

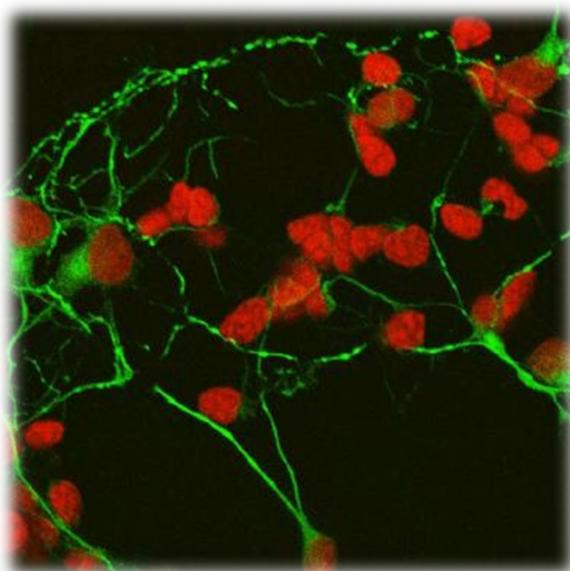


UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Tesis Doctoral en Bioquímica

Germán Ariel Michelis



“Roles del Factor Derivado del Epitelio Pigmentario durante el desarrollo y regeneración de neuronas fotorreceptoras de retina”

Bahía Blanca

Argentina

2022

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Enrique Politi

Investigador Principal - CONICET

Profesor Titular - Biología Celular

Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

CO-DIRECTORA DE TESIS

Dra. Sofía Patricia Becerra

Senior Investigator –National Eye Institute

Head, Section of Protein Structure and Function

Laboratory of Retinal Cell and Molecular Biology, NEI

National Institutes of Health

Prefacio

Esta tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Bioquímica de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada para la obtención de otro título en esta u otra universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca y del National Eye Institute de Bethesda, MD, USA durante el período comprendido entre diciembre de 2016 a Julio 2022, bajo la dirección de los doctores Luis Enrique Politi y Sofía Patricia Becerra de la Universidad Nacional del Sur (Argentina) y el National Eye Institute (Estados Unidos), respectivamente.



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

Septiembre – 2022

Lic. en Ciencias Biológicas Germán Michelis

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

...a mis padres, Graciela y Horacio, por mostrarme que los límites están dónde uno decida que estén.

...a mi esposa Verónica, porque tan importante como tener un lugar al que ir, es tener uno al que volver.

Agradecimientos

A mis directores, Dr. Luis Politi y Dra. Patricia Becerra, por el apoyo, las enseñanzas, la paciencia, el abrirme las puertas de sus laboratorios y poner su confianza en mí. A las Dras. Lorena Germán y Nora Rotstein, por su ayuda con múltiples pósters, presentaciones y con esta tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Neurobiología del INIBIBB, pasados y presentes: Marcos, Facundo, Yanel, Marcela, Beatriz, Victoria S., Victoria A., Edgardo, Andrés, Tamara y Harmonie. Por estar siempre dispuestos a enseñarme y nunca dudar en darme una mano, tanto en lo profesional como en lo personal.

A mis compañeros de la Section of Protein Structure and Function, pasados y presentes: Preeti, Jeanée, Glorivee, Federica, Elma, Shivani, Iván y Alejandra. Por la más que cálida recepción, la enorme ayuda para moverme (física y burocráticamente) por el NIH, y por permitirme aprender tanto de ustedes.

A los integrantes del Laboratory of Retinal Cell and Molecular Biology, por su excelente disposición y generosidad, tanto para enseñarme a usar los equipos, prestarme reactivos y aportar soluciones.

A Valeria Canto-Soler, Miguel Flores-Belver y todo su equipo, por la fructífera colaboración y excelente relación.

A los Dres. Robert Fariss, Maria Mercedes Campos, Megan Kopera y Rafael Villasmil, por todo su apoyo y la formación recibida en sus respectivas áreas, que fueron fundamentales para el desarrollo de esta tesis.

A los organismos que brindaron financiamiento a los laboratorios que permitieron el desarrollo de este trabajo de tesis, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), la Universidad Nacional del Sur (UNS) y el National Eye Institute (NEI).

Al programa GPP del NIH, que me permitió acceder a la invaluable oportunidad de poder realizar parte de mi tesis en uno de los mejores centros de investigación del mundo.

A la American Society for Biochemistry and Molecular Biology, por su apoyo con la beca PROLAB.

A mi familia, mis padres Horacio y Graciela y mi hermano Manuel, simplemente por todo. Y a mi esposa, por estar siempre ahí, de una u otra forma, y hacer que esto valga la pena.

Y obviamente, a todos de los que me pueda haber olvidado. Gracias por el apoyo y la ayuda en transitar este camino.

Resumen

Los fotorreceptores (FRs) son las neuronas que capturan la luz en el ojo, por lo que juegan un rol central en la visión. La pérdida progresiva de estas células durante ciertas enfermedades neurodegenerativas de la retina, como la retinitis pigmentosa o la degeneración macular, conduce a déficits de la visión y eventualmente a la ceguera. Estas patologías, así como otras que afectan al sistema nervioso central, están caracterizadas por la degeneración gradual, selectiva e irreversible de una población neuronal específica. La deficiencia de factores tróficos ha sido involucrada en muchos de estos procesos neurodegenerativos y es característica de la denominada muerte *celular programada*, tal como la que ocurre al momento de la sinaptogénesis en el desarrollo del sistema nervioso. En efecto, en la retina, así como también en otras partes del sistema nervioso, las neuronas requieren para su supervivencia, de factores tróficos, los cuales provienen de su entorno.

El requerimiento de factores tróficos varía según el tipo celular y la etapa del desarrollo. En particular, para los

FRs ya se han identificado varios de ellos, incluyendo el Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF), el

Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF), el ácido docosahexaenoico (DHA), la esfingosina 1-fosfato (S1P) y, más recientemente, uno de los principales, el Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF), una proteína con funciones neurotróficas y antiangiogénicas, asociadas a dominios separados de la proteína. La identificación de las secuencias de estos dominios ha permitido diseñar y sintetizar químicamente péptidos estables, como los fragmentos neurotróficos 44-mer y 17-mer, que conservan las propiedades de la proteína nativa y, por ende, de potencial valor médico. Sin embargo, estas características ventajosas requieren ser evaluadas en un modelo experimental adecuado.

La mayoría del conocimiento actual sobre el PEDF se ha obtenido gracias a modelos *in vivo*, donde, debido su inherente complejidad, sumado a la cantidad de interacciones que ocurren entre las células y moléculas de tejidos circundantes, resulta difícil analizar los procesos involucrados. Una alternativa a este obstáculo son los cultivos primarios elegidos para realizar esta tesis, compuestos solo de neuronas amacrinas y FRs, las que, creciendo en medios químicamente definidos, permiten estudiarlas en un entorno mucho más controlado que en el organismo entero. En estos cultivos, los FRs se desarrollan independientemente, sin requerir la suplementación de factores tróficos, pero, una vez establecidas sus conexiones sinápticas, se tornan dependientes de los mismos para continuar con su desarrollo y prolongar supervivencia. La dependencia por estos factores hace de este sistema *in vitro* un modelo adecuado para evaluar el efecto de distintas moléculas sobre la supervivencia o diferenciación celular.

Por ello, los resultados reseñados en el primer capítulo de esta tesis tuvieron como objetivo principal evaluar el efecto de PEDF y los péptidos derivados de su dominio neurotrófico y angiogénico en este modelo de cultivo primario de neuronas de retina.

En estos cultivos, tanto los FRs como las neuronas amacrinas exhibieron el receptor de PEDF (PEDF-R), el cual es una fosfolipasa del tipo A2, localizado principalmente en la membrana celular. Por otro lado, la expresión del transcripto para PEDF-R mostró un patrón decreciente durante los primeros 5 días de cultivo, así como también en la retina *in vivo*, en el mismo periodo de desarrollo. Este patrón se observó también a nivel de la proteína, aunque su descenso en el tiempo fue más atenuado.

Tanto el PEDF como los dos péptidos derivados de su dominio neurotrófico, protegieron a los FRs en cultivo de la muerte celular, caracterizada por ensayos de TUNEL y Anexina V. Además, previnieron la pérdida de la función mitocondrial evaluada mediante Mitotracker, y preservaron la integridad estructural de la membrana plasmática, analizada indirectamente por medio de yoduro de propidio y DAPI; dado que estos marcadores se visualizan una vez que se altera la permeabilidad de la membrana plasmática. Esta protección se debió principalmente a la interacción de PEDF con PEDF-R, y, en parte, al aumento

constatado en la transcripción de factores antiapoptóticos como Bcl2 y Bcl2a1. El efecto del PEDF fue específico para la supervivencia de los FRs dado que el mismo no alteró la viabilidad de las neuronas amacrinas, la cual se mantuvo constante durante los días de cultivo analizados. Por el contrario, el PEDF y los péptidos 44-mer y 17-mer promovieron el desarrollo de neuritas en las neuronas amacrinas, e indujeron la diferenciación de los FRs, al promover la polarización de la rodopsina hacia el extremo apical de estas neuronas, tal como ocurre en los FRs maduros de la retina *in vivo*.

Estos efectos fueron anulados eficientemente mediante el secuestro de PEDF o de sus péptidos por medio del péptido bloqueante P1, o por la inhibición de la actividad enzimática del PEDF-R mediante el inhibidor enzimático selectivo atglistatin. Todos los efectos del PEDF y sus péptidos neurotróficos fueron asociados a la interacción de los mismos con el PEDF-R. Por su parte, el fragmento derivado del dominio antiangiogénico del PEDF no tuvo ningún efecto.

Por otro lado, también se indagó sobre el potencial del epitelio pigmentario de la retina (EPR) derivado de células madre pluripotentes (CMP) en la producción y liberación del PEDF. Dado que la deficiencia del PEDF ha sido correlacionada con una mayor incidencia de ciertas retinopatías y el hecho que el EPR puede estar comprometido en algunas de estas patologías, ha impulsado el desarrollo de estrategias orientadas a reemplazar el EPR dañado. Entre ellas se destaca la estrategia de generar EPR por medio de CMP obtenidas a partir de la inducción de células somáticas mediante la transducción de factores de pluripotencia por medio de un sistema episomal. Este tipo de estrategia requiere sortear múltiples obstáculos antes de ser viable, particularmente el de garantizar la identidad del nuevo EPR. El objetivo de esta línea de investigación, descrita en el segundo capítulo de esta tesis, fue evaluar los aspectos funcionales del EPR derivado de células madre, comparándolos con los del EPR nativo.

El EPR derivado de CMP humanas recapituló las características distintivas del EPR nativo, como la polarización baso-apical, la capacidad de fagocitar y metabolizar segmentos externos de FRs y la producción de PEDF. Todas estas características se mantuvieron aun hasta 50 días después de su inducción, con la producción de PEDF incrementándose significativamente en función del tiempo.

En conclusión, el PEDF y los péptidos derivados de su dominio neurotrófico ejercieron efectos citoprotectores y de diferenciación sobre los fotorreceptores y promovieron el crecimiento de neuritas en las neuronas amacrinas. Todos estos efectos fueron dependientes de la interacción entre PEDF y PEDF-R.

Por otro lado, el EPR derivado de CMP examinado en este trabajo de tesis mostró un comportamiento similar al del EPR en la retina intacta, lo que permite considerar sus posibles capacidades terapéuticas para estas enfermedades.

Summary

Photoreceptors (PHRs) are the retinal neurons, which react to light, making them a central component in the visual process. Their loss during certain retinal neurodegenerative diseases, such as retinitis pigmentosa or age-related macular degeneration, leads to a gradual decline of vision and ultimately to blindness. These pathologies, as well as others that target the central nervous system, are characterized by the gradual, selective and irreversible degeneration of specific neuronal cell types. The lack of trophic factors has been involved in many of these neurodegenerative processes and it is characteristic of the so-called programmed cell death, such as the one that occurs during the period of synaptogenesis within the developing nervous system. In the retina, just as any other portions of the nervous system, neurons are dependent on trophic factors, which are produced by their environment.

Trophic factor requirements vary according to each cell type and its developmental stage. For the PHRs, many trophic factors have been already identified, including the Glial cell line-derived Neurotrophic Factor (GDNF), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Fibroblastic Growth Factor (FGF), docosahexaenoic acid (DHA), sphingosine-1-phosphate (S1P) and, perhaps one of the most important among them, the Pigment Epithelium-derived Factor (PEDF). PEDF is a protein exhibiting both neurotrophic and antiangiogenic properties, which are conferred by two spatially-separated domains of the PEDF polypeptide. The identification of the sequences of these domains has allowed for the design and chemical synthesis of stable peptides, such as the neurotrophic fragments 44-mer and 17-mer, which could potentially retain the neurotrophic properties of the native protein, and therefore having a potential therapeutic value. However, these advantages should be first evaluated on an adequate experimental model.

Up to now, most of our knowledge regarding PEDF has been obtained through *in vivo* models, which, due to their inherent complexity and the multiplicity of interactions between cells and their surrounding tissues, makes it difficult to analyze the specific processes occurring at a smaller scale. An alternative to overcome these limitations is the use of primary cultures chosen for the present thesis, composed solely of PHRs and amacrine neurons cultured in a chemically defined medium. These cultures allow the study of these neurons in a much more controlled environment when compared to a whole organism. PHRs in these cultures, initially develop and replicate without requiring trophic factor supplementation, but once they establish their synaptic connections, become reliant on them for their survival. This reliance makes this *in vitro* system an adequate testbed to evaluate the effects of different trophic factors on cell survival and differentiation.

Therefore, the results of the first part of the thesis, which are shown in the first chapter, have the main objective of evaluating the effects of PEDF and peptides derived from its neurotrophic and antiangiogenic domains in a primary retinal cell culture-based model.

In these cultures, both neuronal types exhibited the PEDF receptor (PEDF-R), which was primarily localized in the cell membrane. Additionally, the expression patterns for the PEDF-R transcript showed a decreasing trend on the first 5 days in culture, which was also observed in the *in vivo* environment. This pattern was also observed at the protein level, albeit in a less dramatic fashion.

PEDF as well as its neurotrophic domain-derived peptides protected cultured PHRs from cell death, which was measured by TUNEL and Annexin V assays. Furthermore, they also prevented the loss of mitochondrial function, as evaluated by Mitotracker, and preserved the structural integrity of the plasma membrane analyzed by propidium iodide and DAPI staining, given that these markers are visualized once the plasma membrane permeability is altered. This protection was exerted through PEDF/PEDF-R

interaction, along with the upregulation of antiapoptotic factors such as Bcl2 and Bcl2a1. This protective effect was PHR-specific, given that there was no significant difference in the survival rate of amacrine neurons, which was constant throughout the observed timeframe. Furthermore, PEDF and the 44-mer and 17-mer peptides promoted neurite outgrowth in amacrine neurons and induced PHR differentiation by promoting apical rhodopsin polarization, mimicking the same process in the retina *in vivo*.

These effects were readily annulled either by sequestering PEDF or its derived neurotrophic peptides with the blocking P1 peptide, or by inhibiting the enzymatic activity of PEDF-R with the selective enzymatic inhibitor atglistatin. Every previously observed effect, exerted by PEDF or its neurotrophic peptides, was linked to their interaction with PEDF-R. The antiangiogenic domain-derived peptide showed no effects whatsoever.

In a second line of research carried out in this thesis and described in the second chapter of this thesis, I delved on the potential PEDF production and secretion of induced pluripotent cell-derived retinal pigmented epithelium (RPE). Due to the fact that PEDF deficit has been correlated with an increased incidence of retinopathies, coupled with the observation that the pigmented epithelium itself is compromised in several of them; has led to the emergence of novel therapeutic strategies based on replacing the damaged retinal pigmented epithelium. One of the main approaches relies on generating RPE by the differentiation of induced pluripotent stem cells, obtained by the transduction of pluripotency factors in somatic cells by means of an episomal system. This approach must clear several hurdles before becoming viable, starting with confirming the identity and properties of this new RPE and how it compares to native RPE.

The stem cell-derived human RPE was able to replicate the main hallmarks of native RPE, such as basalapical polarization, the capacity to phagocyte and metabolize PHR outer segments and to secrete PEDF. All these features were consistent even at 50 days post-induction, with PEDF secretion showing a significant increase over time.

In conclusion, PEDF and its neurotrophic peptides exerted cytoprotective effects and stimulated neuronal development on photoreceptors and promoted neurite outgrowth amacrine neurons. All of these effects were driven by PEDF/PEDF-R interaction.

Furthermore, stem cell-derived RPE showed a similar behavior to native RPE, allowing this approach of RPE replacement to be further considered as another potential therapeutic approach for the treatment of these diseases.

Índice

Portada	1
Prefacio	5
Dedicatoria	7
Agradecimientos	8
Resumen	9
Summary	11
Índice	14
Abreviaturas	17
Capítulo 1	
Introducción	18
La retina como modelo del sistema nervioso	18
Los factores tróficos como agentes de supervivencia y diferenciación	19
El PEDF y su rol en la retina	20
Modelos para la caracterización de factores tróficos en la retina	22
Hipótesis y Objetivos	22
Materiales y Métodos	23
Animales	23
Proteínas y péptidos	23
Materiales empleados	23
Cultivos neuronales	23
Ensayos de inmunocitoquímica	24
Microscopía	24
Administración e inhibición de los efectos de PEDF y péptidos derivados	25
Identificación celular	25
Inmunomarcación de PEDF-R en células en cultivo	25
Inmunomarcación de PEDF-R en tejidos de retina	26
Evaluación de muerte neuronal	26
Ensayos de citotoxicidad	27
Ensayos mitocondriales	27

	Desarrollo de neuritas	27
	Detección de PEDF por ELISA	28
	Western Blotting	28
	Extracción de ARNm y RT-PCR	29
	Perfil de ARNm de factores pro y antiapoptóticos	29
	Análisis estadístico	29
Resultados		30
	Los cultivos neuronales están compuestos por fotorreceptores y neuronas amacrinadas.	30
	El PEDF-R está presente en neuronas en cultivo	32
	El PEDF está presente en trazas, en el medio condicionado de cultivo de células de Schwannoma RN22	34
	El PEDF y sus péptidos derivados, 17-mer y 44-mer, protegieron a las neuronas de retina de la muerte	35
	La reducción de la muerte celular por el PEDF fue selectiva para los fotorreceptores	38
	La muerte neuronal presente en el modelo no generó liberación de LDH al medio	41
	El PEDF y su péptido derivado 44-mer preservaron la función mitocondrial en neuronas en cultivo	42
	El PEDF promovió la localización apical de rodopsina en los fotorreceptores	43
	El PEDF y sus péptidos derivados 44-mer y 17-mer promueven el desarrollo de neuritas	45
	El tratamiento con PEDF alteró la expresión de múltiples transcritos, incluyendo los de factores antiapoptóticos	46
	El tratamiento con PEDF indujo la expresión de Bcl2	47
Discusión		49
Capítulo 2		
	Introducción	54
	El EPR como sistema de soporte de la retina y el rol de PEDF	54
	La disfunción del EPR posee implicancias patológicas	55

Hipótesis y Objetivos	56
Materiales y Métodos	57
Detección de PEDF por ELISA y Western blotting	57
Cuantificación de β -Hidroxibutirato en EPR derivado de CMP	57
Western Blotting	57
Análisis estadístico	58
Resultados	
El EPR derivado de CMP exhibió una polarización comparable a la que ocurre in vivo	59
El EPR derivado de CMP es capaz de fagocitar y metabolizar segmentos externos de fotorreceptores	60
Discusión	61
Conclusiones generales	62
Publicaciones realizadas, presentaciones hechas y premios obtenidos durante el transcurso de la tesis	63
Bibliografía	64
Apéndice	83

Abreviaturas utilizadas:

BAX: *Bcl-2-Associated X protein*

Bcl2: *B-cell lymphoma 2 protein*

Bcl2a1: *BCL2-related protein A1*

BEL: 4-bromoenoil lactona

BHK: *Baby Hamster Kidney*

CGM: Células Gliales de Müller

CMP: Células Madre Pluripotentes

CRX: *Cone-Rod Homeobox*

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DHA: Ácido Docosaheptaenoico

DIV: Días *in vitro*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO: Dimetilsulfóxido

EPR: Epitelio Pigmentario Retinal

FR/s: Fotorreceptor(es)

FT/s: Factor(es) Trófico(s)

HBSS: *Hank's Balanced Salt Solution*

HPC1: Sintaxina

PBS: *Phosphate Saline Buffer*

PEDF: Factor Derivado del Epitelio Pigmentario

PEDF-R: Receptor del Factor Derivado del Epitelio Pigmentario

PN: Postnatal

PNPLA2: *Patatin-like phospholipase A2*

SE/s: Segmento(s) Externo(s)

SN: Sistema Nervioso

TUNEL: *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-End Labeling assay*

Capítulo I: Rol del factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) en la supervivencia y diferenciación de células de la retina.

Introducción

La retina como modelo del sistema nervioso

Uno de los desafíos científicos más importantes de la actualidad es comprender los mecanismos que gobiernan el desarrollo y funcionamiento del sistema nervioso (SN). Conocer los procesos que determinan la supervivencia y diferenciación neuronal no solo posee un valor biológico incuestionable, sino también médico, dado que sus alteraciones conducen a enfermedades neurodegenerativas, la mayoría de las cuales aún no tienen cura ni tratamientos efectivos. La magnitud y complejidad del cerebro, con sus aproximadamente 10^{11} neuronas, muchas de ellas con conexiones que comprenden hasta 10.000 dendritas, tornan particularmente difícil su comprensión. Afortunadamente la retina, como parte del sistema nervioso central, ofrece una estructura mucho más simple, de fácil acceso y con sus células ordenadas en capas claramente distinguibles; todo lo cual constituye una ventaja para su investigación.

La retina es el tejido nervioso del ojo responsable del proceso de visión (Fig. 1). Específicamente se encarga de la fototransducción, un proceso que implica la conversión de señales lumínicas en impulsos nerviosos, que luego son colectados, modulados y transmitidos al cerebro por medio del nervio óptico para su interpretación. La retina posee seis tipos de neuronas y tres tipos de células de soporte. Los tipos neuronales derivan de un único progenitor neuronal (Turner y Cepko, 1987) y comprenden los fotorreceptores (FRs) (conos y bastones), las neuronas bipolares, amacrinas, horizontales y ganglionares. Ambos tipos de FRs son los responsables de convertir los fotones de luz que llegan a la retina en impulsos nerviosos, los cuales son colectados y modulados por las neuronas bipolares, amacrinas y horizontales, para luego ser transmitidos a las neuronas ganglionares. Los axones de éstas últimas constituyen el nervio óptico, por donde fluye la información al cerebro.

Además de las neuronas, también son importantes las células gliales, responsables del soporte y mantenimiento de las neuronas en el sistema nervioso en general. Particularmente en la retina, están representadas por las células gliales de Müller (CGM), la microglía y los astrocitos. Las CGM se extienden atravesando transversalmente todas las capas de la retina y, entre sus múltiples funciones, proveen soporte estructural y funcional, y son consideradas células madre (Fischer y Reh, 2003; Simón y col., 2012; Volonté y col., 2019). Por su parte, la microglía, ubicada individualmente en todas las capas, está primariamente asociada al proceso de fagocitosis, mientras que los astrocitos se encuentran principalmente vinculados al nervio óptico.

Para su correcto funcionamiento, la retina depende de la vasculatura proveniente de arterias y capilares que aseguran su nutrición. Las paredes de estos vasos están constituidas por células endoteliales, las cuales son rodeadas por células contráctiles denominadas pericitos. A su vez, los pericitos, junto al epitelio pigmentario retinal (EPR), participan en la formación de la llamada “barrera hematorretiniana”, cuyo desbalance contribuye al desarrollo del edema macular y a patologías retinales como la retinopatía diabética (Trost y col., 2019). Por su parte, el EPR, está íntimamente asociado con el estrato de FRs y es responsable de su mantenimiento, fagocitando segmentos externos no funcionales y reciclando sus componentes (Young y Bok, 1969; Strauss, 2005). Otras de sus funciones son la secreción de factores

tróficos (FTs) a la matriz interfotorreceptora (Ming y col., 2009) y la protección contra la generación de radicales libres (Boulton y Dayhaw-Barker, 2001).

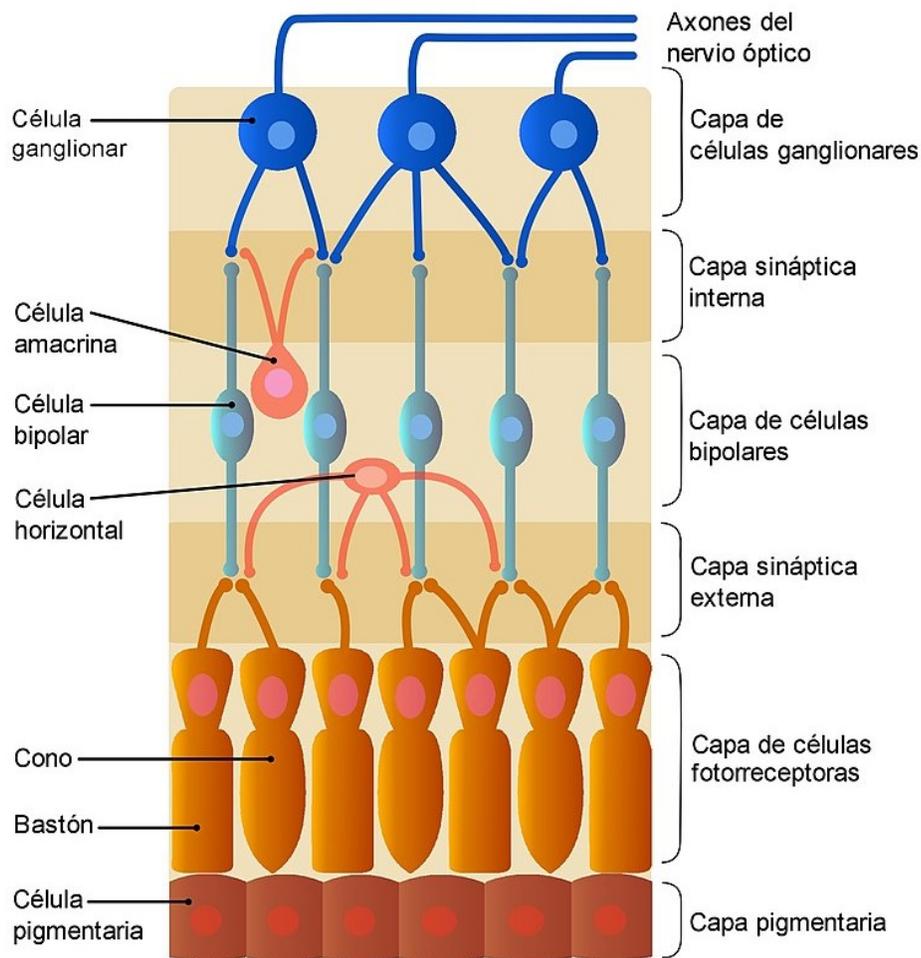


Figura 1: Esquema mostrando las capas y tipos neuronales de la retina (Tomado de <https://es.wikipedia.org/wiki/Retina>).

En resumen, la retina, dada su simplicidad estructural es considerada un excelente modelo para el estudio del SN y de los factores que promueven la supervivencia neuronal.

Los factores tróficos como agentes de supervivencia y diferenciación

Durante la embriogénesis del SN, las neuronas que se generan se desarrollan hasta alcanzar el periodo de formación de las sinapsis, a partir del cual se tornan fuertemente dependientes del suministro de FTs (Wolff y Missler, 1993; Peng y col., 2003), necesarios para continuar con su desarrollo normal y supervivencia. La formación de las sinapsis es clave en el modelado del SN; solo aquellas neuronas que realicen las conexiones correctas y accedan a un suministro adecuado de FTs son seleccionadas para formar parte del SN maduro, siendo las restantes eliminadas por un proceso denominado *muerte programada*. Notablemente, más de la mitad de las neuronas que “nacen” son eliminadas mediante este

proceso natural. Sin embargo, su desbalance conduce a trastornos degenerativos, lo cual pone de relieve la importancia de los FTs. Cabe destacar que, incluso en contextos patológicos, la muerte de los FRs, (así como la de otras neuronas del SN), ocurre mediante una serie de eventos altamente organizados y concertados, que se recapitulan en varios modelos de enfermedades neurodegenerativas (Chang y col., 1993; Marigo y col., 2007; Prado-Spalm y col., 2019).

La dependencia de los distintos tipos neuronales por FTs es específica para cada uno de ellos y varía según la etapa de desarrollo (von Bartheld, 1998) y del tipo de tejido neural. En particular, las neuronas de la retina requieren varios FTs para su supervivencia y diferenciación tanto *in vivo* como *in vitro*. Generalmente, estos FTs son provistos por las *células diana*, con las cuales hacen contacto o, parácrinamente, por las células del entorno. En la retina, las CGM y del EPR proveen buena parte de estos factores. Dada la relevancia que tienen para los FRs y, por ende, en la patogenia de enfermedades retinianas, es necesario establecer cuáles son estos factores, las vías moleculares que activan, las funciones que regulan y cómo influyen en la prevención de su muerte.

Para los FRs, varios de estos factores ya han sido identificados e incluyen al Factor Neurotrófico Derivado de la Glía (GDNF) (Frasson y col., 1999; Wong y col., 2016; García-Caballero y col., 2018), el Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF) (Li y col., 2018) (Wen y col., 2011), el Factor Neurotrófico Derivado del Cerebro (BDNF) (Azadi y col., 2007; Zhang y col., 2009), el Factor de Crecimiento Fibroblástico (FGF) (Fontaine y col., 1998), el ácido docosahexaenoico (DHA) (Rotstein y col., 1996), la esfingosina 1-fosfato (S1P) (Miranda y col., 2009) y, más recientemente, uno de los principales, el Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) (Jablonski y col., 2000; Becerra, 2006; Polato y Becerra, 2016). Todos ellos son necesarios para el mantenimiento de los FRs y, directa o indirectamente, para la retina en su conjunto, de modo que la falta de disponibilidad de los mismos compromete su supervivencia y potencial de desarrollo.

El PEDF y su rol en la retina

La proteína PEDF humana está compuesta por 418 aminoácidos. Es codificada por el gen *SERPINF1* y producida por las células del EPR. El PEDF es un factor con capacidad neuroprotectora frente a varios tipos de estresores externos, como el estrés oxidativo (Nadal-Nicolás y Becerra, 2018; Kim y col., 2021), la fototoxicidad (Rapp y col., 2014; Imai y col., 2009) y la excitotoxicidad (Pang y col., 2007). Además de tener un efecto citoprotector en varios modelos animales de degeneración de la retina (Cayouette y col., 1999;

Miyazaki y col., 2008; Hernández-Pinto y col., 2019; Dixit y col., 2020), también se ha observado que presenta actividad antitumoral para distintas líneas celulares de neuroblastoma, retinoblastoma y osteosarcoma, entre otros (Becerra y Notario, 2013).

El PEDF también es un importante factor antiangiogénico, responsable de mantener la avascularidad en la retina y de contrarrestar la acción del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) (Bouck, 2002; Barnastable y col., 2004; Cai y col., 2006; Amaral y col., 2010). Esta es una propiedad importante si se tiene en cuenta que la Degeneración Macular Asociada a la Edad (AMD), puede presentar manifestaciones neoproliferativas, caracterizadas por la intrusión de capilares sanguíneos en la retina neural, resultado de la deficiencia en los factores antiangiogénicos (Biesemeier y col., 2014; Al-Zamil y Yassin, 2017). Esta función antiangiogénica posee un correlato como factor antitumoral, dado que limita la angiogénesis en ciertos tumores (Filleur y col., 2005).

