustrato, en un *buffer* conteniendo EDTA 10 mM y ATP 2 mM. En la **Figura 25** se muestran los resultados de la evaluación de la liberación de [<sup>14</sup>C]PAL en las fracciones FMic y Cit de la retina previamente expuesta al estrés oxidativo inducido por incubación con  $Fe^{2+}$  durante 5 (**Figura 25A**) y 60 minutos (**Figura 25B**). Luego de 5 minutos de incubación con el agente oxidante, la liberación de [<sup>14</sup>C]PAL se observó inhibida en las FMic con respecto a los controles, en un 33, 70 y 83 % en las concentraciones de  $Fe^{2+}$  25, 200 y 800  $\mu M$ , respectivamente. En los Cit, se observó una disminución en la liberación de [<sup>14</sup>C]PAL del 33 % solo en la concentración de  $Fe^{2+}$  800  $\mu M$ . Es importante destacar que en todas las concentraciones de  $Fe^{2+}$  consideradas, los niveles de liberación de [<sup>14</sup>C]PAL fueron más altos en los Cit que los observados en las FMic (**Figura 26A**). Luego de 60 minutos de exposición al  $Fe^{2+}$ , se observó una fuerte inhibición de la liberación (alrededor del 50 %) de [<sup>14</sup>C]PAL en las fracciones

microsomales. De todos modos, a este tiempo de incubación, no se observaron diferencias debidas a la presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  en la actividad de la isoforma  $\text{iPLA}_2$  entre las fracciones FMic y Cit, a excepción de la condición control (**Figura 25B**). Es importante destacar que en todas las concentraciones consideradas la actividad de la isoforma  $\text{iPLA}_2$  fue mayor a los 5 minutos de exposición al  $\text{Fe}^{2+}$  que a los 60 minutos de exposición al metal.



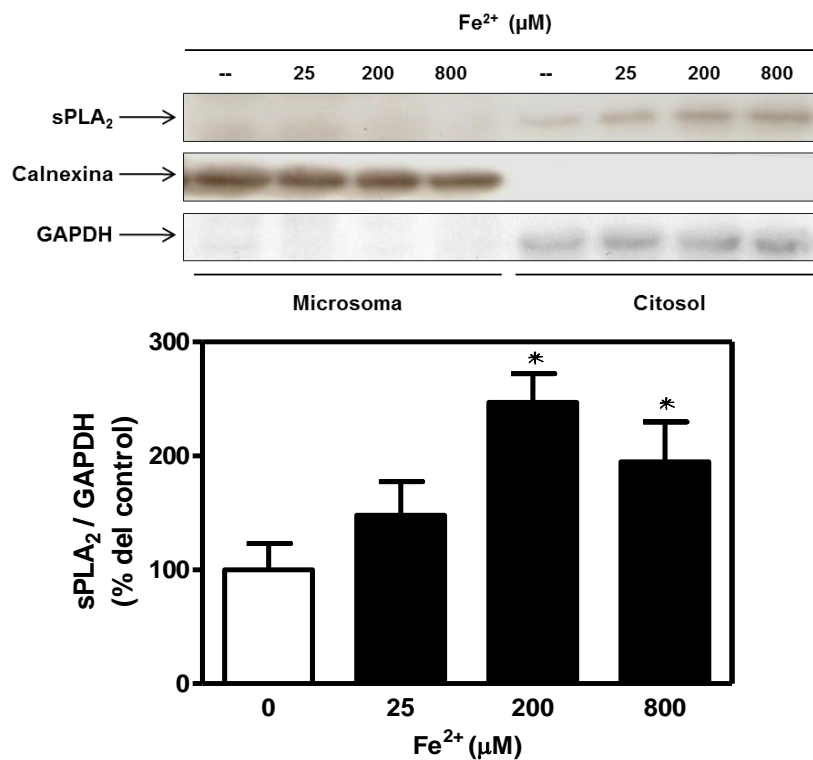
**Figura 25. Evaluación de la liberación de  $[^{14}\text{C}]\text{PAL}$  en las fracciones microsomal y citosólica de la retina.** Esta evaluación se llevó a cabo en retinas previamente expuestas, durante 5 (**A**) y 60 minutos (**B**), al estrés oxidativo inducido por incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) en FMic ( $\square$ ) y en Cit ( $\blacksquare$ ). \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control del grupo de las muestras microsomales ( $p < 0,05$ , ANOVA). # Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control del grupo de las muestras citosólicas ( $p < 0,05$ , ANOVA).

Por lo tanto, se puede observar que la liberación de ácidos grasos catalizada por las isoformas  $\text{cPLA}_2$  e  $\text{iPLA}_2$  presenta un perfil similar en respuesta al estrés oxidativo en la FMic mientras que en los Cit el AA adquiere un rol protagónico.

### **$\text{PLA}_2$ secretoria ( $\text{sPLA}_2$ ).**

Se procedió también a estudiar la participación de la isoforma  $\text{sPLA}_2$  en nuestro modelo. Por tal razón, primeramente se evaluó la localización subcelular de la

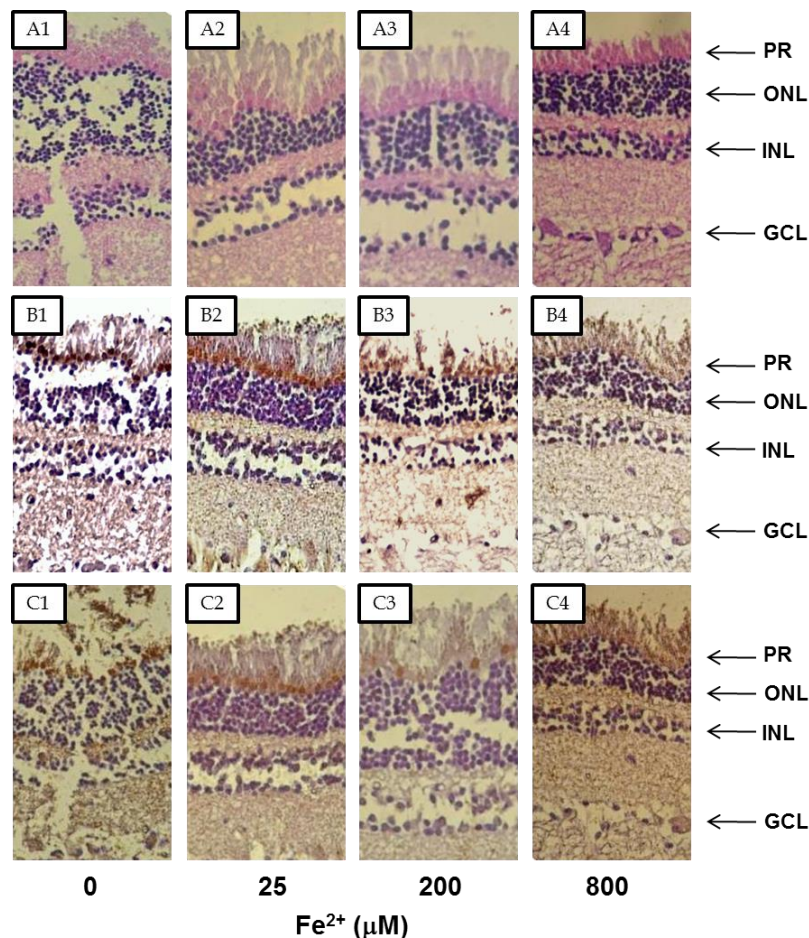
esta isoforma en las distintas fracciones de la retina. Se observó una localización subcelular diferencial de la sPLA<sub>2</sub> inducida por Fe<sup>2+</sup>. Esta isoforma se encontró asociada fundamentalmente con los Cit obtenidos de retinas expuestas al Fe<sup>2+</sup> y se observó que la presencia de la sPLA<sub>2</sub> en esta fracción aumenta de una manera dependiente de la concentración de Fe<sup>2+</sup> (**Figura 26**), siendo dicho incremento del 150 % en la concentración de Fe<sup>2+</sup> 200 μM y del 90 % en la concentración de Fe<sup>2+</sup> 800 μM, en comparación con los controles.



**Figura 26. Evaluación de la localización subcelular de la isoforma sPLA<sub>2</sub>.** Esta evaluación se llevó a cabo en las fracciones FMic y Cit de la retina previamente expuesta al estrés oxidativo inducido por incubación con Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 μM) durante 60 minutos. Ensayo de WB. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes, y su respectiva cuantificación de la expresión de la isoforma sPLA<sub>2</sub> en la Cit. \*Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control (p<0,05, ANOVA).

Además, por medio de la técnica de IHC se evaluó la distribución de la isoforma sPLA<sub>2</sub> en la retina durante la toxicidad retiniana inducida por Fe<sup>2+</sup>. Previamente, se realizó una tinción de H&E para asegurar la conservación de la

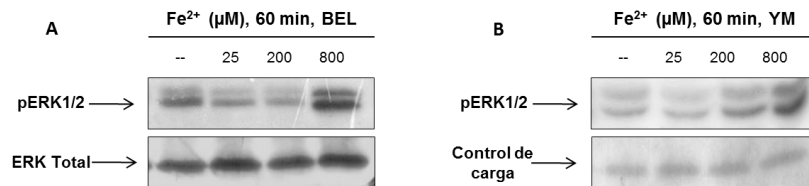
morfología del tejido, la cual no se vio significativamente afectada durante la incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  (**Figura 27A**). Un obstáculo a superar fue la gran labilidad de los segmentos externos de los PR debido a que solo por la suave agitación mecánica sufrida durante la incubación, suelen desprenderse. Se observó una distribución diferencial de la sPLA<sub>2</sub> en las retinas expuestas a la injuria oxidativa. En condiciones control, se observó que esta isoforma se encuentra homogéneamente distribuida en todas las capas del tejido de la retina. Sin embargo, al analizar las retinas incubadas con  $\text{Fe}^{2+}$ , la sPLA<sub>2</sub> se localizó principalmente en la capa de células fotorreceptoras (**Figuras 27B y C**).



**Figura 27. Evaluación de la distribución en el tejido de la isoforma sPLA<sub>2</sub> en cortes histológicos de la retina.** Evaluación realizada tras exponer la retina durante 60 minutos al estrés oxidativo inducido por incubación con  $\text{Fe}^{2+}$  (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ). **(A)** Tinción de H&E. **(B)** y **(C)** Tinción de Perls. PR: Capa de PR. ONL: Capa nuclear externa. INL: Capa nuclear interna. GCL: Capa de células ganglionares. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes.

### **Cross-talk entre las isoformas de la PLA<sub>2</sub> (iPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub>) y las quinasas ERK1/2.**

En presencia de BEL e YM 26734 (inhibidores de las isoformas iPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub>, respectivamente) se estudió el estado de fosforilación de las quinasas ERK1/2 (**Figura 28A**). Se observó que en presencia del inhibidor BEL no hay incremento en la fosforilación debido al metal (véase **Figura 15**) en las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> 25 y 200 μM, aunque sí hay incremento al incubar las retinas con Fe<sup>2+</sup> 800 μM. Por otro lado, al estudiar cómo afecta el inhibidor YM 26734 al estado de fosforilación de las quinasas ERK1/2, fue posible observar que el incremento en la fosforilación de estas quinasas nuevamente se retrasa en las concentraciones más altas de Fe<sup>2+</sup> (**Figura 28B**, compárese con **Figura 15A**).



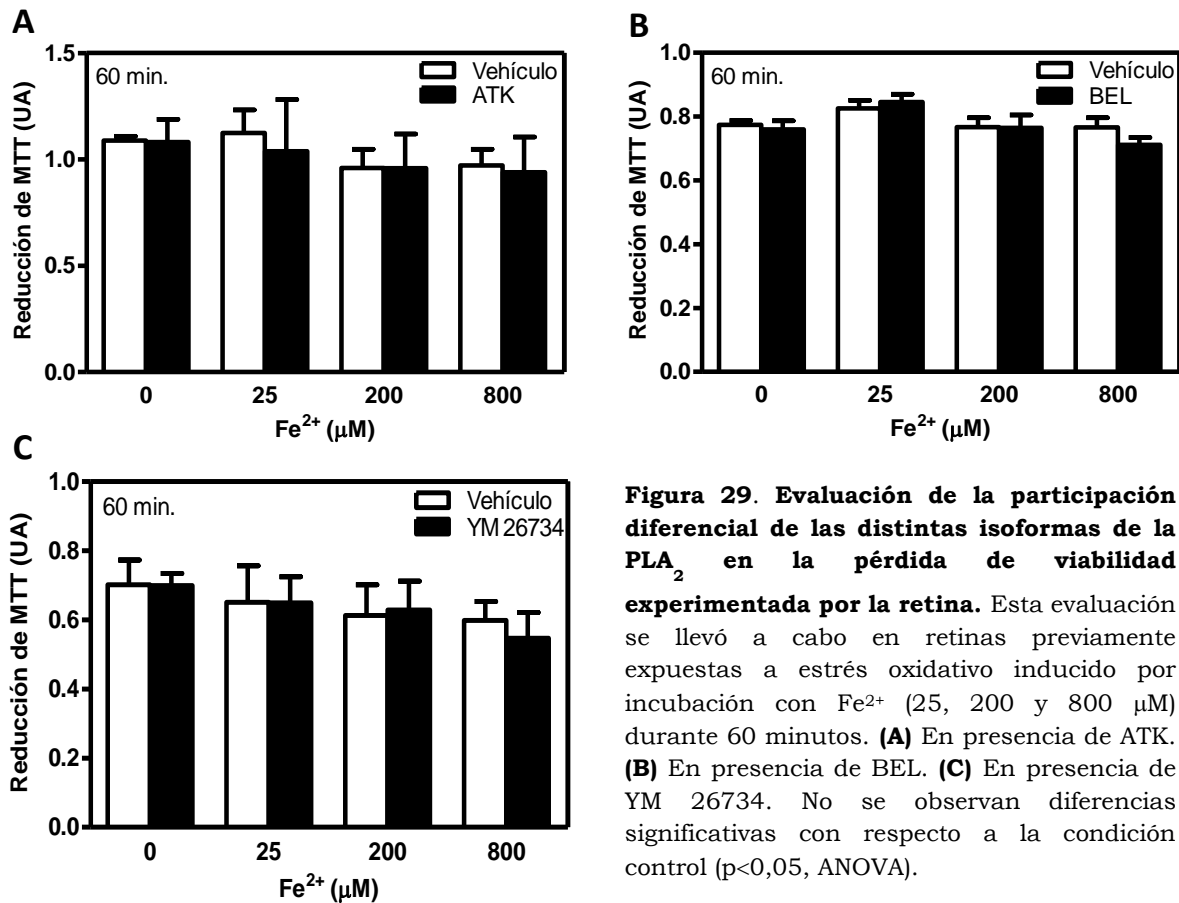
**Figura 28. Evaluación del rol de las isoformas iPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub> en la fosforilación de las quinasas ERK1/2.** Esta evaluación se realizó en el HT de las retinas previamente expuestas a estrés oxidativo inducido por incubación con Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800 μM) durante 60 minutos. Las retinas fueron preincubadas en presencia de **(A)** BEL, inhibidor de la isoforma iPLA<sub>2</sub> o **(B)** YM 26734, inhibidor de la isoforma sPLA<sub>2</sub>. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes.

