



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

TESIS DOCTORAL EN BIOQUÍMICA

“Los esfingolípidos como reguladores de los procesos de
degeneración neuronal de la retina”

Facundo Heber Prado Spalm

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2018

PREFACIO

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para acceder al grado académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otras Universidades.

En la misma se describen los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Lípidos en el Desarrollo Neuronal, del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, dependiente de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), durante el período comprendido entre octubre de 2013 y noviembre de 2018, bajo la dirección de la Dra. Nora P. Rotstein y la co-dirección del Dr. Luis E. Politi.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el día .../.../..... , mereciendo la calificación de (.....)

Noviembre de 2018

Facundo Heber Prado Spalm

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEDICATORIA

... a mi amor, Marianela

... a mis padres Lidia y Dante

... a mi hermano Federico

... a mi abuela Angélica

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Nora P. Rotstein y el Dr. Luis Politi por haberme dado la oportunidad de iniciarme en el mundo de la investigación, por haber creído en mí y por todos sus consejos.

A todos mis compañeros de Laboratorio, los actuales y con los que compartí solo un tiempo. Por lo que me enseñaron, por las charlas y los lindos momentos compartidos. En especial quisiera agradecerle a Marcos, con quien compartimos una gran amistad y a Lorena, por todos sus consejos y su incondicional ayuda en cada momento que más lo necesité. También quiero agradecer especialmente a Beatriz y Edgardo, no solo por todo su apoyo profesional, sino también por su gran calidez humana.

A todos los miembros del INIBIBB que en algún momento me han ayudado, de una u otra manera, ya sea facilitándome un reactivo, enseñándome alguna técnica o brindando algún consejo. Especialmente a las chicas del laboratorio de Norma y también a Susana y Marta, por su invaluable ayuda con la limpieza del material y su calidez para conmigo.

A Diego Obiol, una gran persona y amigo que tuve la suerte de conocer durante esta etapa de doctorado.

A mi amigo Esteban quien, a pesar de la distancia, continuó brindándome acertados consejos.

A mis compañeros de docencia, Jorge y Luciano, excelentes personas con quienes he compartido, reído y aprendido muchísimo.

A la Universidad Nacional del Sur, gracias a la cual pude obtener mi formación de pre y postgrado y por haberme otorgado una beca de tres años para iniciar este doctorado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral concedida, que posibilitó la finalización de estos estudios de postgrado.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), por el espacio y los medios brindados para el desarrollo de esta tesis.

A los organismos que financiaron al Laboratorio de Lípidos en el desarrollo Neuronal, para poder llevar a cabo las investigaciones que se realizaron en el transcurso de esta tesis: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Sur (UNS).

A mis padres y mi hermano, que siempre creyeron en mí y me apoyaron en los momentos más complicados, de esta difícil, pero para mí apasionante, vocación científica.

A mis suegros, Nancy y Omar por haberme apoyado y por quererme como a un hijo.

A Lidia, una hermosa persona que me ayudó mucho desde que llegara, hace ya 12 años, a Bahía Blanca.

A mis abuelos del corazón, Lucrecia y Dino y a mi abuela Angélica, que desde algún lugar sé que me está guiando...

A mi amor, mi compañera de vida, Marianela (Mey). Sin ella nada de esto hubiera sido posible, todas esas horas que me escuchaste y me alentaste a seguir, esa sonrisa que me hacía olvidar de todo lo que no salía y parecía que nunca iba a llegar. Simplemente ¡gracias!

RESUMEN

Desde hace casi tres décadas, los esfingolípidos han entrado a la escena de los lípidos bioactivos. Dentro de esta gran familia, son sus versiones más simples los que han sido relacionados con importantes funciones celulares. La Ceramida (Cer), y su derivado por deacilación, la esfingosina (Sph), han sido reportados como segundos mensajeros de muerte en diversos tipos celulares. Por su parte, sus derivados fosforilados, en especial la esfingosina-1-fosfato (S1P), se han identificado con funciones proliferativas y pro-supervivencia.

Diversas señales mitogénicas contribuyen no solo a la proliferación sino también a la migración celular, siendo de especial interés en ciertas patologías como el cáncer. Sin embargo, los procesos celulares invasivos son relevantes también en la retina, el tejido de interés de este trabajo de tesis. Diversas patologías, como la retinopatía diabética, presentan una proliferación exacerbada de las células gliales de Müller (CGM), el principal tipo glial de la retina, proceso conocido como gliosis. En su inicio, esta respuesta es un intento fisiológico por aislar al tejido neuronal de la injuria y reparar el daño. Sin embargo, en un estado patológico, ante la continuidad de la injuria, esta proliferación celular termina convirtiéndose en una cicatriz que afecta el normal funcionamiento del tejido retiniano, llevando en última instancia a la pérdida parcial o total de la visión. Por lo expuesto, resulta relevante investigar estos procesos proliferativos de la retina a fin de encontrar nuevos tratamientos terapéuticos.

La información sobre las funciones del esfingolípidito mitogénico S1P a nivel de la retina es escasa. Por ejemplo, se ha reportado que la S1P promueve la proliferación y respuestas profibróticas y pro-inflamatorias en células de epitelio pigmentario y que participa en la neovascularización retinal y coroidal. Además, los niveles retinales y plasmáticos de S1P aumentan en un modelo inflamatorio inducido por lipopolisacárido. En el primer capítulo de este trabajo de tesis, planteamos la hipótesis de que la S1P podría estar involucrada en los procesos glióticos, participando como una señal clave para inducir la migración glial. Para contrastar nuestra hipótesis, utilizamos un modelo de cultivo primario de células gliales de Müller y analizamos la migración glial mediante el "ensayo de la herida", un método sencillo y ampliamente utilizado para este propósito. Nuestros experimentos revelaron que la adición exógena de S1P induce modificaciones en el citoesqueleto de las CGM, detectadas en las primeras 8-10 h de tratamiento, que llevan a la formación de lamelipodios y al inicio de la motilidad glial sobre el sustrato. Esta motilidad glial fue claramente superior a la de los cultivos controles luego de 18 h de estímulo. Las CGM expresaron dos de los cinco receptores transmembrana para S1P, los S1PR, específicamente los subtipos S1P1 y S1P3, siendo la activación de este último la que

desencadena el proceso migratorio, tal como lo demostraron experimentos utilizando antagonistas selectivos de ambos receptores. Nuestros resultados también mostraron que rio-abajo de la activación del S1P3 se activarían dos importantes vías intracelulares, la vía de ERK/MAPK y la vía de PI3K, ya que el pre-tratamiento con inhibidores de estas vías disminuyó significativamente el estímulo migratorio inducido por S1P. Cabe destacar que esta inducción del proceso migratorio no estuvo acompañada de un incremento significativo en la proliferación glial. Por otra parte, no solo la S1P exógena tuvo un rol en la migración glial. Encontramos que la inhibición de la síntesis endógena de S1P, utilizando un inhibidor selectivo de la enzima esfingosina quinasa 1 (Sphk1) (enzima que cataliza la síntesis de S1P), el inhibidor de SphK1 2 (SphK12), prácticamente abolió la migración glial basal, es decir aquella observada aun en ausencia de S1P. Estos resultados demuestran que la S1P tiene un rol clave en la inducción de migración glial en la retina, y su bloqueo podría ser utilizado como una estrategia terapéutica para las enfermedades proliferativas de la retina.

Otro conjunto de patologías de la retina, de creciente avance y lamentablemente aun sin tratamientos efectivos, son las enfermedades neurodegenerativas. Las mismas son un conjunto de patologías, entre las que destacan la retinitis pigmentosa y la degeneración de la mácula con una variada etiología, con múltiples factores, desde genéticos hasta ambientales como desencadenantes, pero que comparten un denominador común: la muerte de los fotorreceptores (FR). Esta degeneración progresiva de los FR lleva, como consecuencia final, a la pérdida de la visión.

Como se describió, Cer y Sph son importantes mediadores de muerte celular y han despertado la atención en el campo de las enfermedades neurodegenerativas. Estudios pioneros encontraron que los niveles de Cer se encontraban aumentados en retinas *pos mortem* de pacientes con la enfermedad de Faber, y que los niveles de este esfingolípido aumentaban frente a la degeneración neuronal inducida por desprendimiento de retina. Posteriores reportes, incluidos los de nuestro laboratorio, establecieron que la Cer es un mediador clave en la muerte de los FR en cultivo. El daño oxidativo estimula la síntesis de Cer que desencadena la muerte de los FR y este proceso es mimetizado por la adición exógena de un análogo sintético de ceramidas endógenas, la C2-Ceramida (C2Cer). Hallazgos posteriores en diversos modelos animales de neurodegeneración retiniana permiten proponer a la Cer como un mediador central en la activación de la muerte de los FR. Pese a esto, aún no se conoce en profundidad cuáles son los mecanismos moleculares involucrados en este proceso. Esta pregunta resulta relevante, ya que la regulación de los distintos blancos intracelulares de Cer podría emerger como posible terapia para las enfermedades neurodegenerativas de la retina. Ante esto, nos planteamos como objetivo en el 2º capítulo de esta Tesis, estudiar los mecanismos moleculares involucrados en la

muerte de los FR mediada por C2Cer, utilizando un modelo de cultivo primario de neuronas de retina de rata. Un trabajo previo de nuestro laboratorio demostró que la C2Cer, en una concentración de 10 μ M induce la muerte de los FR y las neuronas amacrinas, los tipos neuronales mayoritarios en los cultivos. Estudiando el proceso de muerte de manera cronológica, encontramos que el tratamiento de cultivos neuronales con C2Cer 10 μ M durante 6 h indujo selectivamente la muerte de los FR, disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial y aumentando la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS). En contraste, las neuronas amacrinas preservaron su viabilidad. Cabe destacar que la cantidad de células marcadas con TUNEL y de FR que expresaron caspasa-3 clivada, forma activa de la caspasa-3, permanecieron constantes y que el pretratamiento con un pan inhibidor de caspasas no evitó la muerte inducida por C2Cer. C2Cer provocó la sobre activación de la poli-ADP ribosil polimerasa-1 (PARP-1). La inhibición de PARP-1 disminuyó la muerte de los FR inducida por C2Cer. A su vez, C2Cer aumentó los niveles de polímero de poli-ADP ribosa (PAR), cuya síntesis es catalizada por PARP-1, e indujo la translocación del factor inductor de apoptosis (AIF) de las mitocondrias al núcleo de los FR, ya que dicha translocación se previno mediante la inhibición de PARP-1. El pretratamiento con un inhibidor de calpaínas y catepsinas, y con un inhibidor de la calpaína redujo la muerte de los FR, mientras que los inhibidores selectivos de catepsinas no otorgaron protección. El pretratamiento combinado con un inhibidor de PARP-1 y un inhibidor de calpaína evidenció la misma protección que cada inhibidor por sí mismo. Esto sugiere que tanto PARP-1 como calpaínas confluyen en el mismo mecanismo de acción río-abajo de la C2Cer. Ni la autofagia ni la necroptosis estuvieron involucradas en la muerte inducida por C2Cer; no se observó un aumento en la liberación de LDH después del tratamiento con C2Cer y el pretratamiento con inhibidores de la necroptosis y de la autofagia no rescataron a los FR. Estos resultados sugieren que la C2Cer activa la muerte de los FR por un mecanismo novedoso, independiente de caspasas, que implica la activación de PARP-1, disminución del potencial de membrana mitocondrial, activación de calpaína y translocación de AIF, todas las características bioquímicas del tipo de muerte celular denominada parthanatos. Nuestros resultados, sugieren así nuevos blancos terapéuticos, y contribuyen a los avances en la búsqueda de tratamientos efectivos para las enfermedades neurodegenerativas de la retina.

SUMMARY

For almost three decades, sphingolipids have entered the bioactive lipid scenery. Within this large family, simple sphingolipids are the ones that have been related to important cellular functions. Ceramide (Cer), and its deacylation derivative, sphingosine (Sph), have been reported as death second messengers in several cell types. On the other hand, its phosphorylated derivatives, especially sphingosine-1-phosphate (S1P) have been related to proliferative and pro-survival functions.

Several mitogenic signals contribute not only to proliferation but also to cell migration, being of special interest in certain pathologies such as cancer. However, invasive cellular processes are also relevant in the retina, the tissue of interest in this thesis work. Diverse pathologies, such as diabetic retinopathy, show an exacerbated proliferation of Müller glial cells (CGM, the main glial type of the retina), a process known as gliosis. Initially, this response is a physiological attempt to isolate neuronal tissue from injury and repair the damage. However, in a pathological state, given the continuity of the injury, this cell proliferation gives rise to a scar that affects the normal functioning of the retinal tissue, ultimately leading to a partial or total vision loss. Therefore, it is relevant to investigate these retinal proliferative processes in order to find new therapeutic treatments.

There is scarce information on the functions of the mitogenic sphingolipid S1P in the retina. S1P has been reported to promote proliferation, pro-fibrotic and pro-inflammatory responses in pigment epithelial cells and it also participates in retinal and choroidal neovascularization. In addition, there is an increase in retinal and plasma levels of S1P in an inflammatory model induced by lipopolysaccharide. In the first chapter of this thesis we propose the hypothesis that S1P might be involved in gliotic processes, as a key signal in the induction of glial migration. To test our hypothesis, we used a primary culture model of Müller glial cells and evaluated cell migration by the scratch-wound assay, which is a simple and widely used method. Our experiments revealed that the exogenous addition of S1P modified the CGM cytoskeleton, in the first 8-10 hours of treatment. This addition led to the formation of lamellipodia and to the onset of glial motility. This motility was markedly enhanced compared to control conditions after 18 h of S1P addition. CGM expressed two of the five transmembrane receptors for S1P (S1PR), specifically the S1P1 and S1P3 subtypes. However, only activation of S1P3 was required to induce S1P-induced CGM migration, as evidenced by experiments performed with S1P1 and S1P3 antagonists. Analysis of the signaling pathways activated downstream of S1P3 evidenced that two well-known pathways, the ERK/MAPK and PI3K pathways were activated, since pre-treatment with specific inhibitors, significantly reduced S1P-induced glial migration. Of note, this

induction of the migratory process was not accompanied by a significant increase in glial proliferation. On the other hand, not only exogenous S1P played a role in glial migration. Inhibition of the endogenous synthesis of S1P, using a selective inhibitor of the enzyme sphingosine kinase 1 (Sphk1) (the enzyme that catalyzes the synthesis of S1P), the SphK1 inhibitor number 2 (SphK12), virtually blocked the basal glial migration, i.e. the migration level observed in the absence of exogenous S1P. These results demonstrated that the S1P-S1P3 axis has a key role in the induction of migration in the retina, and its targeting might provide an interesting approach in the search of new therapeutical treatments for proliferative diseases of the retina.

Among retinal pathologies, neurodegenerative diseases are a set of diseases of the retina that progressively lead to vision loss and still lack effective treatments. Pathologies such as retinitis pigmentosa and macula degeneration have very diverse etiologies, varying from genetic to environmental triggers, but which share a common hallmark: the death of photoreceptors (PhRs). This progressive degeneration of PhR leads, as a final consequence, to visual disability and blindness.

As described, Cer and Sph are important mediators of cell death and have attracted special attention in the field of neurodegenerative diseases. Pioneering studies found that Cer levels were increased in post-mortem retinas of patients with Faber's disease; furthermore, the levels of this sphingolipid are increased in neuronal degeneration induced by retinal detachment. Subsequent reports, including those from our laboratory, established that Cer is a key mediator in the death of PhRs in culture. Oxidative damage stimulates the synthesis of Cer, which triggers the death of photoreceptors and this process is mimicked by the exogenous addition of a synthetic analogue of an endogenous ceramide, C2-Ceramide (C2Cer). Further work using animal models of retina degeneration support a role for Cer as a crucial signal involved in the induction of PhR death. However, the molecular mechanisms involved in this process are still unknown. Uncovering them is very relevant, since regulating the different intracellular targets of Cer might provide new therapies for neurodegenerative diseases of the retina. The purpose of the second chapter of this thesis was to study the molecular mechanisms involved in the death of PhRs induced by C2Cer, using as a model primary cultures of rat retinal neurons. Previous work from our laboratory showed that 10 μ M C2Cer induces the death of PhRs and amacrine neurons, the two major neuronal types in our cultures. A chronological analysis of the death process showed that treatment with 10 μ M C2Cer for 6 h selectively induced the death of photoreceptors, decreasing mitochondrial membrane potential and increasing the formation of Reactive Oxygen Species (ROS). In contrast, amacrine neurons preserved their viability. Of note, the number of cells labeled with TUNEL and of photoreceptors

expressing cleaved caspase-3 remained constant and a pretreatment with a pan caspase inhibitor did not prevent C2Cer-induced neuronal death. C2Cer caused over-activation of poly-ADP ribosyl polymerase-1 (PARP-1). The inhibition of PARP-1 decreased photoreceptor death induced by C2Cer. In turn, C2Cer increased poly-ADP ribose (PAR) polymer levels, the synthesis of which is catalyzed by PARP-1, and induced the translocation of apoptosis-inducing factor (AIF) from mitochondria to the nuclei, which was prevented by PARP-1 inhibition. Pretreatment with a calpain and cathepsin inhibitor, and with a selective calpain inhibitor, reduced photoreceptor death, whereas selective cathepsins inhibitors did not provide any protection. The combined pretreatment with a PARP-1 inhibitor and a calpain inhibitor showed the same extent of protection as each inhibitor by itself. This suggests that both PARP-1 and calpains converge downstream in the same mechanism. Neither autophagy nor necroptosis were involved in C2Cer-induced cell death; no increase in LDH release was observed after C2Cer treatment and pretreatment with necroptosis and autophagy inhibitors did not rescue photoreceptors. These results suggest that the C2Cer-induced photoreceptor death signaling by a novel caspase-independent mechanism, which involves PARP-1 activation, a decrease in mitochondrial membrane potential, activation of calpain and translocation of AIF, all of which are biochemical characteristics of the cell death type named parthanatos. In conclusion, our results identify a new therapeutic target, thus contributing to the advances in the search for effective treatments for neurodegenerative diseases of the retina.

INDICE

PREFACIO.....	i
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
RESUMEN	iv
SUMMARY	vii
INDICE	x
INDICE DE FIGURAS.....	xiv
INTRODUCCION	1
Anatomía del ojo humano	1
La retina	2
Células gliales de Müller	4
Fotorreceptores	6
Los esfingolípidos	7
Metabolismo esfingolipídico.....	8
Los esfingolípidos como moléculas bioactivas.....	10
CAPITULO I: La Esfingosina-1-Fosfato es un esfingolípido clave para la migración de las células gliales de Müller.....	12
ANTECEDENTES.....	13
Las células Gliales de Müller, un arma de doble filo de la retina.....	13
Gliosis de las Células Gliales de Müller.....	14
Retinopatías proliferativas.....	15
La S1P como una señal proliferativa	16
MATERIALES Y METODOS	18
A. Animales.....	18
B. Métodos.....	18
Obtención de Cultivos gliales puros	18
Adición de S1P.....	19
Ensayo de Migración Glial.....	20
Técnicas de Citoquímica e Inmunocitoquímica	22
Participación de los receptores S1P1 y S1P3	22

Inhibición de la Síntesis de S1P	23
Vías intracelulares activadas por S1P	23
Análisis estadístico	24
RESULTADOS.....	25
Caracterización de los cultivos de Glía de Müller puros.....	25
La esfingosina-1-fosfato promueve la migración de las células gliales de Müller	26
La inhibición de SphK1 bloquea la migración de las células gliales.....	29
La esfingosina-1-fosfato activa al S1P3 para inducir la migración glial	30
Vías intracelulares activadas por S1P	32
DISCUSION	33
CAPITULO II: La Ceramida induce la muerte de los fotorreceptores de retina mediante la activación de Parthanatos	36
ANTECEDENTES.....	37
Enfermedades neurodegenerativas	37
Tipos de muerte celular	37
1. Apoptosis intrínseca.....	40
2. Apoptosis extrínseca	41
3. Necroptosis.....	42
4. Parthanatos	43
5. Muerte lisosomal	45
6. Muerte celular mediada por autofagia	45
Muerte neuronal en la retina.....	48
Ceramida y degeneración retiniana	49
MATERIALES Y METODOS	51
1. Animales.....	51
2. Cultivos neuronales de retina.....	51
3. Protocolo de tratamientos	52
4. Determinación de muerte celular.....	53
4.1 Ensayo de MTT	53
4.2 Análisis de despolarización mitocondrial	54
4.3 Marcación con Ioduro de Propidio.....	55
4.4 Análisis de la morfología nuclear	55

4.5	Ensayo de TUNEL.....	55
4.6	Determinación de niveles de estrés oxidativo celular.....	56
4.7	Ensayo de LDH.....	57
5.	Inmunocitoquímica.....	58
5.1	Identificación Neuronal.....	58
5.2	Caspasa-3-clivada	59
5.4	Translocación nuclear de AIF.....	59
5.4	Inmunomarcación de PAR.....	60
6.	Western Blotting	61
6.1	Obtención de las muestras de proteínas	61
6.2	Cuantificación de las proteínas.....	61
6.3	Electroforesis en gel de Poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)	61
6.4	Electro transferencia de proteínas a membrana de PVDF.....	62
6.5	Inmunodetección de las proteínas	62
7.	Análisis estadístico.....	62
	RESULTADOS.....	63
	La Ceramida indujo una muerte rápida y selectiva de los fotorreceptores	63
	El tratamiento con C2Cer no indujo fragmentación internucleosomal del ADN.....	66
	La muerte de los fotorreceptores inducida por Ceramida fue independiente de las caspasas.....	67
	C2Cer incrementó la formación de especies reactivas de oxígeno en fotorreceptores	69
	La sobre-activación de PARP-1 sería un evento clave en la muerte de los fotorreceptores inducida por Ceramida	70
	La muerte inducida por una ceramida natural también fue prevenida mediante el bloqueo de PARP-1.....	74
	La activación de PARP-1 inducida por C2Cer condujo a la translocación nuclear del AIF	75
	C2Cer activó a las calpaínas para promover la muerte de los fotorreceptores.....	77
	Las calpaínas mediaron la translocación del AIF al núcleo inducida por C2Cer.....	81
	Ni la necroptosis ni la muerte mediada por Autofagia estuvieron involucradas en el proceso de muerte inducido por C2Cer.	83
	DISCUSION.....	85

CONCLUSIONES GENERALES.....	92
ABREVIATURAS.....	94
BIBLIOGRAFÍA.....	96

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. ESQUEMA DE UNA SECCIÓN DEL OJO HUMANO.....	2
FIGURA 2. DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RETINA.	2
FIGURA 3. ORGANIZACIÓN CELULAR DE LA RETINA.	4
FIGURA 4. DISPOSICIÓN ESTRUCTURAL Y PRINCIPALES FUNCIONES DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER.	5
FIGURA 5. ESTRUCTURA DE CONOS Y BASTONES.	6
FIGURA 6. ESTRUCTURA DE LOS ESFINGOLÍPIDOS.	7
FIGURA 7. METABOLISMO DE LOS ESFINGOLÍPIDOS.	9
FIGURA 8. REÓSTATO ESFINGOLIPÍDICO.....	10
FIGURA 9. REACTIVIDAD DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER.	15
FIGURA 10. OBTENCIÓN DE CULTIVOS DE CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER PUROS.	19
FIGURA 11. ESQUEMA EXPERIMENTAL DEL “ENSAYO DE LA HERIDA”.....	21
FIGURA 12. CARACTERIZACIÓN DE CULTIVOS GLIALES DE MÜLLER.	25
FIGURA 13. LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO INDUCE LA FORMACIÓN DE LAMELIPODIOS Y LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER.	27
FIGURA 14. LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO PROMUEVE LA MIGRACIÓN DE LAS CGM.	28
FIGURA 15. LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE S1P BLOQUEA LA MIGRACIÓN GLIAL.	29
FIGURA 16. LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER EXPRESAN LOS RECEPTORES S1P1 Y S1P3.	30
FIGURA 17. LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO ACTIVA AL S1P3 PARA INDUCIR LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER.	31
FIGURA 18. LA ESFINGOSINA-1-FOSFATO ACTIVA DIFERENTES VÍAS INTRACELULARES PARA INDUCIR LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER.	32
FIGURA 19. S1P ESTIMULA LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS GLIALES DE MÜLLER.....	35
FIGURA 20. TIPOS DE MUERTE CELULAR.	38
FIGURA 21. MUERTE CELULAR PROGRAMADA (PCD) DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.	39
FIGURA 22. TIPOS DE MUERTE CELULAR REGULADA (RCD).....	40
FIGURA 23. ACTIVACIÓN DEL PROCESO DE APOPTOSIS MEDIANTE LAS VÍAS INTRÍNSECAS Y EXTRÍNSECAS.....	42
FIGURA 24. ESQUEMA DE LA VÍA DE PARTHANATOS.	44
FIGURA 25. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA MAQUINARIA CENTRAL INVOLUCRADA EN EL PROCESO DE AUTOFAGIA. ...	46
FIGURA 26. OBTENCIÓN DE CULTIVOS NEURONALES PUROS DE RETINA DE RATA.	52
FIGURA 27. REACCIÓN MITOCONDRIAL DEL REACTIVO DE MTT.....	54
FIGURA 28. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES CELULARES DE ESTRÉS OXIDATIVO.	57
FIGURA 29. EL AGREGADO DE C2CERAMIDA INDUJO RÁPIDAMENTE LA MUERTE NEURONAL.	64
FIGURA 30. EL TRATAMIENTO DURANTE 6 H CON C2CER PRODUJO LA MUERTE SELECTIVA DE LOS FOTORRECEPTORES.....	65
FIGURA 31. EL TRATAMIENTO CON C2CER NO INCREMENTÓ LA FRAGMENTACIÓN INTERNUCLEOSOMAL DEL ADN.	66

FIGURA 32. LA C2CER INDUJO LA MUERTE DE LOS FR A TRAVÉS DE UN MECANISMO CASPASA-INDEPENDIENTE.	68
FIGURA 33. LA C2CER INCREMENTÓ LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO (ROS).....	69
FIGURA 34. C2CER PROMOVIO LA MUERTE NEURONAL A TRAVÉS DE LA ACTIVACIÓN DE PARP-1.	71
FIGURA 35. EL PRE-TRATAMIENTO CON PJ34 REDUJO LA PICNOSIS NUCLEAR INDUCIDA POR C2CER.	72
FIGURA 36. EL TRATAMIENTO CON C2CER INDUJO LA SOBRE-ACTIVACIÓN DE PARP-1.	73
FIGURA 37. LA SOBRE ACTIVACIÓN DE PARP-1 MEDIÓ LA MUERTE DE LOS FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR UNA CERAMIDA NATURAL.	74
FIGURA 38. LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DEL AIF, INDUCIDA POR C2CER FUE PREVENIDA MEDIANTE INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE PARP-1.....	76
FIGURA 39. UN INHIBIDOR DE CALPAÍNAS Y CATEPSINAS PROTEGIÓ A LOS FOTORRECEPTORES DE LA MUERTE INDUCIDA POR C2CER.	78
FIGURA 40. LA INHIBICIÓN SELECTIVA DE CALPAÍNAS PROTEGIÓ A LOS FOTORRECEPTORES DE LA MUERTE INDUCIDA POR C2CER.	79
FIGURA 41. LA INHIBICIÓN DE CATEPSINAS O DEL PROTEOSOMA NO LOGRÓ RESCATAR A LOS FOTORRECEPTORES DE LA MUERTE INDUCIDA POR C2CER.	80
FIGURA 42. LA INHIBICIÓN CONJUNTA DE CALPAÍNAS Y PARP-1 NO PRESENTÓ EFECTO SINÉRGICO DE NEUROPROTECCIÓN FRENTE A C2CER.	81
FIGURA 43. LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE CALPAÍNAS PREVINO LA TRANSLOCACIÓN NUCLEAR DEL AIF INDUCIDA POR C2CER.	82
FIGURA 44. EL MECANISMO DE MUERTE DE LOS FOTORRECEPTORES INDUCIDA POR C2CER NO INVOLUCRÓ A LA NECROPTOSIS.	83
FIGURA 45. EL TRATAMIENTO CON C2CER NO PRODUJO LA ACTIVACIÓN DE MUERTE MEDIADA POR AUTOFAGIA.....	84
FIGURA 46. LA C2CER DESENCADENA PARTHANATOS PARA INDUCIR UNA RÁPIDA MUERTE DE LOS FOTORRECEPTORES.....	91

INTRODUCCION

Anatomía del ojo humano

Cuando miramos a alguien a los ojos, quizás lo más llamativo es la zona coloreada de los mismos, el *iris*. Se trata de una membrana circular, formada por fibras musculares y tejido conectivo, cuya coloración se debe a cantidades variables de eumelanina (melaninas marrones/negras) y feomelanina (melaninas rojas/amarillas) producidas por los melanocitos. Más allá de su estética, sus músculos se encargan de controlar el tamaño de la apertura que permite la entrada de la luz al ojo, la *pupila*, que es visualizada como una zona oscura debido a los pigmentos absorbentes en la retina. Una superficie transparente, la *córnea* cubre al iris y la pupila. El blanco del ojo, la *esclera*, forma parte de la pared de soporte de la copa óptica y se continúa con la córnea.

Si realizáramos un corte del ojo, como el de la Figura 1, nos revelaría:

- Tres capas:
 - capa externa: formada por la esclera y la córnea
 - capa intermedia: consta de una parte anterior (iris y cuerpo ciliar) y posterior (coroide).
 - capa interna o parte sensorial del ojo: la *retina*
- Tres cámaras de fluido: cámara anterior (entre la córnea y el iris), cámara posterior (entre el iris, los ligamentos del cuerpo ciliar y la lente) y la cámara vítrea (entre la lente y la retina). Las dos primeras cámaras están llenas de humor acuoso, mientras que la cámara vítrea contiene un fluido más viscoso, el humor vítreo.

La sección sagital también revela la lente, una estructura transparente localizada detrás del iris. La lente está suspendida por ligamentos adheridos a la porción anterior del cuerpo ciliar. La contracción y relajación del músculo ciliar, cambia la forma de la lente, en un proceso denominado acomodación, que permite formar una imagen nítida en la retina. Los rayos de luz se enfocan a través de la córnea transparente y la lente sobre la retina. El punto central para el enfoque de la imagen (el eje visual) en la retina humana es la fovea.

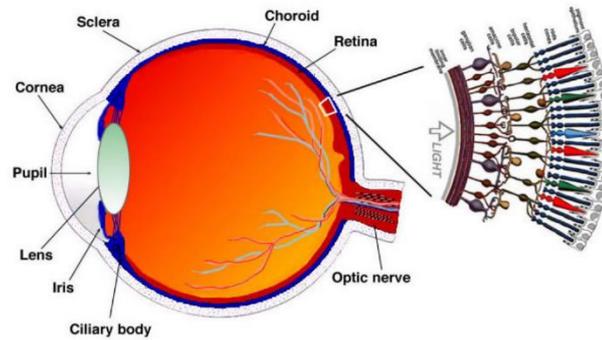


Figura 1. Esquema de una sección del ojo humano.

Modificado de Kolb y col 2018

La retina

La retina es una parte del sistema nervioso central (SNC) y al igual que otras regiones del mismo, deriva del tubo neural. Este tejido, representa un muy buen modelo de estudio, debido a que, comparativamente con otras regiones del SNC, ofrece una mayor facilidad de acceso. La retina se forma durante el desarrollo del embrión a partir de vesículas ópticas que se extienden desde los dos lados del tubo neural en desarrollo (Mann 1964). Las vesículas ópticas primordiales se pliegan sobre sí mismas para formar la copa óptica. Inicialmente, ambas paredes de la copa óptica tienen el espesor de una célula, pero las células de la pared interna se dividen para formar una capa neuroepitelial gruesa que consta de muchas células: la retina (Figura 2). El exterior de la copa, por su parte, se mantiene como una sola monocapa de epitelio, conocido como el epitelio pigmentario de la retina (EPR).

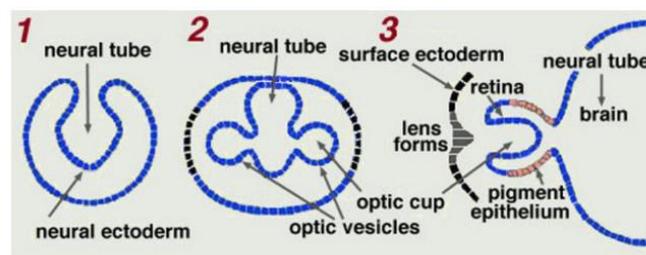


Figura 2. Desarrollo embrionario de la retina.

(Adaptado de Mann y col 1964)

La retina es una capa transparente de tejido neuronal que transduce la energía proveniente de los fotones de la luz en potenciales de acción que transmite al lóbulo occipital del cerebro a través del nervio óptico. Está formada por cinco tipos principales de neuronas, los

fotorreceptores (conos y bastones), las células amacrinas, bipolares, horizontales y ganglionares. Es en los fotorreceptores (FR) donde se produce la transducción visual, es decir la amplificación de la señal luminosa y su transformación a un gradiente electroquímico. La señal visual se transmite a las neuronas bipolares con las que hacen sinapsis, que a su vez conectan con las células ganglionares (conducción vertical). Las neuronas amacrinas y horizontales forman complejas conexiones con los tipos neuronales anteriormente mencionados (conducción horizontal).

Estas neuronas se organizan en diferentes capas, por lo cual para su estudio se suele analizar a la retina como una estructura laminar formada por dos capas nucleares y dos capas sinápticas (Figura 3):

- capa nuclear externa: formada por los cuerpos celulares de los FR (conos y bastones).
- capa plexiforme externa: donde se proyectan las prolongaciones sinápticas de los FR para hacer sinapsis con las neuronas bipolares y horizontales.
- capa nuclear interna: formada por los cuerpos celulares de las células gliales de Müller y las neuronas de asociación o conducción horizontal (células horizontales y las células amacrinas), y las de conducción vertical (células bipolares).
- capa plexiforme interna: constituida por las prolongaciones de las células de Müller, y las sinapsis entre los axones de las neuronas bipolares, prolongaciones de las amacrinas y dendritas de las células ganglionares.
- capa de células ganglionares: formada por los cuerpos de las neuronas ganglionares, prolongaciones de las células de Müller, astrocitos dispersos y capilares sanguíneos.

Además de los distintos tipos neuronales, la retina presenta varios tipos de células gliales, que se encuentran en diferentes partes de este tejido:

- Células Gliales de Müller (CGM): tipo glial mayoritario en la retina, tienen una función de soporte, síntesis y aporte nutritivo. Son alargadas, con su eje mayor perpendicular a la superficie de la retina constituyendo el soporte estructural de ésta, de tal manera que se extienden desde su límite más interno hasta la limitante externa. Presentan límites irregulares con numerosas y finas prolongaciones.
- Astrocitos: se encuentran dentro de la capa plexiforme interna y en la capa de células ganglionares. Sus prolongaciones forman un retículo irregular.

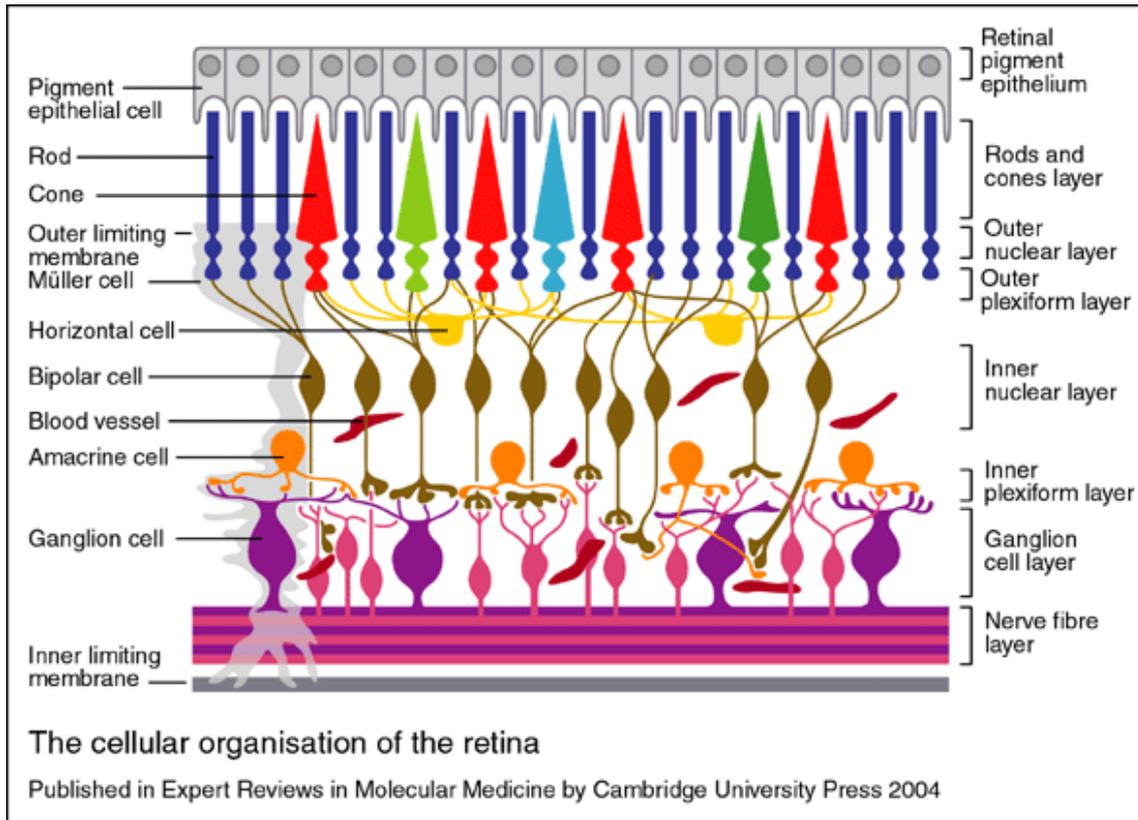


Figura 3. Organización celular de la retina.

Células gliales de Müller

Heinrich Müller describió por primera vez en 1851 células dispuestas a modo de fibras radiales en la retina, que más tarde pasaríamos a conocer como las células gliales de Müller (CGM). Las CGM son células gliales de tipo radial, que se expanden por todo el ancho de la retina. La población de células de Müller forma un patrón denso y regular. Cada una de estas células se puede considerar como el núcleo de una "micro unidad columnar" de neuronas de la retina, constituyendo un enlace anatómico entre dichas neuronas y los compartimentos con los que éstas necesitan intercambiar moléculas, como los vasos sanguíneos de la retina, el cuerpo vítreo y el espacio sub-retiniano.

Esta unión no es meramente anatómica. Dado que las CGM son prácticamente el único tipo de macroglía presente en la retina, llevan a cabo gran cantidad de funciones cruciales de soporte a las neuronas (Figura 4). Desde estadios tempranos de desarrollo retinal, las CGM son esenciales en el mantenimiento de la arquitectura retinal (Willbold et al., 1997) y para resguardar la supervivencia neuronal y el procesamiento de la información (Reichenbach et al., 1993). La importancia de las CGM en el mantenimiento de la estructura y funcionalidad retinal

es evidenciada por la observación de que la destrucción selectiva de las CGM produce displasia retinal, apoptosis de los FR y en un estadio final, degeneración retinal y proliferación del EPR (Dubois-Dauphin et al. 2000). Dentro de las principales funciones de las CGM en retinas sanas encontramos:

- Regular el metabolismo de la glucosa, aportando a las neuronas nutrientes como lactato/piruvato para su metabolismo oxidativo (Poitry-Yamate et al., 1995) así como remover los productos de desecho.
- Modular el procesamiento de las señales neuronales, a través de una rápida captación y reciclaje de neurotransmisores como el GABA y el glutamato. Una vez dentro de las células, el GABA es metabolizado a glutamato, que junto al glutamato captado es convertido a Glutamina por acción de la enzima Glutamina Sintetasa (GS). Esta glutamina es finalmente liberada para ser utilizada por las neuronas como precursora para sintetizar nuevamente GABA y Glutamato (Pow and Robinson 1994).
- Mantener la homeostasis de agua e iones del tejido retinal y la regulación del pH a través de la enzima Anhidrasa Carbónica (AC) (Newman, 1994).
- Sintetizar antioxidantes como el glutatión (Schütte and Werner 1998).

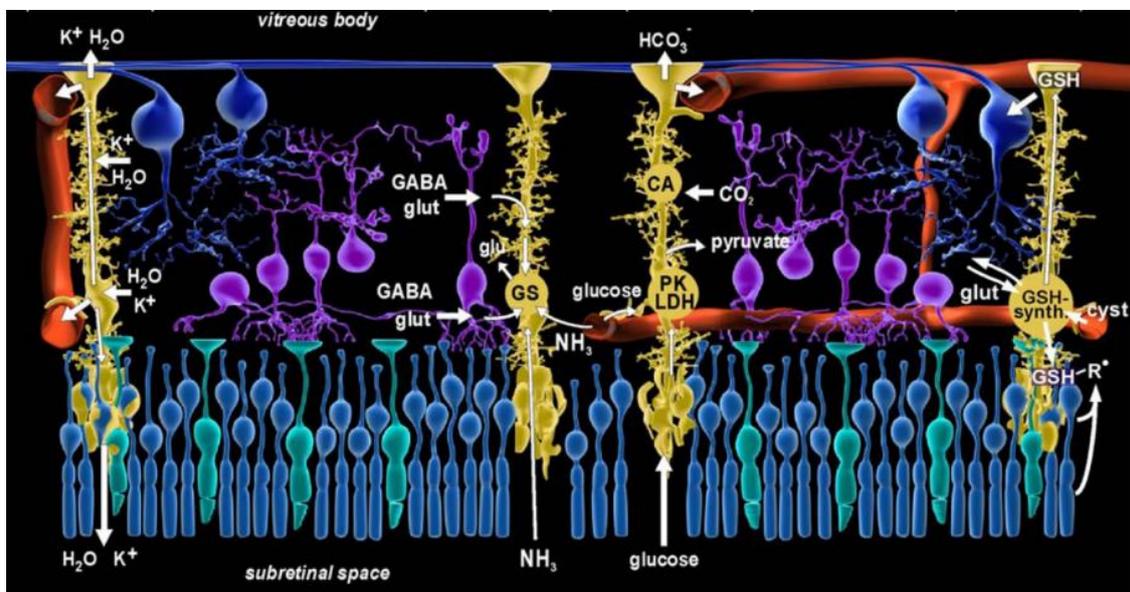


Figura 4. Disposición estructural y principales funciones de las Células Gliales de Müller.

(Modificado de Bringmann et al., 2006)

Fotorreceptores

Los FR son neuronas polarizadas que tienen un segmento externo con un fotopigmento, la rodopsina, un segmento interno con un núcleo, un cuerpo celular y un pedículo o terminación sináptica, mediante el cual se contactan con las neuronas horizontales y bipolares (Figura 5). El segmento interno y el cuerpo celular contienen las organelas mientras que el segmento externo está formado por un apilamiento de membrana; es allí donde se produce la transducción visual. Los FR son las células más abundantes del ojo, sumando alrededor de 90 millones en la retina humana, y se dividen en dos tipos, conos y bastones. Los bastones son responsables de la visión nocturna o escotópica y los conos, de la visión en color, diurna o fotópica. La proporción entre estos tipos de FR varían según la especie; en los humanos, el 5% son conos (Curcio et al., 1990) mientras que en las ratas, representan el 1,5% (La Vail 1976).

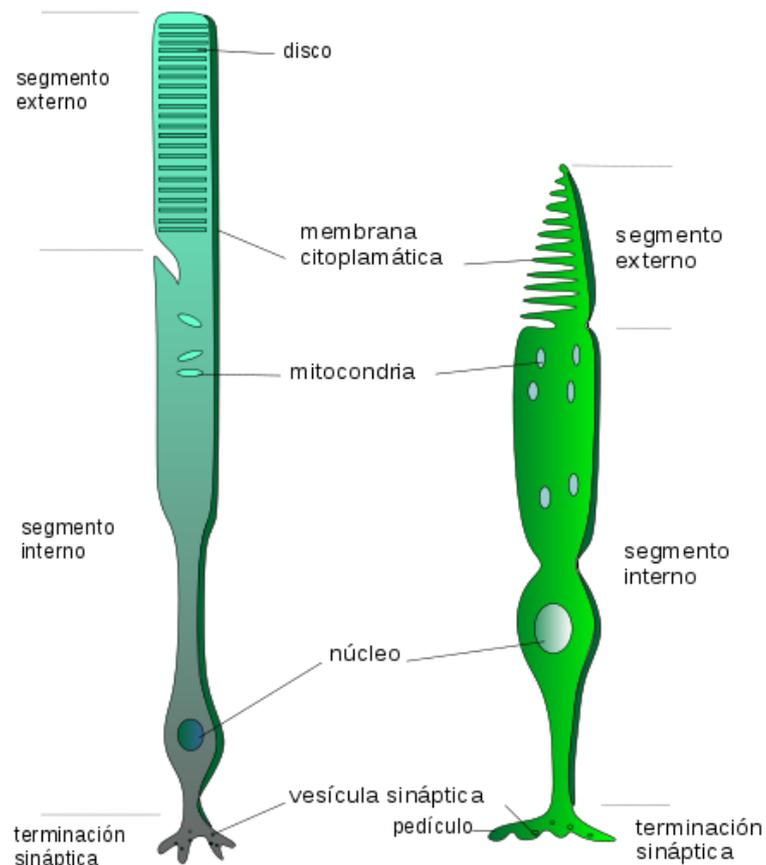


Figura 5. Estructura de conos y bastones.

