



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

TESIS DE DOCTOR EN BIOLOGÍA

**“Control de la apoptosis en neuronas
fotorreceptoras obtenidas a partir de células
madre”**

Marcos Javier Dibo

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

2020

PREFACIO

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para acceder al grado académico de Doctor en Biología, 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 ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 01 de Julio de 2014 y el 13 de Febrero de 2020, en el Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB-CONICET) bajo la dirección del Dr. Luis Enrique Politi y la co-dirección de la Dra. Nora Patricia Rotstein y desde el 13 de Febrero de 2020 hasta el 07 de abril de 2020 bajo la supervisión del Dr. Alejandro Gentili.

	<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>
---	--

DEDICATORIA

... a mis padres

... a Juli

... a Facu

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Sur (UNS), por brindarme la formación académica del más alto nivel.

A la Secretaría de Posgrado y Educación Continua y el Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia y quienes lo conforman, por su calidez y respuesta ante cualquier inquietud. En especial al Secretario de Extensión e Investigación Dr. Alejandro Gentili y la Dra. María Teresa Lockhart por arbitrar el tramo final de este trabajo de tesis.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por la beca doctoral otorgada en 2014 y por la post-doctoral a comenzar en 2020.

Al Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB) y a sus autoridades por haber permitido el desarrollo del doctorado en el Laboratorio de Neurobiología del Desarrollo.

A los organismos que brindaron financiamiento al laboratorio de Neurobiología y que permitieron el desarrollo de este trabajo de tesis: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el CONICET y la UNS.

Al Dr. Federico Jensen y la Dra. Ariana Bruzzone por su gran ayuda con la revisión del manuscrito.

A mis compañeros del INIBIBB y del Laboratorio por su buena onda siempre. En especial a Facu por su amistad de hierro y su pensamiento crítico; a Yane por enseñarme a trabajar desde el primer momento; a Marce y Vicky Simón por contagiar su energía siempre sin importar el día; a Edgardo por compartir la pasión por la microscopía; a Lore por guiarme cuando más me hacía falta; a Andrés por compartir la pasión por la electrónica.

A la cátedra de Biología Celular y todos sus integrantes por hacer que mi trabajo como docente fuera de las mejores experiencias que tuve.

A mis padres Sandra y Eduardo, y mis hermanas Sol y Cami por bancarme siempre de principio a fin y de todas las maneras posibles.

A mi abuela Lily por todas las velas que prendió desde el primer examen hasta hoy que también debe haber una prendida.

A Juli, el amor de mi vida, que me bancó a la distancia por 6 años y medio; y que es, sin lugar a dudas, lo mejor que me pasó en la vida.

RESUMEN

Dentro de la estructura del ojo de los vertebrados, la retina es tal vez el tejido que más capta la atención de los científicos por ser el primer actor en la recepción y transmisión del estímulo visual. La retina si bien forma parte de un sentido periférico, posee gran cantidad de homologías con el Sistema Nervioso Central. Esto provoca que los eventos y patologías asociadas a la retina puedan, hasta cierto punto, relacionarse con las enfermedades neurodegenerativas del cerebro más difíciles de estudiar como son el mal de Parkinson y la enfermedad de Alzheimer. En el caso particular de la retina, existen dos enfermedades aún hoy incurables como son la Retinitis Pigmentosa (RP) y la Degeneración Macular asociada a la Edad (AMD, por sus siglas en inglés). La muerte de las neuronas fotorreceptoras cumple un rol fundamental en el desarrollo de estas enfermedades, que se basan en la pérdida gradual y prácticamente irreversible de la visión. En la retina, las células gliales de Müller proveen el sostén necesario para la estructura de la misma. Se ha reportado que estas células expresan marcadores de células madre por lo cual están involucradas en la regeneración de la retina ante un eventual daño. Existen ya terapias destinadas a estimular el desarrollo de dichas células madre. Sin embargo, aún es necesario un mayor avance en la búsqueda de tratamientos destinados al mantenimiento y posterior diferenciación de las células regeneradas, evitando el proceso de muerte al que están expuestas. En otras palabras, evitar que las neuronas fotorreceptoras sean sometidas al proceso de suicidio celular conocido en líneas generales como Apoptosis. Dentro del enorme abanico de causas que pueden generar

apoptosis en una neurona, la falta de factores tróficos o de crecimiento es una de ellas. Este trabajo de tesis buscó revertir la muerte provocada por la falta de factores tróficos en un modelo de cultivo neuronal puro compuesto en su mayor proporción por neuronas fotorreceptoras. En la primera parte nos enfocamos en estudiar el rol de la Melatonina como agente neuroprotector. Los resultados apuntan a que la Melatonina resulta eficaz para disminuir el avance de la apoptosis a días avanzados en el desarrollo. Pudimos demostrar que el efecto que la Melatonina ejerce específicamente en neuronas fotorreceptoras, está dado por la activación de la vía de señalización de ERK/MAPK. Respecto a la capacidad de la Melatonina de mantener la población de neuronas fotorreceptoras, no se vio un aumento en la expresión de proteínas del ciclo visual. Por el contrario, se observó un aumento de la expresión génica del factor de transcripción CRX (Cone Rod Homeobox) que ayudaría a mantener el fenotipo de neuronas fotorreceptoras a aquellas que hayan iniciado el proceso de diferenciación. Estos resultados sugieren que la Melatonina, podría ejercer su acción protectora directamente en las neuronas fotorreceptoras, e indirectamente, a través del estímulo de la población de neuronas que acompaña a los fotorreceptores en el ciclo visual, como ser las células amacrinas.

La segunda parte de este trabajo se enfocó en la caracterización de la vía de muerte por falta de factores tróficos. En ese sentido, la vía de NO-GAPDH-SIAH consiste en la translocación a núcleo de la enzima GAPDH y el posterior desencadenamiento de la muerte celular. Comprobamos que efectivamente en nuestro modelo se verifica la translocación nuclear; y que al pre-tratar los cultivos con un inhibidor selectivo de dicha translocación se

recupera significativamente la pérdida de la viabilidad en los cultivos neuronales.

Los resultados de esta tesis por un lado enriquecen el conocimiento sobre el rol de la Melatonina como agente neuroprotector en la retina. Por otro lado contribuyen a esclarecer los mecanismos de muerte en las células de la retina ante la falta de factores tróficos para poder, en un futuro, unificar su tratamiento.

ABSTRACT

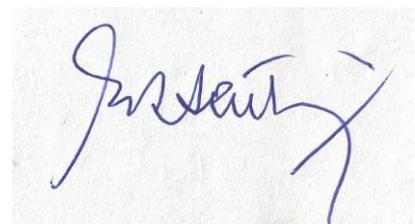
The retina is probably the most interesting tissue within the structure of vertebrate eye, given its role as the first one in charge of receiving and transmitting the visual stimuli. Even though the retina is part of a peripheral sensory system, it shares many homologies with the Central Nervous System. This allows correlating to some extent the pathologic events associated with the retina with neurodegenerative illness more difficult to study such as Alzheimer's and Parkinson's disease. There are two main disorders of the retina named Retinitis Pigmentosa and Age-related Macular Degeneration. Those two pathologies share a common trait which is the death of photoreceptor cells as the main cause of gradual and irreversible loss of vision. In the retina, Müller glial cells are in charge among other functions, to support and maintain the structure of the retina. It has been reported for this cells the expression of stem cell markers and the involvement on retina regeneration after damage. Even though there are treatments nowadays that aim to stimulate Müller glia development of their stem potential, treatments aiming to the maintenance and ulterior differentiation of newly regenerated cells are just as important. The general idea is to prevent newly generated photoreceptor cells to undergo cell suicide, also known as Apoptosis. Within the large range of causes that can trigger apoptosis on a neuron, the lack of growth factors is one of them. In this thesis we aim to revert photoreceptor cell death induced by lack of growth factors, on a model of pure neuronal cultures. On the first chapter we focused on assessing the role of Melatonin as a neurotrophic factor. Results showed that Melatonin is effective on slowing down the apoptotic pathway after 4 days

of development. We proved the involvement of Melatonin on the activation of the ERK/MAPK pathway directly on photoreceptor cells. Regarding Melatonin as a factor promoting neuronal differentiation, we could not observe an overexpression of visual cycle proteins. On the other hand, we observed the genetic overexpression of a transcription factor (Cone Rod Homeobox) which will help maintain the phenotype of those neurons that started developing as photoreceptors. Our results suggest that Melatonin could accomplish neuroprotection by either acting directly on photoreceptor cells, or indirectly through engaging the neurons that aid said cells on the visual cycle.

The second part of this thesis focuses on the characterization on the cell death pathway caused by lack of trophic factors. On that matter, the NO-GAPDH-SIAH pathway consist in nuclear translocation of the glycolytic enzyme GAPDH followed by onset of neuronal death. We found that nuclear translocation of GAPDH occurs in our model, and that by pre-treating cultures with R-(-)-Deprenyl (a selective inhibitor for such translocation), we recovered neuronal cultures from loss of cell viability.

The results shown on this thesis on one hand contribute to deepen the knowledge of Melatonin as a neuroprotective agent in the retina. On the other hand they shed light into the mechanisms involving neuronal death on lack of trophic factors so we may, in the future, unify their treatment.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.



Dr. Alejandro R. Gentili

INDICE

PREFACIO	2
DEDICATORIA.....	3
AGRADECIMIENTOS	4
RESUMEN	6
ABSTRACT	9
INDICE	11
ABREVIATURAS.....	15
INTRODUCCIÓN	17
La retina	17
Enfermedades neurodegenerativas de la retina	19
El modelo	20
Tipos de muerte celular.....	22
Apoptosis.....	22
Autofagia.....	23
Necrosis.....	23
La vía de muerte de NO-GAPDH-SIAH	25
El R-(-)-Deprenyl.....	27
La Melatonina	29
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	32
MATERIALES Y METODOS	33

Animales	33
Obtención de cultivos neuronales puros	33
Tratamientos	34
Viabilidad celular	34
Adición de Melatonina y Deprenyl	35
Implicancia de la vía de ERK/MAPK.....	35
Deprenyl como inhibidor de la translocación de GAPDH a núcleo	36
Deprenyl como neuroprotector ante la falta de factores tróficos.....	36
Deprenyl como neuroprotector ante el agregado de Ceramida exógena	37
Ensayo de MTT	37
Ensayo de Ioduro de Propidio (IP)	37
Técnicas de inmunocitoquímica.....	38
Ensayo de TUNEL	39
Microscopía y análisis de imágenes	40
Western Blot	41
qRT-PCR	42
Análisis estadístico	43
 CAPITULO I : ROL DE LA MELATONINA COMO FACTOR DE SUPERVIVENCIA Y DIFERENCIACIÓN EN NEURONAS FOTORRECEPTORAS	 45
RESULTADOS.....	46

Caracterización neuronal.....	46
Estado basal de los cultivos neuronales puros	48
Efecto de la Melatonina ante la pérdida de la viabilidad a DIV4	49
Efecto de la Melatonina ante la pérdida de la viabilidad a DIV6	51
Mecanismo de acción de la Melatonina.....	54
La Melatonina activa la vía de ERK/MAPK en neuronas fotorreceptoras ..	56
Análisis de la Melatonina como agente de diferenciación de neuronas fotorreceptoras.....	59
DISCUSIÓN	62
CAPITULO II: LA VÍA DE NO-GAPDH-SIAH1/2 Y SU IMPLICANCIA EN LA MUERTE CELULAR EN NEURONAS DE LA RETINA.....	68
RESULTADOS.....	69
Evidencia de la vía de NO-GAPDH-SIAH en cultivos neuronales	69
Efectividad del Deprenyl como inhibidor de la translocación de GAPDH... 70	
El bloqueo de la translocación nuclear de GAPDH resulto efectivo en la disminución de la apoptosis a DIV4.....	72
El Deprenyl no logra la protección a largo plazo ante la apoptosis evaluada a DIV6.....	75
Efecto protector del Deprenyl ante el agregado de C2-Ceramida	79
DISCUSIÓN	81
CONCLUSIONES GENERALES.....	86
CONCLUSIONES DEL CAPITULO I.....	86

CONCLUSIONES DEL CAPITULO II.....	86
BIBLIOGRAFÍA	88

ABREVIATURAS

BSA Bovine serum albumin; albúmina sérica bovina.

BrdUTP: Bromodeoxiuridina trifosfato.

C2Cer: C2-Ceramida.

CRX: Cone rod homeobox.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

Deprenyl: R-(-)-Deprenyl.

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium; Medio Eagle modificado por Dulbecco.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

ERK: Extracellular signal Regulated Kinase; Quinasas reguladas por señales extracelulares.

FR/s: Fotorreceptor/es.

GABA: γ -aminobutyric acid; ácido Gamma-aminobutírico.

GAPDH: Gliceraldehído Fosfato Deshidrogenasa.

HBSS: Hank's Balanced Salt Solution.

HPRT: Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferasa.

IP: Ioduro de Propidio.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase; Proteína Quinasas Activadas por Mitógenos.

MTT: Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio.

PARP-1: Poli-ADP ribosil polimerasa-1.

PBS: Phosphate buffer saline; búfer fosfato salino.

PF: Paraformaldehído.

PN: Postnatal.

qRT-PCR: Reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa con transcriptasa reversa.

RP: Retinitis Pigmentosa.

RAR: Receptor de Ácido Retinoico.

ROR: Receptor huérfano relacionados con RAR.

SEM: Standard Error of the Mean; Error estándar de la media.

SIAH: Seven in absentia homolog.

SDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio.

TUNEL: Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling.

TdT: terminal deoxynucleotidyl transferase; deoxinucleotidil transferasa terminal.

INTRODUCCIÓN

La retina

La retina es la capa más interna del globo ocular que permite la transformación del estímulo lumínico en un impulso nervioso para permitir la visión. En los vertebrados se estructura en capas bien organizadas. Durante el ciclo visual, la luz incide sobre las células del Epitelio Pigmentario y se refleja hacia los discos membranosos de los segmentos externos de los fotorreceptores cargados con proteínas fotosensibles. Los fotorreceptores se clasifican según la proteína visual que poseen. Es así que pueden agruparse en dos grandes grupos: conos y bastones. Estos últimos representan más de 70% de la población neuronal (Lu and Barnstable 2019) y se encuentran distribuidos a lo largo de toda la retina a diferencia de los conos que suelen encontrarse concentrados en una zona de la retina denominada fovea (Szél et al. 1996). Las neuronas fotorreceptoras, o simplemente fotorreceptores (FRs), se encargan de convertir la energía lumínica en impulsos eléctricos en un fenómeno denominado fototransducción. Estos impulsos eléctricos son captados por las neuronas horizontales y bipolares, que a su vez realizan conexiones con células amacrinas y ganglionares (Figura 1, modificada de Eells (2019)). Los axones de estas últimas son los que conforman el nervio óptico que viaja hasta el lóbulo occipital del cerebro donde se encuentra la corteza visual.

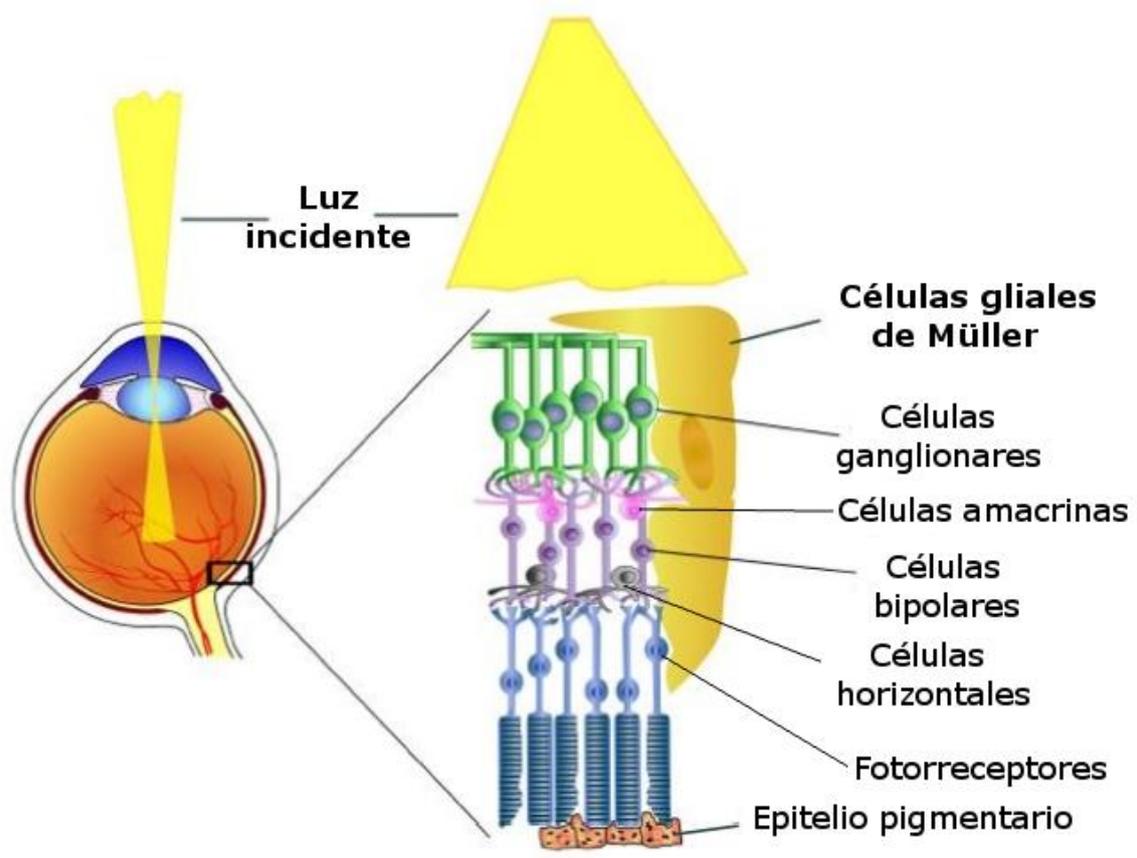


Figura 1. Estructura de la retina de mamíferos. Modificada de Eells (2019)

La estructura de la retina se mantiene como tal gracias a las células de sostén que conforman la población de células gliales. Dentro de esta población son destacables las células gliales de Müller. La estructura funcional de estas células es muy similar entre los vertebrados. A partir del soma central, surgen dos procesos ramificados en ambas direcciones que envuelven prácticamente todos los elementos neuronales de la retina. Esto es esencial para la transmisión del impulso visual ya que las células de Müller cumplen un rol esencial en el metabolismo de los neurotransmisores secretados por las neuronas. Los productos asociados al metabolismo del glutamato y el GABA (dos neurotransmisores, excitador e inhibidor respectivamente), funcionan

como elementos nutricionales para las neuronas a la vez que les provee de defensa contra el estrés oxidativo. Fallas en el metabolismo del glutamato por parte de la glía de Müller, derivará en neurotoxicidad (Reichenbach and Bringmann 2010). En estas células, a su vez, se ha reportado la expresión de marcadores de células madre (Beach, Wang, and Otteson 2017; Insua et al. 2008; Simón et al. 2012; Volonté et al. 2019). En vertebrados inferiores hay evidencia de la presencia de células madre multipotenciales que tienen la capacidad de regenerar las células perdidas por diversos tipos de daño (Conte et al. 2010; Lenkowski and Raymond 2014). En los vertebrados superiores la capacidad de la glía de Müller de desdiferenciarse, y dividirse asimétricamente generando progenitores neuronales, se conserva pero en un grado mucho menor (Löffler et al. 2015). En este sentido, el mantenimiento de la población de estos progenitores representa una estrategia terapéutica para afrontar enfermedades que se basan en la pérdida de las neuronas diferenciadas.

Enfermedades neurodegenerativas de la retina

En las enfermedades neurodegenerativas como la Retinitis Pigmentosa (RP) y la Degeneración Macular asociada a la Edad (AMD, por las siglas en inglés), las células afectadas son principalmente las neuronas fotorreceptoras. En estas enfermedades, se observa una disminución gradual e irreversible de la capa de la retina conformada principalmente por los fotorreceptores. Esta es una característica que comparten entre ambas, pese a que la RP suele afectar a personas muy jóvenes, mientras que la AMD afecta a personas de edad avanzada. Las causas que pueden derivar en una u otra son muy variadas y no

presentan relación entre sí, pudiendo surgir a partir de factores genéticos o bien ambientales como pueden ser el estrés oxidativo o mecanismos inflamatorios (Dunaief et al. 2002; Portera-Cailliau et al. 1994). Cualquiera sea el caso, en la actualidad estas enfermedades carecen de una cura definitiva, por lo que el estudio de terapias que apunten a la regeneración de la propia retina son las que revisten el mayor interés por la comunidad científica. Para esto, es necesario entender la fisiología de la retina, no solo como unidad, sino a partir de la respuesta de las células individuales ante los cambios en su microambiente.