Ambas funciones del PEDF, neurotrófica y antiangiogénica, han sido mapeadas en regiones discretas y separadas de la proteína (Fig. 2). El sitio activo de la región antiangiogénica está localizado en la sección entre los residuos de aminoácidos en posición 44 a 77 de la secuencia humana (conocido como 34-mer) (Becerra, 2006) mientras que el sitio activo neurotrófico está en las posiciones 78-121 (denominado 44-

mer) (Alberdi y col., 1999; Aymerich y col., 2001; Bilak y col., 2002). Este último posee un fragmento interno de 17 aminoácidos de longitud comprendiendo los residuos 98 a 114 (denominado 17-mer), el cual recapitula los efectos neurotróficos con la misma capacidad que la proteína nativa (Kenealey y col., 2015; Valiente-Soriano y col., 2020).

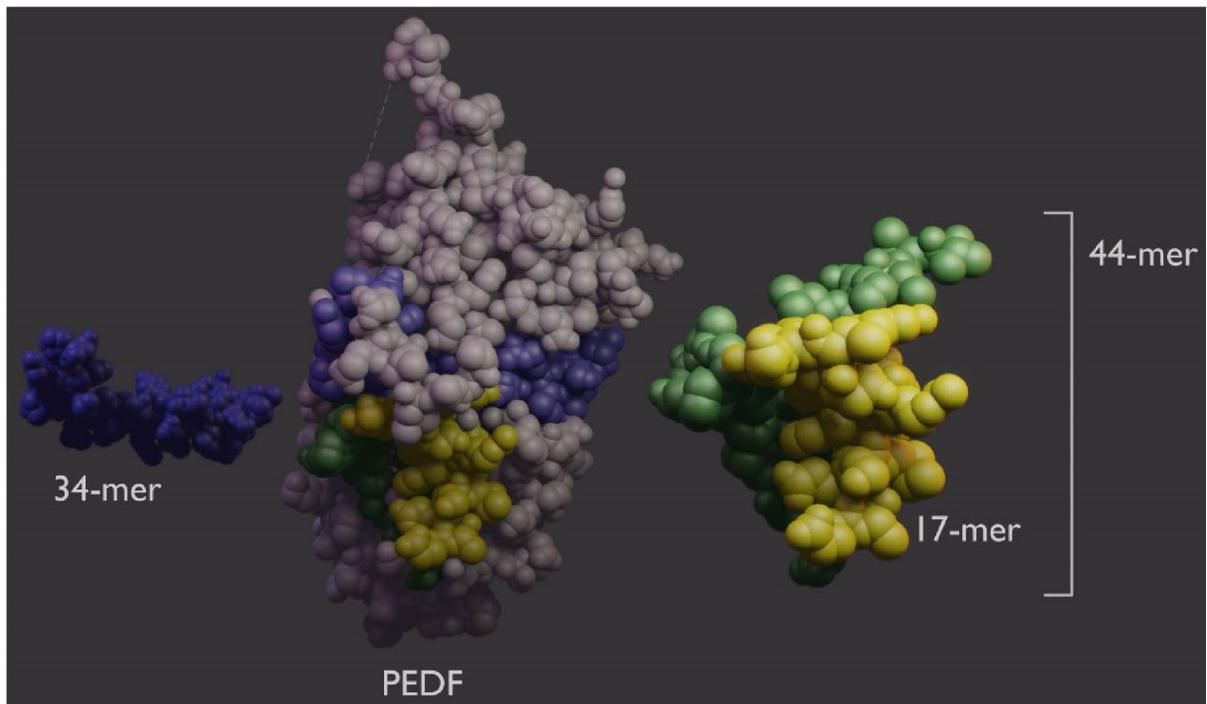


Figura 2: Estructura tridimensional de PEDF (PDB #1IMV), mostrando la proteína entera (centro), su dominio antiangiogénico 34-mer (izquierda) y el dominio neurotrófico 44-mer (derecha), junto con un fragmento (17-mer) capaz de recapitular todas sus funciones neurotróficas. Tomado de Lesley Earl (Office of Science Communications, Public Liaison and Education, NEI)

El PEDF interactúa con su receptor, la proteína denominada PEDF-R. Este receptor posee la actividad enzimática característica de una fosfolipasa A2 independiente de calcio y es codificada por el gen *PNPLA2* (*Patatin-like phospholipase A2*), que se expresa en todas las capas celulares de la retina (Dixit y col., 2020), aunque se halla particularmente concentrada en los FRs (Notari y col., 2006). Esta enzima hidroliza el enlace éster sn-2 de los fosfolípidos, liberando principalmente ácidos grasos poliinsaturados, preferentemente ácido docosahexaenoico (DHA, o 22:6n-3) (Pham y col., 2017) y lisofosfolípidos (Jenkins y col., 2004; Notari y col., 2006). Mientras que la unión al PEDF estimula la actividad enzimática del PEDF-R (Notari y col., 2006) y promueve la supervivencia de las células retinianas R28 y de los fotorreceptores del ratón rd1; su inhibición, ya sea por el péptido bloqueante P1 o por atglistatin, un inhibidor de la fosfolipasa A2 de PEDF-R, suprime estos efectos (Kenealey y col., 2015). Por otra parte, es importante señalar que otro inhibidor de la fosfolipasa A2, la 4-bromoenoil lactona (BEL) inhibe los efectos sobre supervivencia en células R28 del PEDF y la prevención de la muerte celular mediada por el DHA durante el estrés oxidativo en neuronas retinianas *in vitro* (German y col., 2013; Subramanian y col., 2013). Estas evidencias sugieren que el PEDF ejerce una acción directa sobre los FRs, a través de la estimulación del PEDF-R para generar DHA probablemente como su mediador lipídico neurotrófico.

La estimulación del PEDF-R mediante PEDF se ha asociado con varios efectos intracelulares, como la inhibición de la translocación del Factor Inductor de Apoptosis (AIF) al núcleo (Murakami y col., 2008), la reducción del contenido de calcio intracelular (Comitato y col., 2018), la activación de las “quinasas reguladas por señales extracelulares 1/2” (*Extracellular signal-regulated kinases 1 y 2*) (ERK1/2) (Tsao y

col., 2006), el aumento de la expresión del factor del "Linfoma 2 de células B" (*B-Cell Lymphoma 2*) (Bcl2) (Sánchez y col., 2012), la activación de la vía de Fosfatidilinositol-3 Kinasa /Proteína Kinasa B (PI3K/Akt) (Rapp y col., 2014), y la preservación de la actividad mitocondrial (Tian y col., 2017) entre otros, tanto frente a injurias directas como en modelos de degeneración retinal (Pagan-Mercado y Becerra, 2019). El común denominador en estos casos es un aumento en la expresión de factores antiapoptóticos en paralelo con restricción de la acción de sus contrapartes proapoptóticas (Murakami y col., 2008; Bürger y col., 2020).

No obstante, aún se desconoce el alcance de los efectos directos del PEDF en los FRs específicamente, así como los dominios de la proteína asociados a estos efectos.

Modelos para la caracterización de factores tróficos en la retina.

Los efectos del PEDF han sido caracterizados en gran parte en modelos *in vivo* (Polato y Becerra, 2016), los cuales, si bien representan una buena aproximación posible al ser humano, debido a su naturaleza altamente compleja, junto sus numerosas interacciones concurrentes, los convierte en una especie de "caja negra", en la que los procesos, vías moleculares y funciones intervinientes, son difíciles de identificar o caracterizar. En el otro extremo de la escala de complejidad se encuentran las líneas celulares, como las células R28 de retina (Siegel, 2014) que, aunque permiten realizar estudios de buena resolución y reproducibilidad, son células que permanecen activas en el ciclo celular generando diferencias con sus contrapartes *in vivo*, limitando así su fiabilidad.

Los cultivos primarios utilizados en esta tesis, obtenidos a partir de progenitores de retina, permiten capturar las ventajas de ambos modelos. Utilizando un medio químicamente definido, carente de suero, y bajo condiciones controladas de cultivo, estos progenitores se diferencian en neuronas amacrinas y FRs. Ambos tipos neuronales conservan y recapitulan procesos claves del desarrollo observados en la retina entera. Así, la curva de expresión de opsina en estos cultivos conserva los porcentajes hallados en las retinas *in vivo* a tiempos equivalentes del desarrollo. Además, el crecimiento de los axones sigue un patrón morfológico similar al observado *in vivo*, y la generación de progenitores de los FRs ocurre y se completa al mismo tiempo que en su contraparte en la retina entera.

Al igual que otras neuronas del sistema nervioso, los FRs en cultivo, durante su desarrollo, sobrellevan una crisis de supervivencia requiriendo del suministro de FTs, sin los cuales sobreviene su degeneración y muerte (Young, 1984). Estas condiciones permiten evaluar los efectos sobre el desarrollo, supervivencia o diferenciación, de moléculas o factores durante su interacción directa con las células. En particular, debido a que el medio utilizado carece de los FTs requeridos por los FRs, estos cultivos son una herramienta óptima para estudiar los efectos y potencial de FTs como ceramida-1-fosfato (Miranda y col., 2011), DHA (Rotstein y col., 1998), GDNF (Politi y col., 2001b), insulina (Politi y col., 2001c), luteína y zeaxantina (Chucair y col., 2007). Todas estas ventajas nos llevaron a utilizar este modelo para evaluar los efectos de PEDF y sus péptidos derivados.

Hipótesis

La región neurotrófica de la proteína PEDF humana entre los residuos de aminoácidos número 98 y 114 activa los mecanismos intracelulares necesarios para promover la supervivencia, diferenciación y neuritogénesis en células de retina *in vitro*.

Objetivos

Para poner a prueba esta hipótesis los objetivos fueron:

a) Determinar la presencia de PEDF-R en neuronas en cultivo.

b) Determinar el efecto neurotrófico de la proteína y péptidos derivados del PEDF en los fotorreceptores y neuronas amacrininas *in vitro*.

Materiales y métodos

Animales

Los cultivos primarios neuronales se obtuvieron a partir de retinas de ratas neonatas Wistar albinas de entre 1 y 2 días de edad sin distinción de sexo, criadas en los bioterios del NIH y el INIBIBB, o compradas a Charles River (Frederick, MD, Estados Unidos). Los progenitores tenían un rango de edad de entre 3 y 8 meses y fueron mantenidos en parejas hasta el momento del nacimiento. En todos los casos fueron sujetos a un régimen de 14 horas de oscuridad y 10 horas de luz, con suministro de alimento y agua *ad libitum*.

Todos los procedimientos concernientes a la manipulación de animales se realizaron de acuerdo con las normas internacionales vigentes y con aprobación del protocolo de trabajo por el Comité Institucional para Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE) de la Universidad Nacional del Sur (058/2015, 059/2015 y 060/2015) y el Animal Research Advisory Committee del NEI (ASP NEI-682). La eutanasia fue realizada mediante decapitación con tijeras sin anestesia previa.

Proteínas y péptidos

La proteína PEDF recombinante humana, obtenida del laboratorio de la Dra. Becerra (NEI), fue producida y purificada siguiendo una metodología previamente descrita (Stratikos y col., 1996). Específicamente, células BHK fueron transfectadas de forma estable con un plásmido para el PEDF, se rotaron periódicamente entre medio con y sin suero, obteniendo el medio condicionado de este último, el cual fue purificado después de una precipitación con sulfato de amonio por cromatografía de intercambio catiónico.

El fragmento del sitio activo de la proteína PEDF-R (Péptido P1), y los péptidos 17-mer, 34-mer y 44-mer fueron sintetizados químicamente y purificados por Biosynthesis Inc. (Subramanian y col., 2013; Kenealey y col., 2015) (Secuencias de aminoácidos están en la Tabla 1 en Apéndice).

Materiales empleados

Todos los materiales utilizados en este trabajo de tesis, junto con los nombres de sus fabricantes y números de catálogo correspondientes, se encuentran listados en la Tabla 2 del Apéndice.

Cultivos neuronales

Para generar un sustrato que permita la adherencia de las neuronas, las cápsulas de cultivo fueron pretratadas con solución de poli-ornitina disuelta en buffer borato (0,1 mg/ml) durante 1 hora a temperatura ambiente. La poli-ornitina es un polication que se adhiere a la superficie de la cápsula y promueve adhesión neuronal por su atracción electrostática con la superficie cargada negativamente de las neuronas *in vitro*. Las cápsulas fueron lavadas dos veces con una solución salina de Hanks (HBSS) e incubadas durante 16 horas a 37°C con una solución (al 25% en DMEM) de medio condicionado obtenido de cultivos de la línea de Schwannoma RN22, el cual posee un factor promotor del crecimiento de neuritas (Adler,

1982). Justo antes de la siembra de las células, el medio condicionado fue removido, seguido de dos lavados con DMEM.

Los cultivos neuronales puros fueron obtenidos de acuerdo a protocolos previamente establecidos (Politi y col., 1988; Rotstein y col., 1996). Las retinas de ratas neonatas de 1-2 días de edad fueron separadas por medio de una disección en la cual se eliminaron el tejido conectivo y el humor vítreo, para luego ser disociadas mecánicamente mediante agujas de tungsteno. Seguidamente fueron sometidas a una digestión enzimática incubándolas durante 12,5 min a 36°C con una solución de tripsina (0,25%) diluida en 6 ml de buffer Hanks sin calcio ni Magnesio (CMF). Luego de esta digestión, se agregaron 500 µl de inhibidor de tripsina (0,25%) y se incubó durante 30 segundos. A continuación, las retinas se disociaron mecánicamente por medio de una pipeta de vidrio de 5 ml o una pipeta automática con una punta "P1000", previa aplicación de 300 µl de inhibidor de tripsina (0,25%). Las células se resuspendieron en un medio químicamente definido y se sembraron en cápsulas de cultivo de 35 o 60 mm de diámetro, dependiendo del diseño experimental.

Las células así disociadas se sembraron sobre cápsulas de cultivo de 35 mm o 60 mm de diámetro conteniendo un medio de cultivo químicamente definido, preparado como se describiera previamente (Politi y col., 1988). La composición del medio de cultivo químicamente definido fue: DMEM suplementado con penicilina (100.000 U/l), glutamina (2 mM), citidina-5-disfosfocolina (2,56 mg/l), citidina-5-disfosfoetanolamina (1,28 mg/ml), hidrocortisona (100 nM) y el suplemento N1 en el doble de la concentración indicada por Bottenstein y Sato (1979): Insulina ($1,66 \times 10^{-6}$ M), progesterona (4×10^{-8} M), putrescina (2×10^{-4} M), selenio (6×10^{-8} M) y transferrina ($1,25 \times 10^{-7}$ M). El uso de medio de cultivo químicamente definido elimina la variabilidad inherente asociada a medios que contienen suero fetal bovino y permite identificar y caracterizar los efectos generados por aquellos componentes agregados experimentalmente.

Los cultivos se incubaron durante 5 días a 36,5°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂, con un único cambio de medio a día 2.

Cada ensayo fue realizado en triplicado dentro de cada camada, y replicado en múltiples camadas al menos tres veces.

Ensayos de inmunocitoquímica

Para los ensayos de inmunocitoquímica, los cultivos fueron fijados con paraformaldehído (2%) durante 30 minutos a 25°C, permeabilizadas con Tritón X-100 (0,2% en buffer fosfato salino [PBS], compuesto por 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, y 1,8 mM KH₂PO₄, pH 7,4.) durante 10 minutos e incubados con los anticuerpos primarios durante 1 hora, seguido de sus respectivos anticuerpos secundarios durante 1 hora; en ambos casos diluidos en PBS. Cada uno de estos pasos fue intermediado por tres lavados con PBS de 5 minutos cada uno.

Todas las combinaciones de anticuerpos primarios y secundarios junto con sus concentraciones se encuentran detalladas en la Tabla 3 del apéndice.

Para su visualización, los núcleos fueron contrastados con DAPI (35 µM), Hoechst 33342 (20 µM) o TO-PRO3 (2 µM) adquiridos en Invitrogen (Estados Unidos). Todos fueron incubados durante 1 hora junto con los anticuerpos secundarios.

Salvo que se especifique lo contrario, todas las incubaciones se realizaron a 25°C. Las desviaciones de este protocolo están señaladas en las secciones particulares de cada ensayo.

Microscopía

Las imágenes fueron adquiridas mediante microscopía láser confocal, utilizando los microscopios Leica DMIRE2/TSCSP2 y Nikon Eclipse E600, propiedad del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca; junto con los microscopios Zeiss 700 y 880 y Olympus FV1000, propiedad del Bioimaging Core del NEI. Las imágenes fueron analizadas y procesadas con ImageJ (Schneider y col., 2012) y ZEN, el software propiedad de Zeiss. Se analizaron tres cápsulas por condición, con 10 campos aleatorios por cápsula.

Administración y bloqueo de los efectos de PEDF y péptidos derivados

La proteína PEDF y sus péptidos derivados, 17-mer, 34-mer y 44-mer (Tabla 1), fueron diluidos en HBSS para su agregado en el medio. Como control, se utilizó solo HBSS. La concentración óptima que redujo la muerte celular fue de 10 nM, determinada a partir de ensayos preliminares con concentraciones de 1, 10 y 100 nM de PEDF.

Para suprimir los efectos de PEDF o sus péptidos derivados, se utilizó el péptido bloqueante P1, diluido en HBSS a una concentración final en cultivo de 100 nM. Este péptido representa el sitio activo de PEDF-R, el cual, agregado en exceso actúa como un secuestrante de PEDF (Subramanian y col., 2013). Alternativamente, se utilizó el inhibidor enzimático de la lipasa de PEDF-R, atglistatin, en una concentración final en cultivo de 3,5 μ M (disuelto en DMSO). Ambos agentes se incubaron durante 1 hora antes del agregado de los efectores.

Identificación celular

La identificación de los tipos neuronales presentes en los cultivos se realizó por medio de marcación inmunocitoquímica. Para ello, los cultivos fueron fijados; permeabilizados, como fuera previamente descrito e incubados durante 16 horas con los anticuerpos anti-*Cone-Rod Homeobox* (CRX) (Generosamente donado por Cheryl Craft, Universidad de California del Sur, [Zhu et al., 2000]), un factor de transcripción expresado en estadios tempranos del desarrollo de fotorreceptores (Furakawa y col., 1997). Para identificar a las neuronas amacrinas los cultivos se incubaron con un anticuerpo anti-sintaxina (HPC1), que reacciona con un polipéptido de 35 kDa, idéntico a la sintaxina que marca la membrana plasmática del soma celular y la capa plexiforme interna en retina de rata y otras neuronas (Akagawa y Barnstable, 1986; Barnstable y col. 1985). Ambos anticuerpos fueron incubados simultáneamente, diluidos en PBS y llevados a concentraciones finales de 1:400 (vol./vol.) para CRX y 1:40 (vol./vol.) para HPC1 durante 16 horas a 4°C. La expresión de rodopsina en los FRs fue evaluada por medio de ensayos inmunocitoquímicos con los anticuerpos Rho4d2 y Rho1d4 (este último, generosamente donado por el Dr. Robert Molday de la Universidad de Columbia Británica, Canadá [Molday y col., 1988]). Ambos mostraron patrones de marcado equivalentes entre ellos. Los cultivos fueron posteriormente incubados con sus correspondientes anticuerpos secundarios, montados y observados bajo el microscopio confocal Olympus FV1000.

Inmunomarcación de PEDF-R en células en cultivo

Las neuronas fueron cultivadas en portaobjetos de 4 cámaras siguiendo el protocolo previamente descrito. Una vez fijadas y permeabilizadas, las células se incubaron con un anticuerpo anti-PEDF-R (Sigma) diluido en una solución de seroalbúmina bovina (BSA) (0,5%) en PBS durante 1 hora.

Para marcar la membrana celular, las células se incubaron con una solución 10 µg/ml de aglutinina de germen de trigo (WGA) acoplada al fluoróforo Alexa 555 diluido en HBSS durante 10 minutos, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Las imágenes de los preparados se adquirieron con los microscopios Zeiss 700 y 880, así como también *Zstacks*, adquiridos con una separación de 0.6 µm por imagen. Todas las imágenes se procesaron con el software ZEN, utilizando la función de colocalización sobre los *Z-stacks*.

Inmunomarcación de PEDF-R en tejidos de retina

Para la inmunomarcación del PEDF-R en tejidos de retina, se enuclearon ojos de ratas de 1 día de edad, los cuales se fijaron en formalina 10% por 72 horas a temperatura ambiente, tras lo cual se procedió a incluirlos en parafina y finalmente a seccionarlos. Algunas secciones fueron teñidas con hematoxilina-eosina para observar la histología general; mientras que el resto se desparafinó por inmersión en xileno durante 5 minutos, seguido de lavados en concentraciones decrecientes de etanol (100%, 95%, 90%, 70% y 50%) diluido en agua destilada. Estas secciones se lavaron tres veces con PBS e incubaron con solución de bloqueo (0,5% BSA y 0,1% de Tritón X-100 en PBS) durante 30 minutos. Se procedió luego a incubarlas con anticuerpo antiPEDF-R (Protein Tech) diluido 1:1000 en PBS con 0,5% BSA durante 16 horas a 4°C. Luego de 3 lavados con PBS, las secciones se incubaron con su correspondiente anticuerpo secundario diluido 1:200 en PBS, junto con DAPI diluido 1:1000 durante 1 hora a temperatura ambiente. Finalmente, las secciones se lavaron tres veces con PBS antes de montarlas y llevarlas al microscopio Olympus FV1000 para la adquisición de imágenes. Tres ojos de dos animales diferentes se procesaron y analizaron de esta manera.

Evaluación de muerte neuronal

La muerte celular se determinó utilizando la sonda ioduro de propidio (IP), una molécula pequeña autofluorescente que es capaz de unirse al ADN, pero que no puede ingresar pasivamente a células con sus membranas intactas. Dado que la pérdida de integridad de membrana es un evento que ocurre durante cualquier tipo de proceso que conduzca a la muerte celular, este ensayo permite identificar las células muertas en general, independientemente de la forma en que ésta haya ocurrido. Para realizar estos ensayos, los cultivos se incubaron con IP diluido en el medio de cultivo con una concentración de 7,5 µg/ml durante 30 minutos a 37°C. Pasado este lapso los cultivos se lavaron 2 veces con PBS, y se fijaron y permeabilizaron según el protocolo previamente descrito, para luego ser incubados con DAPI o TO-PRO-3. Se procedió luego a la adquisición de imágenes por medio de microscopía de fluorescencia o confocal y su posterior análisis, considerando las células positivas para IP como no viables.

La presencia de ADN fragmentado se determinó por medio del ensayo de TUNEL (*Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick-end labeling assay*), con el kit de detección ApopTag®, siguiendo las instrucciones del fabricante. Este ensayo marca los extremos 3'-hidroxilo terminales en ADN fragmentado, para detectar fragmentación del ADN a nivel celular. Los núcleos fueron contrastados con DAPI, incubado en una dilución 1:100 durante 15 minutos.

Adicionalmente, la fragmentación de ADN se evaluó por medio de citometría de flujo, utilizando el kit APOBrdU™, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras, junto con los controles positivos y negativos que forman parte del kit, se analizaron en el citómetro de flujo CytoFlex NUV LX (Beckmann-Coulter) propiedad del Flow Cytometry Core Facility del NEI. Previamente, las muestras fueron analizadas por FSC y SSC. Los datos se obtuvieron con el software CytExpert (Beckmann-Coulter) y procesados con el software FlowJo (BD Biosciences).

En otros ensayos, se utilizó el kit de Anexina V-Mitotracker de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Anexina V es una sonda que se une selectivamente a la fosfatidilserina, la cual, en condiciones normales,

solo se encuentra en la cara interna de la membrana celular, pero que durante el proceso apoptótico es translocada al exterior por acción de enzimas denominadas *scramblasas*.

En ambos casos se agregaron 50 µl de DAPI (10 µg/ml) inmediatamente antes del ensayo para marcar las células muertas.

Ensayos de citotoxicidad

Para evaluar la presencia de citotoxicidad en el entorno de cultivo se realizó un ensayo con el *LDH Citotoxicity*

Kit. Con este propósito, las células se cultivaron en placas de cultivo de 96 pocillos y se analizaron a los días 3, 5, 7 y 9, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las placas se leyeron en un lector de placas SpectraMax iD5 (Molecular Devices).

Ensayos Mitocondriales

El potencial de membrana mitocondrial se evaluó mediante el kit de *Mitotracker™ Red CMXRos*. Esta sonda permite marcar mitocondrias, y su acumulación y retención en estas organelas es dependiente del potencial de membrana mitocondrial. La marcación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, los cultivos celulares de 5 días *in vitro* fueron incubados durante 30 minutos con la sonda Mitotracker en una concentración final de 200 nM. Los cultivos fueron lavados 2 veces con PBS, fijados, permeabilizados, y finalmente incubados con DAPI o TO-PRO-3 según el protocolo ya descrito.

Las imágenes se adquirieron con el microscopio Eclipse E600 o microscopía confocal. Para cuantificar, la intensidad de fluorescencia, ésta se restringió utilizando un filtro ND40 en el Eclipse E600, o ajustando los parámetros de detección de fluorescencia de una forma equivalente en microscopía confocal. Las células con una señal intensa y discreta localizada en el cono axonal fueron consideradas como sanas.

Desarrollo de Neuritas

Para evaluar el desarrollo de neuritas, las células fueron fijadas y permeabilizadas según el protocolo de inmunocitoquímica descrito anteriormente, e incubadas con anticuerpo anti-tubulina acetilada o anti-Tuj1 durante 1 hora. Para la cuantificación, se midió el largo de la neurita más larga de cada neurona, el cual fue dividido por el diámetro de su respectivo núcleo. Esta información se procesó utilizando el software GraphPad Prism (Versión 8.2.0).

Obtención del medio condicionado de Schwannoma (RN22)

Para obtener el medio condicionado que promueve el crecimiento de neuritas en los cultivos neuronales se cultivaron células de la línea celular RN22, incubadas en un medio de cultivo compuesto de DME y 10% de suero fetal bovino a 37°C y 5% de CO₂, utilizando frascos de cultivo T25 y T75. Justo antes que los cultivos alcanzaran el estadio de *confluencia celular*, se removió el medio de cultivo, se los lavó luego con DME dos veces, de modo de eliminar vestigios de suero en el medio y finalmente fueron incubados con DME sin suero durante 48 horas. Una vez concluido el periodo de incubación, se colectó el medio condicionado, se lo filtró utilizando filtros estériles de 0.22 µm y se lo alicuotó en viales estériles. Para su uso, el medio condicionado fue finalmente diluido al 25% en DMEM, como se indicara en la sección de cultivos neuronales.

DetECCIÓN DE PEDF POR ELISA

Para detectar y cuantificar la proteína PEDF se utilizó un kit de detección de PEDF por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo de ELISA permite detectar la presencia de PEDF por medio de anticuerpos anti-PEDF ubicados en el sustrato de los pocillos de reacción, los cuales capturan el PEDF del medio. La presencia de PEDF fue puesta de manifiesto utilizando un segundo anticuerpo anti-PEDF conjugado con biotina, el cual reacciona con una solución de estreptavidina-peroxidasa, generando un producto coloreado, cuya intensidad se mide por espectrofotometría.

Western Blotting

Las células en cultivo fueron sometidas a lisis con el buffer RIPA siguiendo las instrucciones del fabricante, y los lisados resultantes se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser procesados. La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de BCA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una cantidad equivalente de proteína de cada lisado fue sembrada en geles NuPage Bis-Tris 10%, que fueron sometidos a corridas electroforéticas a 125 volts durante 90 minutos, utilizando MOPS como buffer de corrida. Las proteínas del gel se transfirieron posteriormente a una membrana de nitrocelulosa mediante el dispositivo de transferencia iBlot2 (ThermoFisher, IB21001, US). Se utilizaron dos métodos para detección de señal: *Enhanced chemiluminescence* (ECL) y Li-Cor. Si bien ambos métodos se basan en la detección de proteínas por medio de inmunomarcación, la detección por ECL utiliza anticuerpos secundarios asociados a peroxidasa, la cual reacciona con H_2O_2 y luminol, generando un producto quimioluminiscente. Li-Cor, por su parte, utiliza anticuerpos secundarios conjugados con fluoróforos que emiten en el espectro rojo e infrarrojo (680 y 800 nm), los cuales son detectables por medio del dispositivo Li-Cor.

Para el método de ECL, el éxito de la transferencia fue evaluado mediante una incubación de 2 minutos con Ponceau Red, seguido de 3 lavados con agua destilada.

Las membranas fueron posteriormente incubadas en BSA (5%) disuelta en TBST (137 mM NaCl, 20 mM Tris, 0,1% Tween 20, pH 7,4) durante 1 hora, y posteriormente incubadas con anticuerpo anti-PEDF-R (Sigma) diluido 1:1000 en TBST con BSA 1% durante 16 horas a 4°C . Luego de tres lavados de 5 minutos cada uno con TBST, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa diluido 1:1000 y disuelto en TBST durante una hora, seguido de incubación con el kit de detección por ECL durante 30 segundos antes de realizar la adquisición de imágenes.

Las imágenes fueron tomadas con la cámara Kwik-Quant. Las membranas fueron posteriormente incubadas con buffer de *stripping* (fórmula registrada por el fabricante; ver tabla 2), durante 10 minutos, lavadas 3 veces con PBS durante 5 minutos e incubadas con anticuerpo anti-GAPDH diluido 1:10000.

Para el método Li-Cor, se utilizó el kit de cuantificación de proteína total para verificar el éxito de la transferencia y cuantificar la cantidad total de proteína en cada carril, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Luego de ser lavadas tres veces con PBS, las membranas fueron incubadas en solución de bloqueo, compuesta por el buffer de bloqueo diluido 50% en PBS durante 30 minutos. La solución de bloqueo se removió, reemplazándose por el anticuerpo anti-Bcl2, diluido 1:2000 en solución de bloqueo con 0.1% Tritón X-1000, y se procedió a su incubación por 16 horas a 4°C . Pasado este tiempo, las membranas fueron sometidas a tres lavados de 5 minutos cada uno con PBS e incubadas con el anticuerpo secundario *antiRabbit* diluido 1:1000 durante 1 hora en oscuridad. Luego de otros tres lavados realizados de la misma manera, la señal se visualizó por medio del dispositivo Li-Cor DLx (Li-Cor Biosciences, US). Los anticuerpos se eliminaron de la membrana utilizando el buffer de *stripping* de Li-Cor, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Extracción de ARNm y RT-PCR

La extracción de ARNm fue realizada por medio del *RNeasy Mini Kit* siguiendo las instrucciones del fabricante, incluyendo el paso opcional con ADNasa. En ambos, las muestras fueron almacenadas a -80°C y procesadas de la misma manera. Previo a su uso, la cantidad y pureza del ARN se evaluaron mediante absorbancia utilizando las longitudes de onda a 260 y 280 nm usando el espectrofotómetro NanoDrop One (Fisher Scientific, 13-400-518, US).

Para los ensayos de RT-PCR, las muestras fueron procesadas con el kit QuantiTect SYBR Green siguiendo las instrucciones del fabricante y analizadas en el dispositivo de RT-PCR Viiia7 (Thermo Fisher Scientific). Se realizaron 40 ciclos de amplificación, consistiendo en un primer paso a 95°C durante 15 segundos, seguido de un segundo paso a 60°C durante 60 segundos, modificando la temperatura a una velocidad $1,6^{\circ}\text{C}/\text{segundo}$ en todos los casos. La expresión relativa de ARNm fue calculada usando el método de *Comparative Threshold* (CT), con ARN 18S como normalizador. La expresión del ARN 18S se calculó con las respectivas muestras diluidas 1:1000 respecto de las muestras para detección de PEDF-R (Utilizando agua libre de ARNsa como solvente). Ambas muestras fueron analizadas por triplicado. Los *primers* utilizados fueron designados para amplificar los siguientes ADNcs: *Pnpla2* Forward: (5'TGTGGCCTCATTCTCCTAC-3'), *Pnpla2* Reverse (5'-TGAGAATGGGGACACTGTGA-3'), 18S Forward (5'GGTTGATCCTGCCAGTAGC-3'), 18S Reverse (5'-GCGACCAAAGGAACCATAAC-3'). La eficiencia de amplificación fue de aproximadamente 90% para cada par de *primers*. Los números de acceso son: XM032891430 para *Pnpla2*, y AH001747 para 18S.

