



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

**Efectos degenerativos inducidos por la
cianotoxina β -N-metilamino-L-alanina
(BMAA) en células de retina**

Tesis Doctoral en Biología
Tamara Belén Soto

BAHIA BLANCA - ARGENTINA 2023

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Olga Lorena German

Investigadora Adjunta - CONICET

Profesora Adjunta – Virología Clínica

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Enrique Politi

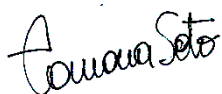
Investigador Principal - CONICET

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

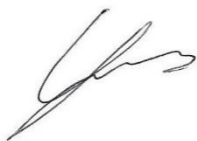
PREFACIO

La versión final digital de tesis presentada se entrega como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctora en Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 14 de noviembre de 2017 y el 7 de julio de 2023, bajo la dirección de la Directora Olga Lorena German y el Co-Director Luis Enrique Politi.

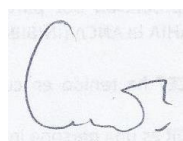


Soto, Tamara Belén

Certificamos que en la versión final digital de tesis presentada fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.



German, Olga Lorena



Politi, Luis Enrique

Marzo – 2023

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

...a mis padres

...a Emilia y a mis hermanas

...a mis amigos

AGRADECIMIENTOS

A mis directores, Lore y Quique por la paciencia de todos estos años. Gracias por todo lo que aprendí, por las oportunidades que me brindaron y por el tiempo que le dedicaron a mi trabajo.

A Nora por su predisposición, sus críticas y sugerencias, tanto en esta Tesis como en el resto de los trabajos realizados durante estos años.

A Bea por haberme enseñado a trabajar en cultivo, por su paciencia y su incondicionalidad.

A los integrantes del Laboratorio de Neurobiología. Los actuales y los anteriores, de una manera u otra todos son parte de este trabajo. Gracias por el día a día.

A Estefi, Meli y Leo por haber colaborado en esta Tesis, por las charlas y lo compartido.

A Edgardito por ser un poco amigo y un poco papá. Siempre al pie con algo rico y una sonrisa.

A Leti, Caro y Horacito por la ayuda en el bioterio. Gracias por hacer más fáciles las cosas.

A las chicas y los chicos del “fulbito”, porque siempre se puede complementar diversión con trabajo.

A la Milstein, porque no es sólo la sala sino los almuerzos con historias lindas (y no tanto), anécdotas y catarsis. Gracias por haber hecho que un almuerzo cambie mi humor.

A Lu, por estar siempre, por ser mi cómplice.

A la “pan-peña” compuesta por Vicky, Yane y Marce, fundada en época de pandemia y solidificada mediante videollamadas. Gracias por los consejos, las cenas y los momentos más que divertidos.

A Quique, porque empezó siendo mi director y terminó siendo mi amigo. Si llegué hasta acá fue gracias a él, que confió en mí desde el principio. Gracias por haberme formado científica y personalmente. Gracias por enseñarme que al final, todo saldrá bien.

Al INIBIBB y a todos sus integrantes, por haberme dado la posibilidad de desarrollar esta Tesis y por la calidez de todos los días.

A la Universidad del Sur, universidad PÚBLICA y GRATUITA, por haberme formado académicamente.

A los organismos que brindaron financiamiento al laboratorio de Neurobiología y que permitieron el desarrollo de este trabajo, la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la Universidad Nacional del Sur (UNS).

A mis amigos de la vida, los de Pringles, Las del gim, Los de Bio, Los de la uni. Gracias porque fueron un sostén fundamental. Los que se alegran de mis triunfos y los que sufren mis tristezas.

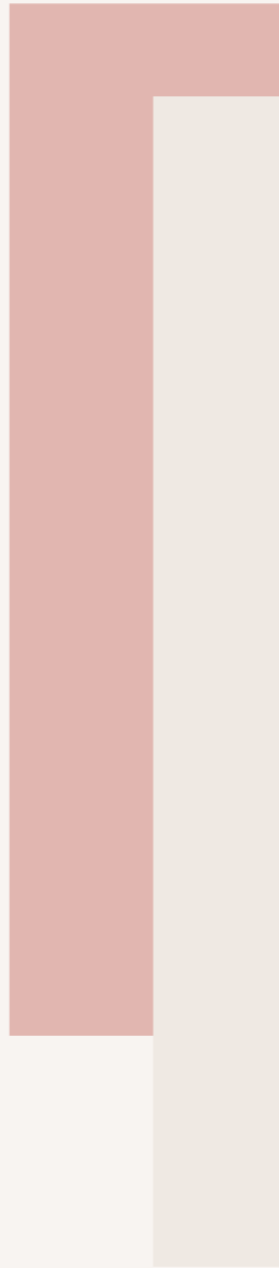
A mis padres por enseñarme a ser libre y que si quiero, puedo. Gracias por darme la libertad de elegir sabiendo que están atrás bancándome.

A mis hermanas, por apoyarme y escucharme.

A Emilia, por enseñarme a disfrutar las pequeñas cosas.

Gracias!!!

RESUMEN



RESUMEN**Candidata:** Tamara Belén Soto**Directora:** Dra. Olga Lorena German**Co-director:** Dr. Luis Enrique Politi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca-Argentina-CONICET

La cianotoxina β -N-metil-amino-L-alanina (BMAA) es un aminoácido no proteico producido por cianobacterias, capaz de biomagnificarse en las cadenas tróficas de ecosistemas marinos y terrestres. Dada su capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica, su ingesta progresiva se asocia con el desarrollo de ciertas retinopatías, así como también de enfermedades neurodegenerativas, tales como la Esclerosis Lateral Amiotrófica (ELA), la Enfermedad de Parkinson (EP) y la Enfermedad de Alzheimer (EA).

Los daños causados por la BMAA son múltiples y originados en mecanismos diversos. Así, la BMAA, en presencia de iones bicarbonato (HCO_3^-), puede formar un compuesto denominado carbamato, cuya estructura química es similar al glutamato (Glut), uno de los neurotransmisores más importantes del sistema nervioso. A su vez, el carbamato se une y activa receptores de Glut, ya sean ionotrópicos (como el receptor de N-metil-D-aspartato) o metabotrópicos. La sobreexcitación de estos receptores ocasionada por la BMAA, promueve mecanismos de excitotoxicidad que conducen a alteraciones neuronales. Por otro lado, la BMAA puede ingresar a las células a través del sistema xc, un sistema de transporte sodio-independiente común para cistina y Glut. Una vez en el interior celular, la toxina puede incorporarse erróneamente en las cadenas polipeptídicas en reemplazo de Serina (Ser). Así, unida a componentes proteicos, puede generar un reservorio endógeno de lenta liberación que expone a las neuronas a una baja pero continua dosis de esta toxina.

Entre sus varios efectos subcelulares, la BMAA puede afectar la permeabilidad de las membranas mitocondriales comprometiendo su actividad. Además, puede inducir modificaciones en los niveles de Ca^{2+} , generar estrés oxidativo, promover fallas en la producción de ATP e inducir estrés en el retículo endoplasmático, lo cual conduce a alteraciones en la síntesis y/o distribución de proteínas. Asociado a esto, se originan alteraciones en el transporte axonal y la fragmentación de estas estructuras.

Pese a su trascendencia para la salud, aún son desconocidos los efectos directos que genera la exposición a la BMAA de las neuronas y células gliales de la retina (como las células gliales de Müller –CGM-), o del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Además, todavía son mayormente desconocidos aquellos factores o moléculas capaces de modular las vías de señalización involucradas en los efectos deletéreos inducidos por la BMAA. Al respecto, recientemente se ha propuesto que la activación de los receptores X retinoides (RXR) protegerían a las neuronas y modularían la respuesta inflamatoria durante las enfermedades neurodegenerativas del sistema nervioso central, y también en retinopatías. Aún se desconoce si estos receptores ejercen un rol protector contra los daños inducidos por la BMAA. En esta Tesis se estudiaron los mecanismos involucrados en los cambios degenerativos inducidos por la BMAA en células de la retina, así como también en células PC12 diferenciadas a neuronas. Asimismo, se evaluó el valor protector de agonistas de los RXRs frente a los efectos deletéreos inducidos por la BMAA en células de la retina.

Para estos estudios, se obtuvieron cultivos puros de neuronas amacrinas y fotorreceptores (FRs), de CGM puros, y cultivos neuro-gliales a partir de retinas de ratas neonatas. Además, se utilizaron cultivos de líneas celulares PC12 y epiteliales ARPE-19. Todos los cuales fueron tratados con la BMAA para evaluar sus efectos sobre estas células y el posible rol protector de los RXRs.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que aún bajas concentraciones de la BMAA (de 0,4 μM) alteraron la viabilidad no sólo de las neuronas amacrinas y FRs, sino también de las células PC12 diferenciadas a neuronas, de las CGM e incluso de las células del EPR.

La BMAA también, indujo alteraciones en la permeabilidad mitocondrial y en la producción de ROS en las células neuronales, gliales y epiteliales, mientras que en las CGM indujo cambios en la morfología nuclear. Por su parte, en neuronas amacrinas, promovió el crecimiento axonal, aunque generando el colapso de sus conos de crecimiento.

Estas alteraciones fueron mediadas por la activación de los receptores NMDA en presencia de iones HCO_3^- . Además, en estas células, la BMAA se incorporaría erróneamente en las cadenas polipeptídicas en reemplazo de la Ser, dado que la suplementación del medio de cultivo con este aminoácido previno la toxicidad inducida por la BMAA.

En cuanto a la acción protectora de los RXRs, nuestros resultados demostraron que su activación bloqueó los efectos tóxicos que produjo la BMAA sobre las neuronas amacrinias y los FRs, así como también sobre las células del EPR.

En resumen, en esta Tesis presentamos evidencias de que la BMAA afecta múltiples estructuras subcelulares en las células que conforman la retina, así como también a células PC12 diferenciadas.

Estos resultados sugieren que los daños inducidos por la BMAA representan un potencial riesgo para la salud, y podrían contribuir al desarrollo de retinopatías, así como de varias enfermedades neurodegenerativas. Además, este trabajo indicaría que la activación de los RXRs puede presentar un papel protector al ejercer un rol relevante en la supervivencia de las neuronas amacrinias y FRs, así como también de las células del EPR.

En su conjunto, estos hallazgos aportan nuevos conocimientos en relación a los mecanismos deletéreos inducidos por la BMAA y podrían ser de utilidad para el desarrollo de futuras estrategias terapéuticas.

SUMMARY**Ph. D. candidate:** Tamara Belén Soto**Director:** Olga Lorena German, PhD**Co-director:** Luis Enrique Politi, PhD

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, Argentina, UNS-CONICET

The cyanotoxin β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) is a non-proteinogenic amino acid produced by cyanobacteria. It is biomagnified along the food chains in both, marine and terrestrial ecosystems. Due to its ability to cross the brain blood barrier, its ingestion may contribute to the onset of retinopathies, as well as neurodegenerative diseases, like Amyotrophic Lateral Sclerosis, Parkinson (PD) and Alzheimer disease (AD).

Damages induced by BMAA are multiple and originated by different mechanisms. In the presence of bicarbonate ions (HCO_3^-), BMAA can produce carbamate, whose chemical structure is similar to that of glutamate (Glut), one of the most important neurotransmitters in the nervous system. In turn, carbamate can bind and activate both ionotropic (like N-Methyl-D-aspartate -NMDA-) and metabotropic Glut receptors. Overactivation of these receptors by BMAA promotes excitotoxicity, which leads to nuclear alterations. On the other hand, BMAA crosses the cell membranes by using the cystine/glutamate antiporter (xc^- system), a sodium-independent amino acid transporter. Once inside the cells, the toxin can mistakenly replace the amino acid Serine (Ser) in polypeptide chains, thus generating an endogenous reservoir of BMAA, whose slow-release exposes neurons to a low, but continuous amount of this toxin.

Among its various subcellular effects, BMAA can alter mitochondrial membrane permeability compromising mitochondrial activity. Besides, it can alter Ca^{2+} levels, generate oxidative stress, promote failures in the ATP production and induce endoplasmic reticulum (RE) stress, leading to alterations in the protein synthesis and/or distribution. In this context, BMAA promotes alterations in axonal transport along with fragmentation of these-structures.

Despite its importance to health, the direct effects of BMAA exposure on retinal neurons and glial cells (such as Müller glial cells –CGM-), or retinal pigment epithelium (RPE) cells, are virtually unknown and the factors or molecules, which could modulate the signaling pathways involved in the deleterious effects induced by BMAA have not been

established. In this regard, it has recently been proposed that the activation of Retinoid X Receptors (RXR) can protect neurons and modulate the inflammatory responses during neurodegenerative diseases of the central nervous system, including retinopathies. However, the possible protective roles of RXRs in BMAA-induced damages are still unknown. In this Thesis, we have studied the mechanisms involved in the degenerative changes induced by BMAA into retinal cells, and in neuron-like, differentiated rat pheochromocytoma cells (PC12 cells), as well. We also evaluated the protection of RXR agonists against the deleterious effects of BMAA in retinal cells.

For these purposes, we obtained pure neuronal cultures of amacrine neurons and photoreceptors (PHRs); pure MGC cultures, and mixed neuro-glial cultures from newborn rats. In addition, we used PC12 cells and ARPE-19 epithelial cell lines. We treated them with BMAA to evaluate its effects on these cells and the possible protective roles of RXRs.

Our results showed that low concentrations of BMAA (0.4 μM) altered, not only the viability of amacrine neurons and PHRs, but also that of neuronally differentiated PC12 cells, MGC and even that of the RPE cells.

Also, the cyanotoxin induced alterations in mitochondrial membrane permeability and in ROS production, while in MGC, BMAA induced changes in the nuclear morphology. On the other hand, in amacrine neurons, this toxin promoted axonal growth, although simultaneously generating the collapse of their growth cones.

We established that all these alterations were induced by activation of NMDA receptors in the presence of HCO_3^- ions. Besides, in all these cell types, BMAA appeared to incorporate into polypeptide chains replacing Ser, since supplementation of the culture media with this amino acid prevented toxicity damages.

Regarding the protective roles of RXRs, our results showed that their activation blocked the toxic effects induced by BMAA in amacrine neurons, PHRs, and RPE cells.

In summary, in this Thesis we present evidences that BMAA affected multiple subcellular structures in retina cells and in PC12 cells differentiated into neurons.

These results suggest that the damaging effects induced by BMAA represent a potential health risk, which could contribute to the development of retinopathies, along with other neurodegenerative diseases. In addition, this work would indicate that RXR activation can promote survival of amacrine PHRs and RPE cells.

Taken together, these findings provide new knowledge regarding the deleterious mechanisms induced by BMAA, which could be useful for the development of future effective therapies.

