



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

**TESIS
DOCTORAL EN BIOQUÍMICA**



“La vía de la fosfolipasa D en las células del epitelio pigmentario de la retina: su rol en la patogénesis de la retinopatía diabética y otras enfermedades inflamatorias de la retina”

PAULA ESTEFANÍA TENCONI

Bahía Blanca

Argentina


2019

Directora: Dra. Melina Valeria Mateos

Codirectora: Dra. Norma María Giusto

PREFACIO

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar 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 Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) dependiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Universidad Nacional del Sur (UNS), durante el período comprendido entre 8 de septiembre 2015 y 25 de noviembre de 2019, bajo la dirección de la Dra. Melina Valeria Mateos, Profesora Adjunta de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Adjunta del CONICET, y bajo la codirección de la Dra. Norma María Giusto, Profesora Emérita de la Universidad Nacional del Sur e Investigadora Emérita del CONICET.

	<p>UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR Secretaría General de Posgrado y Educación Continua</p> <p>La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de(.....)</p>
--	--

25 de noviembre de 2019

Paula Estefanía Tenconi

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

A MÍOS PAPIIS Y HERMANOS.

A JUANMA Y A MÍ UMA

A MÍOS AMADOS NONEITORS

AGRADECIMIENTOS

A la mamá de Lean, la Dra. Melina Mateos, mi directora de tesis. Le agradezco por haberme dedicado muchas horas de trabajo en mi formación doctoral trabajando a la par en la mesada transmitiéndome sus amplios conocimientos en cultivo celular, entre otros. Ella de manera generosa y amable me incorporó en su grupo de trabajo y me brindó la oportunidad de poder concretar esta meta con Uma en mis brazos. Por su compromiso con este proyecto de tesis, por todo el tiempo dedicado a las correcciones y finales mejorías de la tesis. Gracias por brindarme tu apoyo Meli y dejarme pertenecer a tu grupo de investigación.

A mi codirectora de tesis, la Dra. Norma Giusto, por transmitirme su amplio conocimiento y por su confianza al convocarme para realizar el doctorado en su tan querido grupo de trabajo.

A ambas gracias por ser, por sobre todas las cosas, tan buena gente y excelentes profesionales, que incentivan a seguir adelante. Muchas gracias a las dos por la formación profesional recibida y por haberme brindado la oportunidad de ir a congresos y cursos en el transcurso de mi doctorado.

A la Dra. Gabriela Salvador gracias por transmitirme su conocimiento en PLD, PKC y en el cuidado de los animales de laboratorio y por su tiempo en la discusión de los resultados de las publicaciones que se originaron de esta tesis.

Al Dr. Martín Oresti, por su compromiso, conocimiento, paciencia y valiosa ayuda para realizar la técnica de qPCR, así como también por sus correcciones en la metodología de qPCR

A las Dras. Melina Mateos y Sofia Vallés por transmitirme conocimientos de Farmacología y acompañarme en el camino de la docencia.

A las investigadoras Dra. Pascual y Dra. Gaveglio, gracias por transmitirme su conocimiento tan sencillamente. Estefi2 gracias por acompañarme en los cursos de doctorado que permitieron, entre otras cosas, el intercambio cultural. Al Dr. Vicente Bermúdez por asistirme en la microscopia de fluorescencia y a la Dra. Susana Pasquaré por transmitirme su conocimiento en lípidos y el sistema endocannabinoide. Todos

ellos, junto con las Dras. Melina Mateos y Giusto son los mejores compañeros de laboratorio que hicieron que el trabajo de estos 5 años sea tan agradable y sencillo.

A Viviana Soler por su amplio conocimiento en gramática que aportaron a esta tesis las formas correctas de escritura tanto en inglés como en español.

A la UNS, al INIBIBB, a la ANPCyT y al CONICET, les agradezco por facilitarme las instalaciones y los medios necesarios para realizar esta tesis y formarme profesionalmente.

A Juanma, mi gran amigo y compañero de la vida, agradezco el aguante y la contención en la vida y en el transcurso del doctorado.

A mi gran familia, sobre todo a mis papas por enseñarme a perseverar y seguir siempre adelante frente a las adversidades, por confiar en mi y dejarme arriesgar siempre a hacer lo que me gusta. A mis hermanos, Lucas y Guille, siempre curiosos por saber que estoy haciendo, los adoro y admiro, siempre presentes.