Perfil de ARNm de factores pro y antiapoptóticos

Las muestras de ARNm se extrajeron mediante el *RNeasy Mini Kit*, utilizándose 8 cápsulas de 35 mm por condición, 6 horas después del tratamiento con PEDF a DIV2. El rendimiento promedio fue de $0,5\ \mu\text{g}$ de ARNm por cápsula.

El ARNm se procesó a ADNc con el kit *RT² First Strand* siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenó a -80°C . Posteriormente se realizó un ensayo de RT-PCR utilizando el kit *RT² Profiler PCR Array (Rat Apoptosis)*. Se utilizaron los parámetros de amplificación y equipo anteriormente mencionados. La normalización se realizó controlando la cantidad inicial de ARNm convertido a ADNc en ambas condiciones. En el ensayo de RT-PCR se utilizó el gen de Lactato Deshidrogenasa incluido en el kit como control interno.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism (Versión 8.2.0) usando el análisis *t de student* o ANOVA, seguido del test de Tukey o el test de comparaciones múltiples de Dunnett, según sugerencia del software. Todos los gráficos están contruidos con la media más el desvío estándar de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***), $p < 0,0001$ (****).

Resultados

Los cultivos neuronales están compuestos por fotorreceptores y neuronas amacrinas

Para identificar los tipos celulares presentes en los cultivos, se evaluaron la morfología mediante microscopía de contraste de fases y la expresión de marcadores celulares específicos por técnicas inmunocitoquímicas.

El análisis morfológico reveló la existencia de dos tipos celulares, FRs y neuronas amacrinas. Los FRs exhibieron un cuerpo celular pequeño (5-10 μm de diámetro) y redondo y, al momento de ser cultivados, carecieron de neuritas (Fig. 3A). En la medida que progresó su diferenciación, desarrollaron una única neurita corta de 5-10 μm de largo y, eventualmente, un cilio apical y un pie sináptico conspicuo, similar al observado en los FRs en las retinas *in vivo* (Fig. 3B).

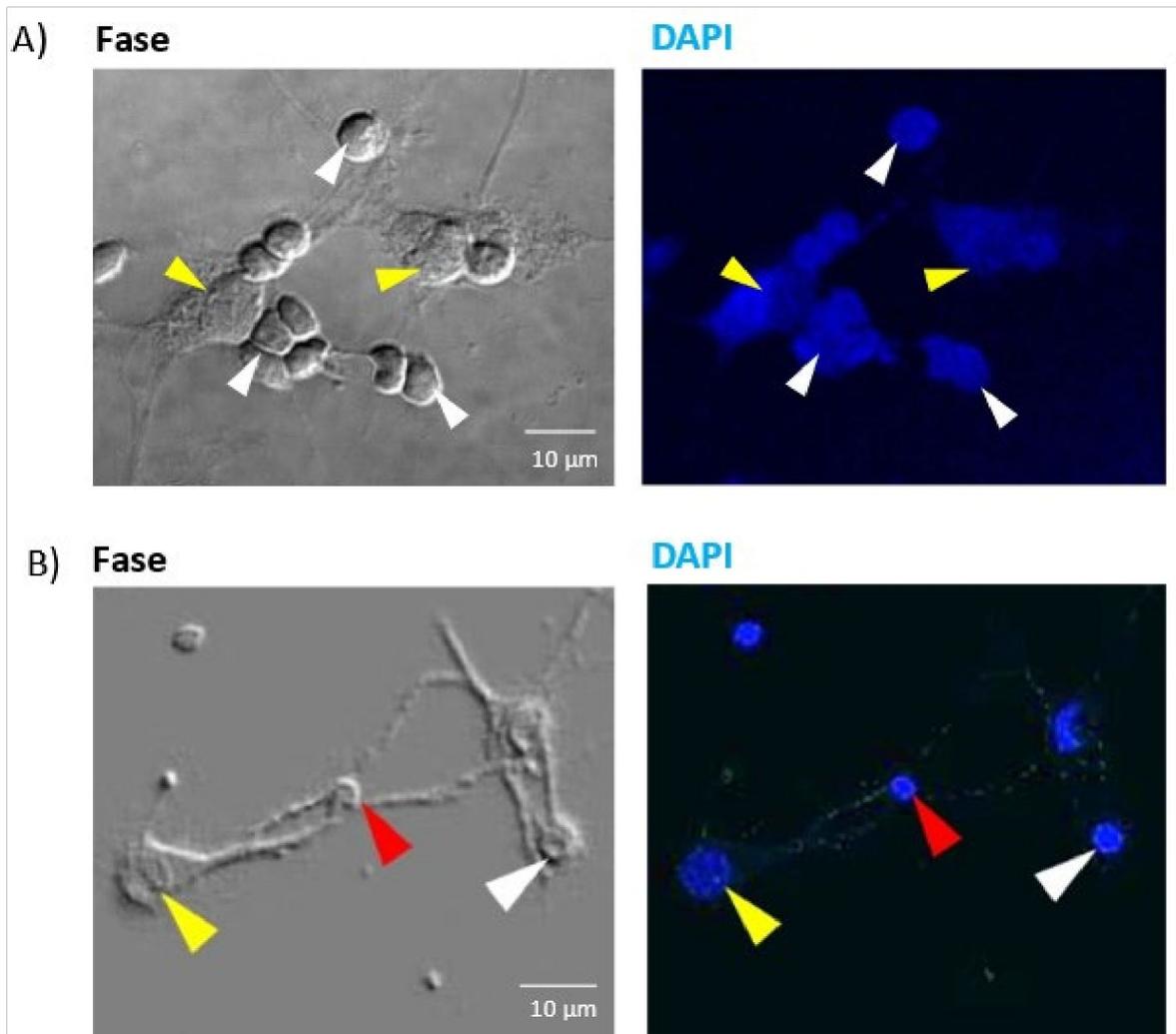


Figura 3: Caracterización de las neuronas obtenidas en cultivo. A) Imágenes de cultivos retinales a 5 días de desarrollo, mostrando la estructura típica de FRs (Flechas blancas) y neuronas amacrinas (Flechas amarillas). Los FRs son identificables por su cuerpo celular redondo, de entre 5 y 10 μm de diámetro y por poseer una única neurita corta. Las neuronas amacrinas, en contraste, poseen un cuerpo celular de entre 10 y 30 μm de diámetro y múltiples neuritas, dependiendo de su subtipo. B) Imágenes de cultivos retinales de 5 días de desarrollo, mostrando FRs y neuronas amacrinas sanas (Flechas blancas y amarillas respectivamente) y FRs picnóticos (Flechas rojas), los cuales se observan como núcleos más pequeños, con mayor intensidad de fluorescencia por DAPI.

Adicionalmente, los FRs en cultivo fueron identificados mediante técnicas inmunocitoquímicas usando anticuerpos contra la proteína *Cone-Rod Homeobox* (CRX) (Fig. 4A), la cual es uno de los primeros marcadores que expresan los precursores de FRs al comprometerse a este linaje. Por su parte, las neuronas amacrinas poseen un cuerpo celular de mayor tamaño (10-30 μm) y, al igual que sus contrapartes *in vivo*, desarrollan una o múltiples neuritas (Figs. 3A, B). Para completar la caracterización inequívoca de estas neuronas, las mismas fueron identificadas con un anticuerpo monoclonal anti-sintaxina (HPC1) (Fig. 4A), el cual permite marcar la mayoría de los subtipos de neuronas amacrinas.

Tal como se observa en la figura 4A, las células positivas para CRX comprendieron la gran mayoría de las células en cultivo, las cuales representaron aproximadamente el 80% de neuronas existentes, mientras que las neuronas amacrinas representaron un 15% (Fig. 4B). Las células restantes fueron constatadas como muertas por contraste de fases y DAPI, una sonda fluorescente que se une a regiones ricas en Adenina-Timina en el

ADN, que permite observar núcleos en estado de picnosis (Fig. 3B).

Ensayos de citometría de flujo revelaron que estas neuronas en cultivo no presentaron una autofluorescencia significativa (Fig. 4C, panel superior) y que, al ser incubadas con anticuerpo anti-CRX y su correspondiente secundario, se observó una abundancia relativa de eventos CRX-positivos de aproximadamente un 80% (Fig. 4C, panel inferior). Ensayos sucesivos permitieron verificar que este porcentaje se mantuvo en diferentes cultivos, y mostró en concordancia con los valores observados por inmunocitoquímica (Fig. 4D). Estas observaciones indicaron que los cultivos primarios retinales están compuestos solo por dos tipos de neuronas, donde una gran mayoría correspondió a los FRs, mientras que las neuronas amacrinas, de mayor tamaño que los FRs, representaron una fracción minoritaria.

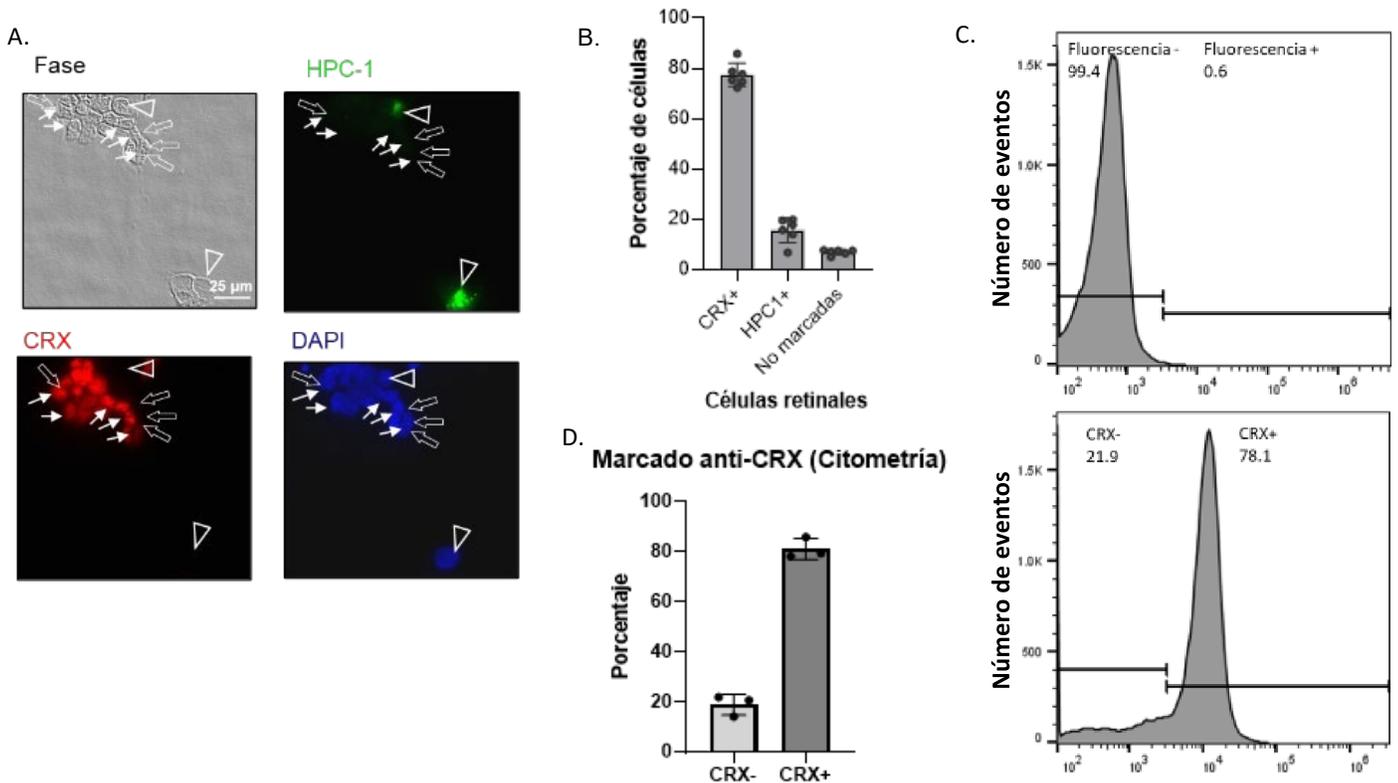


Figura 4: Identificación y cuantificación de neuronas retinales en cultivo. A) Cultivos neuronales de retinas de 5 días de desarrollo mostrando los dos tipos de neuronas presentes en estos cultivos, FRs (flechas) y neuronas amacrinas (cabezas de flecha), identificados por ensayos inmunocitoquímicos utilizando anticuerpos contra CRX (Rojo) y HPC1 (Verde), respectivamente. Los cultivos fueron preparados por duplicado y obtenidos de 6 camadas de ratas PN1 en dos laboratorios distintos (Laboratorios de P. Becerra y L. Politi) (Barra: 25 μm). B) Análisis cuantitativo mostrando el porcentaje de los tipos celulares marcados con HPC1 y CRX en cultivos hechos con diferentes camadas ($n=6$). C) Ensayo de citometría de flujo de neuronas retinales a día 5 de desarrollo *in vitro* inmunomarcadas con CRX (histograma inferior) comparadas con neuronas sin fluoróforo como control de fluorescencia

(histograma superior). D) Gráfico mostrando el porcentaje de eventos CRX+ en tres ensayos independientes por citometría de flujo (n=3).

El PEDF-R está presente en neuronas en cultivo

Para investigar la presencia de PEDF-R en retinas enteras y en los cultivos a distintos tiempos del desarrollo se realizaron ensayos de RT-PCR, *western blotting* e *inmunocitoquímica*.

El ensayo de *RT-PCR* del transcripto para *Pnpla2*, el gen que codifica a PEDF-R, en cultivos de células a los días *in vitro* 1, 3 y 5, y a sus días equivalentes en retinas enteras, PN 2, 4 y 6, mostró que los máximos valores de transcripción (Relación *Pnpla2/18s*) fueron observados en las retinas enteras, al día PN2 y, en los cultivos, a su tiempo equivalente, correspondiente al DIV1 (Fig. 5A) y, en ambos casos, mostraron un perfil descendente, alcanzando sus valores mínimos en las relaciones *Pnpla2/18s* de retinas enteras a los días PN6 y a DIV5, en cultivos. En correspondencia con estos resultados, la presencia de la forma proteica de PEDF-R, evaluada mediante ensayos de *western blot* (Fig. 5B), mostró un patrón decreciente en función del tiempo de desarrollo, similar al observado a nivel del transcripto.

Además, ensayos inmunocitoquímicos con anticuerpos anti-PEDF-R permitieron detectar la presencia de PEDF-R en las células. La marcación de PEDF-R se distribuyó en "parches" ubicados en la periferia celular y a lo largo de las neuritas (Fig. 5C). Una proyección ortogonal evidenció una superposición de PEDF-R con el marcador de membrana plasmática, la aglutinina de germen de trigo (*WGA*) (Fig. 5D). Este fenómeno pudo corroborarse utilizando anticuerpos contra la sodio-potasio ATPasa, un marcador de membrana, y con anticuerpos anti-PEDF-R provenientes de distintas fuentes comerciales (Fig. 6). La proteína PEDF-R se detectó también en la retina *in vivo* de animales al día PN1, cuando este tejido aún se encuentra en un estadio temprano de diferenciación (Fig. 7A). En este caso, el PEDF-R exhibió un gradiente más intenso en la capa ganglionar, desvaneciéndose gradualmente hacia las capas más externas (Fig. 7B).

Concluimos así que PEDF-R está presente en las células del cultivo durante el período de incubación, y que se encuentra ubicado primariamente en la membrana citoplasmática.

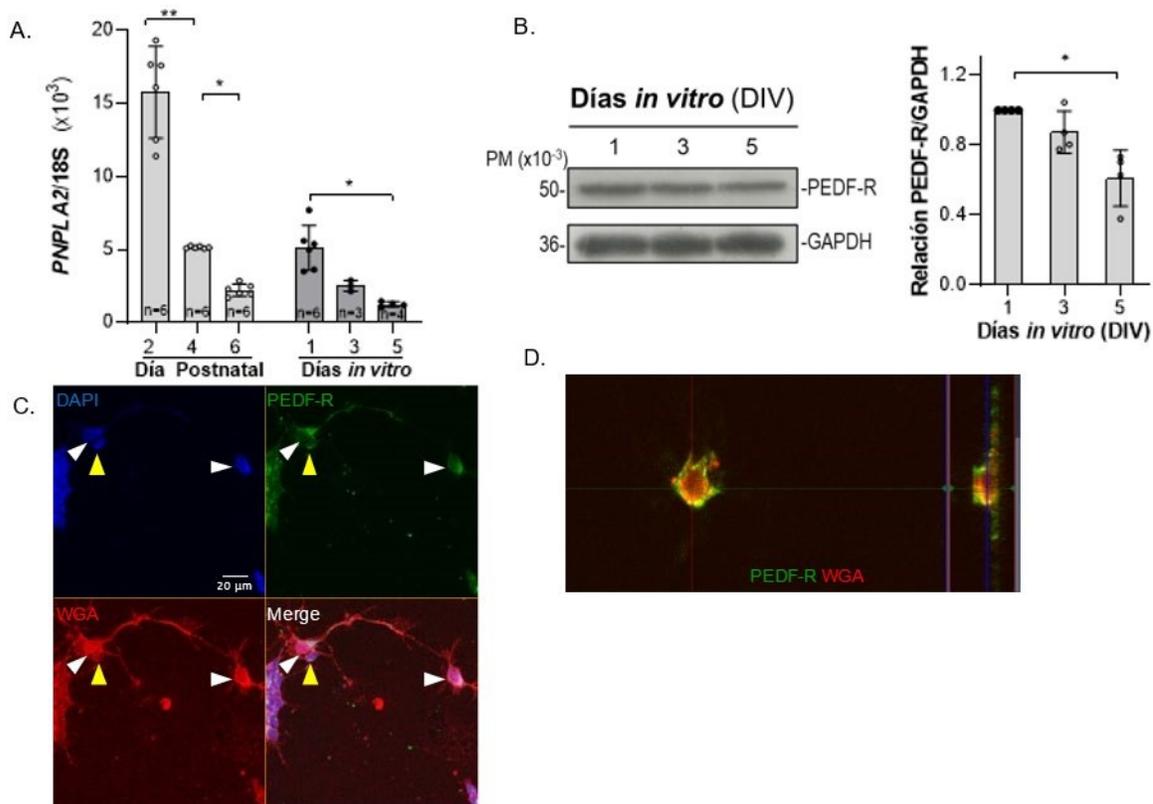


Figura 5: Expresión de del gen Pnpla2 y localización de la proteína PEDF-R. A) Expresión de Pnpla2 en células retinales en cultivos de retina a DIV1, 3 y 5 y en retinas de ratas *in vivo*, a PN2, PN4 y PN6. Los datos fueron colectados mediante ensayos de RT-PCR con ARN aislado de cultivos celulares y retinas enteras. Los gráficos muestran los niveles de expresión relativas de Pnpla2 en relación a los niveles de 18S en función del tiempo de cultivo o edad, respectivamente. Cada punto corresponde a los niveles de expresión de Pnpla2 en un ojo (*in vivo*) o una capsula del cultivo celular (*in vitro*). El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA seguido de un test de Tukey. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. B) Producción de PEDF-R en cultivos celulares determinada por western blot. Las proteínas se extrajeron de las células en cultivos a DIV1 (Carril 1), DIV3 (Carril 2) y DIV5 (Carril 3) y los blots se inmunomarcaron con anticuerpo anti-PEDF-R y anti-GAPDH. El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA seguido de un test de Tukey. * $p < 0,05$ ($n=4$, cada punto representa una camada diferente) C) Fotomicrografía de cultivos neuronales de la retina inmunomarcados con anti-PEDF-R (Verde), el marcador de membrana plasmática WGA (Rojo) y contrastada con DAPI (Azul). (Barra: 20 μm). D) Proyección ortogonal de un Z-stack, mostrando el área de superposición de PEDF-R (Rojo) y el marcador de membrana WGA (Verde) tomada del cultivo mostrado en el panel C.

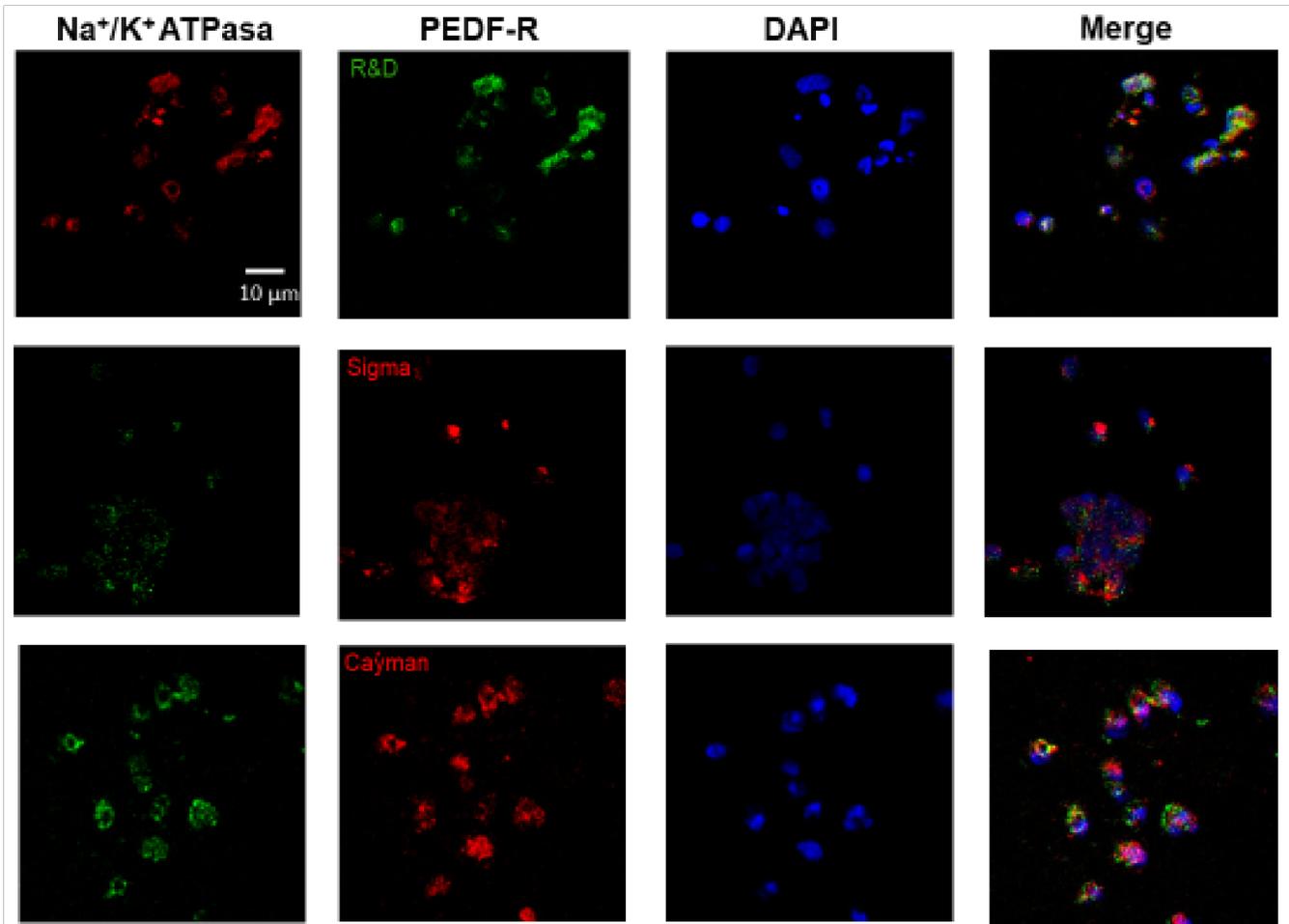


Figura 6: Inmunomarcación de PEDF-R y Na^+/K^+ ATPasa. Distribución de la proteína PEDF-R en células de cultivos de retina después de 5 días (DIV5) de incubación, usando anticuerpos contra PEDF-R proveniente de tres fabricantes diferentes (R&D, Sigma-Millipore y Cayman, indicado en cada panel en la segunda columna de la izquierda), con anti- Na^+/K^+ ATPasa (primera columna de la izquierda), y con DAPI (azul, tercera columna de la izquierda). La columna de la derecha (Merge) corresponde a la superposición de las tres marcaciones. (Barra: 10 μm)

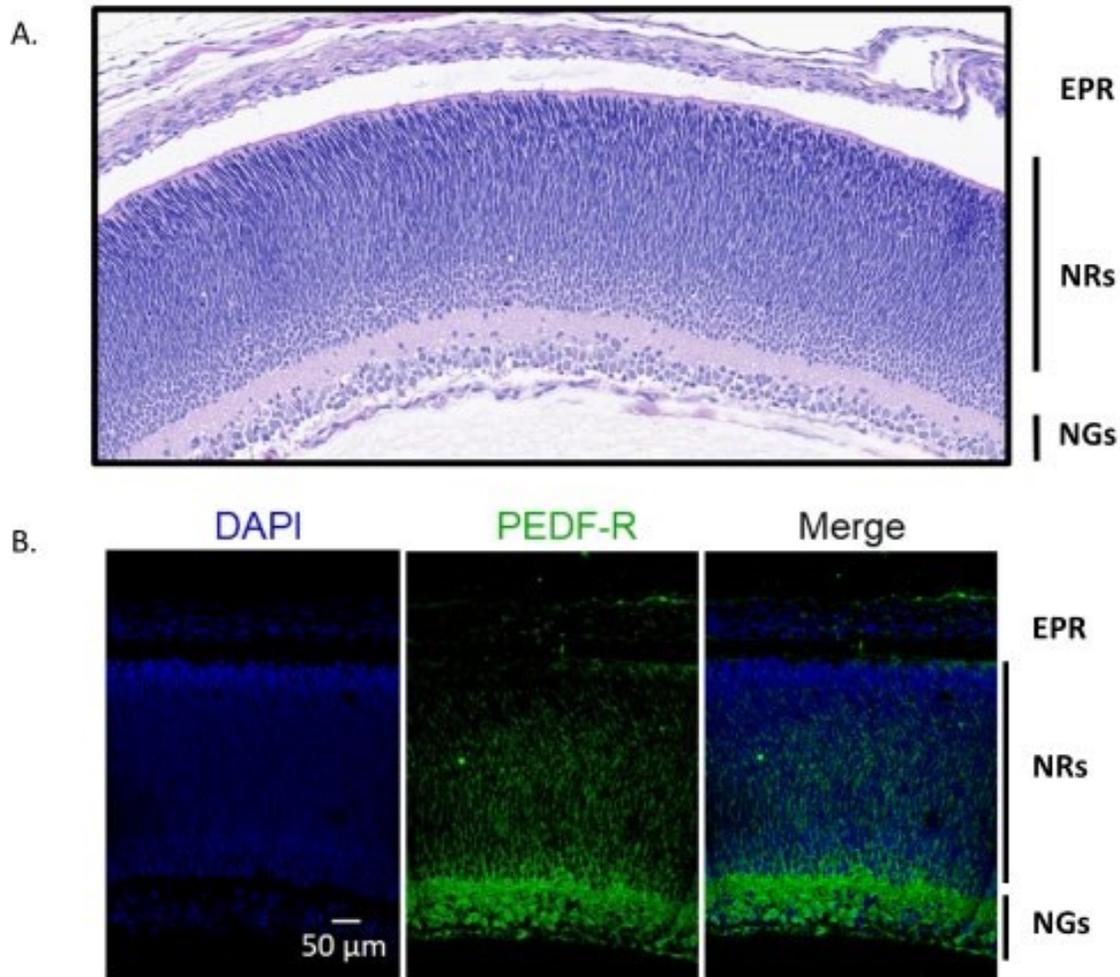


Figura 7. Presencia de PEDF-R en la retina neonata. A) Corte histológico de retina de rata a PN1, teñido con hematoxilina-eosina, mostrando una capa de neuronas ganglionares (NGs) separadas de una sección de neuronas de retina (NRs) que aún no poseen la estratificación típica de la retina madura. B) Inmunocitoquímica para PEDF-R (Verde), mostrando fluorescencia principalmente ubicada en el estrato de neuronas ganglionares y parcialmente en el resto de las neuronas y el EPR (Barra: 50 µm)

El PEDF está presente en trazas en el medio condicionado de cultivo de células de Schwannoma RN22

El medio condicionado de RN22 empleado en los cultivos neuronales utilizados en este trabajo de tesis posee un factor denominado *Polyornithine-attached neurite-promoting factor* (PNPF), capaz de adherirse al sustrato y facilitar la adherencia de neuritas al mismo (Adler, 1982). Dada la capacidad de PEDF para estimular el crecimiento de neuritas en neuronas retinales (Steele y col., 1993; Vigneswara y col., 2013), se investigó la posible presencia de PEDF en el medio condicionado de RN22. La determinación de los niveles de PEDF se realizó en 16 alícuotas de medio condicionado mediante el método de ELISA, seleccionadas al azar. La cantidad de PEDF presente en las alícuotas tuvo un valor promedio de 10 ng/ml con una dispersión de ± 5 ng/ml (Fig. 8), lo que equivale a una concentración de $0,2 \pm 0,1$ nM en el medio condicionado. Las diferencias observadas en los niveles de PEDF entre diferentes muestras es atribuible a la muy baja concentración de PEDF. Considerando que se usaron 2 ml de este medio diluido 1:4 (vol./vol.) para cubrir la cápsula de $9,6 \text{ mm}^2$, esto representa una concentración final de $0,05 \pm 0,025$ nM en la cápsula de cultivo.

Asumiendo una adhesión total de PEDF al sustrato, la cantidad del mismo por cápsula de cultivo de 35 mm de diámetro sería de 5 ng/cápsula, lo que representa el 0,5% del total agregado en el tratamiento a DIV2. Este hecho, junto a que el medio condicionado es removido y lavado previo a recibir las células, indicaría que solo trazas de PEDF quedarían asociadas a la poli-ornitina que forma parte del sustrato, por lo que no tendría un efecto significativo por sí mismo.

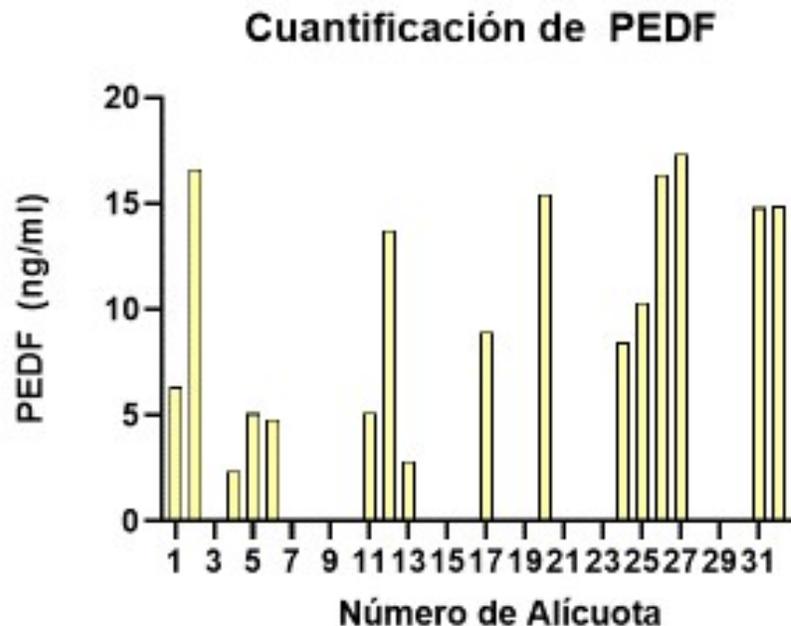


Figura 8: Determinación de los niveles de la proteína PEDF en muestras de medio condicionado de la línea RN22. Gráfico de la cuantificación de 16 alícuotas diferentes por medio de ELISA, mostrando las alícuotas elegidas y su respectiva concentración de PEDF.

El PEDF y sus péptidos derivados, 17-mer y 44-mer, protegieron a las neuronas de retina de la muerte

Trabajos previos han demostrado que, una vez alcanzado el periodo de la formación de sinapsis, las neuronas se tornan dependientes del suministro de FTs para su supervivencia (Wolff y Missler, 1993; Peng y col., 2003). En forma similar, en los cultivos, los FRs en ausencia de FTs, degeneran al cabo de un tiempo de su desarrollo (Rotstein y col., 1996, 1998). En este contexto, se evaluó el efecto citoprotector de PEDF y péptidos neurotróficos 17-mer y 44-mer sobre cultivos neuronales a DIV5. Para ello, se utilizó la sonda IP, la cual es capaz de marcar los núcleos de células cuya membrana se encuentra dañada. Como control negativo de los tratamientos, se utilizó el fragmento antiangiogénico 34-mer.