ÍNDICE

PREFACIO	3
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
RESUMEN.....	8
SUMMARY	11
ÍNDICE	14
ABREVIATURAS	17
La cianotoxina BMAA como causante de enfermedades neurodegenerativas	19
INTRODUCCIÓN.....	19
Mecanismos de acción de la BMAA.....	23
Descripción de los Receptores X retinoides.....	31
Mecanismos de toxicidad de la BMAA en la retina	33
Hipótesis y objetivos	36
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
Materiales empleados.....	38
Cultivos de retina.....	38
Obtención de cultivos neuronales.....	39
Obtención de cultivos gliales puros	40
Obtención de cultivos mixtos neuro-gliales	40
Cultivos de Células de Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR) de la línea celular ARPE-19.....	41
Diferenciación de células PC12 en neuronas	41
Tratamiento con BMAA y determinación de las curvas “concentración-respuesta” para los distintos tipos celulares	42
Tratamiento con el antagonista del receptor NMDA, MK-801	43
Tratamiento con Ser.....	43
Incubación con HEPES	43
Tratamiento con el agonista del receptor RXR, HX630	43
Técnicas inmunocitoquímicas	45
Evaluación de la viabilidad celular, determinación de la fragmentación nuclear y del potencial de membrana mitocondrial	46
Análisis de liberación de ROS.....	48
Análisis de la integridad de los microtúbulos	48
Análisis de la organización del citoesqueleto de actina	48
Microscopía	48

Western Blot.....	49
1-Extracción de proteínas	49
2-Separación electroforética de las proteínas:	49
3-Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF:.....	49
4-Inmunomarcación y revelado:.....	49
Citometría de flujo	50
Análisis estadístico.....	50
RESULTADOS	52
Efectos de la BMAA sobre cultivos neuronales	53
La BMAA indujo fragmentación nuclear y muerte neuronal	54
La BMAA promovió la pérdida del potencial de membrana mitocondrial	55
El bloqueo de los receptores NMDA, protegió a las neuronas amacrinas de la muerte inducida por la BMAA.....	57
La activación de los receptores de Glut por la BMAA en neuronas amacrinas requirió de la presencia de iones bicarbonato	59
La BMAA promovió el crecimiento axonal en neuronas amacrinas	60
La BMAA indujo la desorganización de los conos axonales en neuronas amacrinas	62
El crecimiento axonal generado por la BMAA dependió de la activación de los receptores NMDA	63
La pre-incubación con Ser protegió a las neuronas de la toxicidad inducida por la BMAA	64
La activación de los RXRs protegió a las neuronas de la muerte inducida por la toxina	65
La pre-incubación con el agonista HX630 previno la disminución del potencial de membrana mitocondrial neuronal	66
El agonista de los RXRs, el HX630, previno la apoptosis y el estrés oxidativo promovidos por la BMAA.....	68
Efectos de la BMAA sobre células PC12 diferenciadas	71
La BMAA promovió la muerte de células PC12.....	72
La BMAA indujo el crecimiento de prolongaciones similares a axones en células PC12.....	72
La BMAA no alteró el ciclo celular de las células PC12 diferenciadas	74
Efectos de la BMAA sobre cultivos mixtos neuro-gliales	76
La BMAA indujo daños sobre las CGM e impidió su acción protectora sobre las células neuronales.....	77
La BMAA indujo la retracción de los lamelipodios de las CGM	78
La BMAA promovió el crecimiento de axones en cultivos mixtos neuro-gliales.....	79
Efectos de la BMAA sobre cultivos gliales.....	81

La BMAA indujo alteraciones nucleares en cultivos de CGM a largo plazo	82
La BMAA no afectó la viabilidad celular de las CGM	84
La BMAA no modificó el ciclo celular de las CGM	84
La BMAA alteró la actividad metabólica de las CGM en cultivos desarrollados a corto plazo	86
La BMAA disminuyó el potencial de membrana mitocondrial en las CGM obtenidas en cultivos a corto plazo	86
La BMAA incrementó la producción de ROS en las CGM	87
La BMAA alteró el citoesqueleto de actina en cultivos puros de CGM	89
Efectos de la BMAA sobre las células de la línea celular ARPE-19	90
La BMAA indujo la muerte de células del EPR	91
La BMAA alteró la actividad metabólica de las células del EPR	91
La BMAA promovió la producción de ROS en las células del EPR	92
La activación de los RXRs protegió a las células del EPR de la toxicidad inducida por la BMAA	93
El estrés oxidativo inducido por la BMAA en las células del EPR, disminuyó en presencia del agonista HX630	95
DISCUSIÓN	97
CONCLUSIONES	109
BIBLIOGRAFÍA	111

ABREVIATURAS

BBB: *Blood brain barrier* (Barrera hematoencefálica)

BRB: *Brain Retina Barrier* (Barrera hematoretiniana)

BMAA: β -N-metil-amino-L-alanina

CDP/ELA: Complejo Parkinson-Demencia/Esclerosis Lateral Amiotrófica

CGM: Células gliales de Müller

CRALBP: *Cellular retinaldehyde binding* (proteína de unión a retinaldehídos celulares)

DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole (4'-6-diamino-2-fenilindol)

DCDCDHF: 5(6)-carboxy-2'7'- Diclorofluoresceína diacetato

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Medio Eagle modificado por Dulbecco)

DMSO: *Dimethyl sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)

EA: Enfermedad de Alzheimer

EAATs: Transportadores de aminoácidos excitatorios

EH: Enfermedad de Huntington

ELA: Esclerosis Lateral Amiotrófica

EP: Enfermedad de Parkinson

EPR: Epitelio pigmentario de la retina

RE: Retículo endoplásmico

FR/s: Fotorreceptor/es

GAPDH: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

GFAP: *Glial Fibrillary Acidic Protein* (Proteína fibrilar acídica de la glía)

Glut: Glutamato

GluR: Receptores de Glutamato

HCO₃⁻: iones bicarbonato

HPC-1: Anticuerpo anti-sintaxina

IP: Ioduro de Propidio

mGluR: Receptores metabotrópicos de Glutamato

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

NMDA: N-Metil-D-aspartato

PC12: *Pheochromocytoma cells* (Células de feocromocitoma)

PF: *Paraformaldehyde* (Paraformaldehído)

Rho4D2: Anticuerpo anti-rodopsina

ROS: *Reactive Oxygen Species* (Especies reactivas de oxígeno)

RPE65: Anticuerpo para la proteína de 65ka específica del EPR

RXR: *Retinoid X Receptor* (Receptor X Retinoideos)

SEM: Error estándar de la media

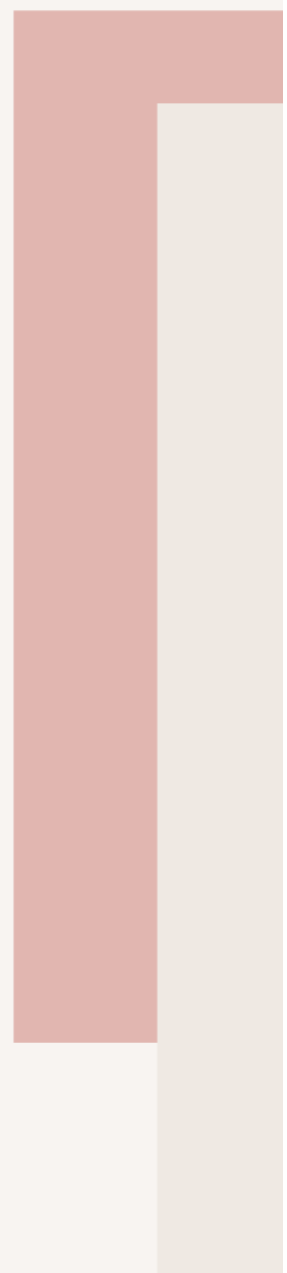
Ser: Serina

SFB: Suero Fetal Bovino

Tuj-1: Anticuerpo anti- β 3 tubulina

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

INTRODUCCIÓN



La cianotoxina BMAA como causante de enfermedades neurodegenerativas

Los procesos de urbanización, así como también el aumento en la actividad industrial, agrícola y ganadera, generan un fuerte impacto sobre la contaminación atmosférica e hídrica, e inciden directamente sobre la salud humana y animal. Al respecto, se ha reportado que la exposición a ciertos factores ambientales contaminantes puede conducir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas (Giannuzzi y col., 2011; Lara y col., 2011).

En particular, en los ecosistemas acuáticos las actividades rurales generan una marcada acumulación de nutrientes, causando la eutrofización de los mismos y alterando las redes tróficas, más precisamente en la base de las cadenas tróficas. La combinación de estos procesos junto con las altas temperaturas, promueven el crecimiento descontrolado de algas y de bacterias fotoautótrofas, denominadas cianobacterias. Asimismo, el aumento en la biomasa de cianobacterias genera floraciones o *blooms*, que pueden observarse a simple vista como películas oleosas en la superficie, o bien originarse en las profundidades (Giannuzzi y col., 2011). En nuestro país se ha informado la existencia de estas floraciones en cuerpos de agua como el embalse San Roque o el Dique Paso de Las Piedras. A nivel mundial, se han reportado en Canadá, Australia y Estados Unidos, entre otros (Amé y col., 2003; Cox y col., 2005; Degano y Rodríguez, 2016; Haque y col., 2017; Jang y col., 2003; Paerl y Otten, 2013; Wood, 2016).

Las cianobacterias, antiguamente conocidas como algas verde-azules, pueden encontrarse en agua dulce o salada, en ambientes terrestres, o como endosimbiontes de plantas o animales (Gademann y Portmann, 2008; Paerl y Otten, 2013). Entre las especies más conocidas se destacan las pertenecientes a los géneros: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Lyngbya*, *Nodularia*, *Oscillatoria*, *Trichodesmium*, *Microcystis* y *Planktothrix* (Cox y col., 2005; Giannuzzi y col., 2011). Además de alterar las propiedades organolépticas del agua, la gravedad de su presencia recae sobre su capacidad de producir metabolitos tóxicos, denominados cianotoxinas (Gademann y Portmann, 2008; Haque y col., 2017), que se liberan al medio cuando las cianobacterias se lisan o mueren. Éstas se clasifican en base a su estructura química (péptidos, alcaloides y lipopolisacáridos cíclicos -LPS-), o bien, según los daños que generan sobre el cuerpo humano (hepatotoxinas, neurotoxinas y dermatotoxinas). Es común que una especie produzca más de un tipo de toxinas y que las concentraciones de éstas varíen según la magnitud de la floración (Cox y col., 2003a, 2005; Giannuzzi y col., 2011; Haque y col., 2017; Jang y col., 2003; Wood, 2016). La exposición a estas toxinas sucede por consumo directo, contacto dérmico o bien, por inhalación de gases. Como

consecuencia, se pueden desarrollar tumores, enfermedades neurodegenerativas, problemas respiratorios o fallas en el hígado, incluso la muerte.

Entre las cianotoxinas más conocidas se encuentran las microcistinas, anatoxinas y saxitoxinas. Las microcistinas son producidas por una amplia variedad de cianobacterias. Son heptapéptidos cíclicos, hepatotoxinas asociadas a graves daños hepáticos, aunque también pueden afectar otros órganos (Gademann y Portmann, 2008; Giannuzzi y col., 2011). Por su parte, las anatoxinas son alcaloides estructuralmente similares a la acetilcolina. Se caracterizan por activar receptores colinérgicos y mantenerlos activados por tiempo indeterminado. Asimismo, dentro del grupo de los alcaloides también se encuentran las saxitoxinas, que actúan sobre canales de sodio bloqueando la transmisión de los impulsos nerviosos. Las anatoxinas y las saxitoxinas se consideran neurotoxinas, ya que afectan el sistema nervioso. Alteran diferentes vías nerviosas generando parálisis y fallas respiratorias que pueden culminar en la muerte (Gademann y Portmann, 2008; Giannuzzi y col., 2011).

La β -metil-amino-L-alanina (BMAA) es una neurotoxina que recientemente ha tomado relevancia debido a su relación con el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas. Es un aminoácido no proteico y no polar (Banack y col., 2006; Cox y col., 2003a, 2005; Murch y col., 2004), con la capacidad de *biomagnificarse*, de modo que su concentración se incrementa a medida que se avanza en la cadena trófica (Fig. 1) (Banack y col., 2006; Cox y col., 2003a, 2005; Murch y col., 2004; Chernoff y col., 2017; Cox y col., 2003b). Se acumula en diferentes animales como peces, mejillones, y ostras, e incluso en el cuerpo humano (Chernoff y col., 2017; Lance y col., 2018; Main y col., 2016). Luego de ingresar al organismo, la estructura aminoacídica de la BMAA le permite atravesar la barrera hematoencefálica (BBB, por sus siglas en inglés *blood-brain barrier*) y alcanzar el sistema nervioso. Una vez allí, la exposición continua a esta toxina de las neuronas, aún a dosis bajas, conduce a su deterioro estructural y funcional (Chernoff y col., 2017; Smith y col., 1992).

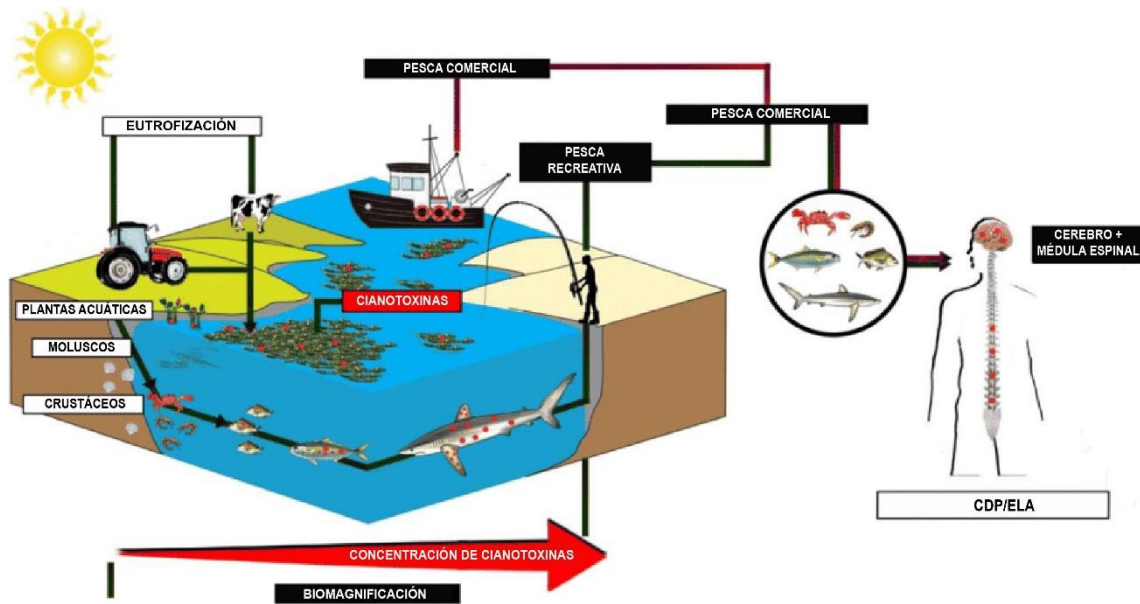


Figura 1. Procesos de biomagnificación de las cianotoxinas. Las actividades agrícolas conducen a procesos de eutrofización, incrementando los niveles de nutrientes de los reservorios acuáticos. Como consecuencia, aumentan las poblaciones de cianobacterias capaces de producir cianotoxinas. Algunas de ellas, en particular la BMAA, puede biomagnificarse luego de ingresar en las cadenas tróficas. Imagen modificada de Dunlop y Guillemin, 2019.

Uno de los casos más estudiados de neurotoxicidad inducida por la BMAA fue en la población de Chamorro, en la Isla Guam. Sus habitantes presentaban una patología atípica denominada complejo Parkinson-Demencia/Esclerosis Lateral Amiotrófica (CDP/ELA) (Banack y col., 2006; P. A. Cox y col., 2003b; T. A. Cox y col., 1989; Murch y col., 2004; Shen y col., 2005). Ante la ausencia de patrones hereditarios asociados a este complejo, se analizaron las características ambientales y culturales de esta población. Se demostró que consumían murciélagos, animales que se alimentaban de los frutos de las plantas de cícada (*Cycas micronesica*), que a su vez presenta como endosimbionte a un grupo de cianobacterias del género *Nostoc* (P. A. Cox y col., 2003b; Lance y col., 2018; Metcalf y col., 2017). Las mismas son productoras de BMAA que se acumula en las raíces de cícadas, que también eran fuente de alimento de los nativos de Guam (Shen y col., 2005). Por lo tanto, no sólo el consumo directo de murciélagos sino de cícadas en sus diversas formas, eran fuentes usuales de exposición a la cianotoxina. Notablemente, la misma relación entre el desarrollo de esta patología y el consumo de cícadas se observó en poblaciones pertenecientes a Nueva Guinea y Japón (Afanasiev y col., 2016; Chernoff y col., 2017).

Una característica distintiva de las afecciones derivadas de la exposición a la BMAA es el desarrollo de retinopatías (Abdulla y Campbell, 1993; Chernoff y col., 2017).

Llamativamente, al analizar los cerebros de pacientes que sufrieron estas patologías, se encontraron diferentes concentraciones de BMAA. En su conjunto, estos hechos sugieren que esta cianotoxina induce modificaciones que conducen lenta y progresivamente, a la muerte de las células neuronales, de manera similar a lo que sucede en las enfermedades neurodegenerativas.