(Imagen de Wikipedia Commons)

Los esfingolípidos

Los esfingolípidos fueron descritos por primera vez por Thudichum en 1884, mientras analizaba extractos de cerebro. Su nombre les fue otorgado en alusión a la esfinge egipcia y el enigma que la rodea, al desconocerse por ese entonces cuál era la función de este novedoso grupo lipídico. Hoy sabemos que son componentes esenciales de todas las membranas de células eucariotas y desde hace aproximadamente tres décadas, han pasado a integrar el grupo de los mensajeros celulares. Los esfingolípidos, al ser componentes de membrana, son moléculas anfifílicas. Su región hidrofóbica es un esqueleto esfingoide de cadena larga, al cual se le une un ácido graso de cadena larga. Si bien han sido reportadas alrededor de 60 bases esfingoides, la esfingosina (Sph), un amino-alcohol de 18 carbonos y una doble ligadura *trans* entre C4 y C5, es la estructura más difundida dentro de los esfingolípidos de mamíferos (Pruett et al. 2008). La unión a ésta de un ácido graso mediante enlace amida da lugar al más simple de los esfingolípidos, la *ceramida*. Estos ácidos grasos son de longitud variable (C2 a C28), siendo más usuales los de cadena larga (16 carbonos o más) (Rotstein et al., 2010). La ceramida (Cer) es un esfingolípidio bioactivo que da lugar, a través de la adición de distintos grupos polares en C1, a esfingolípidos más complejos (Figura 6) de naturaleza anfifílica:

- esfingomielina: adición de fosfocolina o fosfoetanolamina
- cerebrósido: unión de un azúcar simple como glucosa o galactosa
- gangliósidos: formados por la unión de oligosacáridos

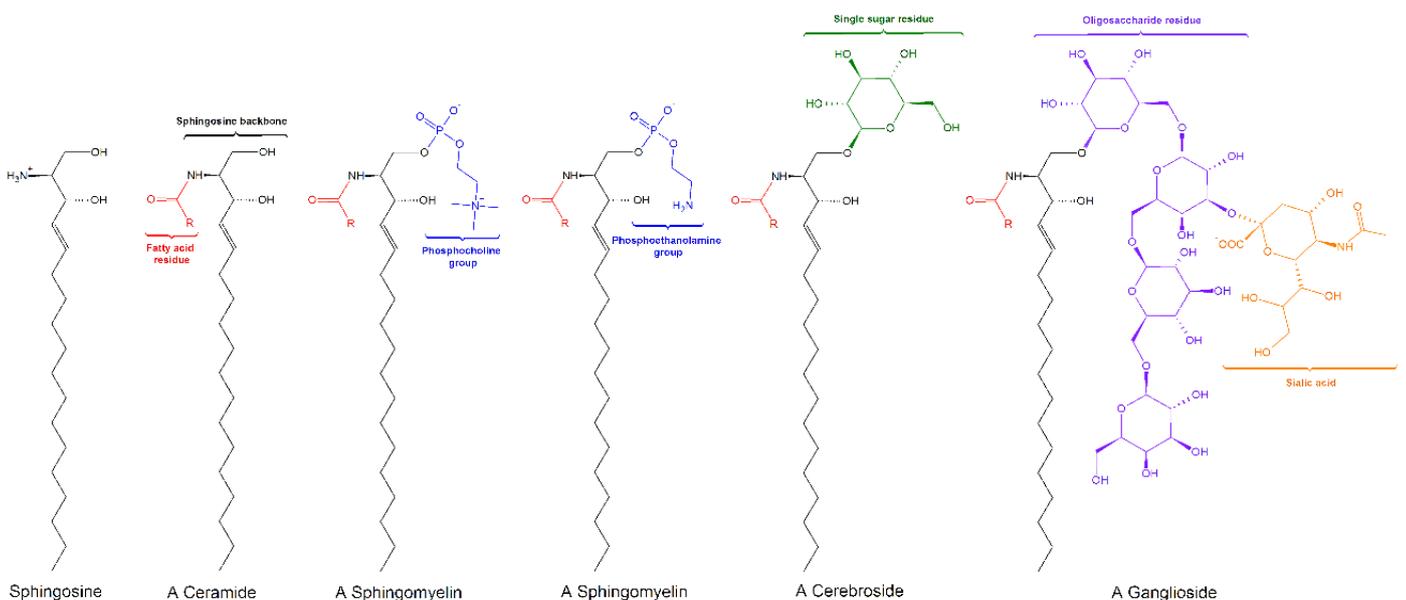


Figura 6. Estructura de los esfingolípidos.

(Imagen de Wikipedia Commons)

Metabolismo esfingolípido

Existen diversas rutas de entrada a la vía de los esfingolípidos y ambas convergen en la formación de Cer, lo cual otorga a esta molécula un rol clave en la generación de otros esfingolípidos bioactivos (Figura 7). La primera ruta de entrada, que ocurre en el retículo endoplasmático (ER), es la *síntesis de novo*, donde la serina y el palmitoil CoA se condensan y, posteriormente, a través de una serie de reacciones generan di-hidro ceramida, la cual es finalmente desaturada para formar Cer. Una vez formada, la Cer puede ser convertida en otros esfingolípidos bioactivos tales como Sph, esfingosina 1-fosfato (S1P) o ceramida-1-fosfato (C1P) o bien formar esfingomielina o glico-esfingolípidos complejos, de función principalmente estructural. La segunda ruta de síntesis es la *vía de las esfingomielinasas*, que involucra la hidrólisis de las esfingomielinas por acción de esfingomielinasas ácidas y neutras. Esta vía de síntesis ocurre virtualmente en todos los compartimentos celulares. Una tercera vía es la *vía de reciclado* o *vía de rescate* mediante la cual se obtiene Cer a partir de esfingolípidos complejos. Esta ruta metabólica ocurre a nivel de los lisosomas y reduce los esfingolípidos a Sph, la cual es luego reutilizada mediante conversión a Cer a través de una re-acilación.

La activación diferencial de estas distintas vías de formación de Cer es posible debido a la separación espacial de las enzimas que intervienen en cada ruta metabólica. Por ejemplo, serina palmitoil transferasa, la enzima limitante de la *vía de novo* se localiza en el retículo endoplasmático (ER), y esta dihidroesfingosina derivada del ER, sirve como sustrato para la biosíntesis de dihidroceramida a través de la *vía de novo*. Por el contrario, la Sph se genera a partir de la degradación de esfingolípidos complejos en lisosomas, y luego podría servir como sustrato para la regeneración de Cer (la denominada “vía de rescate”), posiblemente en el ER o en las membranas asociadas a este. Además, es posible, si no probable, que distintas isoformas (dihidro) ceramida sintasa con localización celular diferencial puedan estar implicadas en la *vía de novo* frente a la ruta de rescate. La homeostasis celular en respuesta a diferentes estímulos dependerá de qué camino de formación de Cer se active, así como de cuándo y dónde se produzca en la célula (Kitatani, Idkowiak-Baldys, and Hannun 2008).

La degradación de los esfingolípidos complejos es un proceso gradual. En primer término, se forma Cer, la cual a su vez es hidrolizada por la acción de ceramidasa para formar Sph. Esta esfingosina a su vez sirve como sustrato de la esfingosina quinasa (SphK), enzima responsable de la fosforilación de esfingosina para formar S1P (Sterin-Speziale 2007). La depuración celular de todos los esfingolípidos requiere de la transformación final a S1P. Por lo tanto, la actividad de la SphK inicia la única vía bioquímica de degradación de Cer de la célula.

La degradación final de S1P es mediada por la S1P liasa, y es el punto de salida de todos los esfingolípidos del pool celular general.

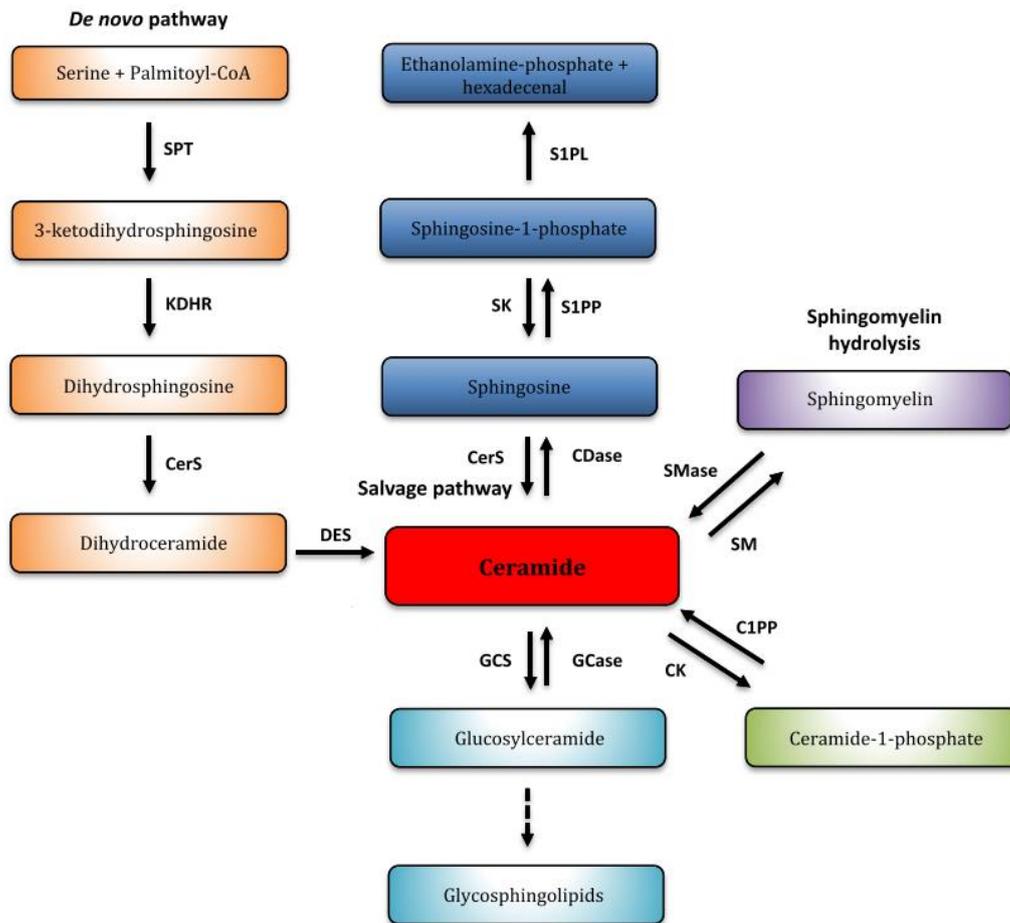


Figura 7. Metabolismo de los esfingolípidos.

La ceramida es la pieza central del metabolismo de esfingolípidos y puede ser sintetizada mediante múltiples vías. Puede ser generada por la vía de novo (naranja) a partir de la condensación de serina y palmitoil-CoA para generar 3-cetodihidrofosfingosina, que luego se reduce a dihidroesfingosina (también conocida como esfinganina) y luego acilada por ceramidas sintasas (CerS). Los esfingolípidos complejos como los glucoesfingolípidos (celestes) pueden ser hidrolizados a esfingosina, que luego es convertida en ceramida en la vía de reciclaje o bien fosforilada a esfingosina-1-fosfato por la esfingosina quinasa (SK), para así salir del metabolismo de esfingolípidos por la acción de la esfingosina-1-fosfato liasa (SPL) (azul). La ceramida también se puede formar mediante la hidrólisis de esfingomielina (púrpura). Serina palmitoiltransferasa (SPT); 3-ketodihidroesfingosina reductasa (KDHR); (dihidro) ceramida sintasa (CerS); dihidroceramida desaturasa (DES); ceramidasa (CDasa); esfingosina-1-fosfato fosfatasas (SPP); esfingomielinasas (SMase); esfingomielina sintasa (SMS); glucosilceramida sintasa (GCS); glucosilceramidasa (GCase); ceramida galactosiltransferasa (CGT); galactosilceramidasa (GALC); ceramida quinasa (CERK); ceramida-1-fosfato fosfatasa (C1PP). Modificado de Hernández-Corbacho et al., 2017.

Los esfingolípidos como moléculas bioactivas

El reciente interés en los esfingolípidos se encuentra en el rol que estos lípidos tienen en la señalización intracelular, particularmente Cer, Sph y sus formas fosforiladas, C1P y S1P. En las últimas décadas quedó firmemente establecida la importancia de estos “esfingolípidos simples” en el control del destino celular. La Cer y la Sph se encuentran implicadas en los procesos de diferenciación, senescencia y muerte celular. La C1P y la S1P en cambio, promueven la supervivencia y proliferación celular. Los efectos antagónicos de estos mediadores esfingolipídicos y su capacidad de interconvertirse ante distintas señales intracelulares dieron origen al concepto de “reóstato esfingolipídico” (Figura 8), que propone que la relación o cociente entre las concentraciones intracelulares de Sph-Cer/S1P-C1P determinaría el destino celular (Maceyka et al., 2002).

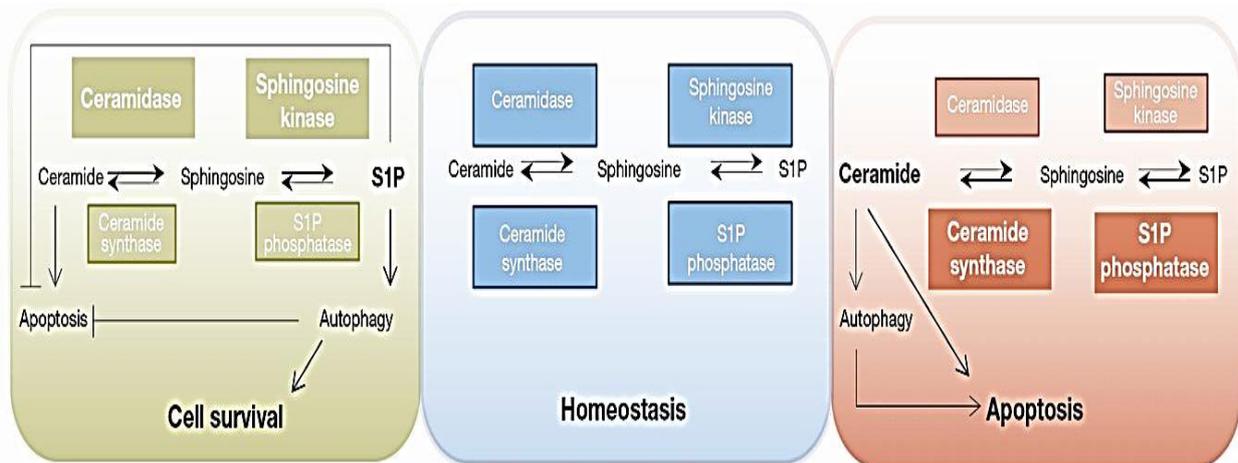


Figura 8. Reóstato esfingolipídico.

(Modificado de Reimann et al., *Transl Cancer Res* 2015;4(5):460-468)

Este balance esfingolipídico se encontraría en un fino equilibrio que fácilmente podría ser modificado por diversos estímulos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. Diferentes tipos de estrés celular activan las enzimas biosintéticas de Cer y Sph para incrementar sus niveles, y luego señalar diversas vías pro-apoptóticas e inhibitorias del crecimiento celular. Por el contrario, los factores de crecimiento elevan los niveles de SphK, llevando así al incremento intracelular de S1P, la cual promueve la supervivencia y la proliferación celular. (Rotstein et al., 2010).

El hecho de que este fenómeno ha sido reportado desde levaduras hasta células de origen humano destaca su relevancia biológica. De su postulado se deriva la atractiva opción de manipular el reóstato como estrategia terapéutica, ya sea para favorecer la muerte celular de

células anormalmente proliferativas como sucede en el cáncer o, por el contrario, promover la supervivencia, como en el caso de las enfermedades neurodegenerativas. A raíz de este enfoque han surgido numerosos reportes con interesantes hallazgos. Por ejemplo, en cerebros de pacientes con enfermedad de Alzheimer existe actividad incrementada de la esfingomielinasa (SMase) ácida, con elevados niveles de Cer y Sph y disminuidos niveles de S1P. A su vez, el tratamiento de cultivos neuronales con oligómeros beta amiloide incrementan la actividad SMase y los niveles de Cer en las neuronas, activando su apoptosis, mientras que el pretratamiento con Ceramidasa ácida recombinante (enzima que promueve la degradación de ceramida) previene dicha inducción de muerte (He et al. 2010).

Como se detallará en el desarrollo de esta tesis, mediante el uso de modelos de cultivos primarios, estudiamos la participación de dos de estos esfingolípidos, la S1P y la Ceramida, en procesos claves de las patologías retinianas como son la *gliosis* y la *muerte de las neuronas fotorreceptoras*. El resultado de nuestra investigación, en el marco del desarrollo de mi tesis doctoral, se presentará a través de dos capítulos, a saber:

- CAPÍTULO I: La Esfingosina-1-Fostato es un esfingolípidido clave en la migración de las Células Gliales de Müller

En este capítulo presentaré nuestro estudio sobre el rol de la S1P en la inducción de migración celular de las CGM. La migración celular es un proceso de especial importancia en el desarrollo de la gliosis reactiva, evento patológico de diversas enfermedades proliferativas de la retina como la retinopatía diabética. Utilizando un modelo de cultivo primario puro de CGM, establecimos que la S1P tiene un papel central en la activación de la migración glial.

- CAPÍTULO II: La ceramida induce la muerte de los fotorreceptores de retina mediante activación de Parthanatos

Como se mencionara, la Cer es un esfingolípidido bioactivo involucrado en los procesos de muerte celular. En este capítulo, describiré los antecedentes que ligan a la Cer con diversos procesos de neurodegeneración retiniana y detallaré los resultados obtenidos en el estudio de los mecanismos intracelulares de muerte celular inducida por el agregado de Cer en los FR. Utilizando como modelo cultivos neuronales puros obtenidos de retinas de rata demostramos la activación de una vía de muerte novedosa para la Cer, la vía de Parthanatos.

CAPITULO I: La Esfingosina-1-Fosfato es un esfingolípido clave para la migración de las células gliales de Müller

ANTECEDENTES

Las células Gliales de Müller, un arma de doble filo de la retina

Como se describió en la introducción, las CGM se expanden por todo el espesor de la retina, envolviendo a las neuronas retinales, y siguiendo un patrón conservado que está presente en todas las retinas de vertebrados. Esta relación morfológica se ve reflejada en múltiples interacciones funcionales entre las neuronas y las CGM, incluyendo el soporte metabólico y el procesamiento de la función visual. Las CGM son responsables del mantenimiento de la homeostasis del medio extracelular (balance de iones, agua, pH y neurotransmisores). Esto convierte a las CGM en una suerte de piedra angular de la retina. Sin embargo, virtualmente toda enfermedad de la retina está asociada con una transformación reactiva de las CGM, la *gliosis reactiva*, que, por un lado, en un intento inicial de mantener la homeostasis, favorece la supervivencia de las neuronas retinales, pero, por otro lado, ante la persistencia del proceso reactivo debido al estrés, puede acelerar el proceso de neurodegeneración. Las CGM protegen a las neuronas a través de la liberación de factores neurotróficos, la captación y degradación del neurotransmisor excitotóxico glutamato, y la secreción del antioxidante glutatión (Reichenbach and Bringmann 2012); sin embargo, las CGM glióticas presentan una desregulación de varias de sus funciones neuroprotectoras. Ya sea que las CGM se vean afectadas de manera directa o indirecta en el proceso patológico, el efecto final será un incremento en la susceptibilidad de las neuronas al estrés generado durante la patología retiniana (Bringmann et al., 2006).

Por todo ello, comprender los mediadores y mecanismos que llevan a la respuesta gliótica en la retina patológica y el balance entre sus funciones protectoras vs las acciones perjudiciales, resulta de crucial importancia en el desarrollo de estrategias terapéuticas para estimular el rol neuroprotector de las CGM, y a la vez prevenir los mecanismos destructivos de la gliosis.

Gliosis de las Células Gliales de Müller

A diferencia de las neuronas retinianas, las cuales son altamente sensibles a los cambios en su ambiente, las CGM son muy resistentes y capaces de sobrevivir a la mayoría de los daños retinales (Abraham et al. 2009; Stone et al. 1999). Frente a distintas condiciones patológicas de la retina, las CGM son capaces de activarse bajo un mecanismo adaptativo, ya mencionado, denominado “gliosis”, que incluye rápidas y variadas respuestas celulares. Las CGM incrementan la expresión de varias proteínas filamentosas, entre las cuales se encuentra como principal indicador de gliosis, la Proteína Fibrilar Ácida Glial (GFAP, por sus siglas en inglés). A su vez, la respuesta gliótica incluye la liberación de diferentes factores tróficos, tales como el factor de crecimiento de fibroblastos y el factor neurotrófico ciliar (Abraham et al., 2009; Bignami & Dahl, 1979; Bringmann et al., 2006). Esta respuesta gliótica puede ser tanto neuroprotectora como perjudicial para las neuronas; por ejemplo, la liberación de determinados factores tróficos protege a las neuronas, pero induce a su vez la neovascularización (Yasuhara et al., 2004). En retinas sanas, las CGM tienen una capacidad limitada de proliferar y migrar. Sin embargo, durante la gliosis son capaces de de-diferenciarse, re ingresando al ciclo celular, e incrementar su proliferación y migración. Este proceso lleva a la formación de una “cicatriz”, cuya finalidad es cubrir y “reparar” la zona afectada del tejido, pero que a largo plazo, termina afectando la capacidad de neuroregeneración y la integridad del tejido neural (Bringmann et al., 2006) (Figura 9). Durante el desprendimiento de retina, por ejemplo, los procesos celulares de las CGM crecen, extendiéndose a través de la membrana limitante externa, llenando los espacios dejados por los FR muertos (Lewis and Fisher 2000). Dentro del espacio subretinal, los procesos de las CGM forman entonces una capa fibrótica que inhibe la regeneración de los segmentos externos de los FR (Anderson et al. 1986). Las cicatrices gliales incluyen la expresión de moléculas inhibitorias en la superficie de las CGM reactivas, que inhiben la reparación del tejido y la neuroregeneración (Fawcett and Asher 1999).

A pesar de lo expuesto, los detalles moleculares de los mecanismos involucrados en la activación o gliosis de las CGM todavía no han sido claramente definidos, y su conocimiento detallado resulta esencial a fin de poder desarrollar estrategias terapéuticas efectivas para controlar la gliosis.

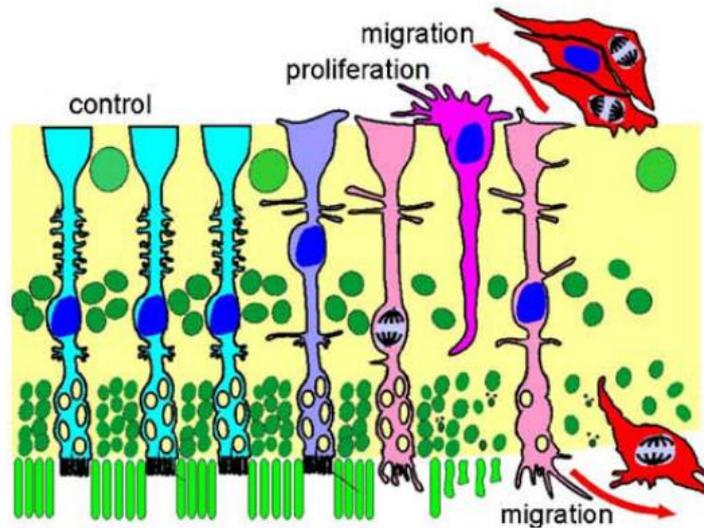


Figura 9. Reactividad de las Células Gliales de Müller.

El esquema muestra, de izquierda a derecha, el creciente avance en reactividad de las células gliales de Müller, desde su fenotipo normal al proliferativo-migratorio.

(Modificado de Bringmann et al, 2006).

Retinopatías proliferativas

La retinopatía vítreo-proliferativa (PVR) es una complicación frecuente del desprendimiento de retina (Wickham et al. 2012) que puede darse espontáneamente en el paciente o como consecuencia de una complicación posterior a una cirugía de retina. La PVR es un proceso de curación de herida de la retina, *a priori* fisiológico; sin embargo, puede evolucionar hacia un proceso perjudicial, conduciendo a una enfermedad caracterizada por una marcada proliferación y migración de las CGM, con posterior formación de membranas fibrocelulares en ambas superficies de la retina, conocidas como *membranas epiretinales*. Las membranas epiretinales conectan con el tejido neural a través de las fibras extendidas por las CGM hipertrofiadas (CGM fibroproliferativas). Diversos estudios demostraron que estas CGM pueden transdiferenciarse en miofibroblastos que generan fuerzas traccionales en respuesta a factores de crecimiento vítreos, causando mediante tracción el desprendimiento de la retina del epitelio pigmentado (Guidry, 2005). Cabe destacar que, las CGM ejercen un rol importante tanto en el desarrollo de la PVR como en la retinopatía proliferativa de tipo diabética (PDR) (Nork et al. 1987).

A partir del análisis de tejido retinal obtenido de pacientes de PVR o PDR se observó que las CGM muestran marcadas alteraciones en las características de sus membranas plasmáticas.

Las células presentan hipertrofia y disminución del potencial de membrana (Francke et al. 2001). A su vez exhiben un significativo aumento en la expresión de canales de calcio dependientes de potasio, los cuales son necesarios para la proliferación de las CGM. Esto sugiere un claro fenotipo de de-diferenciación de las CGM, que exhiben un patrón celular similar al de las células gliales presentes durante la ontogénesis (Bringmann et al., 1997). Por su parte, existe una fuerte disminución en la expresión de los canales de K^+ , el cual sería un requisito para la re-entrada al ciclo celular de las CGM glióticas (Bringmann et al., 1998). Esta regulación a la baja de los canales de K^+ se acompaña de una disminución en la expresión de los canales de agua (proteínas aquaporinas tipo 4). En conjunto, estos cambios alterarían la homeostasis del medio extracelular, agravando el daño a las neuronas retinales, en particular los FR, lo cual conduce, en el estadio final de estas patologías, a la pérdida parcial o total de la visión (Bringmann & Reichenbach, 2001).

La S1P como una señal proliferativa

La S1P es un esfingolípido bioactivo involucrado en la regulación de procesos celulares claves tales como la supervivencia, proliferación, diferenciación e inflamación (Hla and Dannenberg 2012) y promueve la migración en varios tipos celulares. La S1P es generada mediante la fosforilación de la Sph, reacción catalizada por la Esfingosina Quinasa (SphK), de la cual existen dos isoformas, SphK1 y SphK2. La S1P señala como un segundo mensajero intracelular o como señal extracelular, actuando como ligando de una familia de receptores de membrana acoplados a proteína G, los receptores de S1P (S1PRs), nombrados como S1P1-S1P5 (Blaho and Hla 2014). La S1P puede ser secretada de las células, mediante transportadores específicos, para señalar a través de sus receptores de manera autócrina o parácrina, en un proceso denominado señalización de “adentro hacia afuera” (inside-out signaling) (Strub et al., 2010).

Si bien aún no se conoce demasiado acerca de las funciones de la S1P en la retina, ésta ha emergido, a raíz de recientes hallazgos, como un mediador clave en patologías retinales, donde se ha reportado como una molécula de “doble filo”, con acción tanto deletérea como neuroprotectora (Rotstein et al., 2010). La S1P promueve la proliferación y respuestas pro-fibróticas y pro-inflamatorias en células de epitelio pigmentario (Qiao et al. 2012; Swaney et al. 2008) y participa en la neovascularización retinal y coroidal (Xie et al. 2009). A su vez, se ha reportado un aumento en los niveles retinales y plasmáticos de S1P en un modelo inflamatorio inducido por lipopolisacárido (Jang et al. 2007). En contrapartida, la S1P puede, a su vez, contribuir a la protección neuronal. La S1P protege a los FR de la apoptosis inducida por

desprendimiento de retina (Ranty et al. 2009) e incrementa la liberación de Taurina, molécula neuroprotectora, por parte de las CGM (Ando et al. 2012). Nuestro laboratorio demostró que la S1P promueve la supervivencia de los FR *in cultivo* y que es un regulador crucial de la proliferación de los progenitores de FR y de su posterior diferenciación (Miranda et al. 2009). Diversos factores tróficos como el factor neurotrófico derivado de la Glía (GDNF) y el ácido docosahexaenoico (DHA) aumentan los niveles de Sphk1 para incrementar así la síntesis de S1P, la cual actúa luego como un mediador intracelular de los efectos de estos factores en los FR (Miranda et al., 2009).

La similitud entre los efectos bivalentes de la S1P y las características de las CGM glióticas nos llevaron a hipotetizar que la S1P podría ser un mediador molecular de gliosis retiniana, formulando el siguiente objetivo de trabajo, que indagamos en este primer capítulo de tesis doctoral:

Determinar si la S1P estimula la migración y/o la proliferación de las CGM en cultivo y los mecanismos moleculares involucrados en dicho efecto.

MATERIALES Y METODOS

A. Animales

Para los distintos experimentos se utilizaron ratas de 3 días de edad pertenecientes a la cepa Albino Wistar criadas en nuestra propia colonia en el bioterio del INIBIBB.

Todos los procedimientos de manipulación animal se llevaron a cabo de acuerdo con la guía publicada por el National Institutes of Health para el uso y cuidado de animales de laboratorio y con el ARVO Statement para el uso de animales en investigación Oftalmológica y de la visión. Los protocolos utilizados contaron con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Experimentación (CICUAE) de la UNS.

B. Métodos

Obtención de Cultivos gliales puros

Cultivos purificados en CGM fueron preparados siguiendo un protocolo previamente descrito (Hicks and Courtois 1990) con ligeras modificaciones (Figura 10). Se enuclearon ojos de ratas de 3 días posnatales y se incubaron en medio de cultivo Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) a temperatura ambiente y oscuridad durante 24 h. A continuación, los ojos se trataron con 1 ml de una solución de tripsina 1mg/ml durante 3'30'' a 36,5 °C en baño con agitación. Luego se adicionó 1 ml de Colagenasa (4mg/ml) y se continuó la incubación por 7'30''. Completado el tiempo de incubación se lavaron los ojos dos veces con DMEM suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (DMEM 10%) para inhibir la actividad enzimática. Una vez lavados, los ojos se transfirieron a una placa de cultivo, de 35 mm de diámetro, conteniendo 2ml de Buffer Hank's y se extrajeron las retinas bajo lupa. Cada retina fue cortada en pequeños fragmentos de alrededor de 1-2 mm y sembrada en placas de 60 mm en DMEM 10%. Una vez sembrados, los fragmentos se incubaron durante 3-4 días a 36,5°C en una atmosfera de 5% CO₂.

Trascurrido ese tiempo, se pueden observar al microscopio de contraste de fases, las primeras células gliales, de aspecto aguzado y pequeño que se encuentran adheridas al sustrato, por fuera de los fragmentos de retina. Se retiraron entonces los fragmentos de tejido adheridos mediante lavados con Hank's y las CGM adheridas se mantuvieron durante aproximadamente 15 días, hasta que alcanzaron la confluencia, cambiando el medio de cultivo cada 2-3 días. Una vez confluentes, las células se repicaron en una dilución 1:3 y se re sembraron en placas de 35 mm para el posterior desarrollo experimental.

En todos los experimentos, las células fueron “hambreadas” una noche, en DMEM sin suero, para eliminar la influencia que pudieran tener los factores presentes en el mismo sobre el desarrollo experimental.

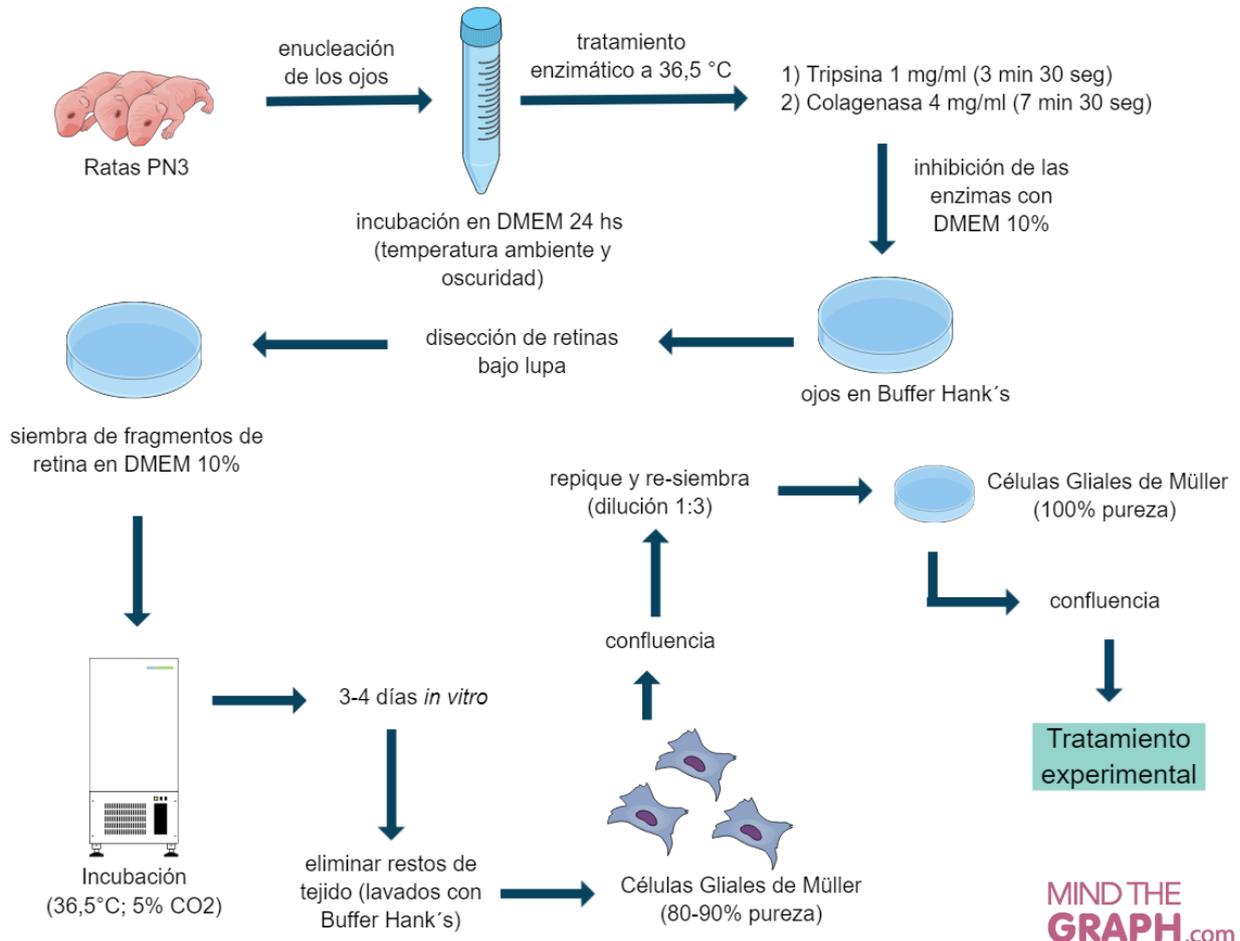


Figura 10. Obtención de Cultivos de Células Gliales de Müller puros.

Adición de S1P

Se preparó una solución de 0,5 mg/ml de S1P en metanol:agua (95:5) y luego se alicuotó en viales de vidrio, las cuales se almacenaron a -20°C. Para preparar las distintas diluciones de trabajo, se tomó el volumen necesario de una alícuota, y se pasó a un tubo de metanólisis. A continuación, se eliminó el solvente, gaseando con una corriente de nitrógeno y movimientos circulares del tubo, hasta formar una fina película de S1P, la cual se adhiere a las paredes del tubo. Posteriormente, se resuspendió la película de S1P mediante agregado de una solución 4mg/ml de Albúmina Sérica Bovina (BSA) en DMEM, calentando a 50°C con agitación ocasional

en Vortex durante 30 minutos. Finalmente, la disolución se completó con sonicación a 50°C hasta completa disolución de la S1P (aprox. 2-3 h).

En todos los experimentos, se utilizó una concentración de 5 μ M (concentración final en cultivo). El mismo volumen de la solución usada como vehículo se agregó a las condiciones controles.

Ensayo de Migración Glial

La migración de las CGM fue evaluada mediante el “ensayo de la herida” (*scratch wound assay*) descrita por Liang et al., 2007, con leves modificaciones (Figura 11). Se realizaron entre 3 y 4 líneas de lesiones paralelas sobre la monocapa de CGM, utilizando un tip estéril amarillo (P100). De esta manera se producen heridas de aproximadamente 1mm de ancho, generando una zona libre de células. El medio de cultivo fue reemplazado con DMEM fresco y se agregaron las distintas drogas o sus vehículos. Las células se fijaron luego de 10 o 18 h de tratamiento y la migración celular fue determinada por microscopía de fases y a través de la visualización del citoesqueleto de actina con Faloidina.

Para caracterizar la magnitud de la migración, en experimentos iniciales, se definieron 4 estadios de migración:

- estadio 0: sin movimiento apreciable de las células sobre la herida.
- estadio 1: campos donde las células comienzan a migrar, visualizado por la extensión de lamelipodios.
- estadio 2: campos donde las células cubren parcialmente la zona de la herida.
- estadio 3: campos donde la herida se cerró completamente, cubriéndose con las CGM.

En experimentos posteriores, se determinó la tasa de cambio en la cantidad de células migratorias comparadas con la condición control.

Se observaron un total de 20 campos por placa de cultivo.

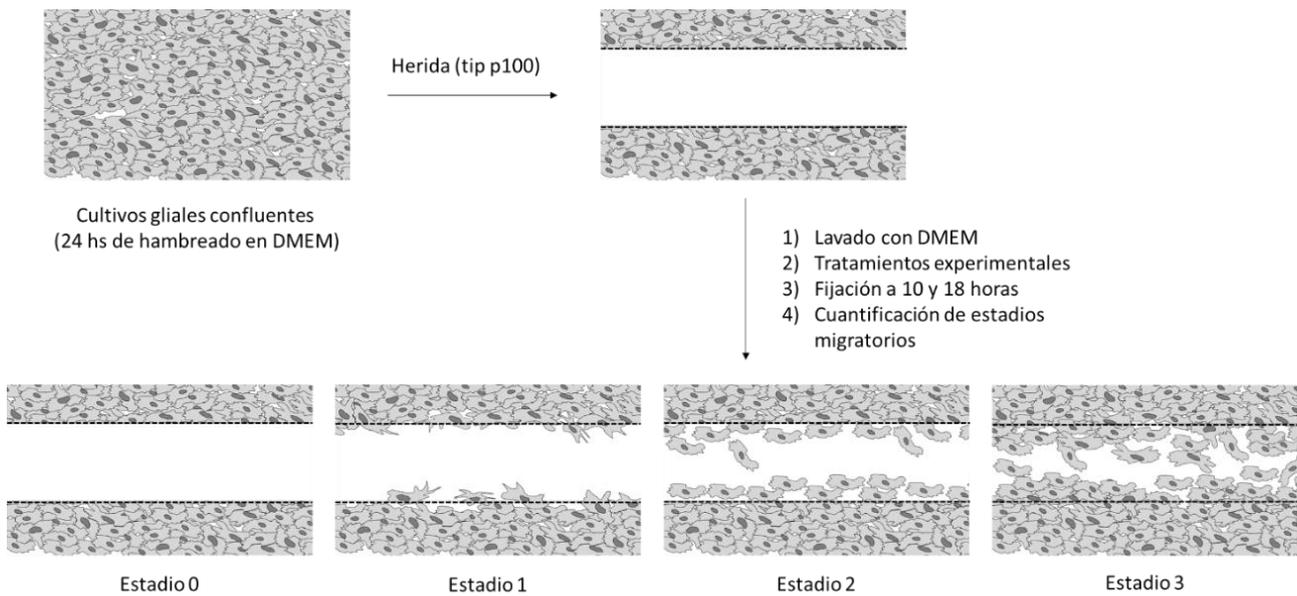


Figura 11. Esquema experimental del “ensayo de la herida”.

Para distinguir entre migración y proliferación celular se evaluó esta última mediante la incorporación de Bromo deoxiuridina (BrdU). Este es un nucleótido modificado que las células incorporan en la fase de síntesis de ADN (fase S), previa a la división mitótica. La determinación de su incorporación por la célula es un ensayo ampliamente utilizado para evaluar proliferación. Cultivos de CGM en las mismas condiciones que aquellos utilizados para los ensayos de migración, se incubaron con 20 μ M de BrdU por 10 h; a continuación, las células se fijaron por 1 hora, se trataron con 2N de HCl por 30 minutos para desnaturalizar el ADN y luego se neutralizó mediante agregado ácido bórico 0,1 M. La incorporación del nucleótido fue determinada utilizando un anticuerpo monoclonal anti-BrdU y anticuerpo Cy2 anti-ratón como anticuerpos primario y secundario respectivamente.

Técnicas de Citoquímica e Inmunocitoquímica

Los cultivos fueron fijados durante 1 hora con Paraformaldehído al 4% en Buffer Fosfato Salino (PBS). Para las marcaciones citoplasmáticas y nucleares se permeabilizó con Tritón X-100 al 0,1% en PBS durante 15 minutos.

Las CGM fueron identificadas por su morfología y mediante Inmunocitoquímica utilizando anticuerpos contra Vimentina (proteína de filamentos intermedios expresada entre otras células por las CGM), anti-GFAP (Glial Fibrillary Acidic Protein), anti GS (Glutamina Sintetasa) y anti-CRALBP (Cellular Retinaldehyde Binding Protein).

Las células microgliales fueron identificadas por Inmunocitoquímica utilizando un anticuerpo policlonal anti-Iba1.

La marcación de los núcleos se realizó mediante 4', 6-diamino-2-fenilindol (DAPI). Este fluorocromo es una sonda para ácidos nucleicos que se une preferencialmente al ácido desoxirribonucleico (ADN). La unión de DAPI a ADN de doble cadena intensifica 20 veces su fluorescencia (Kubista et al., 1987). DAPI también se une a ARN, pero el complejo fluoresce a una longitud de onda máxima mayor y con menor rendimiento cuántico. Incubamos con una solución de DAPI 1 µg/ml en PBS durante 10 minutos a temperatura ambiente y a continuación lavamos con PBS.

Los cultivos fueron posteriormente analizados por microscopia de contraste de fases y de epifluorescencia, utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600 o por microscopia láser confocal (Leica DMIRE2) con un objetivo de 633X de inmersión en agua.

Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con LCS software (Leica) y Photoshop 8.0 (Adobe Systems, San Jose, CA, USA).

Participación de los receptores S1P1 y S1P3

La presencia de los receptores S1P1 y S1P3 fue determinada por Inmunocitoquímica y RT-PCR después de fijar o lisar las células, respectivamente.

Para el análisis inmunocitoquímico, una vez fijadas, las CGM fueron marcadas con anti-S1P1 o anti-S1P3, seguidas de marcación con DAPI y Faloidina, respectivamente.

La presencia de estos receptores fue confirmada a su vez mediante la detección de los ARN mensajeros (ARNm) de ambos receptores, mediante reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa (RT-PCR). Se aislaron los ARN totales a partir de cultivos gliales puros y de cerebros de rata de 10 días posnatales (como controles positivos), utilizando Quick-ZOL (Kalium Technologies) según el protocolo otorgado por el fabricante. Los ADN complementarios

(ADNc) fueron generados utilizando la enzima M-MLV RT (Promega) y random primers. Para la detección de los ARNm de S1P1 y S1P3 se utilizaron los siguientes primers:

- S1P1 forward AGCTTCGTCCCGCTTGAG
- S1P1 reverse: TTACAGCAAGGCC AGGTCAG
- S1P3 forward: CCCAGATGAGCCTTGCAGAA
- S1P3 reverse: CTCAACAGTCCACGAGAGGG.