### **Evaluación del rol de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> frente al daño inducido por Fe<sup>2+</sup>.**

Para caracterizar el rol de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> en el daño oxidativo de la retina, analizamos el estado de los parámetros estudiados en presencia y ausencia de inhibidores específicos para dichas isoformas. Por tal motivo, las retinas fueron preincubadas durante 30 minutos con uno de los

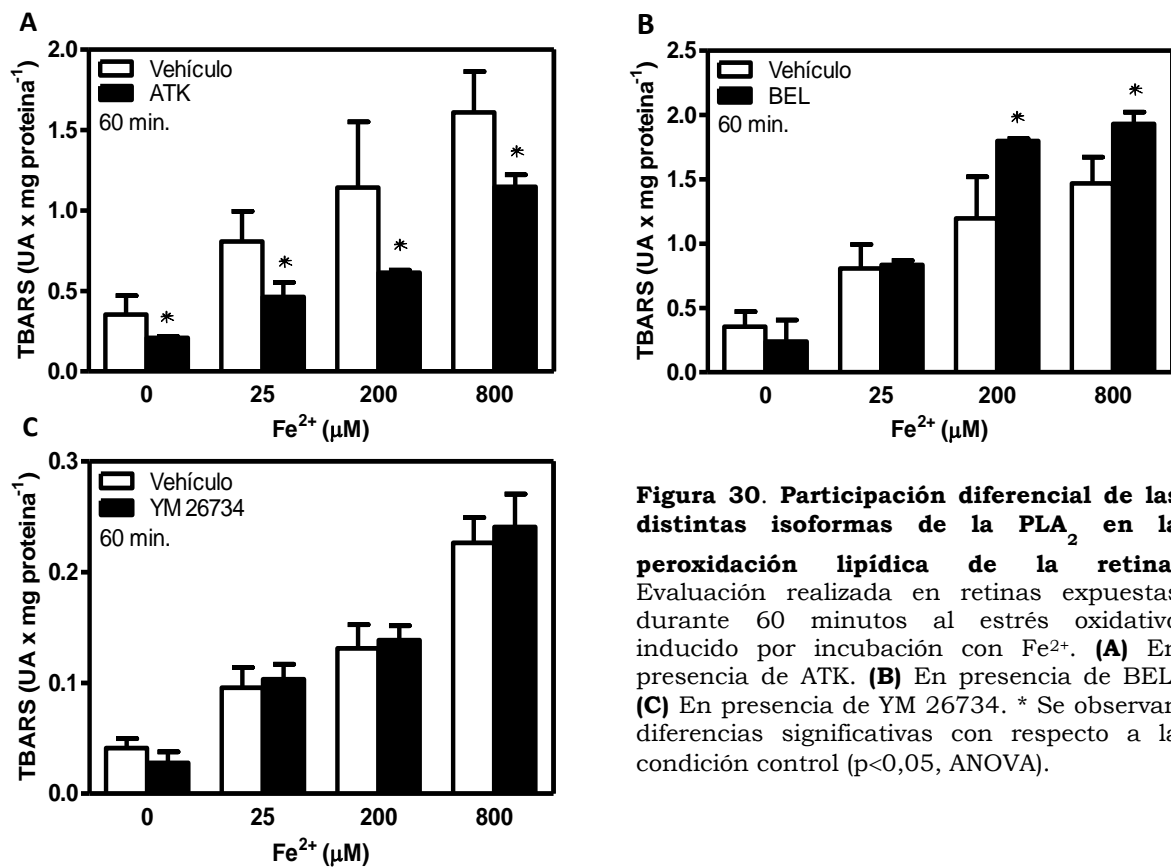
siguientes inhibidores: ATK 50  $\mu\text{M}$  (inhibidor de la isoforma cPLA<sub>2</sub>), BEL 25  $\mu\text{M}$  (inhibidor de la isoforma iPLA<sub>2</sub>) o YM 26734 10  $\mu\text{M}$  (inhibidor de la isoforma sPLA<sub>2</sub>). Posteriormente, se expusieron las retinas según se detalló anteriormente y se procedió a realizar los distintos ensayos.

Para determinar el rol de las isoformas de la PLA<sub>2</sub> en la viabilidad celular de la retina, se midió la reducción del MTT en presencia de los inhibidores de la PLA<sub>2</sub> anteriormente mencionados. Ninguno de ellos modificó los niveles de viabilidad celular de la retina en las diferentes condiciones experimentales consideradas (**Figura 29, A: ATK; B: BEL; C: YM 26734**).



**Figura 29. Evaluación de la participación diferencial de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> en la pérdida de viabilidad experimentada por la retina.** Esta evaluación se llevó a cabo en retinas previamente expuestas a estrés oxidativo inducido por incubación con Fe<sup>2+</sup> (25, 200 y 800  $\mu\text{M}$ ) durante 60 minutos. **(A)** En presencia de ATK. **(B)** En presencia de BEL. **(C)** En presencia de YM 26734. No se observan diferencias significativas con respecto a la condición control ( $p < 0,05$ , ANOVA).

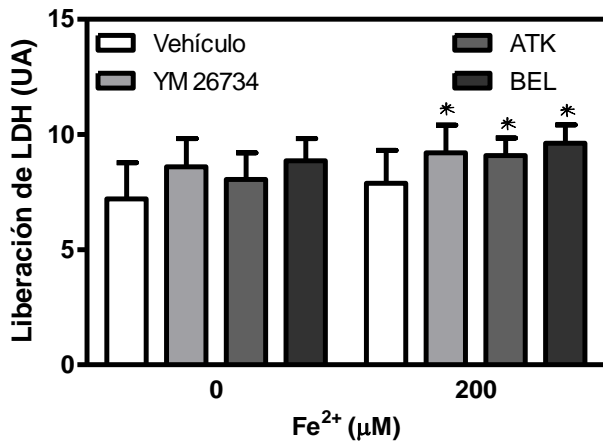
Con la finalidad de determinar el rol de las isoformas de la PLA<sub>2</sub> en la generación de productos de peroxidación lipídica, el ensayo de TBARS también fue llevado a cabo en presencia de los inhibidores anteriormente mencionados. En presencia del inhibidor ATK, se observó una disminución de un 40, 40, 47 y 83 % en los niveles de TBARS en las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> de 25, 200 y 800 μM, respectivamente, con respecto a las mismas condiciones en ausencia del inhibidor (**Figura 30A**). Por otro lado, en presencia del inhibidor BEL, la formación de TBARS aumentó en un 50 y 30 % en las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> 200 y 800 μM, respectivamente (**Figura 30B**). En presencia del inhibidor YM 26734 no se observaron cambios significativos en los niveles de peroxidación lipídica (**Figura 30C**). En base a estos resultados se puede concluir que: i) la isoforma cPLA<sub>2</sub> promueve la peroxidación lipídica, ii) la isoforma iPLA<sub>2</sub> tiene un rol protector frente a la misma, e iii) la isoforma sPLA<sub>2</sub> no parece tener efecto alguno sobre este parámetro.



**Figura 30. Participación diferencial de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> en la peroxidación lipídica de la retina.** Evaluación realizada en retinas expuestas durante 60 minutos al estrés oxidativo inducido por incubación con Fe<sup>2+</sup>. **(A)** En presencia de ATK. **(B)** En presencia de BEL. **(C)** En presencia de YM 26734. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control (p<0,05, ANOVA).



También se evaluó la liberación de LDH al medio en presencia y ausencia de estos inhibidores. Los resultados con los inhibidores ATK, BEL e YM 26734 se muestran en la **Figura 31**. Ninguno de ellos produjo cambios significativos con respecto a las condiciones control.



**Figura 31. Participación diferencial de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> en la pérdida de integridad de la membrana plasmática de la retina.** Evaluación realizada a través de la liberación de LDH al medio de incubación en retinas previamente expuestas a estrés oxidativo inducido por incubación con Fe<sup>2+</sup> durante 60 minutos, en presencia de los inhibidores de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub>. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control (p < 0,05, ANOVA).

### **Parte III: Participación de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> en los procesos inflamatorios frente al daño inducido por Fe<sup>2+</sup>.**

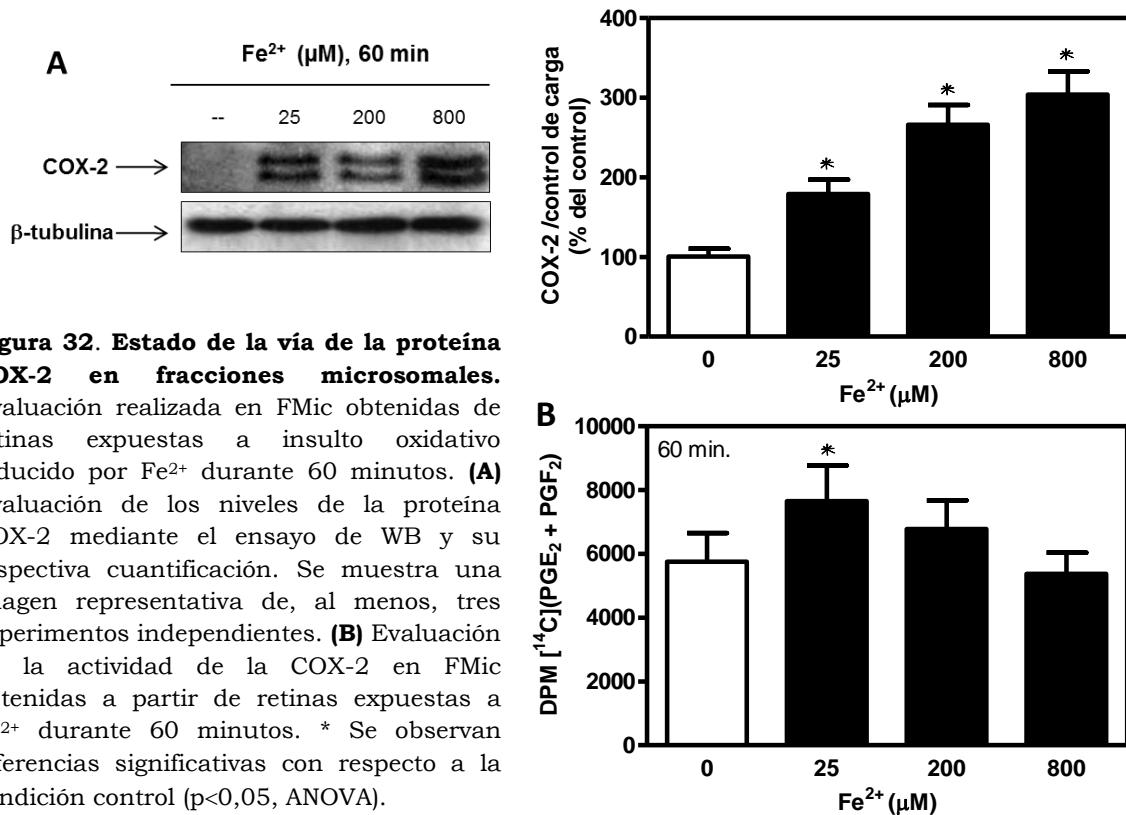
Teniendo en cuenta que las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> se encuentran activas durante los procesos de daño inducidos por Fe<sup>2+</sup>, se procedió a investigar si hay relación entre estas isoformas y los procesos inflamatorios que, se sabe, se producen en el transcurso de la AMD. Tanto la proteína COX-2 como la isoforma cPLA<sub>2</sub> están involucradas en la producción de eicosanoides y también participan en varios procesos patológicos, tales como la progresión de distintos tipos de cáncer y en los eventos de estrés oxidativo (Linkous *et al.*, 2010). Por esta razón, se procedió a estudiar si la toxicidad retiniana inducida por Fe<sup>2+</sup> afecta la expresión de COX-2 y la regulación del factor de transcripción NF-κB, ambos importantes blancos de la respuesta inflamatoria.

#### **Estado de la vía de COX-2.**

Dado que la COX-2 es una proteína clave en el desarrollo de todo proceso inflamatorio, cuyo sustrato de reacción es el AA (20:4) liberado por acción de las PLA<sub>2</sub>s, se analizó la implicancia de esta proteína en la respuesta a la injuria oxidativa inducida por Fe<sup>2+</sup>. A partir de la acción de la proteína COX-2 se producen varios metabolitos bioactivos, como por ejemplo, las PG y los tromboxanos, muy importantes tanto en la señalización celular como así también en el proceso inflamatorio.

Al evaluar la expresión de la proteína COX-2 mediante el ensayo de WB pudimos determinar que su asociación con las membranas microsomales aumenta en función de la concentración de Fe<sup>2+</sup> utilizada, siendo un 80, 170 y 210 % más alta en las condiciones de Fe<sup>2+</sup> 25, 200 y 800 μM, respectivamente, que en la condición control (**Figura 32A**). También se realizaron ensayos

enzimáticos, utilizando [ $^{14}\text{C}$ ]AA como sustrato para evaluar la actividad de esta enzima en las FMic. La generación de PG, más específicamente de las prostaglandinas  $\text{PGF}_2$  y  $\text{PGE}_2$ , se observó incrementada en un 32 % en las retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  (**Figura 32B**), no pudiéndose registrar un incremento a concentraciones más altas de dicho metal.



**Figura 32. Estado de la vía de la proteína COX-2 en fracciones microsomales.** Evaluación realizada en FMic obtenidas de retinas expuestas a insulto oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$  durante 60 minutos. **(A)** Evaluación de los niveles de la proteína COX-2 mediante el ensayo de WB y su respectiva cuantificación. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes. **(B)** Evaluación de la actividad de la COX-2 en FMic obtenidas a partir de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control ( $p < 0,05$ , ANOVA).

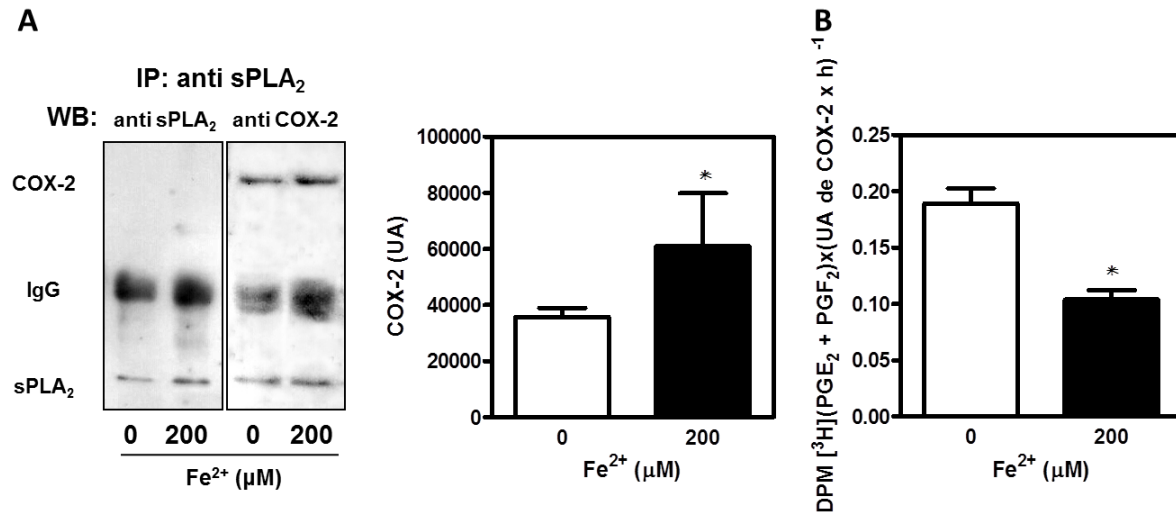
El AA es sustrato de varias enzimas de la vía de la inflamación, no solo de la proteína COX-2. También puede ser utilizado por la enzima LOX que genera los ácidos HPETE (ácido hidroxiperoxi-eicosatetraenoico), a partir de los cuales posteriormente se forman los ácidos HETE (Holinstat *et al.*, 2011; Taha *et al.*, 2012; Walters *et al.*, 2011). Se estudió también la formación de estos productos mediante el ensayo de la actividad enzimática de la LOX en las FMic, encontrándose a los 30 minutos de reacción un aumento del 53 % en la

producción de HETE en la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  25  $\mu\text{M}$  (resultados no mostrados).

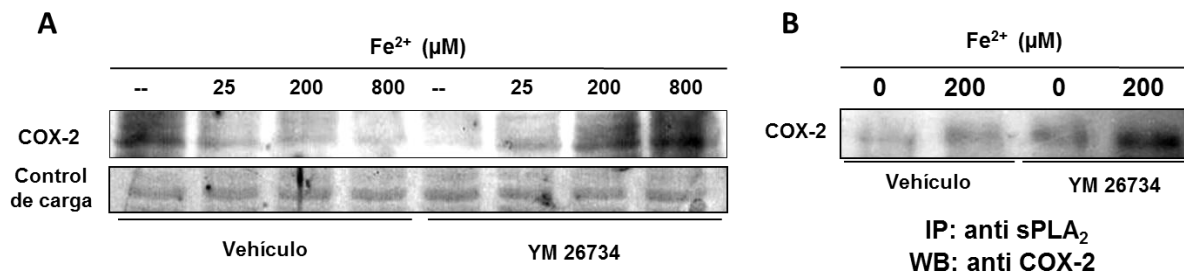
Como se demostró anteriormente, la toxicidad retiniana inducida por  $\text{Fe}^{2+}$  promueve un incremento en la expresión de COX-2 y su asociación con las membranas microsomales. Con la finalidad de comprender mejor la modulación de dicha proteína en este modelo de degeneración inducida por estrés oxidativo, estudiamos la existencia de una posible asociación entre la COX-2 y la isoforma sPLA<sub>2</sub>. Por esta razón, la sPLA<sub>2</sub> fue inmunoprecipitada a partir de retinas previamente expuestas a una concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$  durante 60 minutos, para posteriormente co-inmunoprecipitar la proteína COX-2. Se observó un incremento en la asociación entre COX-2 y la isoforma sPLA<sub>2</sub> cuando las retinas son incubadas con  $\text{Fe}^{2+}$  (**Figura 33A**). La producción de las prostaglandinas PGF<sub>2</sub> y PGE<sub>2</sub>, ambos productos mayoritarios de la actividad de la COX-2, también fue analizada en los IP usando [<sup>3</sup>H]AA como sustrato. La producción de [<sup>3</sup>H]PGF<sub>2</sub> y de [<sup>3</sup>H]PGE<sub>2</sub> se vio disminuida en los IP obtenidos de las retinas previamente expuestas a una concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  200  $\mu\text{M}$ , en comparación con los controles (**Figura 33B**).