Como se observa en la Fig. 9A, el PEDF disminuyó la marcación de IP, lo que sugiere que este factor ejerció un efecto protector sobre las células en los cultivos. La cuantificación de IP mostró que, en los controles, un 29% de células eran IP-positivas, mientras que en aquellas tratadas con PEDF, 44-mer o 17-mer estos porcentajes fueron de 13%, 15% y 16%, respectivamente (Fig. 9B). En contraste, cuando estos cultivos

fueron pretratados con el fragmento del sitio activo de PEDF-R, el péptido bloqueante P1, mostraron valores comparables a los del control (29%, 30% y 27% respectivamente) (Fig. 9B)

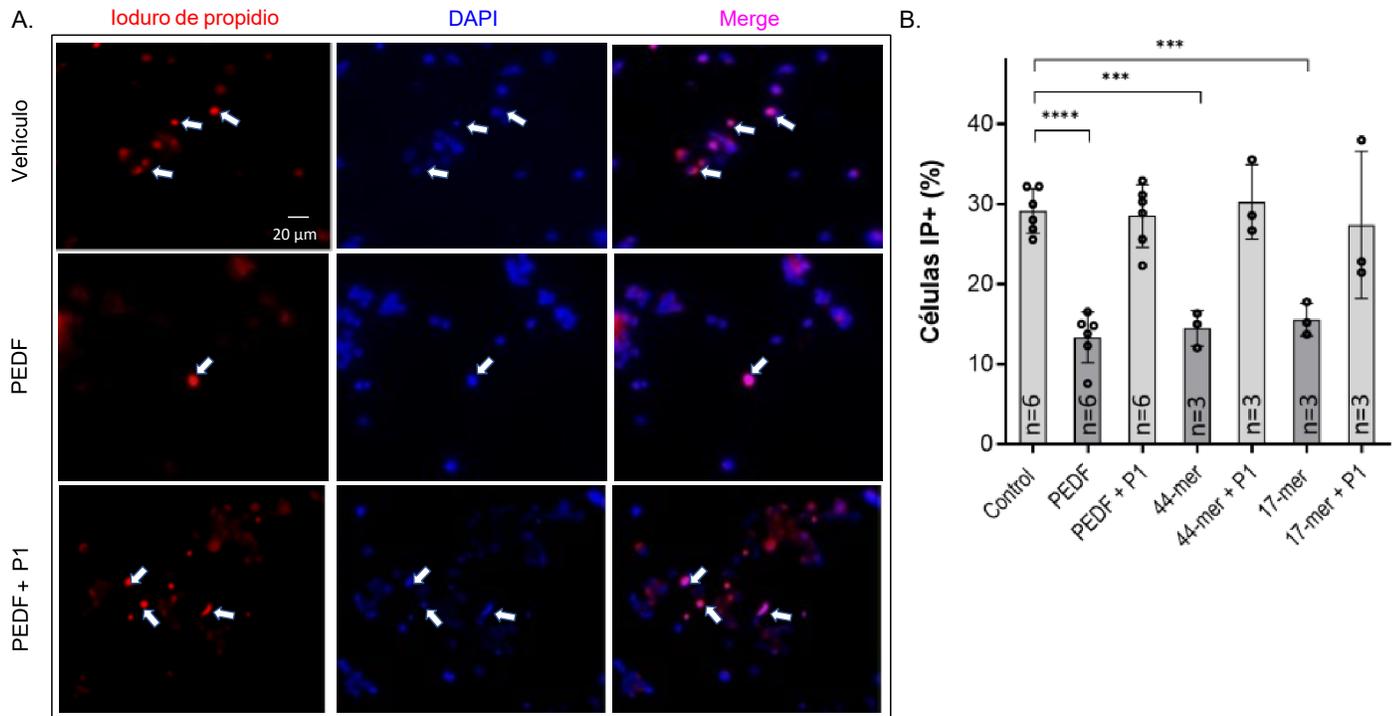


Figura 9: Efectos de la proteína PEDF y péptidos derivados en la prevención de muerte celular. A) Fotomicrografías de fluorescencia tomadas en cultivo de DIV5 suplementados con vehículo (control), PEDF y PEDF+P1, mostrando núcleos fluorescentes (rojo) (flechas) y contrastados con DAPI (azul) (Barra: 20 μ m). B) Porcentajes de núcleos IP+ en cultivos tratados con vehículo (control) o con PEDF y péptidos derivados, con y sin preincubación con el péptido bloqueante P1, según se indica en el eje X. El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA seguido de un test de Dunnett. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ (Cada n está indicado en su respectiva barra, comprendiendo el número de cápsulas evaluadas).

Además, el ensayo de TUNEL, reveló que, en cultivos control, el porcentaje de células TUNEL positivas fue de un 14% las que, mayoritariamente, presentaron núcleos fragmentados o picnóticos (Fig. 10A). El agregado de la proteína PEDF, o los péptidos 44-mer o 17-mer (10 nM), redujo este porcentaje a 8,9%, 6,3% y 8%, respectivamente (Fig. 10B).

En todos los casos, la preincubación de los efectores con el péptido bloqueante P1 en exceso (100 nM) canceló dichos efectos. Por su parte, los péptidos 34-mer (antiangiogénico) y P1 no ejercieron efectos protectores (Fig. 10B).

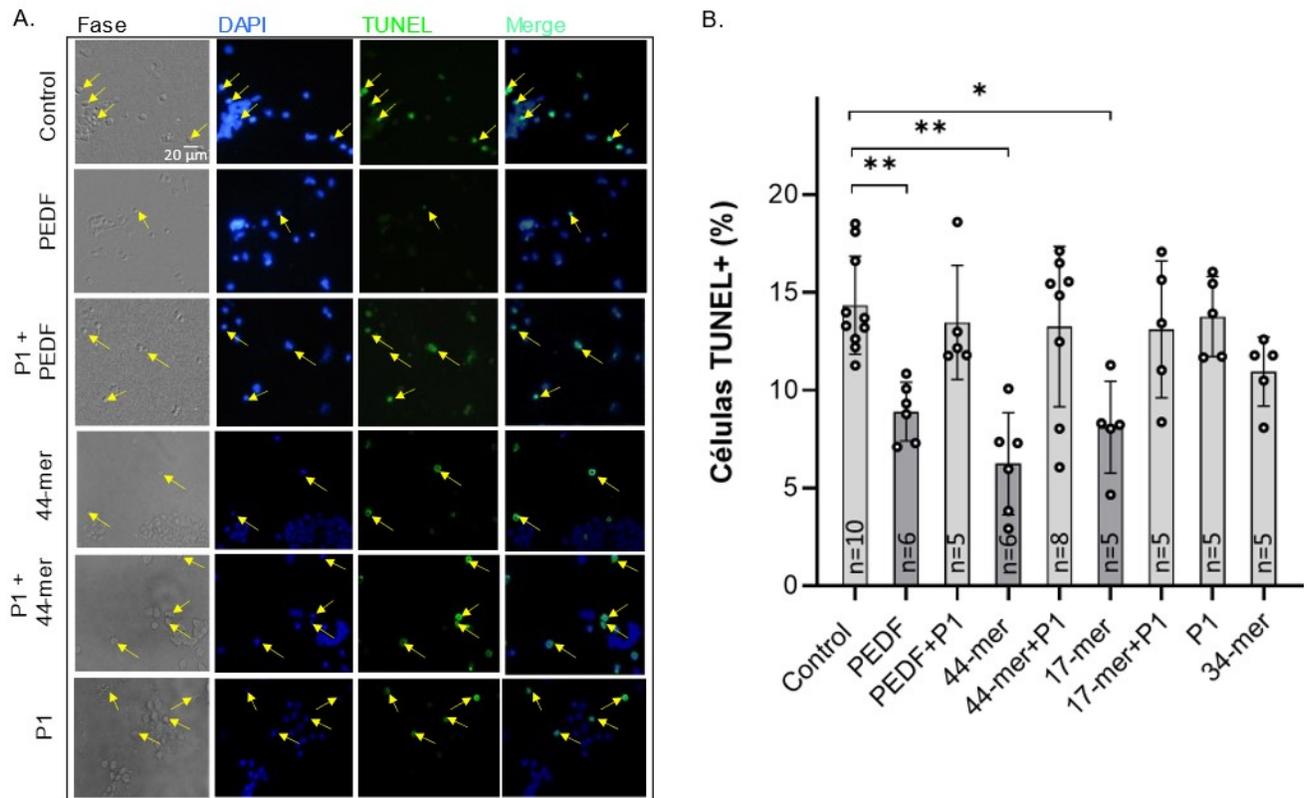


Figura 10: Efectos de la proteína PEDF y sus péptidos derivados en la prevención de la muerte celular. A) Fotomicrografías de cultivos a DIV5 mostrando células con núcleos fragmentados (Flechas), TUNEL-positivas (Verde) y contrastadas con DAPI (Azul) (Barra: 20 µm). B) Porcentajes de núcleos TUNEL-positivos relativos al total de células. El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA seguido de un test de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Cada “n” está indicado en su tratamiento correspondiente, representando el número de cápsulas de cultivo).

Los ensayos de TUNEL realizados por citometría de flujo mostraron que el factor PEDF redujo el porcentaje de células TUNEL positivas de 25,2% a 13,8% (Fig. 11A), y que dicho efecto fue revertido cuando los cultivos fueron preincubados con atglistatin, un inhibidor de la actividad enzimática de PEDF-R. Adicionalmente, no se observaron diferencias significativas entre los cultivos control y aquellos tratados con 34-mer a nivel del porcentaje de eventos TUNEL+. (Fig. 11B)

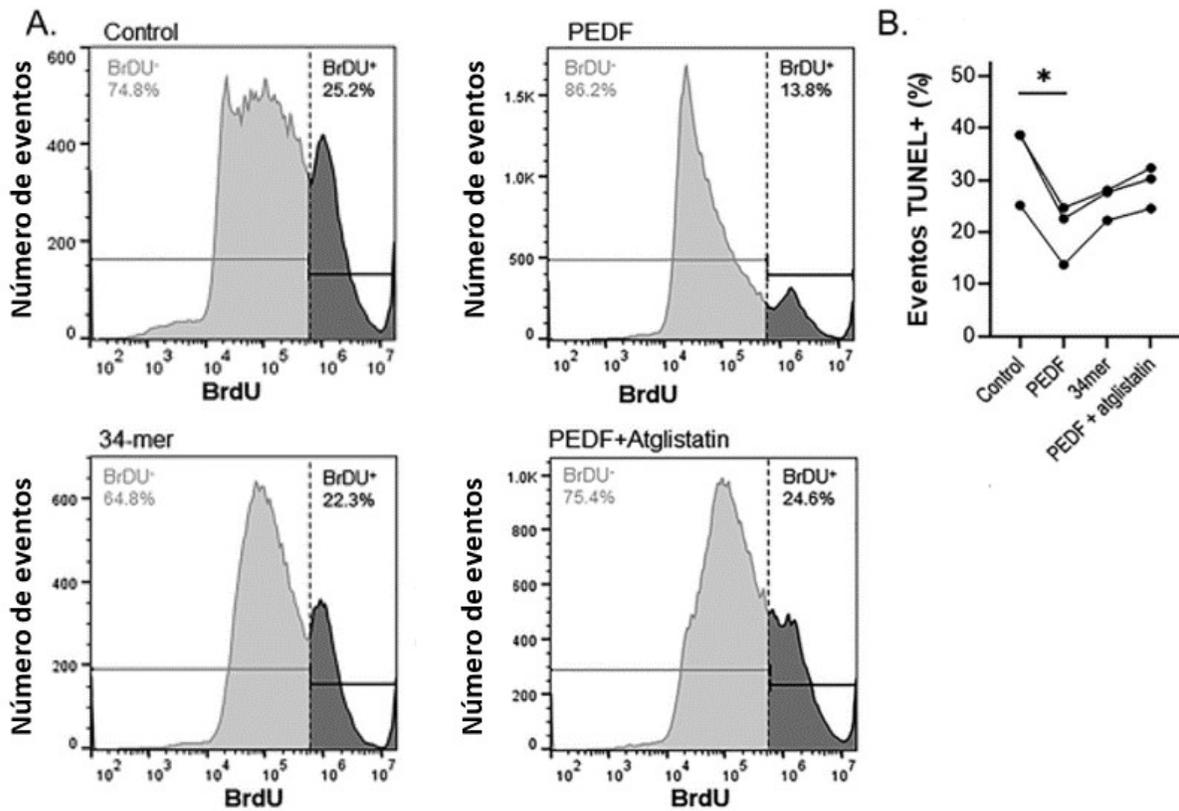


Figura 11: Efectos de la proteína PEDF en la prevención de muerte celular. A) Ensayos de TUNEL para citometría de flujo de muestras de DIV5 tratadas con HBSS (Control) o con PEDF, PEDF+atglistatin o con el péptido 34-mer, todos agregados en concentración 10 nM. Cada histograma muestra el número de eventos en función de la intensidad de BrdU, con una frontera delimitando los eventos positivos y negativos situada en $1,4 \times 10^5$ unidades arbitrarias de fluorescencia. B) Porcentaje de eventos provenientes de ensayos de cultivos de tres camadas diferentes, cuyos porcentajes de eventos TUNEL positivos respecto del total fueron comparados con sus otros tratamientos dentro de cada camada. El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA seguido de un test de Dunnett apareado. * $p < 0,05$ ($n=3$, siendo el cada n una camada diferente).

En su conjunto, estos resultados muestran que la proteína PEDF y sus péptidos derivados 17-mer y 44-mer redujeron la muerte celular, la cual involucra la fragmentación del ADN e implica la interacción del dominio neurotrófico de PEDF con el PEDF-R como un paso necesario en la activación de los procesos de supervivencia celular.

La reducción de la muerte celular por el PEDF fue selectiva para los fotorreceptores

Los datos de citometría de flujo de los cultivos, derivados de la medición del detector frontal denominado *Forward Scatter* (FSC), revelaron la presencia de dos poblaciones neuronales de tamaños diferentes (Figs. 12A y 12B). Como fuera descrito previamente, en los cultivos solo se observaron dos poblaciones de tamaños diferentes, de neuronas amacrinas y FRs, donde la subpoblación de menor tamaño, con bajo valor de FSC, probablemente correspondió a la de los FRs.

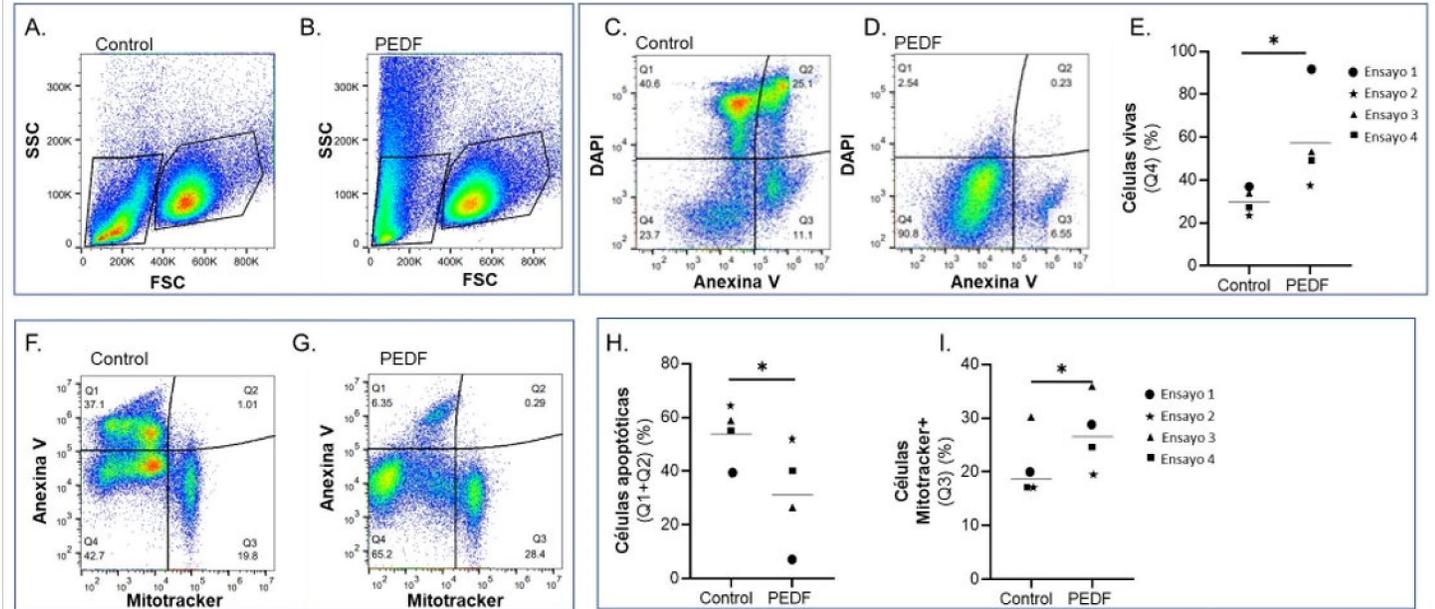


Figura 12: Ensayos de citometría de flujo en cultivos control y tratados con PEDF a DIV5. A, B) Gráficos de Forward (FSC) vs Side (SSC) Scattering, mostrando la presencia de dos poblaciones separadas primariamente por tamaño. La población de menor tamaño fue seleccionada para los análisis mostrados en el resto de los paneles. C, D) La población de bajo FSC fue marcada con DAPI (Eje Y) y Anexina V (Eje X), poniendo de manifiesto células cuya integridad de membrana está comprometida (DAPI+) y células en proceso de apoptosis (Anexina V+). E) Cuantificación realizada a partir de cuatro cultivos independientes, contabilizando el porcentaje de eventos en el cuadrante doble negativo (Q4), representando células vivas en control y DAPI; comparando cada camada con su respectivo tratamiento. El análisis estadístico se realizó por medio de un t de Student apareado. * $p < 0,05$ ($n=4$, con cada n representando una camada diferente). F, G) Gráficos de intensidad de fluorescencia para Anexina V (Eje Y) y Mitotracker (Eje X) de cultivos en condiciones control y tratados con PEDF, respectivamente. H) Cuantificación de eventos perteneciente a cuatro camadas distintas, mostrando células en proceso de apoptosis, comparando el porcentaje de eventos en la condición control con su contraparte tratada con PEDF. Cada punto corresponde a la sumatoria de valores de porcentajes en Q1 y Q2 (Anexina V+) de cada cultivo ($n=4$, con cada n representando una camada diferente). I) Porcentaje de eventos de alto valor de Mitotracker (Q3) en la población de bajo FSC, comparando los cultivos control con sus contrapartes tratadas con PEDF. Los análisis estadísticos se realizaron por medio de un t de student apareado. * $p < 0,05$ ($n=4$, con cada n representando una camada diferente).

El estudio de la población de bajo FSC, correspondiente a los FRs de la condición control mostró que un 23.7% de esta población fue negativa para DAPI y Anexina V (Fig. 12C, Q4). Por el contrario, las poblaciones correspondientes a las fracciones Q1 y Q3, que sumaron un 51.7%, resultaron positivas para uno o ambos, indicando muerte celular. En contraste, cuando los cultivos fueron tratados con PEDF, un 90.5% resultó negativo para ambos marcadores (Fig. 12D, Q4), demostrando la protección mediada por PEDF (Figs. 12E y 12H). Estos resultados permiten concluir que PEDF previno la translocación de fosfatidilserina y la pérdida de integridad estructural de la membrana plasmática, lo cual es consistente con la inhibición de eventos de muerte celular temprana en los FRs.

La medición de Mitotracker de la población de bajo FSC, permitió observar la existencia de dos subgrupos, uno con alta intensidad de Mitotracker (Fig. 12F, Q3) y otro de baja intensidad (Fig. 12F, Q1 y Q4), del cual procedían todos los eventos Anexina V-positivos (Fig. 12F, Q1). El porcentaje de eventos con alta intensidad de Mitotracker se vio significativamente incrementado con el tratamiento con PEDF (Fig. 12 G, I); evidenciando una preservación de la funcionalidad mitocondrial operada por PEDF.

Por otro lado, las células de mayor tamaño, presuntamente correspondientes a las neuronas amacrin, no experimentaron cambios significativos en su muerte celular, tanto en la condición control como cuando

fueron tratados con PEDF (Figs. 13A, B, C). A su vez, el ensayo de Mitotracker para estas neuronas, mostró una población muy homogénea ubicada enteramente en el cuadrante de alta intensidad, sugiriendo que sus mitocondrias se encontraban sanas independientemente de la presencia de PEDF (Figs. 13D E, F).

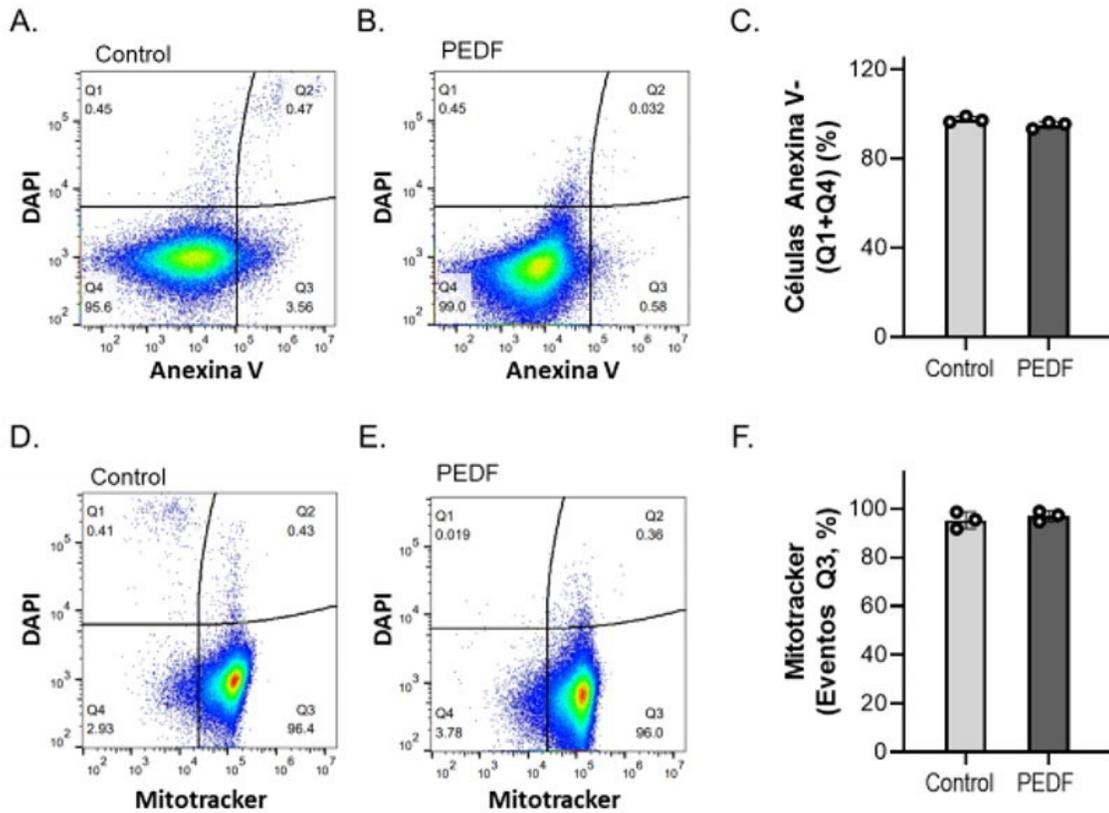


Figura 13: Ensayos de citometría de flujo en la población de alto FSC (presuntamente amacrinas) a DIV5. A, B) Gráficos mostrando la intensidad de fluorescencia para Anexina V (Eje X) y DAPI (Eje Y) en poblaciones en condiciones control y tratadas con PEDF, con la correspondiente cuantificación de eventos Anexina V- (C). D, E) Gráficos mostrando la intensidad de fluorescencia para Mitotracker (Eje X) y DAPI (Eje Y) en cultivos tratados con y sin PEDF, acompañados de la cuantificación de eventos Mitotracker positivos (Q3) (F), ambos realizados en tres cultivos independientes (n=3, con cada n representando una camada diferente).

Notablemente, cuando el tiempo de incubación se prolongó hasta DIV7, se observó una depleción casi total de la población de bajo FSC, presuntamente FRs (Fig. 14A) en la condición control, la cual se preservó parcialmente al ser tratada con PEDF (Fig. 14B) o 44-mer (Fig. 14D). Por el contrario, el pretratamiento con atglistatin abolió dicho efecto (Fig. 14C). En coincidencia con esto, la población de alto FSC mantuvo un alto índice de supervivencia incluso hasta DIV7 (Fig. 14).

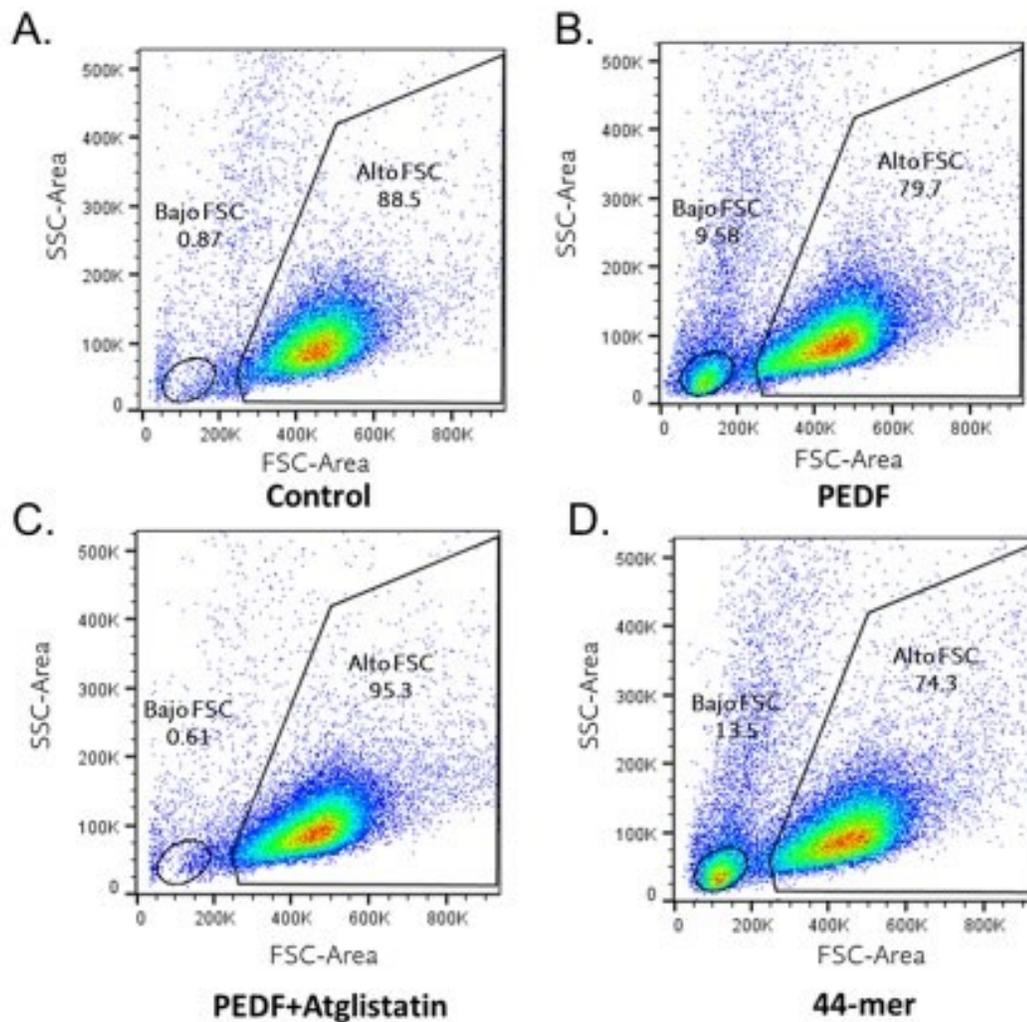


Figura 14: El PEDF y el fragmento 44-mer previenen la depleción de células presuntamente FRs a DIV7. A) citometría de flujo mostrando la preservación de una proporción significativa de neuronas amacrinias, y la desaparición casi total de la población de células más pequeñas. B) Los tratamientos con PEDF (B) y 44-mer (D) preservaron parcialmente la población de células pequeñas. C) La preincubación con atglistatin canceló los efectos del PEDF, resultando en valores equivalentes a los del control (C).

La muerte neuronal presente en el modelo no generó liberación de LDH al medio

Para evaluar la generación de factores citotóxicos liberados por las células durante su muerte, cuya existencia aporte un factor diferencial en función del tratamiento, se realizaron ensayos con el fin de detectar la presencia de Lactato Deshidrogenasa (LDH) en el medio. Debido a que el proceso de muerte ocurre de forma relativamente tardía en relación a la ventana de tiempo observada, esta se tomó desde DIV3 hasta DIV9, con puntos intermedios en DIV5 y 7. Los resultados no mostraron diferencias significativas a lo largo de los tiempos analizados (Fig. 15A). Si bien la relación relativa entre los cultivos control y su respectivo control positivo en cada punto de tiempo registró un aumento, esto se debió a que el valor de absorbancia de los controles positivos decreció a medida que avanzó en el tiempo, mientras que el de las condiciones experimentales se mantuvo estático.

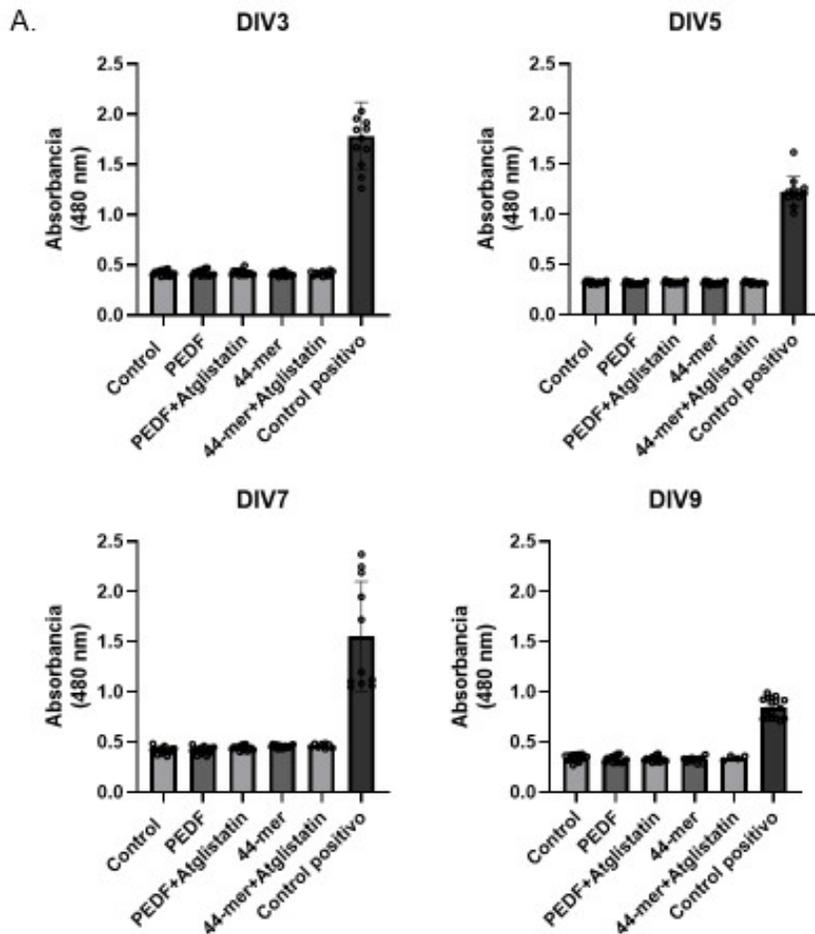


Figura 15: Efectos de PEDF y péptidos derivados en la liberación de LDH al medio. A) Gráficos de absorbancia de LDH bajo los diferentes tratamientos, a lo largo del tiempo, junto con sus respectivos controles positivos, realizado con una única camada, tomando 16 pocillos por condición.