A fin de evaluar si S1P activa a S1P1 y/o S1P3 para inducir la migración de las CGM, cultivos gliales puros fueron incubados en DMEM por 24 h, se realizó la herida y posteriormente se trató con W146, antagonista del S1P1 (Gonzalez-Cabrera et al. 2008) o con BML-241, un antagonista de S1P3 (Koide et al. 2002) o sus respectivos vehículos como controles. En ambos casos se prepararon soluciones stock 1mg/ml en DMSO (W146) o Etanol (BML-241) y se incubaron durante 1 hora en una concentración final de 10 μ M. Posteriormente, los cultivos fueron suplementados con S1P o su vehículo y la magnitud de la migración glial fue evaluada 18 h después.

Inhibición de la Síntesis de S1P

Para investigar si las CGM sintetizan S1P para inducir su migración en la ausencia de S1P exógena, cultivos gliales puros fueron incubados en DMEM por 24 h antes de realizar la herida. Inmediatamente después, fueron tratadas con 30 μ M de SphK Inhibidor 2, un inhibidor específico de la enzima SphK1 (French et al. 2003). La migración glial fue determinada 18 h después.

Vías intracelulares activadas por S1P

Se analizaron las posibles vías intracelulares involucradas en el proceso migratorio inducido por S1P. Después de realizar la herida, cultivos gliales puros se trataron con LY294002 50 μ M, un inhibidor altamente selectivo de la PI3K; U0126 10 μ M, inhibidor selectivo de MEK; o con SB203580 1 μ M, inhibidor de p38 MAPK. Las soluciones stocks fueron preparadas en DMSO y las diluciones de trabajo en DMEM. Luego de 1 hora de incubación con estos inhibidores, los cultivos fueron tratados con S1P o su vehículo y se incubaron durante 8 y 18 h. Posteriormente la magnitud de la migración glial fue evaluada mediante el ensayo de la herida.

Análisis estadístico

Para los estudios de migración, se analizaron 20 campos (elegidos al azar) por cápsula de cultivo. Cada valor representa la media \pm SEM de al menos tres experimentos independientes, con 3 o 4 placas de cultivo en cada condición. La significancia estadística se determinó por t-Test de Student a una cola (en experimentos del tipo control vs experimental) o por ANOVA de una vía seguido por Test de Tukey (experimentos con múltiples tratamientos).

RESULTADOS

Caracterización de los cultivos de Glía de Müller puros

En primer lugar, confirmamos la identidad de las CGM en nuestros cultivos a través del análisis de expresión de marcadores específicos como Vimentina, Glutamina Sintetasa, GFAP y CRALBP (Figura 12 a-d).

La microglía se halla presente en cantidades muy pequeñas en nuestros cultivos (menos del 0,5%) y resulta fácilmente distinguible por su particular morfología, con un pequeño cuerpo celular, del cual usualmente se desprenden múltiples procesos delgados y ramificados. Confirmamos su presencia mediante expresión de un marcador específico, la proteína unidora de calcio, Iba-1 (Figura 12d).

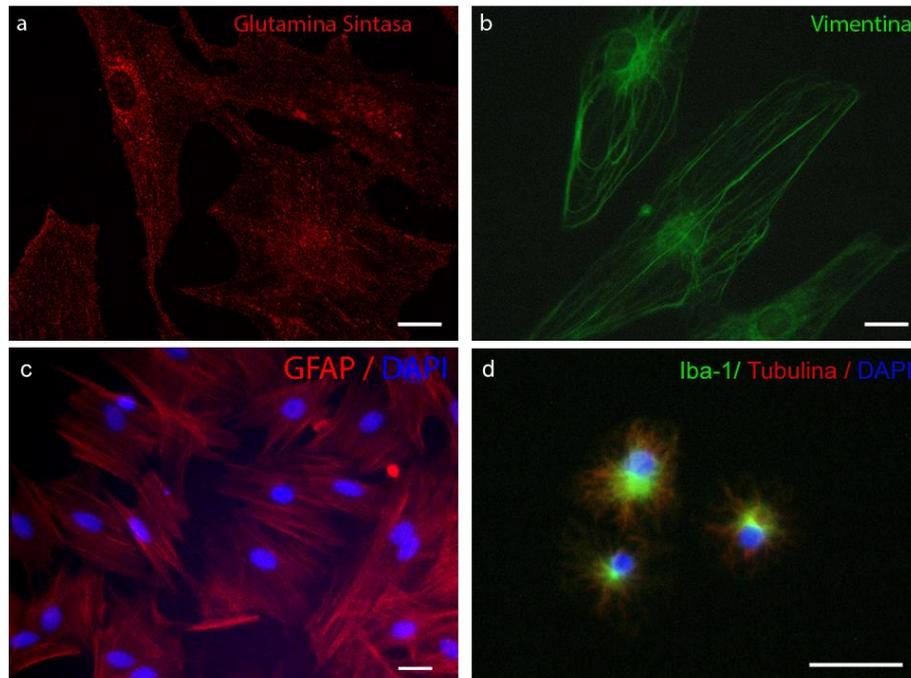


Figura 12. Caracterización de cultivos gliales de Müller.

Las microfotografías muestran cultivos gliales de 14 días y la expresión de marcadores característicos de las células gliales de Müller como Glutamina Sintetasa (a), Vimentina (b), GFAP (c), CRALBP (d) y de la microglía como Iba-1 ([e] en verde). Los núcleos se marcaron con DAPI ([c, e, g] en azul). Las células microgliales fueron escasamente detectadas en los cultivos y, además de mostrar el marcado de Iba-1 (verde en [e]), se identificaron fácilmente por su citoesqueleto pequeño y ramificado, marcado con beta tubulina en la fotografía ([e], rojo). Barra: 20 μ m.

La esfingosina-1-fosfato promueve la migración de las células gliales de Müller

El ensayo de la herida reveló que, tras 10 h de realizada la herida, hubo una muy escasa migración de las CGM (marcadas con Vimentina) en los cultivos controles, y en su gran mayoría no presentaron cambios en su citoesqueleto de actina (Figura 13a, 13c y 13e). En contraste, en los cultivos suplementados con S1P 5 μ M, a ese mismo tiempo, las CGM ya se encontraban sobre la zona de la herida (Figura 13b). La S1P indujo una rápida re-organización del citoesqueleto de actina de las CGM, llevando a la extensión de lamelipodios y filopodios (Figura 13f, cabezas de flecha), que generó un avance sobre la herida y el comienzo de la migración. Al cuantificar el porcentaje de campos analizados que presentaron células con extensión de lamelipodios, encontramos que el tratamiento con S1P triplicó dicho porcentaje, comparado con la condición control (Figura 13g).

Cuando evaluamos los diferentes estadios de migración luego de 10 h de realizada la herida, en los cultivos controles cerca del 80% de los campos analizados mostraron CGM en el estadio 0, es decir, sin movimiento ni alteraciones del citoesqueleto. Alrededor de un 15% y un 10% de los campos tenían células en los estadios 1 y 2, extendiendo lamelipodios o migrando, respectivamente (Figura 14a). Cabe destacar que, en los cultivos suplementados con S1P, solo el 17% de los campos presentaron CGM en estadio 0; mientras que cerca del 60% y 20% de ellas se encontraron en los estadios 1 y 2, respectivamente. Los cultivos tratados con S1P presentaron además unos pocos campos con la herida completamente cubierta de células, lo cual no ocurrió en los cultivos controles.

La migración glial se incrementó tras 18 h. En los controles, el porcentaje de campos que no presentaron migración glial se redujo a un 57% y aproximadamente el 35% y 10% de éstos mostraron células en los estadios 2 y 3, respectivamente (Figura 14b). Sin embargo, tras 18 h la migración glial en cultivos suplementados con S1P fue significativamente mayor que en las condiciones controles; el porcentaje de campos que no mostraron migración celular fue de sólo un 10%, un 60% de campos mostraron células sobre la herida (estadio 2) y cerca de un 30% de ellos presentaron un cierre total de la herida (Figura 14b).

Cabe destacar que se observaron solo unas escasas células BrdU-positivas, ninguna de las cuales estuvieron sobre la herida (Figura 14 c-e), sugiriendo que la contribución de la proliferación en la invasión de la herida por las CGM fue despreciable.

Estos resultados evidencian que la S1P actúa como una señal que estimula marcadamente la migración de las CGM.

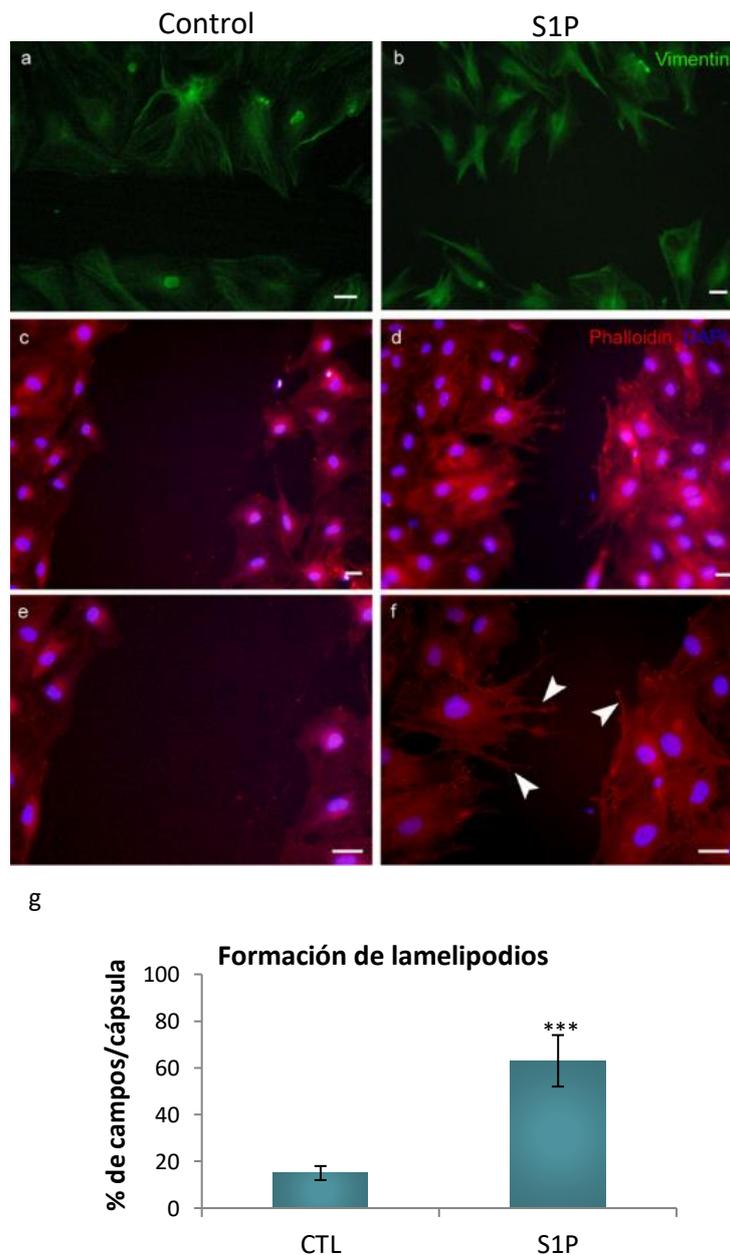


Figura 13. La esfingosina-1-fostato induce la formación de lamelipodios y la migración de las células gliales de Müller.

Los cultivos gliales fueron incubados en DMEM con 10% de suero fetal bovino durante 14 días, y luego “hambreados” en DMEM sin suero durante 24 h antes de realizar las heridas. Luego de esto, el DMEM fue renovado y los cultivos se trataron con vehículo (controles, [a, c, e]) o con S1P 5 μ M (b, d, f) y se incubaron por 10 h.

Las microfotografías de fluorescencia muestran la migración de células gliales marcadas con Vimentina (a, b) y Faloidina (c-f) en cultivos controles y tratados con S1P, y sus núcleos marcados con DAPI (c-f). Barras de escala: 20 μ m

La adición de S1P indujo la migración de las células gliales, marcadas con Vimentina, las cuales avanzaron sobre la herida (b) y rápidamente reacomodaron sus citoesqueletos de actina (d, f), llevando a la formación de filopodios (cabezas de flecha en [f]), fenómeno que estuvo prácticamente ausente en los cultivos controles (c, e). El gráfico en g, muestra la cuantificación de campos con células que presentan lamelipodios (***) Diferencias estadísticamente significativas respecto al control, $p < 0,001$.

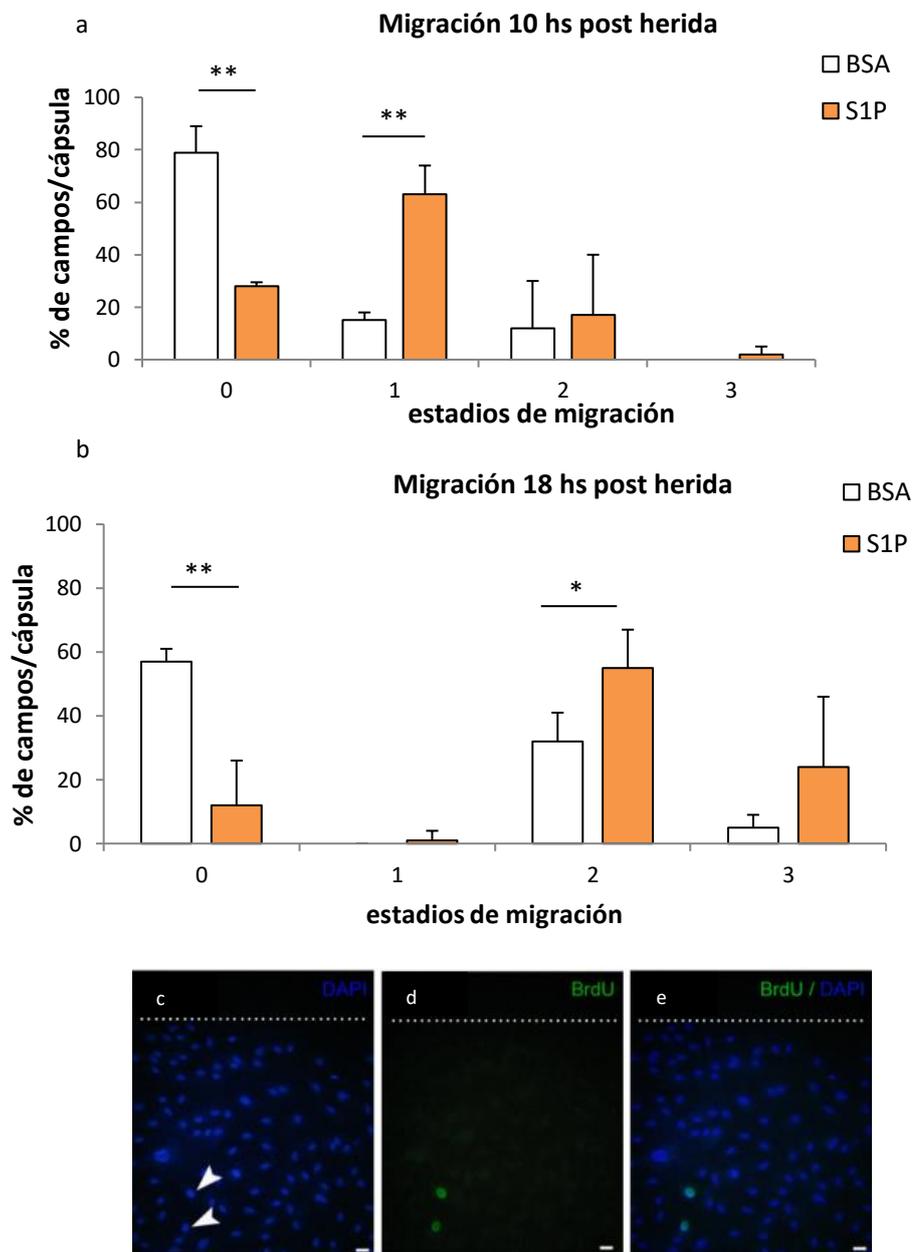


Figura 14. La esfingosina-1-fosfato promueve la migración de las CGM.

Porcentaje de campos mostrando CGM con diferentes estadios de migración en cultivos controles (barras blancas) o tratados con S1P (barras naranjas) después de 10 h (a) o 18 h (b) de realizada la herida. La cuantificación fue realizada mediante el análisis de campos con células gliales marcadas con Faloidina en diferentes estadios de migración definidos como: estadio 0, sin movimiento; estadio 1, campos con células extendiendo lamelipodios; estadio 2, campos con células cubriendo parcialmente la zona de la herida; estadio 3, células cubriendo completamente la zona de la herida. Las barras representan la media \pm S.E.M. Nótese que el tratamiento con S1P disminuyó el porcentaje de campos con células en estadio 0 e incrementó el porcentaje de aquellos campos que mostraron estadios avanzados de migración en comparación con los controles, en ambos tiempos analizados. Diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Para discernir entre migración y proliferación celular, se determinó la cantidad de células que captaron BrdU en las inmediaciones de la herida luego de 10 h de realizada la herida (c, d, e). Se observaron muy pocas células BrdU positivas ([d, e] en verde) y ninguna de ellas se encontró sobre la zona de la herida (línea punteada). Barras de escala: 20 μ m.

La inhibición de SphK1 bloquea la migración de las células gliales

Teniendo en cuenta que aún en ausencia de factores exógenos, se observó una migración sustancial tras 18 h (Figura 14b), nos preguntamos si las células sintetizan S1P para inducir su migración. Luego de 18 h, se observó que las CGM, marcadas con Vimentina, comenzaron a extenderse para comenzar a poblar la zona de la herida (Figura 15a, 15c). La inhibición de la SphK1, enzima responsable de la síntesis de S1P, mediante el agregado del inhibidor de SphK número 2 (SphKI 2) en una concentración de 30 μ M, prácticamente abolió la formación de lamelipodios y filopodios y evitó la migración glial (Figura 15b, 15d). El análisis cuantitativo mostró que SphKI2 redujo significativamente la migración glial, aproximadamente a un 20% de la migración observada en los controles (Figura 15e). Esto implicaría que la síntesis endógena de S1P sería requerida para la movilidad de las CGM en condiciones basales.

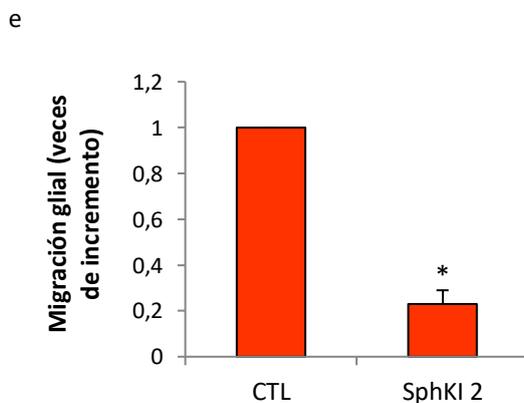
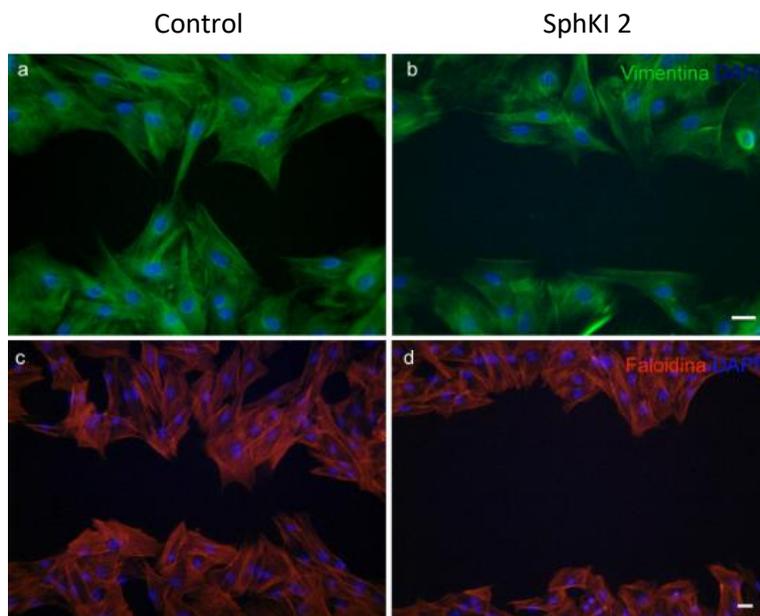


Figura 15. La inhibición de la síntesis de S1P bloquea la migración glial.

Cultivos gliales fueron suplementados con SphKI 2 o su vehículo (CTL) inmediatamente después de realizada la herida. Las microfotografías de fluorescencia corresponden a los controles (a, c) y los cultivos tratados con SphKI 2 (b, d) y muestran la marcación del citoesqueleto con un anticuerpo anti-Vimentina (a, b) y Faloidina (c, d) tras 18 h de realizada la herida. Nótese que la inhibición de la síntesis endógena de S1P con SphKI2 (b, d) redujo significativamente la migración glial comparada con los controles (a, c). Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul en [a, d]). Barra de escala: 20 μ m.

(g) Las barras muestran las veces de cambio en la migración glial de la condición SphKI2 vs la condición control expresada como la media \pm S.E.M. * Diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición control ($p < 0,05$).

La esfingosina-1-fosfato activa al S1P3 para inducir la migración glial

La S1P señala primariamente a través de sus cinco S1PRs, de los cuales S1P1 y S1P3 son conocidos por estimular la migración celular (Lee et al., 2001). El análisis Inmunocitoquímico reveló que las CGM en cultivo expresan tanto el S1P1 como el S1P3 tras 14 días *in vitro* (Figura 16 a, c) y su expresión fue confirmada mediante RT-PCR (Figura 16 b, d).

Para investigar si la activación de S1P1 y/o S1P3 tiene un rol en la migración glial, tratamos a los cultivos gliales con W146 y BML-241, antagonistas de S1P1 y S1P3, respectivamente, antes del agregado de S1P. La migración de las CGM resultó evidente en controles tras 18 h, y fue reducida a la mitad por BML-241 pero no se vio afectada significativamente por el agregado de W146 (Figura 17 a-c, 17g). La S1P incrementó la motilidad de las CGM, las cuales prácticamente cubrieron la herida, y duplicaron la cantidad de células migrantes respecto a los controles (Figura 17d, 17g). Esta inducción de la migración por S1P fue marcadamente reducida por el pre-tratamiento con BML-241, alcanzando valores similares a la condición control, mientras que no hubo una reducción significativa con la adición de W146 (Figura 17 e-g). Esto nos sugiere que la activación de S1P3, tanto por la S1P endógenamente sintetizada, como la agregada de manera exógena, es necesaria para inducir la migración glial, mientras que el S1P1, el otro receptor expresado por las células, no mediaría dicho efecto.

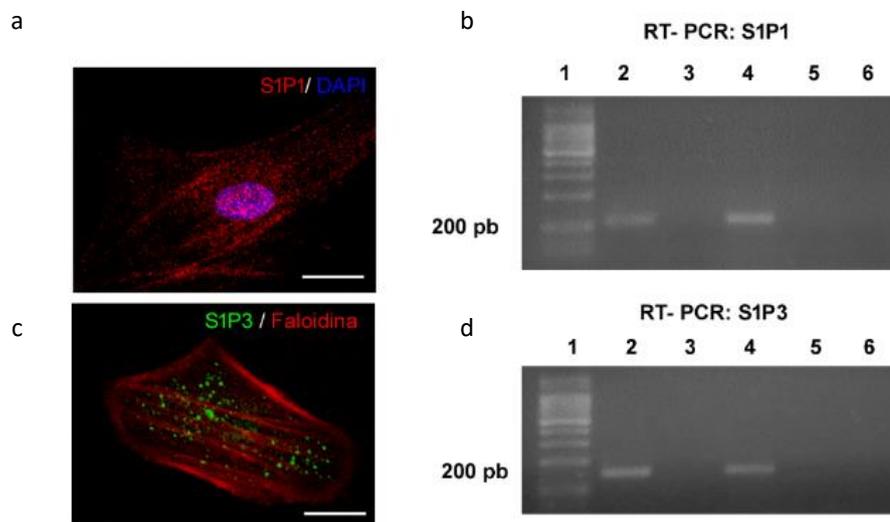


Figura 16. Las Células gliales de Müller expresan los receptores S1P1 y S1P3.

Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando la expresión del S1P1 (a) y el S1P3 (c), los núcleos marcados con DAPI (a) y el citoesqueleto de actina, marcado con Faloidina (c). Electroforesis de los ADNc de S1P1 (b) y S1P3 (d) obtenidos por RT-PCR, mostrando las bandas de 106 y 146 pares de bandas para S1P1 y S1P3 respectivamente, en muestras de cultivos gliales de 14 días (línea 2) y cerebros de rata PN10 (línea 4), utilizados como control positivo, las cuales estuvieron ausentes en sus controles, RNAm de cultivos gliales (línea 3) y de cerebro (línea 5) a los cuales no se les realizó la retro transcripción, y el control negativo de la RT-PCR, en la cual se utilizó agua destilada como muestra (línea 6).

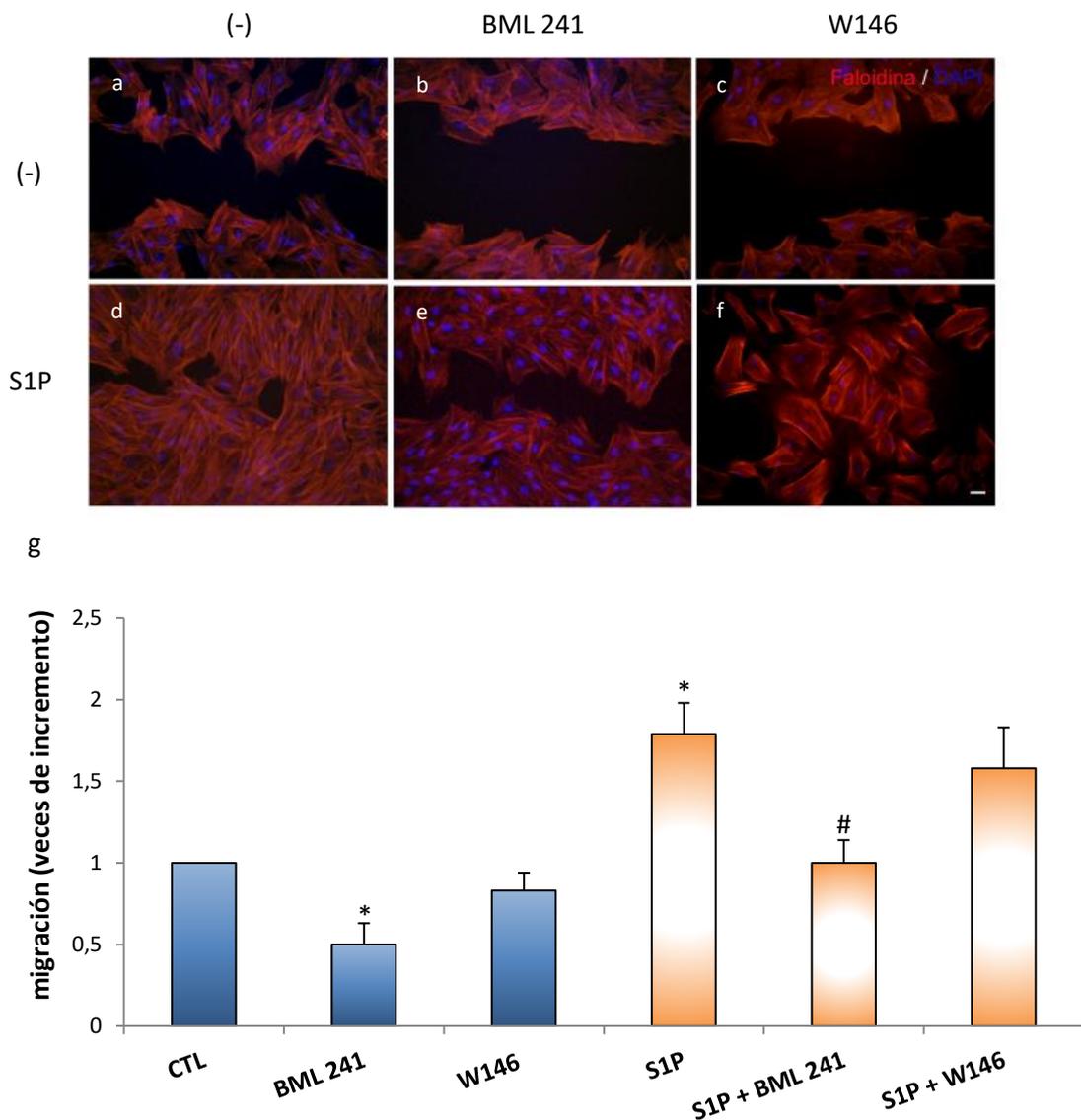


Figura 17. La esfingosina-1-fosfato activa al S1P3 para inducir la migración de las células gliales de Müller.

Las microfotografías de fluorescencia muestran las células gliales de Müller marcadas con Faloidina, para visualizar el citoesqueleto de actina, en controles [(-), (a-c)] y cultivos suplementados con S1P (d-f) sin pretratamiento (a, c) o preincubados con BML-241, un antagonista del S1P3 (b, e) o con W146, un antagonista del S1P1 (c, f). Los núcleos fueron visualizados con DAPI (azul).

La migración fue analizada 18 h después de realizar la herida. Nótese que la pre-incubación con BML-241 redujo marcadamente la migración glial tanto en controles (b) como en cultivos suplementados con S1P (e), mientras que las células gliales cubrieron parcialmente la herida en aquellos cultivos tratados con S1P y W146 (f). Barra de escala: 20 μm .

En la cuantificación (g) las barras muestran las veces de cambio en la migración glial de las distintas condiciones respecto a la condición no tratada (CTL). Los cultivos fueron tratados con los antagonistas de BML-241 y W146 en ausencia (barras azules) o presencia de S1P (barras naranjas).

*Diferencias estadísticamente significativas respecto al control ($p < 0,05$).

Vías intracelulares activadas por S1P

La unión de la S1P a los S1PRs lleva a la activación río abajo de varias vías intracelulares (Strub et al., 2010). Para investigar qué vías intracelulares son activadas por S1P para estimular la migración glial, tratamos los cultivos gliales con LY92004, un inhibidor de PI3K; U0126, un inhibidor de MEK o con SB203580, un inhibidor de p38 MAPK. Mientras que en los cultivos tratados con S1P las CGM extendieron lamelipodios y migraron parcialmente cubriendo la herida, tras 10 h, el pretratamiento con LY294002 o U0126 antes del agregado de la S1P, frenó la migración glial (Figura 18 a-e). El análisis cuantitativo luego de 18 h mostró que LY294002 y U0126 redujeron significativamente la migración glial, tanto en cultivos tratados con o sin S1P, hasta aproximadamente la mitad de la migración observada en la condición control (Figura 18f). Por su parte, el pretratamiento con SB203580 redujo la migración inducida por S1P, aunque esta reducción no fue estadísticamente significativa (Figura 18f).

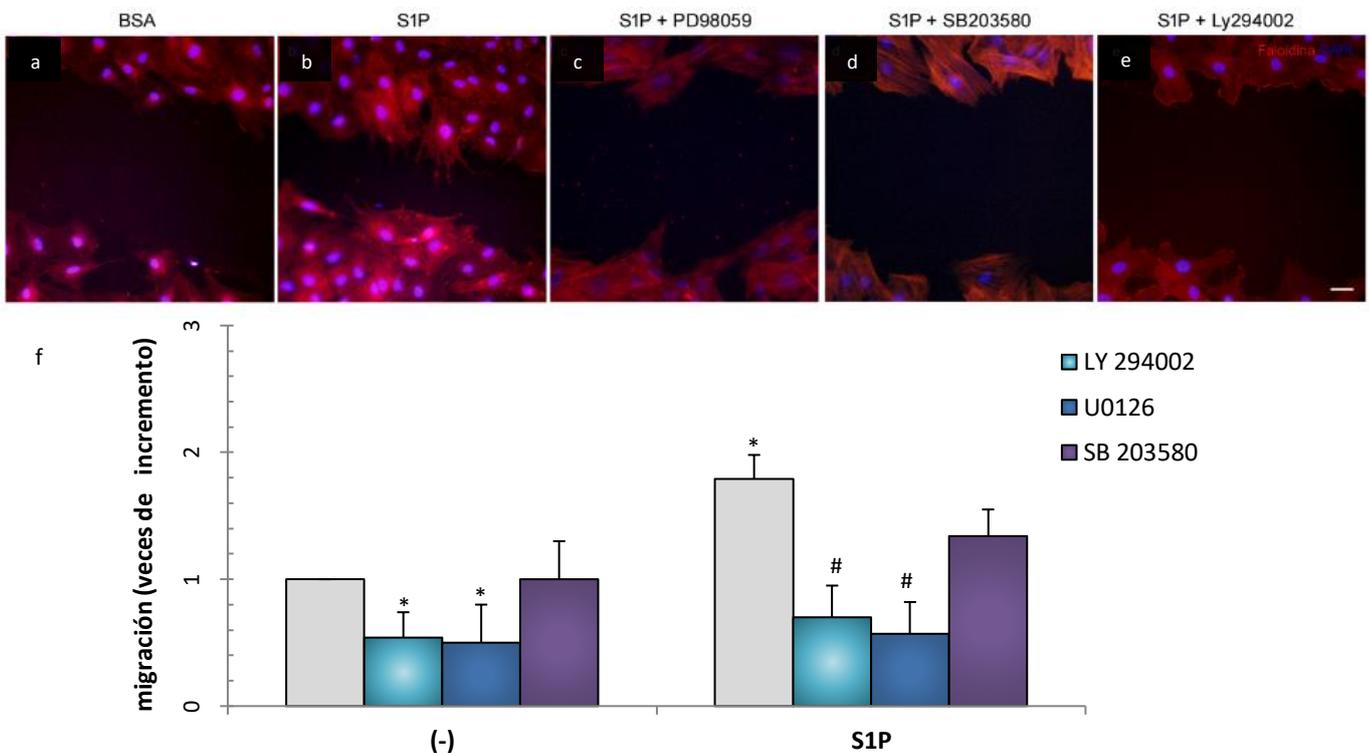


Figura 18. La esfingosina-1-fosfato activa diferentes vías intracelulares para inducir la migración de las células gliales de Müller.

Las microfotografías de fluorescencia muestran el citoesqueleto de actina (marcado con Falloidina) y los núcleos (marcados con DAPI) del control (a) y cultivos suplementados con S1P (b-e) pre-incubados con LY294002 (c), U0126 (d), o SB203580 (e). Luego de 10 h, en los cultivos tratados con S1P, las células gliales de Müller mostraron la formación de lamelipodios y una reducción en el ancho de la herida (b), comparado con el control (a), mientras que la pre-incubación con LY294002, U0126, o SB203580 disminuyó la migración glial. Barra de escala: 20 μ m. La cuantificación (f) muestra las veces de cambio (media \pm S.E.M) en la migración glial respecto al control tratado solo con vehículos luego del tratamiento con LY294002, U0126, o SB203580 en presencia (S1P) y ausencia de S1P (-). (*) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con la condición control ($p < 0,05$). (#) Diferencias estadísticamente significativas comparadas con S1P ($p < 0,05$).

DISCUSION

Los mecanismos moleculares que controlan la migración de las CGM en la retina, un evento clave en la gliosis retinal, no son aun completamente comprendidos. Nuestro hallazgo revela un rol central para la S1P en la motilidad glial, demostrando por primera vez que la síntesis de S1P es necesaria para la migración glial y que un incremento en los niveles de S1P, mediante adición exógena, estimula marcadamente esta migración. Demostramos además que la S1P actúa a través de su receptor S1P3, activando las vías de PI3K y ERK/MAPK para estimular la motilidad glial.

Diferentes estímulos ambientales inducen cambios fenotípicos y funcionales en las CGM, activando un respuesta gliótica caracterizada por una rápida proliferación y migración glial (Tackenberg et al. 2009), involucradas en el desarrollo de enfermedades retinales como las retinopatías proliferativas (Hiscott et al., 1999). La S1P es un quimio-atrayente bien conocido y un modulador de migración de varios tipos celulares (Adada et al. 2014; Spiegel and Milstien 2003). En la retina, las células del epitelio pigmentado serían capaces de secretar y responder a S1P (Swaney et al. 2008), sin embargo, poco se sabe de los efectos de S1P en las CGM. Se ha reportado que la S1P incrementa la liberación de Ca^{2+} en cultivos de células gliales de Müller de retinas de cobayo, pero su efecto en la migración no fue significativo (Esche et al. 2010). Nuestros resultados revelan un rol crucial para la S1P en la movilidad glial. La síntesis de S1P es esencial para este proceso, dado que, cuando se inhibe la actividad de SphK1, se bloquea completamente la migración. La adición de S1P a los cultivos gliales indujo rápidamente cambios en el citoesqueleto de actina, llevando a la formación de lamelipodios y filopodios. Esto es consistente con otros trabajos que indican que la S1P promueve la migración mediante reacomodamientos del citoesqueleto (Gil et al., 2010). Nuestros resultados demuestran que las CGM sintetizan y liberan S1P para regular su migración y a su vez, responden a un incremento en los niveles de S1P estimulando su migración. Muchos estímulos externos y factores de crecimiento aumentan la movilidad de varios tipos celulares a través de la activación de SphK, estimulando así la síntesis y posterior liberación de S1P (Hobson et al. 2001; Lee et al. 2001; Rosen and Goetzl 2005). En forma similar, diferentes daños que pueden activar la gliosis en vítreo-retinopatías, retino proliferación diabética, desprendimiento de retina e injurias retinales (Bringmann et al., 2006; Guidry, 2005; Hiscott et al., 1999) podrían llevar a un incremento en la síntesis y liberación de S1P en CGM para promover la migración glial.

La S1P puede actuar como un mensajero intracelular o como un ligando para una familia de cinco receptores de membrana para S1P (S1P1-5). Los receptores de S1P se acoplan a diferentes subtipos de proteínas G heterotriméricas, teniendo entonces diferentes efectos

sobre la migración glial. S1P1 y S1P3 son conocidos por estimular la migración glial, mientras que los S1P2 la inhiben (Goparaju et al. 2005; Maceyka et al. 2008; Taha, Argraves, and Obeid 2004). Nuestros resultados indican que las CGM expresan los S1P1 y los S1P3. Sin embargo, mientras que un antagonista de los S1P3 frenó la migración, tanto en controles como en cultivos tratados con S1P, un antagonista de S1P1 no tuvo efecto significativo sobre la migración. La señalización de S1P vía sus receptores lleva a la activación de las proteínas Rac y Rho, pertenecientes a la familia de las proteínas G pequeñas, las cuales luego activarán vías río-abajo que conducen a la formación de lamelipodios y fibras de estrés, promoviendo así, la movilidad en varios tipos celulares (Kim et al., 2011). Las vías intracelulares activadas por S1P son dependientes del tipo celular y del contexto de activación. La señalización de S1P mediante activación de los S1P1 y S1P3 produce la activación de Rac, llevando a la polimerización de la actina y formación de lamelipodios, proceso requerido durante la invasión de células mamarias tumorales (Kim et al., 2011). En células HEK, la formación de lamelipodios y la migración celular inducida por S1P es activada a través de ambos, el acoplamiento sobre su receptor S1P1 y la señalización como un mensajero intracelular (Maceyka et al. 2008). Nuestro trabajo evidencia que sería la activación del S1P3 y no la del S1P1, la que estaría involucrada en la estimulación de la migración glial mediada por S1P, remarcando la relevancia del eje S1P-S1P3 en el control de la movilidad glial. Cabe destacar que, condiciones pro-inflamatorias en cultivos de astrocitos inducen la regulación positiva tanto de SphK1 como de S1P3 (Fischer et al. 2011). En conjunto, nuestros hallazgos de que la inhibición de la síntesis de S1P o el bloqueo de la activación de S1P3 inhibieron la motilidad glial sugieren que las células gliales de Müller sintetizarían y liberarían S1P, que luego estimularía la migración glial mediante la señalización de “adentro hacia afuera” sobre el S1P3.

El acoplamiento de S1PRs a diferentes proteínas G heterotriméricas controla la motilidad celular mediante la activación río abajo de múltiples vías de señalización. En sinoviocitos primarios humanos similares a los fibroblastos, la motilidad celular inducida por S1P está regulada por las rutas p38 MAPK, ERK y Rho (Zhao et al. 2008), mientras que en el músculo liso vascular y las células endoteliales, S1P activa a la PI3K / Akt y ERK / MAPK (Heller et al. 2008). La activación de S1P1 por S1P estimula Rac de una manera dependiente de PI3K, y se ha propuesto que la fosforilación de S1P1 por Akt es crucial para transducir la señalización de S1P que conduce a la formación de lamelipodios en células endoteliales (Lee et al. 2001). El eje S1P-S1P3 controla la activación de la vía de señalización ERK / MAPK y la migración de astrocitos (Fischer et al. 2011) y la señalización de S1P a través de S1P1 y S1P3 activa la misma vía para inducir la migración de células madre mesenquimales derivadas de médula ósea (Kong et al., 2014). En nuestros cultivos de CGM, la inhibición de las vías PI3K o ERK / MAPK evitó la migración

glial, tanto en cultivos que carecieron de S1P o en aquellos suplementados con ella, mientras que la vía de p38 MAPK parece contribuir ligeramente a la motilidad glial. Estos resultados sugieren que la señalización de S1P a través de S1P3 conduce a la activación de las vías de señalización PI3K y ERK/MAPK para estimular la migración glial. En conclusión, nuestro trabajo sugiere un papel central para el eje S1P / S1P3 en la inducción de la migración de células gliales Müller en la retina.

Conocer el proceso migratorio de forma detallada a nivel molecular resulta muy relevante, debido al rol crucial de dicho proceso en las retinopatías proliferativas. Aunque requiere aún de más estudios que involucren ensayos *in vivo*, nuestros resultados sugieren que la inhibición farmacológica o genética de la activación del eje S1P/S1P3 en las CGM podría constituir un interesante abordaje terapéutico en la búsqueda de nuevos tratamientos de para estas patologías retinianas.

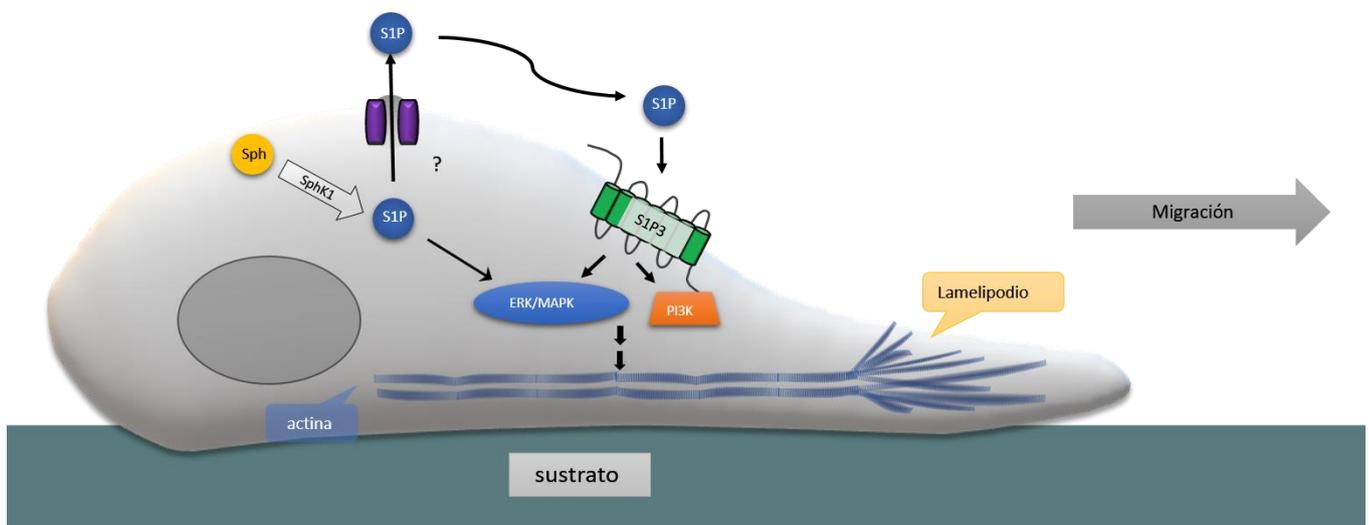


Figura 19. S1P estimula la migración de las Células Gliales de Müller

Tanto la S1P sintetizada endógenamente como la S1P agregada de manera exógena, estimulan la migración glial. La señalización mediada por S1P requiere de la activación de su receptor de membrana S1P3 para inducir el proceso migratorio. La activación del S1P3 conduce a la activación, río abajo, de las vías de ERK/MAPK y PI3K. Estas promoverían cascadas moleculares que conducen a modificaciones estructurales en el citoesqueleto de actina, llevando a la formación de lamelipodios y el consiguiente avance migratorio de las células.