El modelo

Nuestro modelo de estudio, desarrollado por Politi, Lehar, and Adler, (1988), se basa en el cultivo *in vitro* de las neuronas de retina en un medio químicamente definido, carente de suero, suplementado con gentamicina (50 mg/L), glutamina (2 mM), apo-transferrina (125 nM), putrescina (200 µM), hidrocortisona (100 nM), progesterona (40 nM), citidina 5'-difosfocolina (2,56 mg/L) e insulina (1,6 µM). La principal ventaja de este medio de cultivo es que salvo por la presencia de insulina que resulta vital para el mantenimiento de las neuronas amacrinas (Politi et al. 2001), se encuentra libre de factores tróficos para las neuronas fotorreceptoras (Rotstein et al. 1996). Esto permite un análisis donde prácticamente la única variable es el agregado de los factores para el estudio del crecimiento y/o diferenciación de los FRs. Luego de la diferenciación, las neuronas maduras se reconocen por la expresión de las proteínas del ciclo visual. En el caso de los fotorreceptores de tipo bastones,

esta proteína se denomina Rodopsina (Kiser, Golczak, and Palczewski 2014). Como se describe en trabajos de nuestro laboratorio (Garelli, Rotstein, and Politi 2006; De Genaro et al. 2013), los cultivos neuronales puros son ricos principalmente en fotorreceptores y neuronas amacrinas, y se obtienen a partir de la disección mecánica y enzimática de retinas de ratas neonatas. Estos cultivos celulares, en el momento de la siembra cuentan con una población de células redondeadas denominadas como progenitores, que expresan marcadores de células multipotenciales (tales como Pax-6 y Nestina) y a partir de las cuales se originan por mitosis y diferenciación gran parte de las neuronas sobre las cuales se hace el análisis (Insua et al. 2003). Todos los cultivos neuronales puros se realizaron a partir de ratas neonatas de cero a dos días Post-Natal (PN 0-2). El motivo de esta elección radica en los momentos de mayor generación del tipo celular de interés, siendo en este caso los fotorreceptores de tipo bastón (Figura 2, modificada de Cepko (2015)). La figura muestra que entre los PN 0 a 2, las células progenitoras se diferencian en su mayor medida en FRs. Las neuronas que para ese momento ya se encuentran diferenciadas (ganglionares, horizontales, conos), no sobreviven al proceso de disección mecánica y enzimática de la retina para la obtención de los cultivos neuronales. Por otro lado, las neuronas bipolares representan menos del 5% de las células totales en nuestro modelo (Rotstein et al. 2002).

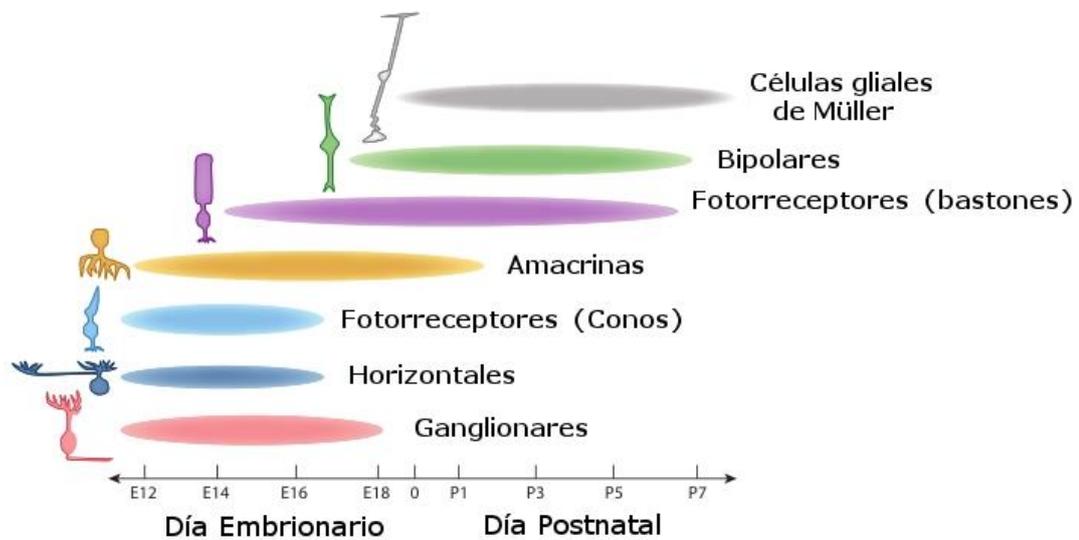


Figura 2. Períodos de génesis de los diferentes tipos celulares de la retina. Modificada de Cepko (2015).

Tipos de muerte celular

Nuestro modelo aborda la vía de muerte desencadenada por la falta de factores tróficos. Está ampliamente aceptado que la falta del estímulo provocado por dichos factores actúa como detonante de al menos la vía intrínseca de la apoptosis, que constituye el tipo más conocido de muerte celular programada (Elmore 2007). Los diferentes tipos de muerte celular se suelen agrupar según tres grandes mecanismos (Schweichel and Merker 1973):

Apoptosis

Se caracteriza por ser programada y controlada por vías de señalización. Básicamente presenta disminución del tamaño celular, y culmina con la

fragmentación del material genético y su posterior condensación en un proceso conocido como picnosis.

Autofagia

Es similar a la apoptosis en el sentido de que es controlada por la misma célula, pero posee ciertas particularidades, como la de ser reversible en algunos casos, y por la formación de un complejo característico conocido como autofagosoma. A su vez se caracteriza por la expresión de marcadores exclusivos de la vía (Galluzzi et al. 2017).

Necrosis

No presenta similitudes con ninguna de los mecanismos anteriores, y suele estar asociado a eventos no programados y ruptura de las células e inmediata liberación de su contenido al medio extracelular.

A pesar de esto, en los últimos años esta clasificación se ha ampliado más acorde a los mecanismos moleculares y de señalización que ocurren en cada tipo celular. En la actualidad el enorme abanico de tipos de muerte celular descritos a la fecha se suelen describir como mecanismos de muerte celular “regulada” y oscila en sus características entre los tres mecanismos arriba mencionados en mayor o menor medida. A su vez se descubrió que estos procesos están íntimamente relacionados al tipo celular estudiado (Galluzzi et al. 2018). De los cerca de 20 tipos diferentes de muerte establecidos en dicho trabajo por el Comité de Nomenclatura sobre Muerte Celular (NCCD, por sus siglas en ingles), mencionamos solo dos que son los que más se ajustan a este trabajo de tesis.

El primero es el de la vía intrínseca de la apoptosis que, como ya fuese mencionado, entre sus causas se lista la falta de factores tróficos. Este se

caracteriza por la despolarización de la membrana externa mitocondrial, lo que permite la liberación de moléculas pro-apoptóticas. Concluye con la presencia de fragmentación y posterior picnosis nuclear. Es importante destacar que en los sistemas *in vivo*, la muerte celular se ve acompañada de la participación del sistema inmune, que en el caso de la apoptosis no genera respuesta inflamatoria, pero si depende de la fagocitosis por parte de los macrófagos (Green, Oguin, and Martinez 2016). *In vitro*, en cambio, la fase final de la apoptosis suele ser sucedida por la ruptura de la membrana plasmática y la adquisición de una morfotipo necrótico (necrosis secundaria) al no ser fagocitadas por células circundantes (Berghe et al. 2010).

El segundo tipo de muerte neuronal a mencionar es el de Parthanatos. Comprende una forma de muerte celular caracterizada por una hiperactivación de una proteína asociada a la reparación del ADN denominada PARP-1. Esta hiperactivación ocurre a raíz de un número de eventos entre los que se destaca la respuesta ante el estrés oxidativo. Este puede ser provocado por la presencia en el medio extracelular de especies reactivas de nitrógeno como Óxido Nítrico (NO, por sus siglas en inglés) o bien por la liberación de especies reactivas de oxígeno desde dentro de las mitocondrias provocada por el agregado de un agente externo como puede ser la C2-Ceramida. Trabajos realizados en nuestro laboratorio con C2-Ceramida sugieren la activación de la vía de Parthanatos en cultivos neuronales puros (Prado Spalm et al. 2019).

Existe una vía adicional no tomada en cuenta en la actualidad por el NCCD, pero que merece una sección aparte para ser descripta, y es la vía de NO-GAPDH-SIAH.

La vía de muerte de NO-GAPDH-SIAH

En el citoplasma, la enzima Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) existe como una isoforma tetramérica compuesta por 4 subunidades de 37 kDa, cada una con un grupo funcional de tipo tiol. Esta enzima cataliza la conversión de Gliceraldehído-3-fosfato en 1,3-bifosfoglicerato en presencia de NAD^+ , generando como subproductos, ATP y NADH (Tristan et al. 2011).

Evolutivamente es una proteína muy conservada, utilizada comúnmente como housekeeping en técnicas de biología molecular en diversos modelos de cultivo celulares debido a no presentar variantes de *splicing* alternativo (Ghalamfarsa 2015; Kosova, Khodyreva, and Lavrik 2017). En los fotorreceptores particularmente, se la halló anclada a la membrana plasmática de los segmentos externos (Hsu and Molday 1990), lo cual tiene sentido considerando la alta tasa metabólica de esa región de la célula, ya que es la responsable de iniciar la cascada de fototransducción en la retina *in vivo*.

Sin embargo, pocos años después a la publicación de Hsu y Molday, comienza a asociarse a la GAPDH con otros eventos celulares distintos de la vía de la glucólisis (Mazzola and Sirover 2003). Incluso, se la comenzó a asociar gradualmente con eventos característicos de la apoptosis en distintos modelos de cultivo celular (Chen et al. 1999; Ishitani et al. 1996; Sawa et al. 1997; Tristan et al. 2011).

Finalmente, en los últimos años se recopilaron todas las funciones que se le atribuían a la GAPDH en diversos estudios, caracterizándola como la proteína “Moonlighting” por excelencia. Esto último refiere a la capacidad de una proteína de ejercer distintas funciones sin que esté asociado un *splicing*

alternativo del gen correspondiente. Lo que ocurre son cambios a nivel post-traduccionales (conservando así su secuencia aminoacídica) los cuales pueden generar cambios conformacionales en el sitio activo para Gliceraldehído-3-fosfato. Esto le permite realizar diversas pero específicas funciones celulares, dependiendo del tipo de modificación post-traduccionales (M. A. Sirover 2017).

La muerte en cultivos neuronales primarios ha sido asociada a un aumento en la producción de Óxido Nítrico. Dentro de las causas que generan este aumento, la falta de factores tróficos parece jugar un papel determinante (Layton et al. 2005). A su vez, la exposición de las neuronas de la retina a la luz puede generar la S-Nitrosilación de GAPDH ante la presencia de Óxido Nítrico (Tooker and Vigh 2015).

Para completar la cascada de señalización, GAPDH experimenta la S-Nitrosilación de la Cisteína 152 perteneciente al sitio activo de la enzima, lo que favorece la unión a la proteína SIAH en el citoplasma que en condiciones fisiológicas es prácticamente indetectable. SIAH 1/2 son las dos isoformas de una proteína de la familia de las E3 ubiquitina ligasas; proteínas encargadas de señalar con Ubiquitina otras moléculas para que sean degradadas por los proteosomas (Hara et al. 2005).

El complejo NO-GAPDH-SIAH transloca al interior del núcleo donde se genera una maquinaria enzimática estable que activa factores de transcripción como p53 que eventualmente generarían la apoptosis de la célula (W. G. Tatton et al. 2000). El rol que cumple SIAH en esta vía de muerte es la de proveerle de un vehículo a GAPDH ya que SIAH posee una secuencia de localización nuclear necesaria para traspasar la membrana nuclear, de la cual GAPDH carece (Hara and Snyder 2006). El éxito de esta vía de muerte radica

fuertemente en el balance entre el GAPDH nativo y el nitrosilado (SNO-GAPDH) como ilustra la Figura 3, tomada de Hildebrandt et al. (2015).

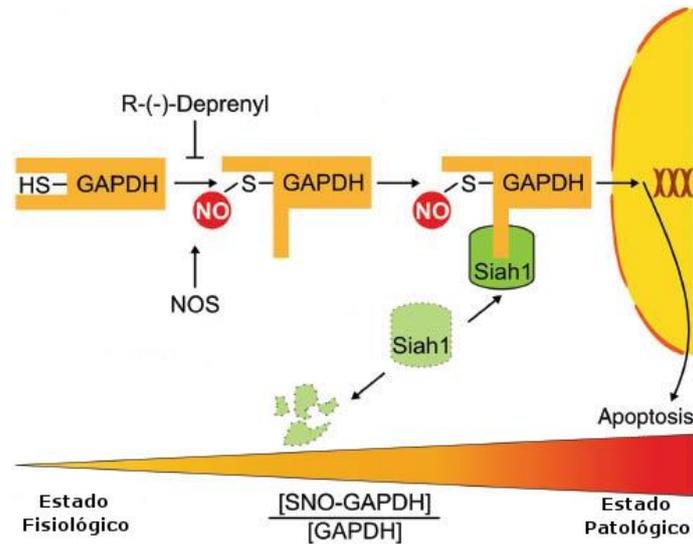


Figura 3: Vía de NO-GAPDH-SIAH. Tomada de Hildebrandt et al. (2015)

Esquema de la vía de NO-GAPDH-SIAH en la cual el Óxido Nítrico (NO) nitrosila a GAPDH, lo que genera el cambio conformacional para que se una a SIAH, y poder translocar a núcleo. El evento de Nitrosilación puede ser bloqueado mediante la interacción de GAPDH con R-(-)-Deprenyl.

El R-(-)-Deprenyl

También conocido como Selegilina, es un reconocido inhibidor de la Mono amino oxidasa-B (MAO-B), una enzima anclada a la membrana externa mitocondrial involucrada en el metabolismo de ciertos neurotransmisores del SNC como la Dopamina. Por esto es que se lo suele usar como terapia ante la enfermedad de Parkinson y patologías derivadas (Riederer and Laux 2011; Szókó et al. 2018)

Poco después de su descubrimiento en 1965, el análisis de los enantiómeros reveló el isómero D poseía 1/150 de la capacidad de inhibir la MAO-B respecto al isómero L. Tal es así que comenzó a utilizarse como L-Deprenyl, también encontrado como R-(-)-Deprenyl en la literatura, o simplemente Selegilina (Gerlach, Riederer, and Youdim 1992). Trabajos publicados posteriormente demostraron una asociación del Deprenyl con el mantenimiento de la viabilidad celular en modelos en los que la MAO no se encontraba desregulada (Semkova et al. 1996; G. Tatton et al. 1996; W. Tatton, Chalmers-Redman, and Tatton 2003; W. G. Tatton et al. 1994)

El Deprenyl estructuralmente es una propargilamina que posee un gran abanico de propiedades. Dentro de la célula resulta una molécula muy versátil ya que según las rutas metabólicas (Figura 4), puede ejercer una gran cantidad de funciones. A su vez, se ha demostrado que el grupo propargilo es el encargado de actuar en relación a la neuroprotección (Magyar et al. 2006; Magyar 2011).

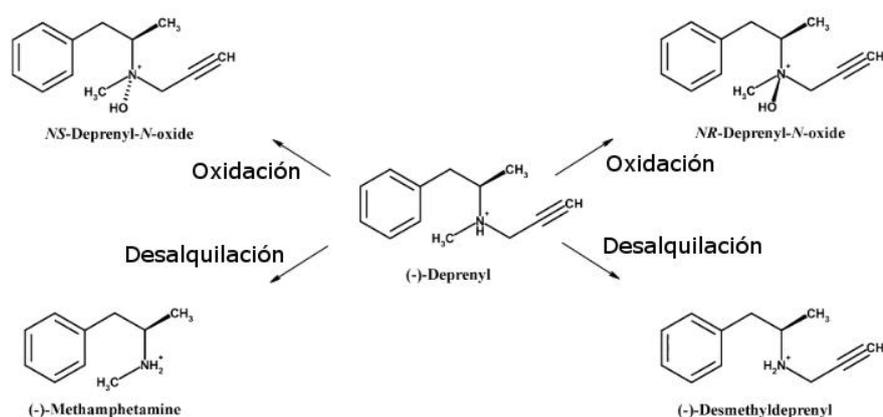


Figura 4: Metabolismo del Deprenyl. Modificado de Magyar et al. (2006).

El mecanismo de acción en la vía apoptótica de NO-GAPDH-SIAH consiste en la unión del Deprenyl a GAPDH en la posición del sitio activo para

Gliceraldehído-3-fosfato. Esto evita el cambio conformacional provocado por el NO y la posterior unión de SIAH, lo cual prevendría la translocación a núcleo y en última instancia, la apoptosis (Hara et al. 2006; W. G. Tatton et al. 2000).

La Melatonina

Es una indolamina encontrada de forma ubicua en la naturaleza, y que representa una de los mecanismos de señalización más antiguos que se conocen. Ha sido identificada en bacterias, invertebrados, eucariotas unicelulares e incluso plantas (Hardeland and Poeggeler 2003). En los vertebrados es secretada principalmente en la glándula pineal, sin embargo se han asociado otros sitios de síntesis incluyendo la retina (Tosini and Menaker 1998). La síntesis ocurre a partir del aminoácido Triptofano, que es convertido en Serotonina por una reacción enzimática de 2 pasos. Esta es acetilada y convertida posteriormente en Melatonina (Figura 5).

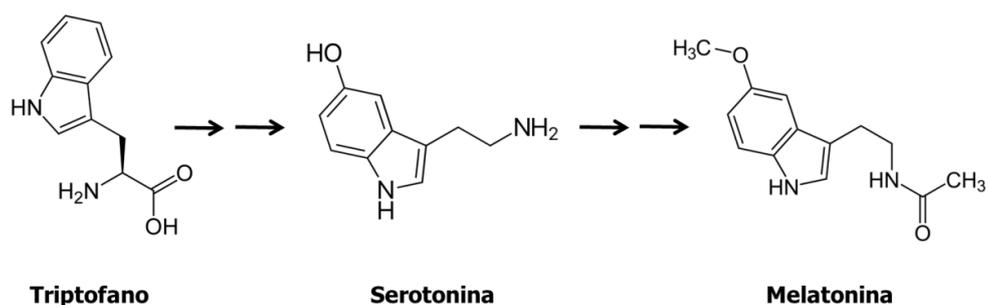


Figura 5: Síntesis de la Melatonina.

Dentro de los diversos procesos fisiológicos entre los que se ve involucrada, pueden mencionarse el control de los ritmos circadianos (Armstrong 1989; Zisapel 2001), la regulación de la presión sanguínea (Doolen

et al. 1998; Scheer et al. 2004), la funcionalidad del sistema inmune (Carrillo-Vico et al. 2005; Guerrero and Reiter 2002) y detoxificación ante radicales libres (Reiter, Tan, and Maldonado 2005). De todos estos procesos, es destacable la regulación de los ritmos circadianos. Estos constituyen una serie de mecanismos moleculares sincronizados que regulan prácticamente todas las funciones del organismo, los cuales están regulados principalmente por la Melatonina secretada por la glándula pineal (Gaspar et al. 2019).

Si bien la glándula pineal es la principal productora de esta hormona, su síntesis ha sido comprobada en la retina de vertebrados, siendo los fotorreceptores las células encargadas de sintetizarla a partir del aminoácido triptófano (Wiechmann and Sherry 2013). La relación entre las neuronas fotorreceptoras secretoras de Melatonina y las neuronas amacrinas secretoras de Dopamina, constituye el ritmo circadiano por el que se rigen una gran cantidad de procesos en la retina (Tosini et al. 2008).

La Melatonina está fuertemente asociada a su capacidad antioxidante; debido a esto, la protección ejercida en los distintos modelos celulares se refiere habitualmente al secuestro de las especies reactivas de Oxígeno (Mercau et al. 2019; Reiter et al. 2000, 2003; Rodriguez et al. 2004). Sin embargo, en los últimos años se ha dado más preponderancia al rol en las diferentes vías de señalización (Jockers et al. 2016; Tocharus et al. 2014; Tosini et al. 2014). Dentro de los mecanismos de acción por los que actúa, los más conocidos son los que involucran la señalización a través de los receptores de membrana encontrados en vertebrados mamíferos denominados MT1 y MT2. Estos funcionan como receptores acoplados a proteína G con sus característicos 7 segmentos transmembrana y que tienen la capacidad de

activar proteínas quinasa como la A o la C así como otras enzimas corriente abajo (Hardeland 2009).

Sin embargo, la Melatonina no solo ejerce sus mecanismos de acción mediante la unión a los receptores de membrana. Respecto a la capacidad de poder atravesar por difusión simple la membrana plasmática de las células, en los últimos años se analizó la permeabilidad de la Melatonina como molécula neutra, arrojando resultados de afinidad alta por este mecanismo (Yu et al. 2016). Esto cobra relevancia al relacionarlo a los trabajos de Carlberg and Wiesenberg (1995); Pandi-perumal et al. (2008), y Wiesenberg et al. (1995) que señalan a la Melatonina como un ligando de una familia de receptores nucleares, más específicamente el “receptor huérfano relacionado con el receptor de ácido retinoico de tipo beta” (ROR- β). Estos receptores suelen actuar como factores de transcripción que promueven la viabilidad celular (Dyall, Michael, and Michael-Titus 2010), lo que podría sugerir que la Melatonina ejercería su función protectora actuando como ligando de dichos receptores, además de las vías ya conocidas de MT1, MT2 y sus homo y heterodímeros.

En nuestro laboratorio se ha demostrado que los mecanismos de acción del ácido Docosahexaenoico y otros factores de protección activan la vía de ERK/MAPK (German et al. 2006; Insua et al. 2003; Politi, Rotstein, and Carri 2001), por lo que no sería extraño que los mecanismos de supervivencia sean conservados aun cuando se trate de la activación por moléculas diferentes.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

De acuerdo a los antecedentes planteados, proponemos el desarrollo de este trabajo de tesis en dos capítulos. La hipótesis del primer capítulo propone que la Melatonina tiene un efecto neuroprotector ante la apoptosis de los fotorreceptores en cultivo.

El segundo capítulo propone que la vía de NO-GAPDH-SIAH está involucrada en la muerte neuronal ante la falta de factores tróficos.

Por lo expuesto, los objetivos planteados son:

- **Estudiar el efecto de la incubación con Melatonina sobre la apoptosis en neuronas fotorreceptoras en cultivo.**
- **Evidenciar la vía apoptótica responsable de la muerte de neuronas por falta de factores tróficos.**

MATERIALES Y METODOS

Animales

Se utilizaron crías neonatas de ratas pertenecientes a la cepa Albino Wistar criadas en nuestra propia colonia en el bioterio del INIBIBB. Los animales se mantuvieron en condiciones de temperatura controladas en un ciclo de 12h luz/oscuridad y alimentados *ad libitum*. Para los distintos experimentos se tomaron ejemplares de día Post-Natal (PN) 0 a 2. 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.