Las retinopatías originadas por la BMAA presentan características comunes y similares a otras enfermedades neurodegenerativas tales como el complejo CDP/ELA, la Enfermedad de Alzheimer (EA), Parkinson (EP), demencia y ELA (Murch y col., 2004). Todas ellas, sin embargo, se diferencian según el tipo de neuronas y las áreas afectadas, lo cual produce síntomas y evoluciones diferentes. Algunas de éstas, como EP o Huntington (EH), pueden ser de origen hereditario, mientras que otras como ELA, también pueden ser consecuencia de la exposición a diferentes factores ambientales, tales como metales, pesticidas y toxinas.

Estas enfermedades afectan áreas diversas del sistema nervioso central (SNC), incluida la retina. Ésta es una estructura clave en el proceso de recibir y procesar la información visual antes de enviarla al cerebro para su interpretación. La retina presenta una estructura organizada, conformada por células neuronales (ganglionares, horizontales, amacrinas, bipolares y fotorreceptoras -FRs-), gliales (células gliales de Müller -CGM-, astrocitos y microglía), epiteliales (pertenecientes al epitelio pigmentario de la retina -EPR-) y endoteliales.

Durante el desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas es frecuente observar la acumulación de proteínas como la Tau en la región intra-retinal en pacientes con ELA, en EA, o de la α -sinucleína en EP (de Vos y col., 2008; Soldatov y col., 2021). Éstas conducen al mal funcionamiento celular, y a un aumento de los marcadores de estrés oxidativo y de procesos de neuroinflamación, que finalmente desencadenan la muerte neuronal. Asimismo, las alteraciones observadas en las enfermedades neurodegenerativas en diferentes regiones del cerebro, también pueden hallarse en la retina (Liao y col., 2021; Rojas y col., 2020; Soldatov y col., 2021; Torriglia y col., 2016).

Mecanismos de acción de la BMAA

Como se señalara previamente, las alteraciones observadas en las enfermedades neurodegenerativas pueden originarse por la exposición a toxinas presentes en el ambiente. En particular la BMAA, como veremos, conduce a procesos degenerativos complejos.

La BMAA puede actuar a través de diferentes mecanismos celulares. La vía más estudiada y frecuente, es la de la activación de transportadores *de aminoácidos excitatorios (EAAT)*, entre los cuales, se encuentran los receptores de glutamato (Glut) (Albano y Lobner, 2018; Chiu y col., 2013; Tan, Mazzocco, y col., 2018). En condiciones fisiológicas, estos receptores regulan la entrada de Ca^{2+} en las células; sin embargo, su sobre-activación en diferentes situaciones patológicas genera una despolarización neuronal continua que conduce a la muerte celular.

Además, esta cianotoxina en presencia de iones bicarbonato (HCO_3^-) en concentraciones fisiológicas, genera un compuesto denominado carbamato, un aducto similar al Glut (Fig. 2) (Myers y Nelson, 1990; Nunn y O'Brien, 1989). El carbamato se genera a través de un proceso de carbamilación, cuando una amina no cargada interactúa con CO_2 o con HCO_3^- formando ácido carbámico (NH_2COOH) (Diaz-parga y col., 2018). Las semejanzas estructurales entre el Glut y el carbamato formado a partir de la BMAA se deben principalmente a su grupo carboxílico secundario, característica necesaria para la activación de GluR (Diaz-parga y col., 2018). El HCO_3^- es un buffer modulador de la concentración de bases y ácidos en solución; actúa manteniendo los niveles fisiológicos del pH, regulando la formación de H_2O y CO_2 a partir de H_2CO_3 por acción de la enzima anhidrasa carbónica. Debido al desbalance en la formación de ácidos y bases, se genera un ambiente propicio para la formación de carbamato. La BMAA presenta grupos α y β -amino; dependiendo de dónde se genere la reacción, se forma α o β -carbamato, lo cual está determinado por el pH del medio (Diaz-parga y col., 2018). Según Weiss y colaboradores, la concentración fisiológica de HCO_3^- es de aproximadamente 10 mM, superior a la de BMAA (Weiss y col., 1989). Por lo tanto, es posible que la cantidad de toxina libre en sangre sea pequeña. Esto sugiere que, en su mayoría se encuentra formando carbamato (Weiss y col., 1989).

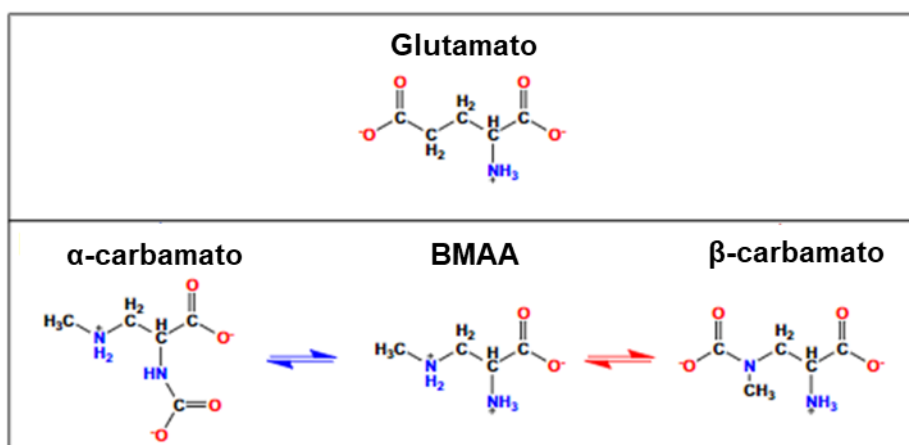


Figura 2. Estructura química de la BMAA y su similitud con el Glut. α y β -carbamato son el resultado del proceso de carbamitación entre la BMAA y iones HCO_3^- (Díaz-parga y col., 2018).

Por su parte, los receptores de Glut pueden ser ionotrópicos o metabotrópicos (mGluR). Dentro de los ionotrópicos, se encuentra el *receptor N-metil-D-aspartato (NMDA)*, de importancia en los procesos de memoria y aprendizaje, así como en los de muerte neuronal. Está formado por tres subunidades NR1-3. Una vez activado, permite la entrada de cationes (principalmente de Ca^{2+}). En condiciones de sobre-activación, puede conducir a diferentes procesos de excitotoxicidad (Lau y Tymianski, 2010).

Por su parte los *receptores AMPA*, están formados por una combinación de cuatro subunidades (GluR1-4) (Lau y Tymianski, 2010). Se localizan en neuronas motoras y colinérgicas, dos poblaciones sensibles a la muerte inducida por la BMAA (Albano y Lobner, 2018). Asociado a éstos, se encuentran los *receptores de kainato*, que comparten propiedades similares (Lau y Tymianski, 2010).

Los receptores metabotrópicos (mGluR) presentan siete subunidades transmembrana y están asociados a proteínas G a nivel intracelular. Existen ocho tipos diferentes (mGluR1-8), divididos según su homología en tres grupos (I, II y III) (Lau y Tymianski, 2010). Cucchiaroni y colaboradores demostraron que la BMAA actúa sobre el grupo de mGluRI en neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra*, a su vez involucradas en el desarrollo de EP. Como consecuencia de la activación de los receptores ionotrópicos, se acumula Ca^{2+} intracelular y se liberan especies reactivas de oxígeno (ROS). Estos efectos pueden bloquearse en presencia de sus antagonistas (Cucchiaroni y col., 2010).

Como se mencionara previamente, existen diferentes procesos neurodegenerativos directamente relacionados con mecanismos de excitotoxicidad por activación de los receptores de Glut (Fig. 4) (Lau y Tymianski, 2010). Estos efectos deletéreos pueden ser revertidos utilizando antagonistas específicos. Así, la activación de receptores NMDA por la BMAA puede ser bloqueada utilizando un antagonista denominado MK-801 (Albano y Lobner, 2018; Liu y col., 2009; Lobner y col., 2007). Se ha demostrado que las retinas de ratones tratados con la BMAA pueden sufrir apoptosis y alteraciones fisiológicas, que pueden ser prevenidas al pretratar con el antagonista MK-801 (Santucci y col., 2009). Por su parte, un antagonista del receptor mGluR5, el 6-metil-2-feniletinil-piridina (MPEP), protege a las células neuronales del estrés oxidativo (Lobner y col., 2007).

Otra vía por la cual actúa la BMAA es a través del sistema xc^- (Fig. 4), un sistema de transporte sodio-independiente común para cistina y Glut. La entrada de cistina depende de la concentración intracelular de Glut; la BMAA podría competir con la cistina y

disminuir su absorción (Albano y Lobner, 2018; Lewerenz y col., 2013; Liu y col., 2013). Este mecanismo ha sido investigado en trabajos donde se ha observado la activación de este sistema en modelos de ELA y EA (Albano y col., 2013; Albano y Lobner, 2018; Mesci y col., 2015).

Por otra parte, estudios en diferentes tipos celulares han demostrado que una vez en el interior celular, la BMAA se incorpora erróneamente en las proteínas en el lugar de Serina (Ser) (Fig. 3) (Albano y Lobner, 2018; Dunlop y col., 2013). Este proceso se desencadena durante la transcripción del código genético a proteínas, cuando la maquinaria “confunde” ambos aminoácidos. Como consecuencia, se genera un daño irreversible que conduce a un plegamiento anómalo de proteínas (Fig. 3). La acumulación de proteínas mal plegadas produce anomalías como cuerpos de Bunina, inclusiones en los cuerpos de Lewis, tauopatías, placas seniles y ovillos neurofibrilares, entre otros (Fig. 4) (Cox y col., 2018; Dunlop y col., 2013). Estudios en neonatos demostraron que tiempo después de administrar la toxina, ya no está libre en el medio, sino incorporada en su mayoría en proteínas, creando así un reservorio del que, eventualmente, se libera para ser reincorporada nuevamente en otras proteínas (Karlsson y col., 2014). Para revertir estos mecanismos se suele administrar Ser que compite con la BMAA. Así, se impide la formación de proteínas anómalas, evitando también que las neuronas sean afectadas (Davis y col., 2020; Main y col., 2016).

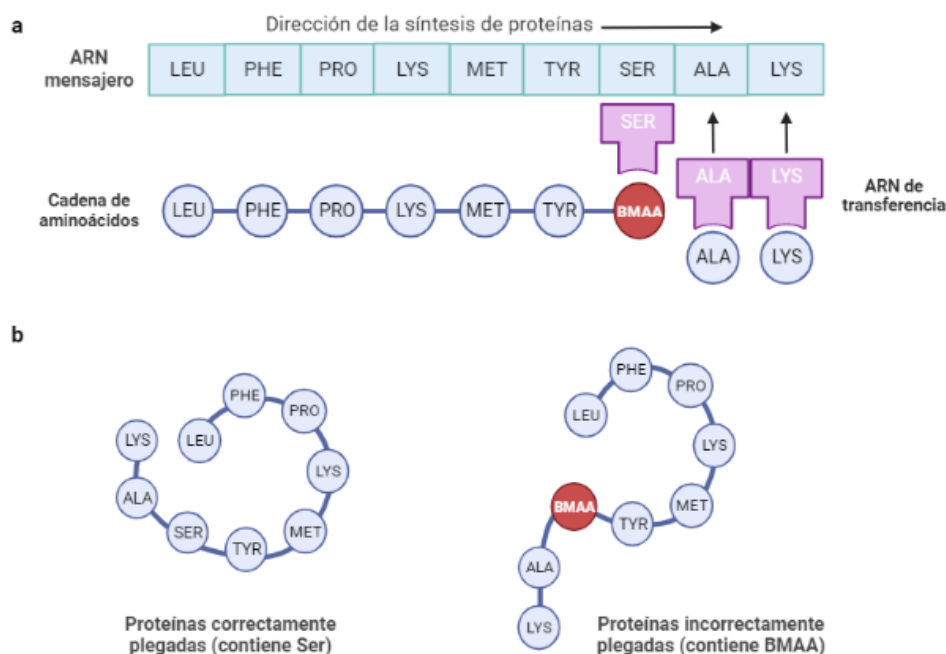


Figura 3. Reemplazo de BMAA por Ser en las cadenas polipeptídicas y mal plegamiento de proteínas. a- Durante la síntesis de proteínas, la BMAA se incorpora en la cadena de aminoácidos reemplazando a la Ser. b- Obsérvese a la izquierda el plegamiento correcto de la proteína que contiene Ser en su cadena aminoacídica; a la derecha, el plegamiento incorrecto

luego de la incorporación de BMAA en la cadena aminoacídica. Imagen modificada de Rodgers y Dunlop, 2011.

Tal como se indicara previamente, es fundamental la capacidad de la BMAA para atravesar la BBB, almacenarse en el cerebro y generar daños, lo cual es posible mediante las principales vías de transporte de aminoácidos: el sistema x_c^- y los EAATs (Albano y Lobner, 2018; Chernoff y col., 2017). En el endotelio capilar existen transportadores para aminoácidos en diferentes estados: neutros, ácidos y básicos. La toxina puede encontrarse como zwitterión, catión y β -carbamato. Como resultado, puede presentar afinidad por más de un transportador, facilitando aún más su transporte (Smith y col., 1992). Al respecto, es de destacar que al igual que lo ocurrido con la BMAA, las alteraciones en la BBB ocurren en muchas enfermedades neurodegenerativas (Kakaroubas y col., 2019).

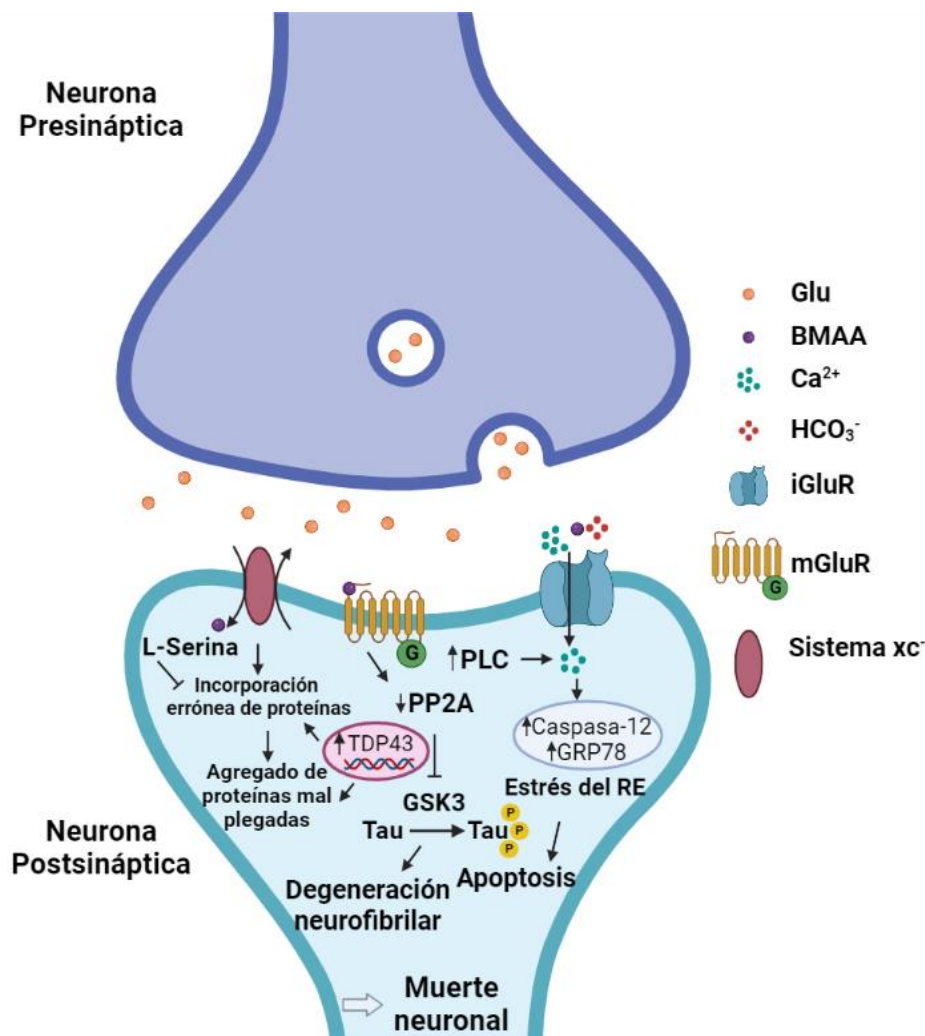


Figura 4. Mecanismos de degeneración neuronal inducidos por la BMAA. De acuerdo a su conformación, tanto el Glu como la BMAA pueden unirse a receptores ionotrópicos (iGluR) y metabotrópicos (mGluR) para activarlos. Así, se incrementan las concentraciones de Ca^{2+} en el interior celular, lo cual promueve estrés sobre el RE y apoptosis. En paralelo, la inhibición de

PP2A induce la hiperfosforilación de Tau, que conduce a la degeneración neurofibrilar. Otro de los mecanismos de ingreso de la BMAA es mediante el sistema xc-. Una vez en el citoplasma, la toxina se incorpora en las proteínas generando el agregado de proteínas mal plegadas que conduce a la muerte celular.