CAPITULO II: La Ceramida induce la muerte de los fotorreceptores de retina mediante la activación de Parthanatos

ANTECEDENTES

Enfermedades neurodegenerativas

Las enfermedades neurodegenerativas de la retina son las responsables de la mayor parte de las disfunciones visuales en países desarrollados. Constituyen un conjunto de enfermedades de diversa etiología; así, la retinitis pigmentosa surge de más de 160 mutaciones genéticas (Hartong, Berson, and Dryja 2006), mientras que otras retinopatías, como la degeneración macular asociada a la edad, resultan de una combinación de factores ambientales, predisposición genética y el envejecimiento. A pesar de la intensa investigación que se ha llevado a cabo, aún no se cuenta con tratamientos efectivos para dichas enfermedades.

Al ser la muerte de los FR un factor común de estas enfermedades, independientemente de su etiología, se puede inferir la importancia de comprender los mecanismos y los mediadores moleculares que se hallan involucrados en este proceso de muerte. Este estudio surge como un interesante punto de partida en la búsqueda de nuevos tratamientos terapéuticos.

Tipos de muerte celular

A fin de abordar el estudio de las enfermedades neurodegenerativas, resulta imperioso entender el proceso de muerte celular, sus diversas variantes y los mecanismos moleculares involucrados.

El concepto de muerte celular programada fue introducido por Lockshin y Williams en 1964 para referirse a la muerte de las células que ocurría en lugares y momentos determinados, como eventos programados dentro del plan de desarrollo de un organismo (Lockshin and Williams 1964).

El término apoptosis (del griego *ptosis*, caída) fue originalmente usado por los botánicos. A principios de la década de 1970 Kerr, Wyllie y Currie lo reacuñaron para describir de una manera muy poética a la muerte de células hepáticas, que, después de encogerse y marchitarse, se desprendían de este órgano “como hojas en otoño” (Kerr, Wyllie, and Currie 1972). En esta revisión, los tres patólogos realizaron una recopilación de evidencias morfológicas, estableciendo las diferencias entre dos grandes tipos de muerte celular. Por un lado, la muerte patológica que ocurre, por ejemplo, en el centro de una lesión aguda, como sucede frente a un trauma o en la isquemia, que está caracterizada por la ruptura celular con liberación de su contenido al medio extracelular y recibe el nombre de *necrosis celular*. Por su parte, al proceso de muerte que ocurre durante el desarrollo o para preservar la homeostasis del organismo y

que mantiene la integridad de la célula, lo denominaron *apoptosis*. Según estos autores, la muerte por apoptosis respondía a un programa de muerte intracelular que podía ser activado o inhibido por una variedad de estímulos, tanto fisiológicos como patológicos. De allí que, incluso actualmente, el término apoptosis se utilice como sinónimo de muerte celular programada.

En 1973 Schweichel y Merker propusieron una novedosa clasificación de los tipos de muerte celular, a las cuales llamaron “Tipo I” para referirse a la muerte asociada a heterofagia, “Tipo II” aquella donde ocurría autofagia y “Tipo III” en la cual no había ningún tipo de digestión de la célula muerta. Esta clasificación es bastante utilizada aún y los procesos descritos se conocen como apoptosis, muerte por autofagia y necrosis, respectivamente (Schweichel and Merker, 1973).

El término necrosis corresponde al actualmente llamado proceso de *Muerte Celular Accidental* (ACD, por sus siglas en inglés) y se refiere a la muerte de las células que ocurre de manera instantánea y catastrófica debido a su exposición a estímulos muy agresivos de naturaleza física (altas temperaturas o presiones, fuerzas osmóticas), química (como variaciones extremas en el pH) o mecánica (fuerzas de corte). En contraste, la *Muerte Celular Regulada* (RCD, por sus siglas en inglés) consiste en la activación, mediante un estímulo estresor determinado, de una maquinaria molecular que desencadenará el proceso de muerte. De la naturaleza de este proceso puede inferirse que la RCD puede ser regulada a través de intervenciones farmacológicas o genéticas (Galluzzi et al., 2016). Cabe destacar que, aunque utilizada como sinónimo de RCD, una forma particular de ésta es el proceso conocido como Muerte Celular Programada (PCD) (Figura 20). Este es un tipo particular de RCD, que ocurre como un proceso fisiológico, sin la presencia de estímulos estresantes, como sucede, por ejemplo, durante el proceso de formación de órganos y tejidos en los embriones (Figura 21).

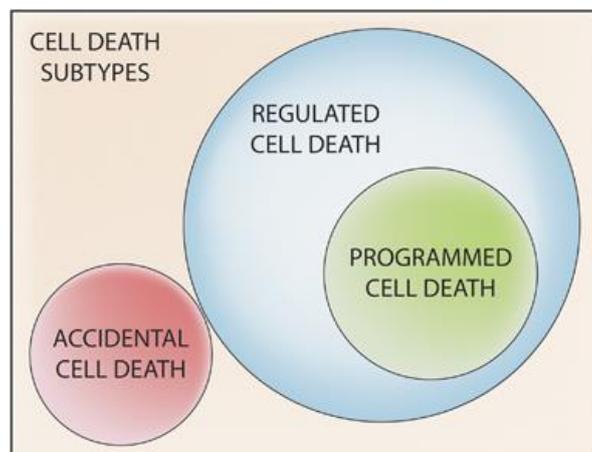


Figura 20. Tipos de muerte celular.

(Modificado de Galluzzi et al., 2012)

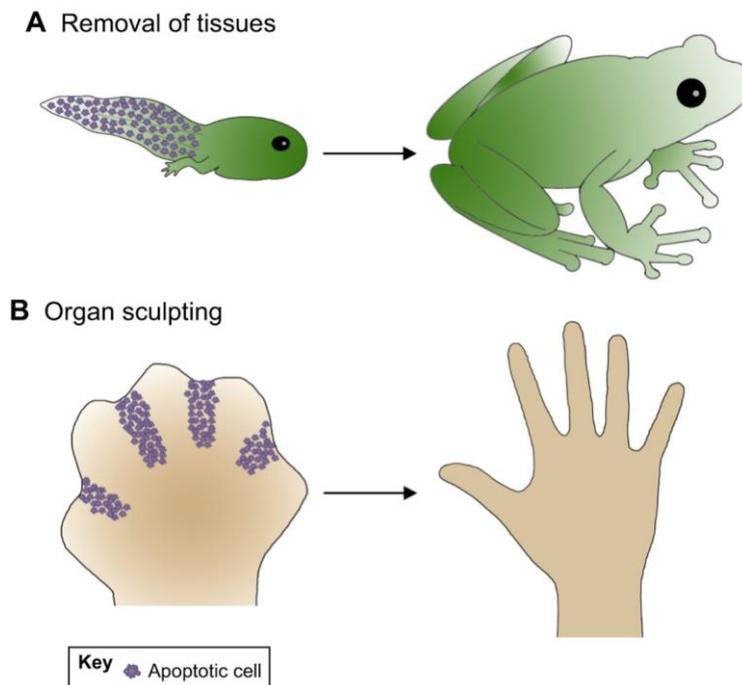


Figura 21. Muerte celular programada (PCD) durante el desarrollo embrionario.

(Modificado de Pérez-Garijo y Steller 2015)

El creciente avance en el estudio de la muerte celular, favorecida por el desarrollo de nuevas técnicas bioquímicas, de biología molecular y de microscopía, permitió profundizar ampliamente esta clasificación inicial, complejizándola al punto en que los límites entre un tipo de muerte y otro son realmente muy difusos.

Desde 2005, el Comité sobre Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD) ha propuesto criterios de clasificación basados en fundamentos genéticos, bioquímicos, farmacológicos y funcionales en lugar de aquellos meramente morfológicos, descriptos hace casi ya 50 años. Debido a que el campo de estudio de muerte celular está en continuo avance, resulta necesario mantener actualizados y uniformados los criterios de clasificación de muerte celular. En su última revisión publicada en 2018 (Galluzzi et al., 2018), describe los mecanismos de muerte por RCD conocidos hasta la fecha (Figura 222).

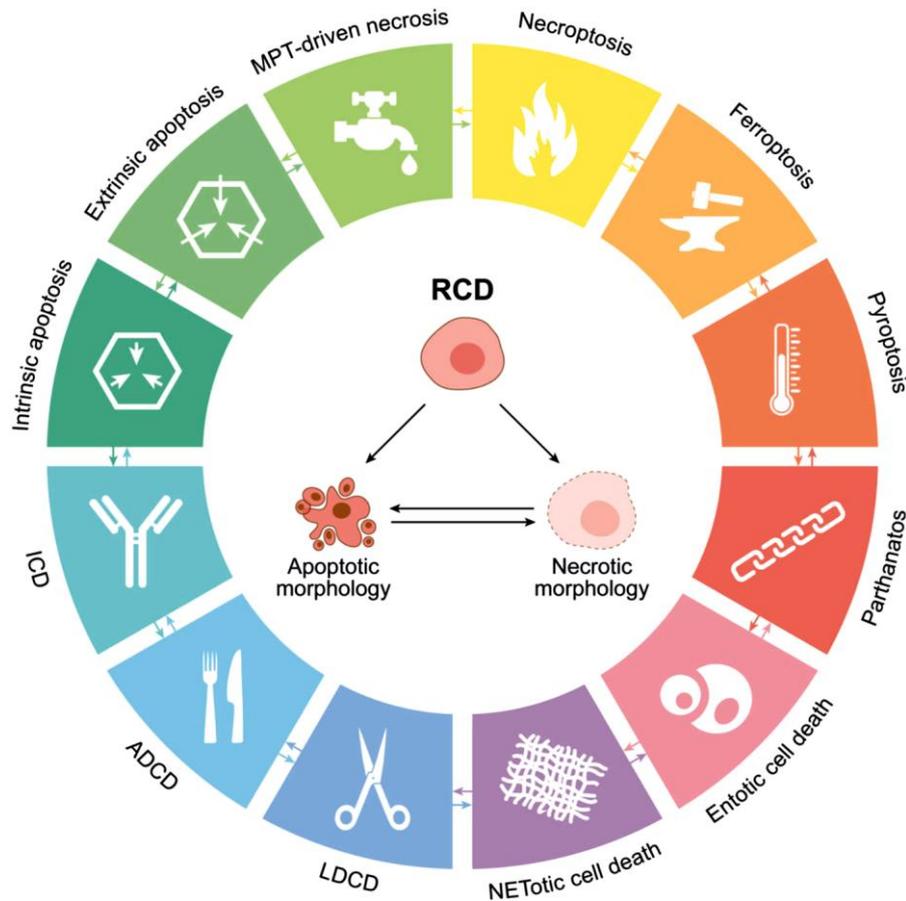


Figura 22. Tipos de Muerte Celular Regulada (RCD).

ADCD: muerte celular dependiente de autofagia; ICD: muerte celular inmunogénica; LDCD: muerte celular dependiente de lisosomas; MPT: Transición de la permeabilidad mitocondrial.

(Modificado de Galluzzi et al. 2018)

A continuación, se resumen brevemente algunos de los subtipos de RCD conocidos, haciendo hincapié en aquellos procesos que han sido asociados con muerte neuronal en procesos neurodegenerativos.

1. *Apoptosis intrínseca*

Este mecanismo de muerte celular es iniciado por perturbaciones del microambiente extracelular o intracelular, tales como la falta de factores tróficos, daño al ADN o sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Czabotar et al. 2014). Las células apoptóticas retienen la integridad de la membrana plasmática y la actividad metabólica, hasta cierto punto, para luego ser completamente removidas por células con actividad fagocítica,

proceso conocido como feroctosis (Green, Oguin, and Martinez 2016). La apoptosis que ocurre *in vitro*, al carecer del proceso de feroctosis, continúa con una pérdida completa de la integridad de membrana plasmática y la adquisición de una morfología de tipo necrótica. Este proceso se conoce como necrosis secundaria (Vanden Berghe et al., 2010).

El paso crítico de la apoptosis intrínseca es la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (en inglés, MOMP). Este proceso es regulado mediante la acción de proteínas pro y anti-apoptóticas de la familia de proteínas BCL-2 (Tait and Green 2010). La MOMP produce la liberación al citosol de proteínas que normalmente residen en el espacio intermembrana o bien están ancladas a la membrana mitocondrial interna; entre otras se destacan el Citocromo c y el segundo activador mitocondrial de caspasas (SMAC, por sus siglas en inglés) (Tait and Green 2010). El pool citosólico de Citocromo c se une luego al APAF1 y la pro-caspasa-9 (forma inactiva de esta proteasa) para formar un complejo molecular conocido como apoptosoma, el cual es responsable de la activación de la caspasa-9 (Li et al. 1997). Finalmente, la caspasa-9 activa, mediante clivaje, a las caspasas 3 y 7, proteasas encargadas de la “demolición celular” en células de mamíferos, y que se conocen como caspasas ejecutoras (Figura 23).

Un caso particular de apoptosis intrínseca conocido como *Anoikis* es activado como consecuencia de la pérdida de adhesión celular dependiente de integrinas. Este desprendimiento de la matriz extracelular induce la MOMP a través de la regulación de proteínas BCL-2 y desencadena finalmente en la activación de la caspasa-3 (Paoli, Giannoni, and Chiarugi, 2013).

2. Apoptosis extrínseca

Proceso iniciado por perturbaciones del microambiente extracelular o intracelular que son detectados por receptores acoplados a la membrana plasmática (Ashkenazi and Dixit, 1998). Los receptores de muerte mejor conocidos son el Receptor de muerte superficial de células Fas (FAS o APO-1) y ciertos subtipos de la superfamilia de receptores para TNF (TNFR1, TRAIL 1 y 2). Estos receptores al ser activados, se estabilizan como homo-trímeros que inducen un cambio conformacional en sus extremos intracelulares, permitiendo el ensamblado de un adaptador conocido como FADD (Figura 23). Éste permitirá el anclaje de procaspasas-8 (inactivas), formando una superestructura conocida como complejo de señalización inductora de muerte (DISC, por sus siglas en inglés). DISC permite la activación, por actividad auto-catalítica, de la caspasa-8 y la posterior activación de la caspasa-3 (Dickens et al. 2012).

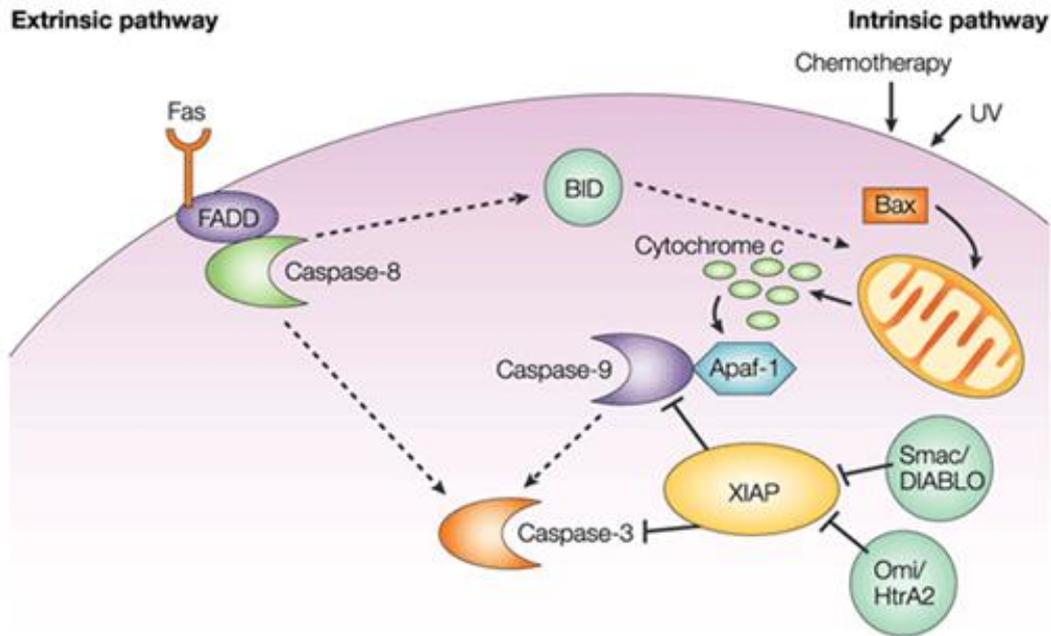


Figura 23. Activación del proceso de apoptosis mediante las vías intrínsecas y extrínsecas.
(Legewie et al 2006)

3. Necroptosis

La Necroptosis es un proceso de muerte iniciado por perturbaciones del microambiente a nivel extracelular o intracelular que son detectadas por receptores de muerte específicos, como FAS y TNFR1, además de los Receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs, por sus siglas en inglés) (Galluzzi et al., 2016). A nivel molecular, la necroptosis depende de la activación de estos receptores, lo cual genera un cambio conformacional que permite el reclutamiento de RIPK1 y luego de RIPK3, formando un complejo conocido como necrosoma o ripoptosoma (Vanden Berghe et al., 2014b). El necrosoma fosforila a MLKL, la cual luego se oligomeriza y se inserta en la membrana plasmática, generando la permeabilidad de las mismas con liberación del contenido celular y la consecuente muerte de características necróticas (Wang et al. 2014). El inhibidor de RIPK1, Necrostatina-1, bloquea eficazmente este proceso (Degterev et al. 2005).

4. Parthanatos

Parthanatos es un proceso de muerte inducido por la sobre-activación de la Poli(ADP-ribosa) Polimerasa 1 (PARP-1), enzima responsable de regular la reparación del ADN. La inducción de Parthanatos ocurriría no solo como consecuencia de un daño prolongado al ADN, sino también ante estrés oxidativo, hipoxia, hipoglucemia o señales inflamatorias (David et al. 2009). Las especies reactivas de nitrógeno (RNS, por sus siglas en inglés) serían uno de los principales disparadores del proceso, especialmente en neuronas (Zhang et al. 1994). La hiperactivación de PARP1 produce efectos citotóxicos a través de la depleción de NAD⁺ y ATP, lo cual conduce al colapso bioenergético y del potencial redox, y a la acumulación de polímeros de poli(ADP-ribosa) (PAR) y de proteínas PAR-iladas en la mitocondria, que llevan a la disipación del potencial de membrana y la generación de la MOMP (Yu et al. 2006a). Uno de los eventos claves del proceso de Parthanatos es la unión de los polímeros de PAR al Factor Inductor de la Apoptosis (AIF). El AIF es una flavoproteína de localización mitocondrial con actividad NADH oxidasa y codificado por un gen nuclear (Susin et al. 1999). Junto con las calpaínas (que serían activadas por PARP-1), los polímeros de PAR promueven la liberación del AIF desde la mitocondria, a través de poros formados por la activación de Bax, también mediada por PARP-1 (David et al. 2009). Una vez en el citosol, AIF puede translocar al núcleo donde producirá fragmentación del ADN a gran escala y condensación nuclear (Wang et al., 2011) (Figura 24). La fragmentación Parthanoica del ADN ocurre entonces de manera independiente de caspasas y de la Endonucleasa G (EndoG) (Xu et al. 2010).

Se ha reportado que la inhibición farmacológica de PARP-1 atenúa eficientemente el proceso de Parthanatos en distintos modelos, tanto *in vitro* como *in vivo* (Curtin and Szabo 2013).

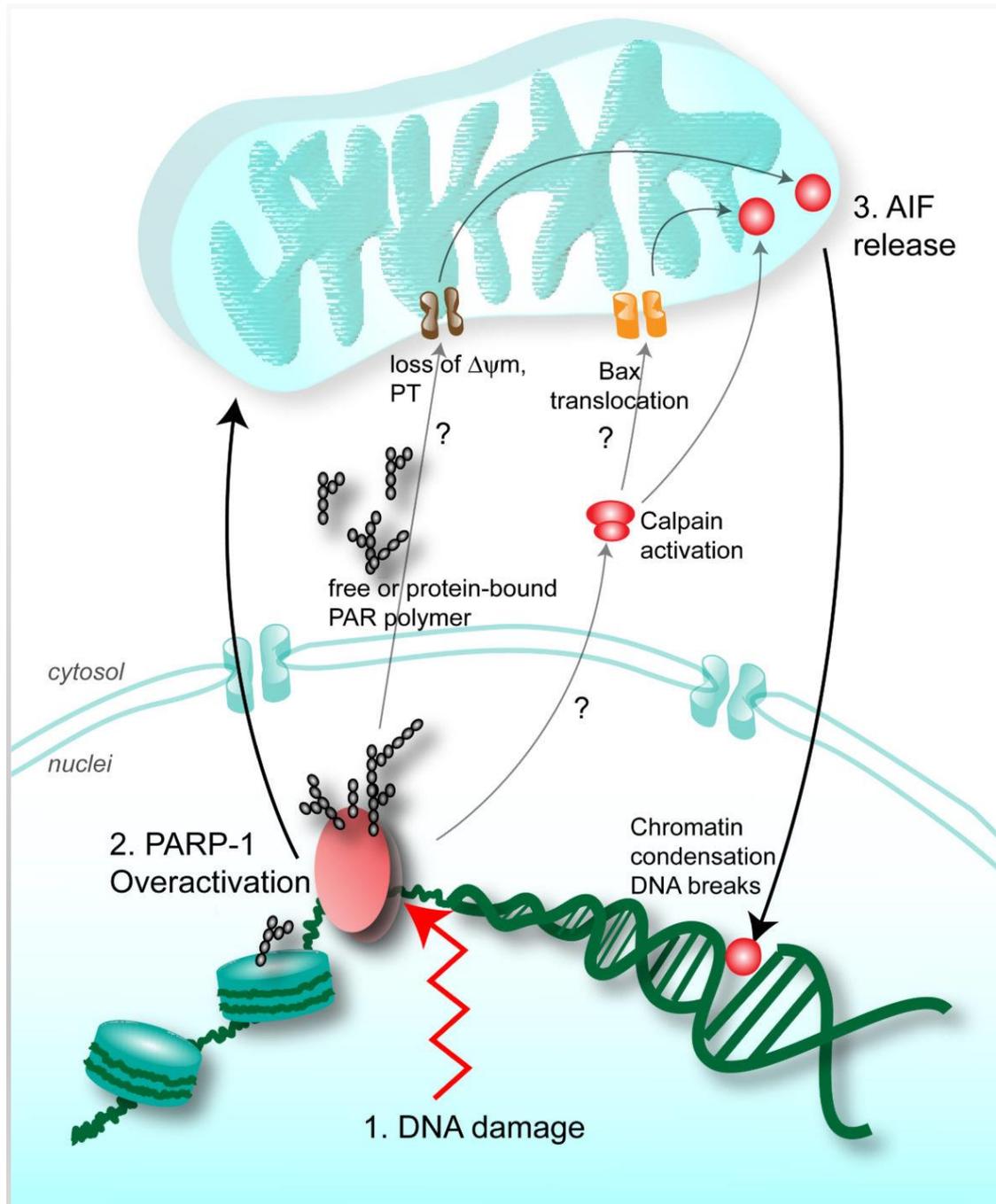


Figura 24. Esquema de la vía de Parthanatos.
(Modificado de David et al 2009)

5. *Muerte lisosomal*

Se trata de un proceso iniciado por perturbaciones de la homeostasis intracelular caracterizado por la permeabilización de las membranas lisosomales, con liberación al citoplasma de sus enzimas digestivas, entre las cuales se destacan la familia de las catepsinas (Aits and Jaattela 2013). La permeabilización lisosomal es desencadenada, principalmente, por un exceso de ROS, que genera peroxidación lipídica en la membrana (Kurz et al. 2008).

En algunos casos, este tipo de muerte se asocia a la MOMP (proceso que puede ocurrir antes o después de la permeabilización lisosomal) con la inclusión de las caspasas ejecutoras en el proceso de desmantelamiento celular (Boya et al. 2003; Feldstein et al. 2006).

6. *Muerte celular mediada por autofagia*

La autofagia es un proceso en el que la célula se “auto-devora” mediante la degradación de elementos celulares que son llevados hacia el lisosoma para su digestión y posterior reciclado. Su nombre se debe al grupo de Christian de Duve, pionero en demostrar que la autofagia es un proceso regulado (Deter, Baudhuin, and De Duve 1967; Klionsky 2008). Constituye un proceso utilizado por todas las células eucariotas para afrontar la deficiencia de nutrientes o factores tróficos, eliminando todo aquello que no sea estrictamente primordial para la supervivencia y proveyendo a la célula de sustratos anabólicos, además de otros propósitos.

El tipo de autofagia mejor estudiado es la macro-autofagia, la cual comienza con la formación de vesículas conocidas como autofagosomas, que engloban los elementos celulares a digerir. La formación del autofagosoma se inicia a través de una cascada de señalización celular que involucra proteínas conocidas como ATG (genes relacionados con la autofagia, por sus siglas en inglés) y en condiciones basales se encuentra reprimida por la quinasa blanco de la Rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés). La Figura 25 resume los aspectos moleculares de la activación de la macro-autofagia.

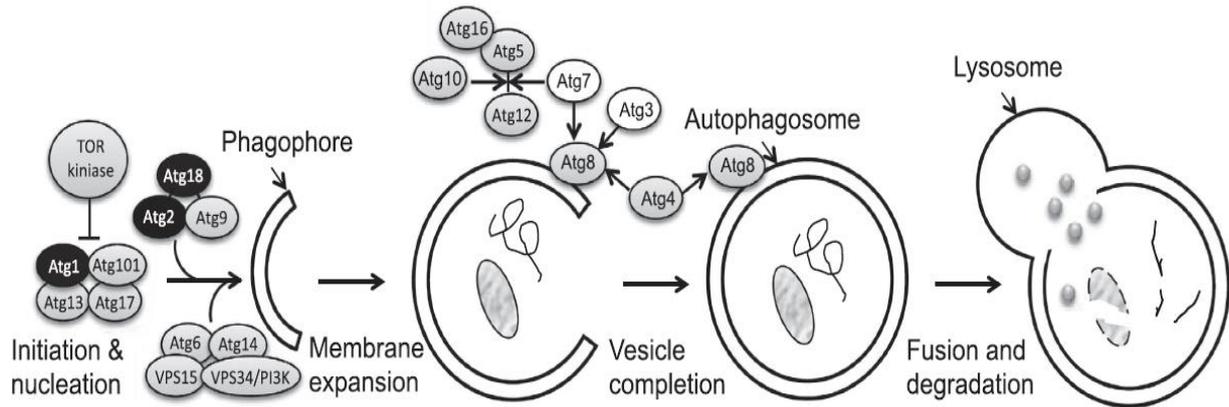


Figura 25. Representación esquemática de la maquinaria central involucrada en el proceso de autofagia.

En condiciones de disponibilidad de nutrientes, la autofagia está regulada negativamente por la quinasa blanco de la Rapamicina (TOR, por sus siglas en inglés). El complejo Atg1 es responsable de la iniciación de la autofagia junto con los complejos de la fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y el complejo Atg2-Atg9, que nuclean y ensamblan el fagóforo de doble membrana. Éste luego se expandirá, a través de la acción de otras proteínas Atg, para formar el autofagosoma, que englobará los elementos celulares que deben ser reciclados. Este autofagosoma se fusiona luego con el lisosoma para que su contenido sea degradado por las enzimas lisosomales. (Modificado de Denton et al., 2015).

Si bien este proceso suele tener como objetivo promover la supervivencia, bajo ciertas condiciones de estrés, la maquinaria autofágica también contribuye a la muerte celular (Das, Shrivage, and Baehrecke 2012; Denton, Xu, and Kumar 2015). Este proceso se caracteriza por la acumulación de vacuolas. Su determinación resulta compleja; el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular recomienda utilizar este término para describir el proceso de muerte celular que puede ser bloqueado mediante la inhibición farmacológica o genética, de al menos dos componentes de la maquinaria autofágica (Galluzzi et al., 2012). Un ejemplo es el trabajo del grupo de Levine, en el cual demostraron que la sobre-expresión de Beclina-1 (ATG6) promueve una autofagia excesiva, que resulta en un estímulo suficiente para desencadenar la muerte mediada por autofagia, que denominaron “autosis”. Esta muerte es prevenida mediante el silenciamiento de los genes ATG claves, pero no por la inhibición de la expresión de genes claves para la apoptosis (Bax/Bak) o la necroptosis (RIPK1/3) (Liu et al. 2013).

Aunque el creciente avance en el conocimiento de las distintas vías de muerte nos ofrece hoy día un interesante punto de partida, cada proceso neurodegenerativo debe ser estudiado de forma particular, lo que torna a la caracterización de un proceso de muerte neuronal, en una tarea fascinante a la vez que metódica y exhaustiva.

En la Tabla I se resumen los marcadores y los blancos farmacológicos de los principales tipos de muerte celular reportados en neuronas.

Tipo de muerte celular	Marcadores	Inhibición farmacológica
Apoptosis Intrínseca	Oligomerización de Bax Liberación de Citocromo c Clivaje de caspasa-3 Marcación positiva de TUNEL Condensación de la cromatina Translocación de Fosfatidilserina (PS).	Pan-inhibidores de caspasas: Z-VAD-Fmk o Q-VD-Oph.
Apoptosis extrínseca	Clivaje de caspasa-8 y 3 Bid truncado (tBid) TUNEL positivo Translocación de PS	Inhibidor de la caspasa-8: Z-IETED-fmk
Necroptosis	Fosforilación de MLKL y oligomerización en la membrana Hinchazón celular Liberación de contenido citoplasmático (Ensayo de LDH positivo)	Inhibidor de RIPK1: necrostatina-1 Inhibidor de RIPK3: GSK872 Inhibidor de MLKL: necro sulfonamida
Parthanatos	Activación de PARP-1 Acumulación de PAR y proteínas PAR-iladas Translocación nuclear del AIF	Inhibidores de PARP-1: PJ34, BYK204165
Muerte por autofagia	Marcación positiva de LC3II en el citoplasma Visualización de Autofagosomas por microscopia electrónica Visualización de múltiples vacuolas	Inhibición de PI3K-III: 3-Metil Adenina (3-MA); Wortmanina; LY294002

Tabla I. Características de los principales tipos de muerte neuronal.

Muerte neuronal en la retina

Durante el desarrollo de la retina, como en otras partes del SNC, la muerte celular permite la selección de aquellas neuronas que hayan realizado las conexiones sinápticas correctas. Las neuronas que no logren conectarse correctamente no recibirán factores tróficos a modo de “recompensa” y morirán a través de un proceso apoptótico del tipo caspasa dependiente (Braunger, Demmer, and Tamm 2014). Conforme las neuronas se diferencian y establecen sus conexiones, existe una disminución en la capacidad de activación de la vía clásica de apoptosis, dependiente de caspasas (Los, Wesselborg, and Schulze-Osthoff 1999). Por ejemplo, en retinas de ratones Balb/c y C57B16 se encontró que existe una disminución en los niveles de expresión de los componentes del apoptosoma, Apaf1 y caspasa-9 conforme avanza el desarrollo retiniano (Donovan & Cotter, 2002; Madden et al., 2007). Este mecanismo de desactivación de una maquinaria tan eficaz y rápida como es la apoptosis mediada por caspasas, tiene mucho sentido a nivel biológico, debido a la naturaleza post mitótica de las neuronas, y su prácticamente nula capacidad de regeneración en vertebrados.

Durante el estudio de muerte neuronal en la retina, como parte de un *modus operandis*, se suele evaluar en primer lugar la participación de las caspasas. Muchos trabajos con neuronas retinales *in vitro* muestran que la activación de caspasas está presente en el mecanismo de muerte asociado al modelo de estudio. Por ejemplo, la exposición prolongada a luz azul reduce la viabilidad de las neuronas ganglionares en la línea RGC-5 caracterizada por activación de Bax y caspasa-3 y disminución de la actividad de Bcl-2 (Huang et al. 2014). Sin embargo, debemos tener en cuenta que este tipo de estudios de células en cultivo involucran el uso de líneas celulares, donde las “neuronas” estudiadas son en realidad células con capacidad de proliferación activa, carentes de una completa diferenciación, por lo que la translación de estos resultados a un modelo patológico donde existe muerte neuronal debe realizarse con mucho cuidado. En un elegante estudio, utilizando tres modelos de degeneración retinal *in vivo* se demostró que la activación de calpaínas y de catepsinas causan la activación de Bax y la liberación del AIF desde la mitocondria (Comitato et al. 2014). La importancia de esta vía caspasa-independiente fue demostrada también en un modelo de retinitis pigmentosa de ratas P23H-1, que presentan una mutación en la rodopsina (Sizova et al. 2014). Sin embargo, la inhibición de esta vía no produce un rescate completo de las neuronas, lo cual sugiere que existen otras vías de muerte que se activan de forma paralela (Comitato et al. 2014).

Uno de los factores más importantes en el estudio de la muerte celular es la evaluación cronológica del proceso. El grupo de Paquet-Durand realizó un importante hallazgo en este

aspecto. Los autores razonaron que la necrosis es un proceso rápido y caótico que toma cerca de 1 hora en completarse, mientras que la activación de la apoptosis dependiente de caspasas involucra entre 6 y 18 h. Utilizando ratones *rd1* estudiaron la acumulación de GMPC, como desencadenante de la muerte celular, determinada mediante el ensayo de TUNEL y calcularon una duración total del proceso de muerte celular de unas 80 h. Dado que este tiempo no es compatible con necrosis ni con apoptosis clásica, los autores concluyen que la muerte neuronal en la retina involucra la activación de otras vías de muerte alternativas (Paquet-Durand et al. 2014; Sahaboglu et al. 2013).

En conclusión, establecer las vías que conducen a la muerte de los FR tiene una gran relevancia en la búsqueda e identificación de nuevos y muy necesarios blancos terapéuticos.

Ceramida y degeneración retiniana

Uno de los puntos clave en el estudio de la muerte celular es el tipo de estímulo que la desencadena, ya que el tipo de RCD activado es un proceso tiempo y estímulo-dependiente. Como se describió en el capítulo I, los esfingolípidos han sido establecidos como mediadores claves de las funciones celulares (Hannun & Obeid, 2008; Rotstein et al., 2010). En particular, la Cer ocupa un rol central en la biosíntesis y catabolismo de los esfingolípidos. Múltiples tipos de estrés celular pueden activar las vías que llevan al incremento en los niveles de Cer, la cual puede activar diferentes respuestas celulares incluyendo la muerte celular (Hannun and Obeid 2008; Young, Kester, and Wang 2013).

En referencia a la retina, nuestro tejido de interés, numerosos grupos, incluido nuestro laboratorio, han documentado un rol para la Cer como mediador de la muerte de los FR. La adición exógena de N-Acetil-D-esfingosina o C2-Ceramida, (C2Cer) un análogo sintético de la Cer ampliamente utilizado en modelos experimentales por ser más fácilmente solubilizado en medio acuoso y a su vez difundir dentro de las células, induce apoptosis de neuronas de retina *in vitro*, a la vez que la inhibición de la síntesis de Cer previene la apoptosis inducida por estrés oxidativo de FR de retina de rata y de células de la línea de conos 661W (German et al. 2006; Sanvicens and Cotter 2006).

Trabajos posteriores demostraron un nexo entre la Cer y la patología de los FR en modelos *in vivo*. La producción de Cer ha sido asociada con la apoptosis de los FR generada por desprendimiento de retina (Ranty et al. 2009). Por su parte, la supresión de la esfingomielinasa de tipo ácida protege parcialmente a la retina del daño por isquemia (Fan et al., 2016). Los niveles de Cer se incrementan durante la degeneración de los FR mientras que la inhibición de

la síntesis de este esfingolípido preserva la estructura y funcionalidad de los FR en un modelo de retinitis pigmentosa (Strettoi et al. 2010).

En modelos de degeneración de retina de ratas, como el modelo de estrés inducido por luz y el de las ratas P23H-1, la inhibición de la síntesis de Cer con FTY720, análogo sintético de la esfingosina, genera protección contra la degeneración de los FR (Chen et al. 2013; Stiles et al. 2016).

De este modo, la Cer emerge como un mediador clave en patologías con diferentes etiologías, que causan finalmente la pérdida de los FR. Esto nos conduce a la interesante hipótesis de que bloquear la síntesis de Cer o las vías intracelulares que activa podría proveer un instrumento terapéutico de amplio espectro.

La Cer tiene múltiples blancos intracelulares, aunque la mitocondria resulta un sitio crucial para su inducción de muerte. El incremento en los niveles de Cer provoca disfunción mitocondrial y apoptosis dependiente de caspasas en diferentes tipos celulares (Young et al. 2013). La Cer a su vez activa otros tipos de muerte celular. Diversos grupos han reportado a la Cer como un mediador en la inducción de autofagia (Scarlati et al. 2004; Sims et al. 2010) y el incremento en los niveles de Cer estaría también involucrado en el desarrollo de la necroptosis (Saddoughi et al. 2013).

Los mecanismos que conducen al incremento de la síntesis de Cer en la retina difieren en los diversos modelos y patologías analizadas. El incremento en los niveles de Cer lleva a la despolarización mitocondrial en FR de rata y la activación de caspasas, catepsinas y calpaínas en las 661W (German et al. 2006; Sanvicens and Cotter 2006), sugiriendo que la Cer podría controlar varios mecanismos de muerte en los FR. La información respecto a estos mecanismos es aun escasa en la retina, y los modelos *in vitro* han provisto los datos más interesantes. Nuestro laboratorio ha establecido que un tratamiento de 24 h con C2Cer 10 μ M induce la muerte tanto de FR y como de neuronas amacrinas *in vitro* (German et al., 2006).

Establecer los mecanismos que conducen a la muerte de los FR es un requisito indispensable para identificar nuevos blancos terapéuticos para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas de la retina. En este capítulo de tesis describiré los hallazgos de nuestro trabajo, en el cual investigamos en profundidad los mecanismos moleculares involucrados en la activación de muerte de los FR inducida por C2Cer.

MATERIALES Y METODOS

1. Animales

Se utilizaron ratas Albino Wistar de nuestra propia colonia en todos los experimentos. Todos los procedimientos relacionados con el uso de animales se realizaron de acuerdo con la Declaración de ARVO para el uso de animales en la investigación oftálmica y de la visión. Los protocolos utilizados contaron con la aprobación del Comité Institucional para el Cuidado de Animales de Experimentación (CICUAE) de la UNS.

2. Cultivos neuronales de retina

Se obtuvieron cultivos neuronales puros de retina de rata de acuerdo al procedimiento previamente descrito (Politi et al., 1988) con ligeras modificaciones. Las retinas fueron disecadas bajo lupa y disociadas mediante digestión con tripsina seguida de disociación mecánica para completar la disgregación del tejido. Luego, las células se re-suspendieron en un medio químicamente definido y se sembraron sobre placas multiwells de 24 pocillos o en placas de cultivo circulares de 35 o 60 mm de diámetro, de acuerdo al diseño experimental (Figura 26).

En todos los casos, las placas de cultivo fueron pre-tratadas con Poli-Ornitina (0,1 mg/ml) por dos h, a fin de favorecer la adherencia celular al sustrato. Posteriormente las placas fueron lavadas e incubadas con una solución de medio condicionado de células de Schwann al 25% (solución de Schwannoma 25%) durante toda la noche. Este tratamiento favorece el desarrollo de neuritas de las neuronas en cultivo (Adler 1982). Una vez sembrados, los cultivos fueron incubados a 36,5°C en una atmosfera humidificada y saturada con 5% de CO₂ durante tres días, momento en el cual se llevaron a cabo los distintos experimentos.

Los cultivos neuronales fueron identificados mediante su morfología, utilizando un microscopio de contraste de fases, y por Inmunocitoquímica como se detallará más adelante. El 95% de la población neuronal en cultivo consiste de neuronas fotorreceptoras y amacrinas. Los FR tienen un cuerpo celular pequeño (3-5 µm) y oscuro que suele presentar una neurita en un extremo, la cual usualmente termina en un conspicuo pie sináptico, la "esférula". En ocasiones, muestran el cilio conector en el extremo opuesto a la neurita, y un escaso número de ellos desarrolla un "proceso apical", que constituye un esbozo del segmento externo. Las neuronas amacrinas tienen múltiples neuritas, en lugar de una sola, un cuerpo celular más grande (alrededor de 10 µm) que los FR y una gran heterogeneidad morfológica.

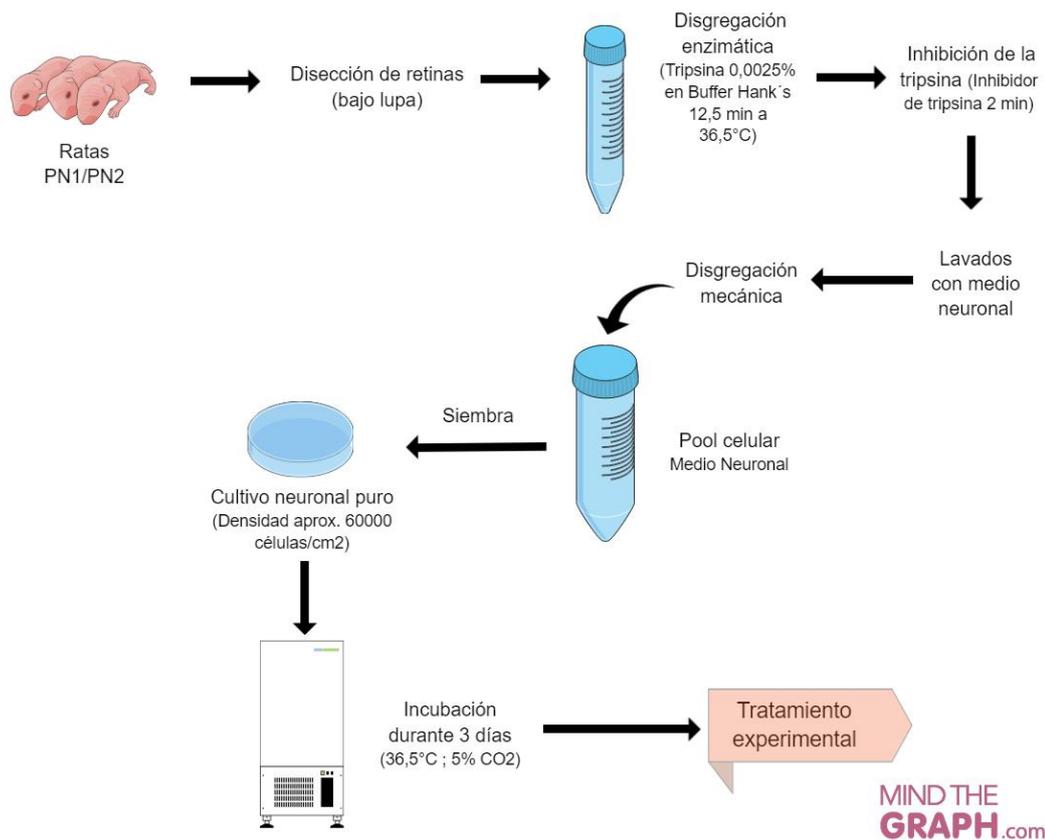


Figura 26. Obtención de cultivos neuronales puros de retina de rata.

3. Protocolo de tratamientos

Los cultivos neuronales se trataron al día 3 *in cultivo* con C2Cer. Se preparó una solución stock de C2Cer en etanol, en una concentración de 25 mM que se almacenó a -20°C. El día del tratamiento se prepararon diluciones 1:300 en DMEM de C2Cer, se suplementaron los cultivos con el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 10 μ M, y se incubaron durante distintos períodos de tiempo. El mismo volumen de una dilución 1:300 de etanol se agregó a los cultivos controles (concentración final de etanol 0,04% [v/v]) (German et al. 2006). Se escogió un tiempo de tratamiento de 6 h para los experimentos, a menos que se especifique un tiempo distinto.

Se investigó, además, el efecto de una ceramida natural, la C16Ceramida (C16Cer) sobre la viabilidad neuronal. Para ello se preparó una solución stock 4 mg/ml (7,41 mM) de C16Cer en una mezcla de etanol/decano (98:2 v/v) para permitir tanto su solubilización en medio acuoso como su entrada a las células (Ji et al. 1995). Los cultivos fueron tratados durante 6 h con distintos volúmenes de una dilución 1:300 en DMEM de la C16Cer stock, de modo de obtener

concentraciones finales en el medio de cultivo de 5, 10, 20 y 25 μM . Idénticos volúmenes de diluciones 1:300 en etanol se agregaron en los cultivos controles (concentración máxima de la mezcla de solventes 0,33% [v/v]).

Se analizó el efecto de distintos inhibidores de moléculas claves en las vías de la señalización de muerte analizadas sobre la muerte inducida por C2Cer, agregándolos durante 1 hora previo al agregado de C2Cer. La Tabla II presenta la información resumida respecto de cada uno de los inhibidores utilizados en este trabajo. Finalizados los tratamientos, se evaluó el efecto de los distintos inhibidores sobre la muerte inducida por C2Cer mediante el ensayo de MTT.