El PEDF y su péptido derivado 44-mer preservaron la función mitocondrial en neuronas en cultivo

Para evaluar los posibles efectos del PEDF y el fragmento 44-mer sobre la preservación del potencial de membrana mitocondrial en neuronas amacrinas y FRs, se incubaron cultivos de DIV5 con la sonda *Mitotracker*TM. El marcado de cultivos neuronales con esta sonda en condiciones control mostró una señal intensa y puntuada, primariamente ubicada en las áreas de citoplasma alrededor del núcleo y en el cono axonal (Fig. 16A), ilustrando la preservación del potencial de membrana mitocondrial tanto en neuronas amacrinas como en los FRs (Fig. 16A) que exhibían las mitocondrias activas.

En los cultivos control, el 26% de los FRs (flechas) mostraron mitocondrias activas, (Fig. 16A, B). Este valor se duplicó (55%) cuando los cultivos se incubaron con PEDF o 44-mer (Fig. 16B). Este incremento fue contrarrestado por el pretratamiento con atglistatin (Fig. 16B). Las neuronas amacrinas, por el contrario, retuvieron mitocondrias activas, independientemente de la presencia de PEDF o sus factores derivados (Fig. 16A, células marcadas con cabezas de flecha).

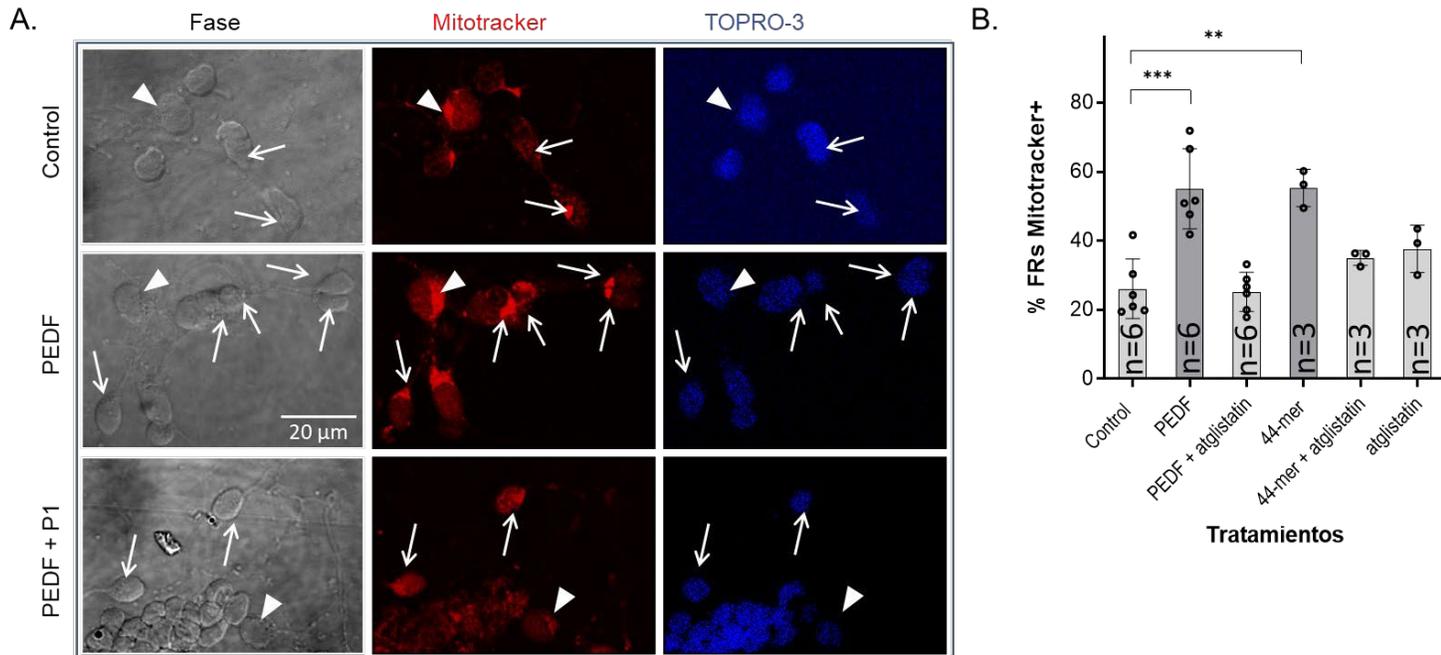


Figura 16: Efectos de PEDF y sus péptidos derivados en la preservación de la actividad mitocondrial. A) Microfotografías de contraste de fase y fluorescencia de cultivos a DIV5, mostrando condiciones control y tratadas con PEDF o PEDF+P1, mostrando el marcado con Mitotracker (Rojo) y TO-PRO-3 (Azul). Las cabezas de flecha demarcan neuronas amacrinas y las flechas indican FRs con mitocondrias activas. (Barra: 20 μm). B) Porcentaje de FRs que poseen mitocondrias activas en cultivos tratados con HBSS (Control), PEDF o 44-mer con y sin atglisatin. El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA seguido de un test de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ (Cada n está indicado en su correspondiente tratamiento, representando el número de cápsulas de cultivo).

El PEDF promovió la localización apical de rodopsina en los fotorreceptores

A DIV5, solo una fracción menor (del 5 a 10%) de los FRs expresó la proteína rodopsina. A este tiempo del desarrollo, y en ausencia de factores neurotróficos, la mayor parte de estos FRs presentó una distribución difusa de rodopsina, tanto en el cuerpo celular como en las neuritas, propia de una fase temprana de diferenciación (Figs. 17A y 18A, control). En etapas más avanzadas de su desarrollo, la rodopsina tendió a desaparecer gradualmente de los axones (Fig. 17B) para concentrarse exclusivamente en el cuerpo celular, dónde comenzó a experimentar un proceso de polarización hacia la región apical (Fig. 17C), culminando su localización, en un cilio y una protrusión similar a un primordio de segmentos externos (Figs. 17D y 18A, PEDF). Sin embargo, bajo condiciones control, solo el 28% de FRs positivos para rodopsina lograron llegar a la etapa de polarización. Este porcentaje experimentó un aumento significativo hasta alcanzar el 72,5% luego del tratamiento con PEDF (Fig. 18B). Un efecto similar se obtuvo luego del tratamiento con los péptidos 17-mer y 44-mer, y en todos los casos estos aumentos fueron bloqueados por la acción de atglisatin (Fig. 18B). Estos resultados implican que PEDF y sus péptidos derivados neurotróficos tienen un rol promotor en

la diferenciación de los FRs, acelerando la polarización de la rodopsina. Sin embargo, el número absoluto de FRs positivos para rodopsina no experimentó cambios significativos con PEDF (Fig. 18C).

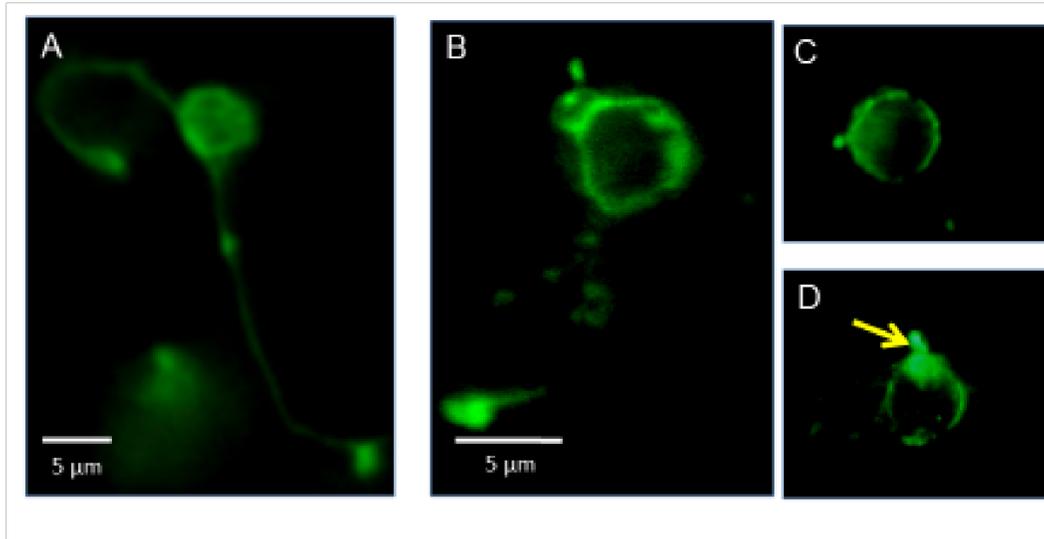


Figura 17: Distribución de la rodopsina a diferentes etapas de desarrollo de los FRs. (A) Distribución homogénea y difusa de la rodopsina en un FR inmaduro (B) Desaparición gradual de la rodopsina de los axones y concentración en el cuerpo celular durante el proceso de maduración (C) Localización gradual de la rodopsina en el extremo apical del cuerpo celular (D). Etapa avanzada de la maduración de un FR mostrando la polarización de rodopsina en un extremo de la célula correspondiente a una protrusión similar a un segmento externo (D) (Barra: 5 μm).

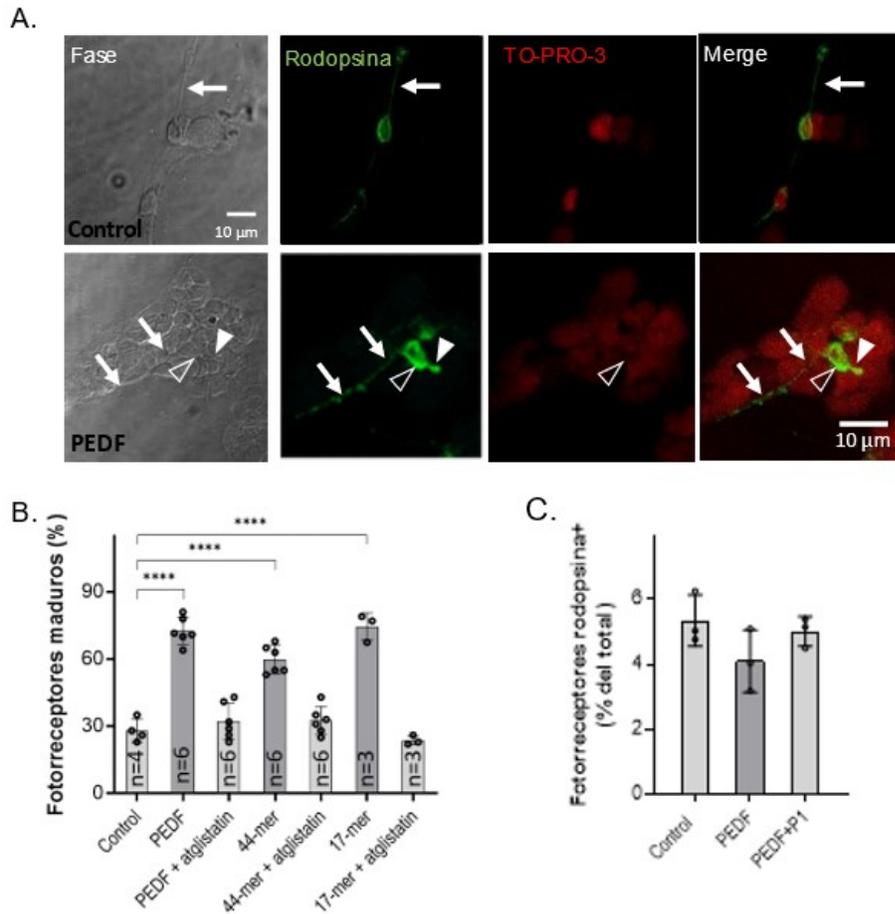


Figura 18: Efectos de PEDF y péptidos derivados en la distribución de rodopsina en FRs. A) Fotomicrografía de imágenes obtenidas por contraste diferencial de fases y fluorescencia, mostrando la distribución de rodopsina (verde) y contrastada con TO-PRO3 (rojo) en cultivos control y tratados con PEDF. Nótese que en condiciones control, el grueso de los FRs presenta una distribución homogénea de rodopsina en cuerpo y neuritas (flechas) mientras que cultivos tratados con PEDF, la rodopsina está principalmente concentrada en el cuerpo celular y en una estructura similar a un cilio con su primordio de segmento externo (cabeza de flecha) (Barra: 10 μ m). B) Porcentajes de FRs rodopsina-positivos con rodopsina polarizada en el cuerpo celular. El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA seguido de un test de Dunnett. **** $p < 0,0001$ (Cada n está indicado en su respectivo tratamiento, comprendiendo el número de cápsulas evaluadas). C) Porcentaje absoluto de FRs rodopsina-positivos en condiciones control, y tratados con PEDF, con y sin P1 (n=3, comprendiendo el número de cápsulas evaluadas).

El PEDF y sus péptidos derivados 44-mer y 17-mer promovieron el desarrollo de neuritas

Dado que la capacidad de entablar conexiones sinápticas entre las neuronas es fundamental para su supervivencia (Davies, 2003), se evaluó el efecto promotor de PEDF y sus péptidos derivados durante la neuritogénesis en cultivo. Para ello se realizaron ensayos inmunocitoquímicos con anticuerpos contra β -III Tubulina y HPC1, biomarcadores para neuritas y neuronas amacrinicas, respectivamente. Para estos ensayos los cultivos no fueron pretratados con el medio condicionado RN22, debido a que, como se describió anteriormente, contiene un factor que promueve el desarrollo de neuritas (Adler, 1982).

Al igual que el PEDF, los péptidos 44-mer y 17-mer exhibieron un efecto promotor del crecimiento de neuritas.

Notablemente, este crecimiento afectó principalmente a las neuronas amacrinicas (Fig. 19A). En efecto, el tratamiento con PEDF, 44-mer o 17-mer incrementó significativamente el largo promedio de las neuritas,

desde 2,8 diámetros celulares en los controles, a 3,3, 4 y 3,6 diámetros respectivamente (Fig. 19B). Por el contrario, el uso del inhibidor atglistatin provocó un bloqueo de este efecto, resultando en valores promedio de 2,8, 2,9 y 3,1 diámetros celulares respectivamente, observándose un efecto comparable al del bloqueo con el péptido P1 (Fig. 1C). La adición de DMSO, el vehículo utilizado en la dilución de atglistatin no alteró la eficacia de PEDF. Además, ni el péptido 34-mer, ni el atglistatin ejercieron efectos significativos. El largo de las neuritas de FRs no fue significativamente afectado por ninguno de los tratamientos.

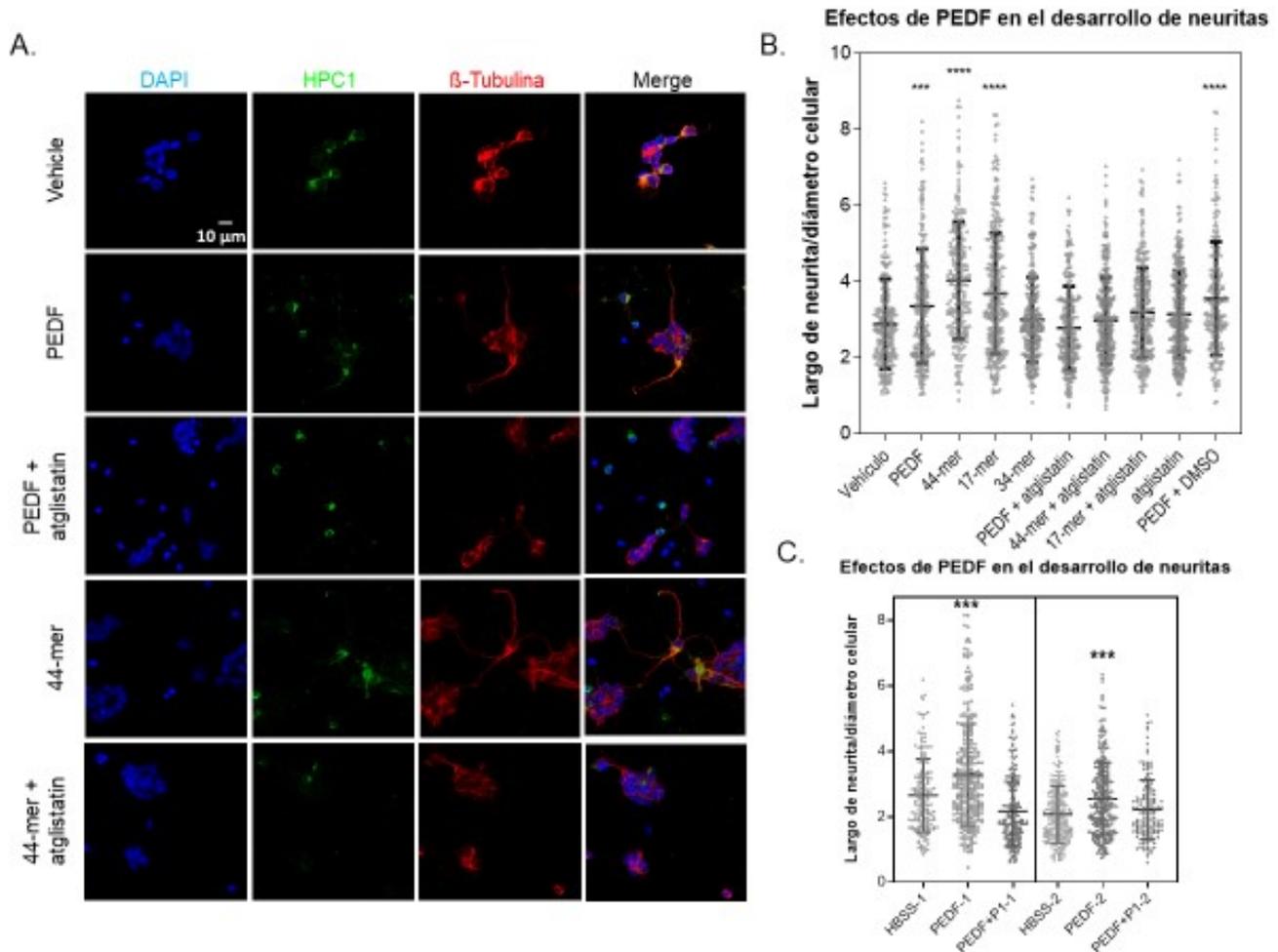


Figura 19: Efectos de PEDF y péptidos derivados en el desarrollo de neuritas. A) Fotomicrografías de inmunofluorescencia de cultivos DIV5, mostrando neuronas amacrinias, positivas para HPC1 (verde) y neuritas marcadas con β -Tubulina (rojo), con los núcleos contrastados con DAPI (azul), mostrando el desarrollo de neuritas en condiciones control y tratadas con PEDF o 44-mer, con y sin atglistatin. Nótese el incremento en el largo de neuritas en cultivos tratados con PEDF o el péptido 44-mer (Barra: 10 μ m). B) Gráfico mostrando el largo de neuritas en diferentes tratamientos con o sin atglistatin, con cada punto representando una medida individual, en tres cultivos diferentes. El análisis estadístico se realizó por medio de un ANOVA seguido de un test de Dunnett. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. C) Gráfico adicional, mostrando el mismo fenómeno mostrado en B, pero con bloqueo ejercido por P1 en dos cultivos separados. Los análisis estadísticos se realizaron por medio de un ANOVA seguido de un test de Dunnett *** $p < 0,001$.

El tratamiento con PEDF alteró la expresión de múltiples transcritos, incluyendo los de factores antiapoptóticos

El ensayo de RT-PCR permitió observar múltiples cambios en el perfil de transcripción de ARNm en cultivos neuronales luego de 6 horas de exposición a PEDF 10 nM. Estos cambios incluyeron el aumento en la expresión de mensajeros, varios de ellos con un rol antiapoptótico, como Bcl2, Bcl2a1 y Akt1 (Fig. 20),

conjuntamente con decrecimiento en factores proapoptóticos, como Bcl2l11. Paradójicamente, se observó un incremento drástico en la expresión del factor proapoptótico Bax.

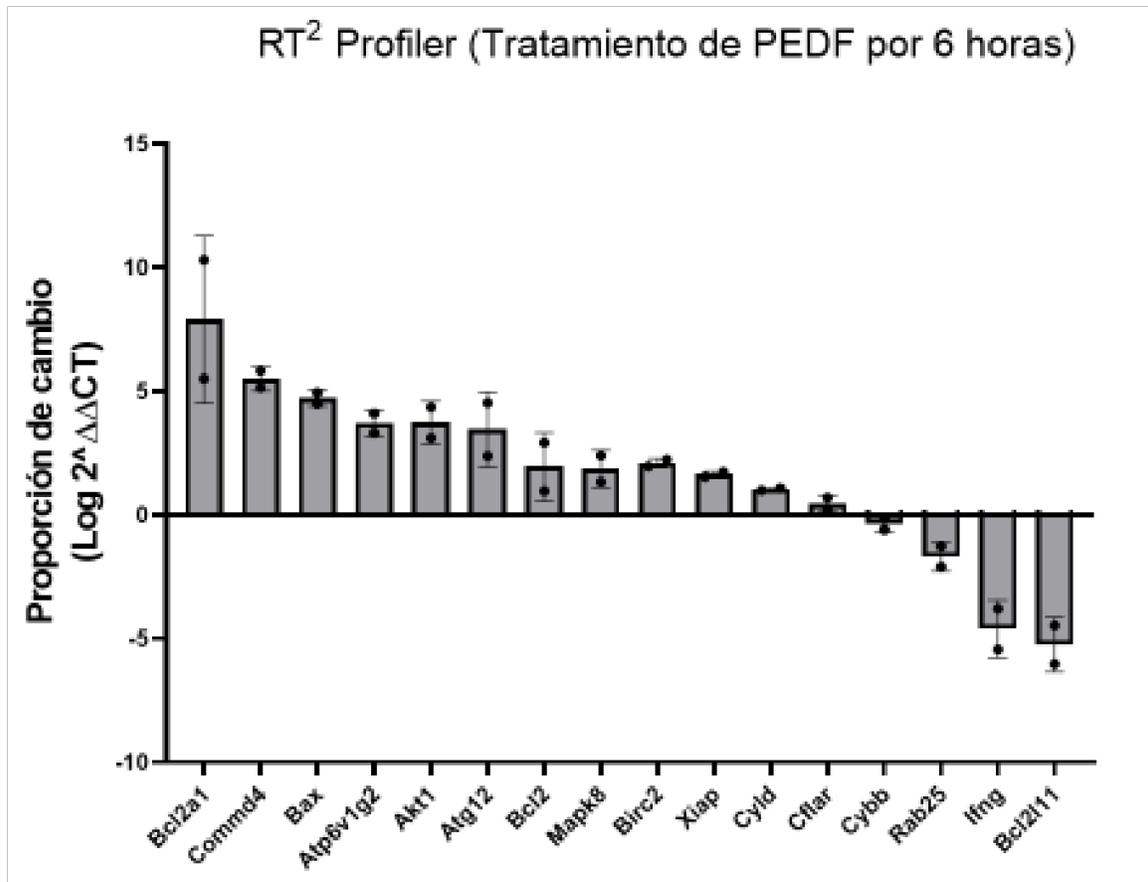


Figura 20: Cambios en el perfil de ARNm inducidos por PEDF respecto de la condición control. Gráfico mostrando los cambios en diferentes factores, presentados como una transformación logarítmica de las diferencias entre los ΔCT entre las muestras Control y tratadas con PEDF. Los cambios respecto del control están ordenados por dirección del cambio y magnitud. El ensayo fue repetido en dos muestras biológicas separadas, y solo los cambios consistentes entre ambas se consideraron válidos.

El tratamiento con PEDF indujo la expresión de Bcl2

Considerando los cambios a nivel transcriptómico previamente observados en el ensayo con el *RT² profiler*, se realizaron ensayos de *Western Blot* para confirmar si los mismos estaban también reflejados en la producción de proteína. Para esto se eligió la proteína Bcl2, identificada como un factor antiapoptótico en múltiples modelos, cuya inducción por PEDF ha sido previamente documentada (Murakami y col., 2008; Subramanian y col., 2013; Winokur y col., 2017).

El ensayo de *Western Blot* mostró un incremento significativo en la producción de Bcl2, el cual se localizó particularmente en la fracción citosólica (Fig. 21, Cyto Ctl), pasadas 24 horas de tratamiento con PEDF a DIV2, en comparación al control (Fig. 21A, Cyto PEDF). Este cambio fue observado en un entorno libre de insulina, ya que la misma, dado su rol como FT para las neuronas amacrinas (Politi et al., 2001c) provoca un enmascaramiento del PEDF (Fig 21A, Cyto Ctl Ins). Este efecto se observó consistentemente en múltiples muestras (Fig 21B).

Estos resultados permiten posicionar al factor Bcl2 como un efector en la cascada de señalización operada por el PEDF, actuando como uno de los posibles operadores de la citoprotección.

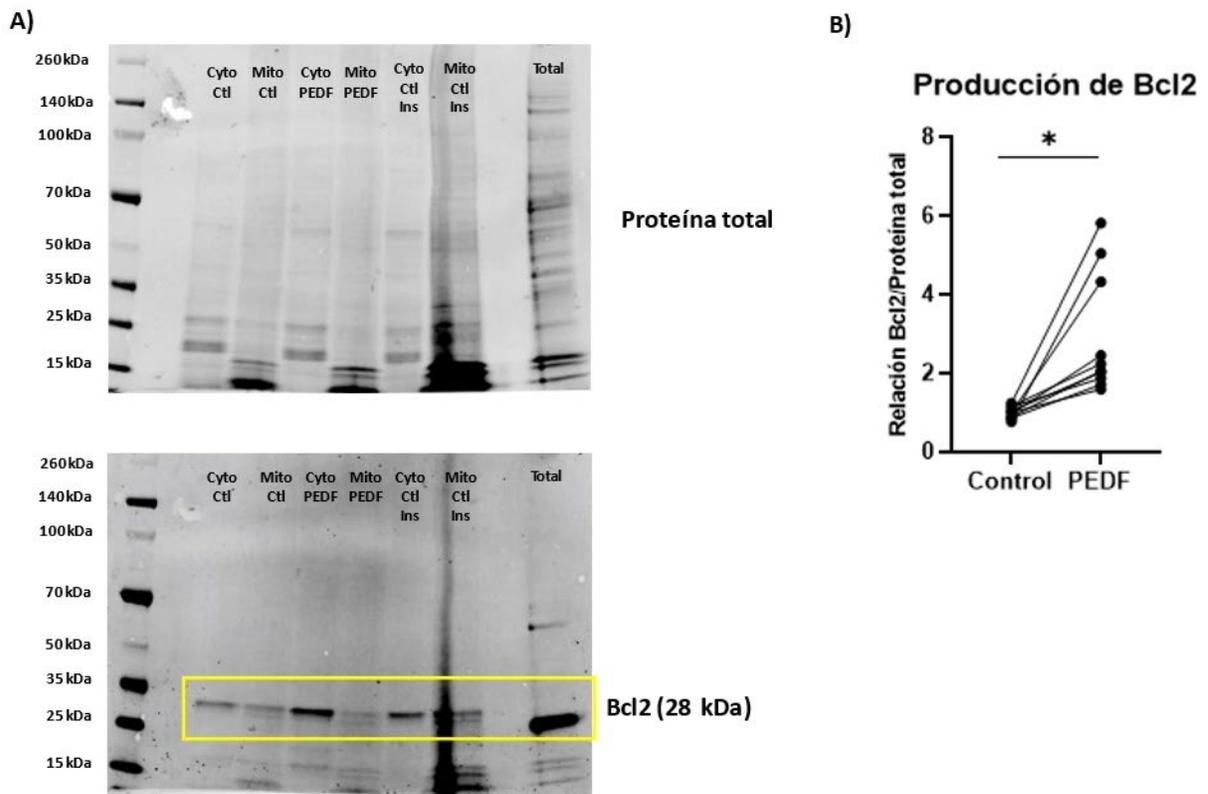


Figura 21: Cambios en la producción de Bcl2 inducidos por PEDF. A) Ensayo de Western blotting realizado en fracciones subcelulares de citosol (Cyto) y mitocondrias (Mito), en condiciones de control sin insulina, PEDF sin insulina y control con insulina, con proteína total como control positivo. Puede observarse la proteína total de cada muestra (superior) junto con la producción de Bcl2 (inferior, ver recuadro amarillo). B) Cuantificación de la producción de Bcl2 citosólico respecto de la proteína total del mismo carril, realizado con tres réplicas técnicas por muestra biológica, utilizando las condiciones sin insulina ($n=3$)

Discusión

En la primera parte de esta tesis se examinaron los efectos del PEDF y dos de sus fragmentos neurotróficos en un modelo de neuronas de retinas murinas *in vitro*. Se estableció que el PEDF y los fragmentos 44-mer y 17-mer (correspondientes a las posiciones 78-121 y 98-114 del PEDF humano, respectivamente), previnieron la muerte celular de los FRs y promovieron su diferenciación, así como también la estimulación del crecimiento de neuritas en neuronas amacrinas. En los FRs, el PEDF previno la fragmentación del ADN, y la translocación de la fosfatidilserina hacia la capa externa de la membrana plasmática. Además, preservó el potencial de membrana mitocondrial de estas células, aumentando la expresión del factor antiapoptótico Bcl2.

Los cultivos neuronales puros utilizados en este trabajo de tesis crecen en un medio químicamente definido en ausencia de los FTs necesarios para la supervivencia de los FRs. En estas condiciones, al igual que lo ocurrido para otras neuronas del sistema nervioso, los FRs inicialmente se desarrollan de forma independiente de estos factores. Sin embargo, durante su desarrollo, sobreviene una crisis de supervivencia, denominada *muerte celular programada*, la cual es similar a la ocurrida luego del periodo correspondiente al establecimiento de las sinapsis observadas en sus contrapartes *in vivo*. Este tipo de degeneración se caracteriza por la fragmentación del ADN, la pérdida de la actividad mitocondrial, y la activación de factores proapoptóticos (Rotstein y col., 1996; Rotstein y col., 1997; German y col., 2006). La adición del PEDF a los cultivos previene significativamente varios de estos efectos deletéreos, como la pérdida de funcionalidad mitocondrial, la fragmentación del ADN nuclear y la pérdida de integridad de la membrana plasmática, revelando que es un factor crucial para el desarrollo y diferenciación de los FRs.

Los efectos protectores del PEDF fueron específicos para los FRs dado que la tasa de supervivencia de las neuronas amacrinas no se vio alterada por el agregado del PEDF o de los péptidos derivados. Estudios previos han demostrado que la insulina, la cual está presente en el medio de cultivo, al igual que el *Insulin-like Growth Factor 1*, actúa como un factor de supervivencia para neuronas amacrinas (Politi y col., 2001c). El tratamiento con PEDF promueve cambios en el perfil transcriptómico, destacándose los incrementos en la expresión del factor antiapoptótico Bcl2 y de la Akt1, una serina/treonina quinasa importante para la supervivencia de neuronas, no solo en la retina (Nakazawa y col., 2003), sino también en otras áreas del sistema nervioso (Dudek y col., 1997; Murakami y col., 2008; Subramanian y col., 2013; Winokur y col., 2017). Estos incrementos fueron similares a los hallados en otros estudios, tanto para Bcl2 (Sanchez y col., 2012; He y col., 2014; Wang y col., 2019), como también para Akt1 (Rapp y col., 2014). En particular fue relevante el aumento del transcrito Bcl2a1, dado que el mismo fue identificado como un factor antiapoptótico, inhibidor de caspasa-3 en modelos de esclerosis lateral amiotrófica (Iaccarino y col., 2011); de otros factores proapoptóticos, como Bax, en modelos no neuronales (Sedlak y col., 1995) y en múltiples tipos de carcinomas (Haq y col., 2013; Lin y col., 2020; Liang y col., 2021). Es importante destacar, que la expresión de Bcl2a1 es inducida por Nf-κB (Zong y col., 1999), el cual es un blanco identificado de la acción de PEDF en la retina (Unterlaufft y col., 2014).