A mis suegros (Moni y Richard), a mi cuñado (Juani) y a las cuñadas (Euge, Laura, Leo y Mari) y a los más peques de la familia que tanta alegría me dan Tiziano Tenconi y Paloma Carbó. A mis súper noneitors (Fede y Rafaela) y abuelos (Mario y Angelita).

En especial a mi tío el Dr. Raúl Miranda, por transmitirme siempre su valioso conocimiento e incentivar me en el doctorado.

A las abuelas de Uma por los cuidados que recibió para poder lograr finalizar el doctorado.

Y también a mis grandes amigos de fierro Guada, Inés, Pau, Eri, Vane, y Georgi y las chikis.

A toda la gente que quiero y que le hace feliz que finalice esta etapa.

Gracias a todos los miembros del INIBIBB que hicieron mi estadía del doctorado un placer.

Gracias a todos los docentes que me formaron desde la escuela primaria y hasta Universidad. Gracias por la educación libre y gratuita.

INDICE TEMÁTICO

INDICE TEMÁTICO

RESUMEN.....	6
ABSTRACT.....	8
INTRODUCCIÓN	10
1. La retina.....	11
2. Características y funciones del epitelio pigmentario de la retina humana.....	15
3. El proceso inflamatorio en enfermedades degenerativas de la retina.....	17
4. Mecanismos moleculares involucrados en la fisiopatología de la Retinopatía Diabética (RD)	20
5. La vía de la fosfolipasa D (PLD).....	26
HIPÓTESIS	32
OBJETIVOS	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
MATERIALES.....	37
1. Reactivos, anticuerpos y primers utilizados.....	39
2. MÉTODOS.....	41
2.1. Líneas celulares utilizadas.....	41
2.1.1. Línea celular ARPE-19.....	41
2.1.2. Línea celular D407.....	42
2.2. Condiciones de cultivo.....	42
2.3. Modelo inflamatorio inducido por LPS.....	43
2.4. Modelo de injuria celular inducido por altas concentraciones de glucosa (HG).....	43
2.5. Ensayos de viabilidad celular.....	45
2.6. Medición de la generación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	46
2.7. Medición de la actividad de PLD.....	46
2.8. Análisis lipídico.....	47
2.8.1. Extracción de los lípidos.....	47
2.8.2. Resolución del PEth por TLC.....	48
2.8.3. Medición de la radioactividad por centelleo líquido.....	50

2.9. <i>Análisis de expresión de proteínas</i>	50
2.9.1. <i>Extracción de proteínas</i>	50
2.9.2. <i>Ensayos de Western Blot (WB)</i>	50
2.9.2.1. <i>Electroforesis en geles de poliacrilamida- dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE)</i>	50
2.9.2.2. <i>Transferencia de las proteínas a las membranas de PVDF</i>	51
2.9.2.3. <i>Tratamiento de las membranas: bloqueo e incubaciones con anticuerpos</i>	51
2.9.2.4. <i>Detección de Inmunoreactividad</i>	51
2.10. <i>Fraccionamiento subcelular</i>	52
2.11. <i>Ensayos de inmunocitoquímica (ICQ)</i>	53
2.12. <i>Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real (qPCR)</i>	54
2.12.1 <i>Extracción de ARN</i>	54
2.12.2. <i>Transcripción reversa (RT)</i>	55
2.12.3. <i>qPCR</i>	55
2.12.4. <i>Análisis de los datos obtenidos de la qPCR</i>	56
2.13. <i>Determinación de proteínas</i>	57
2.14. <i>Análisis estadísticos de los datos experimentales</i>	57
RESULTADOS.....	58
<i>Capítulo I: “La vía PLD modula la señalización por PKC en las células del EPR expuestas a la injuria inflamatoria”</i>	59
1.1. <i>El LPS induce la fosforilación de las PKCα/βII en las células del EPR</i>	60
1.2. <i>En las células del EPR el LPS induce la translocación a la membrana plasmática de la PKCα en forma dependiente de ambas isoformas clásicas de PLD</i>	63
1.3. <i>La reducción en la viabilidad de las células del EPR inducida por el LPS se ve afectada de manera diferencial por los inhibidores de PKC</i>	63
1.4. <i>El LPS induce la translocación de la PKCϵ a la membrana plasmática en forma dependiente de PLD1 pero independiente de PLD2</i>	66
1.5. <i>La inhibición de la PKCϵ reduce la expresión de Bcl-2 y la activación de Akt</i>	68
1.6. <i>La inhibición de la PKCϵ incrementa la activación de la caspasa-3</i>	69
DISCUSIÓN CAPÍTULO I.....	72
<i>Capítulo II: “La vía PLD modula la respuesta inflamatoria del EPR inducida por altas concentraciones de glucosa”</i>	79