Obtención de cultivos neuronales puros

Se obtuvieron cultivos primarios neuronales puros de retina de rata según la metodología previamente descrita por Rotstein et al. (1996). Se enuclearon los ojos con tijeras de punta curva, y se procedió a la disección de las retinas bajo lupa en solución de Hanks libre de Calcio y Magnesio (HBSS; Sigma #14170). Posteriormente, se disociaron enzimáticamente mediante la incubación con tripsina (0,25% en HBSS por 12,5 min a 36°C). Luego de la incubación, se retiró el volumen y se incubó 2 min con inhibidor de tripsina 0,25% en HBSS (Sigma #T6522). Finalmente las células fueron lavadas y

disociadas mecánicamente hasta obtener una suspensión homogénea en el medio químicamente definido para favorecer el desarrollo de neuronas (Politi, Lehar, and Adler 1988).

La siembra se realizó en placas de cultivo de 35 o 60mm de diámetro, o bien en placas Multiwell de 24 pocillos (todas de Greiner Bio-One) según el diseño experimental. En todos los casos, se pre-trataron las capsulas con Poli-L-Ornitina 0,1mg/mL (Sigma, #P4538) durante 24h para favorecer la adhesión de las neuronas al sustrato. Posteriormente, las capsulas se lavaron con HBSS e incubaron por 12h con medio condicionado de células de Schwann al 25% en DMEM obtenido a partir de una línea de células tumorales de retinoblastoma, RN22 (Adler 1982). Este pre-tratamiento ayuda al desarrollo de neuritas en las neuronas en cultivo. Luego del pre-tratamiento, las capsulas se lavaron 2 veces con Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM). Todos los cultivos fueron incubados a 36,5°C en una atmósfera humidificada controlada de 95% aire, 5% CO₂. A partir del momento de la siembra se comienzan a contar los Días *in Vitro* (DIV).

Tratamientos

Viabilidad celular

Para el análisis de viabilidad, los cultivos neuronales puros fueron sembrados en capsulas de 35 mm a una densidad aproximada de 60000 células por cm². Se realizó ensayo de MTT 2h luego de la siembra (DIV0), 24h (DIV1), 48h (DIV2), 96h (DIV4), y 144h (DIV6) post-siembra respectivamente.

Adición de Melatonina y Deprenyl

Para el análisis de la concentración efectiva de Melatonina (Sigma #M5250) o R-(-)-Deprenyl (Santa Cruz Biotechnology, sc-200742), los cultivos neuronales se sembraron en Multiwell de 24 pocillos y se asignó a cada pocillo por triplicado cada una de las concentraciones indicadas. La Melatonina [40pM, 20nM, 40nM, 100nM o 40µM] fue adicionada al cultivo 24h después de la siembra, mientras que el Deprenyl [1pM, 1nM o 1µM], como máximo 2h después de la misma. Cuando los cultivos llegaban al Día *In Vitro* deseado, se realizó el ensayo de MTT para el análisis de la viabilidad celular, o bien la fijación por las técnicas de inmunocitoquímica para el análisis de las estructuras deseadas.

Implicancia de la vía de ERK/MAPK

Se evaluó la expresión de p-ERK en cultivos neuronales tratados con Melatonina 40nM por 15min, 30min, o 1h a DIV4. Posteriormente, los cultivos fueron analizados por la técnica de Western Blot (Laemmli 1970). Para el análisis de dicha expresión en neuronas fotorreceptoras, previo al agregado de la Melatonina (aproximadamente 16h antes), los cultivos fueron pre-tratados con ácido kaínico 0,25mM, un agente selectivo para eliminar las neuronas amacrinas (Abrams, Politi, and Adler 1989). La condición control se calculó como un promedio de todos los controles (vehículo de la droga) a los distintos tiempos de incubación. Dicho promedio fue referido a un valor arbitrario de 100% para evaluar porcentaje de variación entre las condiciones con Melatonina.

En el experimento para evaluar el papel de la Melatonina ante el bloqueo de la vía de ERK/MAPK, los cultivos fueron pre-tratados con U0126 (Inhibidor de MEK; Enzo Life Sciences #BML-EI282) 10 μ M en DMSO 1h antes del agregado de la Melatonina 40nM por 30min.

Deprenyl como inhibidor de la translocación de GAPDH a núcleo

En el caso del Deprenyl, para evaluar su eficacia en el bloqueo de la translocación de GAPDH a núcleo en nuestro modelo, se incubó a una concentración de 1 μ M, 2h posteriores a la siembra. Los cultivos se fijaron para inmunocitoquímica contra GAPDH a las 24h post-siembra.

Deprenyl como neuroprotector ante la falta de factores tróficos

El experimento para la eficacia del Deprenyl ante la muerte en cultivos neuronales deprivados de insulina se realizó como se describe a continuación. Las capsulas de 35mm fueron preparadas con la mitad de su volumen final conteniendo el medio neuronal químicamente definido ya mencionado. La insulina 1,6 μ M fue suplementada a las condiciones experimentales que lo requieran. La disección se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente (Rotstein et al. 1996), salvo por la resuspensión y posterior siembra que fue realizada en medio neuronal sin insulina. Como resultado, las células de los cultivos neuronales rotulados "sINS" nunca son expuestas a dicho factor. El Deprenyl se adicionó a una concentración de 1 μ M, 2h posteriores a la siembra.

Deprenyl como neuroprotector ante el agregado de Ceramida exógena

Los cultivos neuronales a DIV3 fueron incubados con C2-Ceramida (C2-Cer; Sigma #A7191) por 6h a una concentración final de 10 μ M. Los cultivos fueron a su vez pre-tratados con soluciones 1 μ M, 1nM o 1pM de Deprenyl 1h antes del agregado de la Ceramida. Finalizadas las 6h de incubación, se realizó el ensayo de MTT para el análisis de la viabilidad celular. Las condiciones denominadas “control” refieren a los cultivos suplementados con la misma concentración de vehículo (Etanol 0,04%).

Ensayo de MTT

Se adicionó el reactivo de MTT (Sigma #M2128) a las capsulas de cultivo en una concentración final de 0,5 mg/mL y se incubó a 36,5°C durante 90 minutos. Cumplido el tiempo de incubación se descartó el medio de cultivo y las células fueron expuestas a un buffer de lisis (10% Tritón x-100 y 0,01 N de HCl en Isopropanol). Luego de 15 minutos, se cuantificó colorimétricamente la diferencia entre la absorbancia a 570nm y a 650nm (Mosmann 1983) en un espectrofotómetro (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific). La viabilidad celular se calculó como porcentaje referida a la absorbancia media de la condición control, a la cual se le asignó un valor de viabilidad de referencia del 100%.

Ensayo de Ioduro de Propidio (IP)

Para el análisis de la viabilidad celular se adicionó al medio de cultivo una solución de IP (Sigma #P4170) en buffer fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) a una concentración final de 25 μ M en cada cápsula. Se incubó

durante 20 minutos a 36,5°C previo a la inmediata fijación con Paraformaldehído (PF) 2% en PBS por media hora a Temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron las capsulas 3 veces con PBS, se incubaron con la sonda nuclear DAPI por 7 minutos (1µg/mL; Invitrogen #D3571), se lavaron 3 veces y se montaron con cubreobjetos en liquido de montaje (Glicerol 95% v/v en PBS) para la observación por microscopía óptica. Las neuronas positivas para la marcación con IP se las consideró en un estado avanzado de muerte celular.

Técnicas de inmunocitoquímica

Los cultivos neuronales fueron fijados con PF 2% (Sigma #158127) en PBS por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se permeabilizaron las células con Triton-X100 0,1% por 15 minutos. Luego de 3 lavados con PBS se procedió a la incubación con una solución 1% de Albúmina Sérica Bovina (BSA, por sus siglas en inglés) en PBS para bloquear los sitios que pudieran generar señal inespecífica que afecte el análisis. Las técnicas de inmunocitoquímica utilizadas en este trabajo de tesis fueron empleadas para el análisis de estructuras celulares mediante el método de fluorescencia indirecta. Los anticuerpos primarios fueron incubados a 4°C durante toda la noche en diluciones en PBS del rango de 1:50 para Rho4D2 (Cedido por el Dr. RS Molday); 1:50 para Mel1A/B-R (Santa Cruz Biotechnology sc-398788); 1:100 para HPC-1 (Sigma #S0664); 1:800 para CRX (Cedido por Dr. Cheryl Craft); 1:100 para GAPDH (Cell Signaling Technology #2118). Luego de 3 lavados con PBS, los anticuerpos secundarios Cy2 o Cy3 anti-ratón o anti-conejo según el

caso (Jackson ImmunoResearch), se incubaron por 1h a Temperatura ambiente en una concentración 1:200 en PBS.

Luego de 3 lavados con PBS, las sondas nucleares se incubaron por 7 minutos a temperatura ambiente en concentraciones de 1µg/ml para DAPI (Invitrogen #D3571) y 2µM para TOPRO-3. Por último, se montaron las cápsulas para microscopía con líquido de montaje. Las neuronas que evidenciaron núcleos fragmentados o picnóticos ante la marcación con las sondas DAPI o TOPRO, se consideraron apoptóticas.

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). Los cultivos neuronales fueron fijados con PF 2% durante 15 minutos e inmediatamente almacenados en etanol 70% durante un mínimo de 72h a -20°C. Las células fueron luego lavadas 3 veces durante 5 minutos con PBS a temperatura ambiente y posteriormente pre-incubadas con Buffer de la enzima TdT por 15 minutos. Luego fueron incubadas 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 fueron realizados omitiendo la enzima TdT. Esta enzima cataliza la unión del nucleótido BrdUTP al ADN en el sitio correspondiente a la Timina. De esta manera, se detectó la fragmentación

internucleosomal del ADN por inmunocitoquímica. Las células con núcleos positivos para la marcación de TUNEL se consideran apoptóticas.

Microscopía y análisis de imágenes

La señal obtenida con las técnicas inmunocitoquímicas fue registrada mediante microscopía de contraste de fase y epifluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600, acoplado a un condensador para contraste de fase de campo claro y a un equipo de epifluorescencia (Y-FL). Las imágenes fueron obtenidas con una cámara Amscope (MU1403) y analizadas con el software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij>). También cuando se indique, se utilizó un microscopio confocal de barrido laser (Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM) Leica DMIRE Sp2 con objetivo de 63X de inmersión en agua. Las imágenes fueron adquiridas y procesadas con el software LCS (Leica).

Los FRs se identificaron por su morfología esférica con un cuerpo celular oscuro y pequeño de entre 5 y 10 micras, típicamente con un axón corto que remata en un pie sináptico; y mediante la expresión del factor de transcripción Cone Rod Homeobox (CRX). La marcación positiva para CRX es el marcador por excelencia que señala que una célula inició la ruta de diferenciación hacia neurona fotorreceptora (Bibb et al. 2001; Furukawa, Morrow, and Cepko 1997; Garelli, Rotstein, and Politi 2006; Rath et al. 2007).

Las neuronas amacrinas se reconocieron por ser levemente más grandes (entre 10 y 15 micras), con un cuerpo celular piriforme flanqueado por varias neuritas y mediante la inmunomarcación positiva con el anticuerpo HPC-1 específico para el reconocimiento de la proteína Sintaxina-1 que funciona como pan-marcador de neuronas amacrinas (Inoue and Akagawa 1993).

Western Blot

Se sembraron cultivos neuronales puros conteniendo la misma relación de células por superficie (60000 células/cm²) en cápsulas de cultivo de 60mm. Los cultivos celulares, fueron lavados con PBS a 4°C con inhibidores de fosfatasas [10 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄]. El buffer en estas condiciones inhibe la actividad de las fosfatasas y conserva el estado fosforilado de las proteínas de interés (Walker 2009). Las capsulas con los cultivos celulares fueron raspadas mecánicamente con espátula en 100 µl de Buffer de Lisis RIPA [10mM tris HCL (pH 7,4) 15mM NaCl, 5mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1% Tritón X-100] con una dilución 1:100 de inhibidor de proteasas (Sigma #P8340). Las muestras se incubaron en hielo por 30 minutos con agitación en vortex cada 10 minutos. Luego se centrifugaron a 14000g durante 15 minutos a 4°C.

A partir del sobrenadante, se cuantificaron las proteínas totales en solución según la técnica descrita por Bradford (1976). Los extractos proteicos fueron disueltos en buffer Laemmli [Tris 6 mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%, glicerol 20% y β-mercaptoetanol 5%] a 95°C durante 5 min. Se sembraron 30 µg de proteínas en cada calle de un gel de poliacrilamida según el método SDS-PAGE (Laemmli 1970).

La corrida electroforética se realizó en un sistema Mini-PROTEAN® Tetra Vertical Electrophoresis Cell de BioRad. Las proteínas se identificaron utilizando un marcador de peso molecular de 10 a 250 kDa (Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards - BioRad #1610375). La transferencia se realizó en una membrana de PVDF (Immobilon®-P, 0,45

μm). Las membranas, fueron lavadas con PBS-Tween 20 [0,05%], 10mM NaF, 1 mM Na_3VO_4 .

El bloqueo se realizó con BSA 5% en PBS-Tween 20 [0,05%]. Los anticuerpos primarios se incubaron durante la noche con agitación continua a 4°C en concentraciones de 1:1000 según las indicaciones del fabricante: p-ERK (Santa Cruz Biotechnology sc-7383); ERK 1/2 (Cell Signaling Technology #9102); GAPDH (Cell Signaling Technology #2118). Como anticuerpos secundarios se utilizaron anti-ratón o anti-conejo conjugados con enzimas peroxidadas de rabano (HRP) incubados en una concentración 1:1000 durante 1h a temperatura ambiente. La quimioluminiscencia fue generada utilizando una solución de detección [Luminol 2,7mM; 4-Iodofenol 0,175mM; Tris-base 100mM pH 8; H_2O_2 0,02 % (v/v)]. El Luminol y el 4-Iodofenol se obtuvieron de la empresa Sigma (#A8511 y #I10201 respectivamente).

La señal se detectó mediante el uso de placas fotográficas (Amersham Hyperfilm™ ECL, GE Healthcare). La densitometría óptica de las bandas fue cuantificada con el software ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>).

qRT-PCR

La técnica de la reacción en cadena cuantitativa de la polimerasa en tiempo real se utilizó para evaluar la expresión de los genes de *rodopsina* respecto a *crx*, utilizando la enzima HPRT como gen *Housekeeping*. La Melatonina fue adicionada a los cultivos 24h después de la siembra, y el análisis realizado a DIV6.

Brevemente, se extrajo el ARNm de cultivos celulares y se cuantificó por espectrofotometría según el protocolo del reactivo Quick-Zol (Kalium

Technologies). A continuación se partió de 1 µg de ARNm para obtener una concentración de 40 ng/µl de ADNc mediante la incubación con una transcriptasa reversa, random primers, dNTPs e inhibidor de ARNasas según las indicaciones del fabricante (Thermo Scientific #EP0441). Por último, se siguió el protocolo del kit FastStart Essential DNA Green Master (Roche) para cuantificar la intercalación del colorante SYBR Green I en los amplicones obtenidos.

La reacción se llevó a cabo en un termociclador Rotor Gene 6000 y el análisis de los datos se realizó con el software Rotor-Gene 1.7.87. Para la cuantificación se utilizó el método del Ct, definido como el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente sobrepase el umbral de detección.

Primers utilizados:

Rodopsina Forward: 5' CACCCTTGGAGGTGAAATCGG 3';

Rodopsina Reverse: 5' TGATTCTCCCCAAAGCGGAA 3';

CRX F: 5' ACCCAGTACCCGGATGTGTA 3';

CRX R: 5' GCCCTGCGATTCTTGAACCA 3';

HPRT F: 5' CTCATGGACTGATTATGGACAGGAC 3';

HPRT R: 5' GCAGGTCAGCAAAGAACTTATAGCC 3'.

Análisis estadístico

En los análisis por inmunocitoquímica, para cada condición se analizaron un total de 5 campos por duplicado conteniendo un promedio de 100 células cada uno. Los gráficos representan la media de al menos dos experimentos independientes (N=2) con su respectivo error estándar de la media (SEM). En el caso de tratarse de un único experimento, se muestra la media de cada

condición con su respectivo desvío estándar (SD). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA simple con test de comparación de Dunnett o Tukey (en caso de múltiples condiciones), ANOVA doble con test de comparación de Bonferroni, o bien utilizando la prueba “t” de Student (t-Student) a dos colas (cuando se evaluaron solo dos condiciones). En ambos casos, un asterisco (*) corresponde a una significancia estadística con un $p < 0,05$; (**) corresponde a un $p < 0,01$ y (***) a un $p < 0,001$. Las condiciones control, refieren a la mayor concentración utilizada de Etanol absoluto (correspondiente al vehículo) para Melatonina y Deprenyl, siempre menor a 0,1% (v/v).

**CAPITULO I:
ROL DE LA MELATONINA COMO
FACTOR DE SUPERVIVENCIA Y
DIFERENCIACIÓN EN NEURONAS
FOTORRECEPTORAS**

RESULTADOS

Caracterización neuronal

Primeramente se realizó la identificación de las neuronas de interés mediante la inmunomarcación con los anticuerpos específicos para cada una.

La figura 6B muestra la co-marcación entre el anticuerpo anti-CRX y la sonda DAPI en cultivos neuronales en el cuarto día de desarrollo (Día *in Vitro* 4: DIV4) evidenciando la mayoría de las neuronas con un fenotipo concordante con el de neuronas fotorreceptoras.

La figura 6D muestra la co-marcación entre el anticuerpo HPC-1 con la sonda DAPI en estos mismos cultivos para evidenciar la presencia de neuronas amacrinas.

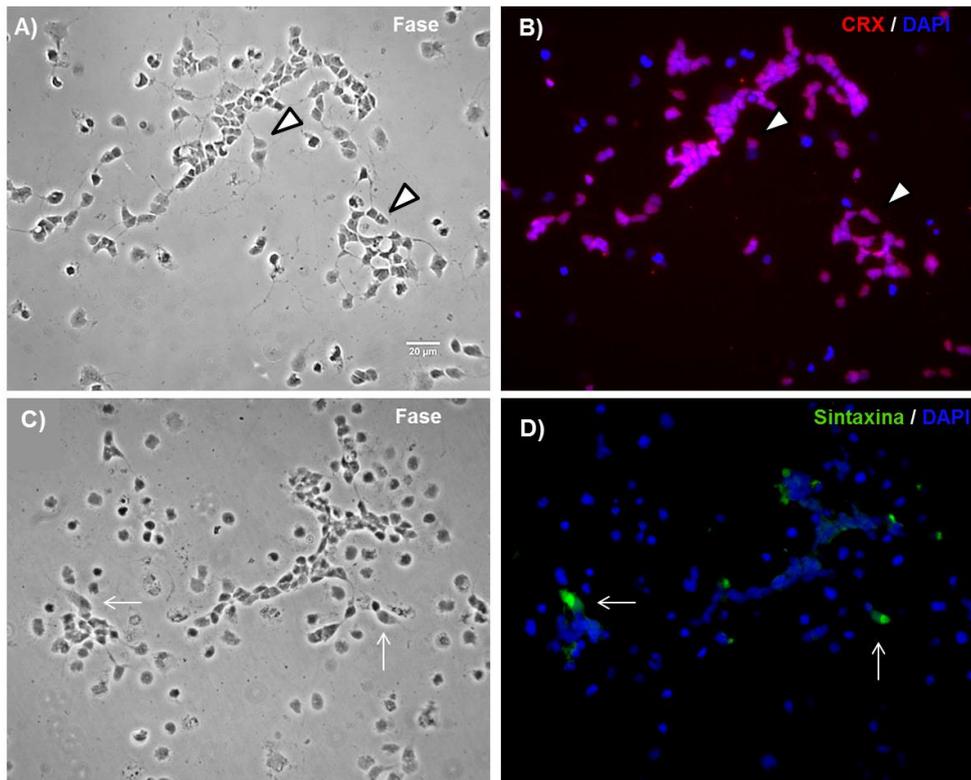


Figura 6: Caracterización de cultivos neuronales puros para fotorreceptores y neuronas amacrinas.

Cultivos neuronales puros 4 días después de la siembra (Día In Vitro 4: DIV4). A) y C) representan microfotografías por microscopía de contraste de fase. B) y D) representan microfotografías de fluorescencia para la co-marcación con el anticuerpo anti-CRX (rojo) o anti-syntaxina (verde) respectivamente y la sonda nuclear DAPI (azul). Las cabezas de flecha representan neuronas fotorreceptoras, mientras que las flechas finas representan neuronas amacrinas. La barra de escala representa 20µm.

Estado basal de los cultivos neuronales puros

Seguidamente, se realizó la cinética de la viabilidad celular medida por el ensayo de MTT en los cultivos neuronales puros. El tiempo se midió en Días *In Vitro* (DIV), contados a partir del momento de la disección e inmediata siembra en las capsulas de cultivo (Figura 7).

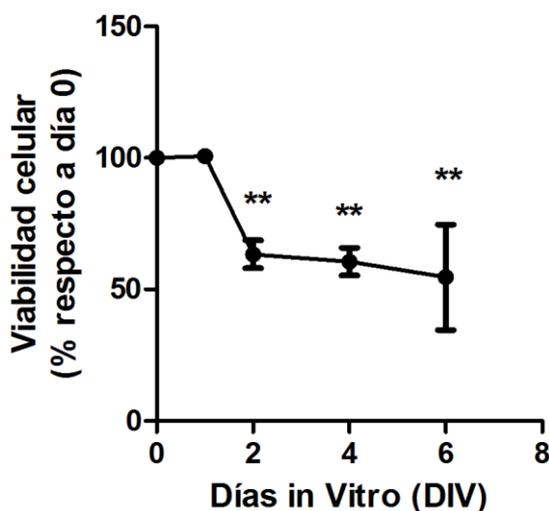


Figura 7: Cinética de la viabilidad celular en cultivos neuronales puros.