Notablemente, el análisis transcriptómico revela también un marcado incremento en la expresión del factor proapoptótico Bax. La razón de este aumento no ha sido establecida, aunque existe un paralelismo con la activación de un mecanismo de control del crecimiento tumoral, documentado en células del endotelio de la vena umbilical (Ho y col., 2007), así como en líneas celulares de condrosarcoma (Tan y col., 2010) y glioma (Zhang y col., 2007). No obstante, dada la ausencia de muerte celular que sería esperable luego de un aumento en la expresión de Bax, es posible que existan mecanismos que anulen su efecto, tales como control post-transcripcional, o inhibición de la proteína por otras, tales como Bcl2a1.

Trabajos previos realizados en el laboratorio de P. Becerra demostraron que el PEDF posee un dominio antiangiogénico y otro neurotrófico (Becerra, 2006). La identificación de los péptidos cortos neurotróficos 44mer y 17-mer posee relevancia médica, dado que son potencialmente más fáciles de vehiculizar hacia la retina gracias a su menor tamaño. Los resultados muestran que, al igual que la molécula entera de PEDF, los péptidos neurotróficos 17-mer y 44-mer promueven, no solo la supervivencia, sino también la localización apical de rodopsina en los FRs, además de estimular el crecimiento axonal de neuronas amacrinas de forma selectiva. Por su parte, como se esperaba, el péptido derivado del dominio antiangiogénico 34-mer (posiciones 44-77) no tiene efectos.

Dado que los fragmentos neurotróficos 17-mer y 44-mer poseen los mismos efectos que el PEDF, es razonable deducir que la prevención de la muerte celular para los FRs, así como también la función de orquestar el desarrollo y diferenciación de la retina, pueden atribuirse casi exclusivamente a sus dominios neurotróficos.

En relación al tamaño del PEDF, es deseable contar con péptidos de menor tamaño; los cuales pueden sortear los inconvenientes asociados a la vehiculización de proteínas de gran tamaño, como baja biodisponibilidad y vida media reducida (Craik y col., 2013). Además, estos péptidos de menor tamaño pueden preservar los efectos de la proteína nativa separados de su dominio antiangiogénico (34-mer), lo que posee relevancia terapéutica para patologías en las que la vasculatura no es afectada, como la RP o la variante seca de la AMD.

Junto con su relevancia para los FRs, estudios previos de Pang (2007) y Vigneswara (2013) demuestran actividad neurotrófica del PEDF también en neuronas ganglionares de retina, en cultivos provenientes de retinas de rata adulta y de ratones de 7 días de vida (Unterlauff y col., 2012). Estos autores demuestran que el PEDF protege a las neuronas ganglionares frente a la citotoxicidad inducida por glutamato e hipoxia, o por remoción de FTs (Pang y col., 2007; Unterlauff y col., 2012), además de promover crecimiento axonal en estas células (Vigneswara y col., 2013).

Aunque el EPR es fundamental para el desarrollo y preservación de los FRs, se ha demostrado que por sí solo, el PEDF es capaz de promover el desarrollo de FRs, aún en ausencia del EPR (Jablonski y col., 2000), involucrando la protección contra apoptosis asociada a disfunción mitocondrial (Tian y col., 2017). Este fenómeno se ha observado también en los cultivos neuronales usados en este trabajo de tesis (Fig. 16), indicando que la disfunción mitocondrial, la cual es revertida por el PEDF y sus péptidos neurotróficos, sería uno de los procesos responsables de la muerte celular.

Los receptores de PEDF están presentes en la retina de ratas neonatas *in vivo* a PN1 (Fig. 7). En nuestros cultivos, el PEDF-R está ampliamente distribuido en la superficie celular de los FRs y de las neuronas amacrinas en los primeros días de desarrollo post-natal (Fig. 5C), aunque mostrando luego un rápido descenso de su expresión, tanto *in vitro* como *in vivo*. Si bien se desconoce la razón de este declive, podría atribuirse a mecanismos de control post-traduccionales. Alternativamente, una explicación plausible de este hecho sería que en etapas más avanzadas del desarrollo, además del PEDF, la retina dependería también de otros factores tales como el GDNF (Rothermel y Layer, 2003; Volpert y col., 2009), el BDNF (Pinzón-Duarte y col., 2004), el FGF (Zhao y Barnstable, 1996; Giordano y col., 2007) y el ácido retinoico (Kelley y col., 1994; Hyatt y Dowling, 1997), los cuales intervienen en procesos importantes como el desarrollo de los FRs (Kelley y col., 1994; Giordano y col., 2007; Volpert y col., 2009), la formación de neuronas ganglionares (Zhao y Barnstable, 1996) y otros efectos tales como la estimulación del crecimiento y ramificación de neuritas (Pinzón-Duarte y col., 2004). En este contexto, es importante señalar que, en la rata albina adulta, el PEDF-R fue detectado en los segmentos internos de los FRs (Notari y col., 2006). La extensa distribución de PEDF-R en la membrana plasmática de FRs como en neuronas amacrinas demostrada en esta tesis, explica la diversidad de efectos mediados por la interacción PEDF/PEDF-R en ambos tipos neuronales, indicando que las funciones del PEDF estarían asociadas a vías de señalización mediadas por la activación de PEDF-R.

Además de los efectos sobre los FRs, el PEDF y sus fragmentos neurotróficos promovieron el crecimiento de neuritas en neuronas amacrinas (Fig 19), un efecto que no se observó en los FRs. Sin embargo, dado que, debido a la presencia de insulina, las neuronas amacrinas no mueren durante el tiempo utilizado para estos cultivos, se requieren estudios posteriores para evaluar el potencial rol neurotrófico de PEDF en esta población.

Por otro lado, los FRs en cultivo experimentaron una estimulación de su desarrollo por parte del PEDF y sus péptidos neurotróficos, reflejado en un aumento en la polarización de rodopsina (Fig. 18). No obstante, dado que el porcentaje absoluto de FRs que expresan rodopsina se mantiene sin cambios, el rol del PEDF como factor de diferenciación es limitado.

Los efectos protectores de los péptidos 17-mer y 44-mer son suprimidos mediante el uso del péptido bloqueante P1, y por la inhibición de la actividad enzimática de PEDF-R mediante el uso de atglitatin, indicando que la interacción con entre el dominio neurotrófico de PEDF y PEDF-R es un paso fundamental en el inicio de estos procesos. La capacidad de los péptidos 44-mer y 17-mer para unirse a PEDF-R (Kenealey y col., 2015), así como la incapacidad del péptido 34-mer para hacer lo propio, indican que la región 17-mer de PEDF, la cual está contenida en el péptido 44-mer, es fundamental para su unión a PEDF-R y su consecuente actividad (Kenealey y col., 2015, Figs. 2-7, S1). El requerimiento de la unión del PEDF al PEDF-R para su estimulación posterior demostrada en este trabajo se corresponde con resultados similares obtenidos en cultivos de la línea celular R28 luego de la suplementación con PEDF (Subramanian y col., 2013; Burger y col., 2020).

Notablemente, los efectos neurotróficos del PEDF sobre los FRs son coincidentes con aquellos reportados para el DHA (Garelli y col., 2006). En forma similar al PEDF, el DHA preserva también la funcionalidad mitocondrial, previene la apoptosis y promueve la diferenciación de FRs (Rotstein y col., 1996; 1997; 2003; Politi y col., 2001a, German y col., 2006; 2013). Estas similitudes no son inesperadas, dado que el PEDF-R posee la capacidad de actuar como una fosfolipasa A2; cuya actividad es estimulada por PEDF, permitiéndole hidrolizar fosfolípidos para liberar ácidos grasos libres, el DHA entre ellos (Subramanian y col., 2010; Pham y col., 2017). Al respecto, es importante señalar que la BEL, un inhibidor de fosfolipasas A2 independientes de calcio, es capaz de bloquear la protección inducida por DHA frente a apoptosis por estrés oxidativo en FRs (German y col., 2013).

También, se ha demostrado que la 4-bromo-enol lactona es capaz de inhibir al PEDF-R y bloquear los efectos citoprotectores de PEDF, así como también la inducción del factor antiapoptótico Bcl2 (*B-Cell lymphoma 2*) en células R28 (Notari y col., 2006; Subramanian y col., 2013). En este mismo contexto, es importante señalar que la Neuroprotectina D1, un derivado del DHA que actúa como efector de su efecto neuroprotector (Bazan, 2005) es también inducida por PEDF (Reinoso y col., 2008). Sus efectos están caracterizados por la inducción de factores como Bcl2 y Bcl-xL, con la conjunta supresión de Bax, Bad y Caspasa-3 (Mukherjee y col., 2004), lo que muestra paralelismos con los cambios transcriptómicos observados en el presente estudio. Los hallazgos de este trabajo de tesis indican que los efectos protectores del DHA y el PEDF están fuertemente relacionados y sugieren que la activación del PEDF-R, con su actividad de fosfolipasa A2, por el PEDF liberaría DHA, activando las vías de neuroprotección observadas. Al respecto, trabajos previos del grupo de L. German, demostraron que el DHA interactúa con receptores nucleares RXR y que agonistas de este receptor activan vías de supervivencia ante el estrés oxidativo (German y col., 2013).

La hipótesis de la interrelación entre PEDF y DHA requiere estudios posteriores, para los cuales la elaboración de perfiles lipídicos y proteómicos sería instrumental en la identificación de lípidos bioactivos y proteínas involucradas en la señalización de PEDF en FRs. Diferentes FTs han mostrado activación de vías de señalización MEK/ERK y PI3K, cuya inducción está asociada a la supervivencia de los FRs (German y col., 2006); convirtiendo a estas vías en posibles candidatos para futuros estudios sobre los efectos de PEDF a nivel molecular.

En suma, los hallazgos de este trabajo de tesis posicionan a los péptidos neurotróficos de PEDF como guardianes neuronales de la retina, denotando su potencial como promotores de la diferenciación, así también como inhibidores de la muerte celular en la retina, la cual conduce a pérdidas progresivas de la visión. Además, estos hallazgos demuestran que los cultivos primarios retinales son un modelo útil para la comprensión de los múltiples efectos inducidos por PEDF en diferentes poblaciones de la retina, como fue evidenciado en los FRs y neuronas amacrinas aquí presentados.

Capítulo 2: El EPR derivado de CMP como fuente de PEDF

Introducción

El EPR como sistema de soporte de la retina y el rol de PEDF

El EPR es un tejido fundamental para mantener la homeostasis de los FRs, por lo que posee múltiples adaptaciones para cumplir su función. De entre ellas, los melanosomas, organelas prominentes del EPR, permiten absorber la luz impidiendo que vuelva a estimular a los fotorreceptores. Al respecto, los compuestos contenidos en los melanosomas remueven radicales libres de oxígeno; quelando además iones metálicos (Hu y col., 2008; Simon y col., 2008), y disminuyendo el estrés oxidativo (He y col., 2007; Lukinova y col., 2009). El mantenimiento de los FRs es otro proceso altamente dependiente del EPR. Los fotones de luz isomerizan al 11-cis retinal a todo-trans retinal, el cual es re-isomerizado por el EPR y devuelto a los fotorreceptores en el proceso conocido como ciclo visual. Para esto, las células de EPR, que están íntimamente unidas a los FRs (Williams y Fisher, 1987), son capaces de fagocitar las porciones terminales de los segmentos externos de los FRs (Young y Bok, 1969); lo que suele estar asociado al ritmo circadiano en los mamíferos (LaVail, 1976). Estos fragmentos de segmentos externos (SEs) son ingresados al EPR en el interior de fagosomas, y combinados con lisosomas para su digestión (Bosch y col., 1993). Dado el daño fotooxidativo al cual son sometidos los SEs durante la captación lumínica, su reemplazo y renovación ocurre diariamente en los FRs. Por ello, la fagocitosis de los SEs es un proceso crítico para la supervivencia de estas neuronas permitiendo, mantener un largo constante de los mismos y reciclando componentes importantes, tales como los ácidos grasos y retinoides (Nguyen-Legros y Hicks, 2000). Durante este proceso, el EPR fagocita y metaboliza los extremos de los segmentos externos de los FRs, los cuales utiliza como sustrato para la β -oxidación de ácidos grasos y procesos de cetogénesis, satisfaciendo así la demanda energética del EPR (Reyes-Reveles y col., 2017). Además, estos metabolitos sirven de sustrato para la síntesis de otros lípidos (Chen y Anderson, 1993), algunos de los cuales son mediadores en procesos de señalización intracelular, como el DHA (SanGiovanni y Chew, 2005).

El establecimiento de la polaridad es otro factor fundamental para el correcto funcionamiento del EPR. Al igual que ocurre con otros tejidos epiteliales, como el epitelio intestinal; las células de EPR están altamente polarizadas, exhibiendo un gran nivel de asimetría entre sus caras basal y apical (Cáceres y RodríguezBoulan, 2020). La bomba de Na^+/K^+ , cuya actividad es fundamental para mantener un nivel de iones necesario para la corriente oscura de fotorreceptores, está primariamente localizada en la cara apical (Miller y col., 1978), así como también proteínas asociadas a la Na^+/K^+ ATPasa (Gundersen y col., 1991). Esta polaridad se observa en otros elementos, como la Molécula de Adhesión de Células Neuronales (N-CAM), localizada únicamente en el lado apical (Gundersen y col., 1993).

Asimismo, esta polarización no se circunscribe únicamente a la disposición interna de los componentes celulares, sino también a sus patrones de secreción de moléculas como la Neuroprotectina D1, la cual es preferentemente liberada hacia la cara apical (Bazan, 2009), o el factor de crecimiento endotelial VEGF, el cual es secretado principalmente desde la cara basal (Witmer y col., 2003). El PEDF es otra molécula cuya secreción ocurre asimétricamente en el EPR, siendo liberado preferentemente hacia la cara apical (Becerra y col., 2004). Adicionalmente, PEDF cumple una función fundamental; no solo en la preservación de la retina neural, sino también del EPR. Se ha demostrado que la delección de PEDF genera defectos de fagocitosis y senescencia a nivel del EPR, similares a los asociados a la ausencia de PEDF-R (Bullock y

col., 2021; Rebusini y col., 2022) en otros tipos celulares (Palmieri y col., 1999; Kojima y col., 2006). Por otro lado, el PEDF-R posee un rol central en metabolismo de los SEs, y su delección provoca disfunciones a nivel del procesamiento de lípidos y de la rodopsina por parte del EPR (Bullock y col., 2021). Es importante mencionar que disfunciones similares a nivel del metabolismo lipídico, asociadas a la delección de PEDF-R, han sido reportadas también en hepatocitos (Sathyanarayan y col., 2017; Cui y col., 2021), cardiomiocitos (Haemmerle y col., 2011) y adipocitos (Zimmerman y col., 2004).

La disfunción del EPR posee implicancias patológicas

La integridad estructural y funcional del EPR es crítica para el mantenimiento y normal funcionamiento de la retina. Las alteraciones de este tejido epitelial conducen a procesos degenerativos ocasionando pérdidas progresivas de la visión. De entre estas patologías, la degeneración macular asociada a la edad (AMD) es la principal causa de ceguera central bilateral en países desarrollados (Gehrs y col., 2006). Esta enfermedad está caracterizada por la degeneración del área macular y presenta dos variantes: la variante seca, que presenta rasgos tales como la formación de acúmulos extracelulares de lípidos y proteínas denominados *drusen* (Gass, 1972), entre la porción basal del EPR y la membrana de Bruch. Si bien estos acúmulos se generan naturalmente con la edad, su cantidad y tamaño pueden predecir la AMD (Sarks y col., 1999), así como también su localización (Lewis y col., 1986). A estos rasgos se suman el adelgazamiento y la pérdida de pigmentación de ciertas áreas del EPR. Estos procesos ocurren previos a la atrofia geográfica, caracterizada por la emergencia de áreas desprovistas de EPR, acompañadas de atrofia de los fotorreceptores subyacentes (Green y Key, 1977). Esta atrofia también es precedida por la acumulación de gránulos de lipofuscina en el EPR, la cual puede detectarse mediante autofluorescencia (Holz y col., 2001). Por otro lado, la atrofia también está acompañada por un proceso de neovascularización coroidal (McLeod y col., 2002). Por su parte, la variante húmeda o exudativa, se caracteriza por la neoproliferación de vasos sanguíneos desde el coroides, pudiendo quedar debajo del EPR o llegar a penetrar el espacio subretinal (Green y Enger, 1993). Esta variante suele acarrear severas pérdidas en la visión (Guyer y col., 1986), pudiendo progresar a un desprendimiento del EPR, resultando en ceguera poco tiempo después de este evento (Casswell y col., 1985). Históricamente se ha considerado a la variante húmeda como una fase posterior de la variante seca, con 10-15% de los pacientes de la variante seca progresando a la húmeda (Gehrs y col., 2006).

La AMD es de origen multifactorial; de entre estos factores, uno de los más importantes es el aumento del estrés oxidativo causado por componentes genéticos o ambientales. La mácula se encuentra expuesta a un entorno con un nivel elevado de estrés oxidativo, el cual puede magnificarse por factores como el cigarrillo, siendo este el factor de riesgo no-genético de mayor peso fuera de la edad (Jonasson y col., 2014). Otros factores que incluyen son las dietas con contenidos altos en hidratos de carbono refinados (Chiu y col., 2007; Kaushik y col., 2008) y la obesidad (Lechanteur y col., 2012). También existen factores genéticos, particularmente las mutaciones que comprometen la capacidad de combatir el estrés oxidativo a nivel mitocondrial (Canter y col., 2008; SanGiovanni y col., 2009), así como también mutaciones a nivel del complemento (Edwards y col., 2005; Hageman y col., 2005). Además de estas causas, se ha reportado una correlación entre la deficiencia de PEDF y el aumento en la incidencia de AMD (Holekamp y col., 2002; Bhutto y col., 2006), así como también en otras enfermedades degenerativas, como la retinitis pigmentosa (Ogata y col., 2004). Dado su rol prominente como factor antiangiogénico y neurotrófico, la deficiencia de PEDF podría estar implicada en procesos degenerativos de los FRs y de angiogénesis patológica (Bhutto y col., 2006; Wang y col., 2013; Dixit y col., 2020; Ye y col., 2022).

Por ello, reestablecer los niveles normales del PEDF en la retina es uno de los objetivos para lograr una terapia más efectiva en estas patologías. Sin embargo, resulta difícil mantener un nivel constante de PEDF en la retina. Si bien los tratamientos mediante inyecciones intraoculares de PEDF han tenido resultados positivos a corto plazo en otras patologías (Ogata y col., 2001), la necesidad de reiterar un tratamiento invasivo lo convierte en un enfoque poco deseable a largo plazo. Frente a esto, la posibilidad de reestablecer el EPR permitiría mantener niveles estables de PEDF a largo plazo con mínima invasividad. Los trasplantes de EPR han sido planteados como una posible vía terapéutica, pero incluso considerando el inmunoprivilegio del espacio subretinal, estos trasplantes han suscitado frecuentes respuestas inmunes que agravan la situación existente (Zhang y Bok, 1998). Otra alternativa consiste en la translocación autóloga de EPR en la retina, de forma libre (Maijwee y col., 2007) o integrado al resto del EPR (Joussem y col., 2006; Maijwee y col., 2008), lo cual se ha ensayado con éxitos limitados.

La posibilidad de inducir la transformación de células somáticas en células madre, puede ahora ser inducida inyectando los factores, Oct3/4, Sox2, c-Myc, y Klf4 (Takahashi y Yamanaka, 2006). Una vez transformadas en células madre, es también posible su posterior diferenciación a otro tipo celular. Esta técnica ha provisto oportunidades sin precedentes en múltiples áreas, como la posibilidad de modelar enfermedades a base de células madre tanto para investigación básica como identificar y validar estrategias terapéuticas para dichas enfermedades, así como también la posibilidad de generar células o tejidos de reemplazo para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas (Canto-Soler y col., 2016). En este contexto, estos avances posibilitarían la generación de EPR a partir de células somáticas, lo que tiene el potencial de generar trasplantes de RPE con mínimas invasividad y respuesta inmune (Bharti y col., 2011).

Sin embargo, la posibilidad de regenerar el EPR por este medio posee obstáculos, dada la dificultad de integrar el nuevo EPR en la retina, junto con el riesgo de generar una respuesta inflamatoria debido al procedimiento de inserción o de las estructuras de andamiaje sintéticas para favorecer su integración (Sugita y col., 2021). También existe el riesgo potencial de que la monocapa de EPR forme agregados tridimensionales, comprometiendo su eficiencia (Vugler y col., 2008). Así, los problemas de implantación del EPR se han convertido en un área de profundo interés, Otro posible riesgo radica en la introducción de elementos desconocidos en una zona inmunoprivilegiada como es la retina, lo cual podría generar teratomas (Hentze y col., 2009; Gutierrez-Aranda y col., 2010). Por lo tanto, es necesario evaluar las características y comportamiento del EPR derivado de CMP para garantizar que pueda desempeñar correctamente sus funciones (Sharma y col., 2020).

Para ello, es necesario evaluar si las características distintivas del EPR original, tales como la polaridad, capacidad de fagocitosis y metabolismo de segmentos externos, así como la secreción de PEDF en cultivos de EPR derivado de CMP inducidas, se mantienen en el EPR derivado de las CMP.

Hipótesis

Las células de EPR derivadas de CMP se comportan como el EPR nativo, recapitulando sus características distintivas, tales como la producción de PEDF.

Objetivos

El objetivo general de esta parte de la investigación fue evaluar las características distintivas y la capacidad de producción de PEDF del EPR derivado de CMP. Con este fin se evaluaron aspectos funcionales del EPR derivado de CMP, específicamente:

- a) El nivel de secreción de PEDF y su polarización,
- b) Su capacidad de fagocitosis de los segmentos externos de los FRs

Materiales y métodos

Obtención de muestras biológicas

Las muestras biológicas utilizadas en este trabajo de tesis; medio condicionado y extractos proteicos de EPR derivado de CMPs, fueron provistas por el laboratorio de la Dra. Canto-Soler (Universidad de Colorado, USA).

El medio condicionado se obtuvo de dos maneras: En la primera, el EPR derivado de CMPs fue cultivado en cápsulas *transwells*, durante 48 horas después de 15, 30 y 50 días de diferenciación.; el cual se obtuvo permitiendo generar medio condicionado derivado de los compartimentos basal y apical

En la segunda, se obtuvo medio condicionado de cultivos a 50 días post-diferenciación, los cuales se trataron con SEs de fotorreceptores bovinos (1×10^7 SEs/ml) durante 5 horas (Bullock y col., 2021), utilizando cultivos sin tratar como controles.

Para la obtención de extractos proteicos se trató el EPR derivado de CMP a los 50 días post-diferenciación con SEs bovinos como se mencionara anteriormente. El medio conteniendo los SEs se removió y las células se lavaron con medio fresco antes de ser sometidos a lisis con el buffer RIPA siguiendo las instrucciones del fabricante. Los lisados resultantes se almacenaron a -80°C hasta el momento de ser procesados.

Detección de PEDF por ELISA

El medio condicionado proveniente de los compartimentos basal y apical a días 15, 30 y 50, como se indicara anteriormente, fue analizado para detectar y cuantificar la presencia de PEDF por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Para asegurar que los valores se ajusten al rango de detección del kit, los medios condicionados de los compartimentos basal y apical se diluyeron 1:2000 y 1:20000, respectivamente.

Cuantificación de β -Hidroxibutirato en EPR derivado de CMP

Con el fin de evaluar el potencial metabolismo de los segmentos externos de los FRs, se eligió el β hidroxibutirato como parámetro, ya que es un subproducto del metabolismo de los segmentos externos (SEs) el cual es liberado al medio (Reyes-Reveles y col., 2017).

La presencia de β -Hidroxibutirato en el medio de cultivo se observó mediante del kit colorimétrico *Stanbio β Hydroxybutyrate Liquicolor kit* siguiendo las instrucciones del fabricante. Este kit permite detectar la presencia de β -Hidroxibutirato por medio de una reacción enzimática que resulta en un producto coloreado.

Detección de rodopsina y PEDF por *Western Blotting*

La cuantificación de proteínas se realizó mediante el ensayo de BCA, siguiendo las instrucciones del fabricante. Una cantidad equivalente de proteína de cada lisado fue mezclada con buffer muestra (40% glicerol, 4% dodecil sulfato de litio, 4% Ficoll™ 400, 0,8 M trietanolamina-Cl, 0,025% rojo fenol, 0.025% *coomassie G250* y 2mM de EDTA disódico) y sembrada en geles de poliacrilamida 10% NuPage Bis-Tris. Las proteínas se separaron por electroforesis con voltaje constante a 125 volts durante 90 minutos, utilizando buffer NuPage™ MOPS como tampón de electroforesis. Las proteínas del gel se transfirieron

posteriormente a una membrana de nitrocelulosa mediante el dispositivo de transferencia iBlot2 (ThermoFisher, IB21001, US). Para la detección de PEDF, el medio condicionado de los *transwells* se procesó de la misma manera, sembrándose un volumen de 20 μ l por carril en todos los casos.

La detección de rodopsina y PEDF se realizó mediante el método de *enhanced chemiluminescence* (ECL) En primer lugar, el éxito de la transferencia fue evaluado mediante una incubación de 2 minutos con Ponceau Red, seguido de 3 lavados con agua destilada. Las membranas fueron posteriormente incubadas en BSA 5% disuelta en TBST (137 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,4, 0,1% Tween 20) durante 1 hora, y posteriormente incubadas con anticuerpo anti-PEDF (XPressBio) diluido 1:100000 o anti-Rodopsina diluido 1:5000 (Novus

Biologicals) en TBST con BSA 1% durante 16 horas a 4°C. Luego de tres lavados de 5 minutos cada uno con TBST, la membrana se incubó con un anticuerpo secundario (Anti-rabbit y anti-mouse, respectivamente) conjugado a peroxidasa diluido 1:1000 y disuelto en TBST durante una hora, seguido de incubación con el kit de detección por ECL durante 30 segundos antes de realizar la adquisición de imágenes. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Kwik-Quant.

Análisis estadístico

Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el software GraphPad Prism (Versión 8.2.0) usando el análisis *t de student* o ANOVA, seguido del test de Tukey o el test de comparaciones múltiples de Dunnett, según sugerencia del software. Todos los gráficos están contruidos con la media más el desvío estándar de al menos tres experimentos independientes. Las diferencias fueron consideradas significativas con un valor de $p < 0,05$ (*), $p < 0,001$ (***)

Resultados

El EPR derivado de CMP exhibió polarización

Los cultivos de EPR fueron preparados por el laboratorio Canto-Soler a partir de la diferenciación de una línea comercial de células madre pluripotentes derivadas de sangre umbilical CD34+ la cual fue inducida por la transducción de siete factores (SOX2, OCT4, KLF4, MYC, NANOG, LIN28, SV40L) por medio de un sistema

episomal basado en el antígeno nuclear 1 del virus Epstein-Barr (EBNA1) (Flores-Bellver 2021). La diferenciación a EPR fue realizada según protocolos previamente establecidos (Zhong y col., 2014; Capowski y col., 2019; Flores-Belver y col., 2021). Para este ensayo, el EPR derivado de CMP se cultivó como una monocapa en *transwells*, exponiendo las caras apical y basal de la monocapa a sendos compartimentos (Superior e inferior, respectivamente). El medio condicionado de ambas caras se produjo reemplazando el medio de cultivo con medio fresco e incubando el EPR durante 48 horas luego de 15, 30 y 50 días después de la inducción a EPR. Una de las características distintivas del EPR es la existencia de polaridad, o asimetría en su cara apical respecto a su cara basal (Cáceres y Rodríguez-Boulan, 2020). Esto es un resultado de la diferencia de funciones entre ambos extremos, siendo la cara apical la única que interactúa con la retina neural. Si bien esta polaridad es generada por las señales diferenciales recibidas del entorno circundante durante el desarrollo, estas señales no existen en el caso del EPR en cultivo. Para evaluar la existencia de polarización, se utilizó la secreción de PEDF como parámetro, ya que es preferentemente liberado por la cara apical en células de EPR confluentes en cultivo (Becerra y col., 2004).

Los resultados, evaluados por ensayos de ELISA y *western blot* para PEDF de medio condicionado de ambos compartimentos, mostraron una asimetría significativa respecto de la producción y liberación de PEDF al medio, siendo ésta unas 20, 25 y 50 veces mayor en la cara apical que en la basal, a días 15, 30 y 50, respectivamente (Fig. 22).

Estos resultados permiten concluir que el EPR derivado de CMP está polarizado desde al menos DIV15, y que esta polarización se acrecienta en función del tiempo, al igual que en el EPR *in vivo*.

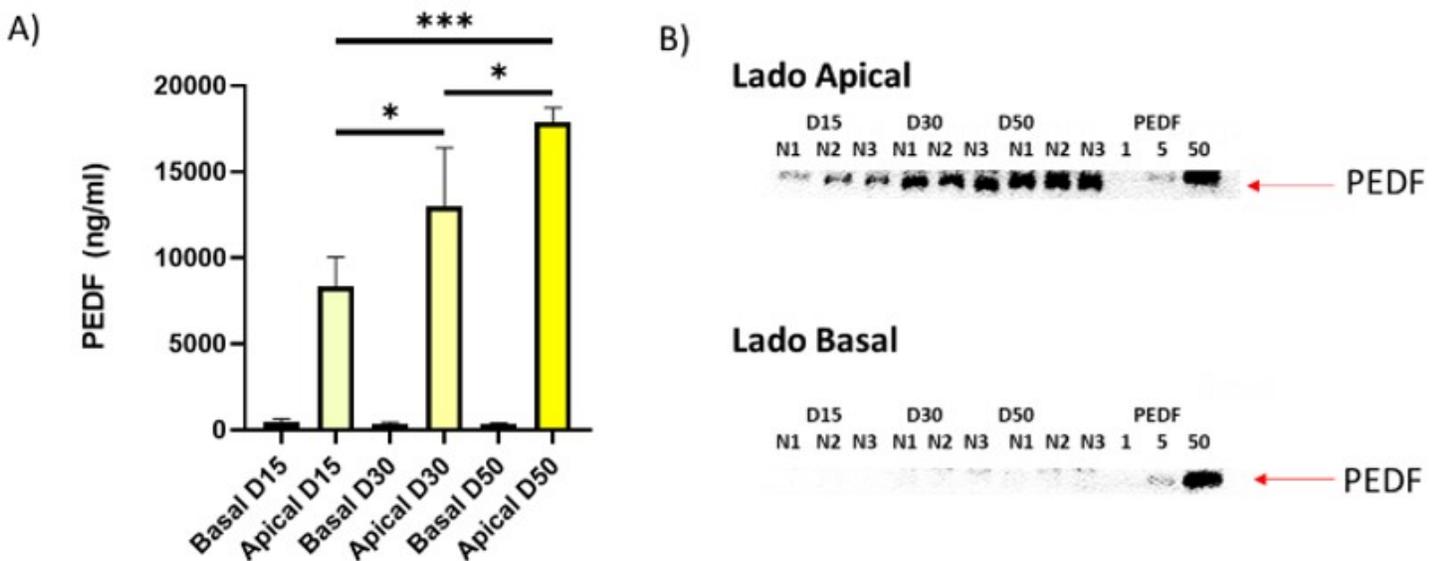


Figura 22: Asimetría en la liberación de PEDF del EPR derivado de CMP. A) Cuantificación por ELISA de PEDF liberado al medio por las caras apical y basal del EPR, realizado en tres cultivos separados de EPR a días 15, 30 y 50, comparando ambas caras (n=3). B) Misma cuantificación realizada por western blotting (n=3).

El EPR derivado de CMP es capaz de fagocitar y metabolizar segmentos externos de fotorreceptores.

Otra función central del EPR es la captación y fagocitosis de la porción terminal de los segmentos externos de fotorreceptores, lo cual es un proceso fundamental tanto para el mantenimiento de estos últimos como para el EPR, dada la importancia de los SEs como fuente de energía y de sustrato para la síntesis de metabolitos.