Para una mayor comprensión del rol de la isoforma sPLA<sub>2</sub> en la modulación de la proteína COX-2, se evaluaron los niveles de expresión de esta proteína en el HT de las retinas expuestas a estrés oxidativo, las cuales habían sido previamente incubadas en presencia del inhibidor YM 26734. Se observó que la inhibición de la actividad de la sPLA<sub>2</sub> promueve un aumento de los niveles de COX-2 en condiciones de estrés oxidativo (**Figura 34A**). Este incremento provoca una mayor asociación entre la proteína COX-2 y la isoforma sPLA<sub>2</sub>, tal como lo

muestran los IP realizados a partir de retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  en presencia del inhibidor YM 26734 (**Figura 34B**).



**Figura 33. Asociación entre la isoforma sPLA<sub>2</sub> y la proteína COX-2 en fracciones microsomales.** Evaluación realizada en FMic obtenidas de retinas expuestas a insulto oxidativo mediado por  $\text{Fe}^{2+}$  durante 60 minutos. **(A)** Inmunoprecipitación de la isoforma sPLA<sub>2</sub> y co-inmunoprecipitación de la proteína COX-2 mediante ensayo de IP y su respectiva cuantificación. **(B)** Evaluación de la actividad de la proteína COX-2 en los inmunoprecipitados. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control ( $p < 0,05$ , ANOVA).



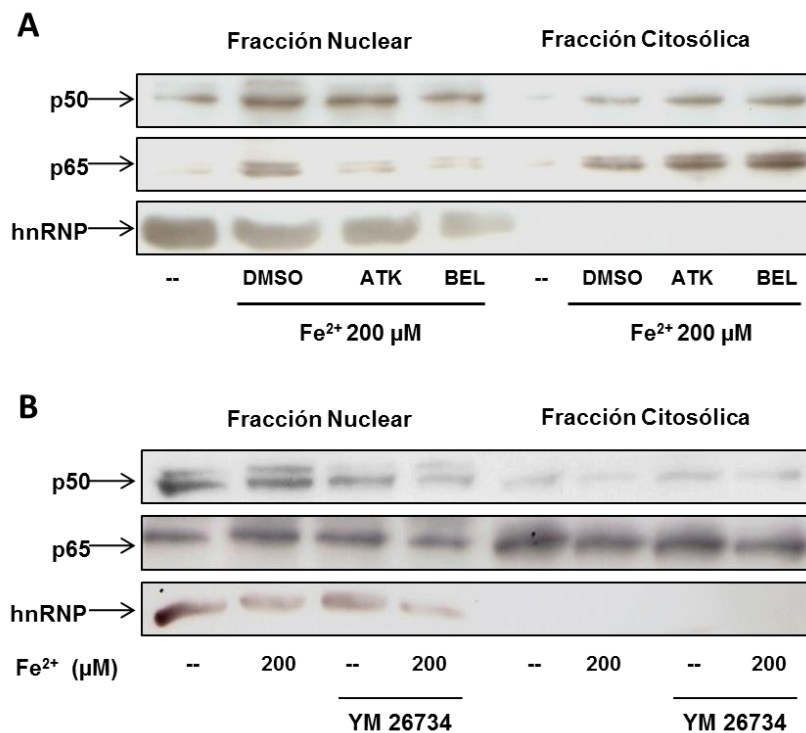
**Figura 34. Expresión de la proteína COX-2.** Evaluación realizada en el HT de retinas expuestas a insulto oxidativo mediado por  $\text{Fe}^{2+}$  durante 60 minutos en presencia y ausencia del inhibidor YM 26734. **(A)** Expresión de la proteína COX-2 analizada mediante la técnica de WB en el HT. **(B)** Inmunoprecipitación de la isoforma sPLA<sub>2</sub> y evaluación de la asociación de la proteína COX-2 en los IP en presencia y ausencia del inhibidor YM 26734. Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control ( $p < 0,05$ , ANOVA).

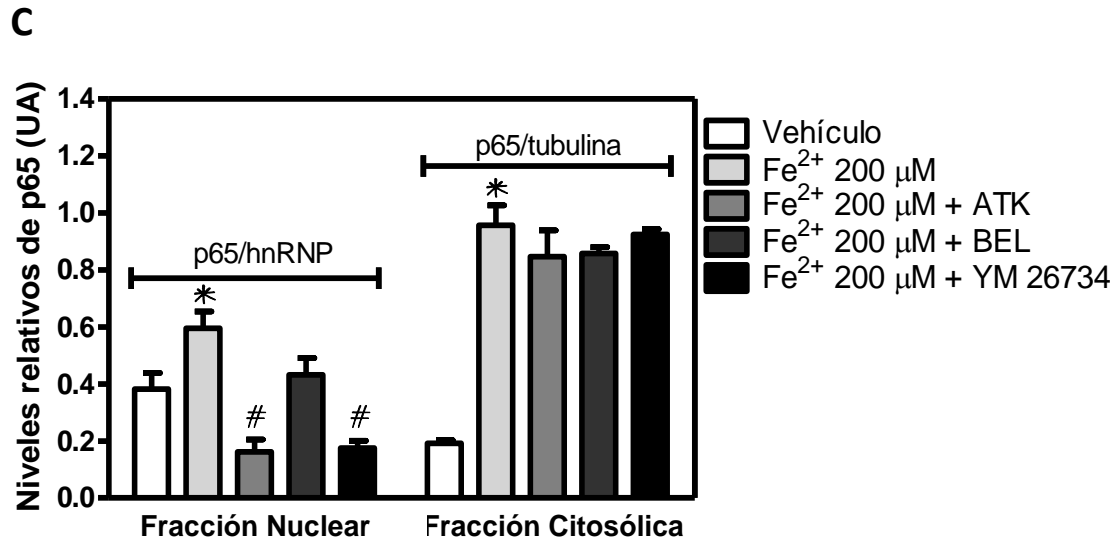
### **Estado de la vía del factor NF- $\kappa$ B.**

Uno de los mecanismos más comúnmente gatillado por el estrés oxidativo es la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Cindrova-Davies *et al.*, 2007; Oeckinghaus *et al.*, 2011). Si bien al momento de regular la transcripción génica, hay varios homo- y heterodímeros formados por las distintas subunidades del factor NF- $\kappa$ B capaces de llevar a cabo esta acción, la forma activa más común de este factor es la que se compone de las subunidades p50 y p65. La proteína NF- $\kappa$ B p50 es generada por el procesado de una proteína precursora de 105 kDa y se une a la proteína NF- $\kappa$ B p65 para formar el complejo NF- $\kappa$ B inactivo con esta proteína. En dicho complejo y en condiciones de reposo, tanto la proteína p50 como como la p65 se encuentran unidas a las proteínas inhibitorias I $\kappa$ B (del inglés *inhibitor of NF- $\kappa$ B*), las cuales secuestran los complejos del factor NF- $\kappa$ B en el citoplasma. Frente a un estímulo, se induce la degradación de I $\kappa$ B, la cual se inicia a través de una serie de fosforilaciones llevadas a cabo por el complejo I $\kappa$ B quinasa (Oeckinghaus *et al.*, 2011), permitiendo así que NF- $\kappa$ B p65 y NF- $\kappa$ B p50 puedan migrar al núcleo, donde ejercen su acción como factores de transcripción.

Para determinar la localización de las subunidades de NF- $\kappa$ B, p65 y p50, entre las fracciones FNuc y FCit, se aplicó un método de fraccionamiento subcelular adecuado para el estudio de los factores de transcripción, tal como se indicó en la sección “Materiales y métodos”. Se encontró que la expresión de estas proteínas se ve afectada en respuesta a la incubación con Fe<sup>2+</sup> y en presencia de los inhibidores de la PLA<sub>2</sub>. Por un lado, en presencia de Fe<sup>2+</sup>, tanto la proteína p50 como la proteína p65 translocan a la fracción nuclear, aumentando su localización en un 40 % con respecto a las condiciones control (**Figura 35A y B**). También se observó que, en presencia de los inhibidores ATK (**Figura 35A**) e YM

26734 (**Figura 35B**), la localización nuclear de ambas subunidades del factor disminuye aproximadamente un 70 % en respuesta al estrés oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ . Por el contrario, en las condiciones de estrés oxidativo estudiadas, el inhibidor BEL (**Figura 35A**) no altera la localización nuclear de NF- $\kappa$ B. La expresión citosólica de las subunidades de NF- $\kappa$ B aumenta en presencia del estrés oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$  y no muestra alteraciones provocadas por la inhibición de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> (**Figuras 35A y 35B**). En la **Figura 35C** se observan los niveles de la proteína p65 en relación a las distintas proteínas marcadoras utilizadas para normalizar.



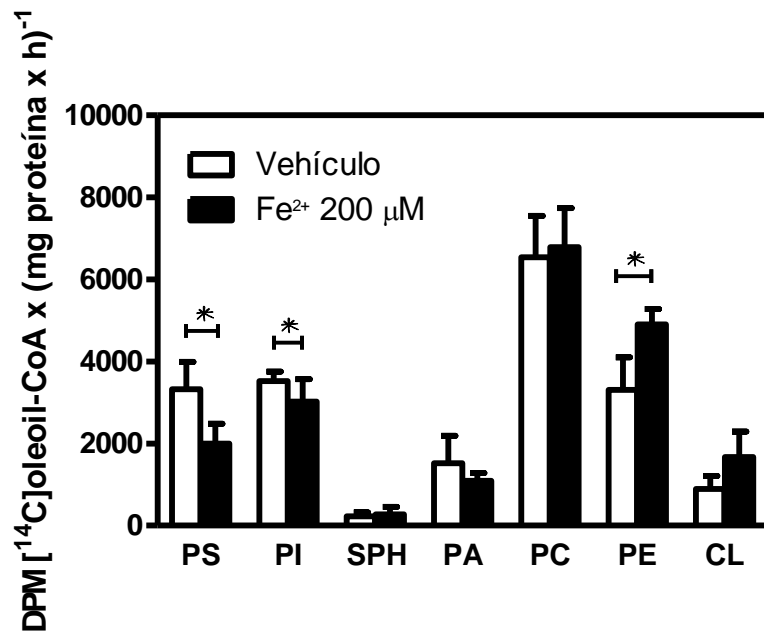


**Figura 35. Expresión y distribución de las subunidades del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, p65 y p50, en fracciones nucleares y citosólicas.** Evaluación realizada en FNuc y en FCit obtenidas de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por Fe<sup>2+</sup> durante 60 minutos, en presencia y ausencia de ATK, BEL e YM 26734, todos inhibidores de la PLA<sub>2</sub>. **(A)** Expresión y distribución de las subunidades de NF- $\kappa$ B, p65 y p50, en presencia de ATK y de BEL evaluadas mediante la técnica de WB en las fracciones anteriormente mencionadas. **(B)** Ídem, en presencia de YM 26734. **(C)** Cuantificaciones de (A) y (B). Se muestra una imagen representativa de, al menos, tres experimentos independientes. \*Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control del grupo de las muestras de las FNuc ( $p < 0,05$ , ANOVA). #Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control del grupo de las muestras de las FCit ( $p < 0,05$ , ANOVA).



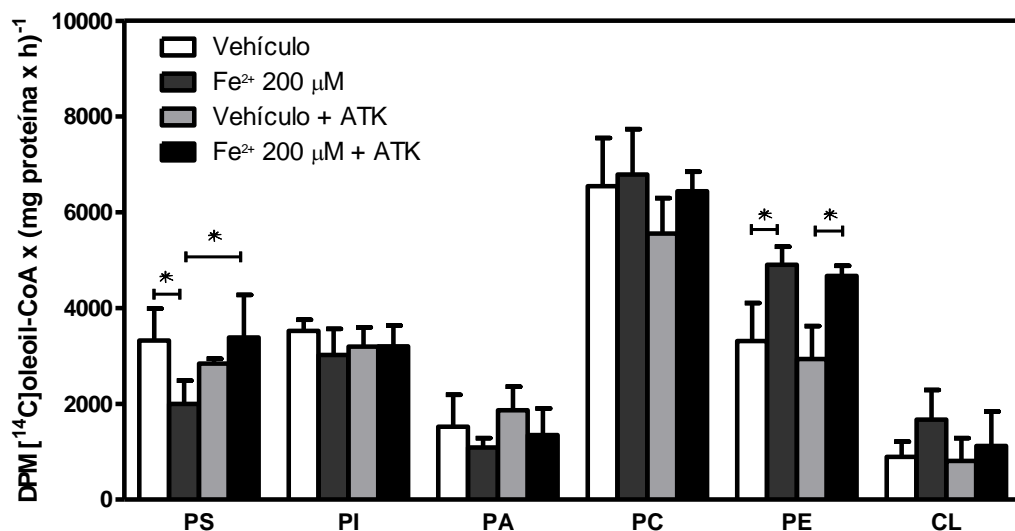
#### Parte IV: Participación de los procesos de acilación en la respuesta a la injuria oxidativa inducida por Fe<sup>2+</sup>.

Como contrapartida de los mecanismos de deacilación en las células, los procesos de acilación de PL son igualmente importantes. Por esta razón, también procedimos a estudiarlos en nuestro modelo. Por lo tanto, para caracterizar la actividad de las AT, los HT obtenidos de las retinas expuestas al estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup> (200 µM) o a su vehículo durante 60 minutos, se incubaron usando [<sup>14</sup>C]oleoil-CoA como sustrato en condiciones que favorecían la acilación de los fosfolípidos. La incorporación de [<sup>14</sup>C]ácido oleico fue analizada en los fosfolípidos PC, PE, PS, PI, PA y CL (**Figura 36**). Se observó que la incubación con Fe<sup>2+</sup> promueve un incremento del 50 % en la incorporación de ácido oleico en el fosfolípido PE y una disminución en la esterificación del mismo en los PL ácidos PS y PI (40 y 15 %, respectivamente). No se observaron cambios en los niveles de acilación de los fosfolípidos PC, PA y CL, con respecto a los controles.

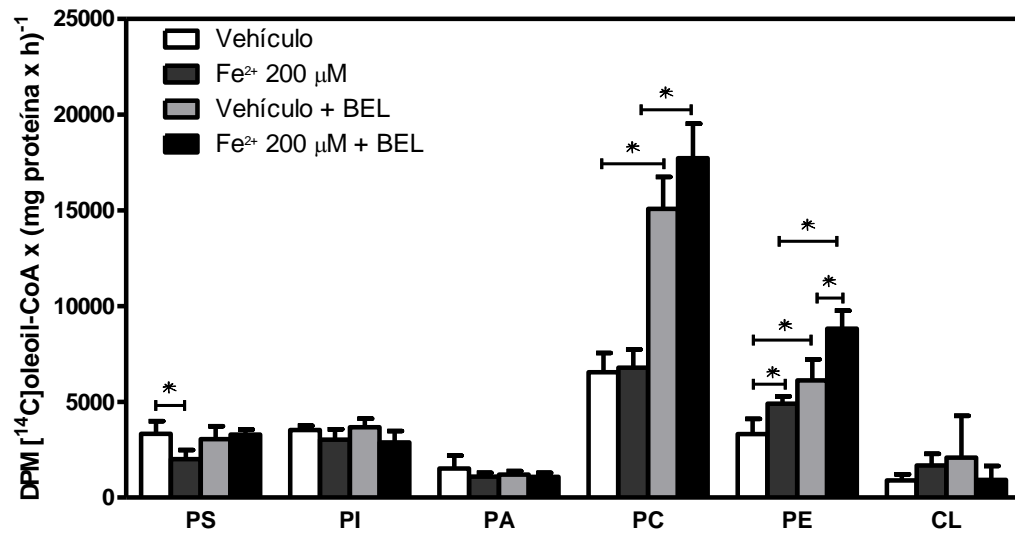


**Figura 36. Actividad de las AT.** Evaluación de esta actividad en los HT obtenidos de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por Fe<sup>2+</sup> durante 60 minutos. \* Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control ( $p < 0,05$ , ANOVA).

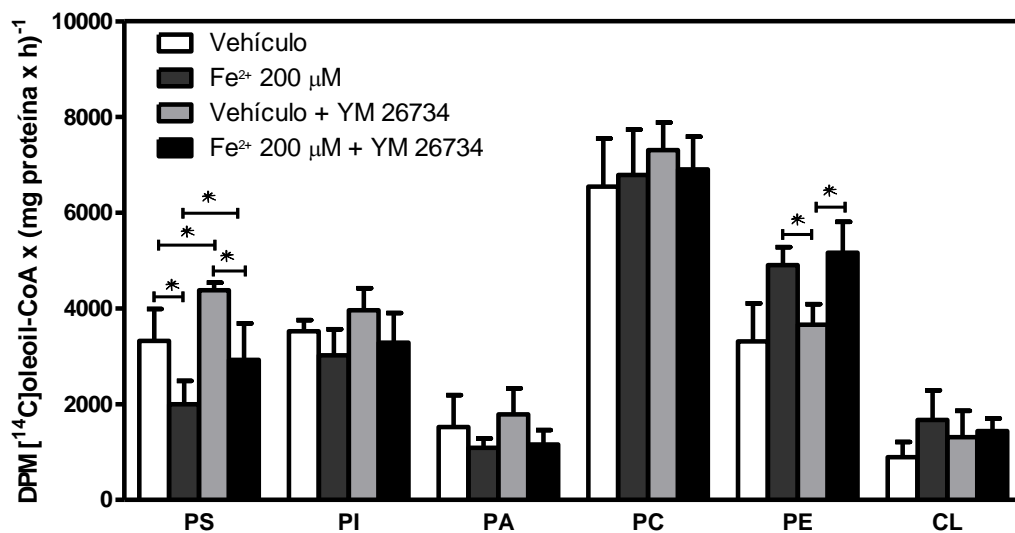
Con la finalidad de determinar la función que las distintas PLA<sub>2</sub> cumplen en los ciclos de acilación/deacilación de los PL de retina, se analizó la actividad de las AT en presencia de los inhibidores ATK, BEL e YM 26734. Se encontró que se restauran los niveles de acilación de la PS a los valores del control en presencia del inhibidor ATK aun cuando las retinas son expuestas a Fe<sup>2+</sup> (**Figura 37**). Se obtuvieron resultados similares para este PL en presencia del inhibidor BEL y del inhibidor YM 26734 (**Figura 38 y 39**, respectivamente). Además, se observaron altos niveles de incorporación de ácido oleico en los fosfolípidos PC y PE en presencia del inhibidor BEL, independientemente de la presencia de Fe<sup>2+</sup>.