<i>II.1. La exposición a HG incrementa la generación de ROS y la activación de la caspasa-3 y reduce la viabilidad de las células del EPR.....</i>	80
<i>II.2. La exposición a HG modula la activación de ERK1/2 y de PKCα en las células del EPR</i>	85
<i>II.3. La exposición a HG incrementa la actividad PLD en las células del EPR.....</i>	89
<i>II.4. En las células del EPR la activación de ERK1/2 inducida por la HG es dependiente de PLD1 y de PLD2</i>	91
<i>II.5. La HG induce la activación del factor nuclear kappa B (NFκB) en las células del EPR en forma dependiente de PLD1, de PLD2 y de la vía de ERK1/2.....</i>	94
<i>II.6. En las células expuestas a HG la vía PLD modula el incremento en los niveles del ARNm de COX-2, de la interleuquina-6 (IL-6) y de la IL-8</i>	99
<i>II.7. Los inhibidores de PLD1, de PLD2, de la vía de ERK1/2 y de COX-2 previenen la activación de la caspasa-3 y la reducción de la viabilidad celular inducidas por la HG</i>	101
DISCUSIÓN CAPITULO II	103
CONCLUSIONES GENERALES	109
PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTÁ TESIS.....	112
PRESENTACIONES A CONGRESOS.....	113
ABREVIATURAS.....	115
REFERENCIAS.....	120
ÍNDICE DE FIGURAS.....	
Figura 1. Estructura de la retina de vertebrados.	15
Figura 2. Esquema de las funciones del EPR.....	17
Figura 3. Esquema de los cambios patológicos observados en la RD.....	21
Figura 4. La vía del polirol	24
Figura 5. Rol del EPR en el desarrollo de la RD.....	26
Figura 6. Regulación de los niveles de DAG y PA por las vías PLD y DAGK	27
Figura 7. Estructura de las isoformas de PLD en mamíferos.	29
Figura 8. Inhibidores farmacológicos de las distintas vías de señalización estudiadas	45
Figura 9. (A) Esquema de las reacciones enzimáticas catalizadas por la vía PLD/LPP. (B) Reacción de transfosfatidilación catalizada por las isoformas clásicas de PLD en presencia de EtOH	47
Figura 10. Esquema de la resolución de PEth por TLC	49
Figura 11. TLC bidimensional para la resolución de PEth.....	49

Figura 12. Protocolo de obtención de fracciones subcelulares.....	53
Figura 13. Fosforilación de PKC α en las células ARPE-19 expuestas a LPS.....	62
Figura 14. Efecto del LPS en la localización subcelular de la PKC α en las células del EPR.....	64
Figura 15. Efecto de la inhibición de la señalización por PKC en la viabilidad de las células del EPR	65
Figura 16. Efecto del LPS en la localización subcelular de la PKC ϵ en las células del EPR.....	67
Figura 17. Localización de la PKC ϵ en la fracción enriquecida en membrana (MEF) obtenida de células ARPE-19 expuestas a injuria inflamatoria.	68
Figura 18. Efecto de la inhibición de PKC en la expresión de Bcl-2 y en la activación de Akt.	69
Figura 19. Efecto del LPS y de la inhibición de PKC ϵ en la activación de la caspasa-3.....	71
Figura 20. Eventos de señalización inducidos por el LPS en las células del EPR	78
Figura 21. Generación de ROS en las células del EPR expuestas a HG	81
Figura 22. Expresión de SOD1 y de PRX en las células ARPE-19 expuestas a HG	82
Figura 23. Efecto de la HG y del Man en la activación de la caspasa-3 y en la viabilidad de las células ARPE-19.	84
Figura 24. Activación de ERK1/2 en las células ARPE-19 expuestas a HG y a Man.....	86
Figura 25. Translocación nuclear de ERK1/2 en las células ARPE-19 expuestas a HG y a Man.	87
Figura 26. Fosforilación de PKC α/β II en las células ARPE-19 expuestas a HG	88
Figura 27. Localización subcelular de la PKC α en las células ARPE-19 expuestas a HG y a Man.	89
Figura 28. Actividad y expresión de las PLD clásicas en las células ARPE-19 expuestas a HG.....	91
Figura 29. Rol de PLD1 y de PLD2 en la activación de ERK1/2 inducida por la HG.....	93
Figura 30. Translocación nuclear del NF κ B en las células ARPE-19 expuestas a HG y a Man.	95
Figura 31. Rol de PLD1, de PLD2 y de la vía ERK1/2 en la activación del NF κ B inducida por HG en las células ARPE-19.	96
Figura 32. Rol de PLD1, de PLD2 y de la vía de ERK1/2 en la activación del NF κ B inducida por HG en las células D407.....	97
Figura 33. Rol de PLD1, de PLD2 y de la vía de ERK1/2 en la translocación nuclear del NF κ B en las células ARPE-19 expuestas a HG por 24 h.....	98
Figura 34. Expresión de mediadores de la inflamación en las células ARPE-19 expuestas a HG.	100