Viabilidad celular con respecto al día 0 medida por el ensayo de MTT. (**: $p < 0,01$; ANOVA Dunnett respecto a día 0; $N=5$).

A las 24h en cultivo, no se aprecian variaciones significativas en la viabilidad celular. A partir del DIV 2 se aprecia una disminución estadísticamente significativa respecto al control del 40% ($p < 0,01$) que se extiende hasta el DIV4. Para el DIV6 la disminución en la viabilidad fue cercana al 50% ($p < 0,01$).

Efecto de la Melatonina ante la pérdida de la viabilidad a DIV4

De acuerdo a la bibliografía (Dubocovich 2003; Giusti et al. 1995; Imbesi, Uz, and Manev 2008; Iuvone and Gan 1994; Kaur et al. 2012; Lee et al. 2001; Witt-Enderby et al. 2006) definimos una curva de concentración-respuesta de Melatonina para poder revertir el efecto de la pérdida de la viabilidad a DIV4 (Figura 8). Si bien ninguna concentración arrojó resultados significativos, se observa una tendencia para la condición de 40nM.

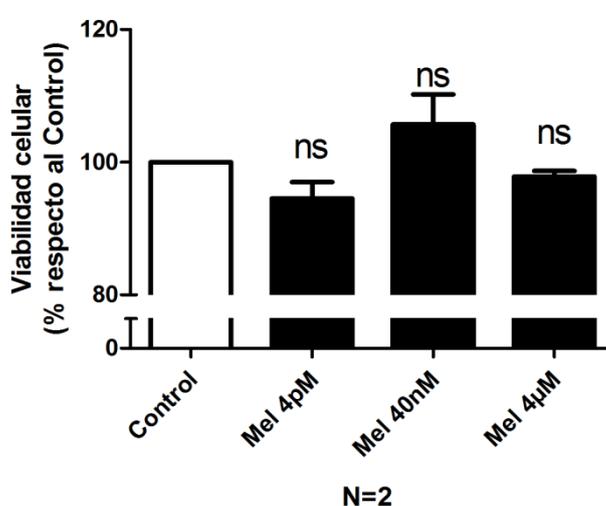


Figura 8: Concentración-respuesta de Melatonina (Mel) sobre la viabilidad celular en cultivos neuronales a DIV4.

Se muestra el análisis de la viabilidad celular para concentraciones crecientes de Melatonina (Mel) en cultivos neuronales de DIV4 por el ensayo de MTT. La viabilidad celular se muestra como porcentaje respecto a la condición control (ns: Diferencias estadísticamente no significativas; ANOVA Dunnett respecto al control; N=2)

Decidimos explorar esta tendencia, basándonos en que el rescate por parte de la Melatonina de la viabilidad a DIV4 puede no ser detectada por el ensayo de MTT. Tal es así que evaluamos el porcentaje de núcleos fragmentados o picnóticos para analizar el efecto de la Melatonina 40nM a DIV4 ante la apoptosis (Figura 9).

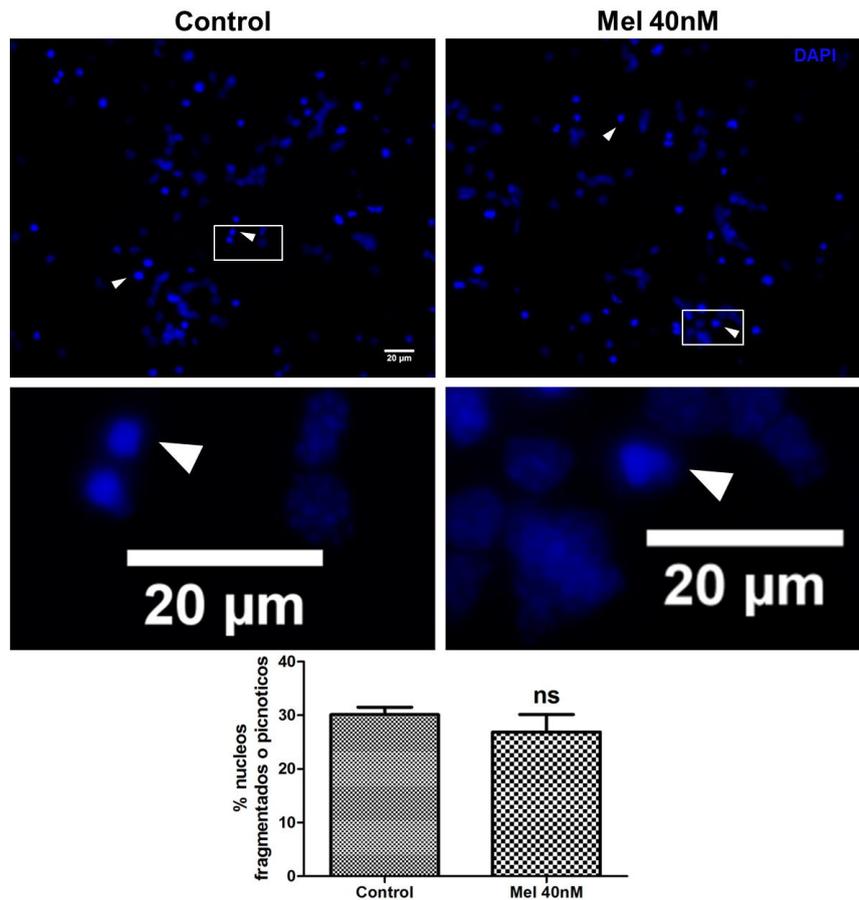


Figura 9: Efecto de la Melatonina sobre la picnosis nuclear a DIV4

Microfotografías de fluorescencia de cultivos neuronales a DIV4 marcados con la sonda nuclear DAPI evidenciando núcleos fragmentados o picnóticos (cabezas de flecha) en cultivos control o tratados con Melatonina 40nM. La barra de escala representa 20μm. El grafico muestra el porcentaje de neuronas con núcleos fragmentados o picnóticos respecto del total para cada condición. (ns: Diferencias estadísticamente no significativas; t-Student; N=2).

Efecto de la Melatonina ante la pérdida de la viabilidad a DIV6

A continuación realizamos el mismo análisis de viabilidad por el ensayo de MTT, pero esta vez en cultivos neuronales a DIV6 y con la curva de concentración-respuesta focalizada en las magnitudes del orden de la nanomolaridad (Figura 10).

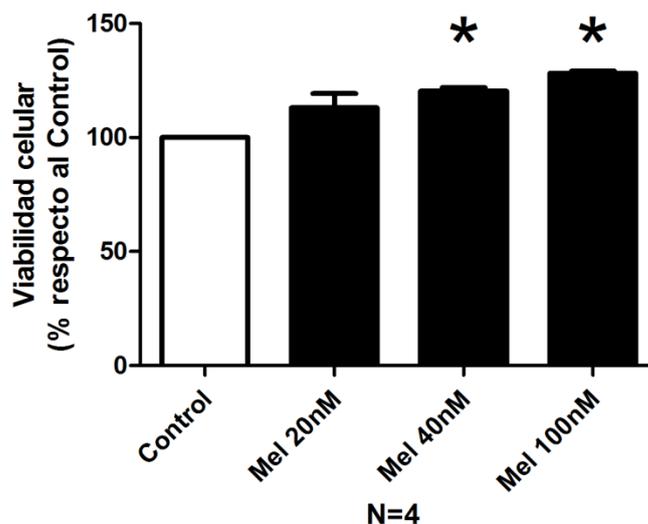


Figura 10: Concentración-respuesta de Melatonina sobre la viabilidad celular en cultivos neuronales a DIV6.

Se muestra el efecto de la Melatonina ante la viabilidad celular en cultivos neuronales a DIV6 respecto a la condición control, medida por el ensayo de MTT. (*: $p < 0,05$; ANOVA Dunnett respecto a la condición control; N=4)

Como puede verse, la Melatonina adicionada a partir de 40nM genera un rescate en la pérdida de viabilidad a DIV6 de alrededor del 10% ($p < 0,05$). A raíz de este resultado, se decidió utilizar la concentración de 40nM para el análisis del efecto de la Melatonina ante la apoptosis en cultivos neuronales a DIV6. En primer lugar, se analizó la fragmentación y picnosis nuclear por microscopía confocal utilizando la sonda nuclear TOPRO-3 (Figura 11). La condición control a DIV6 evidenció una muerte celular del 40%. El tratamiento

con Melatonina 40nM disminuyó significativamente el porcentaje de picnosis y fragmentación nuclear en el orden del 10% ($p < 0,05$).

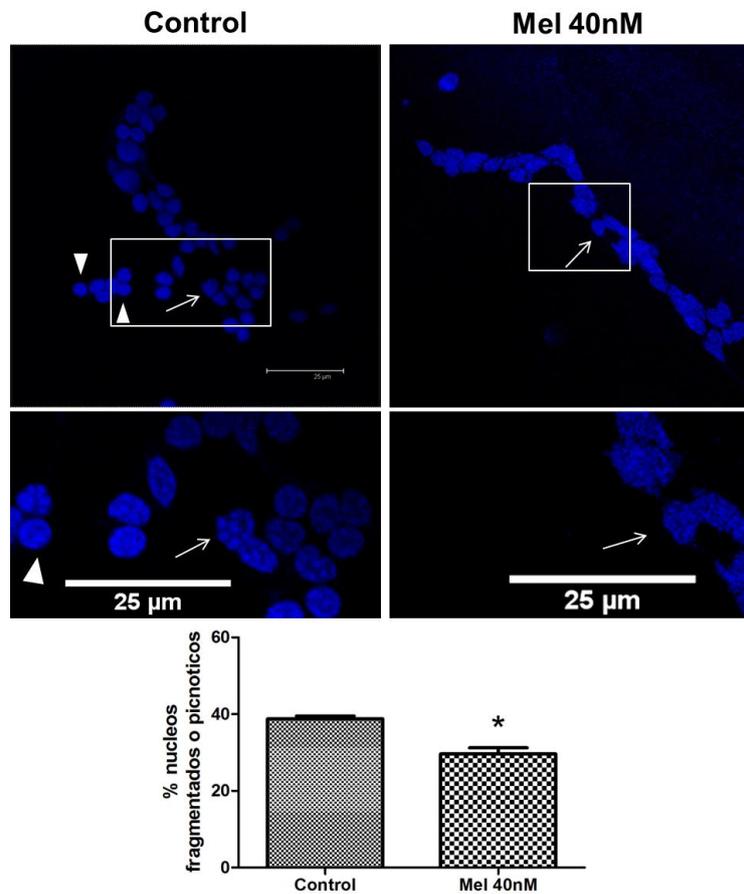


Figura 11. Efecto de la Melatonina sobre la fragmentación nuclear a DIV6

Microfotografías de fluorescencia por microscopía confocal mostrando núcleos fragmentados (flechas finas) o picnóticos (cabezas de flecha) a DIV6 marcados con la sonda nuclear TOPRO-3. La barra de escala representa 25 micrómetros. El gráfico muestra el porcentaje de neuronas con núcleos fragmentados o picnóticos respecto del total para cada condición. (*: $p < 0,05$; t-Student; N=4)

Siguiendo esta línea experimental evaluamos la muerte por apoptosis (Figura 12) utilizando el ensayo de TUNEL como marcador por excelencia, y la sonda Ioduro de Propidio como marcador de muerte neuronal (Moreno, Cuéllar, and González 2000). Los núcleos de las células marcadas positivamente para TUNEL (en verde; Figura 12) experimentan fragmentación internucleosomal,

que es detectada por la enzima presente en dicha técnica. Sin embargo no se registraron diferencias significativas entre la condición de Melatonina 40nM a DIV6 y su control. Por el contrario, la marcación con IP, reveló una disminución de alrededor del 20% de la muerte en las condiciones tratadas con Melatonina ($p < 0,05$).

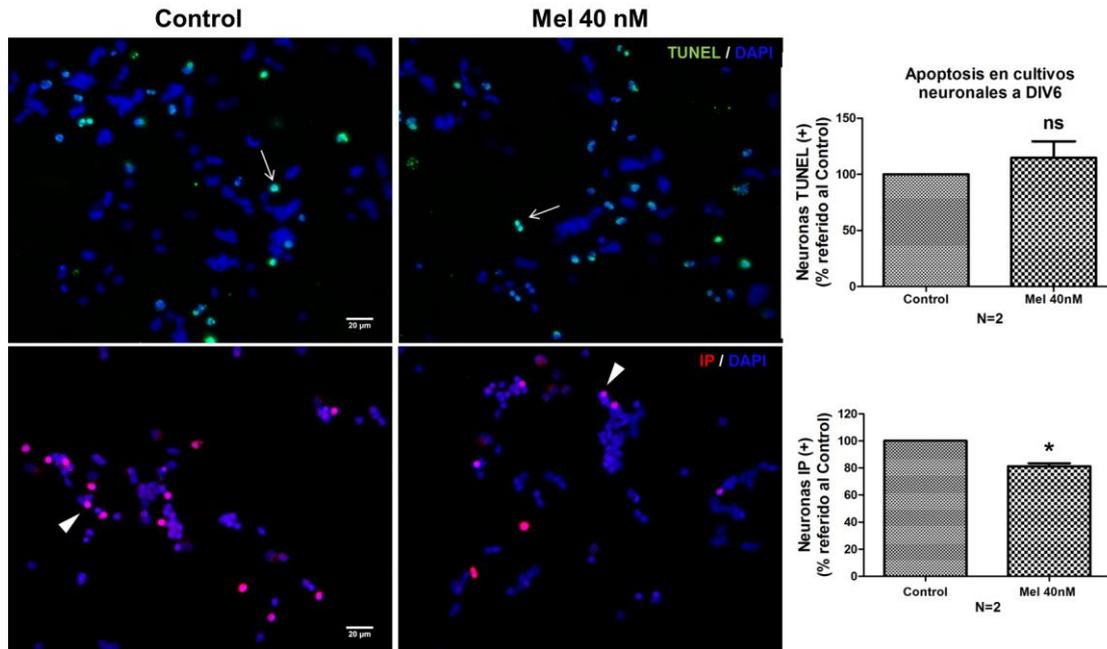


Figura 12: Efecto de la Melatonina ante la muerte a DIV6.

Microfotografías de fluorescencia de cultivos neuronales a DIV6 mostrando la co-marcación entre la sonda DAPI (azul) y la sonda Ioduro de Propidio (IP; rojo), o bien por la técnica de TUNEL (verde). Se señalan las células presentando núcleos celulares positivos para el ensayo de TUNEL (flechas finas), o para el de IP (cabezas de flecha). Las barras de escala representan 20 μ m. Los gráficos muestran el porcentaje referido al control de neuronas positivas para cada marcación. (ns: diferencias no significativas; *: $p < 0,05$; t-Student; N=2)

Mecanismo de acción de la Melatonina

Para entender el mecanismo por el que la Melatonina ejerce su efecto neuroprotector, evaluamos la localización de los receptores de Melatonina presentes en nuestros cultivos celulares a DIV0 y DIV4. Para esto, utilizamos un anticuerpo (Mel1A/B-R) que detecta a ambos receptores de Melatonina (MT1 y MT2) sin distinción entre sí. La figura 13 muestra la distribución de dichos receptores en cultivos neuronales puros, y a su vez la inmunomarcación con el anticuerpo anti-CRX mostrando las neuronas fotorreceptoras. Lo que se observa es que todas las neuronas positivas para CRX no mostraron co-marcación con el anticuerpo Mel 1A/B-R. Por el contrario, todas las neuronas positivas para el marcador de receptores de Melatonina, resultaron negativas para la inmunomarcación con CRX.

Estos resultados, en concordancia con la bibliografía (Dubocovich 2003; Dubocovich and Markowska 2005; Wiechmann and Sherry 2013), muestran que las neuronas fotorreceptoras de rata no expresan los receptores de Melatonina en su membrana plasmática, y que a medida que avanza el desarrollo en el cultivo, la marcación se hace más intensa en células cuya morfología se corresponde con la de las neuronas amacrinas evidenciado por el soma de mayor tamaño que los fotorreceptores, y la presencia de neuritas multipolares.

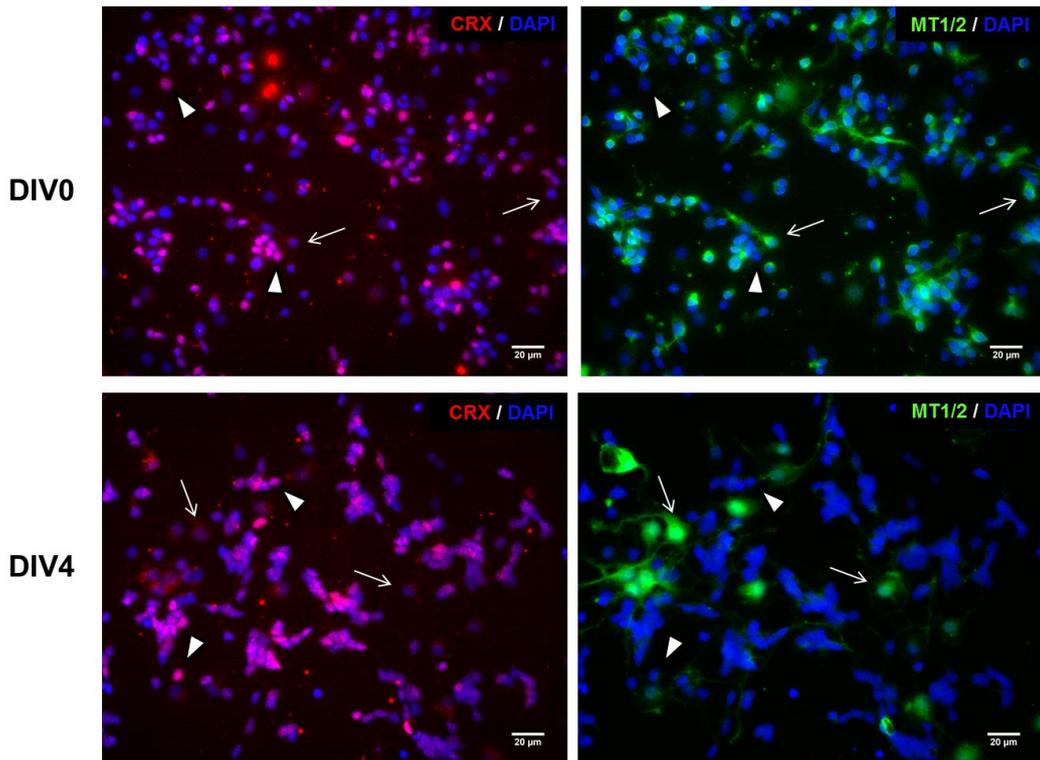


Figura 13: Distribución de los receptores de Melatonina MT1 y MT2 en cultivos neuronales puros.

Microfotografías de fluorescencia de cultivos neuronales puros a DIV0 y DIV4. En verde se muestra la inmunomarcación para los receptores de Melatonina MT1 y MT2 en simultáneo; en rojo, las neuronas fotorreceptoras marcadas con CRX; en azul la sonda nuclear DAPI. Las cabezas de flecha marcan neuronas fotorreceptoras negativas para la inmunomarcación de receptores de Melatonina. Las flechas finas marcan la ausencia del marcador para neuronas fotorreceptoras (CRX) en células que expresan los receptores de Melatonina. La barra de escala representa 20µm.

La Melatonina activa la vía de ERK/MAPK en neuronas fotorreceptoras

A partir de aquí, nos centramos en investigar la vía por la cual la Melatonina ejerce su efecto protector a DIV6. Guiándonos por los reportes en la bibliografía (Tocharus et al. 2014) y trabajos de nuestro laboratorio (German et al. 2006) que sugerían la activación de la vía de ERK/MAPK, decidimos evidenciar dicha activación mediante el protocolo de Western Blot. Evaluamos la expresión de la forma activa de la proteína ERK1/2 (p-ERK1/2), respecto al pool de proteína no fosforilada (ERK1/2, también llamadas p42 y p44 respectivamente). Se utilizó la proteína GAPDH como control de carga de la siembra en el gel de electroforesis.

Se analizó la expresión de p-ERK en cultivos neuronales puros pre-tratados con ácido kaínico para eliminar la población de neuronas amacrinas (Figura 14, derecha) o sin pre-tratamiento (Figura 14, izquierda). Se observa un pico de aumento del 70% respecto a la condición control en la expresión de p-ERK en los cultivos neuronales a DIV4 pre-tratados con ácido kaínico e incubados con Melatonina por 30 minutos ($p < 0,01$). Dicho pico en la expresión es atribuible a la población de neuronas fotorreceptoras, debido a la ausencia de neuronas amacrinas por el tratamiento con ácido kaínico.