**Figura 37. Evaluación de la actividad de AT** en el HT obtenido de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por Fe<sup>2+</sup> durante 60 minutos, en presencia y ausencia del inhibidor de la isoforma cPLA<sub>2</sub>, ATK. Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada fosfolípido ( $p < 0,05$ , ANOVA).



**Figura 38. Actividad de las AT.** Evaluación de esta actividad en los HT obtenidos de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por  $\text{Fe}^{2+}$  durante 60 minutos, en presencia y ausencia del inhibidor de la isoforma  $\text{iPLA}_2$ , BEL. Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada fosfolípido ( $p < 0,05$ , ANOVA).



**Figura 39. Actividad de las AT.** Evaluación de esta actividad en los HT obtenidos de retinas expuestas al insulto oxidativo mediado por  $\text{Fe}^{2+}$  durante 60 minutos, en presencia y ausencia del inhibidor de la isoforma  $\text{sPLA}_2$ , YM 26734. Se observan diferencias significativas con respecto a la condición control de cada fosfolípido ( $p < 0,05$ , ANOVA).

## DISCUSIÓN

La AMD es una enfermedad devastadora que se caracteriza por el deterioro de la mácula, sitio en el que la visión central es severamente afectada. Se trata de una patología que ataca a pacientes adultos de ambos sexos, por lo general, mayores de 60 años, aunque se ha observado que el desarrollo de la enfermedad puede ocurrir en pacientes más jóvenes. Se ha convertido en una patología común en los países desarrollados y en aquellos en vías de desarrollo. Por esta razón, ha cobrado particular interés y nos hemos sumado a los esfuerzos por lograr esclarecer los eventos moleculares que ocurren en ella.

La acumulación de Fe se ha reportado como uno de los signos patognomónicos de retinas con AMD y se sospecha que es responsable de los altos niveles de estrés oxidativo encontrados en la retina de estos pacientes (Blasiak *et al.*, 2009; Blasiak *et al.*, 2011; Dunaief, 2006; Hadziahmetovic *et al.*, 2011a; He *et al.*, 2007). La quelación de Fe se ha planteado como tratamiento de varias enfermedades neurológicas caracterizadas por la acumulación de este metal, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington (Youdim *et al.*, 2005) y la ataxia de Friedreich (Richardson, 2004; Whitnall *et al.*, 2012). Sin embargo, la terapia de quelación aún no es un tratamiento opcional para la AMD (Dunaief, 2006).

Aunque la patogénesis de la AMD ha estado relacionada principalmente con la participación del estrés oxidativo, otra de las grandes causas probables de esta patología son los procesos inflamatorios (Ambati *et al.*, 2013; Campbell & Doyle, 2013; Song & Dunaief, 2013; Whitcup *et al.*, 2013). Un aspecto poco estudiado es la conexión entre el estrés oxidativo inducido por Fe, la RD y los

eventos de señalización asociados a estos procesos inflamatorios. Nuevos estudios que permitan descubrir las bases moleculares que relacionan estos eventos de la patogénesis de la AMD, guiarán hacia nuevas estrategias preventivas o terapéuticas.

El objetivo principal de este trabajo de tesis fue estudiar el rol de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> en retinas bovinas expuestas a concentraciones crecientes de Fe, en un modelo experimental de AMD. Otro de los objetivos fue estudiar la conexión existente entre estas enzimas, claves en el metabolismo de los lípidos peroxidados, y los procesos inflamatorios, principalmente los mediados por la enzima COX-2, debido a que el AA liberado por acción de la PLA<sub>2</sub> es sustrato de esta última. En virtud de que estos eventos inflamatorios pueden provocar la activación de vías de señalización relacionadas con el estrés oxidativo, se analizó también el rol de la vía del factor de transcripción NF-κB y la relación existente entre esta vía y la activación de las PLA<sub>2</sub> y la proteína COX-2.

La PLA<sub>2</sub> genera AA, DHA y lisoPL a partir de la hidrólisis de los PL de las membranas celulares (Kolko *et al.*, 2009). Estos productos se denominan *lípidos bioactivos* ya que tienen una gran variedad de efectos fisiológicos por sí mismos y, además, son sustratos para la síntesis de otros mediadores lipídicos más potentes, tales como los eicosanoides, el PAF, y el 4-hidroxinonenal. Este último, además de ser un producto de peroxidación lipídica, es uno de los metabolitos más citotóxicos y se lo asocia con la muerte apoptótica de las células neuronales (Keller *et al.*, 1997). Se ha observado que la isoforma cPLA<sub>2</sub> está específicamente implicada en la generación de ROS a través de la liberación de AA en los eventos de isquemia cerebral (Adibhatla & Hatcher, 2010). Es sabido, además, que la isoforma cPLA<sub>2</sub> se comporta como mediadora de varios tipos de daño, entre ellos,

el daño inducido por estrés oxidativo (Chakraborti, 2003; Sun *et al.*, 2004; Rao *et al.*, 2013; Farooqui & Horrocks, 2004; Kalyvas & David, 2004; Marusic *et al.*, 2005; Tabuchi *et al.*, 2003). Por otro lado, tras el descubrimiento de las neuroprotectinas, fue posible observar que las PLA<sub>2</sub> están implicadas en mecanismos de señalización involucrados en la neuroprotección (Bazan *et al.*, 2005; Bazan, 2008; Bazan, 2009a; Bazan, 2009b). También se ha descrito, en el caso de la isoforma sPLA<sub>2</sub>, un rol dual frente a los eventos inflamatorios, promoviéndolos en algunos casos pero atenuándolos en otros (Boyanovsky *et al.*, 2010; Giannattasio *et al.*, 2010; Lapointe *et al.*, 2010; Yano *et al.*, 2011; Boilard *et al.*, 2010).

Según se señaló anteriormente, el estrés oxidativo es uno de los factores predisponentes en la patogénesis de la AMD. Las concentraciones altas de Fe<sup>2+</sup>, el cual genera radicales OH<sup>•</sup> altamente reactivos por medio de la reacción de Fenton, pueden inducir o aumentar el estrés oxidativo en la mácula y, de esta manera, ocasionar su deterioro, como el observado en pacientes con AMD. Estas concentraciones patológicas de Fe<sup>2+</sup> encontradas en los ojos de pacientes afectados por AMD provienen, en su mayoría, de un *pool* de Fe quelable. Por esta razón, las retinas bovinas utilizadas para llevar a cabo este trabajo de tesis, se incubaron con concentraciones crecientes de FeSO<sub>4</sub> (una forma de Fe quelable) para obtener un modelo de AMD (Blasiak *et al.*, 2011). Además, la retina bovina es un modelo excelente para el estudio de la AMD ya que el bovino es un mamífero de hábitos diurnos, con lo cual permite una mejor aproximación con las patologías del ser humano. Es importante destacar también que las retinas provenientes de este mamífero son de fácil obtención y proporcionan abundante material de estudio, lo cual permite la aplicación de una amplia variedad de

técnicas. Por último, al ser la retina una especialización del NS, permite obtener lineamientos de lo que podría estar ocurriendo en patologías similares que se desarrollan en el CNS.

Para estudiar este modelo de AMD en retinas bovinas, se procedió, en primer lugar, a la elección de las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  y las fracciones subcelulares o celulares a utilizar. Nos basamos en los resultados presentados en las **Figuras 1-5** para seleccionar las condiciones de estudio. Estas figuras muestran un incremento del daño oxidativo en la retina y la pérdida de viabilidad celular en función del aumento de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizada. Mediante el ensayo de TBARS fue posible observar que las fracciones subcelulares (RH, FMit) son más susceptibles al efecto oxidante del Fe que la retina entera (HT). Esto demuestra que, una vez que la retina pierde su organización tisular, se torna más vulnerable al daño oxidativo, por lo que, evidentemente, debe existir una mayor protección de parte del sistema frente a este tipo de estrés cuando el tejido íntegro es primeramente incubado con el agente oxidante y luego sometido a la homogeneización.

En el caso del ensayo de reducción del MTT, se obtuvieron resultados similares a los obtenidos mediante la técnica de TBARS, observándose que las mitocondrias son más vulnerables al estrés oxidativo cuando se pierde la integridad del tejido. Debido a esto, se optó por estudiar el efecto del estrés oxidativo utilizando el tejido entero para que fuese lo más representativo posible de lo que ocurre *in vivo*. Además, se optó por continuar los estudios con concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  que provocaran incrementos en la acumulación del metal similares a los observados en el proceso normal de envejecimiento (25  $\mu\text{M}$ ) y que permitiesen, además, mimetizar lo que ocurre en condiciones patológicas -200 y

800  $\mu\text{M}$ - (Blasiak *et al.*, 2009; Garcia-Castineiras, 2010; Goralska *et al.*, 2009; Hadziahmetovic *et al.*, 2011a; Hahn *et al.*, 2003b; Hahn *et al.*, 2006; He *et al.*, 2007; Kell, 2009; Loh *et al.*, 2009; Lukinova *et al.*, 2009; Song & Dunaief 2013).

La elección de llevar a cabo el estudio de las actividades de PLA<sub>2</sub> en este modelo se debió a la importante función que tienen estas enzimas. Por un lado, según se señaló anteriormente, la isoforma cPLA<sub>2</sub> libera AA de los fosfolípidos de membrana. El AA tiene un rol innegable en el transcurso del proceso inflamatorio, al ser sustrato de las enzimas COX-2 y LOX, las cuales, a partir de él generarán los metabolitos encargados de guiar el proceso hacia un estado inflamatorio o bien hacia la resolución de la inflamación. Es también interesante el rol de la isoforma iPLA<sub>2</sub> debido a que se ha reportado que esta isoforma participa en la liberación de DHA, el cual luego es sustrato de una serie de enzimas para generar las neuroprotectinas, compuestos que, como su nombre lo indica, protegen a las neuronas de la muerte celular provocada por distintas situaciones de estrés. Por último, la isoforma sPLA<sub>2</sub> tiene roles duales y podría jugar un papel importante al inclinar los eventos hacia la neuroprotección o hacia la injuria neuronal. La actividad de la PLA<sub>2</sub> fue analizada en las distintas fracciones de la retina, con distintas concentraciones de detergente, y en base a los resultados obtenidos y a la bibliografía existente sobre el tema, se optó por continuar el estudio de la actividad en las fracciones subcelulares FMic y Cit.

Mediante técnicas microanalíticas e histoquímicas (ICP-AES y tinción de Perls) pudimos demostrar que hay incorporación de Fe en las retinas cuando estas son incubadas en un medio que contiene FeSO<sub>4</sub>, y que esta incorporación ocurre fundamentalmente en el segmento externo de los PR. El uso de otras técnicas nos permitió investigar si esta acumulación de Fe provoca cambios en la



funcionalidad de la retina. Pudimos demostrar que la acumulación de Fe se encuentra asociada a los cambios observados en los parámetros utilizados para evaluar el daño oxidativo, como por ejemplo, los altos niveles de peroxidación lipídica observados mediante la técnica de TBARS, la disminución de la viabilidad mitocondrial evaluada por la técnica de reducción de MTT, la leve disminución en la capacidad antioxidante del tejido y el aumento leve pero significativo de la permeabilidad de la membrana plasmática evaluada por la técnica de liberación de LDH.

Las retinas expuestas a  $\text{Fe}^{2+}$  presentaron un incremento en la peroxidación lipídica aun después de cortos períodos de incubación. En su máxima concentración (800  $\mu\text{M}$ ), el  $\text{Fe}^{2+}$  provocó que la generación de TBARS fuese entre 5 y 10 veces mayor luego de un período de incubación de 5 y 60 minutos, respectivamente. Además, se estudió la formación de productos tempranos de peroxidación lipídica, como por ejemplo, los dienos y trienos conjugados. Después de 5 minutos de incubación del tejido con el agente oxidante se observó una tendencia al aumento de estos productos, siendo similares las cantidades de dienos y trienos. Por el contrario, después de 60 minutos de incubación de las retinas con  $\text{Fe}^{2+}$  la cantidad de dienos formados superó ampliamente a la de los trienos. No obstante, no se observaron diferencias con respecto a la condición control. Esto permite suponer que el tejido cuenta con una gran capacidad para contrarrestar la acción de los radicales libres que conlleva a la formación de dienos y trienos.

A pesar del importante incremento observado en los productos tardíos de peroxidación lipídica, no se observaron cambios en la viabilidad celular luego de 5 minutos de incubación en ninguna de las concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  analizadas.

Una pequeña disminución (20 % con respecto a los controles) en la función mitocondrial se observó en las concentraciones 200 y 800  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  después de 60 minutos de incubación. Estos resultados están de acuerdo con el grado de disminución observada (menor al 20 %) en la capacidad de captación de radicales libres de la retina, solo observada a 200 y 800  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$  y después de 60 minutos de incubación. En conjunto, estos datos confirman la elevada resistencia de la retina al estrés oxidativo y nos permiten demostrar que, pese al gran insulto oxidativo que sufre la retina (demostrado por los altos niveles de peroxidación lipídica encontrados con la técnica de TBARS), este tejido tiene una gran capacidad de defensa contra el estrés oxidativo debido a que, en los parámetros que permiten evaluar la viabilidad de las células (fundamentalmente, la reducción del MTT y la liberación de LDH), los cambios observados son significativos, pero leves. Los resultados de nuestros experimentos nos han permitido demostrar que, aun con la mayor concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  utilizada, la capacidad antioxidante del tejido no se ve afectada en gran medida. Esto es esperable, ya que este tejido, como se señaló anteriormente, tiene altas concentraciones de antioxidantes endógenos. Además, el epitelio pigmentario, en íntimo contacto con los PR, produce grandes cantidades de ROS al encargarse de la degradación de los segmentos externos de los mismos. Para que la retina pueda continuar con su delicada función, los mecanismos de defensa frente al estrés oxidativo deben ser muchos y variados para resistir el ataque que provienen de todos los frentes, y así continuar funcionando de manera correcta, como se señaló anteriormente. Estos leves cambios observados pueden atribuirse al alto contenido de sustancias antioxidantes (tales como los pigmentos luteína y zeaxantina, entre otros) y a la batería de enzimas protectoras del estrés oxidativo que posee este tejido (Graydon

*et al.*, 2012; Loughman *et al.*, 2012b; Loughman *et al.*, 2012a; Nolan & Beatty, 2012; Stringham *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2006; Loughman *et al.*, 2012b; Maher & Hanneken, 2005; Komeima *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2011; Stahl & Sies, 2005; Usui *et al.*, 2009; Voloboueva *et al.*, 2005; Voloboueva *et al.*, 2007; SanGiovanni & Neuringer, 2012; Sanz *et al.*, 2007; Stahl & Sies, 2005; Usui *et al.*, 2009; Voloboueva *et al.*, 2005).

Para un mejor entendimiento de los eventos de señalización involucrados en el daño oxidativo, se estudió la actividad de las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub>. La familia de la PLA<sub>2</sub> comprende numerosas enzimas, divididas en grupos, que tienen en común la habilidad de liberar, a partir de los PL, ácidos grasos libres y lisoPL, ambas moléculas que actúan tanto en funciones estructurales como de reservorio de mensajeros intracelulares (Burke & Dennis, 2009a; Chakraborti, 2003; Schaloske & Dennis, 2006; Sun *et al.*, 2010; Wang & Kolko, 2010). Estas fosfolipasas se activan de manera específica al ser estimuladas por neurotransmisores, factores neurotróficos, citoquinas, etc. La implicancia fisiológica de la PLA<sub>2</sub> en los procesos de injuria neuronal abre interesantes expectativas para el estudio de los mecanismos de modulación de estas vías de generación de segundos mensajeros lipídicos en un sistema especializado en transducción de señal neuronal como lo es la retina, y en modelos de neurodegeneración.

Múltiples isoformas de la PLA<sub>2</sub> están estimuladas en el proceso de neurotrauma, indicando que esta vía de degradación de lípidos actúa durante la injuria.