Como se observa en la figura 23A, extractos proteicos de EPR a DIV50 incubado con segmentos externos de fotorreceptores mostraron inmunorreacción frente a la proteína rodopsina (Carriles B1-B3), lo que contrastó con su ausencia en cultivos control, sin segmentos externos (Carriles A1-A3). La presencia de rodopsina pudo observarse de igual manera en el medio de cultivo tratado con segmentos externos (Carriles D1-D3), pero no en el medio de cultivo control (Carriles C1-C3). Debido a que los SEs están primariamente compuestos por fosfolípidos, su metabolización resulta en un aumento del doble en la producción del compuesto β hidroxibutirato liberado al medio como consecuencia del incremento en la tasa metabólica (Fig. 23B). Ambos hechos permiten concluir que este EPR derivado de CMP mantiene la capacidad de reconocer, captar y procesar segmentos externos de una forma comparable a la que ocurre *in vivo*.

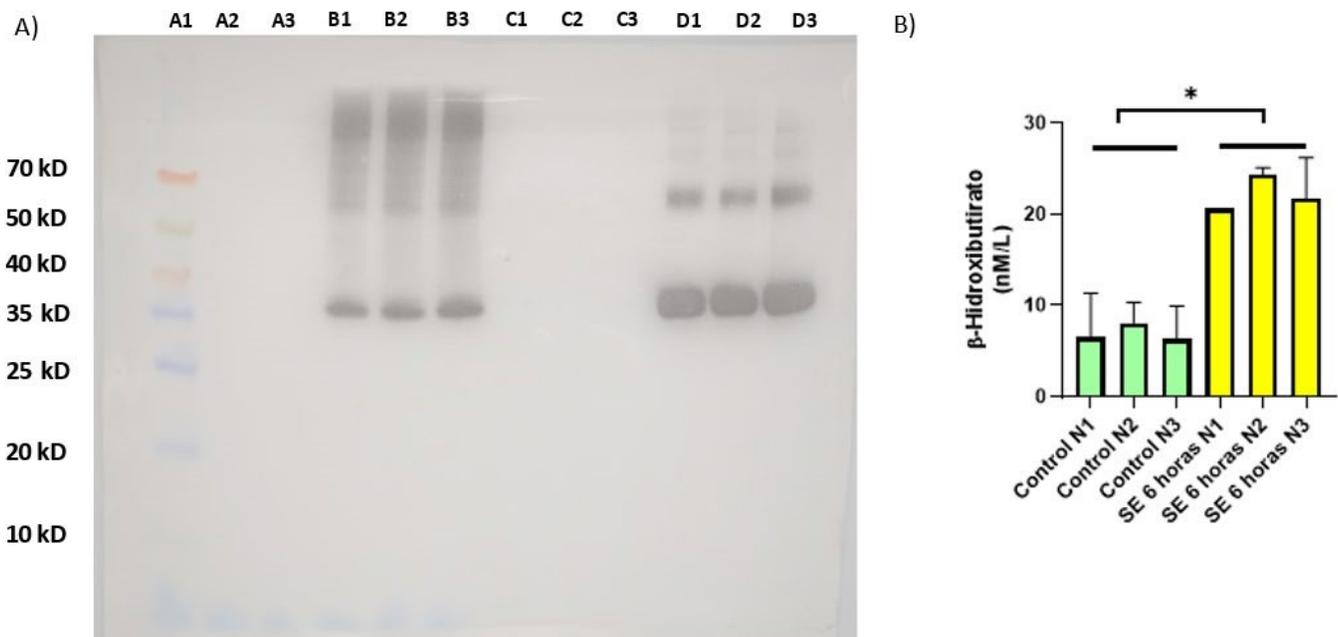


Figura 23: Capacidad metabólica del EPR derivado de CMP. A) Ensayo de Western blot mostrando la presencia de rodopsina en su forma monomérica (36 kDa), dimérica (72 kDa) y trimérica (118 kDa) en extractos de proteína de cultivos de EPR en ausencia de SEs (A1-A3) y tratados con SEs (B1-B3). El mismo ensayo en muestras de medio de los cultivos sin SEs (C1-C3) y con SEs (D1-D3), los cuales sirven como controles negativo y positivo de la inmunomarcación, respectivamente. B) Incremento en la liberación de β hidroxibutirato al medio frente al agregado de segmentos externos en comparación con la condición control en tres cultivos diferentes ($n=3$).

Discusión

Los resultados obtenidos en esta parte de la tesis han demostrado que el EPR derivado de CMP, exhibe rasgos fundamentales del EPR *in vivo*, tales como la capacidad de fagocitosis; la metabolización de segmentos externos y la secreción polarizada de PEDF (Flores-Bellver y col., 2021). Estos hallazgos tienen valor médico, dado que los cultivos de EPR podrían obtenerse, con un mínimo de invasividad y menores riesgos, a partir de pacientes con patologías oculares tales como la degeneración macular. Además, permitiría avanzar en la generación de diagnósticos y tratamientos más apropiados que los existentes, permitiendo realizar estrategias específicas para cada paciente (García y col., 2015; Lukovic y col., 2015; Nguyen y col., 2015; Smith y col., 2019).

Dada su importancia como estructura de soporte, cualquier daño o disfunción que sufra el EPR impacta en la retina en general. Este es el caso de varias enfermedades neurodegenerativas como la AMD (Kaupinnen y col., 2016; Datta y col., 2017; Kaarniranta y col., 2020), la retinopatía diabética (Fan y col., 2021; Tonade y Kern, 2021) o la enfermedad de Stargardt (Taubitz y col., 2018).

El rol del EPR como iniciador o catalizador del daño en la retina pone de relieve la importancia crucial de la preservación o reemplazo del mismo para el tratamiento de múltiples enfermedades neurodegenerativas. En este contexto, el uso de EPR derivado de CMP es un recurso relativamente fácil de obtener.

Lamentablemente, al igual que ocurre con las células madre embrionarias, este EPR podría poseer el potencial de desdiferenciarse y, potencialmente, transformarse en tumorigénico (Merkle y col., 2017), lo que hace imperiosa su caracterización y asegurar que preserve su identidad celular en el mediano-largo plazo. Este problema es particularmente crítico, dado que aun un número muy bajo de células madre embrionarias indiferenciadas son suficientes para dar lugar a teratomas (Cao y col., 2009). Por otro lado, si bien la naturaleza autóloga de los trasplantes ostensiblemente reduce el riesgo de síndrome de rechazo, es importante señalar que estos aspectos no han sido todavía totalmente resueltos, existiendo aun el riesgo de desencadenar respuestas inmunes (Mandai y col., 2017; McGill y col., 2018; Rajendran Nair y col., 2021, German y col., 2021). Además, estos trasplantes deben asegurar que no se localicen incorrectamente dentro de la retina, por lo que requieren estructuras de sostén artificiales (Sharma y col., 2019) e instrumental quirúrgico específico (Li y col., 2022). Por otra parte, también existen aspectos éticos referidos a los trasplantes que requieren ser examinados en mayor detalle. No obstante, se han reportado resultados positivos de estos trasplantes en modelos de degeneración retinal (Takagi y col., 2019; Zhu y col., 2020).

Pese a estas dificultades aún no totalmente resueltas, nuestros resultados, con la demostración que las células del EPR derivado de CMP exhiben características similares y compatibles con el EPR de la retina *in vivo*, han logrado superar un escollo crítico. Estos avances en su conjunto, son, por ende, de potencial médico indudable para avanzar hacia un posible tratamiento de enfermedades degenerativas de la retina como la AMD.

Conclusiones generales

El conjunto de resultados obtenidos en este trabajo de tesis permitió cumplir dos objetivos generales: Evaluar el rol de PEDF y sus péptidos derivados en un modelo de cultivo primario de neuronas de retinas neonatales, y evaluar aspectos funcionales de un modelo de EPR derivado de CMP inducidas. Este último aspecto abre la posibilidad de realizar trasplantes de células que sobreproducen y secretan PEDF, como alternativa al uso farmacológico de PEDF recombinante.

Las neuronas amacrinas y FRs obtenidas en estos cultivos demuestran que poseen características similares a las de la retina en desarrollo. Las mismas recapitulan en sus aspectos principales la expresión de PEDF-R, tanto a nivel de transcripto como de proteína, observada en su contraparte *in vivo*. Esto se observa también en otros procesos, como el crecimiento de neuritas y el desarrollo de fotorreceptores, los cuales son comparables a los que ocurre en el organismo entero. Por todo ello, estos cultivos son un modelo apropiado para el estudio de la retina en desarrollo.

El PEDF, así como los péptidos derivados de su dominio neurotrófico, promueven selectivamente la supervivencia de la población de fotorreceptores en los cultivos celulares. Estos compuestos protegen a los FRs de un tipo de muerte celular derivada de la ausencia de factores tróficos en el medio, la cual se caracteriza por la fragmentación del ADN nuclear, la translocación de la fosfatidilserina hacia la cara externa de la membrana plasmática, la pérdida de la función mitocondrial y la pérdida de integridad de las membranas celulares. Parte de estos efectos protectores involucran la inducción de factores antiapoptóticos como Bcl2 y Bcl2a1. Tanto el PEDF como sus derivados neurotróficos, también promueven el desarrollo y diferenciación de los fotorreceptores y neuronas amacrinas, al inducir la polarización apical de rodopsina, en las primeras; e incrementar el largo de neuritas en las segundas.

Todos estos efectos requieren de la interacción del dominio neurotrófico de PEDF con el sitio activo de PEDFR. En general, si esta interacción se ve comprometida, ninguno de estos efectos tiene lugar.

Estos resultados permiten considerar al PEDF como un factor fundamental para el desarrollo la retina, al ejercer múltiples efectos necesarios para la supervivencia y diferenciación en neuronas FRs y amacrinas.

Por otro lado, el EPR derivado de CMP puede adquirir y preservar en el tiempo varios aspectos funcionales característicos del EPR nativo, como la polarización apical-basal, la capacidad de captar y metabolizar segmentos externos de fotorreceptores, y de secretar PEDF al medio desde su cara apical. Estos resultados permiten concluir que el EPR derivado de CMP conservaría los aspectos funcionales críticos del EPR nativo, los cuales se mantienen estables en el corto-mediano plazo.

Publicaciones realizadas en el transcurso de esta Tesis

Michelis G, German OL, Villasmil R, Soto T, Rotstein NP, Politi L, Becerra SP (2021) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and derived peptides promote survival and differentiation of photoreceptors and induce neurite-outgrowth in amacrine neurons. *J Neurochem*. Vol.159, issue 5. Pags 840-56.

Flores-Bellver M, Mighty J, Aparicio-Domingo S, Li KV, Shi C, Zhou J, Cobb H, McGrath P, **Michelis G**, Lenhart P, Bilousova G, Heissel S, Rudy MJ, Coughlan C, Goodspeed AE, Becerra SP, Redenti S, Canto-Soler MV (2021) Extracellular vesicles released by human retinal pigment epithelium mediate increased polarized secretion of drusen proteins in response to AMD stressors. *J Extracell Vesicles* 10:e12165.

Michelis G, Politi L, Becerra SP (2021). Primary Retinal Cell Cultures as a Model to Study Retina Biology. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, Springer Editorial. (En prensa).

Presentaciones a Congresos realizadas en el transcurso de esta Tesis

- **Michelis G**, Becerra SP, Germán L, Rotstein NP, Politi LE. “El Factor Derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) previene la apoptosis y promueve la maduración de neuronas fotorreceptoras”. XI Meeting of the Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). 20-21 October, Bs. As, 2016.
- **Michelis G**, German OL, Rotstein NP, Politi LE, Becerra SP. “Peptides derived from PEDF prevent apoptosis and promote apical localization of rhodopsin in retina photoreceptors”. XXXIII Meeting of the Sociedad Argentina de Neurociencias (SAN). 24-26 October, Córdoba, 2018.
- **Michelis G**, German OL; Rotstein, NP; Politi, L; Becerra, P. “Peptides derived from PEDF prevent apoptosis and promote apical localization of rhodopsin in retina photoreceptors”. ISER Biennial Meeting; 2018. Belfast, Ireland, UK. Poster 154
- **Michelis G**, German OL, Rotstein NP, Politi LE, Becerra SP. “El factor de crecimiento derivado del epitelio (PEDF) y sus fragmentos neurotróficos promueven la supervivencia y diferenciación de neuronas de retina”. XII Meeting of the Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). 26-27 October, Córdoba, 2018.
- **Michelis G**, German OL, Rotstein NP, Politi LE, Becerra SP. “PEDF y péptidos derivados previenen la apoptosis y promueven la diferenciación de fotorreceptores retinales”. XIII Meeting of the Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). 23-24 October, Virtual Congress. 2020.
- **Michelis G**, German OL; Rotstein, NP; Politi, L; Becerra, P. “Peptides derived from PEDF prevent apoptosis and promote apical localization of rhodopsin in retina photoreceptors”. ARVO 2020 Meeting. Publicado en *Investigative Ophthalmology & Visual Science* June 2020, Vol.61, 2488.
- **Michelis G**, German OL; Rotstein, NP; Politi, L; Becerra, P. “PEDF and Derived Peptides Prevent Apoptosis and Promote Retinal Photoreceptor Differentiation”. Presentado en el NEI Focus on Fellows 2020, October 17, 2020.

Premios recibidos durante el transcurso de esta Tesis

- Receptor del PROLAB Award (Promoting Research Opportunities for Latin American Biochemists) 2017, ofrecido por la ASBMB (American Society of Biochemistry and Molecular Biology)
- Ganador del Primer Lugar en la competencia de Mejor Póster, ISER 2018. Belfast, Ireland, UK.
- Imagen seleccionada como la tapa de la entrega de diciembre 2021 del *Journal of Neurochemistry*.

Bibliografía

Adler R (1982) Regulation of neurite growth in purified retina neuronal cultures: effects of PNPf, a substratum-bound, neurite-promoting factor. *J Neurosci Res* 8:165-177.

Adler R (1986) Developmental predetermination of the structural and molecular polarization of photoreceptor cells. *Dev Biol* 117:520-527.

Akagawa K, Barnstable CJ (1986) Identification and characterization of cell types in monolayer cultures of rat retina using monoclonal antibodies. *Brain Res* 383:110-120.

Al-Zamil WM, Yassin SA (2017) Recent developments in age-related macular degeneration: a review. *Clin Interv Aging* 12:1313-1330.

Alberdi E, Aymerich MS, Becerra SP (1999) Binding of pigment epithelium-derived factor (PEDF) to retinoblastoma cells and cerebellar granule neurons. Evidence for a PEDF receptor. *J Biol Chem* 274:31605-31612.

Amaral J, Becerra SP (2010) Effects of human recombinant PEDF protein and PEDF-derived peptide 34-mer on choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:1318-1326.

Aymerich MS, Alberdi EM, Martínez A, Becerra SP (2001) Evidence for pigment epithelium-derived factor receptors in the neural retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:3287-3293.

Azadi S, Johnson LE, Paquet-Durand F, Perez MT, Zhang Y, Ekström PA, van Veen T (2007) CNTF+BDNF treatment and neuroprotective pathways in the rd1 mouse retina. *Brain Res* 1129:116-129.

Ban Y, Rizzolo LJ (2000) Regulation of glucose transporters during development of the retinal pigment epithelium. *Brain Res Dev Brain Res* 121:89-95.

Barnstable CJ, Tombran-Tink J (2004) Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 23:561-577.

Barnstable CJ, Hofstein R, Akagawa K (1985) A marker of early amacrine cell development in rat retina. *Brain Res* 352:286-290.

Bazan NG (2005) Neuroprotectin D1 (NPD1): a DHA-derived mediator that protects brain and retina against cell injury-induced oxidative stress. *Brain Pathol* 15:159-166.

Bazan NG (2009) Neuroprotectin D1-mediated anti-inflammatory and survival signaling in stroke, retinal degenerations, and Alzheimer's disease. *J Lipid Res* 50 Suppl:S400-405.

Becerra SP (2006) Focus on Molecules: Pigment epithelium-derived factor (PEDF). *Exp Eye Res* 82:739-740.

Becerra SP, Notario V (2013) The effects of PEDF on cancer biology: mechanisms of action and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer* 13:258-271.

Becerra SP, Fariss RN, Wu YQ, Montuenga LM, Wong P, Pfeffer BA (2004) Pigment epithelium-derived factor in the monkey retinal pigment epithelium and interphotoreceptor matrix: apical secretion and distribution. *Exp Eye Res* 78:223-234.

Bharti K, Miller SS, Arnheiter H (2011) The new paradigm: retinal pigment epithelium cells generated from embryonic or induced pluripotent stem cells. *Pigment Cell Melanoma Res* 24:21-34.

Bhutto IA, McLeod DS, Hasegawa T, Kim SY, Merges C, Tong P, Luttj DA (2006) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) in aged human choroid and eyes with age-related macular degeneration. *Exp Eye Res* 82:99-110.

Biesemeier A, Taubitz T, Julien S, Yoeruek E, Schraermeyer U (2014) Choriocapillaris breakdown precedes retinal degeneration in age-related macular degeneration. *Neurobiol Aging* 35:2562-2573.

Bilak MM, Becerra SP, Vincent AM, Moss BH, Aymerich MS, Kuncl RW (2002) Identification of the neuroprotective molecular region of pigment epithelium-derived factor and its binding sites on motor neurons. *J Neurosci* 22:9378-9386.

Bosch E, Horwitz J, Bok D (1993) Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem* 41:253-263.

Bottenstein JE, Sato GH (1979) Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free supplemented medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:514-517.

Bouck N (2002) PEDF: anti-angiogenic guardian of ocular function. *Trends Mol Med* 8:330-334.

Boulton M, Dayhaw-Barker P (2001) The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes. *Eye (Lond)* 15:384-389.

Bullock J, Polato F, Abu-Asab M, Bernardo-Colón A, Aflaki E, Agbaga MP, Becerra SP (2021) Degradation of Photoreceptor Outer Segments by the Retinal Pigment Epithelium Requires Pigment Epithelium-Derived Factor Receptor (PEDF-R). *Invest Ophthalmol Vis Sci* 62:30.

Bürger S, Meng J, Zwanzig A, Beck M, Pankonin M, Wiedemann P, Eichler W, Unterlauff JD (2020) Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Receptors Are Involved in Survival of Retinal Neurons. *Int J Mol Sci* 22.

Caceres PS, Rodriguez-Boulan E (2020) Retinal pigment epithelium polarity in health and blinding diseases. *Curr Opin Cell Biol* 62:37-45.

Cai J, Jiang WG, Grant MB, Boulton M (2006) Pigment epithelium-derived factor inhibits angiogenesis via regulated intracellular proteolysis of vascular endothelial growth factor receptor 1. *J Biol Chem* 281:3604-3613.

Canter JA, Olson LM, Spencer K, Schnetz-Boutaud N, Anderson B, Hauser MA, Schmidt S, Postel EA, Agarwal A, Pericak-Vance MA, Sternberg P, Haines JL (2008) Mitochondrial DNA polymorphism A4917G is independently associated with age-related macular degeneration. *PLoS One* 3:e2091.

Canto-Soler V, Flores-Bellver M, Vergara MN (2016) Stem Cell Sources and Their Potential for the Treatment of Retinal Degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57:ORSFd1-9.

Cao F, Li Z, Lee A, Liu Z, Chen K, Wang H, Cai W, Chen X, Wu JC (2009) Noninvasive de novo imaging of human embryonic stem cell-derived teratoma formation. *Cancer Res* 69:2709-2713.

Capowski EE, Samimi K, Mayerl SJ, Phillips MJ, Pinilla I, Howden SE, Saha J, Jansen AD, Edwards KL, Jager LD, Barlow K, Valiauga R, Erlichman Z, Hagstrom A, Sinha D, Sluch VM, Chamling X, Zack DJ, Skala MC, Gamm DM (2019) Reproducibility and staging of 3D human retinal organoids across multiple pluripotent stem cell lines. *Development* 146.

Casswell AG, Kohen D, Bird AC (1985) Retinal pigment epithelial detachments in the elderly: classification and outcome. *Br J Ophthalmol* 69:397-403.

Cayouette M, Smith SB, Becerra SP, Gravel C (1999) Pigment epithelium-derived factor delays the death of photoreceptors in mouse models of inherited retinal degenerations. *Neurobiol Dis* 6:523-532.

Chang GQ, Hao Y, Wong F (1993) Apoptosis: final common pathway of photoreceptor death in rd, rds, and rhodopsin mutant mice. *Neuron* 11:595-605.

Chen H, Anderson RE (1993) Differential incorporation of docosahexaenoic and arachidonic acids in frog retinal pigment epithelium. *J Lipid Res* 34:1943-1955.

Chen Y, Yang J, Geng H, Li L, Li J, Cheng B, Ma X, Li H, Hou L (2019) Photoreceptor degeneration in microphthalmia (Mif) mice: Partial rescue by pigment epithelium-derived factor. *Dis Model Mech* 12.

Chiu CJ, Milton RC, Klein R, Gensler G, Taylor A (2007) Dietary carbohydrate and the progression of age-related macular degeneration: a prospective study from the Age-Related Eye Disease Study. *Am J Clin Nutr* 86:1210-1218.

Chucair AJ, Rotstein NP, Sangiovanni JP, During A, Chew EY, Politi LE (2007) Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:5168-5177.

Comitato A, Subramanian P, Turchiano G, Montanari M, Becerra SP, Marigo V (2018) Pigment epithelium-derived factor hinders photoreceptor cell death by reducing intracellular calcium in the degenerating retina. *Cell Death Dis* 9:560.

Cui W, Sathyanarayan A, Lopresti M, Aghajani M, Chen C, Mashek DG (2021) Lipophagy-derived fatty acids undergo extracellular efflux via lysosomal exocytosis. *Autophagy* 17:690-705.

Datta S, Cano M, Ebrahimi K, Wang L, Handa JT (2017) The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Prog Retin Eye Res* 60:201-218.

Davies AM (2003) Regulation of neuronal survival and death by extracellular signals during development. *EMBO J* 22:2537-2545.

Dixit S, Polato F, Samardzija M, Abu-Asab M, Grimm C, Crawford SE, Becerra SP (2020) PEDF deficiency increases the susceptibility of rd10 mice to retinal degeneration. *Exp Eye Res* 198:108121.

Dudek H, Datta SR, Franke TF, Birnbaum MJ, Yao R, Cooper GM, Segal RA, Kaplan DR, Greenberg ME (1997) Regulation of neuronal survival by the serine-threonine protein kinase Akt. *Science* 275:661-665.

Edwards AO, Ritter R, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA (2005) Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 308:421-424.

Fan S, Yang Z, Liu Y, Zhong J, Zhang S, Xiao Y, Liu X, Yi W, He C, Hu Y (2021) Extensive Sub-RPE Complement Deposition in a Nonhuman Primate Model of Early-Stage Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 62:30.

Filleur S, Volz K, Nelius T, Mirochnik Y, Huang H, Zaichuk TA, Aymerich MS, Becerra SP, Yap R, Veliceasa D, Shroff EH, Volpert OV (2005) Two functional epitopes of pigment epithelial-derived factor block angiogenesis and induce differentiation in prostate cancer. *Cancer Res* 65:5144-5152.

Fischer AJ, Reh TA (2003) Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *Glia* 43:70-76.

Flores-Bellver M, Mighty J, Aparicio-Domingo S, Li KV, Shi C, Zhou J, Cobb H, McGrath P, Michelis G, Lenhart P, Bilousova G, Heissel S, Rudy MJ, Coughlan C, Goodspeed AE, Becerra SP, Redenti S, Canto-Soler MV (2021) Extracellular vesicles released by human retinal pigment epithelium mediate increased polarised secretion of drusen proteins in response to AMD stressors. *J Extracell Vesicles* 10:e12165.

Fontaine V, Kinkl N, Sahel J, Dreyfus H, Hicks D (1998) Survival of purified rat photoreceptors in vitro is stimulated directly by fibroblast growth factor-2. *J Neurosci* 18:9662-9672.

Frasson M, Picaud S, Léveillard T, Simonutti M, Mohand-Said S, Dreyfus H, Hicks D, Sabel J (1999) Glial cell line-derived neurotrophic factor induces histologic and functional protection of rod photoreceptors in the rd/rd mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 40:2724-2734.

Furukawa T, Morrow EM, Cepko CL (1997) Crx, a novel otx-like homeobox gene, shows photoreceptor-specific expression and regulates photoreceptor differentiation. *Cell* 91:531-541.

García-Caballero C, Lieppman B, Arranz-Romera A, Molina-Martínez IT, Bravo-Osuna I, Young M, Baranov P, Herrero-Vanrell R (2018) Photoreceptor preservation induced by intravitreal controlled delivery of GDNF and GDNF/melatonin in rhodopsin knockout mice. *Mol Vis* 24:733-745.

Garelli A, Rotstein NP, Politi LE (2006) Docosahexaenoic acid promotes photoreceptor differentiation without altering Crx expression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:3017-3027.

Gass JD (1972) Drusen and disciform macular detachment and degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 70:409-436.

Gehrs KM, Anderson DH, Johnson LV, Hageman GS (2006) Age-related macular degeneration--emerging pathogenetic and therapeutic concepts. *Ann Med* 38:450-471.

German OL, Insua MF, Gentili C, Rotstein NP, Politi LE (2006) Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *J Neurochem* 98:1507-1520.

German OL, Monaco S, Agnolazza DL, Rotstein NP, Politi LE (2013) Retinoid X receptor activation is essential for docosahexaenoic acid protection of retina photoreceptors. *J Lipid Res* 54:2236-2246.

German OL, Vallese-Maurizi H, Soto TB, Rotstein NP, Politi LE (2021) Retina stem cells, hopes and obstacles. *World J Stem Cells* 13:1446-1479.

Giordano F, De Marzo A, Vetrini F, Marigo V (2007) Fibroblast growth factor and epidermal growth factor differently affect differentiation of murine retinal stem cells in vitro. *Mol Vis* 13:1842-1850.

Green WR, Key SN (1977) Senile macular degeneration: a histopathologic study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 75:180-254.

Green WR, Enger C (1993) Age-related macular degeneration histopathologic studies. The 1992 Lorenz E. Zimmerman Lecture. *Ophthalmology* 100:1519-1535.

Gundersen D, Orlowski J, Rodriguez-Boulan E (1991) Apical polarity of Na,K-ATPase in retinal pigment epithelium is linked to a reversal of the ankyrin-fodrin submembrane cytoskeleton. *J Cell Biol* 112:863-872.

Gundersen D, Powell SK, Rodriguez-Boulan E (1993) Apical polarization of N-CAM in retinal pigment epithelium is dependent on contact with the neural retina. *J Cell Biol* 121:335-343.

Gutierrez-Aranda I, Ramos-Mejia V, Bueno C, Munoz-Lopez M, Real PJ, Mácia A, Sanchez L, Ligeró G, GarciaParez JL, Menendez P (2010) Human induced pluripotent stem cells develop teratoma more efficiently and faster than human embryonic stem cells regardless the site of injection. *Stem Cells* 28:1568-1570.

Guyer DR, Fine SL, Maguire MG, Hawkins BS, Owens SL, Murphy RP (1986) Subfoveal choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. Visual prognosis in eyes with relatively good initial visual acuity. *Arch Ophthalmol* 104:702-705.

Haemmerle G et al. (2011) ATGL-mediated fat catabolism regulates cardiac mitochondrial function via PPAR- α and PGC-1. *Nat Med* 17:1076-1085.

Hageman GS et al. (2005) A common haplotype in the complement regulatory gene factor H (HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:7227-7232.

Haq R, Yokoyama S, Hawryluk EB, Jönsson GB, Frederick DT, McHenry K, Porter D, Tran TN, Love KT, Langer R, Anderson DG, Garraway LA, Duncan LM, Morton DL, Hoon DS, Wargo JA, Song JS, Fisher DE (2013) BCL2A1 is a lineage-specific antiapoptotic melanoma oncogene that confers resistance to BRAF inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110:4321-4326.

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

He Y, Leung KW, Ren Y, Pei J, Ge J, Tombran-Tink J (2014) PEDF improves mitochondrial function in RPE cells during oxidative stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 55:6742-6755.

Hentze H, Soong PL, Wang ST, Phillips BW, Putti TC, Dunn NR (2009) Teratoma formation by human embryonic stem cells: evaluation of essential parameters for future safety studies. *Stem Cell Res* 2:198-210.

Hernández-Pinto A, Polato F, Subramanian P, Rocha-Muñoz A, Vitale S, de la Rosa EJ, Becerra SP (2019) PEDF peptides promote photoreceptor survival in rd10 retina models. *Exp Eye Res* 184:24-29.

Ho TC, Chen SL, Yang YC, Liao CL, Cheng HC, Tsao YP (2007) PEDF induces p53-mediated apoptosis through PPAR gamma signaling in human umbilical vein endothelial cells. *Cardiovasc Res* 76:213-223.

Holekamp NM, Bouck N, Volpert O (2002) Pigment epithelium-derived factor is deficient in the vitreous of patients with choroidal neovascularization due to age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 134:220-227.

Holz FG, Bellman C, Staudt S, Schütt F, Völcker HE (2001) Fundus autofluorescence and development of geographic atrophy in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1051-1056.

Hu DN, Simon JD, Sarna T (2008) Role of ocular melanin in ophthalmic physiology and pathology. *Photochem Photobiol* 84:639-644.

Hyatt GA, Dowling JE (1997) Retinoic acid. A key molecule for eye and photoreceptor development. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1471-1475.

Iaccarino C, Mura ME, Esposito S, Carta F, Sanna G, Turrini F, Carri MT, Crosio C (2011) Bcl2-A1 interacts with pro-caspase-3: implications for amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol Dis* 43:642-650.

Imai D, Yoneya S, Gehlbach PL, Wei LL, Mori K (2005) Intraocular gene transfer of pigment epithelium-derived factor rescues photoreceptors from light-induced cell death. *J Cell Physiol* 202:570-578.

Immel J, Steinberg RH (1986) Spatial buffering of K⁺ by the retinal pigment epithelium in frog. *J Neurosci* 6:3197-3204.

Jablonski MM, Tombran-Tink J, Mrazek DA, Iannaccone A (2000) Pigment epithelium-derived factor supports normal development of photoreceptor neurons and opsin expression after retinal pigment epithelium removal. *J Neurosci* 20:7149-7157.

Jenkins CM, Mancuso DJ, Yan W, Sims HF, Gibson B, Gross RW (2004) Identification, cloning, expression, and purification of three novel human calcium-independent phospholipase A2 family members possessing triacylglycerol lipase and acylglycerol transacylase activities. *J Biol Chem* 279:48968-48975.

Jonasson F, Fisher DE, Eiriksdottir G, Sigurdsson S, Klein R, Launer LJ, Harris T, Gudnason V, Cotch MF (2014) Five-year incidence, progression, and risk factors for age-related macular degeneration: the age, gene/environment susceptibility study. *Ophthalmology* 121:1766-1772.

Joussen AM, Heussen FM, Joeres S, Llacer H, Prinz B, Rohrschneider K, Maaijwee KJ, van Meurs J, Kirchhof B (2006) Autologous translocation of the choroid and retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration. *Am J Ophthalmol* 142:17-30.

Kaarniranta K, Uusitalo H, Blasiak J, Felszeghy S, Kannan R, Kauppinen A, Salminen A, Sinha D, Ferrington D (2020) Mechanisms of mitochondrial dysfunction and their impact on age-related macular degeneration. *Prog Retin Eye Res* 79:100858.

Kauppinen A, Paterno JJ, Blasiak J, Salminen A, Kaarniranta K (2016) Inflammation and its role in age-related macular degeneration. *Cell Mol Life Sci* 73:1765-1786.

Kaushik S, Wang JJ, Flood V, Tan JS, Barclay AW, Wong TY, Brand-Miller J, Mitchell P (2008) Dietary glycemic index and the risk of age-related macular degeneration. *Am J Clin Nutr* 88:1104-1110.