Inhibidor	Fuente	Solución Stock	Concentraciones testeadas	Concentración máxima de solvente (% v/v)
3-MA	Santa Cruz (sc-205596)	200 mM (DMEM)	100, 250, 500, 1000 μM	-----
ALLN	Santa Cruz (sc-221236)	26,1 mM (DMSO)	10, 20, 50 μM	0,19
Bafilomicina A1	Sigma (B1793)	20 μM (DMSO)	1, 10, 100 nM	0,05
BYK204165	Santa Cruz (sc-214642)	66,7 mM (DMSO)	2,5; 5 ; 10 μM	0,02
CA-074	Santa Cruz (sc-214647)	16,8 mM (DMSO)	1, 5, 10 μM	0,06
Calpeptina	Santa Cruz (sc-202516)	14 mM (DMSO)	0,5; 1 ; 2,5 μM	0,02
Necrostatina-1	Santa Cruz (sc-200142)	38,5 mM (DMSO)	10, 50, 100 μM	0,26
Pepstatina A	Santa Cruz (sc-45036)	7,3 mM (DMSO)	1, 5, 10 μM	0,14
PJ34	Santa Cruz (sc-204161)	30,4 mM (DMSO)	0,5; 1; 2,5 ; 5 μM	0,02
Z-Vad-Fmk	Santa Cruz (sc-311561)	21,4 mM (DMSO)	10, 20 , 50 μM	0,23
MG132	Santa Cruz (sc-201270)	10,5 mM (DMSO)	0,1; 1 ; 5 μM	0,05

Tabla II. Inhibidores de vías de muerte utilizados.

4. Determinación de muerte celular

4.1 Ensayo de MTT

La viabilidad celular y la función mitocondrial se evaluaron mediante el ensayo de Bromuro de 2-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio [MTT, (SIGMA #M2128)]. Este reactivo es una sal de color amarillo, soluble en agua, que puede ser incorporada por las células. Una vez dentro de la célula, puede ser reducida a nivel mitocondrial en aquellas células que se encuentren metabólicamente activas (viables). La reducción transforma al reactivo de MTT en una sal de formazan insoluble en agua, que forma cristales de color violeta (Figura 27). Estos cristales pueden luego solubilizarse con isopropanol acidificado y cuantificarse

colorimétricamente a 570 nm (Mosmann 1983). La absorbancia medida será directamente proporcional al estado metabólico de las células. Este ensayo resulta muy simple y económico y es ampliamente utilizado como indicador de viabilidad celular.

Los cultivos neuronales se sembraron en placas de 24 pocillos y finalizados los distintos tratamientos, se agregó una solución de MTT 5mg/ml en PBS a cada pocillo, de manera de obtener una solución de 0,5 mg/ml como concentración final en el medio de cultivo. Posteriormente, las células se incubaron durante 90 minutos a 36,5°C en incubador y finalmente fueron lisadas utilizando un buffer de solubilización (10% Tritón x-100 y 0,01 N de HCl en isopropanol) seguido de medición espectrofotométrica a 570 nm utilizando un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific). La absorbancia del rojo fenol, presente en el medio de cultivo de remanente, fue registrada a 670 nm y luego sustraída en cada pocillo. La viabilidad celular se calculó como porcentaje de la absorbancia media de la condición no tratada (control), a la cual se le asignó arbitrariamente un valor de viabilidad del 100%.

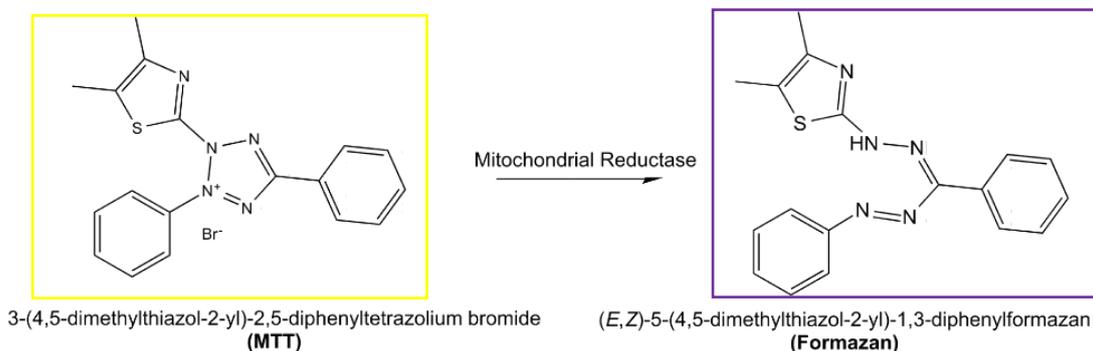


Figura 27. Reacción mitocondrial del reactivo de MTT.

4.2 Análisis de despolarización mitocondrial

Para evaluar la integridad de la membrana mitocondrial, los cultivos fueron incubados con Mitotracker RedCMXRos (Molecular Probes #M7512), en una concentración final de 100nM en el medio de cultivo durante 20 minutos. Luego de la incubación, las células fueron lavadas cuidadosamente con PBS y fijadas con PF al 2% durante 30 minutos. Finalmente, los cultivos fueron micro-fotografiados utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 2000). Esta sonda fluorescente se concentra en las mitocondrias activas, que preservan su potencial de membrana, marcándolas con una fluorescencia roja brillante, mientras que, en las neuronas con

despolarización de la membrana mitocondrial, el reactivo difunde fácilmente y no es retenido dentro de la organela. De este modo, las neuronas con mitocondrias sanas presentan una fluorescencia intensa, mientras que aquellas que presentan daño mitocondrial carecen de fluorescencia y se visualizan con un rojo opaco (Rotstein et al., 2003).

4.3 *Marcación con Ioduro de Propidio*

El ioduro de Propidio (IP) es un agente intercalante del ADN con capacidad fluorescente. Se utiliza como indicador de viabilidad celular ya que, al ser una molécula con carga, es incapaz de atravesar las membranas celulares. Solo podrá ingresar entonces, en aquellas células que tengan comprometida la integridad de su membrana celular, como es el caso de células necróticas o en estado avanzado de apoptosis (necrosis secundaria). De este modo, podemos cuantificar las neuronas muertas como aquellas que presenten marcación con fluorescencia roja de sus núcleos (Jordán et al. 1997).

Se preparó un stock de IP (Sigma #P4170) en una concentración de 1 mg/ml (1,5 mM) en PBS. De esta solución stock, se agregó a las células el volumen necesario para alcanzar una concentración final de 25 μ M en la placa de cultivo. Incubamos durante 20 minutos en incubador previo a la fijación.

4.4 *Análisis de la morfología nuclear*

La integridad nuclear fue evaluada mediante marcación de los núcleos con DAPI, sonda que se une al ADN. Luego de la fijación y permeabilización de la membrana, las células fueron incubadas con DAPI (Invitrogen #D3571), en una concentración de 1 μ g/ml por 10 minutos. Las neuronas fueron consideradas apoptóticas cuando presentaron núcleos fragmentados o condensados (picnóticos) (Rotstein et al., 1997). Para eliminar la subjetividad del operador en la cuantificación, las distintas muestras fueron evaluadas a ciegas.

4.5 *Ensayo de TUNEL*

La fragmentación del ADN fue evaluada utilizando el ensayo de Marcado de corte final de dUTP de deoxinucleotidil transferasa Terminal (TUNEL, por sus siglas en inglés). Este es un método ampliamente utilizado para detectar la fragmentación de ADN debida a cascadas de señalización apoptóticas (Elmore 2007). El ensayo se basa en la identificación de presencia de cortes en el ADN, los cuales se pueden identificar por la deoxinucleotidil transferasa terminal o TdT, una enzima que cataliza la adición de nucleótidos de desoxiuridina trifosfato modificados (dUTPs), que son luego detectados mediante Inmunocitoquímica.

Los cultivos se fijaron con PF 2% durante 15 minutos y a continuación se almacenaron en etanol 70% durante 48-72 h a -20°C . Las células fueron luego pre-incubadas con Buffer TdT por 15 minutos y posteriormente con la mezcla de reacción (0,05 mM BrdUTP y 0,3 U/ μl de enzima TdT recombinante en Buffer TdT) durante 1 hora en incubador. La reacción fue frenada por agregado del buffer stop (300 mM NaCl, 30 mM citrato de sodio, pH 7,4) a temperatura ambiente. Los controles negativos se prepararon omitiendo la enzima TdT en la mezcla de reacción (Abraham et al., 2010). Finalmente, los núcleos con ADN fragmentado se visualizaron por microscopía de fluorescencia luego de realizar una Inmunocitoquímica para detectar el BrdU, como se describió en el capítulo I.

4.6 *Determinación de niveles de estrés oxidativo celular*

Los niveles de estrés oxidativo celular se evaluaron utilizando la sonda 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2-DCFDA, DCF [Termo Fisher]). Esta sonda puede atravesar libremente las membranas celulares, pero una vez dentro de la célula las esterasas citoplasmáticas la convierten en un compuesto cargado a pH fisiológico que queda, por tanto, retenido dentro de la célula. Posteriormente, al reaccionar con las ROS, la sonda es convertida a un compuesto fluorescente (Figura 28), por lo que la fluorescencia medida es proporcional a los niveles de ROS intracelulares.

Luego de un tratamiento de 4 h con C2Cer, se eliminó el medio de cultivo y se añadió PBS conteniendo DCF en una concentración de 1 μM . Después de 20 minutos de incubación a $36,5^{\circ}\text{C}$, los cultivos se analizaron utilizando un microscopio de epifluorescencia. Los niveles de fluorescencia se cuantificaron utilizando ImageJ. Los resultados se expresaron como porcentaje del control.

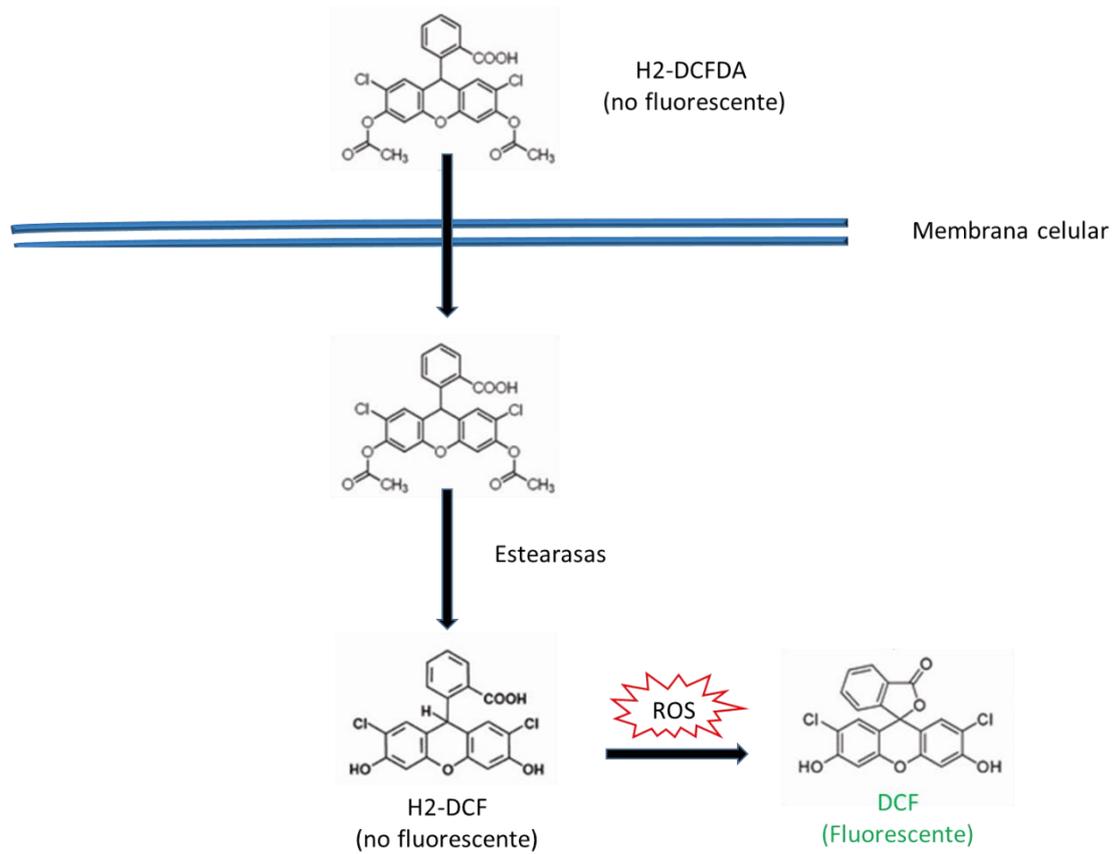


Figura 28. Determinación de los niveles celulares de estrés oxidativo.

4.7 Ensayo de LDH

La detección de Lactato Deshidrogenasa (LDH), una enzima citoplasmática, en el medio de cultivo, es un ensayo muy utilizado como indicador de procesos de necrosis, accidental o programada (necroptosis) (Chan, Moriwaki, and Rosa 2013), ya que en ambos casos se produce la lisis de la membrana plasmática. La liberación de LDH fue determinada como describiera previamente Sánchez Campos et al., (2015) con leves modificaciones. Luego de los tratamientos, el medio de incubación fue removido y centrifugado a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron utilizados para determinar la actividad de la enzima LDH, la cual fue determinada espectrofotométricamente utilizando el Kit LDH-P UV AA (Wiener lab. Argentina), siguiendo las instrucciones del fabricante. El Nicotinamida Adenina Di-nucleótido reducido (NADH) actúa como un cofactor de la conversión de Piruvato a Lactato, reacción que es catalizada por la enzima LDH. Durante esta reacción, el NADH es oxidado a Nicotinamida Adenina Di nucleótido oxidado (NAD⁺). La tasa de consumo del cofactor puede ser monitoreada

a 340 nm (máxima absorción del NADH) y será directamente proporcional a la cantidad de enzima presente en la muestra, como se muestra en la siguiente reacción.



Como control positivo del ensayo se utilizaron cultivos tratados con H_2O_2 350 μM durante 6 h y como control negativo, medio neuronal que no tuvo contacto con células. Los resultados se expresaron como porcentaje del control.

5. Inmunocitoquímica

Después de los diferentes tratamientos, los cultivos se fijaron con PF al 2% en PBS a temperatura ambiente durante 30 minutos o con Metanol frío por 15 minutos a -20°C , seguido por permeabilización con Tritón x-100 al 0,1% durante 15 o 7 minutos según la fijación hubiera sido realizada con PF o en metanol, respectivamente. Posteriormente, se procedió al bloqueo de los sitios no específicos de reconocimiento de los anticuerpos, incubando durante 1 hora a temperatura ambiente con Leche descremada al 2% en Buffer TNT (100mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl y 0,1% tween 20). A continuación, se llevaron a cabo distintas inmunomarcaciones, como se describirá a continuación.

5.1 Identificación Neuronal

Los FR se identificaron mediante expresión del *Cone Rod Homeobox* (Crx). El Crx es un factor de transcripción que se expresa tan pronto como los progenitores neuronales de la retina inician su proceso de diferenciación hacia FR (Garelli et al., 2006). Cultivos previamente fijados en PF fueron incubados toda la noche con una solución 1:600 en PBS de anticuerpo policlonal anti-CRX. Luego de tres lavados con PBS, se agregó una dilución (1:200) de anticuerpo secundario Cy3 anti-conejo durante 1 hora a temperatura ambiente.

Para la identificación de las neuronas amacrin, se recurrió al reconocimiento de la proteína de membrana syntaxina-1, expresada selectivamente por este tipo neuronal (Akagawa and Barnstable 1986). Se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-syntaxina, HPC-1, (Sigma #S0664) en una dilución (1:100) durante 2 h a temperatura ambiente seguido por incubación con anticuerpo secundario cy2 anti-ratón (1:200) 1 hora a temperatura ambiente.

Las muestras se analizaron utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse 2000). La proporción entre neuronas fotorreceptoras y amacrinas en nuestros cultivos neuronales de retina es aproximadamente 70:30, respectivamente.

5.2 Caspasa-3-clivada

La caspasa-3 es una proteína miembro de la familia de las Cisteinil-Aspartato Proteasas (Caspasas). La activación secuencial de las caspasas, juega un rol central en la ejecución de la muerte programada por apoptosis. La caspasa-3 forma parte de las llamadas caspasas efectoras, cuya activación contribuye al desmantelamiento celular. En condiciones basales, esta caspasa se mantiene inactiva en el citoplasma. Frente a diversos estímulos apoptóticos, se activan mediante clivaje, proceso que es ejecutado por una caspasa activadora (Fernandes-Alnemri et al., 1994).

Los cultivos previamente fijados con PF y permeabilizados, fueron incubados con una dilución 1:200 de anticuerpo anti-caspasa-3-clivada (Cell Signaling #9661), forma activa de la caspasa-3, durante toda una noche a 4°C en cámara húmeda. Luego, las células fueron lavadas con PBS e incubadas con un anticuerpo Cy3 anti-conejo en una dilución 1:200 durante 1 hora a temperatura ambiente.

5.4 Translocación nuclear de AIF

El Factor Inductor de la Apoptosis (AIF, por sus siglas en inglés) es una flavoproteína de localización mitocondrial con actividad NADH oxidasa y codificada por un gen nuclear (Susin et al. 1999). Frente a diversos estímulos apoptóticos el AIF es liberado desde la mitocondria hacia el citosol y desde allí se transloca al núcleo (Penninger and Kroemer 2003). Una vez en el núcleo, AIF es responsable de la condensación de la cromatina y de la fragmentación a gran escala del ADN (aprox. 50 kb) a través de un mecanismo caspasa-independiente (Lorenzo et al., 1999).

Cultivos fijados en metanol fueron incubados con una dilución 1:30 de anticuerpo anti-AIF (Santa Cruz #sc-13166) durante toda una noche a 4°C en cámara húmeda. Luego de lavar el anticuerpo con PBS, las células se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con anticuerpo secundario Cy2 anti-ratón, en una dilución 1:200. Para visualizar los núcleos, se marcaron con TOPRO-3, en una concentración de 2 µM, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se analizaron por microscopia láser confocal, utilizando un microscopio confocal DMIRE2/TSCSP2 (Leica, Alemania) equipado con un objetivo 63X de inmersión acuosa. Las imágenes fueron adquiridas mediante el software de procesamiento del equipo (LCS software, Leica).

5.4 Inmunomarcación de PAR

Los polímeros de ADP-ribosa (PAR) son rápidamente sintetizados por acción catalítica de las Poli-ADP-Ribosa Polimerasas (familia de proteínas PARP), en respuesta a un daño sobre el ADN. Las PARP contienen dedos de Zinc de unión al ADN, que las hace capaces de detectar sitios de corte de esta molécula. Esto genera un cambio conformacional que activa a la polimerasa (Ikejima et al. 1990). La acción de la PARP da lugar a la formación de polímeros de PAR que se unen a otras proteínas y las activan (modificación postraduccional), entre las cuales se encuentran ADN polimerasas, ADN ligasas y topoisomerasas implicadas en el proceso de reparación del ADN (Smulson et al. 2000).

Cultivos previamente fijados en PF y permeabilizados, se bloquearon con leche al 2% en buffer TNT durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó una dilución 1:50 de anti-PAR (Enzo # ALX-804-220) y se incubó a 4°C durante toda la noche. Al día siguiente, las células se lavaron con PBS y se incubaron con anticuerpo Cy2 anti-ratón (1:200) durante 1 hora a temperatura ambiente. Al finalizar la incubación, las células se lavaron 3 veces con Tritón x-100 al 0,1% en PBS (PBST) y finalmente se montaron sobre portaobjeto para su análisis.

La Tabla III resume los anticuerpos utilizados en las diferentes inmunocitoquímicas

Anticuerpo	Reconoce	Origen	Fluoróforo asociado	Fuente	Dilución de uso	Tiempo de incubación
CRX	Neuronas fotorreceptoras	conejo	---	Cedido por Dr. Cheryl Craft (University of Southern California)	1:600	Toda la noche
HPC-1	Neuronas amacrinas	ratón	---	Sigma #S0664	1:200	2 h
Anti caspasa-3 clivada	Caspasa 3-clivada	conejo	---	Cell Signaling #9661	1:200	2 h
Anti-AIF	AIF	ratón	---	Santa Cruz #sc-13166	1:30	Toda la noche
Anti-PAR	Proteínas PAR-iladas	ratón	---	Enzo # ALX-804-220	1:50	Toda la noche
Cy2 anti-mouse	Inmunoglobulinas de ratón	cabra	Cy2	Jackson ImmunoResearch	1:200	1 hora
Cy3 anti-rabbit	Inmunoglobulinas de conejo	cabra	Cy3	Jackson ImmunoResearch	1:200	1 hora

Tabla III. Anticuerpos utilizados en inmunocitoquímica.

6. Western Blotting

6.1 Obtención de las muestras de proteínas

Finalizado los tratamientos, las células se lavaron dos veces con buffer de lavado (10mM NaF, 1 mM Na₃VO₄ en PBS) y se recolectaron en buffer de lisis RIPA [10mM tris HCL (pH 7,4) 15 mM NaCl, 5mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1% Tritón X-100] conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas (Sigma #P8340) en una dilución 1:100. Posteriormente, se rasparon las células con espátula y se sometieron a lisis en hielo durante 30 minutos (con vortexeo cada 10 minutos). Finalizada la lisis, se centrifugaron las muestras a 14000g durante 15 minutos en centrifuga refrigerada a 4°C. Se descartaron los pellets, y los sobrenadantes conteniendo las proteínas en solución, se almacenaron a -20°C hasta el momento de su uso.

6.2 Cuantificación de las proteínas

La concentración de proteínas en las muestras se analizó mediante el Método de Bradford (Bradford 1976). Este método se basa en el cambio de absorbancia del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 al unirse a las proteínas. El colorante puede existir en tres formas: catiónica (roja), neutra (verde) y aniónica (azul). Bajo condiciones acídicas, el colorante se encuentra predominantemente en su forma catiónica roja, doblemente protonada ($\lambda_{\text{máx}}= 470$ nm), y cuando se une a proteínas, es convertido a una forma establemente desprotonada de color azul ($\lambda_{\text{máx}}= 595$ nm). La magnitud de esta reacción puede ser detectada espectrofotométricamente.

Una vez cuantificadas las proteínas, se tomó de cada muestra el volumen necesario a fin de obtener entre 30 y 40 μg de proteínas, se mezclaron con *buffer muestra* [62,5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, 1% glicerol, 3% 2-mercapto-etanol, y 0,01% azul de bromofenol] y se desnaturalizaron mediante calentamiento a 95°C durante 7 minutos.

6.3 Electroforesis en gel de Poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Se procedió a la separación de las proteínas de la muestra mediante electroforesis unidimensional en geles de Poliacrilamida al 10% (método SDS-PAGE) (Laemmli 1970). La corrida electroforética se realizó en *buffer cámara* (Tris-HCl 25 mM pH=8,3; Glicina 192 mM; SDS 0,1%). Una vez sembradas las distintas muestras y el marcador de peso molecular, se separaron las proteínas aplicando una corriente de 80V durante 20 minutos, a fin de facilitar el empaquetamiento de las muestras. Luego se continuó la electroforesis a 130 V hasta la salida del indicador del frente de corrida (aprox. 90 minutos).

6.4 Electro transferencia de proteínas a membrana de PVDF

Una vez separadas, las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de PVDF previamente activada con Metanol durante 30 segundos (InmobilonP, Merck Millipore). Para ello se procedió al empaquetamiento del cassette de transferencia, se lo colocó dentro de la cuba y se rellenó el sistema con *Buffer de transferencia* helado (Tris 250 mM pH 8,3; Glicina 1,92 M). Posteriormente, se conectó a la corriente y se electro-transferieron las proteínas a 300 mA durante 2 h en baño de hielo.

Finalizada la transferencia, se corroboró que las proteínas se encontraran adheridas a la membrana mediante coloración reversible con Rojo Ponceau.

6.5 Inmunodetección de las proteínas

Las membranas se lavaron con PBST a fin de eliminar restos de buffer de transferencia y/o Rojo Ponceau y luego se incubó con buffer bloqueante (leche descremada al 5% o BSA al 3% en PBS, según el caso) durante 90 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se incubó con la dilución de anticuerpo primario correspondiente, Tubulina (1:1000 en PBS, 2 h a temperatura ambiente) o anti-PAR (1:400 en leche al 2,5% en PBST toda la noche a 4°C). Luego de la incubación, se lavó la membrana con PBST y se incubó, con una dilución 1:200 en PBS, de anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, se lavó la membrana y las bandas de proteínas reconocidas por los anticuerpos fueron visualizadas mediante técnica de quimioluminiscencia y reveladas sobre placas fotográficas. Las bandas fueron luego escaneadas a 1200 dpi y semi-cuantificadas utilizando el software ImageJ (disponible gratuitamente en <http://rsb.info.nih.gov/ij>).

7. Análisis estadístico

Se realizó análisis de ANOVA seguido de test de comparación de Tukey's. Los datos se representaron como la media \pm S.E.M de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias entre los distintos tratamientos fueron consideradas significativas a $p < 0,05$ (*), (#); $p < 0,01$ (**) o $p < 0,001$ (***), (###). Cuando fue relevante, se señalaron los casos en los que no existieron diferencias significativas entre condiciones, indicándolas como *ns*.

RESULTADOS

La Ceramida indujo una muerte rápida y selectiva de los fotorreceptores

Nuestro laboratorio demostró previamente que un tratamiento de 24 h con C2Cer, induce la muerte tanto de los FR como de las neuronas amacrinas, en cultivos neuronales puros de 3 días *in vitro* (German et al., 2006). Para evaluar si ambos tipos neuronales tenían una sensibilidad diferencial a la C2Cer, analizamos su efecto en tratamientos cortos. El tratamiento con C2Cer 10 μ M indujo un rápido incremento de la muerte neuronal, determinada por marcación con Ioduro de Propidio (IP) luego de 6 h (Figura 29a). El porcentaje de neuronas IP positivas se incrementó significativamente desde menos del 10% en controles hasta aproximadamente 30, 60 y 70% luego de 3, 6 y 9 h de tratamiento, respectivamente (Figura 29b).

De forma similar, un tratamiento de 6 h incrementó la picnosis nuclear en las neuronas (Figura 29 c, columna derecha, señaladas con cabezas de flecha), las cuales fueron muy pocas en los cultivos controles. El porcentaje de neuronas con núcleos picnóticos se incrementó desde alrededor de un 10% en los controles hasta 40, 50 y 55% luego de 3,6, y 9 h de tratamiento, respectivamente (Figura 29d).

La funcionalidad de las mitocondrias neuronales también se vio afectada luego de un tratamiento de 6 h. Mientras que en los controles la mayoría de las neuronas mostraron mitocondrias marcadas brillantemente con la sonda Mitotracker (Figura 29 e, columna de la izquierda), la marca fluorescente disminuyó en un gran número de mitocondrias en los cultivos tratados con C2Cer (Figura 29 e, columna de la derecha, flechas finas). El ensayo de MTT corroboró que la funcionalidad mitocondrial, evaluada como un parámetro de viabilidad, decreció paulatina y significativamente a 80, 65 y 50% del valor control, luego de 3, 6, y 9 h de tratamiento, respectivamente (Figura 29f).

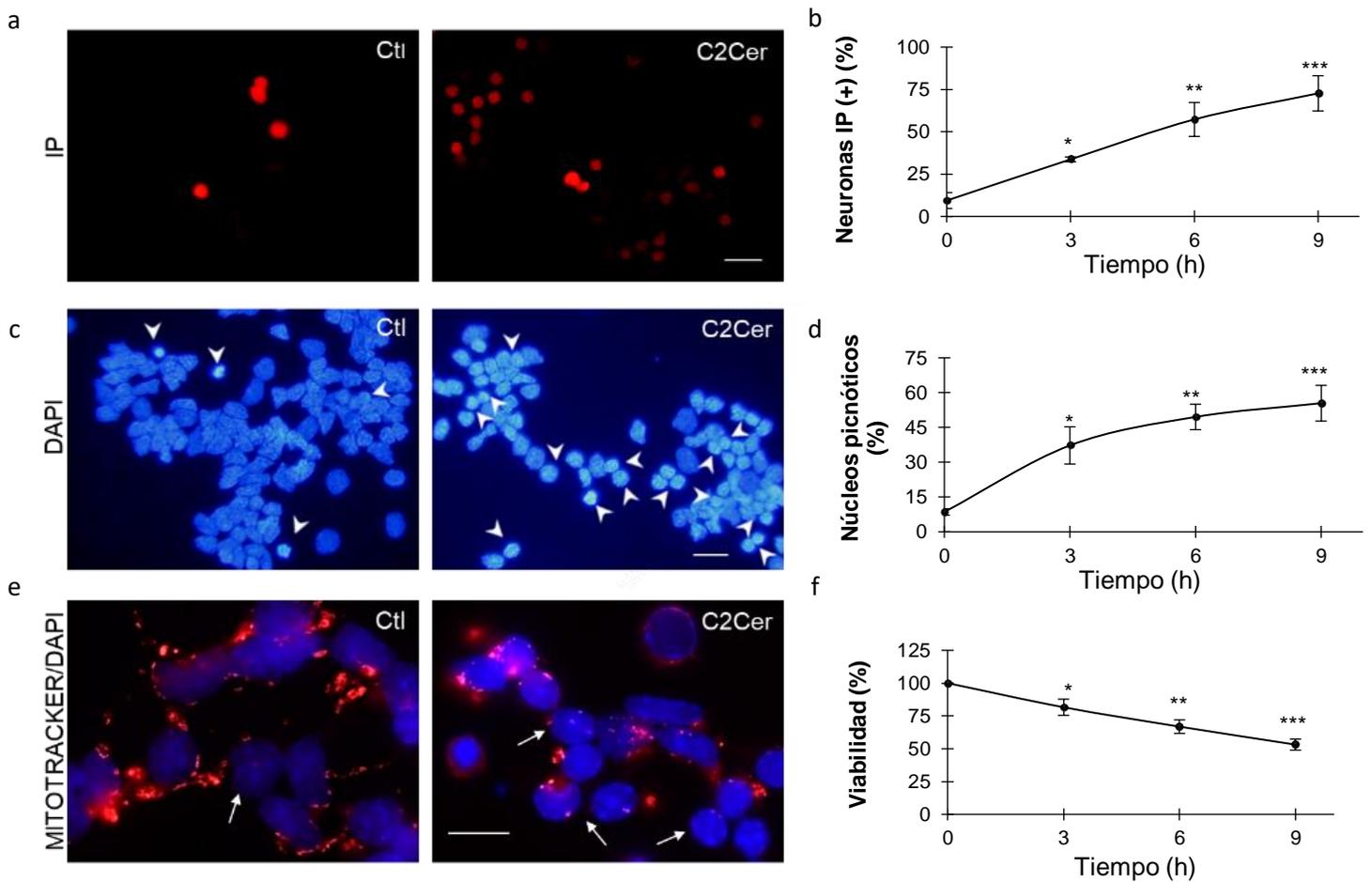


Figura 29. El agregado de C2Ceramide indujo rápidamente la muerte neuronal.

Cultivos neuronales de tres días se suplementaron con vehículo (Ctl) o con C2Cer 10 μ M (C2Cer) durante diferentes períodos de tiempo. Las microfotografías de fluorescencia muestran células marcadas con Ioduro de Propidio (IP, rojo en a), núcleos marcados con DAPI (azul en [c] y [e]) y mitocondrias marcadas con Mitotracker (rojo en [e]) después de un tratamiento de 6 h con vehículo o C2Cer; nótese el aumento en las neuronas que tienen núcleos picnóticos (cabezas de flecha en [c]) y en las neuronas que evidencian una despolarización mitocondrial (flechas finas en [e]) en cultivos tratados con C2Cer. Barra de escala, 10 μ m. Los gráficos muestran el porcentaje de neuronas marcadas con IP (b), de neuronas que tienen núcleos picnóticos (d) y la disminución de la viabilidad en comparación con los controles, determinada por el ensayo de MTT (f) después de diferentes tiempos de tratamiento. Los valores en (b), (d) y (f) representan la media \pm SEM de tres experimentos diferentes. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$, diferencias estadísticamente significativas en comparación con los controles.

Como se mencionara, C2Cer induce la muerte de FR y neuronas amacrinas luego de 24 h de tratamiento. En contraste, el tratamiento de 6h con C2Cer únicamente afectó a los FR. Como puede apreciarse en la Figura 30a, panel superior, solo unos pocos núcleos de FR (marcados con Crx) y neuronas amacrinas (identificadas con HPC-1), se encontraban picnóticos en la condición control. En contraste, en los cultivos tratados con C2Cer el número de FR con núcleos picnóticos se incrementó cerca de 3 veces, mientras que el número de neuronas amacrinas con núcleos picnóticos no se vio afectado con el tratamiento (Figura 30a panel inferior y Figura 30b).

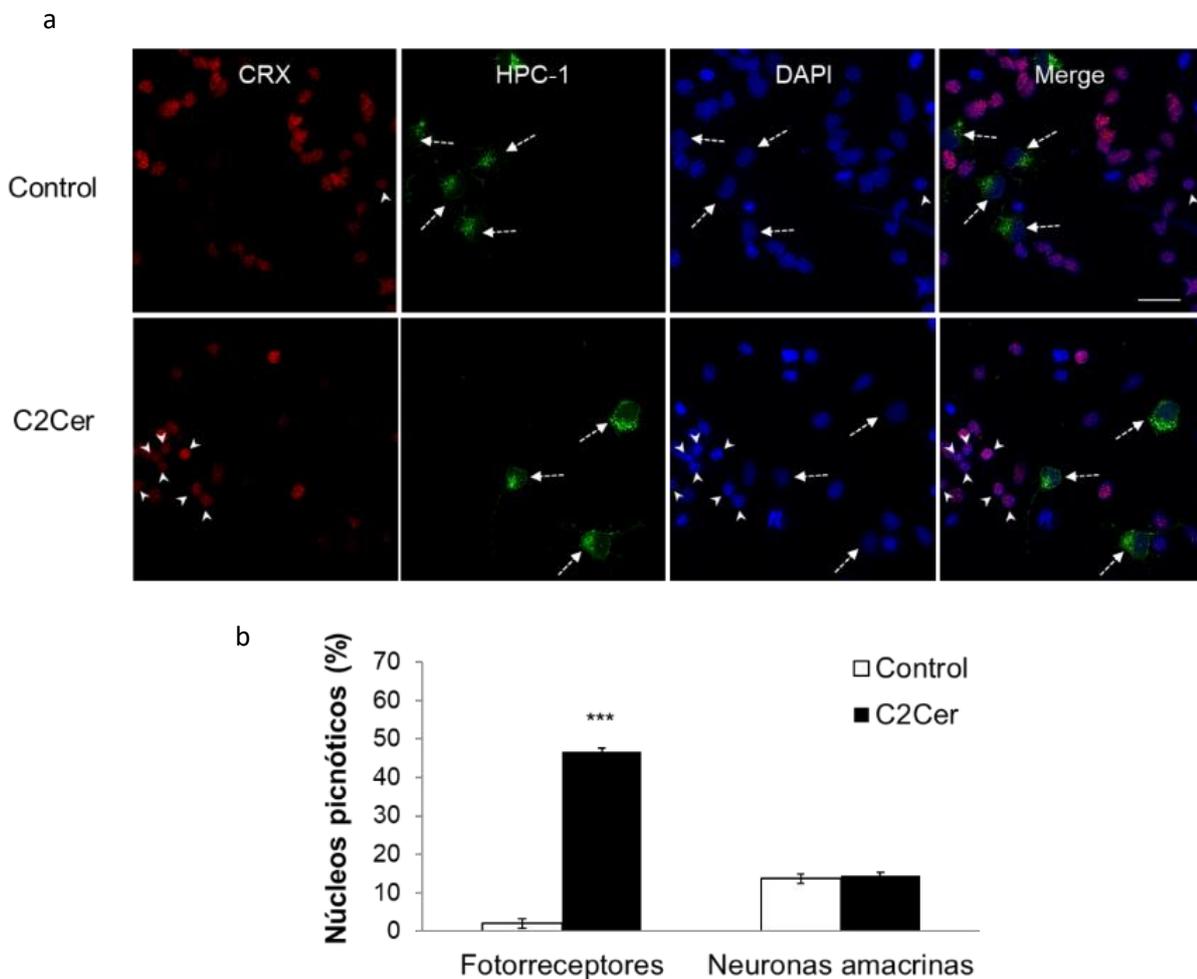


Figura 30. El tratamiento durante 6 h con C2Cer produjo la muerte selectiva de los fotorreceptores.

(a) Los cultivos neuronales fueron tratados con vehículo (control) o C2Cer por 6 h. Las microfotografías muestran fotorreceptores y neuronas amacrinas marcados con anticuerpos anti-Crx (rojo) y HPC-1 (verde), respectivamente, y los núcleos marcados con DAPI (azul) y el Merge.

Las flechas discontinuas señalan las neuronas amacrinas y las cabezas de flechas a las neuronas Crx positivas (FR) que presentan núcleos picnóticos. Barra de escala, 10 μ m. (b) Las barras muestran el porcentaje de FR y neuronas amacrinas con núcleos picnóticos en cultivos controles (barras blancas) y tratados con C2Cer (barras negras); los valores indican la media \pm SEM de tres experimentos independientes.

*** diferencias estadísticamente significativas comparado con la condición control ($p < 0.001$).

El tratamiento con C2Cer no indujo fragmentación internucleosomal del ADN

El ensayo de TUNEL reveló que un tratamiento de 6h con C2Cer prácticamente no aumentó el número de neuronas con fragmentación internucleosomal del ADN, en comparación con los controles (flechas finas en la Figura 31a, primer columna). Incluso 15 h después de la adición de C2Cer no se evidenció aumento significativo en el número de neuronas TUNEL positivas comparado con los cultivos controles (Figura 31b). Un análisis de doble marcación con un anticuerpo contra Crx reveló que virtualmente ninguna célula marcada con TUNEL era positiva para Crx (Figura 31a, primera y tercera columna).

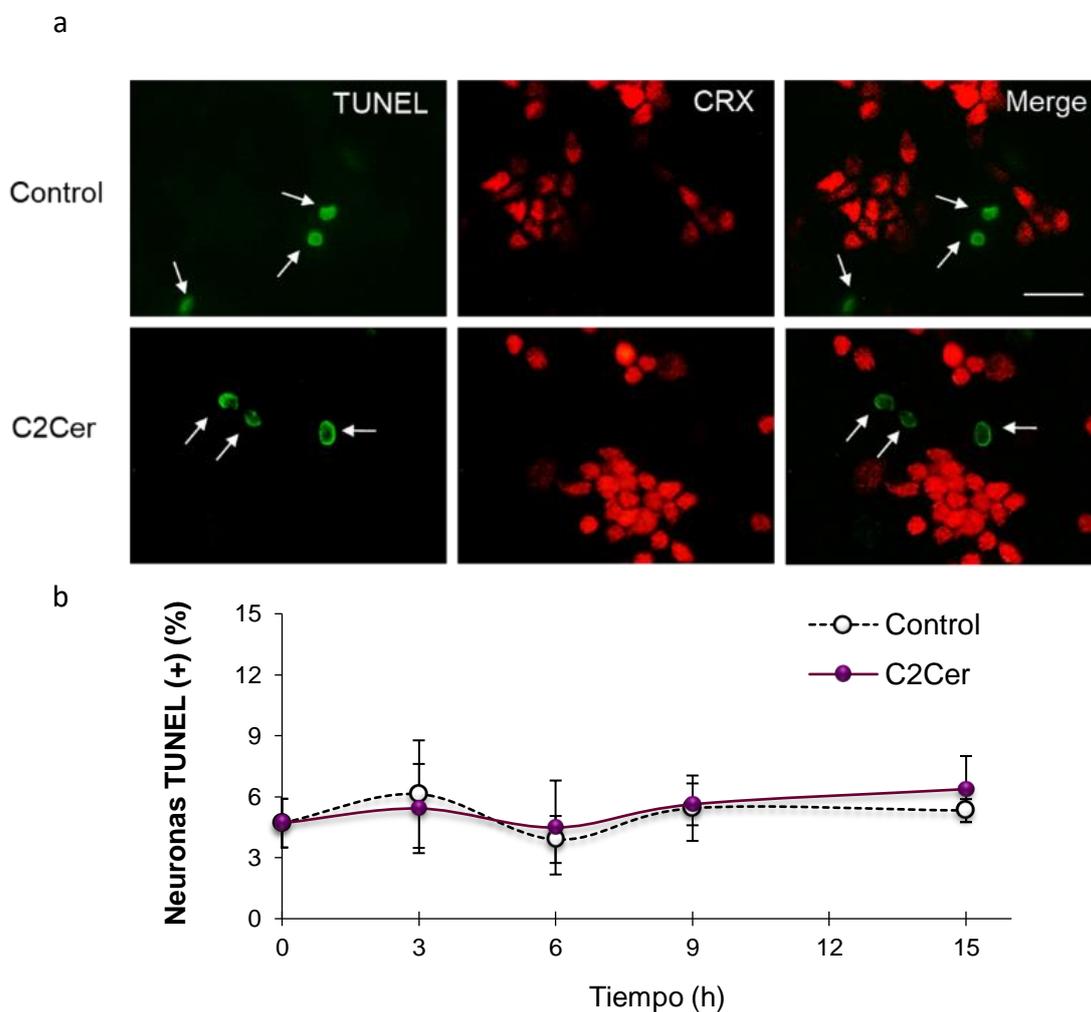


Figura 31. El tratamiento con C2Cer no incrementó la fragmentación internucleosomal del ADN.

(a) Microfotografías de fluorescencia muestran cultivos tratados con vehículo o con C2Cer por 6 h marcados con la técnica de TUNEL (verde, flechas) para evaluar fragmentación internucleosomal del ADN, un evento característico de la apoptosis; Crx (rojo), para identificar fotorreceptores, y el Merge. Notar la ausencia de colocalización entre la marca de TUNEL y la expresión de Crx en las imágenes del Merge. Barra de escala: 20 μ m. (b) Porcentaje de neuronas TUNEL positivas luego de diferentes tiempos de tratamiento.

La muerte de los fotorreceptores inducida por Ceramida fue independiente de las caspasas

Como se mostró en Figura 29e, el tratamiento con C2Cer indujo la pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial, uno de los eventos centrales en el desencadenamiento de la RCD. En la vía intrínseca de la apoptosis, esto conduce a la formación del apoptosoma, y el posterior clivaje y activación de la caspasa-3. Sin embargo, el análisis inmunocitoquímico reveló que no existieron diferencias significativas en el número de células que mostraron la presencia de caspasa-3 clivada entre los cultivos controles y los tratados con C2Cer (Figura 32a, columna central). Sólo alrededor del 5% de las células mostraron marcación de caspasa-3 clivada, tanto en controles como en cultivos tratados con Cer después de 6 h; incluso después de un tratamiento de 15 h, no se registró un aumento significativo en comparación con los controles (Figura 32b), lo que sugiere que la caspasa-3 no participaría en la muerte inducida por C2Cer.

Para investigar si otras caspasas estaban involucradas en esta inducción de muerte, pretratamos a los cultivos con el pan-inhibidor de caspasas Z-VAD-fmk. Después de 6 h de tratamiento con C2Cer, ninguna de las concentraciones de Z-VAD-fmk testeadas logró evitar la disminución en la viabilidad inducida por C2Cer (Figura 32c). Esto implica que la muerte inducida por C2Cer sería de tipo caspasa-independiente.