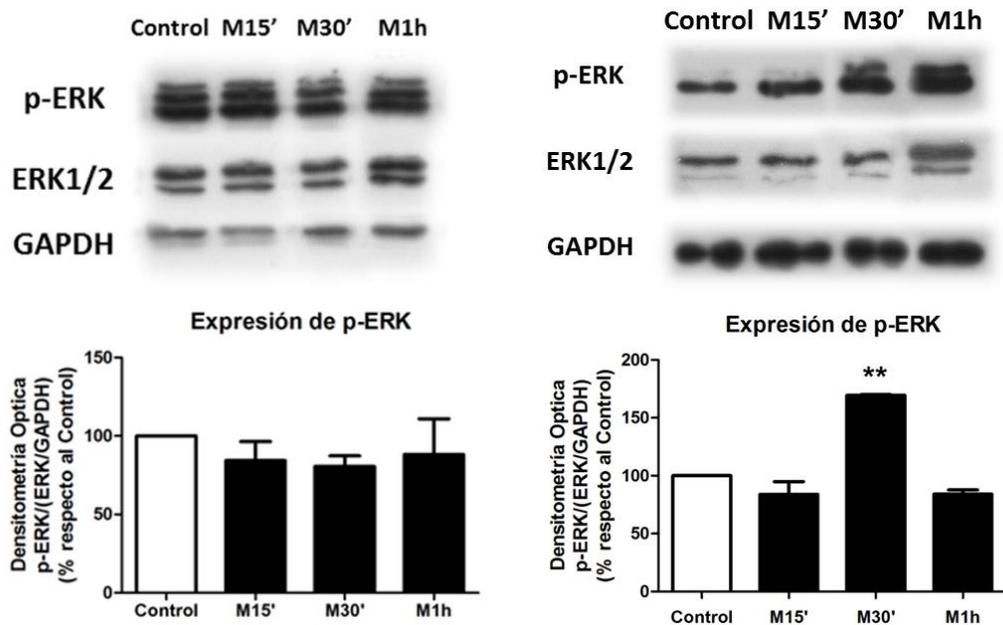


Figura 14: Cinética de la fosforilación de ERK ante la incubación con Melatonina

Se muestra el patrón de bandeo observado para la proteína activada p-ERK (bandas superiores), ERK1/2 (bandas centrales) en su forma nativa, y GAPDH como control de carga (bandas inferiores). Los gráficos muestra el análisis de la densitometría óptica de las bandas respecto a la condición control. Izquierda: Cultivos neuronales puros a DIV4 incubados con Melatonina 40nM por 15 min, 30 min y 1h. Derecha: Cultivos pre-tratados con ácido kaínico 0,25mM 16h previas al agregado de Melatonina. (**: $p < 0,01$; ANOVA Tukey; N=2)

Para comprobar que el pico de aumento de p-ERK en cultivos tratados con Melatonina está asociado a la vía de ERK/MAPK clásica, se realizó un experimento adicional en el que se pre-trataron los cultivos con un inhibidor *upstream* de dicha vía. El U0126 (inhibidor de MEK, que fosforila a ERK) fue adicionado una hora antes del agregado de la Melatonina (Figura 15).

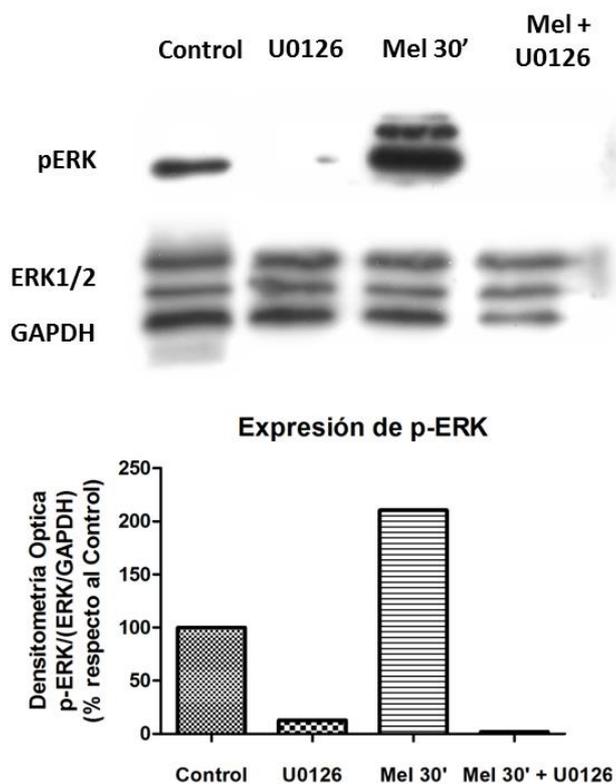


Figura 15: Activación de la vía de ERK/MAPK en cultivos neuronales a DIV4.

Cultivo neuronales puros pre-tratados con ácido kaínico y pre-incubados con U0126 10 μ M (inhibidor de la vía de ERK/MAPK) previo al agregado de la Melatonina 40nM por 30'. Se muestra el patrón de bandeado observado para la proteína activada p-ERK (bandas superiores), ERK1/2 (bandas centrales) en su forma nativa, y GAPDH como control de carga (bandas inferiores). El gráfico muestra el análisis de la densitometría óptica de las bandas respecto a la condición control. Se realizó un único experimento.

Lo que la figura 15 evidencia es el aumento en la expresión de p-ERK en los cultivos tratados con Melatonina por 30' respecto a la totalidad de la proteína ERK1/2 que se mantiene constante en todas las condiciones. Se muestra a su vez como el U0126 actúa inhibiendo la vía de ERK/MAPK. Adicionalmente, este resultado es atribuible a la población de neuronas fotorreceptoras, ya que experimento sigue la línea de su predecesor en el

sentido de estar pre-tratado con ácido kaínico, que elimina la población de neuronas amacrinas.

Análisis de la Melatonina como agente de diferenciación de neuronas fotorreceptoras

Dentro de la población de FRs en cultivos neuronales a DIV6, existen aquellos que se encuentran en un estado más avanzado de diferenciación, en el que además de expresar el factor de transcripción CRX, expresan marcadores del ciclo visual, como es la Rodopsina. Se decidió evaluar, ya que los cultivos tratados con Melatonina evidenciaban una disminución en el número de células muertas, si aquellas que sobrevivían podrían estar expresando marcadores de diferenciación. A tal efecto, se analizó la expresión de Rodopsina en cultivos neuronales a DIV6. La figura 16 muestra que no se hallaron diferencias significativas en la expresión de Rodopsina ante el agregado de Melatonina 40nM respecto al control en cultivos neuronales de DIV6 evidenciada por la marcación con el anticuerpo Rho4D2 (anti-rodopsina).

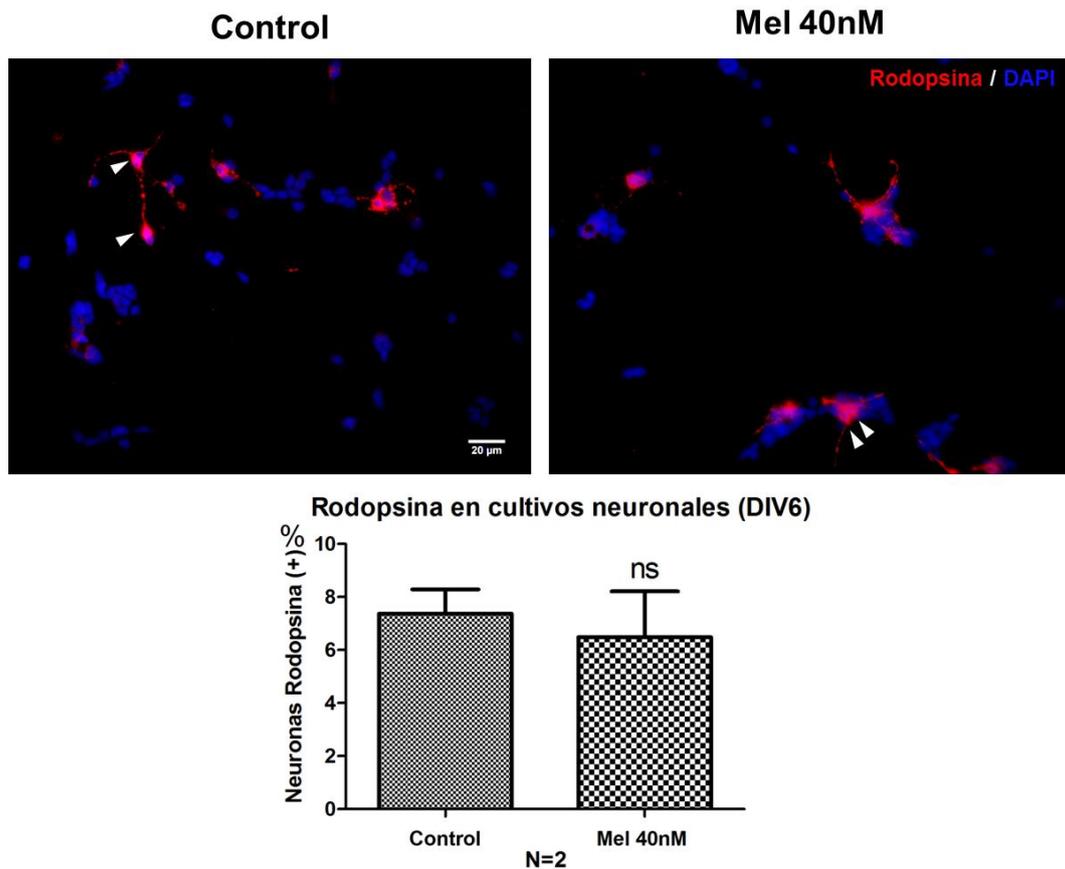


Figura 16: Efecto de la Melatonina en la expresión de Rodopsina en fotorreceptores a DIV6

Microfotografías de fluorescencia de cultivos neuronales a DIV6 mostrando la co-marcación entre la tinción con la sonda nuclear DAPI (azul), y el anticuerpo anti-rodopsina (rojo) evidenciando las neuronas fotorreceptoras diferenciadas (cabezas de flecha). Barra de escala: 20µm. (ns: Diferencias estadísticamente no significativas; t-Student; N=2).

Ya que los resultados anteriores no arrojaron diferencias significativas entre las condiciones para la expresión proteica de este marcador ante el agregado de la Melatonina, nos preguntamos si el efecto de esta última podría no ser detectado aún a nivel proteico, pero si a nivel de la expresión génica de Rodopsina. A tal efecto, se realizó una qRT-PCR para evaluar la expresión de los ARN mensajeros (ARNm) de *crx* y *rodopsina* referidos al gen *HPRT* como *housekeeping* (Figura 17).

**Expresión de genes de diferenciación
en cultivos neuronales
suplementados con Melatonina**

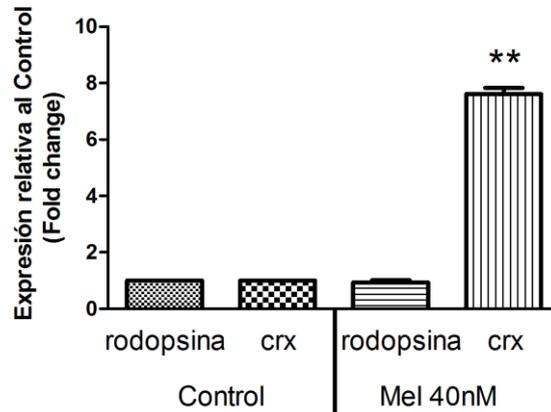


Figura 17: Expresión de genes de diferenciación en cultivos neuronales a DIV6

Expresión diferencial de los genes de *rodopsina* y *crx* en cultivos neuronales incubados con Melatonina 40nM relativos a la condición control. (**: $p < 0,01$ respecto a la condición crx control; t-Student; N=1).

La Figura 17 muestra la ausencia de variación en la expresión del mensajero de *rodopsina* en cultivos neuronales a DIV6 incubados con Melatonina 40nM respecto a la condición control. Por el contrario, se observa que la expresión del ARNm de *crx* aumenta 7 veces en cultivos tratados con Melatonina respecto a la condición control ($p < 0,01$). Esto estaría sugiriendo un rol temprano de la Melatonina ante la diferenciación de las neuronas fotorreceptoras, ya que el factor de transcripción CRX es el primero en expresarse durante el proceso de diferenciación en FRs.

DISCUSIÓN

La Melatonina juega un papel crucial en la retina. Es ampliamente reconocida por su habilidad para neutralizar radicales libres y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Giusti et al. 1995). A su vez tiene la capacidad de activar enzimas antioxidantes (Reiter et al. 2000, 2003; Rodriguez et al. 2004). En relación a su rol como agente neuroprotector mediante la activación de vías de señalización (Imbesi, Uz, and Manev 2008), se ha visto que puede activar la producción *in vitro* de factores como BDNF (Factor Neurotrófico derivado del Cerebro, por sus siglas en ingles). Se ha reportado que los efectos asociados a la función antioxidante de la Melatonina, comprenden la exposición a concentraciones del orden de micro y minimolar (Lee et al. 2001) mientras que la activación de vías de señalización neuroprotectoras se da a partir de incubación a concentraciones en el rango de nanomolaridad (Dubocovich 2003; Iuvone and Gan 1994; Kaur et al. 2012).

En este trabajo de tesis, demostramos el efecto antiapoptótico de la Melatonina a una concentración *in vitro* de 40nM. Esto sugiere que el efecto protector estaría asociado a vías de señalización.

Del diseño experimental debe considerarse que el análisis de viabilidad celular por el ensayo de MTT arrojó una pérdida de la misma a DIV4 del 40% y a DIV6 del 50% ($p < 0,01$). Al analizar el efecto de la Melatonina sobre el rescate de la viabilidad, los tratamientos son comparados con la condición control referidas al 100% en los ensayos de MTT a DIV4 y DIV6. Por lo tanto, si bien se registra un aumento en la viabilidad celular en el análisis a DIV6 para 40nM del 10% ($p < 0,05$), para poder decir correctamente que ocurre un “rescate”,

debería diseñarse un experimento que contenga entre sus condiciones la de control a DIV0.

La Melatonina secretada por los fotorreceptores como parte de los mecanismos asociados a ritmos circadianos, ejerce su acción neuroprotectora en aquellas células que poseen los receptores transmembrana acoplados a proteína G denominados MT1 y MT2 (y sus homo y heterodímeros). En la retina de rata, las principales células que expresan estos receptores, particularmente MT1, han sido identificadas como neuronas amacrinas (Fujieda et al. 1999).

Desde hace más de 10 años que se relaciona la activación del receptor MT1 con la viabilidad celular (Baba et al. 2009). Se ha reportado que la activación de dicho receptor está asociado a una serie de vías de señalización que comprenden desde la inhibición de la formación del segundo mensajero AMPc, disminuyendo la actividad de la Proteína Kinasa A y por lo tanto generando la inactivación del factor de transcripción CREB; hasta el incremento de la fosforilación de MEK 1/2 y por ende ERK 1/2 por la vía de ERK/MAPK (Masana and Dubocovich 2001).

En nuestro trabajo, puede verse una disminución de la apoptosis en cultivos analizados a días tardíos (DIV6). Esto sugiere que la Melatonina activaría vías de señalización en las neuronas amacrinas portadoras del receptor MT1. Sin embargo, en los fotorreceptores, si bien se ha descrito una modalidad de señalización autocrina al ser una molécula capaz de poder atravesar la membrana plasmática (Tosini et al. 2014; Yu et al. 2016), en nuestro modelo de cultivo de neuronas de rata, como hemos corroborado, los fotorreceptores carecen de la presencia de los receptores de membrana MT1 y

MT2 como a su vez propone la bibliografía (Dubocovich 2003). En este sentido, cobran relevancia los receptores nucleares. Estos comprenden una familia de factores de transcripción que regulan la expresión génica de proteínas involucradas en la regulación del crecimiento, desarrollo y homeostasis en un proceso ligando-dependiente. Estos ligandos pueden ser desde estrógenos, glucocorticoides, hormonas tiroideas, ácido retinoico e incluso ácidos grasos. La superfamilia de receptores nucleares incluye además un gran número de receptores para los que no se han identificado ligandos, conocidos como receptores huérfanos (Glass and Rosenfeld 2000). Se ha propuesto que en la retina la Melatonina podría actuar como reguladora de los ROR (Receptores huérfanos relacionados con RAR), particularmente del ROR- β presente de manera abundante en la retina (Carlberg and Wiesenberg 1995; Rüdiger Hardeland 2009; Masana et al. 2007; Smirnov 2001). A pesar de esto, los trabajos más recientes proponen que en lugar de actuar como ligando directo, la Melatonina actuaría activando proteínas del ritmo circadiano como Sirtuina-1 (SIRT1) que estarían ejerciendo el efecto regulatorio sobre estos receptores nucleares (Hardeland 2018; Mayo et al. 2017). Para poner a prueba este eslabón de la cadena neuroprotectora inducida por Melatonina, se podrían pre-tratar los cultivos con un inhibidor de la de la SIRT1, tal como EX 527, que además de ser selectivo para SIRT1 por sobre el resto de las proteínas de su misma familia, no genera efectos adversos como la activación de p53, lo que sí ocurre con otros inhibidores de esta proteína.

La incubación de los cultivos neuronales a DIV4 con Melatonina 40nM, generó un pico de p-ERK en una relación tiempo dependiente a los 30 minutos de la adición al cultivo. Esto fue observado en cultivos neuronales tratados con

ácido kaínico, es decir, desprovistos de neuronas amacrinas portadoras de los receptores de membrana para Melatonina. Aunque se aprecia un valor basal de p-ERK en cultivos control, esto podría suceder a raíz del bajo porcentaje de neuronas amacrinas que no son eliminadas efectivamente por el tratamiento con ácido kaínico (Abrams, Politi, and Adler 1989) y a su vez podrían estar siendo activadas por la secreción endógena por parte de los fotorreceptores.

Con todo esto, lo que se propone es que la neuroprotección ejercida por la Melatonina estaría ocurriendo tanto a nivel de las neuronas amacrinas, como en fotorreceptores.

Respecto al rol de la Melatonina en el mantenimiento de las células rescatadas de la muerte, el análisis de la expresión de tanto la proteína como el gen de Rodopsina no arrojó diferencias en cultivos neuronales incubados con Melatonina respecto a los cultivos control. Por otro lado, se observó un incremento del mensajero del gen *crx* en los cultivos tratados con Melatonina de 8 veces con respecto al control. Ha sido reportado que la expresión de este gen sostenida en el tiempo, contribuye al mantenimiento de la población de FRs, a la vez que las mutaciones del gen *crx*, contribuyen a la degeneración en los FRs (Swain et al. 1997). Esto sugiere que la Melatonina podría estar actuando como un factor de mantenimiento de la población de FRs. De todas maneras, es necesario un diseño experimental más grande y focalizado en analizar este rol de la Melatonina. Adicionalmente, que la exposición a Melatonina por sí sola no sería suficiente para que las células progenitoras alcancen un grado de diferenciación tal que involucre un aumento en expresión de Rodopsina respecto a los cultivos no tratados. En ese sentido, trabajos de

nuestro laboratorio (De Genaro et al. 2013) han demostrado que el ácido retinoico es uno de esos factores.

Diversos trabajos (Czeczuga-Semeniuk et al. 2002; Krestinina et al. 2018; Margheri et al. 2012) han demostrado la asociación positiva entre la Melatonina y el ácido retinoico en líneas celulares, por lo cual el efecto de la adición de ambos factores ante la apoptosis y diferenciación sería uno de los posibles objetivos a investigar en futuros trabajos.

El hecho de que la Melatonina puede estar actuando como agente neuroprotector como parte de procesos asociados a los ritmos circadianos, propone a futuro investigar una serie de elementos que ayuden a esclarecer este proceso. El primero sería la cuantificación de la Melatonina en el medio de cultivo en función del tiempo, para evidenciar la secreción por parte de los fotorreceptores, o bien la medición de la actividad de las enzimas involucradas en las síntesis de esta indolamina.

Seguidamente, el análisis de la apoptosis en cultivos pre-tratados con ácido kaínico y co-incubados con Melatonina y U0126, permitirían confirmar si efectivamente la neuroprotección ejercida por la Melatonina estaría ocurriendo a través de la activación de la vía de ERK/MAPK en neuronas fotorreceptoras.

Respecto a la protección en neuronas amacrinas, la incubación con K 185 y Luzindol (inhibidor de los receptores de Melatonina MT1 y MT2 respectivamente) en cultivos neuronales, permitiría ver si el efecto neuroprotector realmente ocurre al permitir el crecimiento normal de las neuronas amacrinas pero bloqueando su respuesta ante la Melatonina.

A su vez, al ser un neurotransmisor liberado de forma rítmica, podría analizarse su efecto en cultivos suplementados con Melatonina en períodos de

12-24h, lo cual debería incrementar el efecto neuroprotector. En el torrente sanguíneo se ha reportado una vida media de 30 min (Claustrat, Brun, and Chazot 2005). Sin embargo en cultivo, la degradación parece estar sujeta a su propia oxidación por las especies reactivas de oxígeno, o bien a la acción de enzimas mitocondriales, como la MAO-A, mono amino oxidasa de tipo A (Hardeland 2010).

Por último, la Melatonina parece estar ejerciendo el efecto antiapoptótico en células que han comenzado el proceso de diferenciación, ya que el efecto es observable a DIV6. Por lo tanto, el paso siguiente es evaluar la vía de muerte por apoptosis que estaría afectando a las neuronas aún en el estado de células progenitoras indiferenciadas. Para esto se muestran los resultados de los experimentos analizados para evaluar el segundo objetivo en el siguiente capítulo.

**CAPITULO II:
LA VÍA DE NO-GAPDH-SIAH1/2 Y
SU IMPLICANCIA EN LA MUERTE
CELULAR EN NEURONAS DE LA
RETINA**

RESULTADOS

Evidencia de la vía de NO-GAPDH-SIAH en cultivos neuronales

En primer lugar, evaluamos por microscopía confocal si la translocación a núcleo de GAPDH ocurría en nuestro modelo de cultivos neuronales puros. Para esto, evaluamos por inmunocitoquímica dichos cultivos a DIV0 (2h posteriores a la siembra), DIV1 y DIV2 marcados con la sonda nuclear TOPRO-3 y con el anticuerpo anti-GAPDH para evidenciar la localización subcelular de dicha enzima (Figura 18).