Pudimos observar que el daño retiniano inducido por Fe<sup>2+</sup> genera un perfil diferencial de liberación de AA en las fracciones FMic y Cit. La liberación de

[<sup>14</sup>C]AA fue medida en un *buffer* conteniendo calcio y bajo condiciones que promueven la actividad de la isoforma cPLA<sub>2</sub>. Mientras que una acentuada inhibición de la liberación de [<sup>14</sup>C]AA fue detectada en las FMic en todas las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> ensayadas, se observó un incremento en la producción citosólica de [<sup>14</sup>C]AA. Más aún, al comparar la liberación de [<sup>14</sup>C]AA entre microsomas y citosoles, esta fue mayor en la fracción soluble de retinas expuestas a Fe<sup>2+</sup>.

La disminución de la liberación de AA puede deberse, a nuestro entender, a dos factores. Por un lado, una rápida metabolización del AA podría ser la causa para la disminuida detección de [<sup>14</sup>C]AA observada en los microsomas provenientes de retinas expuestas a Fe<sup>2+</sup>. Por otro lado, la disminución de la liberación de AA en microsomas también podría deberse a que la forma activa de la isoforma cPLA<sub>2</sub>, es decir la fracción de enzima que se encuentra fosforilada (pcPLA<sub>2</sub>), se localice en otra fracción frente al estrés oxidativo. Esto puede ser una forma de protección que tiene el sistema, al “secuestrar” a esta enzima que fundamentalmente promueve el daño (al liberar AA) en una fracción pobre de sustrato. En relación con lo anterior, pudimos comprobar un incremento de la pcPLA<sub>2</sub> en los Cit y una disminución de dicha forma activa de la enzima en las FMic.

Por otro lado, para una mejor comprensión del mecanismo de metabolización del AA, y dado que la proteína COX-2 cataliza el segundo paso en la conversión de AA a PG (Fang *et al.*, 2007; Ganesh *et al.*, 2012; Kaufmann *et al.*, 1997; Kishimoto *et al.*, 2010; Rajakariar *et al.*, 2006), razón por la cual podría ser la responsable de la rápida metabolización del AA observada en las FMic, examinamos la expresión de esta proteína en las FMic. En la mayoría de los

tejidos, la proteína COX-1 es considerada responsable de la producción de PG asociada con las funciones homeostáticas en tanto que la proteína COX-2 es usualmente inducida en varios tipos celulares en respuesta al estímulo inflamatorio (Kaufmann *et al.*, 1997). Nosotros logramos demostrar una mayor asociación de la proteína COX-2 a las membranas microsomales en respuesta al estrés oxidativo inducido por la incubación de las retinas con  $\text{Fe}^{2+}$ . Por lo tanto, teniendo en cuenta estos resultados junto con los obtenidos acerca de la localización de la pcPLA<sub>2</sub>, se fortalece la hipótesis según la cual hay un mecanismo compensatorio que excluye la forma activada de la isoforma cPLA<sub>2</sub> de las membranas microsomales durante la toxicidad retiniana inducida por  $\text{Fe}^{2+}$ , de manera de que la proteína COX-2 y la pcPLA<sub>2</sub> se encuentren en distintos compartimentos celulares y de este modo se frene la progresión de la cascada de la inflamación.

Se ha reportado que la activación de las quinasas ERK1/2 se encuentra involucrada tanto en la supervivencia neuronal como en la muerte celular (Barca *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2013; Kim & Wong, 2009; Kim *et al.*, 2009; Laing *et al.*, 2010; Son *et al.*, 2013). Uno de los múltiples blancos fisiológicos de las quinasas ERK1/2 es la isoforma cPLA<sub>2</sub>. Esta es activada cuando las serinas 505 y 727 son fosforiladas por acción de ERK1/2 (Alexander *et al.*, 2004; Balsinde *et al.*, 1999; Burke & Dennis, 2009a; Burke & Dennis, 2009b; Nicotra *et al.*, 2005). Al respecto, demostramos que el estrés oxidativo retiniano inducido por  $\text{Fe}^{2+}$  activa a las quinasas ERK1/2 y que la liberación diferencial del AA entre los compartimentos citosólico y microsomal es un mecanismo regulado por estas quinasas. Estos resultados nos permiten hipotetizar que la activación de ERK durante el estrés oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$

juega un rol preponderante en la regulación de la activación y compartimentalización de la isoforma cPLA<sub>2</sub>. Además, estos resultados están de acuerdo con estudios previos que indican que para que esta isoforma se encuentre activa, necesita estar fosforilada en las posiciones anteriormente mencionadas, lo cual es llevado a cabo por las proteínas MAPK. Por otro lado, para que la activación sea completa, es necesario un aumento del calcio intracelular, lo que la vuelve capaz de translocar a membrana en un proceso mediado por el CaLB (Balsinde *et al.*, 1999; Chakraborti, 2003; Ghosh *et al.*, 2006).

Por otra parte, el estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup> provoca un incremento en la liberación de AA en las Cit y la inhibición de la isoforma cPLA<sub>2</sub> por acción del inhibidor ATK atenúa la activación de las quinasas ERK1/2 a 25 y 200 μM de Fe<sup>2+</sup>, en sustento de la importancia de la PLA<sub>2</sub> como mediadora de la vía de señalización de las proteínas MAPK durante la degeneración retiniana inducida por Fe<sup>2+</sup>. Estos hallazgos, al igual que resultados similares encontrados en la bibliografía [por ejemplo, en el acortamiento circular de las células del túbulo proximal de conejo se observó esta misma relación existente entre la isoforma cPLA<sub>2</sub> y las quinasas ERK1/2 (Alexander *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2007; Mariggio *et al.*, 2006; Nicotra *et al.*, 2005; Zhu *et al.*, 2001)] son un importante soporte a favor de la hipótesis de una regulación bidireccional entre la isoforma cPLA<sub>2</sub> y las quinasas ERK1/2 durante el estrés oxidativo retiniano inducido por Fe<sup>2+</sup>, y sugieren una relación directa entre la actividad de la cPLA<sub>2</sub>, la peroxidación lipídica y la activación de ERK1/2.

Por su parte, se ha observado que la isoforma iPLA<sub>2</sub> está involucrada en la regulación de la fagocitosis de los segmentos externos de los PR llevada a cabo

por el RPE y también podría estarlo en la regulación del recambio fosfolipídico de las células fotorreceptoras (Kolko *et al.*, 2007). Según se señalara anteriormente, se le atribuyen funciones de reparación y remodelación de los PL de membrana por lo que se la ha denominado la isoforma *house-keeping* (Ong *et al.*, 2010; Kolko *et al.*, 2009; Kinsey *et al.*, 2005). En el modelo propuesto, la actividad de la isoforma iPLA<sub>2</sub> fue medida cuantificando la liberación de PAL, la cual mostró un perfil similar al observado para la isoforma cPLA<sub>2</sub> tras tiempos cortos de exposición a la injuria oxidativa (Kolko *et al.*, 2009). Después de 60 minutos de inducido el daño, la liberación de PAL no mostró diferencias significativas entre las fracciones FMic y Cit. De todos modos, es importante observar que después de 5 minutos de exposición al Fe<sup>2+</sup>, la actividad de la iPLA<sub>2</sub> fue mayor que la obtenida luego de 60 minutos de incubación con el metal. Estos resultados permiten suponer una activa participación de esta isoforma, especialmente a tiempos cortos de incubación, en los que podría estar ejerciendo su rol protector al tratar de contrarrestar los efectos de peroxidación lipídica sobre la membrana plasmática mediante el recambio de FA peroxidados, ya que su acción es provocada en la etapa inicial del daño, cuando aún es posible reparar los PL de membrana y reemplazar aquellos que están peroxidados de manera de mantener la homeostasis de la membrana plasmática para un correcto funcionamiento de la misma.

Para esclarecer estos resultados, también se estudió el rol de las distintas PLA<sub>2</sub> en la acilación de fosfolípidos bajo condiciones de estrés oxidativo en la retina. Según se señalara anteriormente, la rápida remoción de FA peroxidados es un mecanismo para preservar la integridad de la membrana plasmática y la viabilidad celular durante los procesos de estrés oxidativo (Murakami *et al.*,

2011). Debido a que en nuestro modelo no observamos grandes cambios en la integridad de la membrana plasmática ni en la viabilidad celular, cabe esperar que estos mecanismos de acilación se encuentren activos ya que mientras las PLA<sub>2</sub> hidrolizan los FA de la posición sn-2, las AT son enzimas necesarias para reacilar esta posición y para mantener el recambio normal de los PL (Perez-Chacon *et al.*, 2009). El incremento de acilación observado en la PE, uno de los PL mayoritarios de la membrana, sumado a la baja detección de liberación de LDH en todas las concentraciones de Fe<sup>2+</sup> consideradas, son argumentos a favor de mecanismos activos de reparación de la membrana durante la injuria oxidativa de la retina. Por otro lado, la inhibición en la acilación de PS y PI durante la toxicidad retiniana inducida por Fe<sup>2+</sup> podría corresponderse con una alta tasa de deacilación probablemente como resultado del elevado contenido de AA presente en estos PL. En relación con esto, la acilación de PS se observó particularmente aumentada cuando las isoformas cPLA<sub>2</sub>, iPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub> fueron inhibidas, demostrando así que bajo condiciones de estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup>, este PL es activamente deacilado por todas las isoformas de la PLA<sub>2</sub>.

Varias isoformas de la sPLA<sub>2</sub>, como las pertenecientes al Grupo IIA y Grupo X sPLA<sub>2</sub>, han sido tradicionalmente consideradas proteínas promotoras de mecanismos inflamatorios en el tejido periférico y nervioso (Bazan *et al.*, 2002; Moses *et al.*, 2006; Saegusa *et al.*, 2008). No obstante, como se señalara anteriormente, novedosas funciones anti-inflamatorias se han descrito para otra isoforma de la sPLA<sub>2</sub>, como es el caso de las del Grupo V sPLA<sub>2</sub> (Boilard *et al.*, 2010). Existen evidencias que indican que la isoforma sPLA<sub>2</sub> presenta roles duales durante el estrés oxidativo (Svensson *et al.*, 2005; Chalimoniuk, 2012). Nosotros hemos caracterizado el rol de la sPLA<sub>2</sub> Grupo V, particularmente



durante el daño retiniano inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ . Logramos demostrar que la isoforma sPLA<sub>2</sub> tiene una localización subcelular diferencial en las distintas fracciones de la retina, desencadenada por la toxicidad retiniana inducida por  $\text{Fe}^{2+}$ . Numerosos trabajos en la bibliografía consultada reportan evidencias de una distribución diferencial y de cambios en la localización de esta enzima en distintos tejidos del organismo, en células del CNS. Algunos estudios proveen información acerca de su distribución subcelular. Sin embargo, los datos existentes acerca de su distribución y localización en retina no son numerosos (Yang *et al.*, 2013; Nardicchi *et al.*, 2007; Shirai *et al.*, 2005; van der Helm *et al.*, 2001). En nuestro modelo, pudimos demostrar que esta isoforma se encuentra asociada con los Cit obtenidos de retinas expuestas al  $\text{Fe}^{2+}$  y que la presencia de la isoforma sPLA<sub>2</sub> en esta fracción aumenta de una manera dependiente de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$ . Además, al evaluar la distribución en la retina de la isoforma sPLA<sub>2</sub> durante la toxicidad retiniana inducida por  $\text{Fe}^{2+}$  se observó una distribución diferencial de la misma debida a la injuria oxidativa. En condiciones control, la sPLA<sub>2</sub> se encontró homogéneamente distribuida en todas las capas del tejido de la retina. Sin embargo, al analizar las retinas que habían sido incubadas con  $\text{Fe}^{2+}$ , se pudo comprobar que esta isoforma de la PLA<sub>2</sub> se localiza principalmente en la capa de células fotorreceptoras. Particularmente en el caso de las distintas estructuras del ojo, Kolko y colaboradores han descripto resultados similares a los obtenidos por nosotros (Kolko *et al.*, 2007; Kolko *et al.*, 2006).

Se estudió el estado de fosforilación de las quinasas ERK1/2 en presencia del inhibidor de iPLA<sub>2</sub> y de sPLA<sub>2</sub>. En presencia de ambos inhibidores, se pudo observar cómo se retrasa la fosforilación de ERK que, en ausencia de los mismos,

ocurre al incubar las retinas con 25  $\mu\text{M}$  de  $\text{Fe}^{2+}$ , por lo que se infiere que estas dos isoformas también regulan la vía de las MAPK.

Para estudiar el rol de las distintas isoformas de la  $\text{PLA}_2$  en el daño oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ , se evaluó la formación de peróxidos lipídicos en presencia de los inhibidores de las distintas isoformas de la  $\text{PLA}_2$ : ATK, BEL e YM 26734. La inhibición de la  $\text{cPLA}_2$  por ATK fue capaz de prevenir el aumento de la peroxidación lipídica inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ . Este resultado podría indicar que la  $\text{cPLA}_2$  es la enzima encargada de liberar el FA (en este caso, mayoritariamente AA) peroxidado, el cual luego es detectado (debido a la técnica utilizada) en citosol. Otra interpretación podría ser que el AA es removido de la membrana por la isoforma  $\text{cPLA}_2$  para iniciar las cascadas de la inflamación, y este FA libre, que aún no se encuentra peroxidado, sufre esta modificación en el citosol tras haber sido liberado por esta isoforma, propagando a partir de ahí el proceso en cadena de peroxidación lipídica. Una función similar se ha descrito para la isoforma  $\text{cPLA}_2$  durante la isquemia cerebral y en muchas otras patologías cerebrales (Adibhatla & Hatcher, 2010; Kishimoto *et al.*, 2010). Se ha demostrado que la inhibición de la  $\text{cPLA}_2$  por acción del extracto de *Ginkgo biloba* protege contra la muerte neuronal inducida por estrés oxidativo (Zhao *et al.*, 2011).

Por otro lado, se observó que la inhibición de la isoforma  $\text{iPLA}_2$  por medio del inhibidor BEL genera el efecto opuesto. Los resultados obtenidos para esta isoforma indican un potencial rol protector contra la peroxidación lipídica. Esto podría sugerir, por lo tanto, que los FA son peroxidados mientras se encuentran en la membrana y que su permanencia allí es más dañina que estando libres debido quizás a la cercanía de los demás lípidos en la membrana. De este modo, al ser liberados los FA peroxidados por acción de la isoforma  $\text{iPLA}_2$  y al ser

reemplazados por otros que no lo son por acción de la AT, se “bloquea”, en cierta forma, la acción en cadena de la peroxidación lipídica. Es probable que los FA en el *pool* citosólico sean reparados por los mecanismos enzimáticos y no enzimáticos allí presentes (véase **Tabla 2**). Esto está de acuerdo con la participación de la isoforma iPLA<sub>2</sub> en el proceso de remodelación fosfolipídica (Balsinde *et al.*, 2006). Además, cabe destacar que esta isoforma no tiene preferencias por el FA a remover por lo que es probable que libere VLC-PUFA (los cuales son más susceptibles a ser peroxidados) o bien que remueva FA con menor número de insaturaciones, que han sufrido menor nivel de peroxidación.

Por último, al inhibir a la isoforma sPLA<sub>2</sub> encontramos que no se veían modificados los niveles de peróxidos lipídicos. En base a estos hallazgos, se puede asumir que la isoforma sPLA<sub>2</sub> no participa en los mecanismos que promueven la peroxidación lipídica de la retina ni el daño de la membrana durante el estrés oxidativo inducido por Fe<sup>2+</sup>.

Al evaluar de manera conjunta estos resultados, podemos suponer que son indicativos de una participación diferencial de estas isoformas en el proceso de peroxidación lipídica, y confirmar que, mientras que la isoforma cPLA<sub>2</sub> promueve el daño al liberar fundamentalmente AA para desencadenar, junto con la proteína COX-2, el fenómeno inflamatorio en este modelo de AMD, la isoforma iPLA<sub>2</sub> tiene un rol protector ya que remueve el FA peroxidado, permitiendo que luego una AT catalice la esterificación de un nuevo FA no peroxidado. Por otra parte, los resultados que obtuvimos demuestran que, aunque las distintas isoformas de la PLA<sub>2</sub> se encuentran involucradas en el proceso de peroxidación lipídica, su participación no afecta la viabilidad celular.

Como se mencionara anteriormente, en nuestro sistema experimental, la asociación de la proteína COX-2 con las membranas microsomales se encontró incrementada en función de la concentración de  $\text{Fe}^{2+}$  y, en consecuencia, con la peroxidación lipídica. La asociación de esta proteína con los microsomas es indicativa de que frente al estrés oxidativo, la generación de PG sería uno de los principales hechos subsiguientes a la activación de la isoforma cPLA<sub>2</sub> para completar el proceso inflamatorio posterior a cualquier daño. Además, según se señalara anteriormente, el sistema tiende a protegerse de dicho daño al promover una rápida metabolización del AA en las membranas microsomales de manera de regular ese proceso inflamatorio. En virtud de esto, es posible inferir que uno de los mecanismos que puede estar siendo empleado por el sistema para protegerse es el mantenimiento de ambas enzimas (cPLA<sub>2</sub> y COX-2) en distintos compartimentos celulares (la forma activa de la isoforma cPLA<sub>2</sub> fundamentalmente en citosol y la COX-2 en microsomas o secuestrada por la isoforma sPLA<sub>2</sub>, léase más adelante para una mejor comprensión).