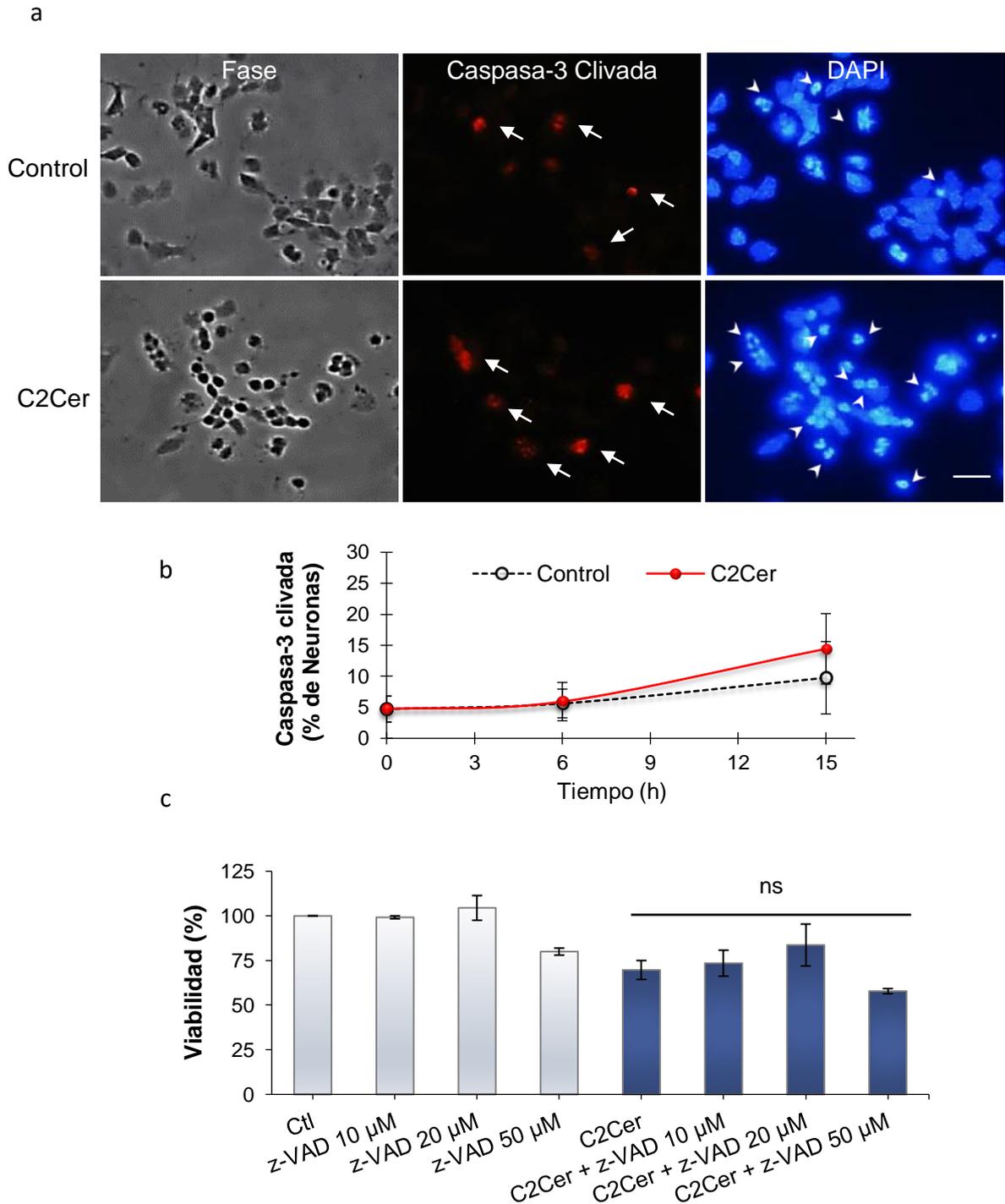


Figura 32. La C2Cer indujo la muerte de los FR a través de un mecanismo caspasa-independiente.

(a) Microfotografías de fase y de fluorescencia de cultivos tratados con vehículo o C2Cer durante 6 h muestran la expresión de caspasa-3 clivada (columna central, flechas) y núcleos marcados con DAPI (derecha); las cabezas de flecha indican núcleos picnóticos. Barra de escala, 10 µm. (b) Porcentaje de células que evidencian presencia de caspasa-3 clivada después de diferentes tiempos de incubación con C2Cer. (c) Las barras muestran la cuantificación del efecto sobre la viabilidad neuronal, en comparación con los controles, del pretratamiento con diferentes concentraciones del inhibidor de caspasas z-VAD-fmk (z-VAD), seguido (barras azules) o no (barras grises) por un tratamiento de 6 h con C2Cer. ns, diferencias estadísticamente no significativas.

C2Cer incrementó la formación de especies reactivas de oxígeno en fotorreceptores

La mitocondria es uno de los blancos principales de Cer, que afecta usualmente la polarización de su membrana, lo que finalmente desencadena un fallo funcional. Esta disfuncionalidad mitocondrial conduce a un desequilibrio en el potencial redox de la organela, lo cual lleva a un incremento en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) (Gudz, Tserng, and Hoppel 1997). Evaluamos la posible generación de ROS en nuestros cultivos tratados con C2Cer utilizando la sonda DCF, que una vez ingresada a la célula, fluoresce en presencia de ROS. Mientras que los cultivos controles evidenciaron un nivel bajo de fluorescencia, ésta se incrementó significativamente en los cultivos tratados durante 4h con C2Cer. El aumento de la fluorescencia se vio en ambos tipos celulares, pero se destacó su incremento en los FR (flechas gruesas en Figura 33a). La cuantificación de esta variación en la fluorescencia demostró un aumento significativo, del 40 % respecto a los controles (Figura 33b).

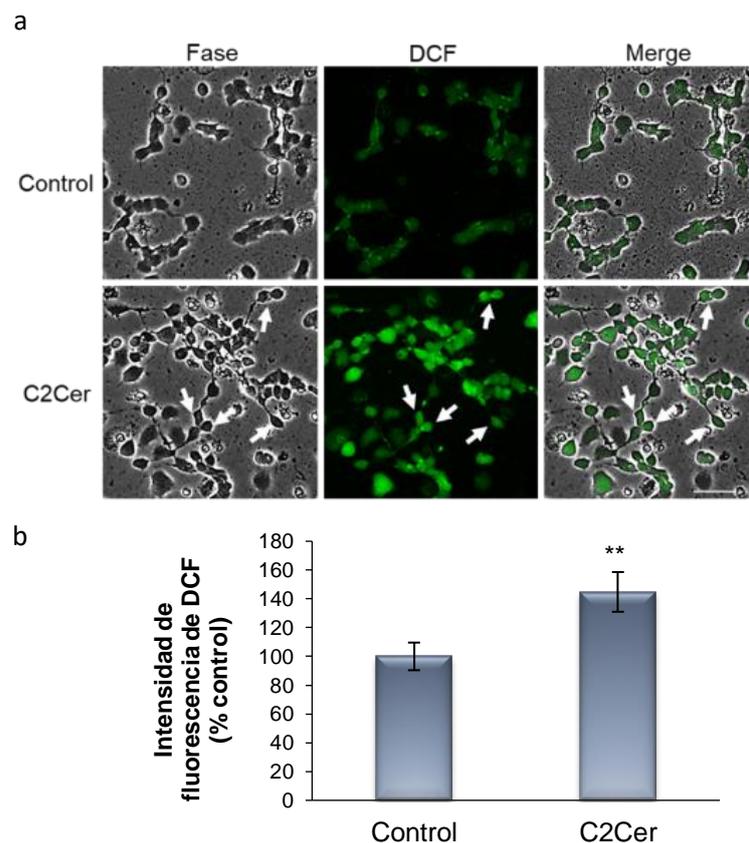


Figura 33. La C2Cer incrementó la formación de especies reactivas de oxígeno (ROS).

(a) Microfotografías de contraste de fase y fluorescencia mostrando cultivos tratados con vehículo o C2Cer por 4h, marcados con DCF para detectar la formación de ROS (verde) y el Merge; las flechas indican la formación de ROS en fotorreceptores. La barra de escala representa 20 μ m. (b) El gráfico de barras indica el porcentaje de incremento de la fluorescencia, en unidades arbitrarias, de los cultivos tratados con C2Cer respecto a los cultivos controles.

** Diferencias estadísticamente significativas comparado con el control ($p < 0.01$).

La sobre-activación de PARP-1 sería un evento clave en la muerte de los fotorreceptores inducida por Ceramida

Diversos insultos al ADN, como el daño oxidativo generado por un desbalance en los niveles de ROS intracelulares, conducen a la activación de una serie de proteínas implicadas en su reparación. Entre ellas encontramos a la familia de las Polimerasas de Poli-ADP-Ribosilada (PARP). En condiciones fisiológicas, estas PARP se unen a los sitios dañados del ADN y sufren una modificación que permite la activación de su sitio catalítico. Las PARP activadas producen polímeros de Poli-ADP-Ribosa (PAR) que luego se unirán a proteínas en un proceso denominado PAR-ilación y estas proteínas PAR-iladas se encargarán de la reparación del ADN. Sin embargo, se ha demostrado que la sobre-activación de PARP-1, debido a la continuidad del estrés y la consecuente acumulación de los PAR y de proteínas PAR-iladas, promueve una forma de muerte celular independiente de caspasas conocida como *Parthanatos* (Yu et al. 2006a). Teniendo en cuenta que la inducción de muerte mediada por C2Cer seguiría un proceso de tipo caspasa-independiente, que cursa con un aumento en los niveles de ROS en los FR, nos preguntamos si C2Cer estaría activando la vía de Parthanatos, ya que era muy escasa la información que indicara que esta vía era inducida por la Cer. Para evaluar si PARP-1 estaba involucrada en la muerte de los FR, pre-tratamos a los cultivos neuronales con PJ34, un inhibidor altamente selectivo de PARP-1, antes de la adición de C2Cer. El pretratamiento con PJ34 1 μ M redujo significativamente la muerte celular, como se muestra mediante el ensayo de MTT (Figura 34a). El pretratamiento con BYK5 μ M, otro inhibidor potente y selectivo de PARP-1, también condujo a una disminución significativa en la muerte de los FR inducida por C2Cer (Figura 34b). A su vez, demostramos que el pretratamiento con PJ34 redujo notablemente la picnosis nuclear provocada por C2Cer (cabezas de flecha en la Figura 35a). La cuantificación del porcentaje de FR con núcleos picnóticos evidenció que esta disminución fue altamente significativa. (Figura 35b).

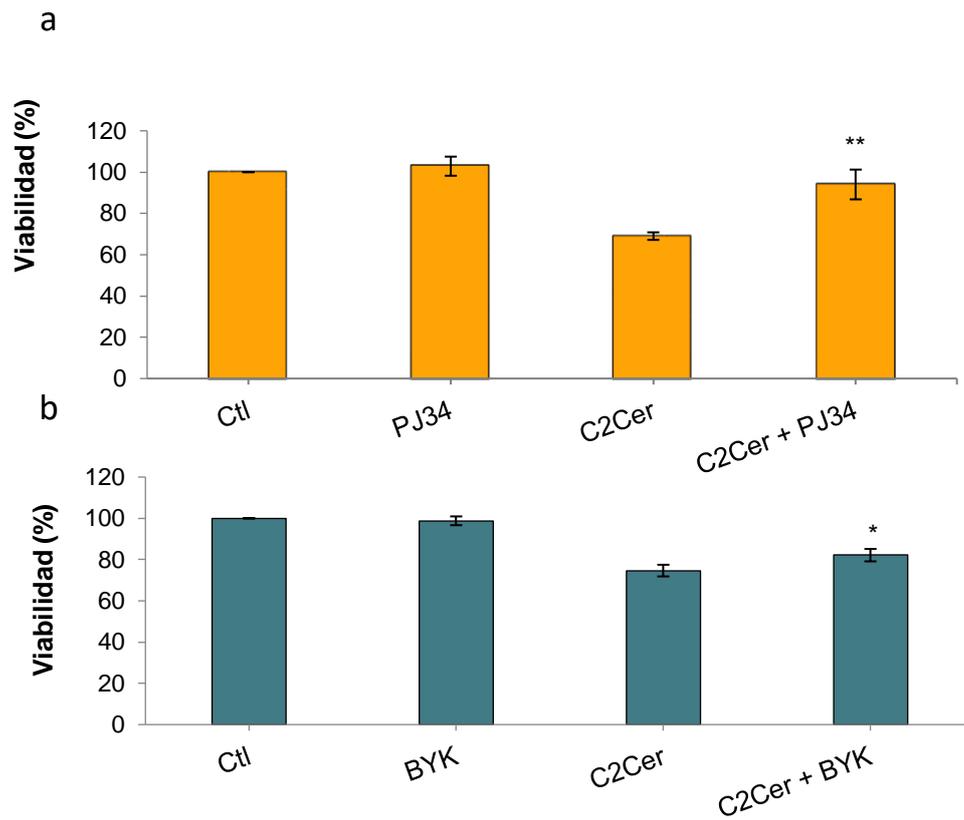
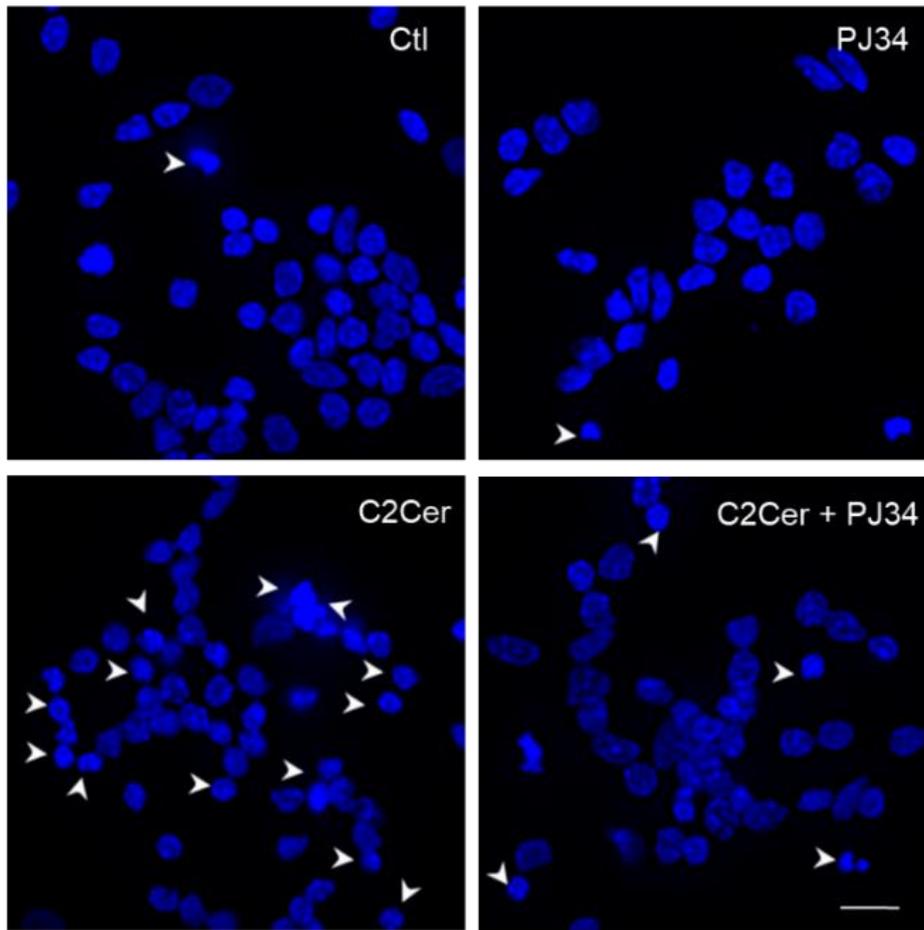


Figura 34. C2Cer promovió la muerte neuronal a través de la activación de PARP-1.

Los cultivos se pre-trataron con dos inhibidores selectivos de PARP-1, PJ34 (a) y BYK (b) antes del tratamiento de 6 h con C2Cer; la viabilidad se determinó mediante ensayo de MTT. Los resultados se expresan como porcentaje del control y representan la media \pm S.E.M de 3 experimentos independientes.

(*) (**) Diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición C2Cer ($p < 0,05$ y $p < 0,01$, respectivamente).

a



b

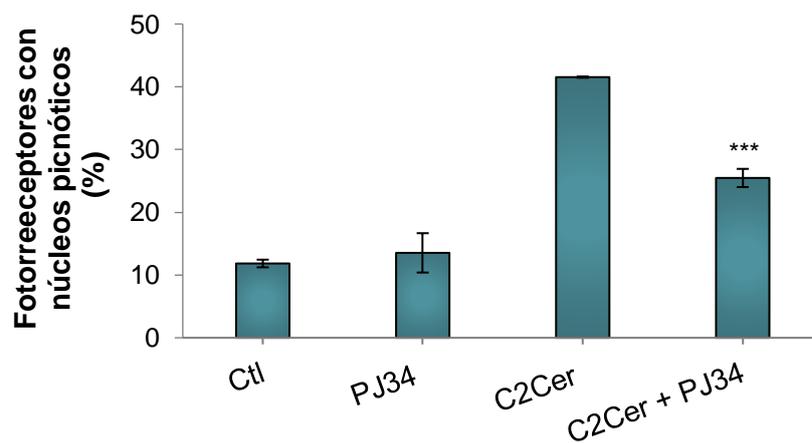


Figura 35. El pre-tratamiento con PJ34 redujo la picnosis nuclear inducida por C2Cer.

(a) Microfotografías de fluorescencia mostrando núcleos marcados con DAPI en cultivos pre tratados con PJ34 1 μ M y luego con vehículo o C2Cer durante 6 h; las cabezas de flecha muestran núcleos picnóticos. Barra de escala: 10 μ m.

(b) Porcentaje (media \pm SEM) de fotorreceptores que presentaron núcleos picnóticos en cultivos controles o pre tratados con PJ34, seguidos o no de un tratamiento con C2Cer de 6 h.

La sobre-activación de PARP, principalmente la de PARP-1, conduce a una rápida acumulación de polímeros de PAR. La marcación inmunocitoquímica demostró que el tratamiento con C2Cer aumentó la expresión de los PAR en comparación con los controles (Figura 36a). El análisis de Western Blot confirmó que C2Cer incrementó rápidamente los niveles de PAR; después de 2 h de la adición de C2Cer, los niveles de PAR aumentaron casi un 50%, en comparación con los controles (Figura 36b), disminuyendo después de 4 h a los niveles del control. A las 6 h se detectó un leve incremento, por encima de los niveles del control, pero dicho aumento no fue significativo a nivel estadístico. En conjunto, estos resultados apoyan firmemente que la sobre-activación de PARP estaría involucrada en la muerte de los FR.

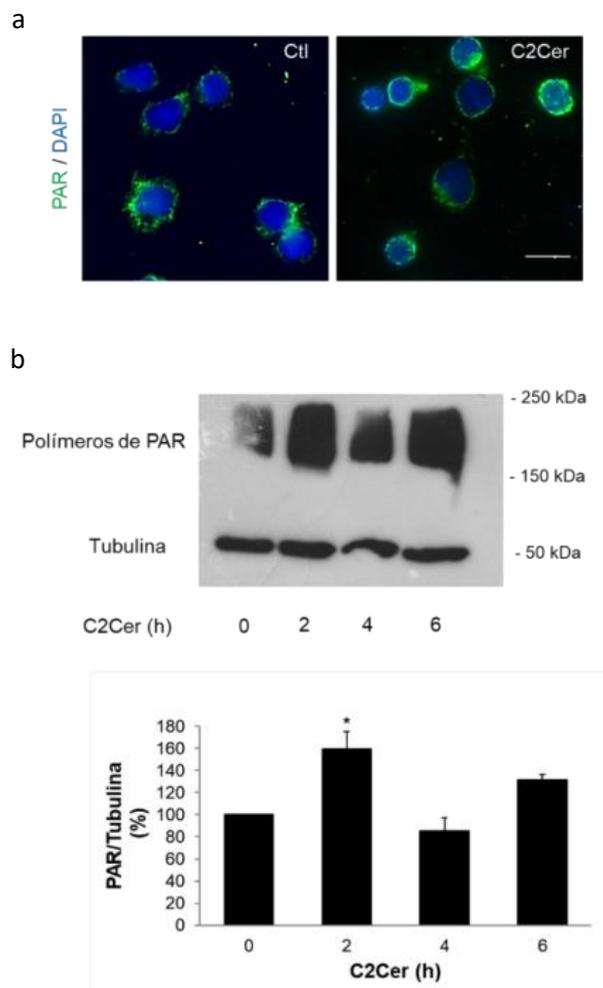


Figura 36. El tratamiento con C2Cer indujo la sobre-activación de PARP-1.

(a) Las microfotografías muestran la expresión de polímeros de PAR (verde) y núcleos marcados con DAPI (azul) en cultivos tratados con vehículo o C2Cer durante 4 h. Barras de escala, 10 μ m. (b) Análisis mediante Western Blot de los niveles de los polímeros PAR a 0, 2, 4 y 6 h de la adición de C2Cer (panel superior); las barras (panel inferior) representan el porcentaje de cambio en los niveles de polímero PAR normalizado contra Tubulina, en comparación con la condición control (tiempo cero).

La muerte inducida por una ceramida natural también fue prevenida mediante el bloqueo de PARP-1

La C2Cer es una ceramida sintética, ampliamente utilizada en modelos *in vitro*, dada su mayor solubilidad en medios acuosos respecto a las ceramidas naturales, que tienen ácidos grasos de cadena larga, usualmente de más de 16 átomos de carbono (Rotstein et al., 2010). Nuestro laboratorio ha demostrado previamente que el estrés oxidativo incrementa la síntesis de [³H]16:0-Cer y que dicho incremento desencadena la muerte de los FR (German et al., 2006). Nos preguntamos entonces si la adición de C16-Ceramida (C16Cer) induciría el mismo mecanismo de muerte que la C2Cer en los FR en cultivo. En la Figura 37 puede observarse que la adición de C16Cer disminuyó la viabilidad de los FR de manera concentración-dependiente, tras 6 h de agregado (líneas discontinuas de la curva), siendo dicha disminución estadísticamente significativa en el rango de 10 a 25 μ M. Por su parte, la pre-incubación con PJ34 1 μ M rescató significativo a los FR, sugiriendo entonces que la inducción de muerte mediada por C16-Cer involucra también la sobre-activación de PARP-1.

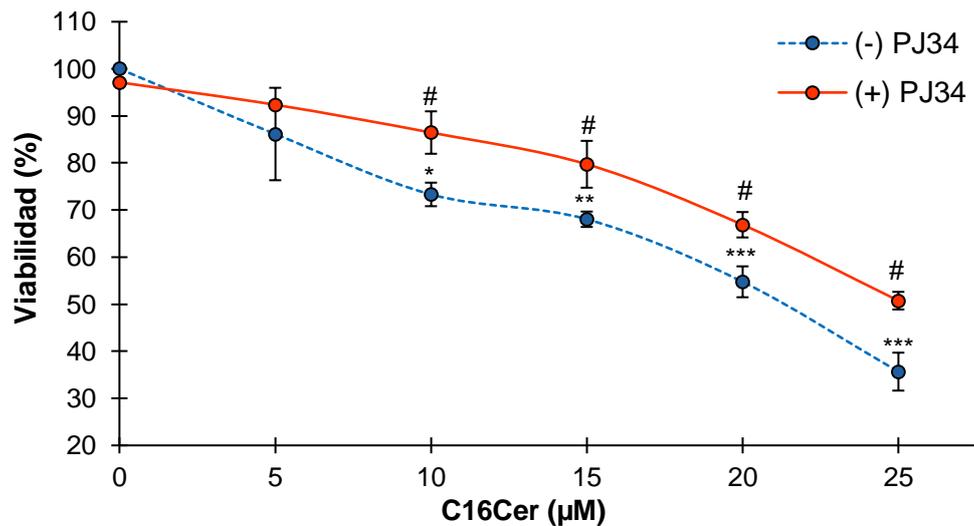


Figura 37. La sobre activación de PARP-1 medió la muerte de los fotorreceptores inducida por una ceramida natural.

La curva muestra la reducción en la viabilidad de tipo concentración-dependiente de neuronas en cultivo tras la adición de C16-Ceramida (curva azul). El pre-tratamiento con PJ34 (curva roja) incrementó significativamente la viabilidad neuronal, sugiriendo la participación de PARP-1 en el proceso de muerte inducido por C16-Ceramida. Diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición control *($p < 0,05$); ** ($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). # Diferencias estadísticamente significativas entre condición tratada y no tratada con PJ34 ($p < 0,05$).

La activación de PARP-1 inducida por C2Cer condujo a la translocación nuclear del AIF

La citotoxicidad mediada por PARP-1 tiene al AIF como efector principal en muchos tipos celulares (Ruchalski et al. 2006; Wang, Dawson, and Dawson 2009; Yu et al. 2006b). AIF se encuentra entre los "factores de muerte" liberados desde la mitocondria frente a diferentes estímulos que conducen a la pérdida de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y su translocación nuclear induce la muerte celular (Susin et al. 1999). Para explorar primero si C2Cer indujo la translocación nuclear del AIF, se evaluó la localización subcelular del AIF mediante Inmunocitoquímica y microscopía confocal en cultivos controles y tratados con C2Cer. La doble marcación con un anticuerpo anti-AIF (verde en la Figura 38a) y TOPRO-3 (azul en la Figura 38a) evidenció que el AIF estuvo casi ausente de los núcleos en las condiciones controles; en contraste, C2Cer aumentó la colocalización de AIF y TOPRO-3, lo que implica que promovió su translocación nuclear (compárense las micrografías izquierda y derecha del panel superior en la Figura 38a, cabezas de flecha). La evaluación de la localización nuclear de AIF mediante análisis de imágenes confocales en el plano xz confirmó la ausencia de AIF en los núcleos de los controles y su translocación nuclear después del tratamiento con C2Cer, como evidenció la colocalización de AIF y TOPRO-3 (Figura 38b, primera y tercera fila, respectivamente). El porcentaje de FR que mostraron localización nuclear de AIF aumentó notablemente, de aproximadamente 10% en controles a 60% después de 6 h de tratamiento con C2Cer (Figura 38c).

Para evaluar si la translocación nuclear del AIF era el resultado de una sobre-activación de PARP-1, pre-tratamos a los cultivos neuronales con PJ34. Este inhibidor de PARP-1 disminuyó notablemente la translocación nuclear de AIF después del tratamiento con C2Cer (Figura 38a, fila inferior). Dicha disminución fue confirmada por el análisis en el plano xz; se observó escasa colocalización de AIF y TOPRO-3 en cultivos pre-tratados con PJ34, en comparación con aquellos tratados únicamente con C2Cer (Figura 38b, última y tercera fila, respectivamente). El porcentaje de FR que exhibieron localización nuclear del AIF disminuyó significativamente desde un 60% en los cultivos tratados solo con C2Cer, hasta aproximadamente un 20% en cultivos pre-tratados con PJ34 (Figura 38c).

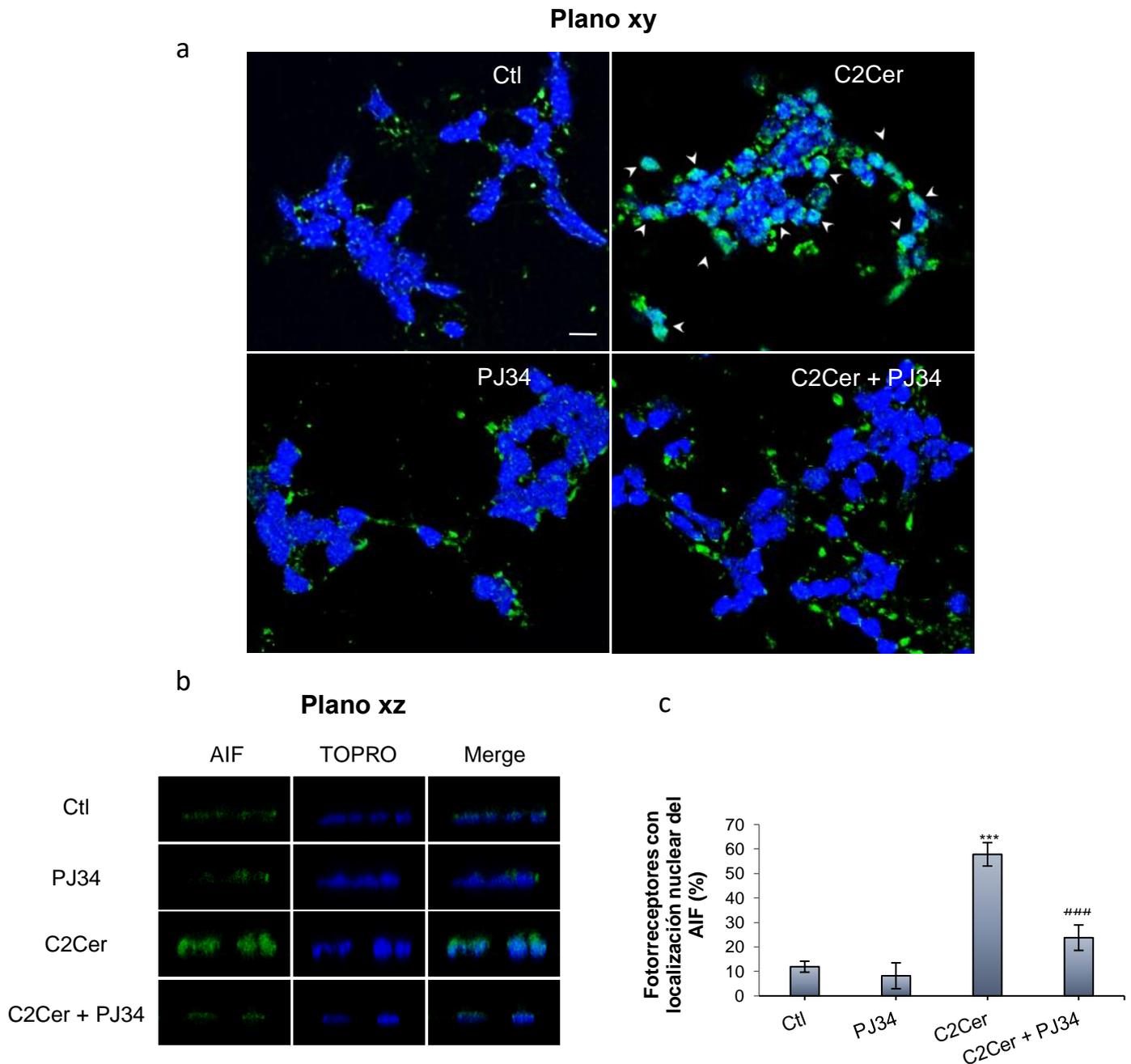


Figura 38. La translocación nuclear del AIF, inducida por C2Cer fue prevenida mediante inhibición de la activación de PARP-1.

Los cultivos se pre-trataron o no con PJ34 y luego con vehículo o C2Cer durante 6 h. (a) Las microfotografías confocales en el plano xy muestran la localización neuronal del AIF (verde) y los núcleos marcados con TOPRO-3 (azul); las cabezas de flecha muestran colocalización de AIF y TOPRO-3. Barra de escala, 10 μ m. (b) Microfotografías confocales en el plano xz mostrando la localización de AIF (columna izquierda, en verde), marcación nuclear con TOPRO-3 (columna central, en azul) y Merge (columna derecha). (c) Porcentaje de fotorreceptores (media \pm SEM) que mostraron localización nuclear del AIF; (***) (####) diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición control y C2Cer, respectivamente ($p < 0.001$).

C2Cer activó a las calpaínas para promover la muerte de los fotorreceptores

Las cisteín-proteasas como las calpaínas y las catepsinas participan en el clivaje del AIF, proceso que sería esencial para su translocación (Polster et al. 2005; Yuste et al. 2005). Para investigar si estas proteasas estarían involucradas en la muerte mediada por C2Cer, en primer lugar, analizamos el efecto de ALLN, un inhibidor de varias cisteín-proteasas, como las calpaína 1 y 2 y las catepsinas B y L. El pretratamiento con ALLN 20 μM durante 1 hora previo al agregado de la C2Cer, redujo notablemente la picnosis nuclear observada en cultivos tratados solo con C2Cer (Figura 39a, comparar micrografías central y derecha en Figura 39b). El pretratamiento con ALLN mantuvo una viabilidad neuronal del 80%, en comparación con los controles, evitando la disminución del 50% inducida por C2Cer (Figura 39c). Estos resultados nos sugirieron que calpaínas y/o catepsinas podrían estar implicadas en la muerte de los FR inducida por C2Cer.

Para discriminar entre la participación de ambas proteasas, primero pre-tratamos los cultivos con diferentes concentraciones de calpeptina, un potente inhibidor de calpaína I y II, antes de la adición de C2Cer. El ensayo de MTT mostró que la pre-incubación con calpeptina 1 μM conservó significativamente la viabilidad neuronal frente al tratamiento con C2Cer (Figura 40a). La calpeptina disminuyó a su vez la picnosis nuclear de los FR en comparación con la observada en cultivos tratados solo con C2Cer (Figura 40b, cabezas de flecha; Figura 40c). Cabe destacar que la neuroprotección con ALLN fue más efectiva que la otorgada por calpeptina.

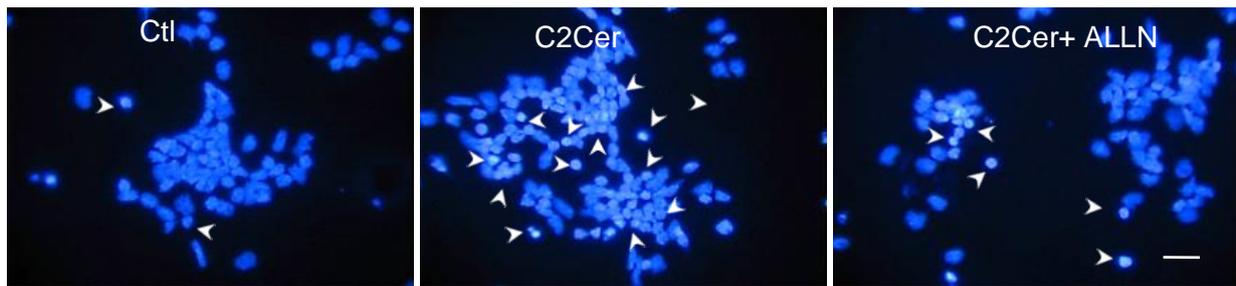
Indagamos entonces si las catepsinas también participaban de la muerte inducida por C2Cer. La inhibición de las catepsinas no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad neuronal. Los ensayos de MTT mostraron que el pretratamiento de los cultivos neuronales con CA-074, un inhibidor selectivo de Catepsina B, en concentraciones 1-10 μM y con Pepstatina A, un inhibidor de proteasas ácidas como la Catepsina D, en concentraciones 5-10 μM no lograron prevenir la reducción de la viabilidad neuronal inducida por C2Cer (Figura 41 a y b).

El ALLN inhibe además el funcionamiento del proteosoma. Aunque esta inhibición ocurre en muy baja proporción ($K_i = 6 \mu\text{M}$), quisimos descartar un posible efecto de este complejo proteico sobre la inducción de muerte mediada por C2Cer. Para ello, pre-incubamos los cultivos durante 1 hora con distintas concentraciones de (R)-MG132, un potente inhibidor de la actividad proteosomal (Miranda et al. 2009), previamente al agregado de C2Cer y evaluamos la viabilidad neuronal por MTT. Los resultados demostraron que el proteosoma no participaría del proceso de muerte, ya que ninguna de las concentraciones evaluadas fue capaz de frenar la muerte (Figura 41c).

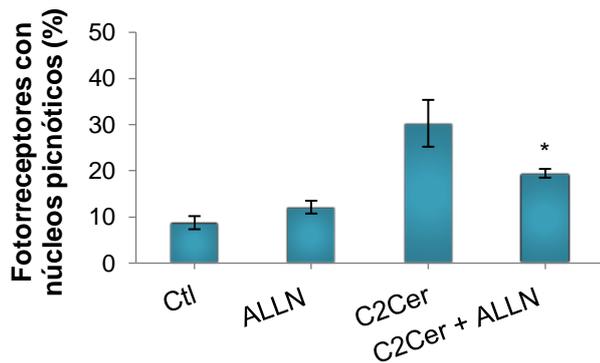
Finalmente, investigamos si PARP-1 y las calpaínas actuaban de forma aditiva o sinérgica para desencadenar la muerte de los FR. Inhibimos simultáneamente la activación de PARP-1 y

calpaína al suplementar los cultivos con PJ34 1 μ M y calpeptina 1 μ M antes del tratamiento con C2Cer. Este tratamiento combinado tuvo el mismo efecto protector que PJ34 y fue solo ligeramente más alto que el de calpeptina (Figura 42). Esto sugiere que PARP-1 y calpaína estarían actuando a través de la misma vía para proteger a los FR de la muerte inducida por C2Cer.

a



b



c

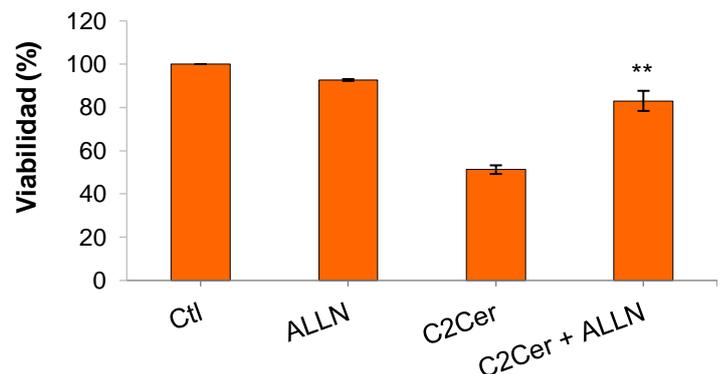


Figura 39. Un inhibidor de calpaínas y catepsinas protegió a los fotorreceptores de la muerte inducida por C2Cer.

Los cultivos se trataron con vehículo o C2Cer después del pretratamiento con ALLN 20 μ M, un inhibidor de calpaínas y catepsinas. Las microfotografías en (a) muestran la marcación nuclear con DAPI de cultivos pre-tratados con ALLN o antes del tratamiento con C2Cer; las cabezas de flecha indican núcleos picnóticos. Barra de escala, 10 μ m. (b) Porcentaje de fotorreceptores (media \pm SEM) con núcleos picnóticos. (c) Porcentaje de viabilidad, comparado con los controles (media \pm SEM) en cultivos pre tratados o no con ALLN, y luego con vehículo o C2Cer. * ($p < 0.05$); ** ($p < 0.01$); diferencias estadísticamente significativas en comparación con la condición C2Cer.

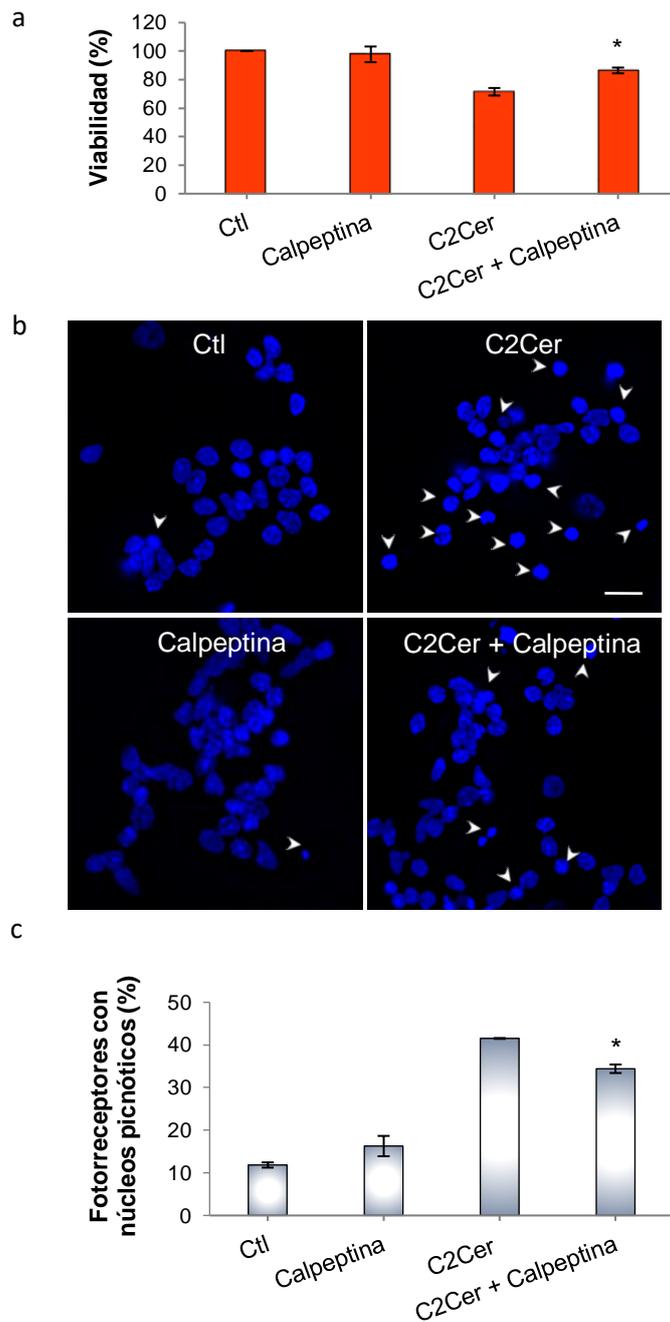


Figura 40. La inhibición selectiva de calpaínas protegió a los fotorreceptores de la muerte inducida por C2Cer.

(a) Las barras muestran el efecto protector de Calpeptina, un inhibidor selectivo de calpaínas, sobre la viabilidad neuronal frente al agregado de C2Cer, mediante ensayos de MTT. La pre-incubación durante 1 hora con Calpeptina 1 μ M redujo significativamente la muerte inducida por C2Cer. (b) Las microfotografías muestran la disminución en el número de fotorreceptores con núcleos picnóticos (cabezas de flecha) al pre-incubar los cultivos con Calpeptina 1 μ M. Barra de escala, 10 μ m (c) Las barras muestran el análisis cuantitativo de la picnosis nuclear en los fotorreceptores.

(*) diferencias estadísticamente significativas respecto a C2Cer ($p < 0,05$).

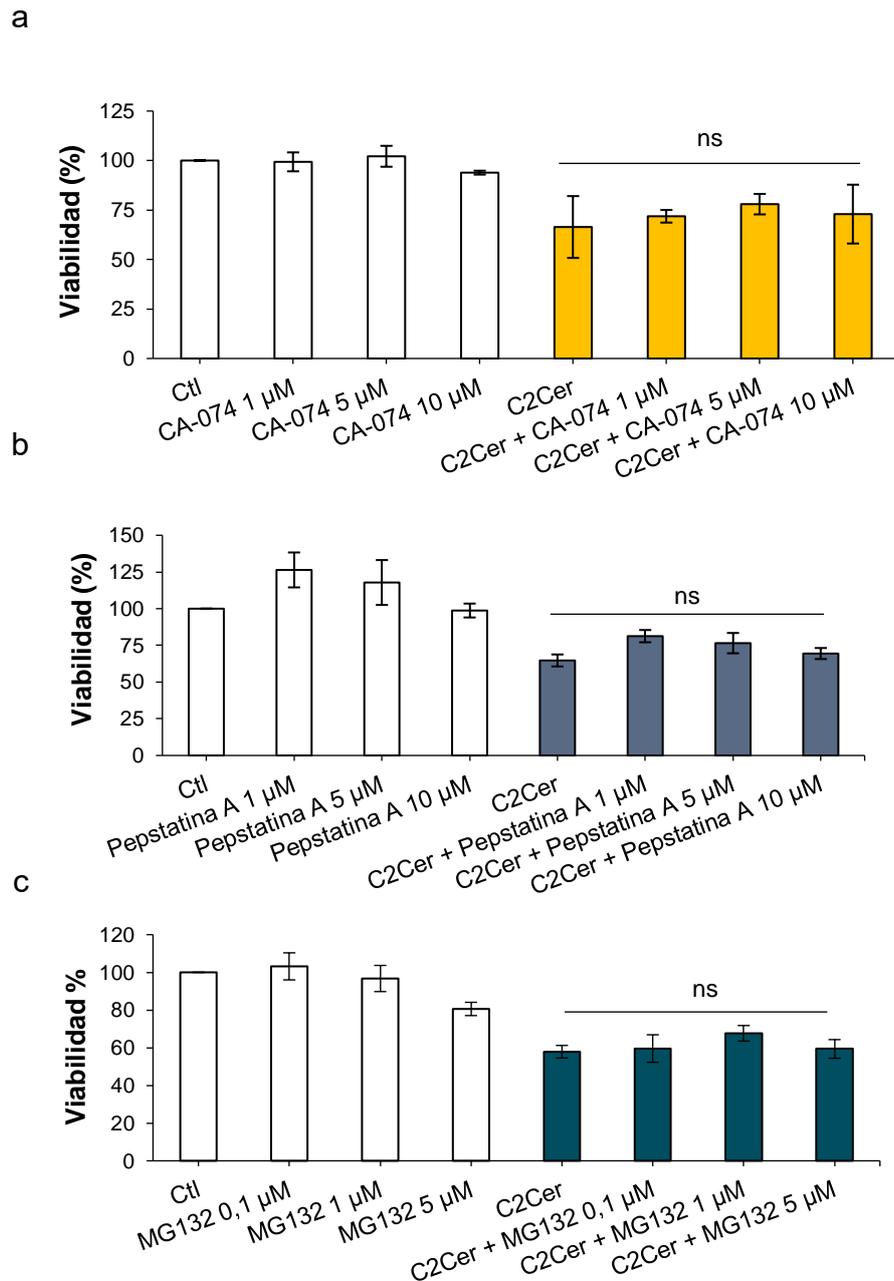


Figura 41. La inhibición de catepsinas o del proteosoma no logró rescatar a los fotorreceptores de la muerte inducida por C2Cer.