Figura 35. Efecto de los inhibidores de PLD1, de PLD2, de la vía de ERK y de COX-2 en la activación de caspasa-3 y en la disminución de la viabilidad celular inducida por la HG en las células ARPE-19. 102

Figura 36. Eventos de señalización inducidos por la HG en las células del EPR..... 108

ÍNDICE DE TABLAS.....

Tabla 1. Anticuerpos primarios 40

Tabla 2. Anticuerpos secundarios 41

Tabla 3. Secuencias (5'-3') de los pares de primers utilizados para la amplificación de ADNc mediante qPCR..... 41

Tabla 4. Equivalencias de las concentraciones de glucosa..... 44

RESUMEN

La inflamación es un factor clave en la patogénesis de diversas enfermedades de la retina que eventualmente terminan en la pérdida de la visión y ceguera, tales como la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE), la retinopatía diabética (RD), endoftalmitis bacteriana y la uveítis. En este contexto, las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) son esenciales para mantener la integridad estructural y funcional de la retina y se ha demostrado que, en estas condiciones patológicas, el EPR puede mediar importantes funciones inmunológicas y participar activamente de la respuesta inflamatoria.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral fue dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta inflamatoria del EPR. En particular nos propusimos estudiar el rol de la vía de la fosfolipasa D (PLD), generadora de mensajeros lipídicos, en dos modelos de injuria inflamatoria: i) inducida por lipopolisacárido (LPS) y ii) por altas concentraciones de glucosa (HG), a modo de simular las hiperglucemias características de la diabetes. En el desarrollo de esta tesis utilizamos dos líneas celulares de EPR de origen humano, las líneas ARPE-19 y D407.

Las PLD clásicas hidrolizan fosfatidilcolina (PC) para generar un segundo mensajero lipídico, el ácido fosfatídico (PA) y colina. El PA puede desfosforilarse por las lípido fosfato fosfohidrolasas (LPP) para generar diacilglicerol (DAG), otro lípido bioactivo. Por lo tanto, la vía de PLD/LPP puede modular la actividad de las proteínas que responden al DAG, como las proteínas quinasas C (PKC) y también de proteínas que son moduladas por el PA, como mTOR (del inglés, *mammalian target of rapamycin*), entre otras.

Resultados previos de nuestro laboratorio habían demostrado la activación de la vía PLD y la participación de las isoformas clásicas (PLD1 y PLD2) en la respuesta inflamatoria de las células del EPR expuestas a LPS. En el capítulo I estudiamos el rol de la vía PLD en la activación de la señalización por PKC en las células del EPR expuestas a LPS. Demostramos que ambas PLD clásicas son necesarias para la activación de isoformas convencionales de PKC (α y β II), mientras que la activación de la isoforma novel PKC ϵ solo es dependiente de la PLD1. Evidenciamos además que la PKC ϵ media la supervivencia de las células del EPR expuestas al LPS promoviendo una menor activación de la caspasa-3 y aumentando la expresión de Bcl-2 y la activación de Akt. Por otra parte, las PKC α y β no estarían involucradas en la pérdida de la viabilidad inducida por el LPS. En conclusión, la vía PLD1-PKC ϵ media la supervivencia de las células del EPR previniendo las señales apoptóticas inducidas por el LPS.

En el capítulo II caracterizamos el modelo de injuria celular inducido por HG. La exposición de las células del EPR a HG indujo la generación de especies reactivas de oxígeno

(ROS), la activación de la caspasa-3 y la disminución de la funcionalidad mitocondrial (parámetro de viabilidad celular). Demostramos además que los niveles elevados de glucosa inducen en las células del EPR la activación temprana y concatenada de la vía PLD y de la quinasa regulada por factores extracelulares (ERK1/2), la fosforilación del inhibidor de κ B (I κ B) y la activación del factor de transcripción nuclear κ B (NF κ B). La activación del NF κ B inducida por la HG se correlacionó con el incremento en la expresión de los ARNm de interleuquinas (*IL*) proinflamatorias (*IL-6*, *IL-8*) y de la ciclooxigenasa-2 (*COX-2*). Finalmente, demostramos que en las células del EPR expuestas a HG los inhibidores farmacológicos de PLD1 (VU0359595) y de PLD2 (VU0285655-1) previenen la expresión de los mediadores proinflamatorios, la activación de la caspasa-3 y la reducción en la viabilidad celular.