Según se indicara anteriormente, se pudo observar que mientras el Fe se acumula en la retina, la localización de la isoforma sPLA<sub>2</sub> Grupo V en la fracción citosólica aumenta. Esta compartimentalización de la isoforma sPLA<sub>2</sub> estaría relacionada con su asociación con la fracción de la enzima COX-2 presente en el citosol, como lo demuestran los ensayos de IP. Esta asociación entre la isoforma sPLA<sub>2</sub> y la enzima COX-2 también fue observada en estudios anteriores (Balboa *et al.*, 2003; Ruiperez *et al.*, 2007). La asociación aumentada de la enzima COX-2 con la isoforma sPLA<sub>2</sub> Grupo V durante el estrés oxidativo retiniano inducido por  $\text{Fe}^{2+}$  estaría correlacionada con una actividad catalítica disminuida, como se observó al medir la generación de las prostaglandinas PGE<sub>2</sub> y PGF<sub>2</sub> en los IP.

Estos resultados podrían ser indicativos de un proceso regulatorio de la enzima COX-2, ejercido por la isoforma sPLA<sub>2</sub> a través de un mecanismo que podría involucrar el secuestro de la enzima COX-2 y la inhibición de su actividad catalítica. Esto está de acuerdo con hallazgos anteriores que proponen que la isoforma sPLA<sub>2</sub> Grupo V actúa como un agente anti-inflamatorio en un modelo de artritis, en este caso en particular por regulación de la síntesis de cisteinil leucotrienos (Boilard *et al.*, 2010). Nosotros proponemos que, de esta manera, el sistema se defiende de la inflamación, manteniendo en el citosol a la isoforma cPLA<sub>2</sub> (mayormente implicada en la continuidad de la inflamación) y bloqueando la actividad de la enzima COX-2 mediante la asociación de la misma a la isoforma sPLA<sub>2</sub>, y, además, su translocación a la membrana microsomal, como se señaló anteriormente.

Otro aspecto que se estudió en este modelo de AMD, y en relación con los procesos inflamatorios, es la participación del factor NF-κB. Desde su descubrimiento –hace más de 25 años– como regulador de la expresión del gen de las cadenas livianas κ en las células B, la investigación sobre este factor sigue proporcionando avances fundamentales en el conocimiento de los procesos celulares (Sen, 2011). El factor NF-κB, modulador clave de la inflamación, inmunidad, respuesta al estrés, apoptosis y diferenciación (Oeckinghaus *et al.*, 2011), también regula complejos patrones de expresión génica (Ruland, 2011). Se ha demostrado que la desregulación de la señalización del NF-κB contribuye a la patofisiología de las enfermedades inflamatorias (Oeckinghaus *et al.*, 2011; Smale, 2011). Esto hace interesante estudiar, en nuestro modelo experimental, el posible rol de las PLA<sub>2</sub> en la activación de la vía de señalización del factor NF-κB cuando se opera bajo condiciones de injuria retiniana provocada por estrés

oxidativo inducido por  $\text{Fe}^{2+}$ . Se sabe que el factor NF- $\kappa$ B participa en el proceso inflamatorio regulando la transcripción de diversos genes (Ruland, 2011). El incremento de la localización nuclear de las subunidades de p50 y p65 del factor NF- $\kappa$ B en las retinas incubadas con  $\text{Fe}^{2+}$ , se encontró abolido por la inhibición de las isoformas cPLA<sub>2</sub> y sPLA<sub>2</sub>, sugiriendo que ambas actividades enzimáticas son necesarias para las respuestas mediadas por el factor NF- $\kappa$ B durante la injuria oxidativa de la retina. No se observaron cambios cuando se inhibió la isoforma iPLA<sub>2</sub>, motivo por el cual se cree que esta isoforma no regula la translocación de este factor a núcleo. En el caso de la isoforma cPLA<sub>2</sub>, es lógico que promueva la activación y translocación de NF- $\kappa$ B a núcleo ya que corriente abajo a su accionar está la enzima COX-2 y la transcripción de la misma es regulada por el factor NF- $\kappa$ B (Kim *et al.*, 2013; Garcia-Garcia *et al.*, 2012; Diaz-Munoz *et al.*, 2010; Choi *et al.*, 2006). Esto podría estar de acuerdo con los demás resultados indicativos de que esta isoforma de la PLA<sub>2</sub> promueve el daño. Por otro lado, de acuerdo con los resultados obtenidos, la isoforma sPLA<sub>2</sub> regula la translocación a núcleo de este factor, lo cual podría indicar un posible mecanismo de autorregulación ya que el factor NF- $\kappa$ B también se encuentra implicado en la transcripción de la isoforma sPLA<sub>2</sub> (Baek *et al.*, 2000; Alaoui-El-Azher *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2012) de manera que haya más cantidad disponible de esta isoforma para secuestrar más COX-2. Más aún, una relación directa entre la activación de la isoforma sPLA<sub>2</sub> y del factor NF- $\kappa$ B ha sido reportada en células espumosas, en las cuales la hidrólisis de LDL debida a esta actividad transcripcional promueve la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Boyanovsky *et al.*, 2010).

Si bien aún queda pendiente profundizar el estudio sobre las implicancias de la participación de la isoforma cPLA<sub>2</sub> durante la degeneración retiniana

inducida por  $\text{Fe}^{2+}$ , nuestros resultados sustentan la hipótesis según la cual esta isoforma es mediadora del daño oxidativo, haciéndola blanco interesante para futuras estrategias farmacológicas. Los resultados obtenidos sobre el rol de la isoforma  $\text{iPLA}_2$  confirman que esta participa fundamentalmente en la protección de las membranas mediante la remoción de los PL oxidados. Los datos obtenidos durante la exposición aguda de la retina al  $\text{Fe}^{2+}$  pueden contribuir al entendimiento de los mecanismos moleculares que operan en los procesos patológicos provocados por la acumulación de Fe, el cual se encuentra involucrado en la patogénesis de la AMD. Por otro lado, teniendo en cuenta los hallazgos que resultan de esta tesis doctoral y de la bibliografía existente, se podría concluir que la isoforma  $\text{sPLA}_2$  Grupo V, durante la toxicidad retiniana inducida por  $\text{Fe}^{2+}$ , juega un rol dual i) como agente anti-inflamatorio porque inhibe la actividad de la enzima COX-2, y ii) como señal pro-inflamatoria porque promueve la localización nuclear de las subunidades del factor NF- $\kappa$ B. De esta manera, descifrar los mecanismos que rigen el balance entre las respuestas de la isoforma  $\text{sPLA}_2$  Grupo V durante la degeneración retiniana inducida por  $\text{Fe}^{2+}$  será una cuestión clave para el desarrollo de nuevos blancos terapéuticos y estrategias para el tratamiento de la degeneración retiniana inducida por estrés oxidativo.

Los hallazgos que resultan de esta tesis doctoral demuestran que cada una de las isoformas de la  $\text{PLA}_2$  ( $\text{iPLA}_2$ ,  $\text{cPLA}_2$  y  $\text{sPLA}_2$ ) tiene un rol específico en el modelo experimental propuesto, y que existen mecanismos de regulación finamente controlados, algunos de los cuales hemos podido confirmar con nuestro modelo experimental. En resumen, las funciones de las isoformas estudiadas son: i) la isoforma  $\text{cPLA}_2$  promueve el daño inducido por el estrés oxidativo al liberar el AA, el cual será sustrato de la proteína COX-2 promoviendo

la inflamación a menos que la COX-2 o bien la cPLA<sub>2</sub> sean secuestradas; ii) la isoforma iPLA<sub>2</sub> tiene un rol protector porque remodela las membranas mediante la remoción de los FA peroxidados y es la isoforma que más participa en la regulación del metabolismo de los PL con las AT para mantener la homeostasis de las membranas; iii) la isoforma sPLA<sub>2</sub> Grupo V podría ser la encargada de mantener el equilibrio en la respuesta inflamatoria generada durante el transcurso de esta patología por su participación en la regulación del factor NF- $\kappa$ B (como señal pro-inflamatoria) y de la enzima COX-2 (como agente anti-inflamatorio al inhibir la actividad de ésta). De todos modos, sigue siendo necesario continuar las investigaciones hasta ahora realizadas con la finalidad de lograr descifrar los mecanismos moleculares que operan en estas patologías. Esta tesis doctoral constituye el puntapié inicial en la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la degeneración retiniana inducida por estrés oxidativo.



## CONCLUSIONES

Para alcanzar los objetivos de esta tesis doctoral se construyó un modelo experimental de sobrecarga de Fe en la retina, el cual mimetiza la acumulación de este metal, producto del envejecimiento y de enfermedades degenerativas de la retina, tales como la AMD. Con este modelo logramos demostrar:

- La presencia de estrés oxidativo de variada intensidad de acuerdo con la concentración de Fe y el tiempo de incubación, y la elevada protección de la retina frente al insulto oxidativo.

- La presencia, actividad y el rol diferencial de las siguientes isoformas de la PLA<sub>2</sub>: la isoforma citosólica (cPLA<sub>2</sub>), la isoforma independiente de calcio (iPLA<sub>2</sub>) y la isoforma secretoria (sPLA<sub>2</sub>).

- La presencia y activación de la vía del factor NF-κB, el cual se activa y transloca a núcleo frente al estrés oxidativo, activando la transcripción de genes relacionados con la injuria oxidativa.

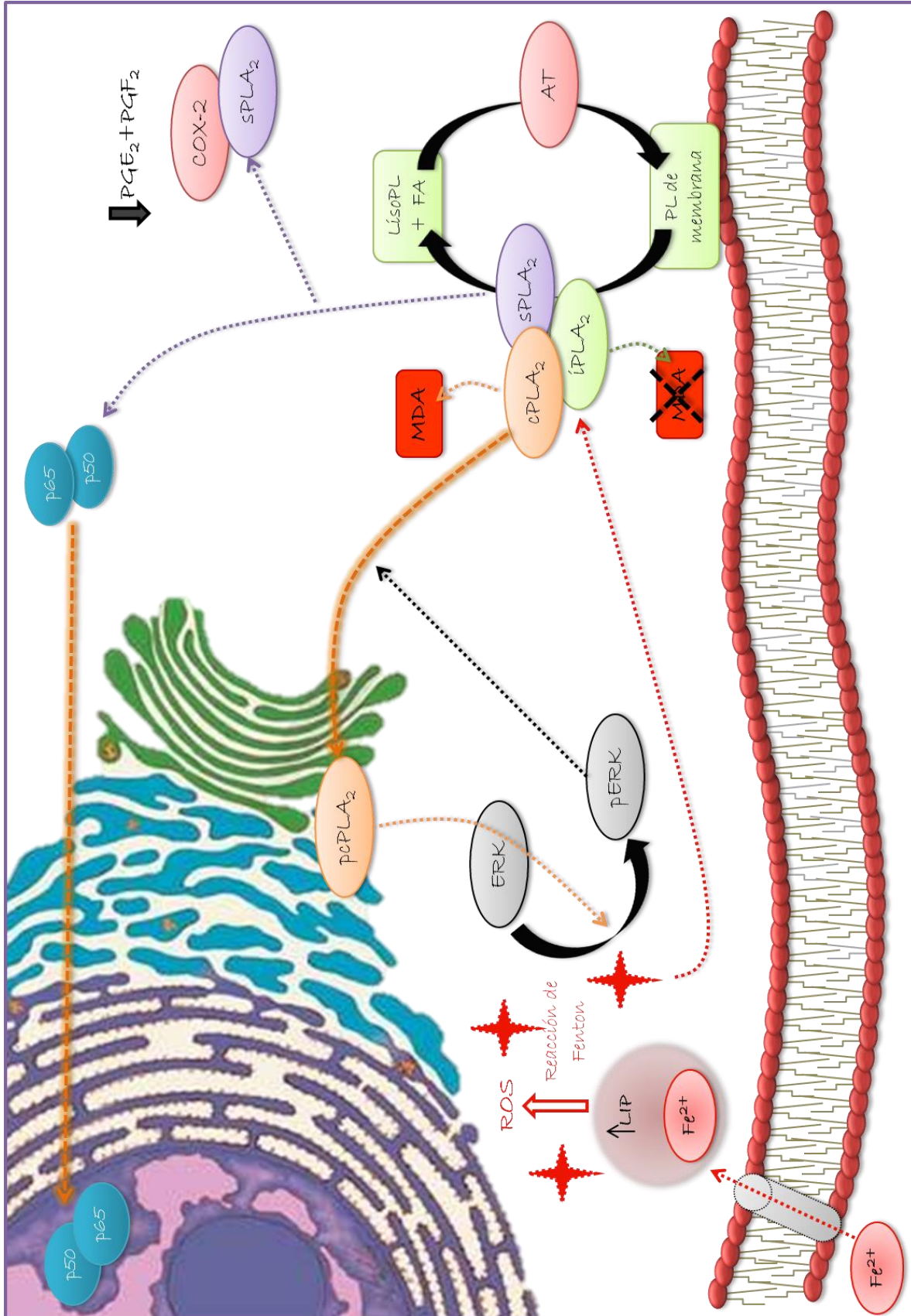
- La presencia y activación de la vía de las quinasas ERK1/2 y su rol en la localización subcelular de la isoforma cPLA<sub>2</sub>.

- El rol de la isoforma cPLA<sub>2</sub> en la señalización inflamatoria al liberar AA. Esta acción promueve el daño inducido por estrés oxidativo, estimula, asimismo, la peroxidación lipídica y la vía de las MAPK, y regula la localización del factor NF-κB, promoviendo su activación y posterior translocación a núcleo.

- El rol protector de la isoforma iPLA<sub>2</sub>, la cual evita la peroxidación lipídica al remodelar los PL de membrana removiendo los FA peroxidados. Esta isoforma actuaría en condiciones fisiológicas liberando lisoPL (LPE y LPC) y FA a partir de

los fosfolípidos PE y PC ya que la acilación de estos PL aumenta en presencia del inhibidor de la isoforma iPLA<sub>2</sub>.

- El rol dual de la isoforma sPLA<sub>2</sub> Grupo V en la respuesta inflamatoria, la cual se localiza fundamentalmente en citosol frente al estrés oxidativo y participa en la regulación del factor NF-κB y la proteína COX-2. Por un lado, se comporta como agente anti-inflamatorio al inhibir la actividad de COX-2 por asociación y, por otra parte, actúa como señal pro-inflamatoria al promover la localización nuclear de las subunidades del factor NF-κB. Además, la isoforma sPLA<sub>2</sub> estaría involucrada en la remodelación fisiológica de la PS. En presencia de Fe<sup>2+</sup> y del inhibidor de la isoforma sPLA<sub>2</sub>, la acilación en PS no se restaura a los niveles de la condición control con inhibidor, por lo que el efecto neto de disminución de la acilación en presencia de injuria oxidativa sería causado por la mayor actividad de las isoformas iPLA<sub>2</sub> y cPLA<sub>2</sub> sobre este fosfolípido.



**Esquema 17.** Resumen de las conclusiones de la presente tesis doctoral.

## REFERENCIAS

Adamczyk A., Kazmierczak A. and Strosznajder J. B. (2006) Alpha-synuclein and its neurotoxic fragment inhibit dopamine uptake into rat striatal synaptosomes. Relationship to nitric oxide. *Neurochem. Int.* 49, 407-412.

Adibhatla R. M. and Hatcher J. F. (2008) Phospholipase A(2), reactive oxygen species, and lipid peroxidation in CNS pathologies. *BMB. Rep.* 41, 560-567.

Adibhatla R. M. and Hatcher J. F. (2010) Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid. Redox. Signal.* 12, 125-169.

Alaoui-El-Azher, M., Wu, Y., Havet, N., Israel, A., Lilienbaum, A., & Touqui, L. (2002) Arachidonic acid differentially affects basal and lipopolysaccharide-induced sPLA(2)-IIA expression in alveolar macrophages through NF-kappaB and PPAR-gamma-dependent pathways. *Mol.Pharmacol.* 61, 786-794.

Arnal E., Miranda M., Barcia J., Bosch-Morell F. and Romero F. J. (2010) Lutein and docosahexaenoic acid prevent cortex lipid peroxidation in streptozotocin-induced diabetic rat cerebral cortex. *Neuroscience* 166, 271-278.

Astudillo, A. M., Balgoma, D., Balboa, M. A., and Balsinde, J. (2012) Dynamics of arachidonic acid mobilization by inflammatory cells. *Biochim.Biophys.Acta.* 1821 (2), 249-256.