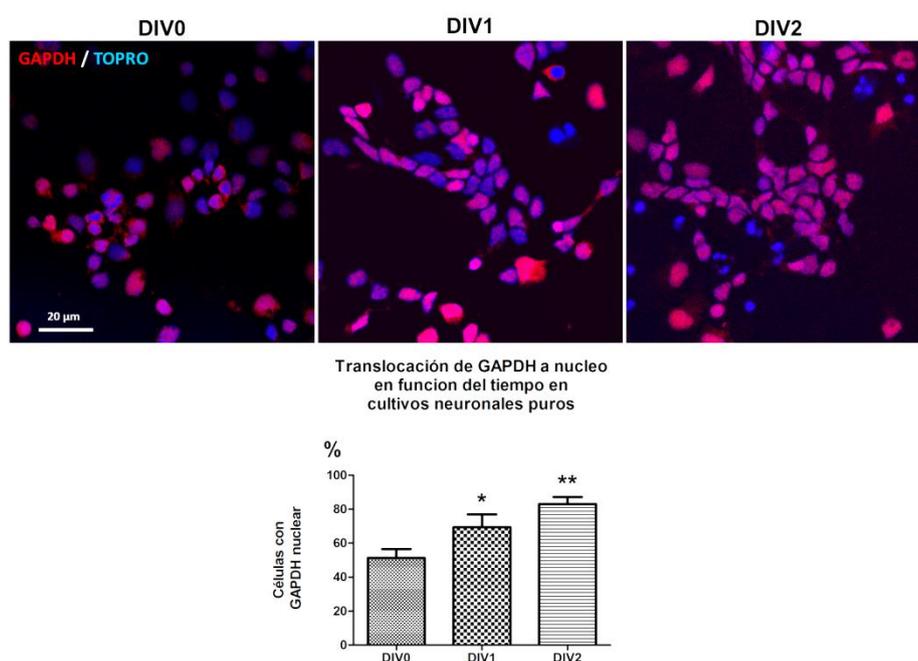


Figura 18: Translocación nuclear de GAPDH en cultivos neuronales puros

Microfotografías de fluorescencia confocal mostrando la co-marcaación entre la sonda TOPRO-3 (azul), y el anticuerpo anti-GAPDH (rojo). Escala: 20µm. En el gráfico inferior se muestra la cuantificación de neuronas con GAPDH localizado en el núcleo medido en %. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$; ANOVA Dunnett respecto a DIV0; N=1).

En la figura 18 se muestra como aumenta la translocación de la enzima GAPDH a núcleo a medida que avanzan los días en cultivo. Se observa el 50% de las células con GAPDH nuclear 2h luego de la siembra (DIV0). Seguidamente, se ve un aumento del 20% en la proporción de células con GAPDH nuclear 24h después respecto a la condición inicial ($p < 0,05$). A su vez se observa a que pasadas las 48h en cultivo (DIV2) este aumento es del 30% con respecto a la localización de GAPDH a DIV0 ($p < 0,01$).

Efectividad del Deprenyl como inhibidor de la translocación de GAPDH

A continuación se evaluó si la translocación de GAPDH a núcleo podía ser inhibida mediante el agregado de R-(-)-Deprenyl 2h después de la siembra.

A tal efecto, realizamos un ensayo de concentración-respuesta para evaluar el rescate con Deprenyl ante la pérdida de la viabilidad celular a DIV4 evaluado por la técnica de MTT (Figura 19).

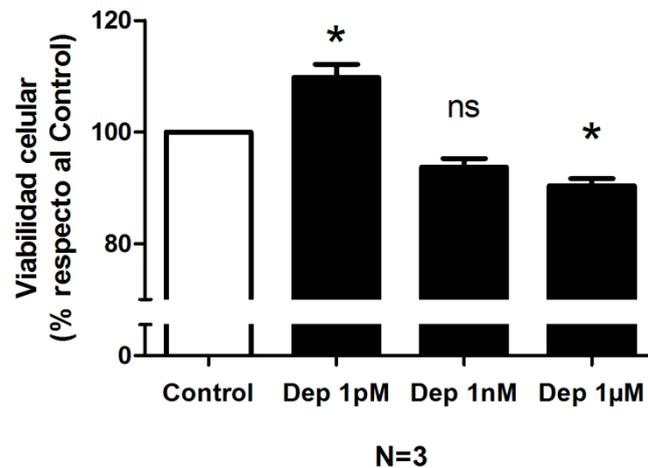


Figura 19: Concentración-respuesta para Deprenyl (Dep) en cultivos neuronales a DIV4

Se muestra el análisis de la viabilidad celular por el ensayo de MTT en cultivos neuronales a DIV4 incubados con Deprenyl (Dep) a concentraciones crecientes. Las barras representan el porcentaje de viabilidad celular respecto al control. (ns: diferencias no significativas; *: $p < 0,05$; ANOVA Dunnett respecto a la condición control; N=3).

El ensayo de concentración-respuesta evidenció un aumento del 10% en la viabilidad celular respecto a la condición control para los cultivos tratados con Deprenyl en una concentración de 1pM ($p < 0,05$). Por el contrario, puede observarse que el tratamiento con Deprenyl 1µM provocó una disminución del 10% en la viabilidad celular respecto a la condición control ($p < 0,05$).

Posteriormente, evaluamos la correlación entre el rescate ante la pérdida de la viabilidad a DIV4, y el bloqueo de la translocación de GAPDH a núcleo. Para esto, una vez obtenida la concentración necesaria para ejercer el efecto neuroprotector en nuestro modelo, evaluamos la translocación nuclear de GAPDH en cultivos neuronales a DIV1. En la figura 20 se observa como el Deprenyl 1pM durante 24h causa una disminución del 10% en la translocación de GAPDH a núcleo luego de la incubación en cultivos neuronales ($p < 0,05$).

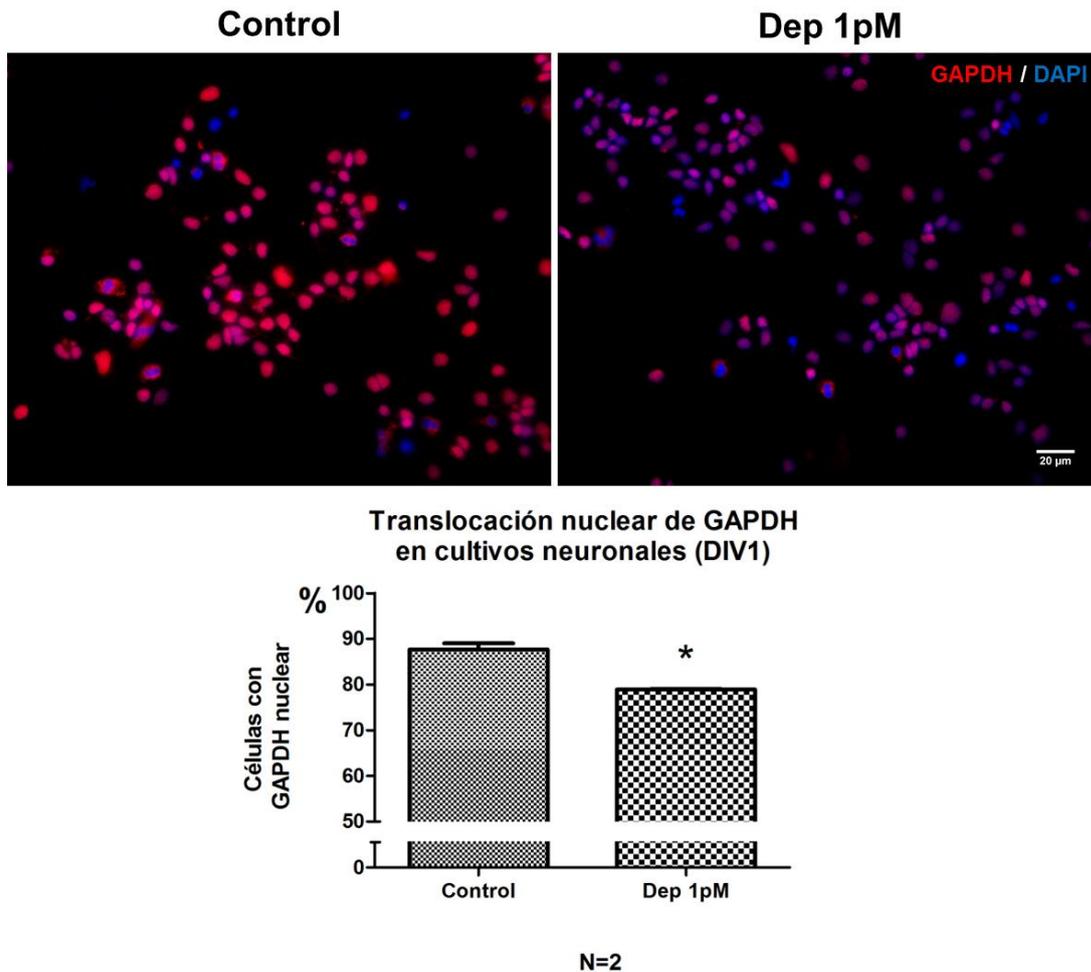


Figura 20: Efecto del Deprenyl (1pM) sobre la translocación nuclear de GAPDH en cultivos neuronales.

Microfotografías de fluorescencia de cultivos neuronales a DIV1 evidenciando la co-marcaación con la sonda DAPI (azul), y el anticuerpo anti-GAPDH (rojo). La barra representa 20 μm. El grafico muestra el porcentaje de células con GAPDH nuclear (*: $p < 0,05$; t-Student; N=2).

El bloqueo de la translocación nuclear de GAPDH resulto efectivo en la disminución de la apoptosis a DIV4

En la sección anterior se evaluó el efecto del Deprenyl en el bloqueo de la translocación a GAPDH asociado al rescate de la perdida de la viabilidad en cultivos neuronales a DIV4. El paso siguiente consistió en analizar por las

técnicas de inmunocitoquímica el efecto del Deprenyl ante el desarrollo de la apoptosis en estos cultivos.

Se analizó la fragmentación nuclear y picnosis de los cultivos neuronales puros a DIV4 así como la marcación por el ensayo de IP ante el tratamiento con Deprenyl 1pM. Se evaluó simultáneamente el efecto del Deprenyl en cultivos neuronales puros deprivados de insulina. El análisis de la figura 21 nos muestra que el Deprenyl disminuyó un 50% la picnosis nuclear en cultivos neuronales normales a DIV4 con respecto a la condición control ($p < 0,05$). Por el contrario, en los cultivos deprivados de insulina, este efecto no fue observable.

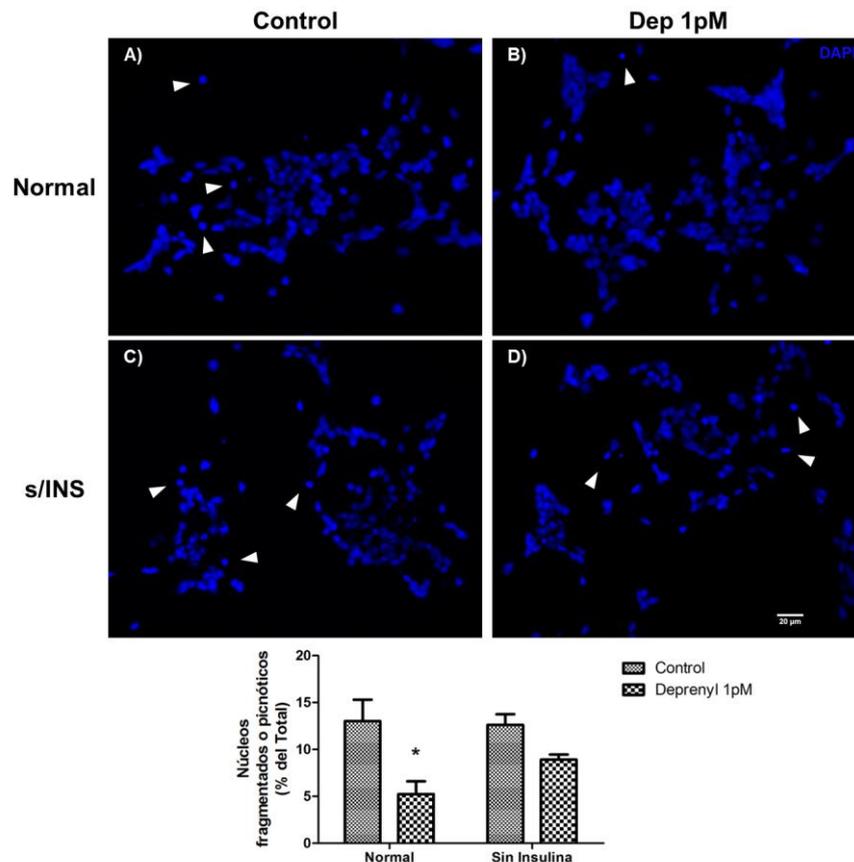


Figura 21: Efecto del Deprenyl ante la muerte neuronal a DIV4

Microfotografías de fluorescencia evidenciando la marcación con la sonda nuclear DAPI en cultivos neuronales normales (fila superior) y aquellos privados de insulina (fila inferior). Escala: 20 μ m. Debajo, la cuantificación de los diferentes tratamientos como porcentaje de núcleos fragmentados o picnóticos respecto a la condición control en cultivos neuronales a DIV4. (*: $p < 0,05$; ANOVA de dos vías con test de Bonferroni respecto a la condición control normal; N=2).

Al analizar estos mismos cultivos mediante la marcación por el ensayo de IP (Figura 22), se evidencia que el Deprenyl a una concentración 1pM no posee efecto neuroprotector en ninguno de los modelos de cultivo, a pesar de observarse una tendencia a la disminución de la picnosis en cultivos normales. Por otro lado, se observa un aumento significativo del 20% en la proporción de células IP (+) en la condición control sin insulina, respecto del control normal

($p < 0,01$). Esto podría indicar que la muerte de las células por la falta de insulina podría llevarse a cabo por un proceso diferente al esperado.

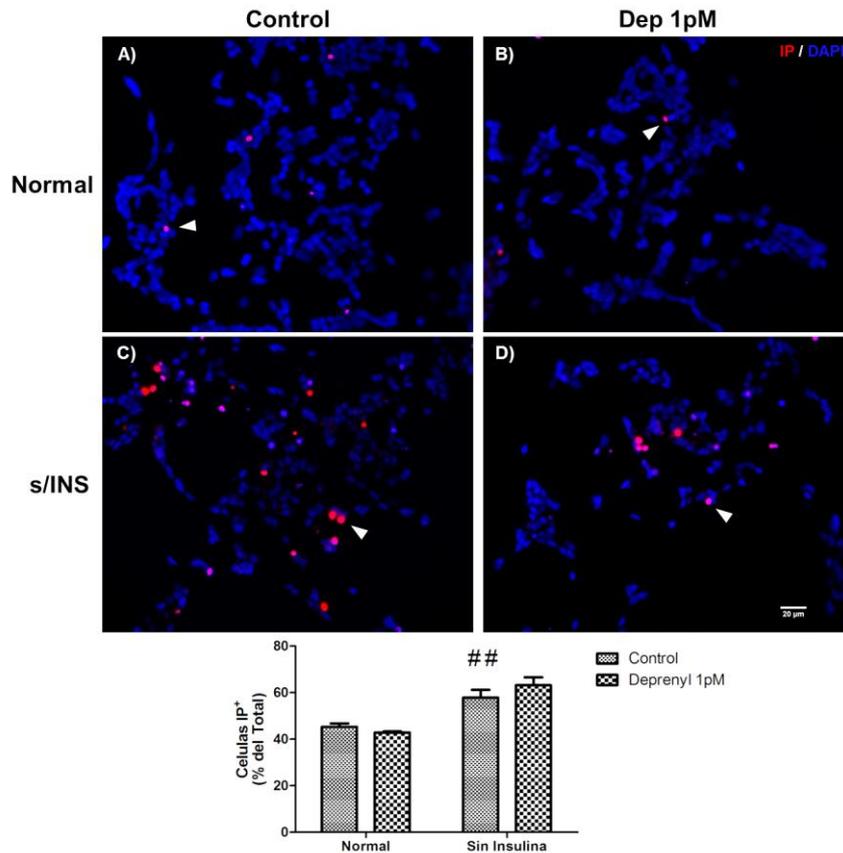


Figura 22: Efecto del Deprenyl sobre la muerte celular en cultivos neuronales a DIV4.

Microfotografías de fluorescencia evidenciando la marcación con la sonda nuclear DAPI (azul) y la sonda IP (rojo) en cultivos neuronales normales (fila superior) y aquellos privados de insulina (fila inferior). Escala: 20 μ m. Debajo, el gráfico muestra el porcentaje de núcleos positivos para la marcación con IP en cultivos neuronales a DIV4. (##: $p < 0,01$; ANOVA de dos vías con test de Bonferroni respecto a la condición control normal; N=2).

El Deprenyl no logra la protección a largo plazo ante la apoptosis evaluada a DIV6

A continuación se realizó la misma batería de ensayos que en la sección anterior, pero esta vez el análisis fue localizado en los cultivos neuronales a DIV6 para evaluar la efectividad del Deprenyl en la protección a largo plazo.

El análisis del rescate de la viabilidad ante concentraciones crecientes de Deprenyl no fue significativo para ninguna de las condiciones (Figura 23).

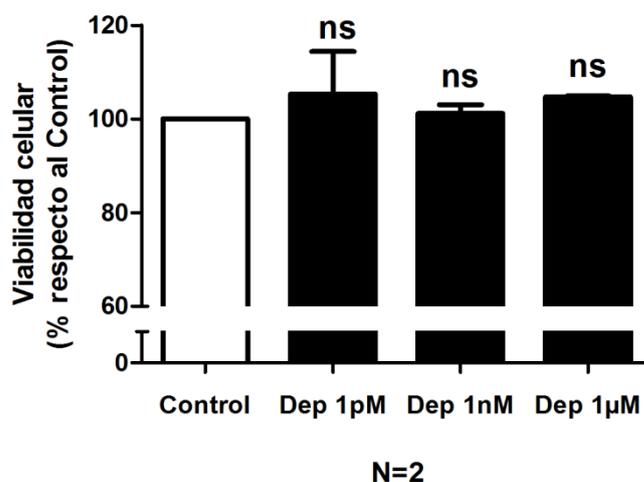


Figura 23: Concentración-respuesta para Deprenyl en cultivos neuronales a DIV6

Se muestra el análisis de la viabilidad celular en cultivos neuronales a DIV6 por el ensayo de MTT. Las barras representan el porcentaje respecto al control. (ns: diferencias no significativas; ANOVA Dunnett respecto a la condición control; N=2).

Seguidamente, el análisis de la fragmentación y picnosis nuclear en cultivos neuronales a DIV6 incubados con Deprenyl 1pM no arrojó resultados significativos asociados a la capacidad neuroprotectora del Deprenyl a días avanzados en el desarrollo (Figura 24). Al igual que a DIV4, al evaluar picnosis nuclear en cultivos privados de insulina a DIV6, no se observa un cambio en la condición control sin insulina respecto al control convencional. Sin embargo, esto se aprecia al evaluar la muerte neuronal por el ensayo de IP (Figura 25).

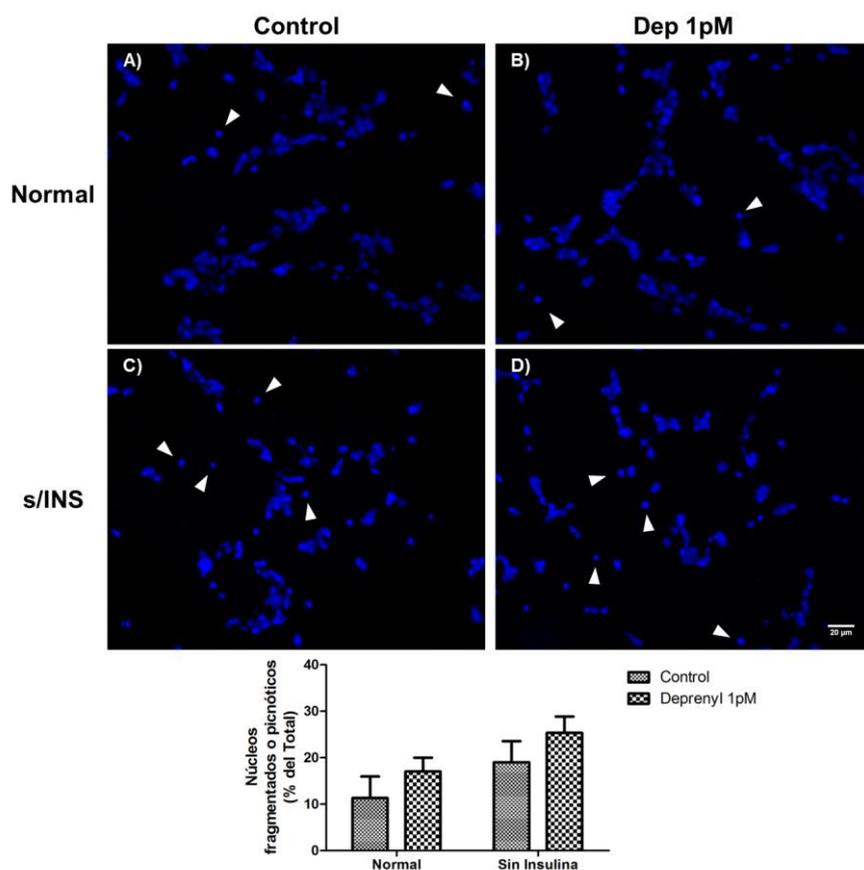


Figura 24: Efecto del Deprenyl ante la muerte neuronal a DIV6

Microfotografías de fluorescencia evidenciando la marcación con la sonda nuclear DAPI en cultivos neuronales normales (fila superior) y aquellos privados de insulina (fila inferior). Escala: 20 µm. Debajo, el gráfico muestra el porcentaje de núcleos fragmentados o picnóticos respecto a la condición control en cultivos neuronales a DIV6. ANOVA de dos vías con test de Bonferroni respecto a la condición control normal; N=2.