Los cultivos se pre trataron o no con diferentes concentraciones de los inhibidores de catepsinas CA-074 (a) o Pepstatina (b) y luego se trataron con vehículo o C2Cer durante 6 h. El posible rol del proteosoma en la muerte inducida por C2Cer se evaluó mediante pre-incubación con distintas concentraciones del inhibidor MG132 (c). Las barras representan el porcentaje de viabilidad (media \pm SEM) en comparación con los controles. ns, diferencias estadísticamente no significativas.

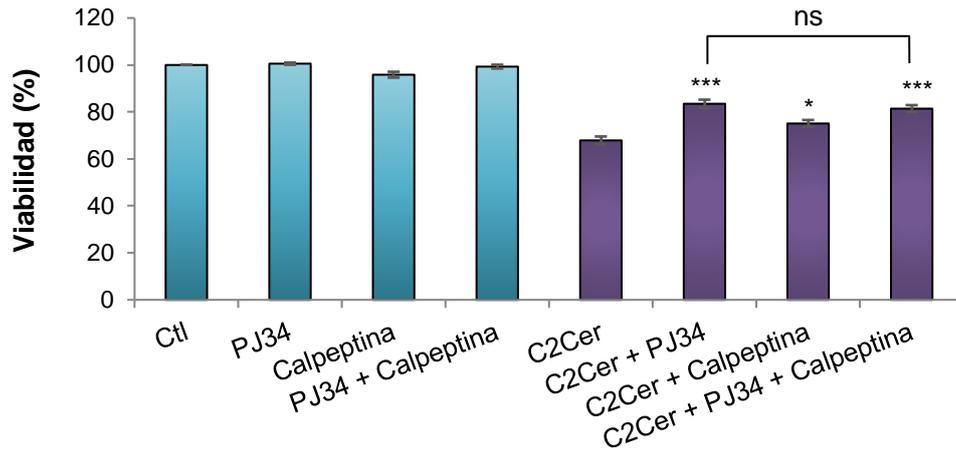


Figura 42. La inhibición conjunta de Calpaínas y PARP-1 no presentó efecto sinérgico de neuroprotección frente a C2Cer.

El gráfico muestra el efecto sobre la viabilidad celular de la pre-incubación por separado y en forma conjunta de Calpeptina y PJ34 frente al agregado (barras violetas) o no (barras celestes) de C2Cer. (*), (***) Diferencias estadísticamente significativas respecto a la condición C2Cer, $p < 0,05$ y $p < 0,001$ respectivamente. ns, sin diferencias estadísticamente significativas.

Las calpaínas mediaron la translocación del AIF al núcleo inducida por C2Cer.

Dado que se ha reportado que las calpaínas clivan el AIF y promueven su translocación, nos preguntamos si participarían también en la translocación del AIF. Para establecerlo, evaluamos el efecto del tratamiento con calpeptina sobre dicha translocación. La colocalización de AIF y TOPRO-3 (cabezas de flecha en la Figura 43a) fue muy evidente en cultivos tratados con C2Cer y disminuyó apreciablemente cuando los cultivos se pre-trataron con calpeptina. El aumento de la colocalización después del tratamiento con C2Cer y su disminución frente al pretratamiento con calpeptina se evidenciaron claramente cuando se analizó el solapamiento entre la marcación de AIF y el marcador nuclear TOPRO-3 en el plano xz (Figura 43b, Merge en tercera y cuarta fila, respectivamente). El análisis cuantitativo confirmó que el pretratamiento con calpeptina redujo significativamente la translocación nuclear de AIF inducida por C2Cer en los FR (Figura 43c).

En conjunto, estos datos sugieren que las calpaínas participaron en la muerte de los FR y en la translocación nuclear de AIF inducidas por C2Cer.

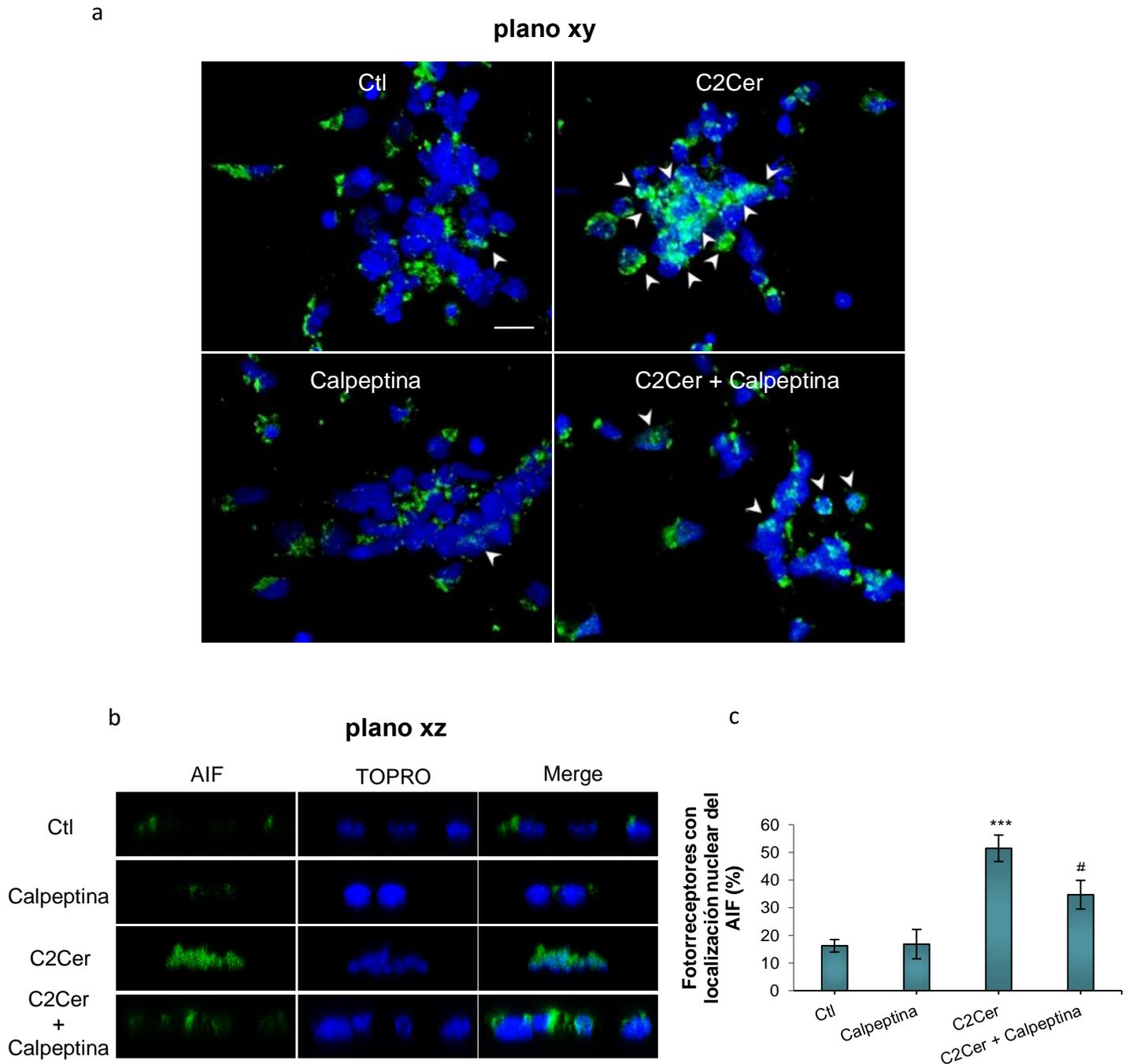


Figura 43. La inhibición de la activación de calpaínas previno la translocación nuclear del AIF inducida por C2Cer.

Los cultivos se pre-trataron o no con calpeptina y luego se trataron con vehículo o C2Cer durante 6 h. (a) Las microfotografías confocales en el plano xy muestran la localización del AIF (verde) en el núcleo, marcado con TOPRO-3 (azul); las cabezas de flecha muestran colocalización de AIF con marca de TOPRO-3. Barra de escala, 10 μ m. (b) Microfotografías confocales en el plano xz muestran la localización nuclear de AIF (columna izquierda, verde), con TOPRO-3 (columna central, azul) y el Merge (columna derecha). (c) Porcentaje de fotorreceptores (media \pm SEM) que muestran la localización nuclear de AIF. * $p < 0.05$, diferencias estadísticamente significativas en comparación con C2Cer.

Ni la necroptosis ni la muerte mediada por Autofagia estuvieron involucradas en el proceso de muerte inducido por C2Cer.

PARP-1 ha sido implicada como un mediador clave en otras vías de muerte caspasa-independientes, como la necroptosis y la autofagia. La necroptosis se caracteriza por la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, como ocurre en la necrosis o muerte catastrófica, pero a diferencia de esta última, lo hace siguiendo un programa orquestado por RIPK1. Al analizar la liberación de LDH, que se produce como consecuencia de la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, encontramos que los valores determinados fueron similares tanto en los controles como en los cultivos tratados por 6 h con C2Cer (Figura 44a). El pretratamiento con necrostatina-1, un potente inhibidor de RIPK1, en concentraciones que variaron de 10 a 100 μM , no redujo la muerte celular inducida por C2Cer (Figura 44b).

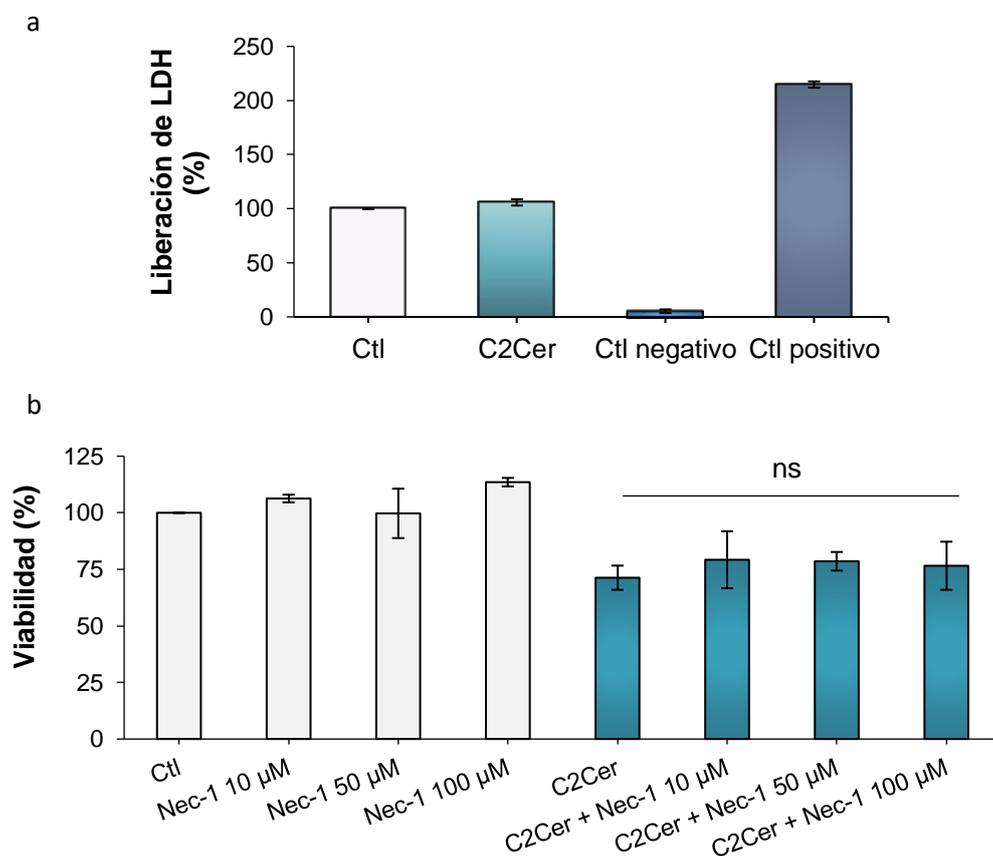


Figura 44. El mecanismo de muerte de los fotorreceptores inducida por C2Cer no involucró a la necroptosis.

(a) Las barras muestran la cuantificación, representando el porcentaje de liberación de LDH en comparación con los controles en cultivos tratados (barra celeste) o no (barra blanca) con C2Cer durante 6 h. Cultivos tratados con peróxido de hidrógeno 350 μM (barra violeta) durante 6 h se usaron como controles positivos, mientras que, como controles negativos, se utilizó medio de cultivo que no tuvo contacto alguno con células (barra roja). (b) Las barras representan el porcentaje de viabilidad en comparación con los controles (media \pm SEM) en cultivos pre tratados con diferentes concentraciones de necrostatina-1 (Nec-1) y luego con vehículo (barras grises) o con C2Cer (barras celestes) por 6 h. ns, diferencias estadísticamente no significativas.

PARP-1 juega papeles duales en la modulación de parthanatos y la autofagia bajo estrés oxidativo (Jiang et al. 2018). La evaluación del posible papel de la autofagia en la muerte de FR inducida por C2Cer mostró que el pretratamiento con 100 a 1000 μ M de 3-MA, un inhibidor temprano de la autofagia, no evitó la muerte celular inducida por C2Cer (Figura 45a). De manera similar, el pretratamiento con Bafilomicina-A1 (0,1-10 nM), otro inhibidor de autofagia, tardío, tampoco logró conservar la viabilidad neuronal después del tratamiento con C2Cer (Figura 45b).

En conjunto, estos resultados implican que ni la necrosis programada ni la autofagia participarían en la muerte de los FR después del tratamiento con C2Cer y la activación de PARP-1.

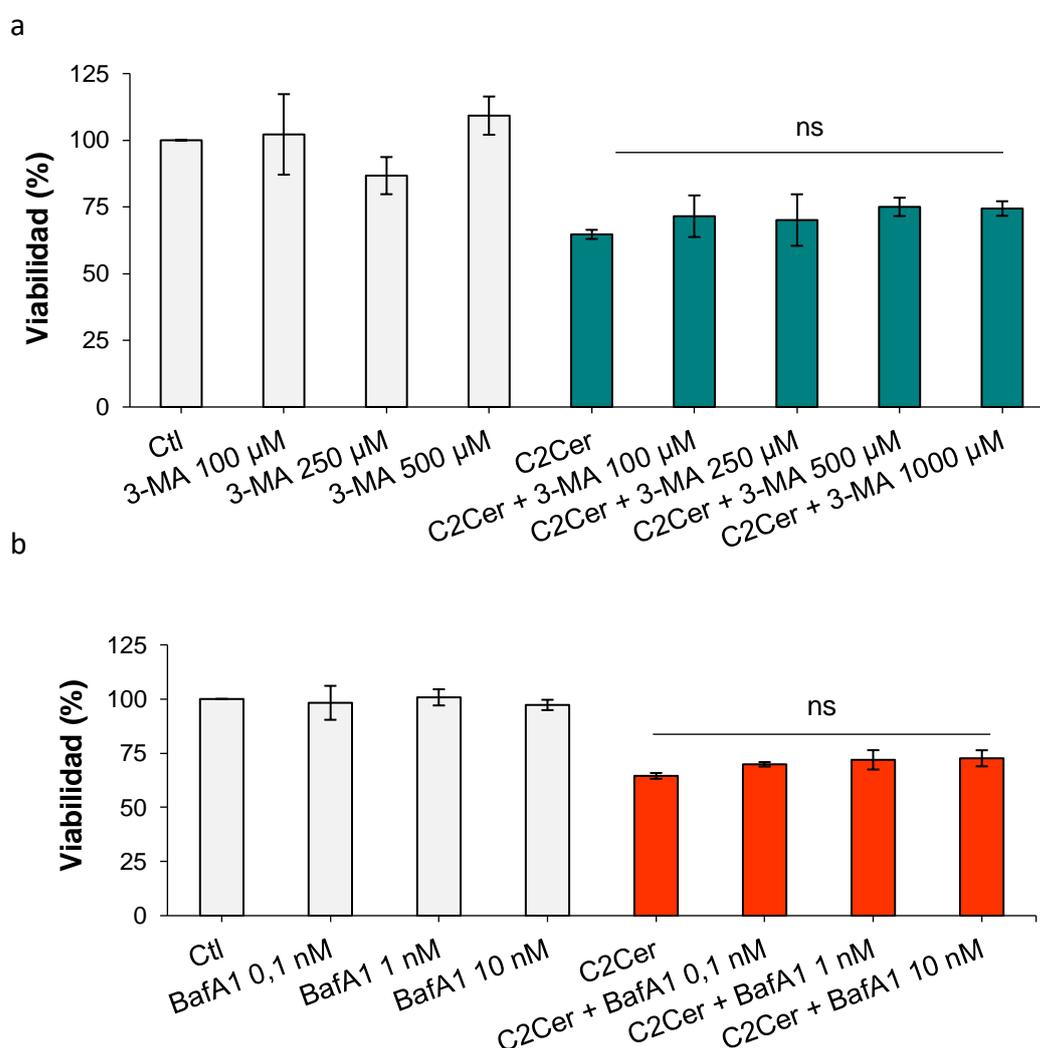


Figura 45. El tratamiento con C2Cer no produjo la activación de muerte mediada por autofagia.

Las barras en (a) y (b) representan el porcentaje de viabilidad en comparación con los controles (media \pm SEM) en cultivos pre tratados con diferentes concentraciones de 3-MA o Bafilomicina 1 (BafA1), respectivamente, y luego tratados con vehículo (barras grises) o con C2Cer (barras celestes en [a] y naranjas en [b]) durante 6 h. ns, diferencias estadísticamente no significativas.

DISCUSION

La acumulación de Cer surge como una característica común durante las degeneraciones retinales con diversas etiologías que conducen finalmente a la muerte de los FR. Sin embargo, las vías que conducen a esta muerte todavía no han sido claramente definidas. Nuestros hallazgos evidencian la existencia de una novedosa vía activada por la Cer en los FR para desencadenar su muerte. Demostramos que, el tratamiento con C2Cer en una concentración 10 μM durante 6 h, indujo la muerte selectiva de FR de retina en cultivo a través de una vía independiente de caspasas. Esta muerte involucró la generación de ROS, activación de PARP-1 con la consecuente acumulación de los PAR, activación de calpaínas, la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y la translocación de AIF, que son las características de una vía de muerte celular recientemente establecida, denominada parthanatos. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que C2Cer provocó la muerte de los FR activando parthanatos como mecanismo de muerte celular.

El conjunto de evidencias en modelos animales de diversas patologías retinianas respalda el papel de la Cer como un mediador clave que desencadena la muerte de los FR. Los niveles de Cer se incrementan en retinas de modelos animales con degeneración retinal; la Cer se acumula durante la degeneración de la retina en un modelo animal de retinitis pigmentosa, y la inhibición de su síntesis retrasa la muerte, tanto de los FR de tipo bastones como en los conos, y preserva la función visual (Piano et al. 2013; Strettoi et al. 2010). El estrés lumínico induce la síntesis *de novo* de Cer y la degeneración de la retina, proceso que cursa con la muerte de los FR, mientras que la prevención de esta síntesis protege la estructura y la función de la retina (Chen et al. 2013). La isquemia provoca un aumento en los niveles de Cer debido a la activación de la esfingomielinasa ácida (ASMase, por sus siglas en inglés) y el daño resultante a la retina se reduce en ratones ASMase +/- (Fan et al., 2016); la Cer se acumula en las primeras etapas durante la degeneración de retinas de rata P23H-1 (Stiles et al. 2016). En un trabajo anterior de nuestro laboratorio se estableció que el estrés oxidativo aumenta la síntesis de Cer en neuronas de retina de rata en cultivo y que un tratamiento de 24 h con C2Cer 10 μM provoca la muerte tanto de los FR como de las neuronas amacrinas (German et al. 2006). En este trabajo de Tesis demostramos que los FR fueron más sensibles que las neuronas amacrinas a la C2Cer; un tratamiento de 6 h con C2Cer 10 μM indujo la muerte selectiva de los FR, mientras que las neuronas amacrinas prácticamente no se vieron afectadas. Esta selectividad nos permitió investigar los mecanismos intracelulares implicados en la inducción de la muerte de los FR mediada por la Cer en cultivo. La C2Cer indujo una rápida y significativa condensación de la cromatina y picnosis nuclear en los FR, y provocó la despolarización de la membrana

mitocondrial. Además, la C2Cer promovió rápidamente la formación de ROS en las neuronas, siendo dicho aumento muy evidente en los FR. Múltiples estudios han demostrado una estrecha conexión entre la muerte celular inducida por la Cer y la pérdida de la función mitocondrial. Un trabajo previo del laboratorio demostró que un tratamiento de 24 h con C2Cer conduce a la despolarización mitocondrial en FR (German et al. 2006). La disfunción mitocondrial está implicada en la muerte inducida por Cer de neuronas corticales y células de neuroblastoma (Stoica et al., 2003; Kim et al., 2007). La Cer aumenta la permeabilidad de la membrana mitocondrial, lo que lleva a la liberación de proteínas mitocondriales pro-apoptóticas como el citocromo c, Omi y AIF, y al colapso del potencial mitocondrial (Colombini 2010; Di Paola, Cocco, and Lorusso 2000; Siskind et al. 2003; Siskind et al. 2002; Stoica et al. 2005). La Cer afecta a su vez a la permeabilidad de la membrana mitocondrial de manera indirecta, promoviendo la translocación de Bax a las mitocondrias (Pettus et al., 2002; Bidère et al., 2003) o actuando sinérgicamente con Bax para permeabilizar la membrana mitocondrial externa (Ganesan et al. 2010). Los primeros estudios realizados *in vitro* mostraron que la Cer inhibe el transporte de electrones e induce la formación de ROS en mitocondrias intactas; la C2Cer inhibe varios complejos de la cadena respiratoria (Gudz et al. 1997; Di Paola et al. 2000) e incrementa la producción de ROS (García-Ruiz et al. 1997). Se ha demostrado recientemente que la C2Cer aumenta la producción de ROS en células de neuroblastoma (Fan et al., 2017).

La permeabilización de las mitocondrias es fundamental para la mayoría de las vías de muerte celular programada. La activación de la vía apoptótica mitocondrial se asocia con frecuencia a la muerte neuronal, e involucra la cascada caspasa-9 / caspasa-3 (Stoica et al., 2003; Falluel-Morel et al., 2004). Las caspasas activadas son responsables de muchas de las características que generalmente definen la muerte celular apoptótica, como la fragmentación del ADN detectada por la técnica de TUNEL, que depende de escisiones en el ADN realizadas por una nucleasa activada por caspasas. Sin embargo, nuestra evidencia sugiere que la activación de las caspasas no estuvo involucrada en la muerte de los FR inducida por la C2Cer. El tratamiento con la C2Cer no aumentó el número de FR TUNEL positivos. A su vez, no se observó aumento en la expresión de caspasa-3 clivada en los FR tratados con C2Cer, lo que implica que esta caspasa no se activó con dicho tratamiento. Además, Zvad-fmk, un pan-inhibidor de caspasas, no fue capaz de impedir la muerte de FR inducida por C2Cer. Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que la Cer promovió la muerte de los FR a través de una vía independiente de caspasas. La participación de las caspasas en la muerte de los FR parece ser dependiente de la edad y de la enfermedad. Las caspasas intervienen en la apoptosis de los FR temprano durante el desarrollo, *in vivo* e *in vitro* (Donovan and Cotter 2002; Donovan, Doonan, and Cotter 2006). Múltiples proteasas están involucradas en la muerte de los FR en modelos animales de degeneración de

la retina. Las caspasas están activas en ratones *rd*, modelo animal de retinitis pigmentosa (Lohr et al. 2006), pero su inhibición no previene la degeneración de los FR (Yoshizawa et al. 2002). Las vías independientes de las caspasas y otras proteasas distintas de las caspasas también tienen un rol activo en la desaparición de los FR durante la degeneración de la retina (Donovan et al., 2002; Lohr et al., 2006; Doonan et al., 2005). Por su parte, diferentes cisteín-proteasas, incluidas las caspasas, se activan durante la muerte de células tipo cono 661W inducida por la Cer (Sanvicens and Cotter 2006).

La activación de PARP-1 se ha convertido en la piedra angular de un modo distintivo de muerte celular caspasa-independiente denominado parthanatos (Galluzzi et al., 2012; Andrabi et al., 2008; Narne et al., 2017). PARP-1 juega roles opuestos en la función celular. Por un lado, tiene un papel vital en la vigilancia y reparación del daño en el ADN, protegiendo las células contra los factores estresantes genotóxicos (Hong, Dawson, and Dawson 2004; Schreiber et al. 2002). Paradójicamente, un gran daño del ADN conduce a una activación excesiva de PARP-1 que finalmente causa la muerte celular. La sobre-activación de PARP-1 provoca la depleción de NAD⁺ y la inhibición de la glucólisis, y el colapso energético resultante conduce a una necrosis regulada (Andrabi et al. 2014; Ying, Garnier, and Swanson 2003). Esta activación excesiva de PARP-1 causa, a su vez, la formación masiva de polímeros PAR, con el consiguiente aumento de la poli-ADP ribosilación de proteínas (PAR-ilación) (Narne et al. 2017) y la acumulación de polímeros PAR en las mitocondrias. Allí, los polímeros de PAR conducen a la despolarización de la membrana mitocondrial a la vez que promueven la liberación y posterior translocación nuclear del AIF (Wang et al., 2009; Baek et al., 2013). La inhibición de PARP-1 fue neuroprotectora para los FR. El pretratamiento con dos inhibidores selectivos de PARP-1, PJ34 y BYK204165 aumentó la viabilidad celular frente al tratamiento con la C2Cer; el PJ34 evitó, además, el aumento de la picnosis nuclear inducido por la C2Cer. El tratamiento con C2Cer aumentó la formación de los polímeros de PAR. A través del análisis por Western Blot e Inmunocitoquímica observamos un rápido aumento en los niveles de proteínas PAR-iladas en los FR *in cultivo* tratados con la C2Cer. En conjunto, estos resultados implican que la C2Cer induce una sobre-activación de PARP-1 y que ésta conduce luego a la muerte de los FR. Se ha demostrado que la inhibición de PARP-1 mejora el daño producido por isquemia-reperfusión en la retina interna (Chiang and Lam 2000), que proporciona una neuroprotección parcial frente a la pérdida de las células ganglionares inducida por NMDA (Goebel and Winkler 2006) y que evita la apoptosis de los FR inducida por la inyección de N-metil-N-nitrosourea en ratas (Miki et al. 2007). El aumento de la actividad de PARP y la PAR-ilación de proteínas están presentes también en las retinas de ratones *rd1* y *rd2*, modelos animales de degeneración de la retina, y la inhibición

de PARP-1 aumenta la supervivencia de los FR en estas retinas (Paquet-Durand et al. 2007; Sahaboglu et al. 2017, 2016).

Como se describió anteriormente, las Ceramidas actúan como árbitros de la muerte celular. Si bien, la C2Cer es ampliamente utilizada en modelos *in vitro* dada su mejor solubilidad y capacidad de difusión a través de las membranas, las características fisicoquímicas de este esfingolípido, y por ende su accionar sobre la inducción de muerte, podrían distar de aquellas Ceramidas naturales, de mayor longitud de cadena. El grupo de la Dra. Rotstein demostró previamente que el estrés oxidativo incrementa la síntesis de [³H]C16-Ceramida y que dicho incremento desencadena la muerte de los FR (German et al., 2006). Nos preguntamos entonces si la adición de C16Ceramide (C16Cer) induciría el mismo mecanismo de muerte que la C2Cer sobre los FR en cultivo. Nuestros resultados demostraron que la C16Cer produjo una disminución en la viabilidad de los FR de manera concentración-dependiente, tras 6 h de agregado y que la pre-incubación con PJ34 1 μ M, al igual que frente a C2Cer, también logró rescatar significativamente a los FR. Estos hallazgos nos sugieren entonces que la inducción de muerte mediada por Ceramidas naturales, como la C16Cer, involucra también la sobre-activación de PARP-1.

Nuestros resultados vinculan por primera vez a la muerte de FR inducida por la Cer con la activación de PARP-1 en estas células. Aunque varios trabajos han demostrado que la Cer induce la escisión de PARP-1 (Spinedi et al. 1998; Flowers et al. 2012; Kota et al. 2013; Xu et al. 2016), la muerte inducida por Cer solo se ha asociado con la activación de PARP-1 seguida de la acumulación de PAR y la liberación de AIF en células de neuroblastoma (Czubowicz and Strosznajder 2014). Por lo tanto, nuestros hallazgos apoyan la inclusión de la activación de PARP-1 entre los mecanismos de muerte celular desencadenados por Cer.

Nuestros resultados también evidenciaron que la activación de PARP-1 provocada por C2Cer condujo a la translocación nuclear del AIF en FR. C2Cer estimuló la liberación del AIF desde las mitocondrias, aumentando su localización en núcleos de FR, y generando picnosis nuclear. La inhibición de PARP-1 impidió notablemente la translocación nuclear de AIF, reduciendo la picnosis nuclear. AIF es una flavoproteína con actividad oxidorreductasa bifuncional, que actúa como un secuestrador de ROS en la fosforilación oxidativa y como una molécula apoptogénica. Anclada a la membrana interna mitocondrial, esta proteína cumple entonces funciones vitales a nivel bioenergético. Distintos daños promueven su clivaje y liberación al citosol seguida de su translocación al núcleo, donde induce la fragmentación a gran escala del ADN y la picnosis nuclear (Susin et al. 1999; Otera et al. 2005). El AIF suele localizarse en los segmentos internos de los FR, que contienen mitocondrias y retículo endoplásmico (Sanges et al. 2006). Se sabe que la sobre-activación de PARP-1 promueve la liberación de AIF desde las mitocondrias y su

subsiguiente translocación nuclear. Los polímeros de PAR, resultado de dicha sobre-activación, difunden desde el núcleo hasta las mitocondrias, donde se unen al AIF y promueven su translocación nuclear (Andrabi et al. 2006; Wang et al. 2011b, 2009; Yu et al. 2006b). El daño excitotóxico induce la formación de ROS, que causa daño al ADN provocando una excesiva activación de PARP-1 y muerte celular mediada por AIF (Wang et al. 2009). De manera similar, el aumento en los niveles de ROS en los FR inducido por la C2Cer podría causar daño al ADN, promoviendo la sobre-activación de PARP-1 y el consiguiente aumento en los polímeros PAR, lo que a su vez conduciría a la translocación del AIF observada, que originaría la posterior picnosis nuclear de los FR (Figura 46). Por lo tanto, la activación de PARP-1 y la translocación de AIF resultante podrían ser los eventos clave que desencadenan una cascada de muerte celular en los FR, actuando como efectores de muerte independiente de caspasa.

Calpaínas y catepsinas también han demostrado participar en la liberación de AIF (Cao et al. 2007; Polster et al. 2005; Yang et al. 2017). Las calpaínas son cisteína proteasas dependientes de calcio que pueden desencadenar vías de muerte celular independientes de las caspasas. Tanto las calpaínas como las catepsinas participan en la muerte de los FR después del tratamiento con Cer o en la retina *rd1* (Sanvicens et al., 2006; Lohr et al., 2006). La inhibición de la actividad de calpaína con ALLN y calpeptina redujo la muerte neuronal inducida por C2Cer, disminuyendo la picnosis nuclear de los FR. La inhibición de calpaína con calpeptina también disminuyó la translocación nuclear del AIF. Esto sugiere que la C2Cer activaría a las calpaínas para inducir la muerte de los FR y esta activación contribuyó a la translocación de AIF. Por el contrario, dos inhibidores de catepsina diferentes no mostraron ningún efecto protector. Cabe destacar que ALLN, un inhibidor de proteasas de amplio espectro que inhibe calpaínas, catepsinas y el proteosoma (Czerwinski et al. 2015) fue más eficaz que la calpeptina en la preservación de la viabilidad de los FR. Esto es consistente con reportes anteriores, que indican que los inhibidores generales de proteasas son más efectivos para evitar la liberación de AIF que aquellos inhibidores más específicos (Yuste et al. 2005), y sugieren que varias cisteína-proteasas podrían participar en el clivaje del AIF. Aunque no podemos descartar la participación de otras proteasas, nuestros datos respaldan la participación de las calpaínas en la liberación de AIF y la posterior muerte de los FR.

La activación secuencial de PARP-1 y calpaínas juega un papel muy importante en la muerte celular programada de tipo necrótica (Moubarak et al. 2007). La evaluación del efecto del tratamiento combinado con un inhibidor de PARP-1 (PJ34) y de calpaína (calpeptina) evidenció la misma protección que la de cualquiera de ellos por sí mismo, sin ningún efecto aditivo o sinérgico. Esto implica que, o PARP-1 se activa antes de la activación de calpaína o que

tanto PARP-1 como calpaína comparten la misma ruta río abajo que conduce a la muerte de los FR (Figura 46).

La Cer ha sido reportada como partícipe en el inicio de la necroptosis y autofagia (Scarlati et al., 2004; Bailey et al., 2017), programas de muerte celular caspasa-independientes en los que la activación de PARP-1 también estaría implicada. La activación secuencial de PARP-1, calpaínas y Bax puede desempeñar un papel en la necrosis programada (Moubarak et al. 2007) y la activación de PARP-1 y la acumulación de polímero PAR se han postulado como reguladores de la necroptosis (Jouan-Lanhouet et al., 2012; Aredia & Scovassi, 2014). La necroptosis conduce a la muerte celular con algunas de las características morfológicas de la necrosis, como la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, mediante la activación de un programa orquestado por RIPK1/3 y generalmente inhibido por la necrostatina, inhibidor selectivo de RIPK1 (Vandenabeele et al. 2010). Nuestros resultados evidencian que la C2Cer no indujo la pérdida de la integridad de la membrana plasmática, según lo determinado por la ausencia de liberación de LDH al medio de cultivo; además, la necrostatina no pudo preservar la viabilidad de los FR, descartando de esta manera a la necrosis programada como un programa de muerte celular activado por C2Cer en los FR en cultivo.

PARP-1 también se ha visto involucrada en la autofagia (Aredia and Scovassi 2014), que, como dijera, generalmente actúa como una vía de protección, orientada a preservar la viabilidad celular en situaciones de estrés como la falta de factores tróficos o de nutrientes. La autofagia podría contribuir a la muerte de los FR inducida por C2Cer o tener un papel protector ante el tratamiento con C2Cer. En este contexto, se ha demostrado un papel dual para PARP-1 en la modulación de parthanatos y la autofagia sobre el estrés oxidativo, activando tanto parthanatos como una autofagia de tipo pro-supervivencia (Jiang et al. 2018). El pretratamiento con 3-MA y Bafilomicina A1, que inhiben la formación de autofagosomas y la fase tardía de la autofagia, respectivamente, no previno ni aumentó la muerte de los FR *in cultivo*. Esto implica que la autofagia no contribuyó a la muerte inducida por la C2Cer ni tuvo un papel protector frente al tratamiento con C2Cer.

En conclusión, nuestros resultados apoyan firmemente un novedoso mecanismo para la muerte de los FR de la retina inducida por la Cer, que implicaría la sobre-activación de PARP-1, aumento de la formación de PAR, activación de calpaínas, posterior liberación del AIF de las mitocondrias y degradación del ADN, con picnosis nuclear. Incluso en ausencia de muerte de los FR, los niveles elevados de Cer y PARP-1 pueden contribuir a acelerar o exacerbar la neuroinflamación (Morris et al. 2017). Por consiguiente, el hallazgo de esta vía desencadenada por la Cer puede ser relevante tanto desde la perspectiva de la patogénesis como en la búsqueda de dianas moleculares para tratar estas enfermedades.

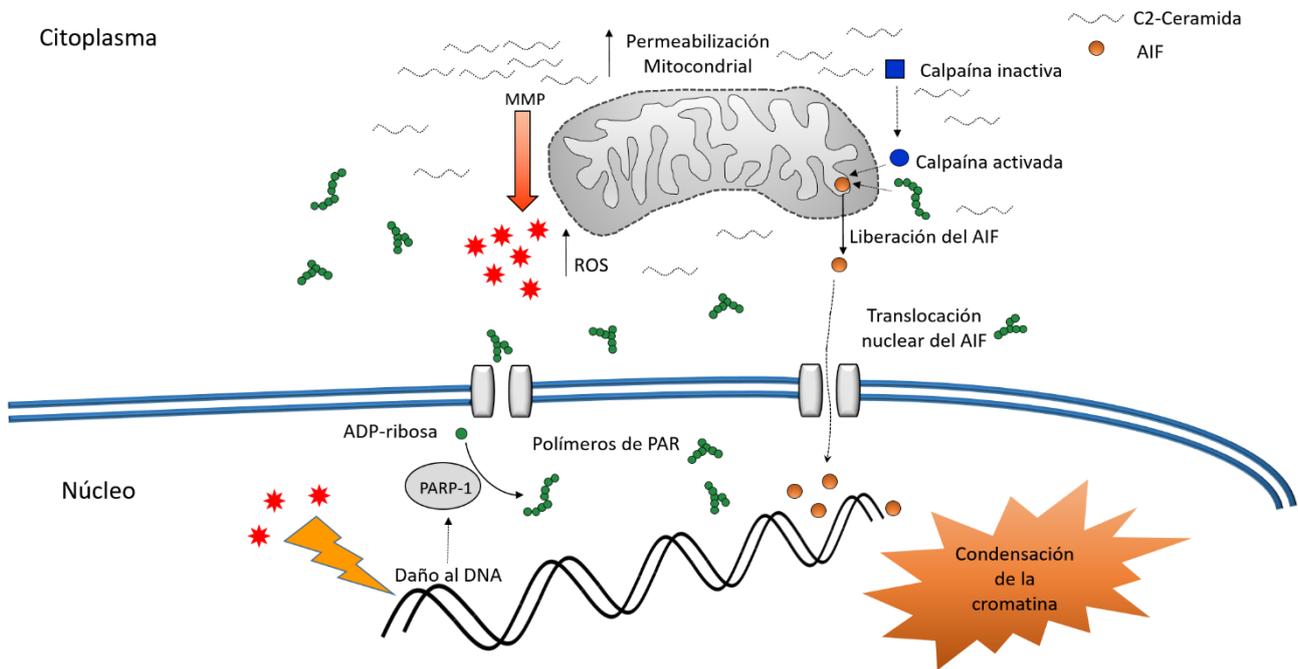


Figura 46. La C2Cer desencadena Parthanatos para inducir una rápida muerte de los fotorreceptores.

C2Cer induce disfunción mitocondrial en los fotorreceptores, lo que incrementa la formación de ROS, que dañan al ADN. Este daño provoca la activación de PARP-1, promoviendo la polimerización de ADP-ribosa, dando como resultado la síntesis excesiva de polímeros de PAR. Estos difunden hacia el citoplasma y de allí ingresan a las mitocondrias, donde pueden afectar aún más la permeabilización de la membrana mitocondrial, disminuyendo el potencial de membrana mitocondrial (MMP) y causando la liberación del AIF. Además, la C2Cer provoca la activación de calpaínas, que también contribuyen a la liberación del AIF. El AIF luego se transloca al núcleo, generando la fragmentación del ADN a gran escala y condensación de la cromatina, eventos que comprometen irreversiblemente la viabilidad de los fotorreceptores, induciendo su muerte.

CONCLUSIONES GENERALES

A continuación, se resumen los principales hallazgos de esta tesis doctoral.

➤ Capítulo I: en este apartado demostramos que:

- La S1P es una señal clave en el proceso migratorio de las CGM.
- Tanto la S1P sintetizada endógenamente como la S1P agregada de manera exógena, estarían involucradas en la migración glial.
- La S1P exógena señala a través de su receptor S1P3, activando intracelularmente las vías de ERK/MAPK y de PI3K.

Los resultados presentados en este capítulo de tesis sugieren un posible enfoque para el tratamiento de las enfermedades proliferativas de la retina, consistente en el bloqueo de la síntesis o la señalización de la S1P en este tejido.

Dichos resultados fueron publicados en la revista *Investigative Ophthalmology & Visual Science* (IOVS):

Simón, M. V., Prado Spalm, F. H., Politi, L. E., & Rotstein, N. P. (2015). Sphingosine-1-phosphate is a crucial signal for migration of retina Müller glial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 56(10), 5808–5815. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-16195>.

➤ En el Capítulo II demostramos que:

- La muerte de los FR inducida por la C2Cer sería de tipo caspasa-independiente.
- Esta muerte celular se caracteriza por generación de núcleos picnóticos con ausencia de fragmentación internucleosomal del ADN, y pérdida de funcionalidad mitocondrial, lo cual conduce a un aumento en los niveles de ROS.
- El aumento en los niveles de estrés oxidativo llevaría a la sobre-activación de PARP-1.
- La inhibición de PARP-1 y de calpaínas protege a los FR de la muerte inducida por C2Cer.
- La inhibición de PARP-1 protege también a los FR de la muerte inducida por una ceramida natural, como la C16-Cer.
- El tratamiento con la C2Cer induce liberación del AIF desde la mitocondria, y su translocación al núcleo, explicando la picnosis nuclear observada.

- Tanto la inhibición de PARP-1 como de calpaínas disminuye la translocación nuclear del AIF, sugiriendo que ambos participarían en su clivaje en la mitocondria.
- Todos estos eventos celulares condicen con el programa de muerte celular denominado Parthanatos y sugieren que la Cer activaría Parthanatos para inducir la muerte de los FR.

La identificación de este proceso de muerte de los FR constituye un hallazgo muy relevante, ya que, si bien requiere de posteriores estudios utilizando modelos *in vivo*, ofrece la identificación de un nuevo blanco molecular en la búsqueda de tratamientos farmacológicos para las enfermedades neurodegenerativas que afectan a la retina.

Estos resultados fueron publicados en la revista *Molecular Neurobiology*:

Prado Spalm, F.H., Vera, M.S., Dibo, M.J., Simon M.V., Politi L.E., Rotstein N.P. Ceramide Induces the Death of Retina Photoreceptors Through Activation of Parthanatos. *Mol Neurobiol* (2018). <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1402-4>.