Baek, S. H., Kwon, T. K., Lim, J. H., Lee, Y. J., Chang, H. W., Lee, S. J., Kim, J. H., & Kwun, K. B. (2000) Secretory phospholipase A2-potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-kappa B activation. *J.Immunol.* 164, 6359-6365.

Balboa M. A. and Balsinde J. (2006) Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 385-391.

Balboa M. A., Shirai Y., Gaietta G., Ellisman M. H., Balsinde J. and Dennis E. A. (2003) Localization of group V phospholipase A2 in caveolin-enriched

granules in activated P388D1 macrophage-like cells. *J. Biol. Chem.* 278, 48059-48065.

Balsinde J., Balboa M. A. and Dennis E. A. (1998) Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 7951-7956.

Balsinde J., Bianco I. D., Ackermann E. J., Conde-Frieboes K. and Dennis E. A. (1995) Inhibition of calcium-independent phospholipase A2 prevents arachidonic acid incorporation and phospholipid remodeling in P388D1 macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 8527-8531.

Bazan N. G. (2006a) Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends Neurosci.* 29, 263-271.

Bazan N. G. (2006b) Survival signaling in retinal pigment epithelial cells in response to oxidative stress: significance in retinal degenerations. *Adv. Exp. Med. Biol.* 572, 531-540.

Bazan N. G. (2006c) The onset of brain injury and neurodegeneration triggers the synthesis of docosanoid neuroprotective signaling. *Cell Mol. Neurobiol.* 26, 901-913.

Bazan N. G. (2009a) Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 81, 205-211.

Bazan N. G. (2009b) Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S400-S405.

Bazan N. G., Marcheselli V. L. and Cole-Edwards K. (2005) Brain response to injury and neurodegeneration: endogenous neuroprotective signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1053, 137-147.

Bazan N. G., Molina M. F. and Gordon W. C. (2011) Docosaehaenoic acid signalolipidomics in nutrition: significance in aging, neuroinflammation, macular degeneration, Alzheimer's, and other neurodegenerative diseases. *Annu. Rev. Nutr.* 31, 321-351.

Blasiak J., Sklodowska A., Ulinska M. and Szaflik J. P. (2009) Iron and age-related macular degeneration. *Klin. Oczna* 111, 174-177.

Blasiak J., Szaflik J. and Szaflik J. P. (2011) Implications of altered iron homeostasis for age-related macular degeneration. *Front Biosci.* 16, 1551-1559.

Buege J. A. and Aust S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 52, 302-310.

Burke J. E. and Dennis E. A. (2009a) Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 23, 49-59.

Burke J. E. and Dennis E. A. (2009b) Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. *J. Lipid Res.* 50 Suppl, S237-S242.

Cano M., Thimmalappula R., Fujihara M., Nagai N., Sporn M., Wang A. L., Neufeld A. H., Biswal S. and Handa J. T. (2010) Cigarette smoking, oxidative stress, the anti-oxidant response through Nrf2 signaling, and Age-related Macular Degeneration. *Vision Res.* 50, 652-664.

Castagnet P. I. and Giusto N. M. (1997) Acyl-CoA:lysophosphatidylcholine acyltransferase activity in bovine retina rod outer segments. *Arch. Biochem. Biophys.* 340, 124-134.

Chakraborti S. (2003) Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. *Cell Signal.* 15, 637-665.

Choi, S. H., Langenbach, R., & Bosetti, F. (2006) Cyclooxygenase-1 and -2 enzymes differentially regulate the brain upstream NF-kappa B pathway and downstream enzymes involved in prostaglandin biosynthesis. *J. Neurochem.* 98, 801-811.

Cindrova-Davies T., Spasic-Boskovic O., Jauniaux E., Charnock-Jones D. S. and Burton G. J. (2007) Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins. *Am. J. Pathol.* 170, 1511-1520.

Curfs D. M., Ghesquiere S. A., Vergouwe M. N., van d. M., I, Gijbels M. J., Greaves D. R., Verbeek J. S., Hofker M. H. and de Winther M. P. (2008) Macrophage secretory phospholipase A2 group X enhances anti-inflammatory responses, promotes lipid accumulation, and contributes to aberrant lung pathology. *J. Biol. Chem.* 283, 21640-21648.

de Jong P. T. (2006) Age-related macular degeneration. *N. Engl. J. Med.* 355, 1474-1485.

de Jong P. T., Bergen A. A., Klaver C. C., van Duijn C. M. and Assink J. M. (2001) Age-related maculopathy: its genetic basis. *Eye (Lond)* 15, 396-400.

Denizot F. and Lang R. (1986) Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J. Immunol. Methods* 89, 271-277.

Diaz-Munoz, M. D., Osma-Garcia, I. C., Cacheiro-Llaguno, C., Fresno, M., & Iniguez, M. A. (2010) Coordinated up-regulation of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase 1 transcription by nuclear factor kappa B and early growth response-1 in macrophages. *Cell Signal.* 22, 1427-1436.

Dunaief J. L. (2006) Iron induced oxidative damage as a potential factor in age-related macular degeneration: the Cogan Lecture. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 47, 4660-4664.

Dunaief J. L., Richa C., Franks E. P., Schultze R. L., Aleman T. S., Schenck J. F., Zimmerman E. A. and Brooks D. G. (2005) Macular degeneration in a patient with aceruloplasminemia, a disease associated with retinal iron overload. *Ophthalmology.* 112, 1062-1065.

Facchinetti M. M., Gandini N. A., Fermento M. E., Sterin-Speziale N. B., Ji Y., Patel V., Gutkind J. S., Rivadulla M. G. and Curino A. C. (2010) The expression of sphingosine kinase-1 in head and neck carcinoma. *Cells Tissues. Organs.* 192, 314-324.

Farooqui A. A., Horrocks L. A. and Farooqui T. (2007a) Interactions between neural membrane glycerophospholipid and sphingolipid mediators: a recipe for neural cell survival or suicide. *J. Neurosci. Res.* 85, 1834-1850.

Farooqui A. A., Horrocks L. A. and Farooqui T. (2007b) Modulation of inflammation in brain: a matter of fat. *J. Neurochem.* 101, 577-599.

Farooqui A. A., Ong W. Y. and Horrocks L. A. (2006) Inhibitors of brain phospholipase A2 activity: their neuropharmacological effects and therapeutic importance for the treatment of neurologic disorders. *Pharmacol. Rev* 58, 591-620.

Feder J. N., Gnirke A., Thomas W., Tsuchihashi Z., Ruddy D. A., Basava A., Dormishian F., Domingo R., Jr., Ellis M. C., Fullan A., Hinton L. M., Jones N. L., Kimmel B. E., Kronmal G. S., Lauer P., Lee V. K., Loeb D. B., Mapa F. A., McClelland E., Meyer N. C., Mintier G. A., Moeller N., Moore T., Morikang E., Prass C. E., Quintana L., Starnes S. M., Schatzman R. C., Brunke K. J., Drayna D. T., Risch N. J., Bacon B. R. and Wolff R. K. (1996) A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 13, 399-408.

Fliesler S. J. and Anderson R. E. (1983) Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog. Lipid Res.* 22, 79-131.

Folch J., Lees M. and Sloane Stanley G. H. (1957) A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.

Forrellat Barrios M., Fernández Delgado N. and Hernández Ramírez P. (2005) Nuevos conocimientos sobre el metabolismo del hierro. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia.* 21.



Foti M. C., Daquino C. and Geraci C. (2004) Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH(\*) radical in alcoholic solutions. *J. Org. Chem.* 69, 2309-2314.

Franchi A., Di G. G., Farina M., de los Santos A. R., Marti M. L. and Gimeno M. A. (2000) [Differential action of non-steroidal antiinflammatory drugs on human gallbladder cyclooxygenase and lipoxygenase]. *Medicina (B Aires)* 60, 580-586.

Frisardi V., Panza F., Seripa D., Farooqui T. and Farooqui A. A. (2011) Glycerophospholipids and glycerophospholipid-derived lipid mediators: a complex meshwork in Alzheimer's disease pathology. *Prog. Lipid Res.* 50, 313-330.

Funke C., Schneider S. A., Berg D. and Kell D. B. (2013) Genetics and iron in the systems biology of Parkinson's disease and some related disorders. *Neurochem. Int.* 62, 637-652.

Garcia-Castineiras S. (2010) Iron, the retina and the lens: a focused review. *Exp. Eye Res.* 90, 664-678.

Garcia-Garcia, F. J., Mullol, J., Perez-Gonzalez, M., Pujols, L., Alobid, I., Roca-Ferrer, J., & Picado, C. (2012) Signal transduction pathways (MAPKs, NF-kappaB, and C/EBP) regulating COX-2 expression in nasal fibroblasts from asthma patients with aspirin intolerance. *PLoS.One.* 7, e51281.

Ghosh M., Tucker D. E., Burchett S. A. and Leslie C. C. (2006) Properties of the Group IV phospholipase A2 family. *Prog. Lipid Res.* 45, 487-510.

Giusto N. M. and Bazan N. G. (1979a) Phosphatidic acid of retinal microsomes contains a high proportion of docosahexaenoate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 91, 791-794.

Giusto N. M. and Bazan N. G. (1979b) Phospholipids and acylglycerols biosynthesis and <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> production from [<sup>14</sup>C]glycerol in the bovine retina: the effects of incubation time, oxygen and glucose. *Exp. Eye Res.* 29, 155-168.

Goralska M., Ferrell J., Harned J., Lall M., Nagar S., Fleisher L. N. and McGahan M. C. (2009) Iron metabolism in the eye: a review. *Exp. Eye Res.* 88, 204-215.

Guix P., Parera M., Castro J. A., Picornell A., Ramon M. M. and Obrador A. (2003) [Molecular aspects of duodenal iron absorption]. *Gastroenterol. Hepatol.* 26, 86-93.

Guo Z. H. and Mattson M. P. (2000) In vivo 2-deoxyglucose administration preserves glucose and glutamate transport and mitochondrial function in cortical synaptic terminals after exposure to amyloid beta-peptide and iron: evidence for a stress response. *Exp. Neurol.* 166, 173-179.

Hadziahmetovic M., Dentchev T., Song Y., Haddad N., He X., Hahn P., Pratico D., Wen R., Harris Z. L., Lambris J. D., Beard J. and Dunaief J. L. (2008) Ceruloplasmin/hephaestin knockout mice model morphologic and molecular features of AMD. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 49, 2728-2736.

Hadziahmetovic M., Song Y., Ponnuru P., Iacovelli J., Hunter A., Haddad N., Beard J., Connor J. R., Vaulont S. and Dunaief J. L. (2011a) Age-dependent retinal iron accumulation and degeneration in hepcidin knockout mice. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 109-118.

Hadziahmetovic M., Song Y., Wolkow N., Iacovelli J., Kautz L., Roth M. P. and Dunaief J. L. (2011b) Bmp6 regulates retinal iron homeostasis and has altered expression in age-related macular degeneration. *Am. J. Pathol.* 179, 335-348.

Hahn P., Qian Y., Dentchev T., Chen L., Beard J., Harris Z. L. and Dunaief J. L. (2004) Disruption of ceruloplasmin and hephaestin in mice causes retinal iron overload and retinal degeneration with features of age-related macular degeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 13850-13855.

Halliwell, B. (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radic. Biol. Med.* 46 (5), 531-542.

He X., Hahn P., Iacovelli J., Wong R., King C., Bhisitkul R., Massaro-Giordano M. and Dunaief J. L. (2007) Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration. *Prog. Retin. Eye Res.* 26, 649-673.

Holinstat M., Boutaud O., Apopa P. L., Vesci J., Bala M., Oates J. A. and Hamm H. E. (2011) Protease-activated receptor signaling in platelets activates cytosolic phospholipase A2alpha differently for cyclooxygenase-1 and 12-lipoxygenase catalysis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 31, 435-442.

Hsu Y. H., Burke J. E., Li S., Woods V. L., Jr. and Dennis E. A. (2009) Localizing the membrane binding region of Group VIA Ca<sup>2+</sup>-independent phospholipase A2 using peptide amide hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 284, 23652-23661.

Janik-Papis K., Ulinska M., Krzyzanowska A., Stoczynska E., Borucka A. I., Wozniak K., Malgorzata Z., Szaflik J. P. and Blasiak J. (2009) [Role of oxidative mechanisms in the pathogenesis of age-related macular degeneration]. *Klin. Oczna* 111, 168-173.

Kashiwagi T., Meyer-Rochow V. B., Nishimura K. and Eguchi E. (2000) Light activation of phospholipase A2 in the photoreceptor of the crayfish (*Procambarus clarkii*). *Acta Neurobiol. Exp. (Wars.)* 60, 9-16.

Kell D. B. (2009) Iron behaving badly: inappropriate iron chelation as a major contributor to the aetiology of vascular and other progressive inflammatory and degenerative diseases. *BMC. Med. Genomics* 2, 2.

Kell D. B. (2010) Towards a unifying, systems biology understanding of large-scale cellular death and destruction caused by poorly liganded iron: Parkinson's, Huntington's, Alzheimer's, prions, bactericides, chemical toxicology and others as examples. *Arch. Toxicol.* 84, 825-889.

Keller J. N., Mark R. J., Bruce A. J., Blanc E., Rothstein J. D., Uchida K., Waeg G. and Mattson M. P. (1997) 4-Hydroxynonenal, an aldehydic product of membrane lipid peroxidation, impairs glutamate transport and mitochondrial function in synaptosomes. *Neuroscience* 80, 685-696.

Kim, A. R., Lee, M. S., Choi, J. W., Utsuki, T., Kim, J. I., Jang, B. C., & Kim, H. R. (2013) Phlorofuofuroeckol A suppresses expression of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2, and pro-inflammatory cytokines via inhibition of nuclear factor-kappaB, c-Jun NH2-terminal kinases, and Akt in microglial cells. *Inflammation*. 36, 259-271.

Kinsey G. R., Cummings B. S., Beckett C. S., Saavedra G., Zhang W., McHowat J. and Schnellmann R. G. (2005) Identification and distribution of endoplasmic reticulum iPLA2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 327, 287-293.

Kishimoto K., Li R. C., Zhang J., Klaus J. A., Kibler K. K., Dore S., Koehler R. C. and Sapirstein A. (2010) Cytosolic phospholipase A2 alpha amplifies early cyclooxygenase-2 expression, oxidative stress and MAP kinase phosphorylation after cerebral ischemia in mice. *J. Neuroinflammation*. 7, 42.

Kodavanti P. R. (2011) Cell signaling and neurotoxicity: (3)H-arachidonic acid release (phospholipase A(2)) in cerebellar granule neurons. *Methods Mol. Biol.* 758, 321-328.

Kolko M., Kiilgaard J. F., Wang J., Poulsen K. A., Andreasen J. R., la C. M., Nissen M. H., Heegaard S., Bazan N. G. and Prause J. U. (2009) Calcium-independent phospholipase A2 regulates retinal pigment epithelium proliferation and may be important in the pathogenesis of retinal diseases. *Exp. Eye Res.* 89, 383-391.

Kolko M., Rodriguez de Turco E. B., Diemer N. H. and Bazan N. G. (2003) Neuronal damage by secretory phospholipase A2: modulation by cytosolic phospholipase A2, platelet-activating factor, and cyclooxygenase-2 in neuronal cells in culture. *Neurosci. Lett.* 338, 164-168.

Kolko M., Wang J., Zhan C., Poulsen K. A., Prause J. U., Nissen M. H., Heegaard S. and Bazan N. G. (2007) Identification of intracellular phospholipases A2 in the human eye: involvement in phagocytosis of photoreceptor outer segments. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 48, 1401-1409.

Kruszewski M. (2003) Labile iron pool: the main determinant of cellular response to oxidative stress. *Mutat. Res.* 531, 81-92.

Kruszewski M. and Iwanenko T. (2003) Labile iron pool correlates with iron content in the nucleus and the formation of oxidative DNA damage in mouse lymphoma L5178Y cell lines. *Acta Biochim. Pol.* 50, 211-215.

Laemmli U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Lee C. W., Lin C. C., Lee I. T., Lee H. C. and Yang C. M. (2011) Activation and induction of cytosolic phospholipase A(2) by TNF-alpha mediated through Nox2, MAPKs, NF-kappaB, and p300 in human tracheal smooth muscle cells. *J. Cell Physiol* 226, 2103-2114.

Li X. H., McGrath K. C., Tran V. H., Li Y. M., Duke C. C., Roufogalis B. D. and Heather A. K. (2013) Attenuation of Proinflammatory Responses by S-[6]-Gingerol via Inhibition of ROS/NF-Kappa B/COX2 Activation in HuH7 Cells. *Evid. Based. Complement Alternat. Med.* 2013, 146142.

Loh A., Hadziahmetovic M. and Dunaief J. L. (2009) Iron homeostasis and eye disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 637-649.

Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.

Lukinova N., Iacovelli J., Dentchev T., Wolkow N., Hunter A., Amado D., Ying G. S., Sparrow J. R. and Dunaief J. L. (2009) Iron chelation protects the retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 against cell death triggered by diverse stimuli. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 50, 1440-1447.