Al analizar la muerte por el ensayo de IP en cultivos neuronales a DIV6 puede observarse que desaparece la tendencia al rescate del Deprenyl con respecto a la condición control en cultivos normales. Por otro lado, se observa un aumento significativo ($p < 0,05$) en la marcación por IP en cultivos control sin insulina con respecto a la condición control en cultivos normales. Esto reafirma la hipótesis de que la falta de insulina estaría provocando la muerte de las

neuronas por un mecanismo distinto a la muerte regulada por la vía de NO-GAPDH-SIAH.

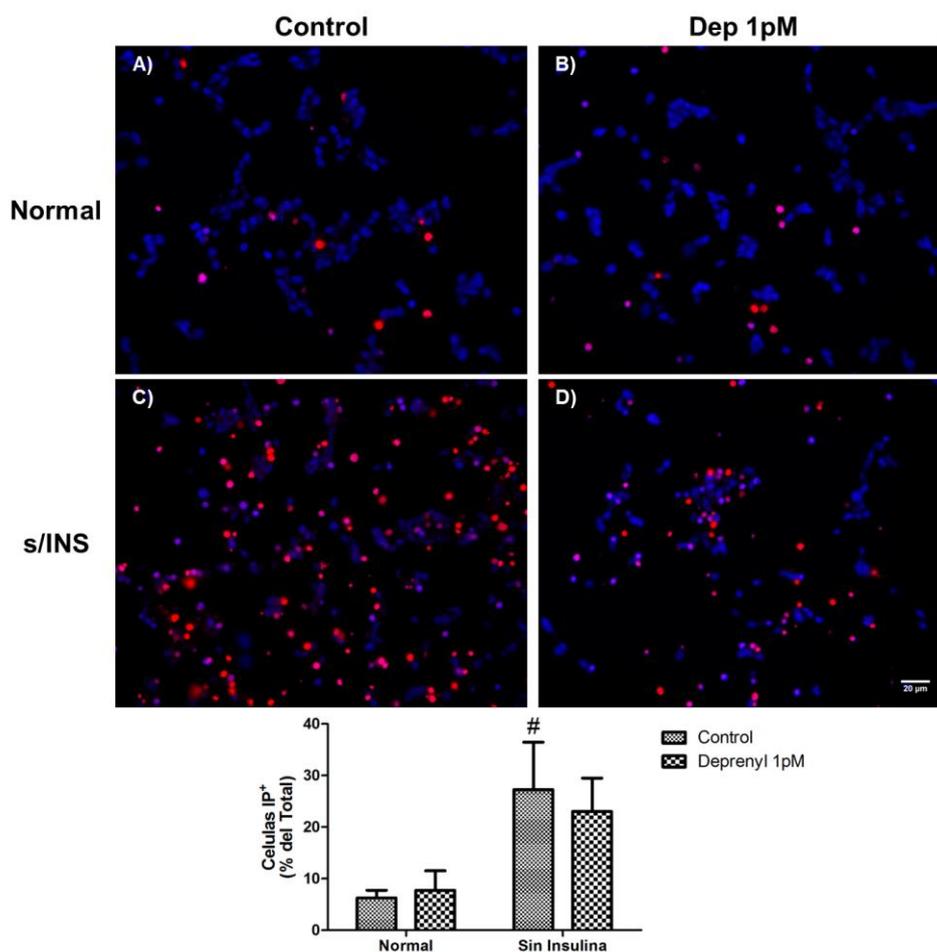


Figura 25: Efecto del Deprenyl sobre la viabilidad celular en cultivos neuronales a DIV6

Microfotografías de fluorescencia evidenciando la marcación con la sonda nuclear DAPI (azul) y la sonda IP (rojo) en cultivos neuronales normales (fila superior) y aquellos privados de insulina (fila inferior). Escala: 20 µm. Debajo, el gráfico muestra el porcentaje de núcleos positivos para la marcación con IP respecto a la condición control en cultivos neuronales a DIV6. (#: $p < 0,05$; ANOVA de dos vías con test de Bonferroni respecto a la condición control normal; N=2).

Habiendo evaluado la capacidad del Deprenyl como agente neuroprotector en cultivos neuronales puros ante la falta de factores tróficos, nos propusimos evaluar su rol en otro modelo de muerte utilizado en nuestro

laboratorio basado en el agregado exógeno de C2-Ceramida (Prado Spalm et al. 2019), que podría estar relacionado con la vía de GAPDH.

Efecto protector del Deprenyl ante el agregado de C2-Ceramida

Realizamos una curva de concentración-respuesta de Deprenyl sobre cultivos neuronales puros a DIV3 incubados con C2-Ceramida 10 μ M durante 6h (Figura 26).

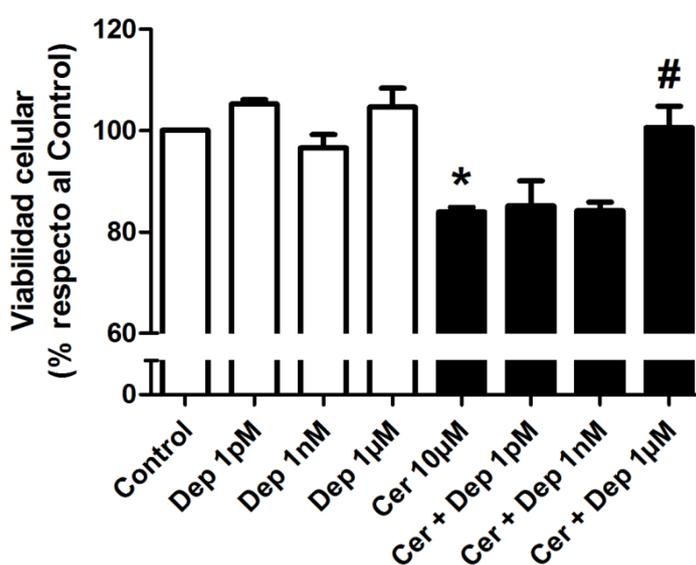


Figura 26: Concentración-respuesta de Deprenyl ante el agregado de C2-Ceramida en cultivos neuronales a DIV3

Se muestra la viabilidad celular respecto al control en cultivos pre-tratados por 1h con concentraciones crecientes de Deprenyl (Dep) en cultivos neuronales incubados con C2-Ceramida (Cer) 10 μ M por 6h a DIV3. La viabilidad celular se muestra como el porcentaje respecto a la condición control. ANOVA Tukey. N=2.

(*) Diferencia estadísticamente significativa respecto a la condición control ($p < 0,05$)

(#) Diferencia estadísticamente significativa respecto a la condición Cer 10 μ M ($p < 0,05$)

La pre-incubación con Deprenyl demostró tener un efecto concentración-dependiente en el rescate ante la pérdida de la viabilidad celular inducida por

C2-Ceramida en cultivos neuronales a DIV3 (Figura 26). Dicha pérdida puede observarse como una disminución estadísticamente significativa de alrededor del 20% en la columna de Ceramida respecto a la condición control ($p < 0,05$). El Deprenyl en una concentración de $1\mu\text{M}$ generó un rescate en la pérdida de la viabilidad celular de alrededor del 20% con respecto a la condición de Ceramida ($p < 0,05$).

DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis hemos evidenciado la presencia de una vía de muerte por apoptosis asociada a la translocación al núcleo de la enzima GAPDH ante la falta de factores tróficos.

Al disminuir la translocación de dicha enzima mediante la incubación con R-(-)-Deprenyl, un inhibidor específico de este proceso, observamos que se recupera la viabilidad celular en cultivos neuronales a DIV4 en un 10% respecto a la condición control ($p < 0,05$). Este rescate ante la pérdida de la viabilidad celular también se traduce en una disminución del 10% ($p < 0,05$) en el porcentaje de núcleos fragmentados o picnóticos evaluados a DIV4, lo cual indicaría el bloqueo de la vía apoptótica desencadenada por la translocación al núcleo de GAPDH.

Al igual que en el Capítulo 1, se llama a consideración el hecho de que por el diseño experimental, el llamado “rescate” en este caso es el del aumento de un 10 % en la viabilidad celular respecto al control ($p < 0,05$) medido por el ensayo de MTT a DIV4. Para ser considerado un verdadero rescate, debería haberse utilizado el control a DIV0 en cada experimento, lo cual para disminuir la variabilidad del diseño, se omitió.

La inhibición de la cascada apoptótica de GAPDH, sin embargo, no arrojó resultados significativos en cultivos analizados a días tardíos (DIV6), sugiriendo que ocurre un proceso dinámico en el que no es suficiente la incubación con el Deprenyl pocas horas después de la siembra para el desencadenamiento de un proceso efectivo a largo plazo. Posiblemente, esto esté relacionado con que el Deprenyl al entrar en la célula sufre cambios moleculares que le impiden volver a atravesar la membrana plasmática,

sumado al hecho de que la unión a GAPDH resulta irreversible (Magyar et al. 2006). Ante esto, la célula podría generar un pool de GAPDH *de novo* que no sería afectado por la presencia del Deprenyl ya unido a otras moléculas de GAPDH.

Debido a que el objetivo fue caracterizar la vía de muerte neuronal desencadenada ante la falta de factores tróficos, se consideró evaluar el rol de la insulina ante la apoptosis. Como hemos visto, el Deprenyl no genera disminución de la muerte neuronal a días avanzados (DIV4) ni tardíos (DIV6) en cultivos desprovistos de insulina. Lo notable fue el aumento significativo ($p < 0,05$) a DIV4 en la marcación de IP en cultivos control sin insulina respecto a cultivos control convencionales, lo cual sugiere un tipo de muerte distinta de la de NO-GAPDH-SIAH. Esto se evidencia todavía más a DIV6 al ver un aumento significativo en el porcentaje de núcleos picnóticos ($p < 0,05$) entre estas dos condiciones, sumado a un aumento altamente significativo ($p < 0,001$) en la marcación de IP en la condición control sin insulina respecto al control convencional. Según reportes de nuestro laboratorio (Politi et al. 2001) en los que se basa la adición de insulina en nuestro modelo, las neuronas amacrinas serían las más afectadas por la falta de este factor trófico. Más aun, el rol de la insulina (o de la activación de sus receptores) en neuronas fotorreceptoras parecía ser clave en el desarrollo axonal (Rajala et al. 2009). Sin embargo estos resultados parecen estar en línea con trabajos más recientes (Natalini et al. 2016; Zhang et al. 2019) según los cuales la insulina activaría vías de neuroprotección como la de ERK/MAPK o la de PI3K-Akt en neuronas fotorreceptoras, por lo que la falta de insulina favorecería la muerte celular al no poder activar dichas vías. Ante esto, es esperable que el Deprenyl no logre

frenar la muerte en cultivos neuronales deprivados de insulina, debido a que esta degeneración ocurriría independientemente a la vía de NO-GAPDH-SIAH.

Para el estudio de la eficacia del Deprenyl como agente antiapoptótico, generamos un experimento de concentraciones-respuesta abarcando un rango de 6 órdenes de magnitud desde picoMolar (pM) a microMolar (μ M) según la bibliografía consultada (Cui et al. 2017; Kontkanen and Castren 1999; Magyar 2011; Magyar and Szende 2004; Semkova et al. 1996; Szökő et al. 2018). La extensa bibliografía reporta que el Deprenyl resulta efectivo como agente antiapoptótico a concentraciones del orden de nanoMolar (nM) a picoMolar.

Esto está relacionado al hecho que el Deprenyl en altas concentraciones funciona como inhibidor de la Mono Amino Oxidasa mitocondrial de tipo B (MAO-B), lo cual en patologías asociadas a la desregulación de neurotransmisores como el mal de Parkinson, resulta beneficioso. En cambio cuando se lo agrega en altas concentraciones en cultivos sanos, es factible que funcione como agente proapoptótico debido a la desregulación de eventos fisiológicos como el metabolismo del neurotransmisor Dopamina en las neuronas amacrinias, entre otros (Magyar and Szende 2004). Esto cobra relevancia cuando se tienen en cuenta las relaciones entre amacrinias y fotorreceptores generadas por las proteínas asociadas a los ritmos circadianos, como se mencionó en el Capítulo 1. Esto es así ya que entre las proteínas reportadas como actores en el metabolismo de GAPDH, se ha reportado que la sola presencia de Sirtuina-1 está asociada a la inhibición de la translocación de GAPDH a núcleo (Joo et al. 2012). Esto cobra relevancia ya que podría asociarse el efecto protector de la Melatonina a la vía de GAPDH en

fotorreceptores, la cual no dependería de la activación de los receptores de membrana MT1 y MT2.

Cabe destacar como ya se mencionó, que una enzima clave en la degradación de la Melatonina es la MAO-A. El Deprenyl en altas concentraciones actúa como inhibidor de la MAO-B, por lo que se ha reportado que el metabolismo de la Melatonina no se ve afectado por la acción de este inhibidor (Murphy et al. 1986). Esto demuestra que el enfoque ante una potencial sinergia de ambas moléculas debería estar dirigido hacia la inhibición de la translocación nuclear de GAPDH.

Por último, se buscó evaluar la efectividad del Deprenyl como agente neuroprotector en un modelo de muerte neuronal basados en el agregado de C2-Ceramida al medio de cultivo. La exposición de cultivos neuronales de DIV3 a una concentración de C2-Ceramida de 10 μ M durante 6h, generó una disminución de la viabilidad celular del 20% ($p < 0,05$). Esta disminución en la viabilidad celular fue inhibida mediante la pre-incubación con Deprenyl 1 μ M. El motivo del análisis de la efectividad del Deprenyl en este modelo se asocia al hecho de que la Ceramida tiene la capacidad de generar estrés oxidativo, a partir del cual PARP-1 es activada por encima de las condiciones fisiológicas. Esta hiperactivación genera un aumento de la generación de polímeros de PoliADP-ribosa (PAR) agotando el pool celular de NAD⁺ y provocando la muerte celular por la vía de Parthanatos (Prado Spalm et al. 2019).

El interés radica en que se han reportado diversas asociaciones entre GAPDH y PARP-1 en el avance de las vías de muerte neuronal. Una de ellas sugiere que la translocación de GAPDH a núcleo sería necesaria para la hiperactivación de PARP-1. Adicionalmente, la unión de GAPDH al ADN para

provocar la expresión de factores relacionados con la vía apoptótica (como p53) es inhibida mediante la unión del nucleótido NAD⁺ a GAPDH, el cual como fuera mencionado, es agotado por PARP-1 (Kosova, Khodyreva, and Lavrik 2017). Esto lo que genera es un ciclo de activaciones enzimáticas que garantizaría el desencadenamiento de la vía apoptótica.

Se ha reportado incluso el rol de la translocación a núcleo de GAPDH en un modelo de retinopatía diabética en células gliales de Müller (Kusner, Sarthy, and Mohr 2004). Este trabajo, además propone la translocación a núcleo como el evento clave en la regulación de la vía. En este mismo modelo, otro trabajo (Yego and Mohr 2010) propone que la presencia de SIAH1 en la efectividad apoptótica de esta vía constituye otro punto de regulación que debe ser estudiado en otros modelos.

Por lo expuesto, es evidente que la enzima GAPDH no sólo está involucrada en la muerte neuronal provocada por la falta de factores tróficos, sino formando parte de un gran abanico de estímulos pro-apoptóticos por lo que estudiar la dinámica de esta enzima en modelos de muerte retiniana puede suponer un gran avance a futuro.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES DEL CAPITULO I

- La Melatonina a una concentración de 40nM sería capaz de disminuir el avance de la apoptosis de neuronas fotorreceptoras a días tardíos del desarrollo.
- El tratamiento con Melatonina podría provocar la activación de la vía de ERK/MAPK en neuronas fotorreceptoras.
- La Melatonina fomentaría el mantenimiento de la expresión de genes destinados a mantener la población de fotorreceptores.

CONCLUSIONES DEL CAPITULO II

- La vía apoptótica de NO-GAPDH-SIAH estaría involucrada en la muerte de los fotorreceptores por falta de factores tróficos.
- El bloqueo de esta vía influye en la disminución en la pérdida de la viabilidad celular a días tempranos en el desarrollo.
- La depleción de las neuronas amacrinias genera un tipo de muerte independiente de la vía de NO-GAPDH-SIAH.
- La vía de muerte en neuronas fotorreceptoras inducida por C2-Ceramida, podría tener a GAPDH como un elemento clave de la misma.

En este trabajo de tesis se analizó la capacidad neuroprotectora de la Melatonina, así como el rol crucial de la enzima GAPDH en el control de la apoptosis en neuronas fotorreceptoras ante la falta de factores tróficos.

Demostramos que el efecto de la Melatonina es apreciable a días tardíos del desarrollo, mientras que el efecto del Deprenyl, inhibidor de la translocación de GAPDH, es efectivo a días tempranos.

Por esto es que es necesario considerar a futuro si la Melatonina junto con el Deprenyl adicionados en el momento de la siembra, podrían estar ejerciendo su efecto anti apoptótico en neuronas fotorreceptoras de manera sinérgica.

Un mecanismo propuesto es a través de la activación de la Sirtuina-1 que impediría el desarrollo de la apoptosis uniéndose a GAPDH evitando su translocación a núcleo en neuronas fotorreceptoras, junto con la activación de la vía de ERK/MAPK.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrams, L., L. E. Politi, and R. Adler. 1989. "Differential Susceptibility of Isolated Mouse Retinal Neurons and Photoreceptors to Kainic Acid Toxicity. In Vitro Studies." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 30(11): 2300–2308.
- 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.
- Armstrong, S M. 1989. "Melatonin and Circadian Control in Mammals." *Experientia* 45(10): 932–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2680573>.
- Baba, Kenkichi et al. 2009. "Melatonin Modulates Visual Function and Cell Viability in the Mouse Retina via the MT1 Melatonin Receptor." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(35): 15043–48.
- Beach, Krista M., Jianbo Wang, and Deborah C. Otteson. 2017. "Regulation of Stem Cell Properties of Müller Glia by JAK/STAT and MAPK Signaling in the Mammalian Retina." *Stem Cells International* 2017.
- Berghe, T. Vanden et al. 2010. "Necroptosis, Necrosis and Secondary Necrosis Converge on Similar Cellular Disintegration Features." *Cell Death and Differentiation* 17(6): 922–30.
- Bibb, Lindsay C et al. 2001. "Temporal and Spatial Expression Patterns of the CRX Transcription Factor and Its Downstream Targets . Critical Differences during Human and Mouse Eye Development ." 10(15): 1571–80.
- 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): 248–54. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273>.
- Carlberg, Carsten, and Irmgard Wiesenberg. 1995. "The Orphan Receptor Family RZR/ROR, Melatonin and 5- lipoxygenase: An Unexpected Relationship: Mini Review." *Journal of Pineal Research* 18(4): 171–78.
- Carrillo-Vico, Antonio, Juan M Guerrero, Patricia J Lardone, and Russel J Reiter. 2005. "A Review of the Multiple Actions of Melatonin on the Immune

- System." *Endocrine* 27(2): 189–200.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16217132>.
- Cepko, Constance L. 2015. "The Determination of Rod and Cone Photoreceptor Fate." *Annual Review of Vision Science* 1(1): 211–34.
- Chen, R W et al. 1999. "Involvement of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) and P53 in Neuronal Apoptosis: Evidence That GAPDH Is Upregulated by P53." *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 19(21): 9654–62.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10531467>.
- Claustrat, Bruno, Jocelyne Brun, and Guy Chazot. 2005. "The Basic Physiology and Pathophysiology of Melatonin." *Sleep Medicine Reviews* 9(1): 11–24.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1087079204000735>.
- Conte, Ivan et al. 2010. "Proper Differentiation of Photoreceptors and Amacrine Cells Depends on a Regulatory Loop between NeuroD and Six6." 2317: 2307–17.
- Cui, Yuting et al. 2017. "Inhibition of Monoamine Oxidase-B by Selegiline Reduces Cigarette Smoke-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Airway Epithelial Cells." *Toxicology Letters* 268: 44–50.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.01.005>.
- Czeczuga-Semeniuk, Ewa et al. 2002. "Effect of Melatonin and All-Trans Retinoic Acid on the Proliferation and Induction of the Apoptotic Pathway in the Culture of Human Breast Cancer Cell Line MCF-7." *Polish journal of pathology : official journal of the Polish Society of Pathologists* 53: 59–65.
- Doolen, Suzanne, Diana N Krause, Margarita L Dubocovich, and Sue P Duckles. 1998. "Melatonin Mediates Two Distinct Responses in Vascular Smooth Muscle." *European Journal of Pharmacology* 345(1): 67–69.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9593596>.
- Dubocovich, Margarita L., and Magdalena Markowska. 2005. "Functional MT₁ and MT₂ Melatonin Receptors in Mammals." *Endocrine* 27(2): 101–10.
<http://link.springer.com/10.1385/ENDO:27:2:101>.
- Dubocovich, Margarita L. 2003. "Molecular Pharmacology Regulation and Function of Mammalian Melatonin Receptors." *Frontiers in Bioscience* 8(4): 1089. <https://www.bioscience.org/2003/v8/d/1089/list.htm>.