GRP78: proteína reguladora de glucosa 78; GSK-3: quinasa glucógeno 3-sintasa; iGluR: receptores ionotrópicos de Glut; mGluR: receptores metabotrópicos de Glut; PLC: fosfolipasa C; PP2A: proteína fosfatasa 2A; TDP-43: proteína de unión al ADN TAR 43. Imagen modificada de Delcourt y col., 2018.

La estructura química de la BMAA, similar al Glut, la posiciona en la base de las patologías neurodegenerativas. El Glut es un neurotransmisor que participa en diferentes procesos de supervivencia y comunicación neuronal. La presencia de un elevado número de GluRs hace a las neuronas notablemente sensibles al incremento en la concentración de Glut. A su vez, la estimulación de los mGluRs presentes en las células gliales puede contribuir a su proliferación o al desarrollo de gliosis reactiva. Las células gliales (ya sean astrocitos en el SNC, o CGM en la retina) son las encargadas de remover el exceso de Glut que resulte nocivo para las neuronas. Sin embargo, se ha observado que la disminución en los transportadores de Glut gliales y la elevada concentración de Glut extracelular, generan un ambiente excitotóxico para las neuronas (Rojas y col., 2020; Soldatov y col., 2021). De manera similar, cuando la BMAA actúa sobre los receptores NMDA se desencadenan mecanismos de excitotoxicidad, al incrementar los niveles de Ca^{2+} en el interior celular (Fig. 5). Posteriormente, estos cambios generan fallas en la comunicación sináptica al modificar la liberación de neurotransmisores (Chiu y col., 2012, 2013).

La BMAA también altera las funciones mitocondriales, necesarias para la producción de ATP, la homeostasis del Ca^{2+} , el metabolismo de neurotransmisores, la producción de ROS, y, por ende, para la regulación de la muerte y la supervivencia neuronal. Por ello, la dinámica mitocondrial es uno de los mecanismos más estudiados en los procesos neurodegenerativos (Cowan y col., 2019; Lin y Luo, 2019). Las alteraciones mitocondriales, aumentan la producción de radicales libres y el estrés oxidativo (Fig. 5). Si bien las ROS son moléculas que se liberan como parte de los procesos metabólicos normales, un aumento en su liberación, como sucede por acción de la BMAA, puede generar estrés mitocondrial. Como consecuencia se libera superóxido (O_2^-) o peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Estos compuestos actúan sobre moléculas lipídicas, proteicas y otras asociadas al ADN, afectando la viabilidad celular (Albano y Lobner, 2018; Chiu y col., 2012; Liu y col., 2013; Okle y col., 2013; Silva y col., 2020). Además de acentuar la liberación de ROS, los déficits mitocondriales podrían generar daños en el ADN, cuya

reparación requiere de grandes cantidades de ATP. Estos tres procesos en conjunto: alteraciones en los niveles de Ca^{2+} , liberación de ROS y fallas en la producción de ATP, generan cambios en la permeabilidad de las membranas mitocondriales con la consiguiente pérdida del potencial de membrana (Chiu y col., 2013). Además, en respuesta a los procesos inflamatorios, las mitocondrias participan en la inducción de apoptosis (Cowan y col., 2019). Debido a sus altos requerimientos energéticos, las neuronas son una población altamente sensible a estos daños. Tal es el caso de las neuronas que conforman la retina, las cuales presentan un elevado número de mitocondrias. Asimismo, cambios sobre éstas pueden conducir a defectos en la visión (Rojas y col., 2020; Soldatov y col., 2021).

Como se mencionara previamente, otra característica de las enfermedades neurodegenerativas es la presencia de inclusiones proteicas (Fig. 5), como resultado de alteraciones en su síntesis o en su transporte. Por un lado, situaciones de estrés en el RE conducen a un desbalance en la síntesis de proteínas generando agregados, plegamientos anómalos y acumulaciones de las mismas en el lumen del RE. De esta manera, se desencadena la respuesta a proteínas mal plegadas o UPR (por sus siglas en inglés *unfolded protein response*), que puede culminar en apoptosis (Gaballah y col., 2016). Estudios *in vitro* han demostrado que la BMAA induce la expresión de marcadores de estrés, como el factor de transcripción CHOP (Main y col., 2016; Okle y col., 2013). También se activa la UPR, al fosforilar a las proteínas de la familia MAPK (ERK, JNK y p38), que desencadenan la vía apoptótica (Shen y col., 2016). La apoptosis es un tipo de muerte celular programada, una de cuyas características fundamentales es la activación de la vía de las caspasas. Éstas son proteínas aspartato específicas y dependientes de cisteínas. Al respecto, se ha reportado que la BMAA promueve el aumento de proteínas pro-apoptóticas como Bax (Shen y col., 2016) y caspasas, induciendo también su clivaje (Chiu y col., 2012; Main y col., 2016; Okle y col., 2013; Staton y Bristow, 1997).

Por otro lado, se ha relacionado a la BMAA con alteraciones en el transporte axonal. Este proceso es el encargado de enviar proteínas y organelas que se encuentran en el cuerpo celular hacia los pies sinápticos. Fallas en el mismo conducen a la acumulación y formación de depósitos anómalos de diferentes moléculas. Sorprendentemente, estos agregados endógenos fueron encontrados en cerebros de pacientes que presentaban el complejo CDP/ELA en la isla de Chamorro, posterior al consumo de BMAA (Abdulla y Campbell, 1993; Chernoff y col., 2017). A su vez, los axones pueden fragmentarse como consecuencia de la toxicidad inducida por la BMAA, lo cual en un principio genera

daños en el transporte neuronal, que finalmente culmina en la muerte celular (Ma y col., 2013; Tan, Lassus, y col., 2018). En este contexto, la BMAA induce un mecanismo de degeneración similar a la Walleriana, un proceso que se inicia cuando la entrada de Ca^{2+} activa a las calpaínas, proteasas responsables de la proteólisis de los neurofilamentos (Tan, Lassus, y col., 2018).

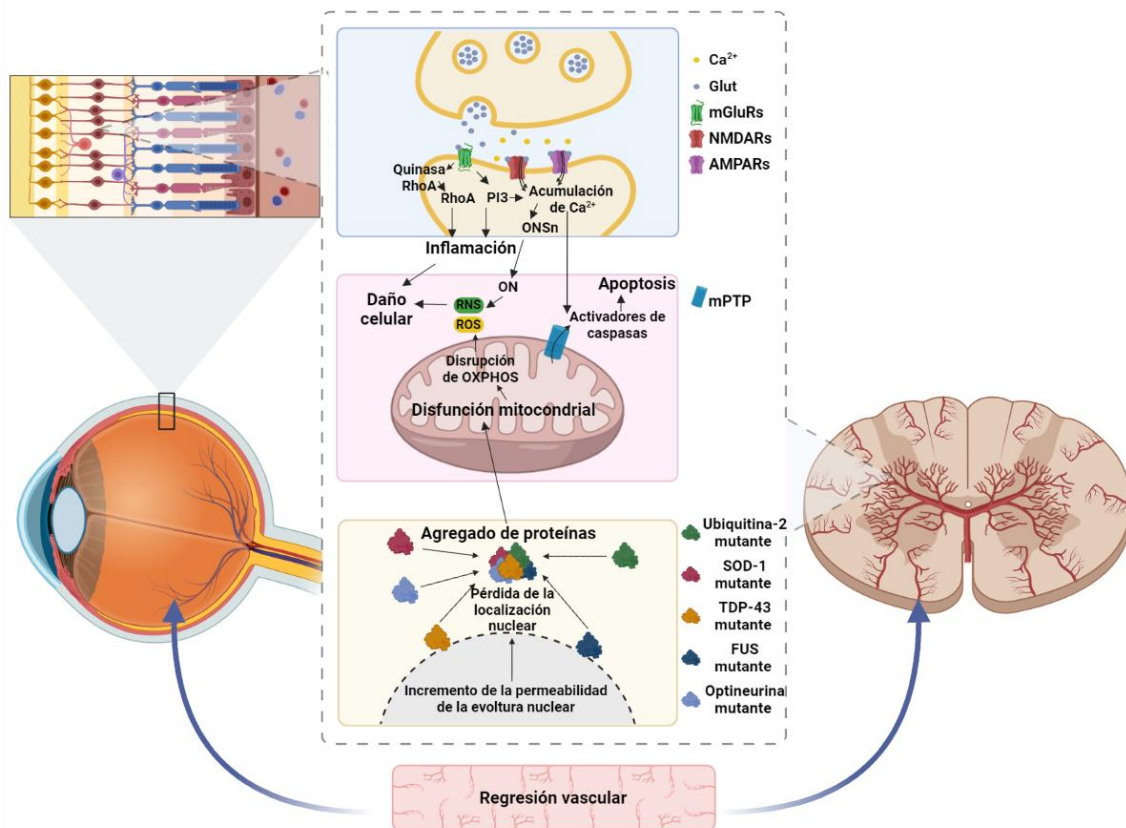


Figura 5. Vías involucradas en el desarrollo de retinopatías y ELA. La liberación de Glut conduce a la activación de los receptores NMDA, AMPA y mGluR. Luego de esta activación, se abren los canales de Ca^{2+} , aumentando su flujo, lo cual genera la apertura de los poros de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). Como consecuencia, la mitocondria se hincha y colapsa liberando los activadores de caspasas que promueven la apoptosis dependiente de éstas. Por otra parte, la activación de los receptores NMDA induce la generación de óxido nítrico (ON) por la óxido nítrico sintasa neuronal (ONSn), que induce la producción de especies reactivas de Nitrógeno (RNS) y Oxígeno (ROS). Además, a través de los mGluRs se activa RhoA y PI3, que estimulan los procesos de inflamación y de daños celulares. El desarrollo de ELA está asociado a mutaciones en SOD-1, Ubiquilina-2 y Optineurina, causando agregados de proteína que conducen a la disfunción mitocondrial. Por otro lado, la disfunción mitocondrial conduce a la ruptura del proceso de fosforilación oxidativa (OXPHOS), estimulando también, la producción de ROS. El mismo fenómeno ocurre con las proteínas FUS y TDP-43, que pierden la localización nuclear con el incremento de la permeabilidad. Además, estos procesos pueden ser agravados por la regresión vascular. Imagen modificada de Soldatov y col., 2021.

Cabe resaltar que la BMAA no sólo induce sus efectos deletéreos directamente sobre las células neuronales, sino también, de manera indirecta al promover la disfunción de astrocitos y microglía. Como consecuencia, se altera el funcionamiento de neuronas motoras, importantes en el desarrollo de ELA. Sorprendentemente, se ha observado que la BMAA puede ser incorporada por estos tipos celulares causando alteraciones mitocondriales, disrupción en la homeostasis del Ca^{2+} , aumento en la liberación de ROS y disminución en la proliferación celular (D'Mello y col., 2017; Chiu y col., 2013; Liu y col., 2013; Tan, Lassus, y col., 2018).

De lo expuesto se evidencia que la participación de estos mecanismos en la inducción de daños en la retina por la BMAA, aún no están completamente establecidos. Por ello, en esta Tesis se evaluaron los mecanismos neurodegenerativos que induce la BMAA tanto sobre neuronas amacrinas y FRs, así como también en CGM y células del EPR.

Descripción de los Receptores X retinoides

Un enfoque terapéutico para el tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas es el de lograr la disminución de la muerte o disfuncionalidad de las células afectadas. Esto podría llevarse a cabo utilizando factores tróficos o bien regulando las vías de señalización involucradas. Dentro de éstas, se pueden mencionar las que incluyen a los receptores nucleares. En los últimos años se ha comenzado a explorar el rol de los mismos en enfermedades neurodegenerativas del SNC, en particular el de los receptores X retinoides (RXR), ya que poseen efectos pleiotrópicos que podrían promover directa o indirectamente la supervivencia neuronal.

Los RXRs son receptores nucleares, miembros de la familia de receptores esteroides/tiroides. En mamíferos, existen tres isoformas: α , β y γ , compartiendo un alto porcentaje de homología en su secuencia con los receptores murinos. Al igual que el resto de los receptores nucleares, tienen la capacidad de actuar como factores de transcripción. Se encargan de regular la expresión de diferentes genes involucrados en la proliferación celular y homeostasis. Asimismo, son importantes durante el desarrollo embrionario, en la diferenciación de progenitores neuronales y en la neurogénesis. Pueden también estar asociados a diferentes patologías (Sharma y col., 2022). Estos receptores se activan luego de la formación de homodímeros y homotetrámeros. Frecuentemente suelen formar heterodímeros con otros receptores nucleares, como los receptores de activación de los proliferadores de los peroxisomas (PPARs) o los receptores hepáticos X (LXRs) (Mariani y col., 2017; Sharma y col., 2022). Esta conformación puede ser “permisiva”, cuando se activan a partir de la unión con un

ligando de cualquiera de los dos receptores. De lo contrario, pueden generarse de manera “no permisiva”, como sucede con receptores del ácido retinoico (RAR) o de la hormona tiroidea (TR), cuando se unen ligandos de estos últimos (Ayala-Peña y col., 2016; Sharma y col., 2022). A su vez, los ligandos pueden ser endógenos o exógenos. Dentro de los primeros se pueden mencionar el ácido retinoico (AR) y ácidos grasos libres como el ácido docosahexanoico (DHA) o el ácido eicopentanoico (EPA). Los exógenos pueden ser naturales, muchos de ellos derivados de plantas medicinales como el honokiol, magnolol o drupanina, o pueden ser sintéticos, como el bexaroteno, PA024 o HX630 (Dawson y Xia, 2012). Esto abre múltiples posibilidades terapéuticas: mediante el uso de ligandos se pueden regular diferentes mecanismos alterados en enfermedades neurodegenerativas e incluso en diferentes tipos de cáncer (Ayala-Peña y col., 2016; German y col., 2006; Sharma y col., 2022; Volonté y col., 2021).

En su manera inactiva, los receptores se mantienen unidos a proteínas correpressoras. Éstas reclutan enzimas con actividad histona desacetilasa, incrementándose así la afinidad de las histonas por el ADN y reprimiéndose la transcripción de genes diana. Para liberarse de las proteínas correpressoras, los RXRs deben unirse al ligando, que recluta proteínas coactivadoras, con actividad histona acetiltransferasa. De manera contraria a las anteriores, debilitan la asociación de las histonas al ADN y facilitan la transcripción de genes diana. Una vez activados, los RXRs son parte del metabolismo de diferentes moléculas y de procesos importantes para la supervivencia celular. Suelen reducir los efectos del estrés del RE o modular la UPR, disminuir la liberación de ROS y, consecuentemente, el estrés mitocondrial. Además, regulan la expresión de genes que actúan como moduladores de la neuroinflamación. Incluso, pueden inducir gliosis activa como respuesta protectora (Mariani y col., 2017; Sharma y col., 2022).