ABREVIATURAS

AC	Anhidrasa carbónica
ACD	<i>Accidental Cell Death</i> ; muerte celular accidental
AIF	<i>Apoptosis Induction Factor</i> ; factor inductor de la apoptosis
ATG	<i>Autophagy-Related Genes</i> ; genes relacionados con la autofagia
BrdU	Bromo-deoxiuridina
BrdUTP	Bromo-deoxiuridina-trifosfato
BSA	<i>Bovine serum albumin</i> ; albúmina sérica bovina
C16Cer	C16-Ceramida
C1P	Ceramida-1-fosfato
C2Cer	C2-Ceramida
Cer	Ceramida
CGM	Células gliales de Müller
CRALBP	<i>Cellular Retinaldehyde Binding Protein</i> ; Proteína unidora de retinaldehídos celulares
Crx	<i>Cone rod homeobox</i>
DAPI	4'-6-diamino-2-fenilindol
DCF	2',7'-diclorofluoresceína
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> ; Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPR	Epitelio pigmentado de la retina
ER	<i>Endoplasmic reticulum</i> ; retículo endoplásmico
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i> ; Quinasas reguladas por señales extracelulares
FR	Fotorreceptores
GDNF	Glial cell Derived Neurotrophic Factor; Factor neurotrófico derivado de la glía
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> ; Proteína fibrilar ácida de la glía
GS	Glutamina Sintetasa
IP	Ioduro de Propidio
LDH	Lactato Deshidrogenasa
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> ; Proteína Quinasas Activadas por Mitógenos <i>Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization</i> ;
MOMP	Permeabilización de la membrana mitocondrial externa
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

PAR	Polímeros de Poli ADP-ribosa
PARP-1	Poli-ADP ribosil polimerasa-1
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i> ; búfer fosfato salino
PCD	<i>Programmed Cell Death</i> ; muerte celular programada
PDR	Retinopatía de tipo diabética
PF	Paraformaldehído
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i> ; Fosfatidilinositol 3-quinasa
PVR	Retinopatía vítreo-proliferativa
RCD	<i>Regulated Cell Death</i> ; muerte celular regulada
rd	<i>Retinal degeneration</i> ; degeneración retinal
rd1	<i>Retinal degeneration 1</i> ; degeneración retinal tipo 1
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> ; especies reactivas de oxígeno
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
S.E.M	Error estándar de la media
S1P1	Receptor de S1P tipo 1
S1P2	Receptor de S1P tipo 2
S1P3	Receptor de S1P tipo 3
S1PR	Receptores de S1P
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio
Smase	Esfingomielinasa
Sph	Esfingosina
Sphk	Esfingosina quinasa
SphK1	Esfingosina quinasa 1
Sphk2	Esfingosina quinasa-2
Sphk12	Inhibidor de esfingosina quinasa número 2
tdt	<i>Terminal Deoxynucleotide Transferase</i> ; transferasa de desoxinucleótido terminal
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling</i>

BIBLIOGRAFÍA

- Abrahan, Carolina E., M. Fernanda Insua, Luis E. Politi, O. Lorena German, and Nora P. Rotstein. 2009. "Oxidative Stress Promotes Proliferation and Dedifferentiation of Retina Glial Cells in Vitro." *Journal of Neuroscience Research* 87(4):964–77.
- Abrahan, Carolina E., Gisela E. Miranda, Daniela L. Agnolazza, Luis E. Politi, and Nora P. Rotstein. 2010. "Synthesis of Sphingosine Is Essential for Oxidative Stress-Induced Apoptosis of Photoreceptors." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 51(2):1171–80.
- Adada, Mohamad, Daniel Canals, Yusuf A. Hannun, and Lina M. Obeid. 2014. "Sphingolipid Regulation of Ezrin, Radixin, and Moesin Proteins Family: Implications for Cell Dynamics." *Biochimica et Biophysica Acta* 1841(5):727–37.
- Adler, Ruben. 1982. "Regulation of Neurite Growth in Purified Retina Neuronal Cultures: Effects of PNPf, a Substratum-bound, Neurite-promoting Factor." *Journal of Neuroscience Research* 8(2–3):165–77.
- Aits, S. and M. Jaattela. 2013. "Lysosomal Cell Death at a Glance." *Journal of Cell Science* 126(9):1905–12.
- Akagawa, K. and C. J. Barnstable. 1986. "Identification and Characterization of Cell Types in Monolayer Cultures of Rat Retinal Using Monoclonal Antibodies." *Brain Res* 383:110–20.
- Anderson, D. H., C. J. Guérin, P. A. Erickson, W. H. Stern, and S. K. Fisher. 1986. "Morphological Recovery in the Reattached Retina." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 27(2):168–83.
- Ando, Daisuke et al. 2012. "Function and Regulation of Taurine Transport in Müller Cells under Osmotic Stress." *Neurochemistry International* 60(6):597–604.
- Andrabi, S. A. et al. 2006. "Poly(ADP-Ribose) (PAR) Polymer Is a Death Signal." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(48):18308–13.
- Andrabi, Shaida A. et al. 2014. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-Dependent Energy Depletion Occurs through Inhibition of Glycolysis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(28):10209–14.
- Andrabi, Shaida A., Ted M. Dawson, and Valina L. Dawson. 2008. "Mitochondrial and Nuclear Cross Talk in Cell Death: Parthanatos." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147(1):233–41.
- Aredia, Francesca and Anna Ivana Scovassi. 2014. "Involvement of PARPs in Cell Death." *Frontiers in Bioscience (Elite Edition)* 6:308–17.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit. 1998. "Death Receptors: Signaling and Modulation." *Science (New*

- York, N.Y.) 281(5381):1305–8.
- Baek, Seung-Hoon, Ok-Nam Bae, Eun-Kyoung Kim, and Seong-Woon Yu. 2013. “Induction of Mitochondrial Dysfunction by Poly(ADP-Ribose) Polymer: Implication for Neuronal Cell Death.” *Molecules and Cells* 36(3):258–66.
- Bailey, Liane Jennifer, Sruthi Alahari, Andrea Tagliaferro, Martin Post, and Isabella Caniggia. 2017. “Augmented Trophoblast Cell Death in Preeclampsia Can Proceed via Ceramide-Mediated Necroptosis.” *Cell Death & Disease* 8(2):e2590–e2590.
- Vanden Berghe, T. et al. 2010. “Necroptosis, Necrosis and Secondary Necrosis Converge on Similar Cellular Disintegration Features.” *Cell Death and Differentiation* 17(6):922–30.
- Vanden Berghe, Tom, Andreas Linkermann, Sandrine Jouan-Lanhouet, Henning Walczak, and Peter Vandenabeele. 2014. “Regulated Necrosis: The Expanding Network of Non-Apoptotic Cell Death Pathways.” *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(2):135–47.
- Bidère, Nicolas et al. 2003. “Cathepsin D Triggers Bax Activation, Resulting in Selective Apoptosis-Inducing Factor (AIF) Relocation in T Lymphocytes Entering the Early Commitment Phase to Apoptosis.” *The Journal of Biological Chemistry* 278(33):31401–11.
- Bignami, A. and D. Dahl. 1979. “The Radial Glia of Müller in the Rat Retina and Their Response to Injury. An Immunofluorescence Study with Antibodies to the Glial Fibrillary Acidic (GFA) Protein.” *Experimental Eye Research* 28(1):63–69.
- Blaho, Victoria A. and Timothy Hla. 2014. “An Update on the Biology of Sphingosine 1-Phosphate Receptors.” *Journal of Lipid Research* 55(8):1596–1608.
- Boya, Patricia et al. 2003. “Mitochondrial Membrane Permeabilization Is a Critical Step of Lysosome-Initiated Apoptosis Induced by Hydroxychloroquine.” *Oncogene* 22(25):3927–36.
- Bradford, Marion M. 1976. “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical Biochemistry* 72(1–2):248–54.
- Braunger, Barbara M., Cora Demmer, and Ernst R. Tamm. 2014. “Programmed Cell Death During Retinal Development of the Mouse Eye.” Pp. 9–13 in *Advances in experimental medicine and biology*. Vol. 801.
- Bringmann, A. et al. 2006. “Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina.” *Progress in Retinal and Eye Research* 25(4):397–424.
- Bringmann, A., F. Faude, and A. Reichenbach. 1997. “Mammalian Retinal Glial (Müller) Cells Express Large-Conductance Ca(2+)-Activated K⁺ Channels That Are Modulated by Mg²⁺ and PH and Activated by Protein Kinase A.” *Glia* 19(4):311–23.
- Bringmann, A., H. Kuhrt, A. Germer, B. Biedermann, and A. Reichenbach. 1998. “Müller (Glial)

- Cell Development in Vivo and in Retinal Explant Cultures: Morphology and Electrophysiology, and the Effects of Elevated Ammonia." *Journal Fur Hirnforschung* 39(2):193–206.
- Bringmann, A. and A. Reichenbach. 2001. "Role of Muller Cells in Retinal Degenerations." *Frontiers in Bioscience : A Journal and Virtual Library* 6:E72-92.
- Bringmann, Andreas et al. 2006. "Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 25(4):397–424.
- Cao, Guodong et al. 2007. "Critical Role of Calpain I in Mitochondrial Release of Apoptosis-Inducing Factor in Ischemic Neuronal Injury." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 27(35):9278–93.
- Chan, Francis Ka-ming, Kenta Moriwaki, and María José De Rosa. 2013. "Immune Homeostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology." Pp. 65–70 in *Immune Homeostasis: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*. Vol. 979. New York: Springer Science+Business Media.
- Chen, Hui et al. 2013. "Inhibition of de Novo Ceramide Biosynthesis by FTY720 Protects Rat Retina from Light-Induced Degeneration." *Journal of Lipid Research* 54(6):1616–29.
- Chiang, S. K. and T. T. Lam. 2000. "Post-Treatment at 12 or 18 Hours with 3-Aminobenzamide Ameliorates Retinal Ischemia-Reperfusion Damage." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41(10):3210–14.
- Colombini, Marco. 2010. "Ceramide Channels and Their Role in Mitochondria-Mediated Apoptosis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1797(6–7):1239–44.
- Comitato, Antonella, Daniela Sanges, Alessandra Rossi, Marian M. Humphries, and Valeria Marigo. 2014. "Activation of Bax in Three Models of Retinitis Pigmentosa." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 55(6):3555.
- Curcio, Christine A. ;, Kenneth R. ; Sloan, Robert E. ; Kalina, and Anita E. Hendrickson. 1990. "Human Photoreceptor Topography." *The Journal of Comparative Neurology* 292(4):497–523.
- Curtin, Nicola J. and Csaba Szabo. 2013. "Therapeutic Applications of PARP Inhibitors: Anticancer Therapy and Beyond." *Molecular Aspects of Medicine* 34(6):1217–56.
- Czabotar, Peter E., Guillaume Lessene, Andreas Strasser, and Jerry M. Adams. 2014. "Control of Apoptosis by the BCL-2 Protein Family: Implications for Physiology and Therapy." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 15(1):49–63.
- Czerwinski, Andrzej, Channa Basava, Mirosława Dauter, and Zbigniew Dauter. 2015. "Crystal Structure of N-{N-[N-Acetyl-(S)-Leuc-YI]-(S)-Leuc-YI}norleucinal (ALLN), an Inhibitor of Proteasome." *Acta Crystallographica. Section E, Crystallographic Communications* 71(Pt

- 3):254–57.
- Czubowicz, Kinga and Robert Strosznajder. 2014. “Ceramide in the Molecular Mechanisms of Neuronal Cell Death. The Role of Sphingosine-1-Phosphate.” *Molecular Neurobiology* 50(1):26–37.
- Das, G., B. V. Shrivage, and E. H. Baehrecke. 2012. “Regulation and Function of Autophagy during Cell Survival and Cell Death.” *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4(6):a008813–a008813.
- David, Karen Kate, Shaida Ahmad Andrabi, Ted Murray Dawson, and Valina Lynn Dawson. 2009. “Parthanatos, a Messenger of Death.” *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* 14:1116–28.
- Degterev, Alexei et al. 2005. “Chemical Inhibitor of Nonapoptotic Cell Death with Therapeutic Potential for Ischemic Brain Injury.” *Nature Chemical Biology* 1(2):112–19.
- Denton, Donna, Tianqi Xu, and Sharad Kumar. 2015. “Autophagy as a Pro-Death Pathway.” *Immunology and Cell Biology* 93(1):35–42.
- Deter, R. L., P. Baudhuin, and C. De Duve. 1967. “Participation of Lysosomes in Cellular Autophagy Induced in Rat Liver by Glucagon.” *The Journal of Cell Biology* 35(2):C11-6.
- Dickens, Laura S., Ian R. Powley, Michelle A. Hughes, and Marion MacFarlane. 2012. “The ‘complexities’ of Life and Death: Death Receptor Signalling Platforms.” *Experimental Cell Research* 318(11):1269–77.
- Donovan, M. and T. G. Cotter. 2002a. “Caspase-Independent Photoreceptor Apoptosis in Vivo and Differential Expression of Apoptotic Protease Activating Factor-1 and Caspase-3 during Retinal Development.” *Cell Death and Differentiation* 9(11):1220–31.
- Donovan, M. and T. G. Cotter. 2002b. “Caspase-Independent Photoreceptor Apoptosis in Vivo and Differential Expression of Apoptotic Protease Activating Factor-1 and Caspase-3 during Retinal Development.” *Cell Death and Differentiation* 9(11):1220–31.
- Donovan, Maryanne, Francesca Doonan, and Thomas G. Cotter. 2006. “Decreased Expression of Pro-Apoptotic Bcl-2 Family Members during Retinal Development and Differential Sensitivity to Cell Death.” *Developmental Biology* 291(1):154–69.
- Doonan, Francesca, Maryanne Donovan, and Thomas G. Cotter. 2005. “Activation of Multiple Pathways during Photoreceptor Apoptosis in the Rd Mouse.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 46(10):3530–38.
- Dubois-Dauphin, M. et al. 2000. “Early Postnatal Müller Cell Death Leads to Retinal but Not Optic Nerve Degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 Transgenic Mice.” *Neuroscience* 95(1):9–21.
- Elmore, Susan. 2007. “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death.” *Toxicologic Pathology* 35(4):495–516.

- Esche, Mirko et al. 2010. "Signalling of Sphingosine-1-Phosphate in Müller Glial Cells via the S1P/EDG-Family of G-Protein-Coupled Receptors." *Neuroscience Letters* 480(2):101–5.
- Falluel-Morel, Anthony et al. 2004. "Opposite Regulation of the Mitochondrial Apoptotic Pathway by C2-Ceramide and PACAP through a MAP-Kinase-Dependent Mechanism in Cerebellar Granule Cells." *Journal of Neurochemistry* 91(5):1231–43.
- Fan, Chenghe et al. 2017. "Autophagy Inhibits C2-Ceramide-Mediated Cell Death by Decreasing the Reactive Oxygen Species Levels in SH-SY5Y Cells." *Neuroscience Letters* 651:198–206.
- Fan, Jie, Bill X. Wu, and Craig E. Crosson. 2016. "Suppression of Acid Sphingomyelinase Protects the Retina from Ischemic Injury." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 57(10):4476.
- Fawcett, J. W. and R. A. Asher. 1999. "The Glial Scar and Central Nervous System Repair." *Brain Research Bulletin* 49(6):377–91.
- Feldstein, Ariel E., Nathan W. Werneburg, Zhengzheng Li, Steven F. Bronk, and Gregory J. Gores. 2006. "Bax Inhibition Protects against Free Fatty Acid-Induced Lysosomal Permeabilization." *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 290(6):G1339-46.
- Fernandes-Alnemri, Teresa, Gerald Litwack, and Emad S. Alnemri. 1994. "CPP32, a Novel Human Apoptotic Protein with Homology to Caenorhabditis Elegans Cell Death Protein Ced-3 and Mammalian Interleukin-1??-Converting Enzyme." *Journal of Biological Chemistry* 269(49):30761–64.
- Fischer, Iris et al. 2011. "Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine 1-Phosphate Receptor 3 Are Functionally Upregulated on Astrocytes under pro-Inflammatory Conditions." edited by C. Combs. *PLoS One* 6(8):e23905.
- Flowers, Margaret et al. 2012. "C6-Ceramide and Targeted Inhibition of Acid Ceramidase Induce Synergistic Decreases in Breast Cancer Cell Growth." *Breast Cancer Research and Treatment* 133(2):447–58.
- Francke, M. et al. 2001. "Electrophysiology of Rabbit Müller (Glial) Cells in Experimental Retinal Detachment and PVR." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42(5):1072–79.
- French, Kevin J. et al. 2003. "Discovery and Evaluation of Inhibitors of Human Sphingosine Kinase." *Cancer Research* 63(18):5962–69.
- Galluzzi, L. et al. 2012. "Molecular Definitions of Cell Death Subroutines: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012." *Cell Death and Differentiation* 19(1):107–20.
- Galluzzi, Lorenzo et al. 2018. "Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death & Differentiation* 25(3):486–541.

- Galluzzi, Lorenzo, José Manuel Bravo-San Pedro, Oliver Kepp, and Guido Kroemer. 2016. "Regulated Cell Death and Adaptive Stress Responses." *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(11–12):2405–10.
- Ganesan, Vidyaramanan et al. 2010. "Ceramide and Activated Bax Act Synergistically to Permeabilize the Mitochondrial Outer Membrane." *Apoptosis* 15(5):553–62.
- García-Ruiz, C., A. Colell, M. Marí, A. Morales, and J. C. Fernández-Checa. 1997. "Direct Effect of Ceramide on the Mitochondrial Electron Transport Chain Leads to Generation of Reactive Oxygen Species. Role of Mitochondrial Glutathione." *The Journal of Biological Chemistry* 272(17):11369–77.
- Garelli, Andrés, Nora P. Rotstein, and Luis E. Politi. 2006. "Docosahexaenoic Acid Promotes Photoreceptor Differentiation without Altering Crx Expression." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 47(7):3017–27.
- German, Olga L., Gisela E. Miranda, Carolina E. Abraham, and Nora P. Rotstein. 2006. "Ceramide Is a Mediator of Apoptosis in Retina Photoreceptors." 47(4):1658–68.
- Gil, Pilar Rivera, Lukasz Japtok, and Burkhard Kleuser. 2010. "Sphingosine 1-Phosphate Mediates Chemotaxis of Human Primary Fibroblasts via the S1P-Receptor Subtypes S1P1 and S1P3 and Smad-Signalling" edited by M. Kinoshita. *Cytoskeleton* 67(12):773–83.
- Goebel, Dennis J. and Barry S. Winkler. 2006. "Blockade of PARP Activity Attenuates Poly(ADP-Ribosyl)ation but Offers Only Partial Neuroprotection against NMDA-Induced Cell Death in the Rat Retina." *Journal of Neurochemistry* 98(6):1732–45.
- Gonzalez-Cabrera, Pedro J. et al. 2008. "Full Pharmacological Efficacy of a Novel S1P1 Agonist That Does Not Require S1P-like Headgroup Interactions." *Molecular Pharmacology* 74(5):1308–18.
- Goparaju, Sravan K. et al. 2005. "The S1P2 Receptor Negatively Regulates Platelet-Derived Growth Factor-Induced Motility and Proliferation." *Molecular and Cellular Biology* 25(10):4237–49.
- Green, D. R., T. H. Oguin, and J. Martinez. 2016. "The Clearance of Dying Cells: Table for Two." *Cell Death and Differentiation* 23(6):915–26.
- Gudz, T. I., K. Y. Tserng, and C. L. Hoppel. 1997. "Direct Inhibition of Mitochondrial Respiratory Chain Complex III by Cell-Permeable Ceramide." *The Journal of Biological Chemistry* 272(39):24154–58.
- Guidry, Clyde. 2005a. "The Role of Müller Cells in Fibrocontractive Retinal Disorders." *Progress in Retinal and Eye Research* 24(1):75–86.
- Guidry, Clyde. 2005b. "The Role of Müller Cells in Fibrocontractive Retinal Disorders." *Progress in Retinal and Eye Research* 24(1):75–86.

- Hannun, Yusuf A. and Lina M. Obeid. 2008. "Principles of Bioactive Lipid Signalling: Lessons from Sphingolipids." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 9(2):139–50.
- Hartong, Dyonne T., Eliot L. Berson, and Thaddeus P. Dryja. 2006. "Retinitis Pigmentosa." *The Lancet* 368(9549):1795–1809.
- He, Xingxuan, Yu Huang, Bin Li, Cheng Xin Gong, and Edward H. Schuchman. 2010. "Deregulation of Sphingolipid Metabolism in Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 31(3):398–408.
- Heller, Regine et al. 2008. "Overlapping and Distinct Roles for PI3Kbeta and Gamma Isoforms in S1P-Induced Migration of Human and Mouse Endothelial Cells." *Cardiovascular Research* 80(1):96–105.
- Hicks, D. and Y. Courtois. 1990. "The Growth and Behaviour of Rat Retinal Müller Cells in Vitro. 1. An Improved Method for Isolation and Culture." *Experimental Eye Research* 51(2):119–29.
- Hiscott, P., C. Sheridan, R. M. Magee, and I. Grierson. 1999. "Matrix and the Retinal Pigment Epithelium in Proliferative Retinal Disease." *Progress in Retinal and Eye Research* 18(2):167–90.
- Hla, Timothy and Andrew J. Dannenberg. 2012. "Sphingolipid Signaling in Metabolic Disorders." *Cell Metabolism* 16(4):420–34.
- Hobson, J. P. et al. 2001. "Role of the Sphingosine-1-Phosphate Receptor EDG-1 in PDGF-Induced Cell Motility." *Science (New York, N.Y.)* 291(5509):1800–1803.
- Hong, Suk Jin, Ted M. Dawson, and Valina L. Dawson. 2004. "Nuclear and Mitochondrial Conversations in Cell Death: PARP-1 and AIF Signaling." *Trends in Pharmacological Sciences* 25(5):259–64.
- Huang, Chen et al. 2014. "Long-Term Blue Light Exposure Induces RGC-5 Cell Death in Vitro: Involvement of Mitochondria-Dependent Apoptosis, Oxidative Stress, and MAPK Signaling Pathways." *Apoptosis* 19(6):922–32.
- Ikejima, M. et al. 1990. "The Zinc Fingers of Human Poly(ADP-Ribose) Polymerase Are Differentially Required for the Recognition of DNA Breaks and Nicks and the Consequent Enzyme Activation. Other Structures Recognize Intact DNA." *The Journal of Biological Chemistry* 265(35):21907–13.
- Jang, Soyong et al. 2007. "Cytochemical Alterations in the Rat Retina by LPS Administration." *Neurochemical Research* 32(1):1–10.
- Ji, L., G. Zhang, S. Uematsu, Y. Akahori, and Y. Hirabayashi. 1995. "Induction of Apoptotic DNA Fragmentation and Cell Death by Natural Ceramide." *FEBS Letters* 358(2):211–14.
- Jiang, Hong-Yan et al. 2018. "The Dual Role of Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 in Modulating Parthanatos and Autophagy under Oxidative Stress in Rat Cochlear Marginal Cells of the

- Stria Vascularis." *Redox Biology* 14:361–70.
- Jordán, J. et al. 1997. "P53 Expression Induces Apoptosis in Hippocampal Pyramidal Neuron Cultures." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 17(4):1397–1405.
- Jouan-Lanhouet, S. et al. 2012. "TRAIL Induces Necroptosis Involving RIPK1/RIPK3-Dependent PARP-1 Activation." *Cell Death & Differentiation* 19(12):2003–14.
- Kerr, J. F., A. H. Wyllie, and A. R. Currie. 1972. "Apoptosis: A Basic Biological Phenomenon with Wide-Ranging Implications in Tissue Kinetics." *British Journal of Cancer* 26(4):239–57.
- Kim, Eun-Sook et al. 2011. "Sphingosine 1-Phosphate Regulates Matrix Metalloproteinase-9 Expression and Breast Cell Invasion through S1P3-Gαq Coupling." *Journal of Cell Science* 124(Pt 13):2220–30.
- Kim, Nam Hyun, Kyunghoon Kim, Weon Seo Park, Hyeon S. Son, and Youngmee Bae. 2007. "PKB/Akt Inhibits Ceramide-Induced Apoptosis in Neuroblastoma Cells by Blocking Apoptosis-Inducing Factor (AIF) Translocation." *Journal of Cellular Biochemistry* 102(5):1160–70.
- Kitatani, Kazuyuki, Jolanta Idkowiak-Baldys, and Yusuf A. Hannun. 2008. "The Sphingolipid Salvage Pathway in Ceramide Metabolism and Signaling." *Cellular Signalling* 20(6):1010–18.
- Klionsky, Daniel J. 2008. "Autophagy Revisited: A Conversation with Christian de Duve." *Autophagy* 4(6):740–43.
- Koide, Yuuki et al. 2002. "Development of Novel EDG3 Antagonists Using a 3D Database Search and Their Structure–Activity Relationships." *Journal of Medicinal Chemistry* 45(21):4629–38.
- Kong, Yaxian, Hong Wang, Tao Lin, and Shuling Wang. 2014. "Sphingosine-1-Phosphate/S1P Receptors Signaling Modulates Cell Migration in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells." *Mediators of Inflammation* 2014:565369.
- Kota, Venkatesh et al. 2013. "2'-Hydroxy C16-Ceramide Induces Apoptosis-Associated Proteomic Changes in C6 Glioma Cells." *Journal of Proteome Research* 12(10):4366–75.
- Kubista, M., B. Akerman, and B. Nordén. 1987. "Characterization of Interaction between DNA and 4',6-Diamidino-2-Phenylindole by Optical Spectroscopy." *Biochemistry* 26(14):4545–53.
- Kurz, Tino, Alexei Terman, Bertil Gustafsson, and Ulf T. Brunk. 2008. "Lysosomes and Oxidative Stress in Aging and Apoptosis." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1780(11):1291–1303.
- Laemmli, U. K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of

- Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259):680–85.
- Lee, M. J. et al. 2001. "Akt-Mediated Phosphorylation of the G Protein-Coupled Receptor EDG-1 Is Required for Endothelial Cell Chemotaxis." *Molecular Cell* 8(3):693–704.
- Lewis, G. P. and S. K. Fisher. 2000. "Müller Cell Outgrowth after Retinal Detachment: Association with Cone Photoreceptors." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 41(6):1542–45.
- Li, P. et al. 1997. "Cytochrome c and DATP-Dependent Formation of Apaf-1/Caspase-9 Complex Initiates an Apoptotic Protease Cascade." *Cell* 91(4):479–89.
- Liang, Chun Chi; Park, Ann Y;Guan, Jun Lin. 2007. "In Vitro Scratch Assay: A Convenient and Inexpensive Method for Analysis of Cell Migration in Vitro." *Nature Protocols* 2(2):329–33.
- Liu, Y. et al. 2000. "Edg-1, the G Protein-Coupled Receptor for Sphingosine-1-Phosphate, Is Essential for Vascular Maturation." *The Journal of Clinical Investigation* 106(8):951–61.
- Liu, Yang et al. 2013. "Autosis Is a Na⁺,K⁺-ATPase-Regulated Form of Cell Death Triggered by Autophagy-Inducing Peptides, Starvation, and Hypoxia-Ischemia." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110(51):20364–71.
- Lockshin, Richard A. and Carroll M. Williams. 1964. "Programmed Cell Death—II. Endocrine Potentiation of the Breakdown of the Intersegmental Muscles of Silkmoth." *Journal of Insect Physiology* 10(4):643–49.
- Lohr, Heather R., Kannan Kuntchithapautham, Ashish K. Sharma, and Bärbel Rohrer. 2006. "Multiple, Parallel Cellular Suicide Mechanisms Participate in Photoreceptor Cell Death." *Experimental Eye Research* 83(2):380–89.
- Lorenzo, Hans Kristian, Santos A. Susin, Josef Penninger, and Guido Kroemer. 1999. "Apoptosis Inducing Factor (AIF): A Phylogenetically Old, Caspase-Independent Effector of Cell Death." *Cell Death & Differentiation* 6(6):516–24.
- Los, M., S. Wesselborg, and K. Schulze-Osthoff. 1999. "The Role of Caspases in Development, Immunity, and Apoptotic Signal Transduction: Lessons from Knockout Mice." *Immunity* 10(6):629–39.
- Maceyka, Michael, Sergio E. Alvarez, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel. 2008. "Filamin A Links Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 at Lamellipodia to Orchestrate Cell Migration." *Molecular and Cellular Biology* 28(18):5687–97.
- Maceyka, Michael, Shawn G. Payne, Sheldon Milstien, and Sarah Spiegel. 2002. "Sphingosine Kinase, Sphingosine-1-Phosphate, and Apoptosis." *Biochimica et Biophysica Acta* 1585(2–3):193–201.
- Madden, Shane D., Maryanne Donovan, and Thomas G. Cotter. 2007. "Key Apoptosis Regulating Proteins Are Down-Regulated during Postnatal Tissue Development." *The International Journal of Developmental Biology* 51(5):415–23.

- Mann, Ida. 1964. *The Development of the Human Eye*. 3rd ed. London: British Medical Association.
- Miki, Katsuaki, Norihisa Uehara, Nobuaki Shikata, Miyo Matsumura, and Airo Tsubura. 2007. "Poly (ADP-Ribose) Polymerase Inhibitor 3-Aminobenzamide Rescues N-Methyl-N-Nitrosourea-Induced Photoreceptor Cell Apoptosis in Sprague-Dawley Rats through Preservation of Nuclear Factor-KappaB Activity." *Experimental Eye Research* 84(2):285–92.
- Miranda, Gisela E., Carolina E. Abrahan, Luis E. Politi, and Nora P. Rotstein. 2009. "Sphingosine-1-Phosphate Is a Key Regulator of Proliferation and Differentiation in Retina Photoreceptors." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 50(9):4416–28.
- Miranda, Gisela E., Carolina E. Abrahan, Luis E. Politi, and Nora P. Rotstein. 2009. "Sphingosine-1-Phosphate Is a Key Regulator of Proliferation and Differentiation in Retina Photoreceptors." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 50(9):4416–28.
- Morris, G., A. J. Walker, M. Berk, M. Maes, and B. K. Puri. 2017. "Cell Death Pathways: A Novel Therapeutic Approach for Neuroscientists." *Molecular Neurobiology* 55(7):5767–86.
- Mosmann, Tim. 1983. "Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays." *Journal of Immunological Methods* 65(1–2):55–63.
- Moubarak, Rana S. et al. 2007. "Sequential Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1, Calpains, and Bax Is Essential in Apoptosis-Inducing Factor-Mediated Programmed Necrosis." *Molecular and Cellular Biology* 27(13):4844–62.
- Narne, Parimala, Vimal Pandey, Praveen Kumar Simhadri, and Prakash Babu Phanithi. 2017. "Poly(ADP-Ribose)Polymerase-1 Hyperactivation in Neurodegenerative Diseases: The Death Knell Tolls for Neurons." *Seminars in Cell & Developmental Biology* 63:154–66.
- Nork, T. M., I. H. Wallow, S. J. Sramek, and G. Anderson. 1987. "Müller's Cell Involvement in Proliferative Diabetic Retinopathy." *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 105(10):1424–29.
- Otera, Hidenori, Shigenori Ohakaya, Zen-Ichiro Nagaura, Naotada Ishihara, and Katsuyoshi Mihara. 2005. "Export of Mitochondrial AIF in Response to Proapoptotic Stimuli Depends on Processing at the Intermembrane Space." *The EMBO Journal* 24(7):1375–86.
- Di Paola, Marco, Tiziana Cocco, and Michele Lorusso. 2000. "Ceramide Interaction with the Respiratory Chain of Heart Mitochondria⁺." *Biochemistry* 39(22):6660–68.
- Paoli, Paolo, Elisa Giannoni, and Paola Chiarugi. 2013. "Anoikis Molecular Pathways and Its Role in Cancer Progression." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1833(12):3481–98.
- Paquet-Durand, F. et al. 2007. "Excessive Activation of Poly(ADP-Ribose) Polymerase Contributes to Inherited Photoreceptor Degeneration in the Retinal Degeneration 1

- Mouse." *Journal of Neuroscience* 27(38):10311–19.
- Paquet-Durand, F. et al. 2014. "How Long Does a Photoreceptor Cell Take to Die? Implications for the Causative Cell Death Mechanisms." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 801:575–81.
- Penninger, Josef M. and Guido Kroemer. 2003. "Mitochondria, AIF and Caspases — Rivaling for Cell Death Execution." *Nature Cell Biology* 5(2):97–99.
- Pettus, Benjamin J., Charles E. Chalfant, and Yusuf A. Hannun. 2002. "Ceramide in Apoptosis: An Overview and Current Perspectives." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1585(2–3):114–25.
- Piano, Ilaria et al. 2013. "Cone Survival and Preservation of Visual Acuity in an Animal Model of Retinal Degeneration." *European Journal of Neuroscience* 37(11):1853–62.
- Poitry-Yamate, C. L., S. Poitry, and M. Tsacopoulos. 1995. "Lactate Released by Müller Glial Cells Is Metabolized by Photoreceptors from Mammalian Retina." *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 15(7 Pt 2):5179–91.
- Politi, L. E., M. Lehar, and R. Adler. 1988. "Development of Neonatal Mouse Retinal Neurons and Photoreceptors in Low Density Cell Culture." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 29(4):534–43.
- Polster, Brian M., Gorka Basañez, Aitor Etxebarria, J. Marie Hardwick, and David G. Nicholls. 2005. "Calpain I Induces Cleavage and Release of Apoptosis-Inducing Factor from Isolated Mitochondria." *The Journal of Biological Chemistry* 280(8):6447–54.
- Pow, D. V and S. R. Robinson. 1994. "Glutamate in Some Retinal Neurons Is Derived Solely from Glia." *Neuroscience* 60(2):355–66.
- Pruett, Sarah T. et al. 2008. "Biodiversity of Sphingoid Bases ("Sphingosines") and Related Amino Alcohols." *Journal of Lipid Research* 49(8):1621–39.
- Qiao, Yanbin et al. 2012. "Sphingosine 1-Phosphate Elicits Proinflammatory Responses in ARPE-19 Cells." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 53(13):8200–8207.
- Ranty, Marie-Laure et al. 2009. "Ceramide Production Associated with Retinal Apoptosis after Retinal Detachment." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv Fur Klinische Und Experimentelle Ophthalmologie* 247(2):215–24.
- Reichenbach, A. et al. 1993. "What Do Retinal Müller (Glial) Cells Do for Their Neuronal 'Small Siblings'?" *Journal of Chemical Neuroanatomy* 6(4):201–13.
- Reichenbach, Andreas and Andreas Bringmann. 2012. "Cell Biology of the Müller Cell." *Retina Fifth Edition* 1(D):415–32.
- Rosen, Hugh and Edward J. Goetzi. 2005. "Sphingosine 1-Phosphate and Its Receptors: An

- Autocrine and Paracrine Network." *Nature Reviews. Immunology* 5(7):560–70.
- Rotstein, N. P. et al. 1997. "Apoptosis of Retinal Photoreceptors during Development in Vitro : Protective Effect of Docosahexaenoic Acid." *Journal of Neurochemistry* 69(2):504–13.
- Rotstein, Nora P., Gisela E. Miranda, Carolina E. Abraham, and O. Lorena German. 2010. "Regulating Survival and Development in the Retina: Key Roles for Simple Sphingolipids." *Journal of Lipid Research* 51(6):1247–62.
- Rotstein, Nora P., Luis E. Politi, O. Lorena German, and Romina Girotti. 2003. "Protective Effect of Docosahexaenoic Acid on Oxidative Stress-Induced Apoptosis of Retina Photoreceptors." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44(5):2252–59.
- Ruchalski, Kathleen et al. 2006. "Distinct Hp70 Domains Mediate Apoptosis-Inducing Factor Release and Nuclear Accumulation." *The Journal of Biological Chemistry* 281(12):7873–80.
- Saddoughi, Sahar A. et al. 2013. "Sphingosine Analogue Drug FTY720 Targets I2PP2A/SET and Mediates Lung Tumour Suppression via Activation of PP2A-RIPK1-Dependent Necroptosis." *EMBO Molecular Medicine* 5(1):105–21.
- Sahaboglu, A. et al. 2013. "Retinitis Pigmentosa: Rapid Neurodegeneration Is Governed by Slow Cell Death Mechanisms." *Cell Death & Disease* 4(2):e488.
- Sahaboglu, Ayse et al. 2016. "Olaparib Significantly Delays Photoreceptor Loss in a Model for Hereditary Retinal Degeneration." *Scientific Reports* 6(1):39537.
- Sahaboglu, Ayse et al. 2017. "Temporal Progression of PARP Activity in the Prph2 Mutant Rd2 Mouse: Neuroprotective Effects of the PARP Inhibitor PJ34" edited by F. Gallyas. *PLOS ONE* 12(7):e0181374.
- Sánchez Campos, Sofía, Guadalupe Rodríguez Diez, Gerardo Martín Oresti, and Gabriela Alejandra Salvador. 2015. "Dopaminergic Neurons Respond to Iron-Induced Oxidative Stress by Modulating Lipid Acylation and Deacylation Cycles." *PLoS ONE* 10(6):1–20.
- Sanges, D., A. Comitato, R. Tammaro, and V. Marigo. 2006. "Apoptosis in Retinal Degeneration Involves Cross-Talk between Apoptosis-Inducing Factor (AIF) and Caspase-12 and Is Blocked by Calpain Inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(46):17366–71.
- Sanvicens, Nuria and Thomas G. Cotter. 2006. "Ceramide Is the Key Mediator of Oxidative Stress-Induced Apoptosis in Retinal Photoreceptor Cells." *Journal of Neurochemistry* 98(5):1432–44.
- Scarlatti, Francesca et al. 2004. "Ceramide-Mediated Macroautophagy Involves Inhibition of Protein Kinase B and up-Regulation of Beclin 1." *The Journal of Biological Chemistry* 279(18):18384–91.
- Schreiber, Valérie et al. 2002. "Poly(ADP-Ribose) Polymerase-2 (PARP-2) Is Required for Efficient

- Base Excision DNA Repair in Association with PARP-1 and XRCC1." *The Journal of Biological Chemistry* 277(25):23028–36.
- Schütte, M. and P. Werner. 1998. "Redistribution of Glutathione in the Ischemic Rat Retina." *Neuroscience Letters* 246(1):53–56.
- Schweichel, J. U. and H. J. Merker. 1973. "The Morphology of Various Types of Cell Death in Prenatal Tissues." *Teratology* 7(3):253–66.
- Sims, Kacee et al. 2010. "Kdo2-Lipid A, a TLR4-Specific Agonist, Induces de Novo Sphingolipid Biosynthesis in RAW264.7 Macrophages, Which Is Essential for Induction of Autophagy." *The Journal of Biological Chemistry* 285(49):38568–79.
- Siskind, Leah J., Amirparviz Davoody, Naomi Lewin, Stephanie Marshall, and Marco Colombini. 2003. "Enlargement and Contracture of C2-Ceramide Channels." *Biophysical Journal* 85(3):1560–75.
- Siskind, Leah J., Richard N. Kolesnick, and Marco Colombini. 2002. "Ceramide Channels Increase the Permeability of the Mitochondrial Outer Membrane to Small Proteins." *The Journal of Biological Chemistry* 277(30):26796–803.
- Sizova, Olga S., Vishal M. Shinde, Austin R. Lenox, and Marina S. Gorbatyuk. 2014. "Modulation of Cellular Signaling Pathways in P23H Rhodopsin Photoreceptors." *Cellular Signalling* 26(4):665–72.
- Smulson, M. E. et al. 2000. "Roles of Poly(ADP-Ribosyl)ation and PARP in Apoptosis, DNA Repair, Genomic Stability and Functions of P53 and E2F-1." *Advances in Enzyme Regulation* 40:183–215.
- Spiegel, Sarah and Sheldon Milstien. 2003. "Sphingosine-1-Phosphate: An Enigmatic Signalling Lipid." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4(5):397–407.
- Spinedi, A., A. Amendola, S. Di Bartolomeo, and M. Piacentini. 1998. "Ceramide-Induced Apoptosis Is Mediated by Caspase Activation Independently from Retinoblastoma Protein Post-Translational Modification." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 243(3):852–57.
- Sterin-Speziale, N. Leocata Nieto F. 2007. "Los Esfingolípidos En La Muerte y Proliferación Celular N." *Revista Química Viva* 3:112–33.
- Stiles, Megan et al. 2016. "Sphingolipid Profile Alters in Retinal Dystrophic P23H-1 Rats and Systemic FTY720 Can Delay Retinal Degeneration." *Journal of Lipid Research* 57(5):818–31.
- Stoica, Bogdan A., Vilen A. Movsesyan, Susan M. Knoblach, and Alan I. Faden. 2005. "Ceramide Induces Neuronal Apoptosis through Mitogen-Activated Protein Kinases and Causes Release of Multiple Mitochondrial Proteins." *Molecular and Cellular Neurosciences* 29(3):355–71.

- Stoica, Bogdan A., Vilen A. Movsesyan, Paul M. Lea, and Alan I. Faden. 2003. "Ceramide-Induced Neuronal Apoptosis Is Associated with Dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and Induction of the Mitochondrial-Dependent Intrinsic Caspase Pathway." *Molecular and Cellular Neurosciences* 22(3):365–82.
- Stone, J. et al. 1999. "Mechanisms of Photoreceptor Death and Survival in Mammalian Retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 18(6):689–735.
- Strettoi, Enrica et al. 2010. "Inhibition of Ceramide Biosynthesis Preserves Photoreceptor Structure and Function in a Mouse Model of Retinitis Pigmentosa." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(43):18706–11.
- Strub, Graham M. ;, Michael ;. Maceyka, Nitai C. ;. Hait, Sheldon ;. Milstien, and Sarah Spiegel. 2010. "Extracellular and Intracellular Actions of Sphingosine-1-Phosphate." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 688:141–55.
- Susin, Santos A. et al. 1999. "Molecular Characterization of Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor." *Nature* 397(6718):441–46.
- Swaney, James S., Kelli M. Moreno, Angela M. Gentile, Roger A. Sabbadini, and Glenn L. Stoller. 2008. "Sphingosine-1-Phosphate (S1P) Is a Novel Fibrotic Mediator in the Eye." *Experimental Eye Research* 87(4):367–75.
- Tackenberg, Mark A. et al. 2009. "Müller Cell Activation, Proliferation and Migration Following Laser Injury." *Molecular Vision* 15:1886–96.
- Taha, Tarek A., Kelly M. Argraves, and Lina M. Obeid. 2004. "Sphingosine-1-Phosphate Receptors: Receptor Specificity versus Functional Redundancy." *Biochimica et Biophysica Acta* 1682(1–3):48–55.
- Tait, Stephen W. G. and Douglas R. Green. 2010. "Mitochondria and Cell Death: Outer Membrane Permeabilization and Beyond." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11(9):621–32.
- La Vail, M. M. 1976. "Survival of Some Photoreceptor Cells in Albino Rats Following Long-Term Exposure to Continuous Light." *Investigative Ophthalmology* 15(1):64–70.
- Vandenabeele, Peter, Lorenzo Galluzzi, Tom Vanden Berghe, and Guido Kroemer. 2010. "Molecular Mechanisms of Necroptosis: An Ordered Cellular Explosion." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11(10):700–714.
- Wang, Huayi et al. 2014. "Mixed Lineage Kinase Domain-like Protein MLKL Causes Necrotic Membrane Disruption upon Phosphorylation by RIP3." *Molecular Cell* 54(1):133–46.
- Wang, Yingfei et al. 2011a. "Poly(ADP-Ribose) (PAR) Binding to Apoptosis-Inducing Factor Is Critical for PAR Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos)." *Science Signaling* 4(167):ra20.

- Wang, Yingfei et al. 2011b. "Poly(ADP-Ribose) (PAR) Binding to Apoptosis-Inducing Factor Is Critical for PAR Polymerase-1-Dependent Cell Death (Parthanatos)." *Science Signaling* 4(167):ra20.
- Wang, Yingfei, Valina L. Dawson, and Ted M. Dawson. 2009. "Poly(ADP-Ribose) Signals to Mitochondrial AIF: A Key Event in Parthanatos." *Experimental Neurology* 218(2):193–202.
- Wickham, Louisa, Geoffrey P. Lewis, David G. Charteris, and Steven K. Fisher. 2012. *Cellular Effects of Detachment and Reattachment on the Neural Retina and the Retinal Pigment Epithelium*. Vol. 1. Fifth Edit. Elsevier Inc.
- Willbold, E., J. Berger, M. Reinicke, and H. Wolburg. 1997. "On the Role of Müller Glia Cells in Histogenesis: Only Retinal Spheroids, but Not Tectal, Telencephalic and Cerebellar Spheroids Develop Histotypical Patterns." *Journal Fur Hirnforschung* 38(3):383–96.
- Xie, Bing et al. 2009. "Blockade of Sphingosine-1-Phosphate Reduces Macrophage Influx and Retinal and Choroidal Neovascularization." *Journal of Cellular Physiology* 218(1):192–98.
- Xu, Ruijuan et al. 2016. "Alkaline Ceramidase 2 and Its Bioactive Product Sphingosine Are Novel Regulators of the DNA Damage Response." *Oncotarget* 7(14):18440–57.
- Xu, Zhenfeng et al. 2010. "Endonuclease G Does Not Play an Obligatory Role in Poly(ADP-Ribose) Polymerase-Dependent Cell Death after Transient Focal Cerebral Ischemia." *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 299(1):R215–21.
- Yang, Qinghui et al. 2017. "Caspase-Independent Pathway Is Related to Nilotinib Cytotoxicity in Cultured Cardiomyocytes." *Cellular Physiology and Biochemistry : International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology* 42(6):2182–93.
- Yasuhara, Takao, Tetsuro Shingo, and Isao Date. 2004. "The Potential Role of Vascular Endothelial Growth Factor in the Central Nervous System." *Reviews in the Neurosciences* 15(4):293–307.
- Ying, Weihai, Philippe Garnier, and Raymond A. Swanson. 2003. "NAD⁺ Repletion Prevents PARP-1-Induced Glycolytic Blockade and Cell Death in Cultured Mouse Astrocytes." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 308(4):809–13.
- Yoshizawa, Katsuhiko et al. 2002. "Caspase-3 Inhibitor Transiently Delays Inherited Retinal Degeneration in C3H Mice Carrying the Rd Gene." *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 240(3):214–19.
- Young, Megan M., Mark Kester, and Hong-Gang Wang. 2013. "Sphingolipids: Regulators of Crosstalk between Apoptosis and Autophagy." *Journal of Lipid Research* 54(1):5–19.
- Yu, Seong-Woon et al. 2006a. "Apoptosis-Inducing Factor Mediates Poly(ADP-Ribose) (PAR) Polymer-Induced Cell Death." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48):18314–19.

- Yu, Seong-Woon et al. 2006b. "Apoptosis-Inducing Factor Mediates Poly(ADP-Ribose) (PAR) Polymer-Induced Cell Death." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(48):18314–19.
- Yuste, V. J. et al. 2005. "Cysteine Protease Inhibition Prevents Mitochondrial Apoptosis-Inducing Factor (AIF) Release." *Cell Death and Differentiation* 12(11):1445–48.
- Zhang, J., V. L. Dawson, T. M. Dawson, and S. H. Snyder. 1994. "Nitric Oxide Activation of Poly(ADP-Ribose) Synthetase in Neurotoxicity." *Science (New York, N.Y.)* 263(5147):687–89.
- Zhao, Chenqi et al. 2008. "Specific and Overlapping Sphingosine-1-Phosphate Receptor Functions in Human Synoviocytes: Impact of TNF-Alpha." *Journal of Lipid Research* 49(11):2323–37.