- Dunaief, Joshua L., Tzvete Dentchev, Gui Shuang Ying, and Ann H. Milam. 2002. "The Role of Apoptosis in Age-Related Macular Degeneration." *Archives of Ophthalmology* 120(11): 1435–42.
- Dyall, Simon C., Gregory J. Michael, and Adina T. Michael-Titus. 2010. "Omega-3 Fatty Acids Reverse Age-Related Decreases in Nuclear Receptors and Increase Neurogenesis in Old Rats." *Journal of Neuroscience Research* 88(10): 2091–2102.
- Eells, Janis T. 2019. "Mitochondrial Dysfunction in the Aging Retina." *Biology* 8(2).
- Elmore, Susan. 2007. "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." *Toxicologic Pathology* 35(4): 495–516.
- Fujieda, H. et al. 1999. "Expression of Mt1 Melatonin Receptor in Rat Retina: Evidence for Multiple Cell Targets for Melatonin." *Neuroscience* 93(2): 793–99.
- Furukawa, Takahisa, Eric M Morrow, and Constance L Cepko. 1997. "Crx , a Novel Otx -like Homeobox Gene , Shows Photoreceptor-Specific Expression and Regulates Photoreceptor Differentiation." 91: 531–41.
- Galluzzi, Lorenzo et al. 2017. "Molecular Definitions of Autophagy and Related Processes." *The EMBO Journal* 36(13): 1811–36.
- . 2018. "Molecular Mechanisms of Cell Death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018." *Cell Death and Differentiation* 25(3): 486–541.
- 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.
- Gaspar, Laetitia S. et al. 2019. "The Importance of Determining Circadian Parameters in Pharmacological Studies." *British Journal of Pharmacology* 176(16): 2827–47.
- De Genaro, Pablo, M. Victoria Simón, Nora P. Rotstein, and Luis E. Politi. 2013. "Retinoic Acid Promotes Apoptosis and Differentiation in Photoreceptors by Activating the P38 MAP Kinase Pathway." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 54(5): 3143–56.
- Gerlach, Manfred, Peter Riederer, and Moussa B.H. Youdim. 1992. "The

- Molecular Pharmacology of L-Deprenyl." *European Journal of Pharmacology: Molecular Pharmacology* 226(2): 97–108.
- German, Olga Lorena et al. 2006. "Docosahexaenoic Acid Prevents Apoptosis of Retina Photoreceptors by Activating the ERK/MAPK Pathway." *Journal of Neurochemistry* 98(5): 1507–20.
- Ghalamfarsa, Ghasem. 2015. "Use of Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) as Internal Control in Western-Blot Experiments?" *Journal of Cancer Prevention & Current Research* 2(6): 5–7.
- Giusti, Pietro et al. 1995. "Melatonin Protects Primary Cultures of Cerebellar Granule Neurons from Kainate but Not from N-Methyl-d-Aspartate Excitotoxicity." *Experimental Neurology* 131(1): 39–46. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014488695900055>.
- Glass, Christopher K., and Michael G. Rosenfeld. 2000. "The Coregulator Exchange in Transcriptional Functions of Nuclear Receptors." *Genes and Development* 14(2): 121–41.
- 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.
- Guerrero, Juan M, and Russel J Reiter. 2002. "Melatonin-Immune System Relationships." *Current topics in medicinal chemistry* 2(2): 167–79. <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=2&issue=2&spage=167>.
- Hara, Makoto R., and Solomon H. Snyder. 2006. "Nitric Oxide-GAPDH-Siah: A Novel Cell Death Cascade." *Cellular and molecular neurobiology* 26(4–6): 527–38.
- Hara, Makoto R et al. 2005. "S-Nitrosylated GAPDH Initiates Apoptotic Cell Death by Nuclear Translocation Following Siah1 Binding." *Nature Cell Biology* 7(7): 665–74. <http://www.nature.com/articles/ncb1268>.
- . 2006. "Neuroprotection by Pharmacologic Blockade of the GAPDH Death Cascade." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(10): 3887–89. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505364>.
- Hardeland, Rüdiger. 2009. "Melatonin: Signaling Mechanisms of a Pleiotropic Agent." *BioFactors* 35(2): 183–92.
- . 2010. "Melatonin Metabolism in the Central Nervous System." *Current*

- Hardeland, Rüdiger, and Burkhard Poeggeler. 2003. "Non-Vertebrate Melatonin." *Journal of Pineal Research* 34(4): 233–41. <https://doi.org/10.1034/j.1600-079X.2003.00040.x>.
- Hardeland, Ruediger. 2018. "Melatonin and Retinoid Orphan Receptors: Demand for New Interpretations after Their Exclusion as Nuclear Melatonin Receptors." *Melatonin Research* 1(1): 78–93. <http://www.melatonin-research.net/index.php/MR/article/view/6>.
- Hildebrandt, Thomas et al. 2015. "Cytosolic Thiol Switches Regulating Basic Cellular Functions: GAPDH as an Information Hub?" *Biological Chemistry* 396(5): 523–37.
- Hsu, S. C., and R. S. Molday. 1990. "Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is a Major Protein Associated with the Plasma Membrane of Retinal Photoreceptor Outer Segments." *Journal of Biological Chemistry* 265(22): 13308–13.
- Imbesi, Marta, Tolga Uz, and Hari Manev. 2008. "Role of Melatonin Receptors in the Effects of Melatonin on BDNF and Neuroprotection in Mouse Cerebellar Neurons." *Journal of Neural Transmission* 115(11): 1495–99.
- Inoue, Akihiro, and Kimio Akagawa. 1993. "Neuron Specific Expression of a Membrane Protein, HPC-1: Tissue Distribution, and Cellular and Subcellular Localization of Immunoreactivity and mRNA." *Molecular Brain Research* 19(1–2): 121–28.
- Insua, M. Fernanda et al. 2003. "Cell Cycle Regulation in Retinal Progenitors by Glia-Derived Neurotrophic Factor and Docosahexaenoic Acid." *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 44(5): 2235–44.
- . 2008. "Trophic Factors and Neuronal Interactions Regulate the Cell Cycle and Pax6 Expression in Müller Stem Cells." *Journal of neuroscience research* 86(7): 1459–71. <http://doi.wiley.com/10.1002/jnr.21606>.
- Ishitani, Ryoichi et al. 1996. "Evidence That Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Involved in Age-Induced Apoptosis in Mature Cerebellar Neurons in Culture." *Journal of Neurochemistry* 66(3): 928–35. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1046/j.1471-4159.1996.66030928.x>.

- Iuvone, P Michael, and Jiwei Gan. 1994. "Melatonin Receptor-Mediated Inhibition of Cyclic AMP Accumulation in Chick Retinal Cell Cultures." *Journal of Neurochemistry* 63(1): 118–24. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1994.63010118.x>.
- Jockers, Ralf et al. 2016. "Update on Melatonin Receptors: IUPHAR Review 20." *British Journal of Pharmacology*: 2702–25.
- Joo, Hyun Yoo et al. 2012. "SIRT1 Interacts with and Protects Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) from Nuclear Translocation: Implications for Cell Survival after Irradiation." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 424(4): 681–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.07.006>.
- Kaur, Charanjit et al. 2012. "Neuroprotective Effect of Melatonin against Hypoxia-Induced Retinal Ganglion Cell Death in Neonatal Rats." *Journal of Pineal Research* 54(2): 190–206.
- Kiser, Philip D, Marcin Golczak, and Krzysztof Palczewski. 2014. "Chemistry of the Retinoid (Visual) Cycle." *Chemical Reviews* 114(1): 194–232. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/cr400107q>.
- Kontkanen, Outi, and Eero Castrén. 1999. "Trophic Effects of Selegiline on Cultured Dopaminergic Neurons." *Brain Research* 829(1–2): 190–92.
- Kosova, A A, S N Khodyreva, and O I Lavrik. 2017. "Role of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH) in DNA Repair." *Biochemistry (Moscow)* 82(6): 643–54. <http://link.springer.com/10.1134/S0006297917060013>.
- Krestinina, Olga et al. 2018. "Melatonin Can Strengthen the Effect of Retinoic Acid in HL-60 Cells." *International Journal of Molecular Sciences* 19(10).
- Kusner, Linda L, Vijay P Sarthy, and Susanne Mohr. 2004. "Nuclear Translocation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: A Role in High Glucose-Induced Apoptosis in Retinal Müller Cells." : 1553–61.
- Laemmli, U K. 1970. "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." *Nature* 227(5259): 680–85. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Layton, Christopher J., J. P.M. Wood, G. Chidlow, and N. N. Osborne. 2005. "Neuronal Death in Primary Retinal Cultures Is Related to Nitric Oxide Production, and Is Inhibited by Erythropoietin in a Glucose-Sensitive

- Manner.” *Journal of Neurochemistry* 92(3): 487–93.
- Lee, Min-Cheol et al. 2001. “Antioxidant Effect of Melatonin in Human Retinal Neuron Cultures.” *Experimental Neurology* 172(2): 407–15. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014488601977933>.
- Lenkowski, Jenny R, and Pamela A Raymond. 2014. “Progress in Retinal and Eye Research Müller Glia : Stem Cells for Generation and Regeneration of Retinal Neurons in Teleost Fish Q.” *Progress in Retinal and Eye Research* (January): 1–30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.12.007>.
- Löffler, Kati et al. 2015. “Age-Dependent Müller Glia Neurogenic Competence in the Mouse Retina.” *Glia* 63(10): 1809–24.
- Lu, Amy Q., and Colin J. Barnstable. 2019. “Pluripotent Stem Cells as Models of Retina Development.” *Molecular Neurobiology* 56(9): 6056–70.
- Magyar, K, M. Pálfi, V Jenei, and É. Szökő. 2006. “Deprenyl: From Chemical Synthesis to Neuroprotection.” In *Oxidative Stress and Neuroprotection*, Vienna: Springer Vienna, 143–56. http://link.springer.com/10.1007/978-3-211-33328-0_16.
- Magyar, Kálmán. 2011. “The Pharmacology of Selegiline.” In *International Review of Neurobiology*, , 65–84. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123864673000042>.
- Magyar, Kálmán, and Béla Szende. 2004. “(-)-Deprenyl, A Selective MAO-B Inhibitor, with Apoptotic and Anti-Apoptotic Properties.” *NeuroToxicology* 25(1–2): 233–42.
- Margheri, Martina et al. 2012. “Combined Effects of Melatonin and All-Trans Retinoic Acid and Somatostatin on Breast Cancer Cell Proliferation and Death: Molecular Basis for the Anticancer Effect of These Molecules.” *European Journal of Pharmacology* 681(1): 34–43. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014299912001471>.
- Masana, M. I., and M. L. Dubocovich. 2001. “Melatonin Receptor Signaling: Finding the Path through the Dark.” *Science’s STKE : signal transduction knowledge environment* 2001(107): 1–6.
- Masana, Monica I., Isabel C. Sumaya, Michael Becker-Andre, and Margarita L. Dubocovich. 2007. “Behavioral Characterization and Modulation of Circadian Rhythms by Light and Melatonin in C3H/HeN Mice Homozygous for the ROR β Knockout.” *American Journal of Physiology - Regulatory*

- Integrative and Comparative Physiology* 292(6): R2357–67.
<https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajpregu.00687.2006>.
- Mayo, Juan C et al. 2017. “Melatonin and Sirtuins: A ‘Not-so Unexpected’ Relationship.” *Journal of Pineal Research* 62(2): 1–17.
- Mazzola, Jennifer L., and Michael A. Sirover. 2003. “Subcellular Localization of Human Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Independent of Its Glycolytic Function.” *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1622(1): 50–56.
- Mercau, María Elisa et al. 2019. “Melatonin Prevents Early Pituitary Dysfunction Induced by Sucrose-Rich Diets.” *Journal of Pineal Research* 66(2): e12545.
<https://doi.org/10.1111/jpi.12545>.
- Moreno, Ernesto Alfaro, Claudia García Cuéllar, and Alfonso Dueñas González. 2000. “Métodos de Detección de La Apoptosis, Aplicaciones Y Limitaciones.” *Rev Inst Nal Cancerol (Mex)* 46(4): 275–80.
- 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.
- Murphy, Dennis L. et al. 1986. “Human Plasma Melatonin Is Elevated during Treatment with the Monoamine Oxidase Inhibitors Clorgyline and Tranylcypromine but Not Deprenyl.” *Psychiatry Research* 17(2): 119–27.
- Natalini, Paola M., Melina V. Mateos, Mónica G. Ilincheta de Boschero, and Norma M. Giusto. 2016. “Insulin-Related Signaling Pathways Elicited by Light in Photoreceptor Nuclei from Bovine Retina.” *Experimental Eye Research* 145: 36–47.
- Pandi-Perumal, Seithikurippu R. et al. 2008. “Physiological Effects of Melatonin: Role of Melatonin Receptors and Signal Transduction Pathways.” *Progress in Neurobiology* 85(3): 335–53.
- Politi, L. E., M. Lehar, and R. Adler. 1988. “Development of Neonatal Mouse Retinal Neurons and Photoreceptors in Low Density Cell Culture.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 29(4): 534–43.
- Politi, L. E., N. P. Rotstein, and N. G. Carri. 2001. “Effect of GDNF on Neuroblast Proliferation and Photoreceptor Survival: Additive Protection with Docosahexaenoic Acid.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science* 42(12): 3008–15.

- Politi, Luis E. et al. 2001. "Insulin-like Growth Factor-I Is a Potential Trophic Factor for Amacrine Cells." *Journal of Neurochemistry* 76(4): 1199–1211.
- Portera-Cailliau, C., C. H. Sung, J. Nathans, and R. Adler. 1994. "Apoptotic Photoreceptor Cell Death in Mouse Models of Retinitis Pigmentosa." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(3): 974–78.
- Prado Spalm, Facundo H. et al. 2019. "Ceramide Induces the Death of Retina Photoreceptors Through Activation of Parthanatos." *Molecular Neurobiology* 56(7): 4760–77.
- Rajala, Raju V.S. et al. 2009. "Insulin Receptor Signaling Regulates Actin Cytoskeletal Organization in Developing Photoreceptors." *Journal of Neurochemistry* 110(5): 1648–60.
- Rath, Martin F. et al. 2007. "Ontogenetic Expression of the Otx2 and Crx Homeobox Genes in the Retina of the Rat." *Experimental Eye Research* 85(1): 65–73.
- Reichenbach, Andreas, and Andreas Bringmann. 2010. Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina *Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina*.
- Reiter, Russel J. et al. 2003. "Melatonin as an Antioxidant: Biochemical Mechanisms and Pathophysiological Implications in Humans." *Acta Biochimica Polonica* 50(4): 1129–46.
- Reiter, Russel J, Dun-Xian Tan, and Maria D Maldonado. 2005. "Melatonin as an Antioxidant: Physiology versus Pharmacology." *Journal of pineal research* 39(2): 215–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16098101>.
- Reiter, Russel J, Dun-xian Tan, Carmen Osuna, and Eloisa Gitto. 2000. "Actions of Melatonin in the Reduction of Oxidative Stress." *Journal of Biomedical Science* 7(6): 444–58. <http://link.springer.com/10.1007/BF02253360>.
- Riederer, Peter, and Gerd Laux. 2011. "MAO-Inhibitors in Parkinson's Disease." *Experimental neurobiology* 20(1): 1–17. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22110357>.
- Rodriguez, Carmen et al. 2004. "Regulation of Antioxidant Enzymes: A Significant Role for Melatonin." *Journal of Pineal Research* 36(1): 1–9.
- Rotstein, Nora P. et al. 2002. "Apoptosis of Retinal Photoreceptors During

- Development In Vitro: Protective Effect of Docosahexaenoic Acid.” *Journal of Neurochemistry* 69(2): 504–13.
- Rotstein, Nora P., Marta I. Aveldaño, Francisco J. Barrantes, and Luis E. Politi. 1996. “Docosahexaenoic Acid Is Required for the Survival of Rat Retinal Photoreceptors In Vitro.” *Journal of Neurochemistry* 66(5): 1851–59.
- Sawa, A, A A Khan, L D Hester, and S H Snyder. 1997. “Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: Nuclear Translocation Participates in Neuronal and Nonneuronal Cell Death.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94(21): 11669–74. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326668>.
- Scheer, Frank A.J.L. et al. 2004. “Daily Nighttime Melatonin Reduces Blood Pressure in Male Patients With Essential Hypertension.” *Hypertension* 43(2): 192–97. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14732734>.
- Schweichel, J.-U., and H.-J. Merker. 1973. “The Morphology of Various Types of Cell Death in Prenatal Tissues.” *Teratology* 7(3): 253–66. <https://doi.org/10.1002/tera.1420070306>.
- Semkova, Irina, Philipp Wolz, Matthias Schilling, and Josef Krieglstein. 1996. “Selegiline Enhances NGF Synthesis and Protects Central Nervous System Neurons from Excitotoxic and Ischemic Damage.” *European Journal of Pharmacology* 315(1): 19–30.
- Simón, María V. et al. 2012. “Müller Glial Cells Induce Stem Cell Properties in Retinal Progenitors In Vitro and Promote Their Further Differentiation into Photoreceptors.” *Journal of Neuroscience Research* 90(2): 407–21.
- Sirover, Michael A. 2017. “Chapter 1 - The Role of Moonlighting GAPDH in Cell Proliferation: The Dynamic Nature of GAPDH Expression and Subcellular Localization.” In ed. Michael A B T - Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase (GAPDH) Sirover. Academic Press, 3–20. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128098523000017>.
- Smirnov, A N. 2001. “Nuclear Melatonin Receptors.” *Biochemistry (Moscow)* 66(1): 19–26. <https://doi.org/10.1023/A:1002821427018>.
- Swain, Prabodha K. et al. 1997. “Mutations in the Cone-Rod Homeobox Gene Are Associated with the Cone- Rod Dystrophy Photoreceptor Degeneration.” *Neuron* 19(6): 1329–36.
- Szél, Ágoston, Pal Röhlich, A. Romeo Caffé, and Theo Van Veen. 1996.

- “Distribution of Cone Photoreceptors in the Mammalian Retina.” *Microscopy Research and Technique* 35(6): 445–62.
- Szőkő, Éva et al. 2018. “Pharmacological Aspects of the Neuroprotective Effects of Irreversible MAO-B Inhibitors, Selegiline and Rasagiline, in Parkinson’s Disease.” *Journal of Neural Transmission* 125(11): 1735–49. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1853-9>.
- Tatton, G, J S Wadias, W Y H Ju, and N A Tatton. 1996. “(-)-Deprenyl Reduces Neuronal Apoptosis and Facilitates Neuronal Outgrowth by Altering Protein Synthesis without Inhibiting Monoamine Oxidase.” 1996: 45–59.
- Tatton, W., R. Chalmers-Redman, and N Tatton. 2003. “Neuroprotection by Deprenyl and Other Propargylamines: Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Rather than Monoamine Oxidase B.” *Journal of Neural Transmission* 110(5): 509–15.
- Tatton, W. G. et al. 2000. “Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase in Neurodegeneration and Apoptosis Signaling.” *Journal of Neural Transmission, Supplement* 60: 77–100.
- Tatton, W G et al. 1994. “Reduces PC 12 Cell Apoptosis by Inducing New Protein Synthesis.” : 1992–95.
- Tocharus, C. et al. 2014. “Melatonin Enhances Adult Rat Hippocampal Progenitor Cell Proliferation via ERK Signaling Pathway through Melatonin Receptor.” *Neuroscience* 275: 314. <http://dx.doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.06.026>.
- Tooker, Ryan E., and Jozsef Vigh. 2015. “Light-Evoked S-Nitrosylation in the Retina.” *Journal of Comparative Neurology* 523(14): 2082–2110.
- Tosini, Gianluca, and Michael Menaker. 1998. “The Clock in the Mouse Retina: Melatonin Synthesis and Photoreceptor Degeneration.” *Brain Research* 789(2): 221–28. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006899397014467>.
- Tosini, Gianluca, Sharon Owino, Jean-Luc Guillame, and Ralf Jockers. 2014. “Melatonin Receptors: Latest Insights from Mouse Models.” *Bioessays*. 36(8): 778–87.
- Tosini, Gianluca, Nikita Pozdeyev, Katsuhiko Sakamoto, and P. Michael Iuvone. 2008. “The Circadian Clock System in the Mammalian Retina.” *BioEssays* 30(7): 624–33.

- Tristan, Carlos, Neelam Shahani, Thomas W Sedlak, and Akira Sawa. 2011. "The Diverse Functions of GAPDH: Views from Different Subcellular Compartments." *Cellular Signalling* 23(2): 317–23. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.08.003>.
- Volonté, Yanel A. et al. 2019. "A Defective Crosstalk Between Neurons and Müller Glial Cells in the Rd1 Retina Impairs the Regenerative Potential of Glial Stem Cells." *Frontiers in Cellular Neuroscience* 13(July): 1–15.
- Walker, J M. 2009. *The Protein Protocols Handbook*. Humana Press. <https://books.google.com.ar/books?id=vXpFAQAAIAAJ>.
- Wiechmann, Allan F., and David M. Sherry. 2013. 300 International Review of Cell and Molecular Biology *Role of Melatonin and Its Receptors in the Vertebrate Retina*.
- Wiesenberg, Irmgard et al. 1995. "Transcriptional Activation of the Nuclear Receptor RZR α by the Pineal Gland Hormone Melatonin and Identification of CGP 52608 as a Synthetic Ligand." *Nucleic Acids Research* 23(3): 327–33.
- Witt-Enderby, Paula A., Nicholas M. Radio, John S. Doctor, and Vicki L. Davis. 2006. "Therapeutic Treatments Potentially Mediated by Melatonin Receptors: Potential Clinical Uses in the Prevention of Osteoporosis, Cancer and as an Adjuvant Therapy." *Journal of Pineal Research* 41(4): 297–305. <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600-079X.2006.00369.x>.
- Yego, ECK., and Susanne Mohr. 2010. "Siah-1 Protein Is Necessary for High Glucose-Induced Glyceraldehyde-3- Phosphate Dehydrogenase Nuclear Accumulation and Cell Death in Müller Cells." *Journal of Biological Chemistry* 285(5): 3181–90.
- Yu, Haijie et al. 2016. "High Membrane Permeability for Melatonin." *Journal of General Physiology* 147(1): 63–76.
- Zhang, Rui et al. 2019. "Selectively Knocking down Insulin Receptor in Rods Disrupts Glucose Flux and Leads to Photoreceptor Degeneration." *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 60(9): 1670.
- Zisapel, Nava. 2001. "Circadian Rhythm Sleep Disorders: Pathophysiology and Potential Approaches to Management." *CNS drugs* 15(4): 311–28. <http://link.springer.com/10.2165/00023210-200115040-00005>.