Estos mecanismos son importantes en el desarrollo de diferentes patologías e incluso en el estudio de tratamientos para las mismas. En enfermedades como EA y EP, la activación de los RXRs evita que las neuronas sufran apoptosis y procesos neuroinflamatorios (Friling y col., 2009; Mariani y col., 2017). También disminuye la inflamación y promueve la eliminación del péptido β -amiloide por las células microgliales *in vivo* (Cramer y col., 2012). En casos de esclerosis múltiple, promueven la actividad de oligodendrocitos y evitan la desmielinización, causa fundamental en el desarrollo de esta enfermedad (Mariani y col., 2017; Sharma y col., 2022). Asimismo, el AR posee un efecto anti-inflamatorio sobre la microglía. Por su parte, la combinación de 9-cis AR y agonistas de otros receptores nucleares, como los PPAR, inhibe la expresión de citoquinas pro-inflamatorias.

Como se mencionó previamente, en el desarrollo de enfermedades de la retina, ciertos mecanismos neurodegenerativos pueden conducir a la pérdida de la visión. En el desarrollo de glaucoma, los daños sobre células ganglionares son revertidos luego de la activación de los RXRs con ligandos sintéticos, como el bexaroteno (Dheer y col., 2019). Por otro lado, en nuestro laboratorio se ha demostrado que el DHA promueve la supervivencia de FRs frente al daño oxidativo, y que agonistas sintéticos de los RXRs mimetizan dicho efecto (German y col., 2013). Asimismo, en el modelo murino *rd1*, de retinitis pigmentaria, el tratamiento *in vitro* con el agonista de los RXRs, el PA024, disminuye tanto la muerte por apoptosis de los FRs como la reactividad de las CGM (Volonté y col., 2021). También se demostró que la activación de los RXRs en presencia del agonista HX630 protege a las células del EPR de la apoptosis inducida por estrés oxidativo (Ayala-Peña y col., 2016).

Teniendo en cuenta la importancia de estos receptores en la regulación de la expresión génica y de procesos involucrados en la degeneración celular, varios de sus ligandos sintéticos han sido fuente de estudio en pacientes que presentaron diversas patologías neurodegenerativas (Sharma y col., 2022). De todo ello, se desprende la importancia de su estudio en la prevención de los daños inducidos por la BMAA.

Mecanismos de toxicidad de la BMAA en la retina

En su conjunto, los antecedentes descritos previamente muestran una serie de procesos degenerativos inducidos por la BMAA sobre el SNC. Sin embargo, los daños que esta toxina induce en el sistema visual son complejos, poco explorados y mayoritariamente desconocidos.

En particular, la retina de los vertebrados presenta una estructura conservada y una disposición organizada de sus componentes. Es la única porción del SNC que puede ser visible a simple vista. Su estructura sencilla, su ubicación accesible y su manipulación fácil, permiten el estudio de procesos que suceden en otros sectores del SNC, incluyendo, el desarrollo neuronal, la apoptosis, y los procesos de neurotransmisión (Ames y Nesbett, 1981; Cepko, 2014; Just y Pintor, 2009; Masland, 2001).

Tal como se observa en la figura 6, las neuronas de la retina se disponen en capas donde se ubican los núcleos celulares: las capas nucleares interna (CNI) y externa (CNE), y la capa de células ganglionares. A su vez, en las capas plexiformes interna (CPI) y externa (CPE) se realizan las interacciones sinápticas. Los tipos neuronales que conforman la retina son los siguientes:

Células ganglionares: contactan con las células bipolares, y sus axones forman parte del nervio óptico.

Células amacrinas: Tienen como función principal integrar, modular y dirigir las señales de la retina. Sus principales contactos se dan entre estas mismas células, así como con bipolares y/o ganglionares. Reciben señales de diferentes neurotransmisores, e incluso pueden presentar actividad inhibitoria. Son muy variadas morfológica y funcionalmente.

Células bipolares: envían la información emitida desde los FRs hacia las células ganglionares.

Células horizontales: de diversa morfología, son consideradas células de asociación ya que realizan contactos con diferentes tipos neuronales, incluso dentro de una misma capa.

Neuronas fotorreceptoras (FRs): son células fototransductoras que transforman las señales lumínicas en químicas o eléctricas, que luego transmiten hacia las células bipolares. Los FRs pueden ser *bastones* o *conos*. Los bastones son importantes para la visión en condiciones de baja luminosidad u oscuridad. Contienen a la rodopsina como pigmento visual, que se ubica en discos membranosos en los segmentos externos. Por otro lado, los conos contienen como pigmento a la opsina. Estas células se encargan de la percepción del color. Si bien ambos tipos neuronales se encuentran en las retinas maduras de vertebrados, el tipo de visión que se desarrolle depende de la cantidad de conos o bastones que presenten.

En la región más externa de la retina se encuentran las *células del epitelio pigmentario de la retina (EPR)*. Se trata de células epiteliales con pigmentación. Éstas se ubican formando una monocapa, sobre un estrato basal denominado membrana de Bruch que contacta con el endotelio de los capilares. El EPR es fundamental en el desarrollo y la correcta funcionalidad de los FRs. El contacto entre ambos tipos celulares se realiza en la región apical. Las células del EPR tienen la capacidad de secretar diversos factores tróficos importantes para el mantenimiento de las células aledañas. Además, transportan nutrientes, remueven metabolitos y presentan actividad inmune sobre el sistema visual (Strauss, 2005).

Como parte de la citoarquitectura de la retina, también se encuentran las *células gliales*, de diversos tipos y orígenes embrionarios. Entre ellas, las *células gliales de Müller (CGM)* son las más abundantes, y atraviesan todo el ancho de la retina, desde la membrana limitante externa hasta la interna. Presentan un rol importante en el mantenimiento de la homeostasis, angiogénesis, inmunidad y neuroprotección (De Melo

y col., 2008; Bringmann y col., 2006). Además, se encargan de mantener la arquitectura de la retina; liberan factores tróficos importantes para la actividad neuronal y remueven neurotransmisores controlando el balance iónico en el espacio intercelular. Asimismo, son importantes para guiar los rayos de luz en la formación de la imagen (Goldman, 2014). Más recientemente, se las ha descrito como células madre potencialmente capaces de regenerar la retina (Reh y Fischer, 2006; Volonté y col., 2019). También se encuentran las células de la *microglía*, responsables de la fagocitosis en todas las capas de la retina (Chen y col., 2009), y los *astrocitos*, encargados de recubrir los vasos sanguíneos en las capas fibrosas y el nervio óptico (Stone y Dreher, 1987; Watanabe y Raff, 1988).

Por último, también forman parte de la retina las *células endoteliales vasculares*, que constituyen los diferentes vasos que nutren a las células en todo su espesor.

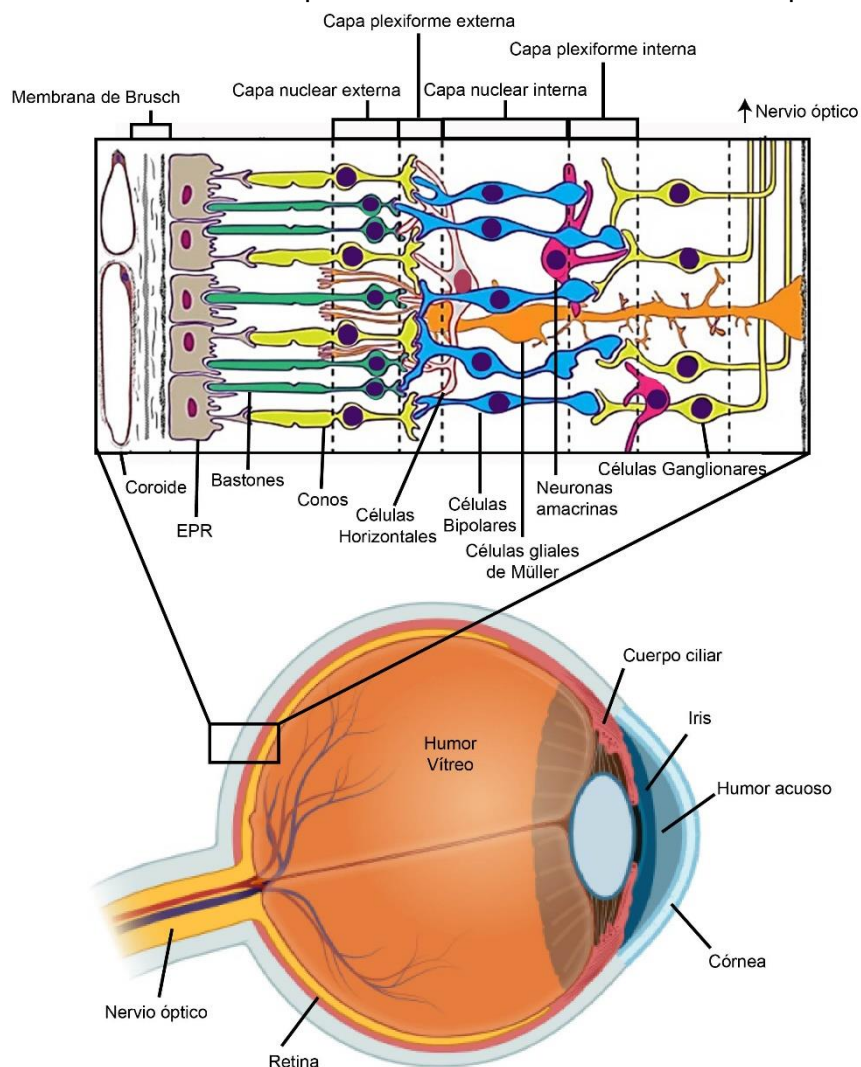


Figura 6. Estructura de la retina. La retina es un tejido complejo formado por diferentes capas de células. En la base se encuentran las células del EPR, que actúan como soporte estructural y funcional de los FRs (conos y bastones), los que se localizan en la capa nuclear externa. La

luz absorbida atraviesa el tejido retinal y llega a los FRs, que convierten la energía lumínica en una señal eléctrica. Las neuronas horizontales, bipolares y amacrinas forman las capas plexiformes externa e interna, y la capa nuclear interna. Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico, que transmite la información al cerebro. Imagen modificada de Nakano y col., 2014 y Silverstein y col., 2020.

Hipótesis y objetivos

Dados los antecedentes expuestos sobre la toxicidad inducida por la BMAA en el SNC, las **hipótesis de trabajo** son que, en la retina:

1. La BMAA:

1.1. Altera la funcionalidad y viabilidad de las neuronas amacrinas y FRs, así como también de aquellas células que funcionan como soporte de las mismas, tales como las CGM y las células del EPR.

1.2. Activa los receptores de Glut luego de que se forme carbamato, y se incorpora erróneamente en proteínas promoviendo el mal plegamiento de las mismas.

2. Los efectos deletéreos inducidos por la BMAA en la retina son prevenidos por la activación de los RXRs.

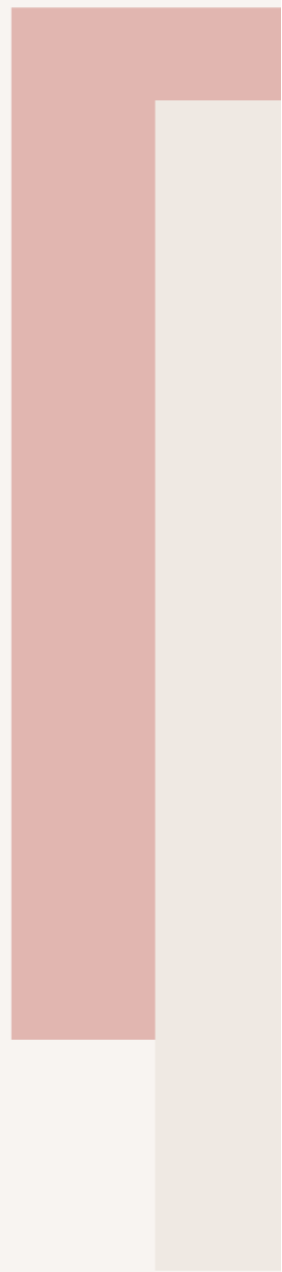
Es por ello que el **objetivo principal** de esta Tesis fue identificar los mecanismos activados por la BMAA al inducir cambios degenerativos en células de la retina.

Como **objetivos específicos** se establecieron:

- 1) Determinar la susceptibilidad a la BMAA de las células de la retina.
- 2) Establecer y caracterizar los procesos degenerativos inducidos por la toxina en los diferentes tipos celulares.
- 3) Investigar las vías de señalización involucradas en dichos procesos.
- 4) Analizar la toxicidad de la BMAA sobre las células PC12 diferenciadas a neuronas
- 5) Evaluar el valor protector de agonistas de los RXRs en los efectos deletéreos inducidos por la BMAA en neuronas amacrinas y FRs, así como también en células del EPR.

Para ello, teniendo en cuenta la complejidad que presentan los estudios de la retina en organismos *in vivo*, debido a las múltiples interacciones entre los diferentes tejidos que dificultan su evaluación, se utilizaron cultivos celulares. Estos sistemas *in vitro* permiten investigar mecanismos en células aisladas, así como también las interacciones entre éstas (Just y Pintor, 2009).

MATERIALES Y MÉTODOS



Materiales empleados

Las cápsulas plásticas para cultivo de 35 y 60 mm de diámetro, junto con los frascos de cultivo de 50 ml y las pipetas graduadas de 2, 5 y 10 ml se obtuvieron de la firma GBO (Greiner Bio-one -Frickenhausen, Alemania-). El suero de caballo se obtuvo de Internegocios S.A. (Argentina), al igual que el suero fetal bovino (SFB), que también se adquirió en Natocor (Córdoba, Argentina). El medio de cultivo Dulbecco modified Eagle's (DME), el buffer Hank's Balanced Salt Solution (HBSS) y la penicilina-estreptomicina fueron de la firma GIBCO, y se compraron en Invitrogen Argentina.

De la empresa Sigma-Aldrich Argentina se adquirieron los siguientes reactivos: L-BMAA hydrochloride, SFB, poli-L-ornitina, tripsina, inhibidor de tripsina, transferrina, hidrocortisona, putrescina, progesterona, insulina, CDPcolina, CDP-etanolamina, gentamicina, (+)-MK-801 hydrogen maleate (M107), las sondas 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) y faloidina TRITC, paraformaldehído (PF), ioduro de propidio (IP), Trypan Blue y los anticuerpos monoclonales anti-HPC-1 y Vimentina.

La colagenasa tipo II (GIBCO) se compró en Invitrogen; y los anticuerpos secundarios conjugados anti-ratón y anti-conejo, Cy2 y Cy3, en Jackson ImmunoResearch (West Grove, PA). El anticuerpo monoclonal anti- β III tubulina (Tuj-1) y el anticuerpo secundario para western blotting anti-ratón conjugado a peroxidasa de rábano picante, fueron adquiridos en Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Los anticuerpos para la proteína de unión al retinaldehído celular (CRALBP) y para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se compraron en GeneTex, Inc. (Irvine, CA, USA); y el anticuerpo para la proteína de 65ka específica del EPR (RPE65) en Novus Biologicals (USA). Las sondas MitoTracker Red (CMXRos), faloidina Alexa Fluor 488 y TOPRO-3 fueron de Molecular Probes, Invitrogen (Carlsbad, CA); y la sonda 5(6)-carboxy-2'7'- Diclorofluoresceína diacetato (DCDCDHF) de Molecular Probes (Eugene, OR, USA) y Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EE.UU.). Las membranas de PVDF "Inmobilon-P" en Millipor Corporation (MA, EE.UU.); y el buffer HEPES se obtuvieron de Calbiochem. El agonista HX630 se compró en la empresa Tocris (Biosystems, Argentina). Por su parte, el anticuerpo monoclonal anti-rodopsina (Rho4D2) fue generosamente donado por el Dr. R. Molday (University of British Columbia, Canada); y el aminoácido Ser de Sigma, por el laboratorio de la Dra. Giusto (INIBIBB-CONICET-UNS).