Mackenzie G. G. and Oteiza P. I. (2007) Zinc and the cytoskeleton in the neuronal modulation of transcription factor NFAT. *J. Cell Physiol* 210, 246-256.

Mariggio S., Bavec A., Natale E., Zizza P., Salmona M., Corda D. and Di G. M. (2006) Galpha13 mediates activation of the cytosolic phospholipase A2alpha through fine regulation of ERK phosphorylation. *Cell Signal.* 18, 2200-2208.

Marin-Castaño M. E. (2013) Cigarette Smoking and Hypertension. Two Risk Factors for Age-Related Macular Degeneration. *Age-Related Macular Degeneration-Etiology, Diagnosis and Management - A Glance at the Future*. Dr. Giuseppe Lo Giudice (Ed.). ISBN: 978-953-51-1113-9, InTech, DOI: 10.5772/53958. Available from: <http://www.intechopen.com/books/age-related-macular-degeneration-etiology-diagnosis-and-management-a-glance-at-the-future/cigarette-smoking-and-hypertension-two-risk-factors-for-age-related-macular-degeneration>

Morgan N. V., Westaway S. K., Morton J. E., Gregory A., Gissen P., Sonek S., Cangul H., Coryell J., Canham N., Nardocci N., Zorzi G., Pasha S., Rodriguez D., Desguerre I., Mubaidin A., Bertini E., Trembath R. C., Simonati A., Schanen C., Johnson C. A., Levinson B., Woods C. G., Wilmot B., Kramer P., Gitschier J., Maher E. R. and Hayflick S. J. (2006) PLA2G6, encoding a phospholipase A2, is mutated in neurodegenerative disorders with high brain iron. *Nat. Genet.* 38, 752-754.

Moses G. S., Jensen M. D., Lue L. F., Walker D. G., Sun A. Y., Simonyi A. and Sun G. Y. (2006) Secretory PLA2-IIA: a new inflammatory factor for Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation.* 3, 28.

Mosmann T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.

Mukherjee P. K., Marcheselli V. L., Serhan C. N. and Bazan N. G. (2004) Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101, 8491-8496.

Murakami M. and Kudo I. (2004) Secretory phospholipase A2. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1158-1164.

Nicotra A., Lupo G., Giurdanella G., Anfuso C. D., Ragusa N., Tirolo C., Marchetti B. and Alberghina M. (2005) MAPKs mediate the activation of cytosolic phospholipase A2 by amyloid beta(25-35) peptide in bovine retina pericytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1733, 172-186.

Oeckinghaus A., Hayden M. S. and Ghosh S. (2011) Crosstalk in NF-kappaB signaling pathways. *Nat. Immunol.* 12, 695-708.

Ong W. Y., Farooqui T. and Farooqui A. A. (2010) Involvement of cytosolic phospholipase A(2), calcium independent phospholipase A(2) and plasmalogen selective phospholipase A(2) in neurodegenerative and neuropsychiatric conditions. *Curr. Med. Chem.* 17, 2746-2763.

Osborn M. T., Herrin K., Buzen F. G., Hurlburt B. K. and Chambers T. C. (1999) Electrophoretic mobility shift assay coupled with immunoblotting for the identification of DNA-binding proteins. *Biotechniques* 27, 887-90, 892.

Pérez G., Vittori D., Pregi N., Garbossa G. and Nesse A. (2005) Homeostasis del hierro.: Mecanismos de absorción, captación celular y regulación. *Acta bioquímica clínica latinoamericana* 39, 301-314.

Perez-Chacon G., Astudillo A. M., Balgoma D., Balboa M. A. and Balsinde J. (2009) Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A2 and lysophospholipid acyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1791, 1103-1113.

Pete M. J., Wu D. W. and Exton J. H. (1996) Subcellular fractions of bovine brain degrade phosphatidylcholine by sequential deacylation of the sn-1 and sn-2 positions. *Biochim. Biophys. Acta* 1299, 325-332.

Picard E., Ranchon-Cole I., Jonet L., Beaumont C., Behar-Cohen F., Courtois Y. and Jeanny J. C. (2011) Light-induced retinal degeneration correlates with changes in iron metabolism gene expression, ferritin level, and aging. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* 52, 1261-1274.

Rajakariar R., Yaqoob M. M. and Gilroy D. W. (2006) COX-2 in inflammation and resolution. *Mol. Interv.* 6, 199-207.

Salvador G. A. and Giusto N. M. (1998) Characterization of phospholipase D activity in bovine photoreceptor membranes. *Lipids* 33, 853-860.

Salvador G. A. and Giusto N. M. (2006) Phospholipase D from photoreceptor rod outer segments is a downstream effector of RhoA: evidence of a light-dependent mechanism. *Exp. Eye Res.* 83, 202-211.

Salvador G. A. and Oteiza P. I. (2011) Iron overload triggers redox-sensitive signals in human IMR-32 neuroblastoma cells. *Neurotoxicology* 32, 75-82.

SanGiovanni J. P. and Neuringer M. (2012) The putative role of lutein and zeaxanthin as protective agents against age-related macular degeneration: promise of molecular genetics for guiding mechanistic and translational research in the field. *Am. J. Clin. Nutr.* 96, 1223S-1233S.

Santano Sánchez C. and Just J. P. (2009) El ojo, ventana al sistema nervioso central. *Anales de la Real Academia de Farmacia. Monografía XXV: Avances en Neurociencia: Neurotransmisores y Patologías Nerviosas.* 348-405.

Scandalios J. G. (2005) Oxidative stress: molecular perception and transduction of signals triggering antioxidant gene defenses. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 38, 995-1014.

Schaloske R. H. and Dennis E. A. (2006) The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta* 1761, 1246-1259.

Seilhamer J. J., Pruzanski W., Vadas P., Plant S., Miller J. A., Kloss J. and Johnson L. K. (1989) Cloning and recombinant expression of phospholipase A2 present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J. Biol. Chem.* 264, 5335-5338.

Serhan C. N., Arita M., Hong S. and Gotlinger K. (2004) Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* 39, 1125-1132.

Song H., Bao S., Ramanadham S. and Turk J. (2006) Effects of biological oxidants on the catalytic activity and structure of group VIA phospholipase A2. *Biochemistry* 45, 6392-6406.



Spickett, C. M., Wiswedel, I., Siems, W., Zarkovic, K., and Zarkovic, N. (2010) Advances in methods for the determination of biologically relevant lipid peroxidation products. *Free Radic.Res.* 44 (10), 1172-1202.

Sun G. Y., Horrocks L. A. and Farooqui A. A. (2007) The roles of NADPH oxidase and phospholipases A2 in oxidative and inflammatory responses in neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 103, 1-16.

Sun G. Y., Shelat P. B., Jensen M. B., He Y., Sun A. Y. and Simonyi A. (2010) Phospholipases A2 and inflammatory responses in the central nervous system. *Neuromolecular. Med.* 12, 133-148.

Svensson C. I., Lucas K. K., Hua X. Y., Powell H. C., Dennis E. A. and Yaksh T. L. (2005) Spinal phospholipase A2 in inflammatory hyperalgesia: role of the small, secretory phospholipase A2. *Neuroscience* 133, 543-553.

Taha A. Y., Gao F., Ramadan E., Cheon Y., Rapoport S. I. and Kim H. W. (2012) Upregulated expression of brain enzymatic markers of arachidonic and docosahexaenoic acid metabolism in a rat model of the metabolic syndrome. *BMC. Neurosci.* 13, 131.

Tanito M., Kaidzu S., Ohira A. and Anderson R. E. (2008) Topography of retinal damage in light-exposed albino rats. *Exp. Eye Res.* 87, 292-295.

Uranga R. M., Mateos M. V., Giusto N. M. and Salvador G. A. (2007) Activation of phosphoinositide-3 kinase/Akt pathway by FeSO<sub>4</sub> in rat cerebral cortex synaptic endings. *J. Neurosci. Res.* 85, 2924-2932.

Valenzuela A., Nieto S., Sanhueza J., Morgado N., Rojas I. and Zañartu P. (2010) Supplementing female rats with DHA-lysophosphatidylcholine increases docosahexaenoic acid and acetylcholine contents in the brain and improves the memory and learning capabilities of the pups. *Grasas y Aceites.* 61 (1), 613-626.

Voloboueva L. A., Killilea D. W., Atamna H. and Ames B. N. (2007) N-tert-butyl hydroxylamine, a mitochondrial antioxidant, protects human retinal pigment epithelial cells from iron overload: relevance to macular degeneration. *FASEB J.* 21, 4077-4086.

Walters J. N., Bickford J. S., Beachy D. E., Newsom K. J., Herlihy J. D., Peck M. V., Qiu X. and Nick H. S. (2011) cPLA(2)alpha gene activation by IL-1beta is dependent on an upstream kinase pathway, enzymatic activation and downstream 15-lipoxygenase activity: a positive feedback loop. *Cell Signal.* 23, 1944-1951.

Wang J. and Kolko M. (2010) Phospholipases A2 in ocular homeostasis and diseases. *Biochimie* 92, 611-619.

Weikel K. A., Chiu C. J. and Taylor A. (2012) Nutritional modulation of age-related macular degeneration. *Mol. Aspects Med.* 33, 318-375.

Winstead M. V., Balsinde J. and Dennis E. A. (2000) Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim. Biophys. Acta* 1488, 28-39.

Wong R. W., Richa D. C., Hahn P., Green W. R. and Dunaief J. L. (2007) Iron toxicity as a potential factor in AMD. *Retina* 27, 997-1003.

Yagami T., Ueda K., Asakura K., Hata S., Kuroda T., Sakaeda T., Takasu N., Tanaka K., Gemba T. and Hori Y. (2002) Human group IIA secretory phospholipase A2 induces neuronal cell death via apoptosis. *Mol. Pharmacol.* 61, 114-126.

Yang L. P., Wu L. M., Guo X. J., Li Y. and Tso M. O. (2008) Endoplasmic reticulum stress is activated in light-induced retinal degeneration. *J. Neurosci. Res.* 86, 910-919.

Yu, J. A., Kalatardi, S., Dohse, J., Sadaria, M. R., Meng, X., Fullerton, D. A., & Weyant, M. J. (2012) Group Iia sPLA2 inhibition attenuates NF-kappaB activity and promotes apoptosis of lung cancer cells. *Anticancer Res.* 32, 3601-3607.

## PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS

**Publicaciones en revistas científicas:**

• **Rodríguez Diez, G.**; Sánchez Campos, S.; Giusto, N.M.; Salvador, G.A.  
“Specific roles for Group V secretory PLA2 in retinal iron-induced oxidative stress. Implications for age-related macular degeneration.” (2013) *Experimental Eye Research* 113 172-181.

• **Rodríguez Diez, G.**; Uranga, R.; Mateos M.; Giusto N.; Salvador G.  
“Differential participation of phospholipase A2 isoforms during iron-induced retinal toxicity. Implications for age-related macular degeneration.” (2012) *Neurochemistry International* 61 749–758.

**Capítulo de libro:**

Gabriela A. Salvador \*, Melina V. Mateos #, Romina M. Uranga #,  
**Guadalupe Rodríguez Diez** & Norma M. Giusto. “Lipid signaling events during oxidative injury in nervous system”. (2009) *Anales de la Academia Nacional de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. ISSN 0365-1185.

## ABREVIATURAS

[ <sup>14</sup> C]DPPC	1-[ <sup>14</sup> C]palmitoil-2-[ <sup>14</sup> C]palmitoil-sn-glicero-3-fosfocolina
[ <sup>14</sup> C]PAPC	1-[ <sup>14</sup> C]palmitoil-2-[ <sup>14</sup> C]araquidonoil-sn-glicero-3-fosfocolina
[ <sup>3</sup> H]AA	[ <sup>3</sup> H]ácido araquidónico
AA	Ácido araquidónico
ACS	Acil CoA sintetasa
AMD	Degeneración macular relacionada con la edad
AP-1	Proteína activadora-1
AT	Aciltransferasas
ATK	Araquidonoil trifluorometilcetona
ATP	Adenosina 5'-trifosfato
BA	<i>Buffer</i> hipotónico A
Bad	Proteína asociada a Bcl-2 promotora de muerte
Bax	Proteína X asociada a Bcl-2
BB	<i>Buffer</i> de lisis completa hipertónico B
Bcl-2	Linfoma 2 de célula B
Bcl-xL	Bcl-extra grande
BEL	Bromoenucléol lactona
BH	<i>Buffer</i> de homogeneización para sistema nervioso central
BSA	Seroalbúmina bovina
CAT	Catalasas
Cit	Citosol (Fracccionamiento subcelular)
CL	Cardiolipina
CNS	Sistema nervioso central
CoA	Co-enzima A

CoA IT	Transacilasa independiente de CoA
COX	Ciclooxigenasa;
Cp	Ceruloplasmina
cPLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> citosólica
Cyt-C	Citocromo C
DAG	Diacilglicerol
DCytb	Citocromo b duodenal
DKO	Doble <i>knockout</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMT-1	Proteína transportadora de metales bivalentes
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil reducido
DPPH*	Radical libre 1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraacético
ERK1/2	Quinasas reguladas por señal extracelular
FA	Ácidos grasos
FCit	Fracción citosólica (Fraccionamiento para factores de transcripción)
Fe	Hierro
Fe <sup>2+</sup>	Hierro en estado ferroso
FMic	Fracción microsomal
FMit	Fracción mitocondrial
FN	Fracción nuclear (Fraccionamiento subcelular)
FNuc	Fracción nuclear (Fraccionamiento para factores de transcripción)

Fpn	Ferroportina
GAPDH	Gliceraldehido-3-fosfatodehidrogenasa
Glicerol-P	Glicerol fosfato
GSH	Glutación reducido
GST	Glutación S-transferasas
H&E	Hematoxilina y eosina
HCl	Ácido clorhídrico
HEPES	Ácido 2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfónico
HETE	Ácido 5-hidroxi eicosatetraenoico
HFE	Proteína tipo antígeno leucocitario de histocompatibilidad clase I
hnRNP	Ribonucleoproteínas heterogéneas nucleares
Hp	Hepcidina
HPETE	Ácido hidroxi-peroxieicosatetraenoico
HPGPx	Glutación peroxidasa de hidroperóxidos
Hph	Hefastina
HRP	Peroxidasa de rábano
HT	Homogenado total
ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo
Ig	Inmunoglobulina
IHC	Inmunohistoquímica
IκB	Inhibidor de kappa B
IP	Inmunoprecipitados
iPLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> independiente de calcio
IRE	Elementos de respuesta al hierro
IRE-BP	Proteína unidora de elementos de respuesta al hierro

LB	<i>Buffer</i> de Locke
LC-PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de larga cadena
LDH	Lactato dehidrogenasa
LIP	<i>Pool</i> de Fe lábil
LOX	Lipooxigenasa
LPC	2-araquidonoil-lisofosfatidilcolina
LPCAT	Lisofosfatidilcolina acil CoA aciltransferasa
LPIAT	Lisofosfatidil inositol acil CoA aciltransferasa
LPLA <sub>2</sub>	Lisofosfolipasa A <sub>2</sub>
LPLAT	Aciltransferasa de lisofosfolípido
MAPK	Proteínas quinasas activadas por mitógenos
MDA	Malondialdehido
MEK	Proteínas quinasas de quinasas activadas por mitógenos
MeOH	Metanol
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazol
NAD <sup>+</sup>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina oxidado
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NBIA	Desórdenes neurodegenerativos con acumulación neuronal de Fe
NF-κB	Factor nuclear κB
NP-40	Nonidet P-40
NPD1	Neuroprotectina D1
NS	Sistema nervioso
PA	Ácido fosfatídico
PAF	Factor activador de plaquetas
PAF-AH	Acetilhidrolasa del factor activador de plaquetas

PAL	Ácido palmítico
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
PGF <sub>2</sub>	Prostaglandina F <sub>2</sub>
PI	Fosfatidil inositol
PL	Fosfolípidos
PLA <sub>1</sub>	Fosfolipasa A <sub>1</sub>
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub>
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
POPC	1-palmitoil-2-oleo-sn-glicero-3-fosfocolina
PR	Fotorreceptores
PS	Fosfatidilserina
PSS	Solución salina fisiológica
PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados
PVDF	Difluoro de polivinilideno
Px	Peroxidasas
RD	Degeneración retiniana
RH	Retina homogeneizada
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RPE	Epitelio pigmentario de la retina
RTf	Receptores de transferrina
SDI	Test de inhibición de la succinato deshidrogenasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de



	sodio
SM	Esfingomielina
SOD	Superóxido dismutasas
sPLA <sub>2</sub>	Fosfolipasa A <sub>2</sub> secretoria
SPMic	Sobrenadante post-microsomal
SPMit	Sobrenadante post-mitocondrial
SPN	Sobrenadante post-nuclear
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TBS-T	<i>Buffer</i> tris salino con <i>tween</i> 20
TCA	Ácido tricloroacético
Tf	Transferrina
TLC	Cromatografía en capa fina
Tx	Tromboxanos
U0126	1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis[2-aminofeniltio]butadieno
VLC-PUFA	Ácidos grasos poliinsaturados de muy larga cadena