Los resultados obtenidos en las células expuestas a LPS y al modelo de injuria inducida por HG demuestran que el rol de las PLD en las células del EPR difiere según cuál sea el origen de la injuria inflamatoria. Estos hallazgos indican la importancia de conocer los mecanismos moleculares involucrados en la respuesta inflamatoria del EPR desencadenada por distintos estímulos. Nuestros resultados postulan a las isoformas clásicas de PLD como posibles dianas terapéuticas para distintas enfermedades inflamatorias de la retina.

ABSTRACT

Inflammation is a key factor in the pathogenesis of several retinal diseases that eventually end in vision loss and blindness, such as age-related macular degeneration (AMD), diabetic retinopathy (DR), retinitis pigmentosa (RP) and uveitis. In this context, retinal pigment epithelial (RPE) cells are essential to maintain the integrity and function of the retina and it has been shown that, under these pathological conditions, RPE cells can mediate important immunological functions and actively participate in the inflammatory response.

The main objective of this Ph. thesis was to elucidate the molecular mechanisms involved in the inflammatory response of the RPE. In particular, we wanted to study the role of the lipid messenger generating phospholipase D (PLD) pathway in two inflammatory injury models: i) induced by lipopolysaccharide (LPS) and ii) by high glucose (HG) concentrations, in order to simulate the typical hyperglycemia of diabetes. To this end, we used two human RPE cell lines: ARPE-19 and D407. Classical PLDs hydrolyze phosphatidylcholine (PC) to generate the lipid second messenger, phosphatidic acid (PA), and choline. PA can be further dephosphorylated by lipid phosphate phosphatases (LPP) in order to generate diacylglycerol (DAG), another lipid messenger. Thus, the PLD/LPP pathway can modulate the activity of DAG-responding proteins, such as protein kinases C (PKCs) and PA-responding proteins such as mTOR (mammalian target of rapamycin), among others.

Previous results from our laboratory demonstrated the activation of the PLD pathway and the participation of classical PLD isoforms (PLD1 and PLD2) in the inflammatory response of RPE cells exposed to LPS. In the first chapter of this thesis, we studied the role of the PLD pathway in the activation of LPS-induced PKC signaling in RPE cells. We demonstrated that both PLDs are necessary for the activation of conventional PKC isoforms (PKC α / β II) while the activation of the novel PKC ϵ is dependent only on PLD1. We also showed that PKC ϵ mediates the survival of RPE cells exposed to LPS by promoting less activation of caspase-3 and increasing Bcl-2 expression and activation of Akt. In contrast, PKC α and β may not be involved in the cell viability loss induced by LPS. In conclusion, the PLD1-PKC ϵ pathway mediates RPE cell survival by preventing apoptotic signals induced by LPS.

In chapter II we characterized the model of cellular injury induced by HG. RPE cell exposure to HG induced reactive oxygen species (ROS) generation, caspase-3 activation and reduced mitochondrial functionality (cell viability parameter). We also demonstrated that in RPE cells high glucose levels induce the early and concatenated activation of the PLD pathway and of extracellular signal regulated kinase (ERK1/2), the phosphorylation of inhibitor of κ B (I κ B) and the activation of nuclear factor κ B (NF κ B). The activation NF κ B induced by HG was found to correlate with the increased expression of proinflammatory interleukins (IL-6, IL-8)

and cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA. Finally, we demonstrated that in RPE cells exposed to HG pharmacological inhibitors of PLD1 (VU0359595) and PLD2 (VU0285655-1) prevent the expression of proinflammation mediators, the activation of caspase-3 and the reduction in cell viability.

The results obtained in RPE cells exposed to LPS and in the model of cellular injury induced by HG demonstrate that the role of PLD isoforms in RPE cells differs depending on the origin of the inflammatory injury. These findings indicate the importance of knowing the molecular mechanisms involved in the RPE inflammatory response elicited by different stimuli. Our results postulate classical PLD isoforms as possible therapeutic targets for several retinal inflammatory diseases.