- Kelley MW, Turner JK, Reh TA (1994) Retinoic acid promotes differentiation of photoreceptors in vitro. *Development* 120:2091-2102.
- Kenealey J, Subramanian P, Comitato A, Bullock J, Keehan L, Polato F, Hoover D, Marigo V, Becerra SP (2015) Small Retinoprotective Peptides Reveal a Receptor-binding Region on Pigment Epithelium-derived Factor. *J Biol Chem* 290:25241-25253.
- Kevany BM, Palczewski K (2010) Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors. *Physiology (Bethesda)* 25:8-15.
- Kim JY, Park S, Park HJ, Kim SH, Lew H, Kim GJ (2021) PEDF-Mediated Mitophagy Triggers the Visual Cycle by Enhancing Mitochondrial Functions in a H₂O₂-Injured rat model. *Cells* 10.
- Kojima T, Nakahama K, Yamamoto K, Uematsu H, Morita I (2006) Age- and cell cycle-dependent changes in EPC-1/PEDF promoter activity in human diploid fibroblast-like (HDF) cells. *Mol Cell Biochem* 293:63-69.
- Laird DW, Molday RS (1988) Evidence against the role of rhodopsin in rod outer segment binding to RPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:419-428.
- LaVail MM (1976) Rod outer segment disk shedding in rat retina: relationship to cyclic lighting. *Science* 194:10711074.
- Lechanteur YT, van de Ven JP, Smallhodzic D, Boon CJ, Klevering BJ, Fauser S, Groenewoud JM, van der Wilt GJ, den Hollander AI, Hoyng CB (2012) Genetic, behavioral, and sociodemographic risk factors for second eye progression in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 53:5846-5852.
- Lehmann GL, Benedicto I, Philp NJ, Rodriguez-Boulan E (2014) Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Exp Eye Res* 126:5-15.
- Lewis H, Straatsma BR, Foos RY (1986) Chorioretinal juncture. Multiple extramacular drusen. *Ophthalmology* 93:1098-1112.
- Li KV, Flores-Bellver M, Aparicio-Domingo S, Petrash C, Cobb H, Chen C, Canto-Soler MV, Mathias MT (2022) A Surgical Kit for Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium Transplants: Collection, Transportation, and Subretinal Delivery. *Front Cell Dev Biol* 10:813538.

- Li S, Sato K, Gordon WC, Sendtner M, Bazan NG, Jin M (2018) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) protects retinal cone and rod photoreceptors by suppressing excessive formation of the visual pigments. *J Biol Chem* 293:15256-15268.
- Li ZY, Jacobson SG, Milam AH (1994) Autosomal dominant retinitis pigmentosa caused by the threonine-17methionine rhodopsin mutation: retinal histopathology and immunocytochemistry. *Exp Eye Res* 58:397-408.
- Liang R, Yung MMH, He F, Jiao P, Chan KKL, Ngan HYS, Chan DW (2021) The Stress-Inducible BCL2A1 Is Required for Ovarian Cancer Metastatic Progression in the Peritoneal Microenvironment. *Cancers (Basel)* 13.
- Lin P, Li J, Ye F, Fu W, Hu X, Shao Z, Song C (2020) KCNN4 induces multiple chemoresistance in breast cancer by regulating BCL2A1. *Am J Cancer Res* 10:3302-3315.
- Lukinova N, Iacovelli J, Dentchev T, Wolkow N, Hunter A, Amado D, Ying GS, Sparrow JR, Dunaief JL (2009) Iron chelation protects the retinal pigment epithelial cell line ARPE-19 against cell death triggered by diverse stimuli. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:1440-1447.
- Lukovic D, Artero Castro A, Delgado AB, Bernal MeL, Luna Pelaez N, Díez Lloret A, Perez Espejo R, Kamenarova K, Fernández Sánchez L, Cuenca N, Cortón M, Avila Fernandez A, Sorkio A, Skottman H, Ayuso C, Erceg S, Bhattacharya SS (2015) Human iPSC derived disease model of MERTK-associated retinitis pigmentosa. *Sci Rep* 5:12910.
- Mandai M et al. (2017) Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med* 376:1038-1046.
- Marigo V (2007) Programmed cell death in retinal degeneration: targeting apoptosis in photoreceptors as potential therapy for retinal degeneration. *Cell Cycle* 6:652-655.
- Mazzoni F, Safa H, Finnemann SC (2014) Understanding photoreceptor outer segment phagocytosis: use and utility of RPE cells in culture. *Exp Eye Res* 126:51-60.
- McBee JK, Van Hooser JP, Jang GF, Palczewski K (2001) Isomerization of 11-cis-retinoids to all-trans-retinoids in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 276:48483-48493.
- McGill TJ, Stoddard J, Renner LM, Messaoudi I, Bharti K, Mitalipov S, Lauer A, Wilson DJ, Neuringer M (2018) Allogeneic iPSC-Derived RPE Cell Graft Failure Following Transplantation Into the Subretinal Space in Nonhuman Primates. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 59:1374-1383.

- McLeod DS, Taomoto M, Otsuji T, Green WR, Sunness JS, Luty GA (2002) Quantifying changes in RPE and choroidal vasculature in eyes with age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:1986-1993.
- Merkle FT, Ghosh S, Kamitaki N, Mitchell J, Avior Y, Mello C, Kashin S, Mekhoubad S, Ilic D, Charlton M, Saphier G, Handsaker RE, Genovese G, Bar S, Benvenisty N, McCarroll SA, Eggan K (2017) Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* 545:229-233.
- Michelis G, German OL, Villasmil R, Soto T, Rotstein NP, Politi L, Becerra SP (2021) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) and derived peptides promote survival and differentiation of photoreceptors and induce neurite outgrowth in amacrine neurons. *J Neurochem*.
- Miller SS, Steinberg RH, Oakley B (1978) The electrogenic sodium pump of the frog retinal pigment epithelium. *J Membr Biol* 44:259-279.
- Ming M, Li X, Fan X, Yang D, Li L, Chen S, Gu Q, Le W (2009) Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in Parkinson's disease. *J Transl Med* 7:53.
- Miranda GE, Abrahan CE, Politi LE, Rotstein NP (2009) Sphingosine-1-phosphate is a key regulator of proliferation and differentiation in retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4416-4428.
- Miranda GE, Abrahan CE, Agnolazza DL, Politi LE, Rotstein NP (2011) Ceramide-1-phosphate, a new mediator of development and survival in retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 52:6580-6588.
- Miyazaki M, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Goto Y, Kohno R, Murakami Y, Inoue M, Ueda Y, Hasegawa M, Tobimatsu S, Sueishi K, Ishibashi T (2008) Synergistic neuroprotective effect via simian lentiviral vector-mediated simultaneous gene transfer of human pigment epithelium-derived factor and human fibroblast growth factor-2 in rodent models of retinitis pigmentosa. *J Gene Med* 10:1273-1281.
- Mukherjee PK, Marcheselli VL, Serhan CN, Bazan NG (2004) Neuroprotectin D1: a docosahexaenoic acid-derived docosatriene protects human retinal pigment epithelial cells from oxidative stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:8491-8496.
- Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakagawa K, Kohno R, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura M, Yabe T, Hasegawa M, Ishibashi T, Sueishi K (2008) Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am J Pathol* 173:1326-1338.

- Nadal-Nicolas FM, Becerra SP (2018) Pigment Epithelium-derived Factor Protects Retinal Pigment Epithelial Cells Against Cytotoxicity "In Vitro". *Adv Exp Med Biol* 1074:457-464.
- Nakazawa T, Shimura M, Tomita H, Akiyama H, Yoshioka Y, Kudou H, Tamai M (2003) Intrinsic activation of PI3K/Akt signaling pathway and its neuroprotective effect against retinal injury. *Curr Eye Res* 26:55-63.
- Nguyen HV, Li Y, Tsang SH (2015) Patient-Specific iPSC-Derived RPE for Modeling of Retinal Diseases. *J Clin Med* 4:567-578.
- Nguyen-Legros J, Hicks D (2000) Renewal of photoreceptor outer segments and their phagocytosis by the retinal pigment epithelium. *Int Rev Cytol* 196:245-313.
- Notari L, Baladron V, Aroca-Aguilar JD, Balko N, Heredia R, Meyer C, Notario PM, Saravanamuthu S, Nueda ML, Sanchez-Sanchez F, Escribano J, Laborda J, Becerra SP (2006) Identification of a lipase-linked cell membrane receptor for pigment epithelium-derived factor. *J Biol Chem* 281:38022-38037.
- Ogata N, Matsuoka M, Imaizumi M, Arichi M, Matsumura M (2004) Decreased levels of pigment epithelium-derived factor in eyes with neuroretinal dystrophic diseases. *Am J Ophthalmol* 137:1129-1130.
- Ogata N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, Matsumura M (2001) Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res* 22:245-252.
- Pagan-Mercado G, Becerra SP (2019) Signaling Mechanisms Involved in PEDF-Mediated Retinoprotection. *Adv Exp Med Biol* 1185:445-449.
- Palmieri D, Watson JM, Rinehart CA (1999) Age-related expression of PEDF/EPC-1 in human endometrial stromal fibroblasts: implications for interactive senescence. *Exp Cell Res* 247:142-147.
- Pang IH, Zeng H, Fleenor DL, Clark AF (2007) Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells. *BMC Neurosci* 8:11.
- Peng HB, Yang JF, Dai Z, Lee CW, Hung HW, Feng ZH, Ko CP (2003) Differential effects of neurotrophins and schwann cell-derived signals on neuronal survival/growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 23:5050-5060.

Pham TL, He J, Kakazu AH, Jun B, Bazan NG, Bazan HEP (2017) Defining a mechanistic link between pigment epithelium-derived factor, docosahexaenoic acid, and corneal nerve regeneration. *J Biol Chem* 292:18486-18499.

Pinzón-Duarte G, Arango-González B, Guenther E, Kohler K (2004) Effects of brain-derived neurotrophic factor on cell survival, differentiation and patterning of neuronal connections and Müller glia cells in the developing retina. *Eur J Neurosci* 19:1475-1484.

Polato F, Becerra SP (2016) Pigment Epithelium-Derived Factor, a Protective Factor for Photoreceptors in Vivo. *Adv Exp Med Biol* 854:699-706.

Politi L, Rotstein N, Carri N (2001a) Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: cellular and molecular aspects. *Lipids* 36:927-935.

Politi LE, Lehar M, Adler R (1988) Development of neonatal mouse retinal neurons and photoreceptors in low density cell culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:534-543.

Politi LE, Rotstein NP, Carri NG (2001b) Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: additive protection with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:3008-3015.

Politi LE, Rotstein NP, Salvador G, Giusto NM, Insua MF (2001c) Insulin-like growth factor-I is a potential trophic factor for amacrine cells. *J Neurochem* 76:1199-1211.

Prado Spalm FH, Vera MS, Dibo MJ, Simón MV, Politi LE, Rotstein NP (2019) Ceramide Induces the Death of Retina Photoreceptors Through Activation of Parthanatos. *Mol Neurobiol* 56:4760-4777.

Rajendran Nair DS, Zhu D, Sharma R, Martinez Camarillo JC, Bharti K, Hinton DR, Humayun MS, Thomas BB (2021) Long-Term Transplant Effects of iPSC-RPE Monolayer in Immunodeficient RCS Rats. *Cells* 10.

Rapp M, Woo G, Al-Ubaidi MR, Becerra SP, Subramanian P (2014) Pigment epithelium-derived factor protects cone photoreceptor-derived 661W cells from light damage through Akt activation. *Adv Exp Med Biol* 801:813820.

Rebustini IT, Crawford SE, Becerra SP (2022) PEDF Deletion Induces Senescence and Defects in Phagocytosis in the RPE. *Int J Mol Sci* 23.

Reinoso MA, Mukherjee P, Marcheselli V, Bergsma D, Hesse R, Bazan N (2008) PEDF Promotes Biosynthesis of a Novel Anti-inflammatory and Anti-apoptotic Mediator NPD1 in Retinal Pigment Epithelial Cells. *Ochsner J* 8:39-43.

Reyes-Reveles J, Dhingra A, Alexander D, Bragin A, Philp NJ, Boesze-Battaglia K (2017) Phagocytosis-dependent ketogenesis in retinal pigment epithelium. *J Biol Chem* 292:8038-8047.

Rothermel A, Layer PG (2003) GDNF regulates chicken rod photoreceptor development and survival in reaggregated histotypic retinal spheres. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2221-2228.

Rotstein NP, Politi LE, Aveldaño MI (1998) Docosahexaenoic acid promotes differentiation of developing photoreceptors in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:2750-2758.

Rotstein NP, Aveldaño MI, Barrantes FJ, Politi LE (1996) Docosahexaenoic acid is required for the survival of rat retinal photoreceptors in vitro. *J Neurochem* 66:1851-1859.

Rotstein NP, Politi LE, German OL, Girotti R (2003) Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2252-2259.

Rotstein NP, Aveldaño MI, Barrantes FJ, Roccamo AM, Politi LE (1997) Apoptosis of retinal photoreceptors during development in vitro: protective effect of docosahexaenoic acid. *J Neurochem* 69:504-513.

Sanchez A, Tripathy D, Yin X, Luo J, Martinez J, Grammas P (2012) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) protects cortical neurons in vitro from oxidant injury by activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and induction of Bcl-2. *Neurosci Res* 72:1-8.

SanGiovanni JP, Chew EY (2005) The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. *Prog Retin Eye Res* 24:87-138.

SanGiovanni JP, Arking DE, Iyengar SK, Elashoff M, Clemons TE, Reed GF, Henning AK, Sivakumaran TA, Xu X, DeWan A, Agrón E, Rochtchina E, Sue CM, Wang JJ, Mitchell P, Hoh J, Francis PJ, Klein ML, Chew EY, Chakravarti A (2009) Mitochondrial DNA variants of respiratory complex I that uniquely characterize haplogroup T2 are associated with increased risk of age-related macular degeneration. *PLoS One* 4:e5508.

Sarks SH, Arnold JJ, Killingsworth MC, Sarks JP (1999) Early drusen formation in the normal and aging eye and their relation to age related maculopathy: a clinicopathological study. *Br J Ophthalmol* 83:358-368.

Sathyanarayan A, Mashek MT, Mashek DG (2017) ATGL Promotes Autophagy/Lipophagy via SIRT1 to Control Hepatic Lipid Droplet Catabolism. *Cell Rep* 19:1-9.

Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 9:671-675.

Sedlak TW, Oltvai ZN, Yang E, Wang K, Boise LH, Thompson CB, Korsmeyer SJ (1995) Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:7834-7838.

Seigel GM (2014) Review: R28 retinal precursor cells: the first 20 years. *Mol Vis* 20:301-306.

Sharma R, Bose D, Maminishkis A, Bharti K (2020) Retinal Pigment Epithelium Replacement Therapy for AgeRelated Macular Degeneration: Are We There Yet? *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 60:553-572.

Sharma R et al. (2019) Clinical-grade stem cell-derived retinal pigment epithelium patch rescues retinal degeneration in rodents and pigs. *Sci Transl Med* 11.

Simon JD, Hong L, Peles DN (2008) Insights into melanosomes and melanin from some interesting spatial and temporal properties. *J Phys Chem B* 112:13201-13217.

Simón MV, De Genaro P, Abrahan CE, de los Santos B, Rotstein NP, Politi LE (2012) Müller glial cells induce stem cell properties in retinal progenitors in vitro and promote their further differentiation into photoreceptors. *J Neurosci Res* 90:407-421.

Smith EN, D'Antonio-Chronowska A, Greenwald WW, Borja V, Aguiar LR, Pogue R, Matsui H, Benaglio P, Borooah S, D'Antonio M, Ayyagari R, Frazer KA (2019) Human iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium: A Model System for Prioritizing and Functionally Characterizing Causal Variants at AMD Risk Loci. *Stem Cell Reports* 12:1342-1353.

Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J (1993) Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1526-1530.

Stratikos E, Alberdi E, Gettins PG, Becerra SP (1996) Recombinant human pigment epithelium-derived factor (PEDF): characterization of PEDF overexpressed and secreted by eukaryotic cells. *Protein Sci* 5:2575-2582.

Strauss O (2005) The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85:845-881.

Subramanian P, Notario PM, Becerra SP (2010) Pigment epithelium-derived factor receptor (PEDF-R): a plasma membrane-linked phospholipase with PEDF binding affinity. *Adv Exp Med Biol* 664:29-37.

Subramanian P, Locatelli-Hoops S, Kenealey J, DesJardin J, Notari L, Becerra SP (2013) Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents retinal cell death via PEDF Receptor (PEDF-R): identification of a functional ligand binding site. *J Biol Chem* 288:23928-23942.

Sugasawa K, Deguchi J, Okami T, Yamamoto A, Omori K, Uyama M, Tashiro Y (1994) Immunocytochemical analyses of distributions of Na, K-ATPase and GLUT1, insulin and transferrin receptors in the developing retinal pigment epithelial cells. *Cell Struct Funct* 19:21-28.

Sugita S, Mandai M, Kamao H, Takahashi M (2021) Immunological aspects of RPE cell transplantation. *Prog Retin Eye Res* 84:100950.

Takagi S, Mandai M, Gocho K, Hiramami Y, Yamamoto M, Fujihara M, Sugita S, Kurimoto Y, Takahashi M (2019) Evaluation of Transplanted Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina* 3:850-859.

Takahashi K, Yamanaka S (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126:663-676.

Tan ML, Choong PF, Dass CR (2010) Anti-chondrosarcoma effects of PEDF mediated via molecules important to apoptosis, cell cycling, adhesion and invasion. *Biochem Biophys Res Commun* 398:613-618.

Taubitz T, Tschulakow AV, Tikhonovich M, Illing B, Fang Y, Biesemeier A, Julien-Schraermeyer S, Schraermeyer U (2018) Ultrastructural alterations in the retinal pigment epithelium and photoreceptors of a Stargardt patient and three Stargardt mouse models: indication for the central role of RPE melanin in oxidative stress. *PeerJ* 6:e5215.

Tian SW, Ren Y, Pei JZ, Ren BC, He Y (2017) Pigment epithelium-derived factor protects retinal ganglion cells from hypoxia-induced apoptosis by preventing mitochondrial dysfunction. *Int J Ophthalmol* 10:1046-1054.

Tonade D, Kern TS (2021) Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res* 83:100919.

Trost A, Bruckner D, Rivera FJ, Reitsamer HA (2019) Pericytes in the Retina. *Adv Exp Med Biol* 1122:1-26.

Tsao YP, Ho TC, Chen SL, Cheng HC (2006) Pigment epithelium-derived factor inhibits oxidative stress-induced cell death by activation of extracellular signal-regulated kinases in cultured retinal pigment epithelial cells. *Life Sci* 79:545-550.

Turner DL, Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 328:131-136.

Unterlauff JD, Eichler W, Kuhne K, Yang XM, Yafai Y, Wiedemann P, Reichenbach A, Claudepierre T (2012) Pigment epithelium-derived factor released by Müller glial cells exerts neuroprotective effects on retinal ganglion cells. *Neurochem Res* 37:1524-1533.

Unterlauff JD, Claudepierre T, Schmidt M, Müller K, Yafai Y, Wiedemann P, Reichenbach A, Eichler W (2014) Enhanced survival of retinal ganglion cells is mediated by Müller glial cell-derived PEDF. *Exp Eye Res* 127:206214.

Valiente-Soriano FJ, Di Pierdomenico J, García-Ayuso D, Ortín-Martínez A, Miralles de Imperial-Ollero JA, Gallego-Ortega A, Jiménez-López M, Villegas-Pérez MP, Becerra SP, Vidal-Sanz M (2020) Pigment Epithelium-Derived Factor (PEDF) Fragments Prevent Mouse Cone Photoreceptor Cell Loss Induced by Focal Phototoxicity In Vivo. *Int J Mol Sci* 21.

Verbakel SK, van Huet RAC, Boon CJF, den Hollander AI, Collin RWJ, Klaver CCW, Hoyng CB, Roepman R, Klevering BJ (2018) Non-syndromic retinitis pigmentosa. *Prog Retin Eye Res* 66:157-186.

Vigneswara V, Berry M, Logan A, Ahmed Z (2013) Pigment epithelium-derived factor is retinal ganglion cell neuroprotective and axogenic after optic nerve crush injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 54:2624-2633.

Volonté YA, Vallese-Maurizi H, Dibo MJ, Ayala-Peña VB, Garelli A, Zanetti SR, Turpaud A, Craft CM, Rotstein NP, Politi LE, German OL (2019) A Defective Crosstalk Between Neurons and Müller Glial Cells in the. *Front Cell Neurosci* 13:334.

Volpert KN, Tombran-Tink J, Barnstable C, Layer PG (2009) PEDF and GDNF are key regulators of photoreceptor development and retinal neurogenesis in reagggregates from chick embryonic retina. *J Ocul Biol Dis Infor* 2:1-11.

von Bartheld CS (1998) Neurotrophins in the developing and regenerating visual system. *Histol Histopathol* 13:437-459.

Vugler A, Carr AJ, Lawrence J, Chen LL, Burrell K, Wright A, Lundh P, Semo M, Ahmado A, Gias C, da Cruz L, Moore H, Andrews P, Walsh J, Coffey P (2008) Elucidating the phenomenon of HESC-derived RPE: anatomy of cell genesis, expansion and retinal transplantation. *Exp Neurol* 214:347-361.

Wang X, Liu X, Ren Y, Liu Y, Han S, Zhao J, Gou X, He Y (2019) PEDF protects human retinal pigment epithelial cells against oxidative stress via upregulation of UCP2 expression. *Mol Med Rep* 19:59-74.

Wang Y, Subramanian P, Shen D, Tuo J, Becerra SP, Chan CC (2013) Pigment epithelium-derived factor reduces apoptosis and pro-inflammatory cytokine gene expression in a murine model of focal retinal degeneration. *ASN Neuro* 5:e00126.

Watanabe T, Raff MC (1992) Diffusible rod-promoting signals in the developing rat retina. *Development* 114:899906.

Wen R, Tao W, Li Y, Sieving PA (2012) CNTF and retina. *Prog Retin Eye Res* 31:136-151.

Williams DS, Fisher SK (1987) Prevention of rod disk shedding by detachment from the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 28:184-187.

Winokur PN, Subramanian P, Bullock JL, Arocas V, Becerra SP (2017) Comparison of two neurotrophic serpins reveals a small fragment with cell survival activity. *Mol Vis* 23:372-384.

Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO (2003) Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res* 22:1-29.

Wolff JR, Missler M (1993) Synaptic remodelling and elimination as integral processes of synaptogenesis. *APMIS Suppl* 40:9-23.

Wong FS, Wong CC, Chan BP, Lo AC (2016) Sustained Delivery of Bioactive GDNF from Collagen and AlginateBased Cell-Encapsulating Gel Promoted Photoreceptor Survival in an Inherited Retinal Degeneration Model. *PLoS One* 11:e0159342.

Ye Q, Wang J, Liu X, Liu Z, BaZong L, Ma J, Shen R, Ye W, Zhang W, Wang D (2022) The Role of RAD6B and PEDF in Retinal Degeneration. *Neuroscience* 480:19-31.

Young RW (1984) Cell death during differentiation of the retina in the mouse. *J Comp Neurol* 229:362-373.

- Young RW, Bok D (1969) Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42:392-403.
- Zhang M, Mo X, Fang Y, Guo W, Wu J, Zhang S, Huang Q (2009) Rescue of photoreceptors by BDNF gene transfer using in vivo electroporation in the RCS rat of retinitis pigmentosa. *Curr Eye Res* 34:791-799.
- Zhang T, Guan M, Xu C, Chen Y, Lu Y (2007) Pigment epithelium-derived factor inhibits glioma cell growth in vitro and in vivo. *Life Sci* 81:1256-1263.
- Zhao S, Barnstable CJ (1996) Differential effects of bFGF on development of the rat retina. *Brain Res* 723:169176.
- Zhong X, Gutierrez C, Xue T, Hampton C, Vergara MN, Cao LH, Peters A, Park TS, Zambidis ET, Meyer JS, Gamm DM, Yau KW, Canto-Soler MV (2014) Generation of three-dimensional retinal tissue with functional photoreceptors from human iPSCs. *Nat Commun* 5:4047.
- Zhu D, Xie M, Gademann F, Cao J, Wang P, Guo Y, Zhang L, Su T, Zhang J, Chen J (2020) Protective effects of human iPS-derived retinal pigmented epithelial cells on retinal degenerative disease. *Stem Cell Res Ther* 11:98.
- Zhu X, Craft CM (2000) Modulation of CRX transactivation activity by phosducin isoforms. *Mol Cell Biol* 20:52165226.
- Zimmermann R, Strauss JG, Haemmerle G, Schoiswohl G, Birner-Gruenberger R, Riederer M, Lass A, Neuberger G, Eisenhaber F, Hermetter A, Zechner R (2004) Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. *Science* 306:1383-1386.
- Zong WX, Edelstein LC, Chen C, Bash J, Gélinas C (1999) The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev* 13:382-387.

Apéndice

Tabla 1: Secuencias de los péptidos utilizados

Nombre del péptido	Secuencia de aminoácidos, del terminal COOH al terminal NH ₂
P1	TSIQFNLRNLYRLSKALFPPEPLVLREMCKQGYRDGLRFL
34-mer	FFVVPVNKLAAVSNFGYDLYRVRSSMSPTTN
44-mer	VLLSPLSVATALSALS LGADQRTEsiiHRALYYDLISSPDIHGT
17-mer	QRTEsiiHRALYYDLIS

Tabla 2: Materiales utilizados

Preparación del medio de cultivo neuronal		
Nombre	Fabricante	Número de catálogo
Medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM)	Thermo Fisher Scientific	31600034
Insulina	Sigma	I4011
Hidrocortisona	Sigma	H0888
Putrescina	Sigma	P5780
Apotransferrina	Sigma	T1147
CDP-Etanolamina	Sigma	C0256
Progesterona	Sigma	P8783
Gentamicina	Thermo Fisher Scientific	15750060
Agua destilada	Thermo Fisher Scientific	15230147
Penicilina-Estreptomicina	Thermo Fisher Scientific	15140122
CDP-Colina	Sigma	90756

Disección retinal		
Nombre	Fabricante	Número de catálogo
Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)	Thermo Fisher Scientific	14170112
Tripsina	Thermo Fisher Scientific	15090046
Poli-Ornitina	Sigma	P3655
Inhibidor de tripsina	Sigma	T6522
Portaobjetos de 4 cámaras	Thermo Fisher Scientific	154526
Placas de 96 pocillos	Thermo Fisher Scientific	07-200-90
Cápsulas de cultivo (35 mm)	Greiner Bio-One	627160
Cápsulas de cultivo (60 mm)	Greiner Bio-One	628160
Tripsina-EDTA	Thermo Fisher Scientific	25200-056

Inhibidores		
Nombre	Fabricante	Número de catálogo
Atglistatin	Sigma	SML1075

Cultivo de RN22		
Nombre	Fabricante	Número de catálogo
Línea celular RN22	Sigma	93011414
Suero Fetal Bovino	Thermo Fisher Scientific	1614089
Medio Dulbecco modificado por Eagle (DMEM)	Thermo Fisher Scientific	31600034
Tripsina-EDTA	Thermo Fisher Scientific	25200-056
Frasco de cultivo T25	Corning	430639
Frasco de cultivo T75	Corning	430641

Detección de PEDF		
Nombre	Fabricante	Número de catálogo
Kit de detección de PEDF por ELISA	XPressBio	PED613

Inmunocitoquímica		
Nombre	Fabricante	Número de catálogo
Paraformaldehído	Sigma	P6148
Formalina 10%	Sigma	HT501128
Triton X-100	Sigma	T8787
Wheat Germ Agglutinin (WGA) conjugada a Alexa 555	Thermo Fisher Scientific	W32464
DAPI	Sigma	D9542
Hoechst 3342	Sigma	H3570
TO-PRO-3	Sigma	T3506

Ensayos celulares		
Nombre	Fabricante	Número de catálogo
Kit Anexina-V/Mitotracker	Thermo Fisher Scientific	V35116
Kit de Citotoxicidad LDH	Thermo Fisher Scientific	88953
Kit de TUNEL APO-BrdU™	Thermo Fisher Scientific	A23210
Ioduro de Propidio	Sigma	P4170
Kit de TUNEL ApopTag®	Sigma	S7110
Kit de Mitotracker Red CMXRos	Sigma	M7512

Western Blotting		
Nombre	Fabricante	Número de catálogo

Kit de cuantificación de proteína (BCA)	Thermo Fisher Scientific	23227
Geles NuPAGE 10%	Thermo Fisher Scientific	NP0301
Buffer muestra 4X	Thermo Fisher Scientific	NP0007
Dispositivo de transferencia iBlot2	Thermo Fisher Scientific	IB21001
Buffer de Stripping (ECL)	Thermo Fisher Scientific	46430
Buffer de electroforesis MOPS	Thermo Fisher Scientific	NP0001
Buffer RIPA	Thermo Fisher Scientific	89900
Inhibidor de proteasas y fosfatasas	Thermo Fisher Scientific	78440
Ponceau Red	Sigma	P7170
Anticuerpo secundario conjugado a HRP (Anti-rabbit)	Kindle Biosciences	R1005
Anticuerpo secundario conjugado a HRP (Anti-mouse)	Kindle Biosciences	R1006
Kit de detección por ECL	Kindle Biosciences	R1004
Cámara Kwik-Quant	Kindle Biosciences	D1001
Anticuerpo anti-GAPDH	Genetex	GTX627408
Kit de cuantificación de proteína total	Li-Cor Biosciences	926-11010
Buffer de bloqueo	Li-Cor Biosciences	927-70001
Anticuerpo anti-Bcl2	Abcam	ab59348
Anticuerpo secundario conjugado a IRDye 800 (Anti-rabbit)	Li-Cor Biosciences	926-32211
Buffer de Stripping (Nitrocelulosa)	Li-Cor Biosciences	928-40030

RT-PCR

Nombre	Fabricante	Número de catálogo
RNAeasy Mini Kit	Qiagen	74106
ADNasa	Qiagen	79254
Agua libre de ARNsa	Qiagen	129112
NanoDrop One	Thermo Fisher Scientific	840274200
Kit QuantiTect SYBR Green	Qiagen	204143
Kit RT2 First Strand	Qiagen	330401
RT ² Profiler PCR Array (Rat Apoptosis)	Qiagen	PARN-012Z

Ensayos en Epitelio Pigmentario Retinal (EPR)

Nombre	Fabricante	Número de catálogo
Stanbio B-Hydroxybutyrate Liquicolor kit	EKF Diagnostics USA	244-058
Anticuerpo anti-Rodopsina	Novus Biologicals	NBP2-251159

Tabla 3: Anticuerpos utilizados

Anticuerpo primario	Fabricante	Número de catálogo	Dilución	Anticuerpo secundario	Fabricante	Número de catálogo de
HPC-1	Abcam	ab3265	1/40	Goat antimouse (Cy3)	Invitrogen	115-16-003
CRX	Donado por C. Craft.	-	1/400	Goat anti-rabbit (Alexa 488)	Invitrogen	A11001
PEDF-R (1)	Sigma-Millipore	ABD66	1/100	Goat anti-rabbit (Alexa 555)	Invitrogen	A27039
PEDF-R (2)	Cayman	10006409	1/100	Goat anti-rabbit (Alexa 555)	Invitrogen	A27039
PEDF-R (3)	Protein Tech	55190-1-AP	1/1000	Goat anti-rabbit (Alexa 488)	Invitrogen	A11001
PEDF-R (4)	R&D	AF5365	1/100	Goat antimouse (Alexa 488)	Invitrogen	A28175
Rodopsina 4d2	Sigma-Millipore	MAB5356	1/100	Goat antimouse (Alexa 488)	Invitrogen	A28175
Rodopsina 1d4	Donado por R. Molday	-	1/100	Goat antimouse (Cy2)	Jackson Immunoresearch	115-225-146
TUJ1	Abcam	ab24610	1/300	Goat antimouse (Cy2)	Jackson Immunoresearch	115-225-146
Tubulina acetilada	Abcam	ab18207	1/300	Goat anti-rabbit (Cy3)	Jackson Immunoresearch	115-16-003
Bomba de Na ⁺ /K ⁺	Sigma-Millipore	06-520	1/100	Goat anti-rabbit/mouse (Alexa 555/488)	Invitrogen	A27039/A28175