Cultivos de retina

Los cultivos primarios se realizaron a partir de ratas Albino Wistar establecidas como colonia en el Bioterio del INIBIBB. Las mismas fueron manipuladas de acuerdo a los lineamientos publicados en la "Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio"

de los National Institutes of Health (NIH). La Metodología empleada fue aprobada por el Comité Institucional de Cuidados de Animales de Experimentación (CICUAE), de acuerdo a los protocolos CICUAE-UNS: 058/2015, 059/2015, 060/2015 y 185/2022.

Para evaluar los efectos de la toxina BMAA, realizamos curvas de concentración-respuesta mediante sistemas en cultivo mixtos neuro-gliales y neuronales puros, sin células gliales contaminantes (Insua y col., 2008; Politi y Adler, 1988; Politi y col., 1988, 1996). Además, utilizamos cultivos gliales puros (Hicks y Courtois, 1990a; Simón y col., 2012). Por otro lado, empleamos la línea celular de epitelio pigmentario de la retina ARPE-19, ya utilizada previamente en nuestro laboratorio (Simón y col., 2022; Vera y col., 2021); y la línea celular de feocromocitoma de rata (PC12), diferenciada en neuronas.

Obtención de cultivos neuronales

Para obtener los cultivos neuronales puros, se siguieron métodos desarrollados previamente en nuestro laboratorio (Politi y col., 2001; Politi y col., 2001; Rotstein y col., 1996). Los cultivos fueron obtenidos a partir de retinas de ratas de 2 días posnatales (PN2) (Politi y col., 1996), que fueron disociadas de manera mecánica e incubadas en tripsina 0,0125 % disuelta en una solución salina de Hank's libre de calcio y magnesio (CMF) en proporción 1:25 (v/v), durante 12,5 min. Luego, agregamos inhibidor de tripsina (0,25 %) para detener la acción enzimática. Una vez disociadas, sembramos la suspensión celular en cápsulas de cultivo pre-tratadas con poli-L-ornitina (0,1 mg/ml) y con medio condicionado de Schwannomma, para aumentar la adhesividad y promover el desarrollo de neuritas, respectivamente (Adler, 1982). Incubamos los cultivos a una temperatura de 36,5 °C con 5 % de CO₂. El medio de cultivo químicamente definido (medio neuronal) libre de lípidos y suero, consiste en medio de cultivo DME (con 3,7 g/l bicarbonato de sodio), suplementado con gentamicina (50 mg/l), glutamina (2 mM), citidina-5-difosfolina (2,56 mg/l), hidrocortisona (100 nM), insulina (16,6 X 10⁻⁷ M), progesterona (4 X 10⁻⁸ M), putrescina (2 X 10⁻⁴ M), selenio (6 x 10⁻⁸ M) y transferrina (12,5 x 10⁻⁸ M) (Politi, y col., 2001; Rotstein y col., 1996, 1998). Bajo estas condiciones se diferenciaron células fotorreceptoras (FRs) y neuronas amacrinas (Rotstein y col., 1996). Estos cultivos pueden mantenerse durante 5 días (o más), un tiempo suficiente para estudiar diferentes mecanismos y procesos involucrados que afectan la viabilidad, el desarrollo y el normal funcionamiento de la célula. Cabe destacar que, las características que presentan ambos tipos de neuronas en cultivo, son similares a las de su contraparte en la retina entera. Los FRs presentan un cuerpo celular pequeño de entre 5 y 10 µm de diámetro, ocupado mayormente por el núcleo lo que permite visualizarlos de color más oscuro que las otras células en cultivo. En uno de sus

extremos presentan un axón único y corto, y en el otro puede encontrarse un cilio. Por su parte, las neuronas amacrinas son de mayor tamaño respecto a los FRs. Presentan un cuerpo celular que oscila entre 10 y 35 μm , y un núcleo grande con forma circular o arriñonada con uno o múltiples axones. Si bien ambos tipos neuronales pueden diferenciarse morfológicamente, en este trabajo empleamos marcadores específicos. Por un lado, identificamos a los FRs mediante la marcación con el anticuerpo Rho4D2, que determina la presencia de la proteína visual opsina, la cual se distribuye difusamente en el cuerpo celular y en el proceso apical (de Genaro y col., 2013); para identificar a las neuronas amacrinas utilizamos el anticuerpo HPC-1 (Fig. 7), que marca a la proteína syntaxina (Politi y col., 2001).

Obtención de cultivos gliales puros

Para la obtención de los cultivos puros de células gliales de Müller (CGM) se siguieron protocolos previamente establecidos (Hicks y Courtois, 1990b; Simón y col., 2015). En primer lugar, se disecaron los ojos de ratas (PN 3-5), los cuales se mantuvieron durante toda la noche en DME, y posteriormente fueron tratados con una solución de tripsina (1 mg/ml) y colagenasa tipo II (2 mg/ml) durante 3,30 min y 7,30 min, respectivamente. Seguidamente, se sembraron los fragmentos de retina en medio de cultivo DME suplementado con 10 % de SFB. Después de 72 h, se removieron los pequeños trozos de tejido adheridos a la cápsula mediante lavados suaves. Se reemplazó el medio de cultivo cada 3-4 días, previo lavado suave con el buffer Hank's. A los 7/9 días *in vitro* (d.i.v.) (60 % de confluencia) los cultivos fueron repicados mediante disociación con tripsina 0,25 % EDTA 5 mM/Hank's 1X (0,3 ml) y se combinaron las células de todas las placas de cultivo primario para obtener un pool único de células, del cual se sembraron aproximadamente 30.000 células por placa de 35 mm. En estas condiciones, se obtuvieron cultivos altamente purificados en CGM (contenido de CGM superior al 98 %). Éstas son células planas con una morfología rectangular o irregular, con lamelipodios conspicuos que cubren la mayor parte de la superficie de cultivo. Fueron identificadas con diferentes anticuerpos como vimentina, CRALBP, glutamina sintasa o GFAP, entre otros (Fig. 8) (Simón y col., 2012; Vera y col., 2021; Volonté y col., 2019).

Obtención de cultivos mixtos neuro-gliales

Para obtener los cultivos mixtos neuro-gliales, se emplearon métodos previamente desarrollados en nuestro laboratorio (Insua y col., 2003; Simón y col., 2015). Se extrajeron retinas de ratas PN2 (Insua y col., 2003; Simón y col., 2015) y, luego de disociarlas, se sembraron las células sobre cápsulas de cultivo, en este caso sin tratamiento previo. Las células crecieron en DME suplementado con 10 % de SFB

(Sigma), bajo las mismas condiciones en las que se mantuvieron los cultivos neuronales. Después de realizar la siembra, se obtuvieron grumos compuestos por CGM y neuronas en distintos estadios de diferenciación. Cabe destacar que las CGM derivan de progenitores tardíos, los cuales tras finalizar la mitosis originan tanto FRs como CGM (Turner y Cepko, 1987). Entre los 2 y 3 días posteriores a la siembra, las CGM comienzan a proliferar y extenderse por debajo de los grumos, formando una monocapa sobre la cual crecen y se diferencian los dos tipos neuronales indicados anteriormente. Tal como lo muestra la figura 9, presentan cuerpos celulares grandes e irregulares de alrededor de 50 μM , y extensos lamelipodios, sobre las que se ubican las neuronas (Simón y col., 2012; Volonté y col., 2019).

Cultivos de Células de Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR) de la línea celular ARPE-19

Para obtener estos cultivos, en nuestro laboratorio contamos con una línea celular de EPR, la línea ARPE-19, que se utilizó en esta Tesis para analizar los efectos de la cianotoxina. Estas células pueden identificarse por inmuno-marcación con los anticuerpos para CRALBP y la proteína de 65ka específica del EPR, RPE65, que están involucradas en la regeneración de 11-cis retinol, función específica de las células del EPR.

Las células de esta línea celular humana, se repicaron rutinariamente por disociación en tripsina 0,25 % EDTA 5 mM/Hank's 1X, seguido del resembrado a una dilución 1:3 (v/v) en placas de 35 mm para los experimentos, o en frascos de T75 de diámetro para el mantenimiento de la línea. Las células fueron mantenidas en DME 10 % SFB, el cual se renovó semanalmente (Fig. 10).

Diferenciación de células PC12 en neuronas

La línea celular PC12 es una línea derivada de feocromocitoma de la médula adrenal de rata (Tischler y Greene, 1978). Su origen embrionario es a partir de células neuroblásticas de la cresta neural. Por lo tanto, debido a que comparten propiedades similares a neuronas, pueden diferenciarse fácilmente en células semejantes a éstas. Debido a esto, las células PC12 son consideradas como un modelo útil de diferenciación neuronal. Luego de ser tratadas con factores de crecimiento nervioso, dejan de dividirse y pueden diferenciarse. Presentan procesos largos conocidos como *varicosidades*, que contienen pequeñas cantidades de vesículas, a través de las cuales pueden liberar neurotransmisores como dopamina, noradrenalina y acetilcolina (Popova y col., 2017). Trabajos previos han reportado la presencia de receptores NMDA tanto en células diferenciadas como no diferenciadas (Casado y col., 1996).

Para esta Tesis se utilizó la línea PC12 diferenciada para determinar si la BMAA afectaba a otro tipo neuronal diferente al de la retina. Para ello, se sembraron células de la línea PC12 en cápsulas de 35 mm de diámetro que crecieron en presencia de DME suplementado con 10 % suero de caballo (HS) y 5 % de SFB. Para diferenciar a las células PC12, se pre-trataron las cápsulas con poli-L-ornitina (0,1 mg/ml). Luego de sembrados, los cultivos se mantuvieron en DME suplementado con HS/SFB, como se indicó previamente, durante 2 días y se los incubó luego, en medio neuronal químicamente definido sin suero durante 5 días, previo a la fijación. Estas células en cultivo, presentaron una morfología irregular y las identificamos con el marcador neuronal Tuj-1 (Fig. 11).

Tratamiento con BMAA y determinación de las curvas “concentración-respuesta” para los distintos tipos celulares

Para preparar la solución stock, la toxina fue disuelta en agua y luego resuspendida en solución Hank's libre de Ca^{2+} y Mg^{2+} , para ser agregada a los cultivos. Los cultivos neuronales y neuro-gliales de 2 días fueron tratados con diferentes concentraciones (0 - 0,8 μM) de BMAA (Sigma) o con el mismo volumen de su vehículo, Hank's (control). Luego de estos tratamientos, se incubaron durante 3 días los cultivos neuronales puros, y 5 días los cultivos mixtos neuro-gliales (Figs. 7, 9). Esta diferencia en el tiempo de incubación se debió al distinto tiempo de proliferación y diferenciación de las CGM. Además, los cultivos mixtos neuro-gliales fueron estudiados en dos tiempos que denominamos corto plazo (7 d.i.v.) y largo plazo (13 d.i.v.).

Por otro lado, tanto para las líneas celulares PC12 y ARPE-19, como para los cultivos gliales puros, se utilizaron concentraciones de 0,4, 1 y 10 μM de BMAA (Figs. 8, 10, 11), una vez que los cultivos llegaron al 50/60 % de confluencia. Estos tratamientos se realizaron durante 3 días. Por su parte, los cultivos gliales puros se analizaron en dos tiempos equivalentes a los analizados en los cultivos mixtos neuro-gliales. El tratamiento a corto plazo (4 d.i.v.) finalizó 3 días después de agregar la toxina; mientras que a ese tiempo a los cultivos a largo plazo (10 d.i.v.), se les renovó el medio y volvió a agregar la toxina en las mismas concentraciones durante 6 días.

Finalmente, para el procesamiento de las muestras, los cultivos se fijaron con paraformaldehído 4 % (PF) durante 45 min, y se evaluaron los cambios generados por la BMAA, tanto en viabilidad celular como en morfología, utilizando microscopía de fase, fluorescencia y confocal junto con ensayos inmunocitoquímicos.

Tratamiento con el antagonista del receptor NMDA, MK-801

El MK-801 es un antagonista no competitivo del receptor NMDA. Se preparó una solución stock de MK-801 en dimetilsulfóxido (DMSO), que fue resuspendida para ser agregada a cultivos neuronales de 2 días a una concentración de 10 μM . Este procedimiento fue realizado 1 h antes de agregar la BMAA o el vehículo (Hank's) (Fig. 7).

Tratamiento con Ser

Para evaluar la competencia entre Ser y BMAA, se preparó una solución stock de Ser en agua, con una concentración final de 50 mg/ml. Posteriormente, fue resuspendida en DME para ser agregada a cultivos neuronales de 2 días a una concentración de 25 μM . Este procedimiento fue realizado 1 h antes de agregar la BMAA o el vehículo (Hank's) (Fig. 7).

Incubación con HEPES

Para evaluar el efecto de la BMAA junto con iones HCO_3^- , las células fueron incubadas con DME suplementado con buffer NaHCO_3 , utilizando el medio de cultivo en que crecen usualmente durante 2 días. Luego, se reemplazó este medio por medio neuronal suplementado con HEPES 25 mM (pH 7.4), carente de iones HCO_3^- , previo al tratamiento con BMAA o Hank's.

Tratamiento con el agonista del receptor RXR, HX630

El tratamiento con el agonista sintético de los RXRs, el HX630, se realizó en cultivos neuronales de 2 días, 1 h antes del tratamiento con la toxina. La concentración utilizada fue de HX630 1 μM . Este valor surge de la realización previa de una curva con concentraciones crecientes del agonista (0,01 μM , 0,1 μM y 1 μM) vs. los niveles de fragmentación nuclear y actividad mitocondrial evaluados con la sonda DAPI y Mitotracker, respectivamente. Como controles del experimento se utilizaron cultivos incubados con DMSO, vehículo del HX630. Para los ensayos con técnicas inmunocitoquímicas, los cultivos fueron fijados con PF 4 % (Fig. 7).

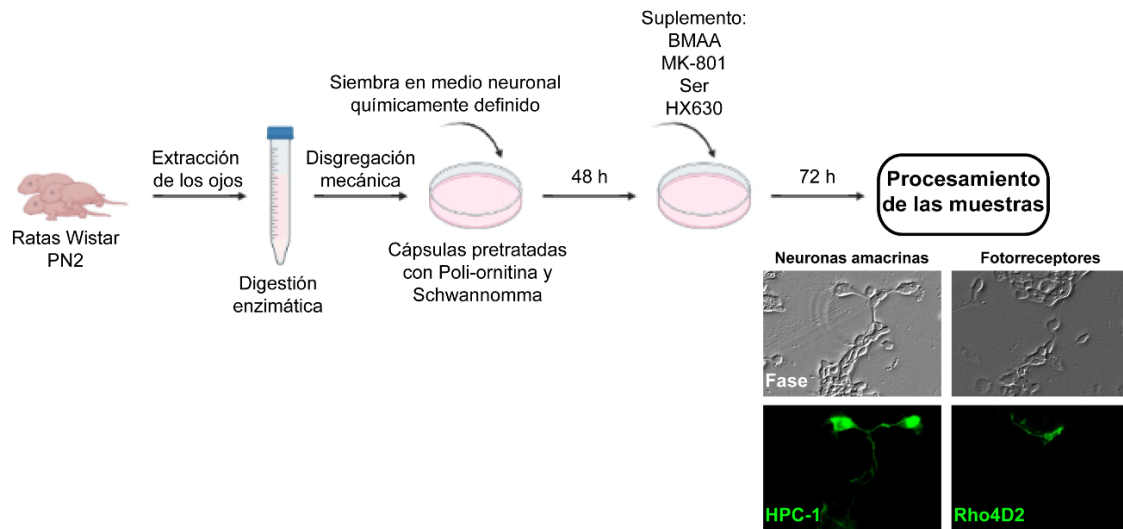


Figura 7. Obtención de cultivos neuronales puros de retina de rata. Secuencia de pasos metodológicos para la obtención de cultivos neuronales partir de retinas de ratas PN2, y el posterior tratamiento experimental.

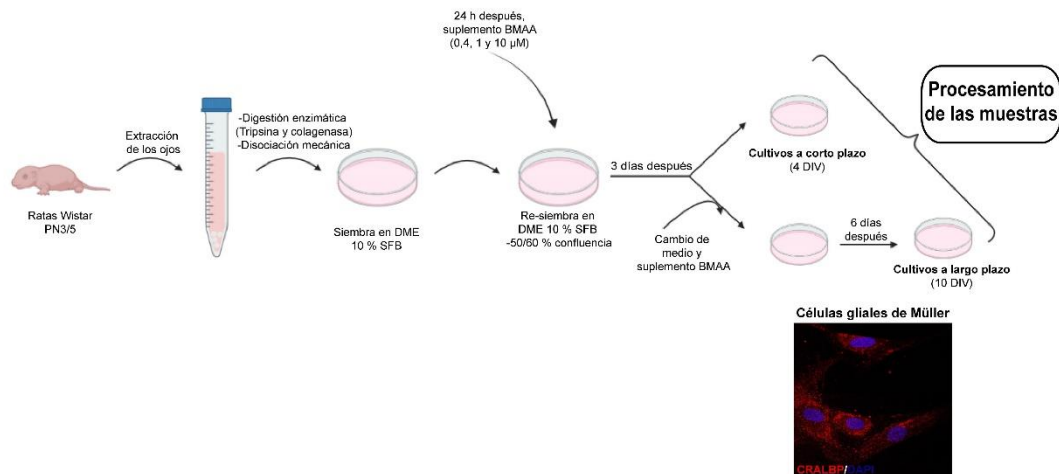


Figura 8. Obtención de cultivos gliales puros de retina de rata. Representación esquemática de la metodología utilizada para obtener cultivos gliales puros a partir de retinas de rata PN3/5.

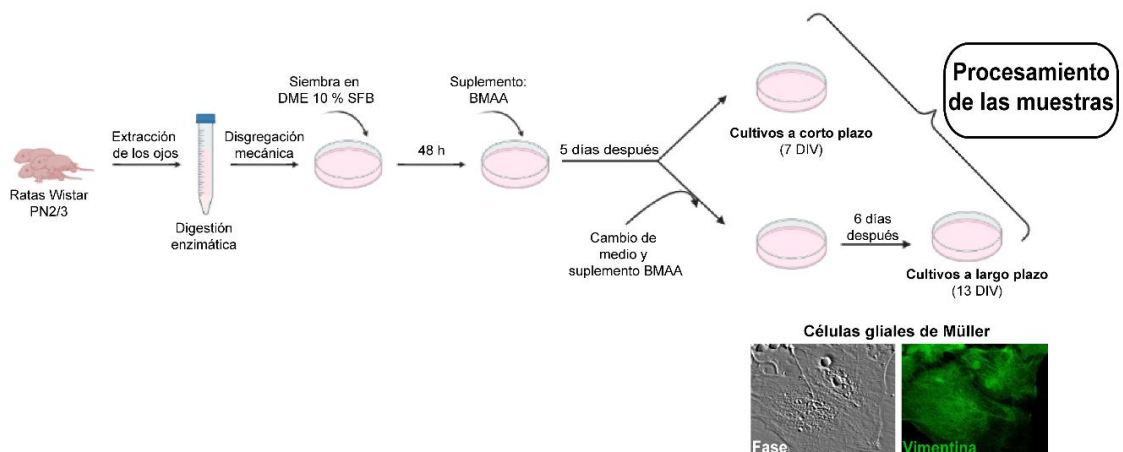


Figura 9. Obtención de cultivos mixtos neuro-gliales de retina de rata. Esquema del protocolo implementado en la obtención de cultivos mixtos neuro-gliales y el posterior tratamiento experimental.

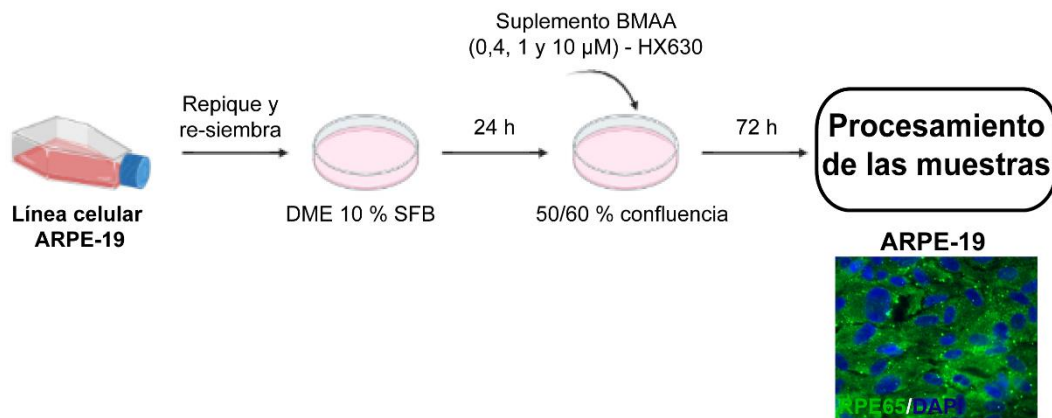


Figura 10. Línea celular ARPE-19, células del EPR. Representación esquemática del mantenimiento de las células del EPR y el tratamiento experimental correspondiente.

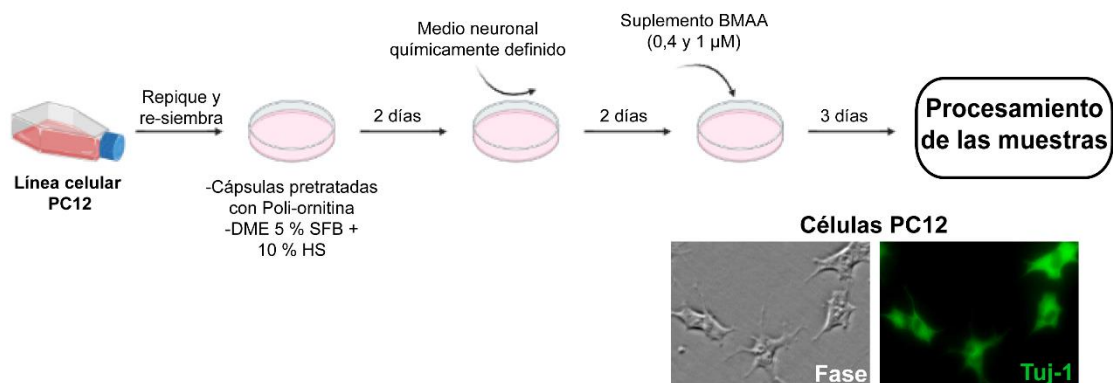


Figura 11. Línea celular PC12. Esquema que muestra la secuencia de pasos realizados para obtener células PC12 diferenciadas a neuronas.

Técnicas inmunocitoquímicas

Los diferentes tipos celulares neuronales y gliales fueron identificados por su morfología (mencionada previamente), evaluada bajo el microscopio y por técnicas inmunocitoquímicas, utilizando anticuerpos monoclonales (Tabla 1). Las neuronas amacrinas fueron reconocidas por ensayos inmunocitoquímicos empleando anti-sintaxina HPC-1 1:200 (v/v). A su vez, los FRs se identificaron con el anticuerpo anti-rodopsina Rho4D2 1:100 (v/v) (Hicks y Barnstable, 1987; Rotstein y col., 1996, 1998).

Por su parte, las células PC12 luego de adquirir las características neuronales, fueron identificadas por su morfología y por la expresión del marcador neuronal anti β -Tubulina tipo III Tuj-1 1:300 (v/v), principalmente en sus estructuras similares a axones.

Las CGM fueron identificadas por su inmuno-reactividad a los anticuerpos CRALBP, una proteína de unión al retinaldehído celular (Fig. 8), o Vimentina (Fig. 9) y GFAP, que son filamentos intermedios específicos del citoesqueleto de las células gliales. También por tinción para glutamina sintetasa (GS), una enzima utilizada por las CGM para reciclar Glut (Simón y col., 2012; Vera y col., 2021; Volonté y col., 2019).

Por otro lado, las células de EPR de la línea ARPE-19, fueron identificadas por inmunomarcación con los anticuerpos para CRALBP y la proteína de 65ka específica del EPR, RPE65 (Fig. 10).

Para realizar estos ensayos, se fijaron los cultivos durante 45 min con PF 4 % en buffer fosfato salino (PBS), luego se permeabilizaron por 15 min con Tritón X-100 (0,1 %), y se incubaron con albumina de suero bovino 1X (BSA) durante 30 min como bloqueante, Finalmente, se los incubó (durante 1 h) con los anticuerpos primarios, seguidos del anticuerpo secundario (Cy2 o Cy3) también durante 1 h.

Evaluación de la viabilidad celular, determinación de la fragmentación nuclear y del potencial de membrana mitocondrial

Para estudiar la viabilidad de los distintos tipos celulares, se emplearon diferentes técnicas. Por un lado, la sonda Ioduro de Propidio (IP), que difunde en células que han perdido la integridad de su membrana plasmática (células muertas). Para ello, las células fueron incubadas durante 20 min con 0,5 µg/ml IP previo a la fijación. Se consideraron como muertas aquellas células que fueron marcadas con la sonda (Jordán y col., 1997). Asimismo, para evaluar la integridad del núcleo, después de la fijación, las células se permeabilizaron con Tritón X-100 y luego se incubaron durante 10 min con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) 1 µg/ml o TOPRO 1 µM. En este caso, se consideraron apoptóticas aquellas neuronas que presentaron su núcleo fragmentado y/o picnótico.

También fue utilizada la técnica de TUNEL para determinar el porcentaje de células con fragmentación internucleosomal del ADN, evento precoz en la vía apoptótica. Este método se basa en la actividad de la enzima Deoxynucleotidyl Transferasa Terminal (TdT), que cataliza la incorporación repetitiva de nucleótidos modificados sobre los extremos OH-libre del ADN. Estos fragmentos se forman durante la muerte celular por apoptosis y se visualizan finalmente por inmunocitoquímica, utilizando un anticuerpo específico que reacciona contra los nucleótidos empleados. Para ello, luego de fijadas las células, se mantuvieron en etanol (Et-OH) 70 % a -20 °C durante 3 días, como mínimo. Posteriormente, los cultivos se lavaron en buffer PBS, se pre-incubaron por 15 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda con el buffer para la enzima TdT (1X), para luego ser expuestos por 1 h a 36 °C a la mezcla de reacción enzimática (0,05 mM BrdUTP; 0,3 U/µl TdT en buffer TdT). La reacción se detuvo mediante el agregado de

buffer stop (300 mM NaCl, 30 mM citrato de sodio – pH 7,4), con el cual se incubó por 15 min. Luego se realizaron lavados con PBS, se bloqueó con BSA 1 % durante 30 min y se agregó el anticuerpo primario anti BrdU en una concentración 1:50 (v/v) en PBS durante 1 h, para analizar la incorporación de BrdUTP por inmunocitoquímica. Posteriormente, se lavaron las muestras con PBS, y se les adicionó el anticuerpo secundario Cy2 (anti-ratón) 1:200 (v/v) durante 1 h. Por último, se realizó la técnica de DAPI.

Para evaluar la viabilidad en células PC12, ARPE-19 y CGM, se removieron las células utilizando Tripsina/EDTA (0,25 %) en solución Hank's. Luego, se resuspendieron en DME con 10 % de suero para frenar la reacción enzimática. Se tomaron 50 µl de la suspensión junto con 50 µl de la solución Trypan Blue. Posteriormente, se colocaron 10 µl en una cámara de Neubauer donde se contabilizaron como células muertas aquellas que se visualizaban de color azul.

El estado del potencial de membrana mitocondrial fue determinado mediante la sonda fluorescente Mitotracker Red (0,1 µg/ml), incubando a las células con la misma durante 30 min en estufa; posteriormente se realizó un lavado con Met-OH 70 %, se fijaron las células con PF 4 % y se evaluó su fluorescencia por microscopía. Las células que preservaron su potencial de membrana mitocondrial fueron aquellas que demostraron una fluorescencia roja y brillante.

A su vez, se evaluó la actividad metabólica mediante el ensayo de Bromuro de 2-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). En este procedimiento se utiliza un reactivo soluble en agua, que es incorporado por las células. Al ingresar a éstas, se reduce a nivel mitocondrial en aquellas células que se encuentran metabólicamente activas (viables). La reducción transforma al reactivo de MTT en una sal de formazán insoluble en agua, que forma cristales de color violeta. Estos cristales luego se solubilizan con isopropanol acidificado y se cuantifican colorimétricamente a 570 nm (Mosmann, 1983). La absorbancia medida es directamente proporcional al estado metabólico de las células. Para realizar esta medición, se sembraron las células del epitelio y las CGM en placas de 24 pocillos. Finalizados los distintos tratamientos, se agregó una solución de MTT 5 mg/ml en PBS a cada pocillo, de manera de obtener una solución de 0,5 mg/ml como concentración final en el medio de cultivo. Se incubó durante 90 min a 36,5 °C, y finalmente se lisaron las células utilizando un buffer de solubilización (10 % Tritón X-100 y 0,01 N de HCl en isopropanol), seguido de medición espectrofotométrica a 570 nm utilizando un lector de microplacas (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific). La absorbancia del rojo fenol, presente en el medio de cultivo de remanente, fue registrada a 670 nm y luego sustraída en cada pocillo.

Análisis de liberación de ROS

La producción de ROS fue medida utilizando la sonda 5(6)-carboxy-2'7'-Diclorofluoresceína diacetato (DCDCDHF), que atraviesa la membrana celular y cuando se oxida, genera una marcación fluorescente (Tenconi y col., 2019). La línea ARPE-19, así como también los cultivos neuronales y gliales, fueron sembrados sobre cubreobjetos de 12 mm, y posteriormente incubados con la BMAA. Al finalizar el tratamiento, se removió el medio de cultivo y se agregó 1 ml de DME con la sonda DCDCDHF 10 μ M durante 30 min a 36 °C. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS estéril y se montaron los cubreobjetos para ser observados en el microscopio. La intensidad de fluorescencia fue evaluada a partir de 8-10 imágenes por condición, utilizando el software ImageJ.

Análisis de la integridad de los microtúbulos

La integridad de los microtúbulos axonales se determinó por inmunocitoquímica utilizando el anticuerpo primario Tuj-1 1:300 (v/v) durante 1 h. Previamente, las células se incubaron con BSA durante 30 min para bloquear marcaciones inespecíficas. Posteriormente, se realizaron lavados con PBS y se agregó el anticuerpo secundario Alexa-conjugado (de oveja), Cy2 1:200 (v/v). Los controles para el análisis inmunocitoquímico se realizaron al omitir el anticuerpo primario o el secundario; los restos fueron eliminados lavando con PBS. Posteriormente, el largo de los axones fue determinado utilizando el software ImageJ en las neuronas Tuj-1 positivas, identificadas con Rho4D2 (FRs) y HPC-1 (amarinas), como se indicó previamente.

Análisis de la organización del citoesqueleto de actina

Para observar la integridad y la distribución del citoesqueleto de actina en las CGM y en la línea ARPE-19, y de los conos de crecimiento en los cultivos neuronales, utilizamos la sonda faloidina. Una vez fijados y permeabilizados los cultivos, se les agregó 4 μ g/ml de faloidina en una concentración 1:50 (v/v) durante 30 min. Luego, se realizaron tres lavados con PBS de 5 min cada uno.

Microscopía

Los cultivos fueron analizados por contraste de fase y por microscopía de fluorescencia, utilizando los microscopios Nikon Eclipse E600 y TE2000-S con una cámara Cannon montada. También se utilizaron microscopios láser confocales Leica (modelo TCS SP2 AOBS) y ZEISS LSM 900 Airyscan 2.

Western Blot

Para evaluar si la BMAA altera los niveles en la expresión de la proteína tubulina, realizamos la técnica de Western Blot en las células PC12. Este procedimiento se divide en diferentes etapas:

1-Extracción de proteínas

En primer lugar, las células fueron lavadas con PBS y resuspendidas sobre hielo con buffer lisis, el cual contiene una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasa [KCl 3 mM, Tris HCl 50 mM (pH: 7,4), NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 1 % y NP-40 1 %] por 20 min. Luego, se lisaron los extractos de células durante 30 min, mediante agitación con vórtex cada 10 min y manteniendo el frío con hielo. Para finalizar, se cuantificaron las proteínas totales con el método de Bradford (Bradford, 1976).

2-Separación electroforética de las proteínas:

Las proteínas fueron separadas empleando la técnica SDS-PAGE. Luego de cuantificarlas, se desnaturalizaron las muestras con buffer muestra Laemmli 6X [Tris-HCl 250 mM (pH 6,8), SDS 8 %, glicerol 40 %, β -mercaptoetanol 20 % y 0,02 % azul bromofenol], calentando durante 5 min a 95 °C (Laemmli, 1970). A continuación, se separaron las proteínas (50 μ g por calle) por electroforesis en geles de poliacrilamida/bis-acrilamida al 10 %.

La corrida electroforética se realizó a 80-120 mv durante aproximadamente 1 h, utilizando el buffer de corrida [Tris 25 mM (pH 8,8); glicina 192 mM].

3-Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF:

Una vez separadas electroforéticamente, las proteínas se transfirieron de las muestras desde el gel hacia una membrana Inmobilon-P (PVDF), que fue previamente activada a través de metanol (Met-OH). Para realizar la transferencia, se utilizó un buffer de transferencia [Tris 25 mM (pH 8,3); glicina 192 mM, Met-OH 20 %], y una cámara de transferencia (BioHRad, modelo Mini Trans H Blot, Bio H Rad Life Science Group, California). Esto se mantuvo durante 2 h, a amperaje constante de 350 mA y voltaje variable.

4-Inmunomarcación y revelado:

Como último paso, las membranas se mantuvieron inmersas en buffer PBS 1X; Tween-20 0,1 % y BSA 5 % durante 2 h a temperatura ambiente, para bloquear o eliminar las uniones inespecíficas. Luego, se incubaron durante toda la noche con agitación leve a 4 °C, con el anticuerpo primario anti β III tubulina (Tuj-1), en una solución 1:1000 (v/v) preparada en buffer PBS 1X; Tween-20 0,1 % y BSA 3 %. A continuación, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón para Tuj-1 acoplado a peroxidasa, durante 1 h a temperatura ambiente. Las bandas inmuno-reactivas se revelaron por el método de quimioluminiscencia (Amersham HyperfilmTM ECL, GE

Healthcare), utilizando ECL y placas fotográficas específicas para luminiscencia. Para identificar las bandas proteicas de interés, se utilizaron como referencia estándares proteicos de peso molecular conocido en el rango de 220-14 kDa. Como control se empleó GAPDH, un marcador que se mantiene estable en diferentes tipos celulares (Tabla 1). Finalmente, se utilizó el programa ImageJ para cuantificar las bandas inmuno-activas, de las imágenes obtenidas a partir de las placas radiográficas.

Citometría de flujo

Para evaluar si la BMAA afectaba el ciclo celular de las células PC12 y de las CGM, éstas fueron analizadas mediante citometría de flujo. Para obtener las células en suspensión, se utilizaron como filtros, mallas de nylon con poros de 32 μm . Posteriormente, las células se fijaron y permeabilizaron en Et-OH 70 %; 1 hora antes de realizar el análisis, fueron resuspendidas en 0,5 ml de PI/RNase Staining Buffer durante 15 min a temperatura ambiente. Se utilizó el citómetro de flujo FACS (BD Biosciences), y se realizó la cuantificación con FACSCComp. Para cada muestra se analizaron un mínimo de 10.000 eventos.

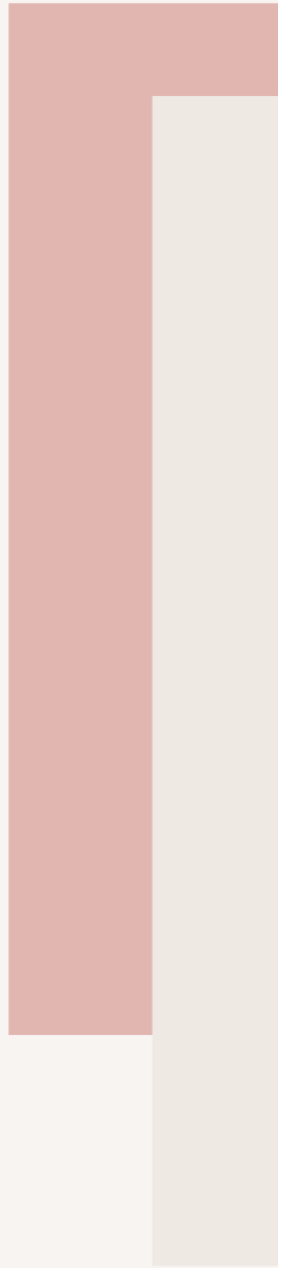
Análisis estadístico

Los resultados muestran el porcentaje de al menos 3 experimentos independientes (\pm desvío estándar -DS- o error estándar de la media -SEM-), a menos que se indique lo contrario. En cada experimento, cada condición fue realizada por duplicado o triplicado y se contaron 10 campos por placa de manera aleatoria y a ciegas. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba *t de Student* o ANOVA seguido del análisis de *Tukey*, según se especifique, considerando significativo un valor $p \leq 0,05$. Para realizar los gráficos y el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5. Las imágenes mostradas de cultivo celular son representativas de cada resultado.

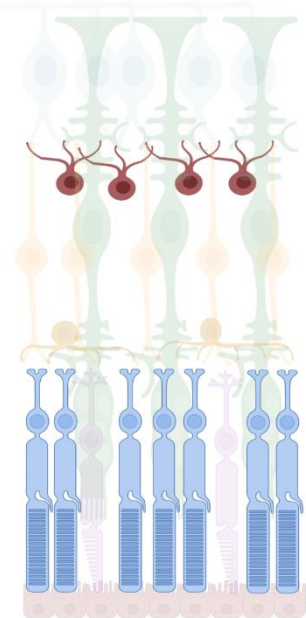
Anticuerpo	Reconoce	Origen	Fuente	Uso	Dilución de uso (v/v)
Rho4D2	Opsina	Ratón	Donado por el Dr. RS Molday University of British Columbia, Canadá	ICQ	1:50
HPC-1	Sintaxina	Ratón	Sigma S0664	ICQ	1:200
Vimentina	Vimentina	Ratón	Sigma V6630	ICQ	1:100
BrdU	BrdU	Ratón	DSHB 6364	ICQ	1:100
Tuj-1	β III tubulina	Ratón	Santa Cruz Biotechnology, Inc. SC-58888	ICQ/WB	1:300/1:1000
CRALBP	Proteína de unión al retinaldehído celular	Ratón	Gene Tex gtx15051	ICQ	1:100
RPE65	Proteína de 65ka específica del EPR	Ratón	Novus Biologicals (USA) NB100-355	ICQ	1:100
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	Ratón	Gene Tex gtx627408	WB	1:1000
Cy2 anti-mouse	Inmunoglobulina de ratón	Cabra	Jackson ImmunoResearch 115-225-003	ICQ	1:200
Cy2 anti-rabbit	Inmunoglobulina de conejo	Cabra	Jackson ImmunoResearch 111-225-144	ICQ	1:200
Cy3 anti-mouse	Inmunoglobulina de ratón	Cabra	Jackson ImmunoResearch 115-165-003	ICQ	1:200
Cy3 anti-rabbit	Inmunoglobulina de conejo	Cabra	Jackson ImmunoResearch 111-165-144	ICQ	1:200
IgG HRP anti-mouse	Inmunoglobulina de ratón	Cabra	Santa Cruz Biotechnology, Inc. SC-2031	WB	1:1000

Tabla 1. Anticuerpos utilizados en Inmunocitoquímica (ICQ) y Western Blot (WB).

RESULTADOS



Efectos de la BMAA sobre cultivos neuronales



La BMAA indujo fragmentación nuclear y muerte neuronal

Para establecer los efectos de la toxina sobre la fragmentación nuclear y la muerte celular se realizó una curva concentración-respuesta a concentraciones que variaron de 0 μM a 0,8 μM de BMAA (Fig. 12). Como se observa en la figura 12, la concentración mínima de BMAA que condujo al mayor porcentaje de células con núcleos fragmentados correspondió a 0,4 μM . Para esta concentración, el porcentaje de neuronas con núcleos fragmentados o picnóticos aumentó, respecto de los controles, de un 25 % a un 52 %, en las neuronas amacrinas y de un 28 % a un 54 % en los FRs (Fig. 12 A). Además, para esta misma concentración de BMAA, el número de neuronas amacrinas y FRs muertos se incrementó 1,8 veces y 0,5 veces, respectivamente respecto de la condición control (Fig. 12 B). En base a estos resultados, se estableció que la concentración citotóxica mínima (CC50) capaz de inducir la mayor fragmentación nuclear y muerte celular correspondió a una concentración de 0,4 μM de BMAA, la cual se utilizó para los experimentos subsiguientes.

Los cultivos incubados con la BMAA a la concentración óptima de 0,4 μM mostraron que las células IP positivas adquirieron morfologías irregulares con una correspondiente pérdida de la integridad celular y signos de picnosis o fragmentación nuclear (Fig. 12 D, G). Además, los porcentajes de núcleos fragmentados o picnóticos fueron significativamente más altos que los de las células muertas, lo cual sugiere que los daños nucleares son desencadenantes previos a la muerte celular.

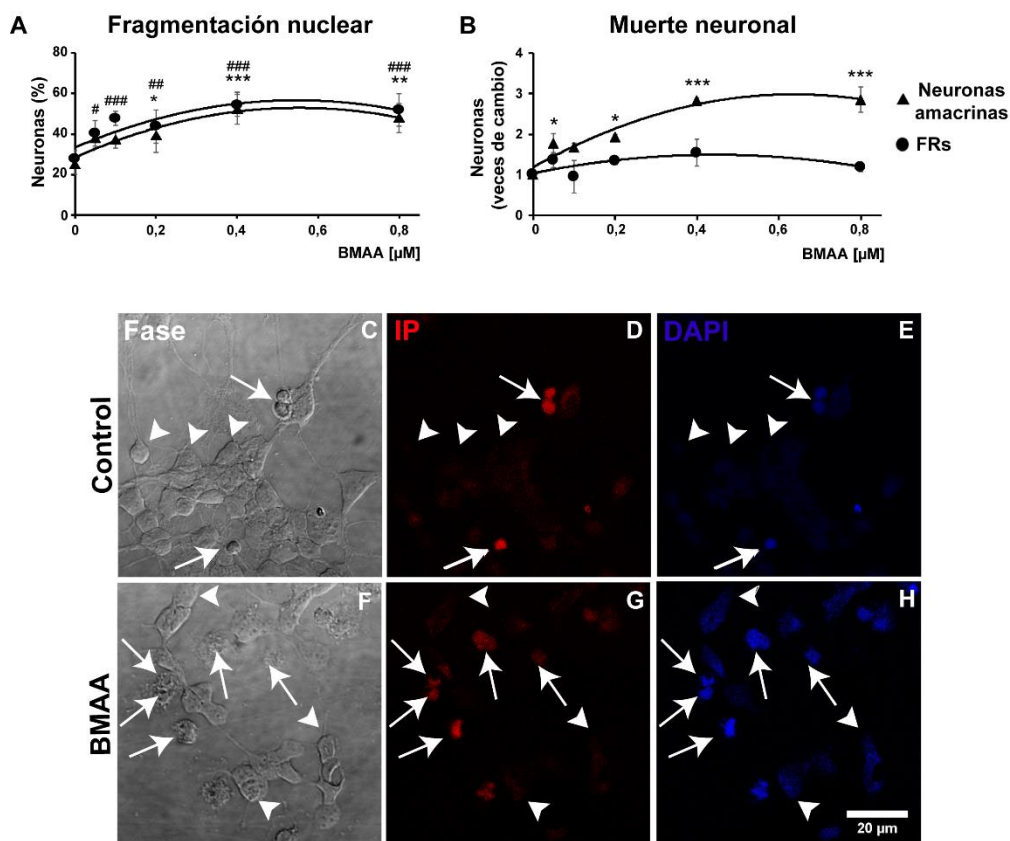


Figura 12. Determinación de la CC50 y evaluación de los daños inducidos por la BMAA. Las curvas concentración-respuesta indican el porcentaje de neuronas amacrinas y FRs en cultivos de 5 días de desarrollo, expuestos a diferentes concentraciones de BMAA, que presentan núcleos fragmentados o picnóticos (A), o muerte celular (B), determinados por ensayos de DAPI e IP, respectivamente. Imágenes de fase (C, F) y fluorescencia (D, E, G, H) de cultivos neuronales de 5 días tratados con BMAA (F-H) o Hank's (control) (C-E) durante 3 días. La muerte celular fue determinada por IP (D, G), y la fragmentación nuclear fue evaluada por DAPI (E, H). Las flechas muestran neuronas no viables y con núcleos fragmentados o picnóticos, y las cabezas de flecha señalan neuronas viables. La escala corresponde a 20 μ m. Los resultados representan el promedio \pm SD de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. Diferencias significativas neuronas amacrinas respecto del control: (*) : $p \leq 0,05$, (**) : $p \leq 0,01$, (***) : $p \leq 0,001$. Diferencias significativas FRs respecto del control: (#) : $p \leq 0,05$, (##) : $p \leq 0,01$, (###) : $p \leq 0,001$.

La BMAA promovió la pérdida del potencial de membrana mitocondrial

Las disfunciones mitocondriales se encuentran en la base de diferentes patologías, en las que se genera un desbalance en el intercambio de diferentes metabolitos que conducen a alteraciones en la homeostasis y, finalmente, llevan a la muerte celular (Cowan y col., 2019; Lin y Luo, 2019; D. F. Silva y col., 2020). Por ello, se investigó si la BMAA afecta la funcionalidad de estas organelas como parte de sus mecanismos de

toxicidad. Utilizando la sonda Mitotracker se observó que en condiciones control, las neuronas exhibieron una fluorescencia roja y brillante, indicando que sus mitocondrias se mantenían activas y conservando su potencial de membrana (Fig. 13 B, D). Mientras que, en los cultivos tratados con la BMAA, éstas mostraron una menor marcación (Fig. 13 F, H). La cuantificación de estos resultados mostró que el porcentaje de neuronas tratadas con la toxina que mantuvieron su actividad mitocondrial, disminuyó en las neuronas amacrininas de un 79,5 % a un 53,3 %, y en los FRs de un 74 % a un 45,4 % (Fig. 13 I). Por lo tanto, la BMAA alteró el potencial de membrana mitocondrial.

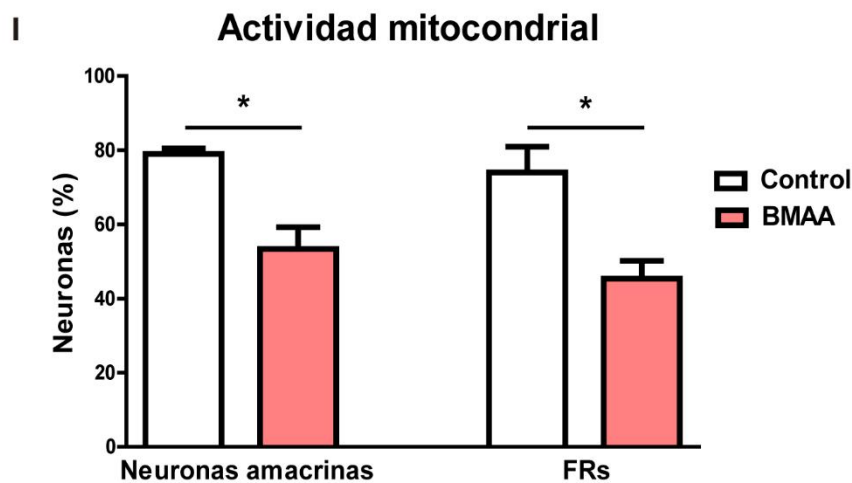
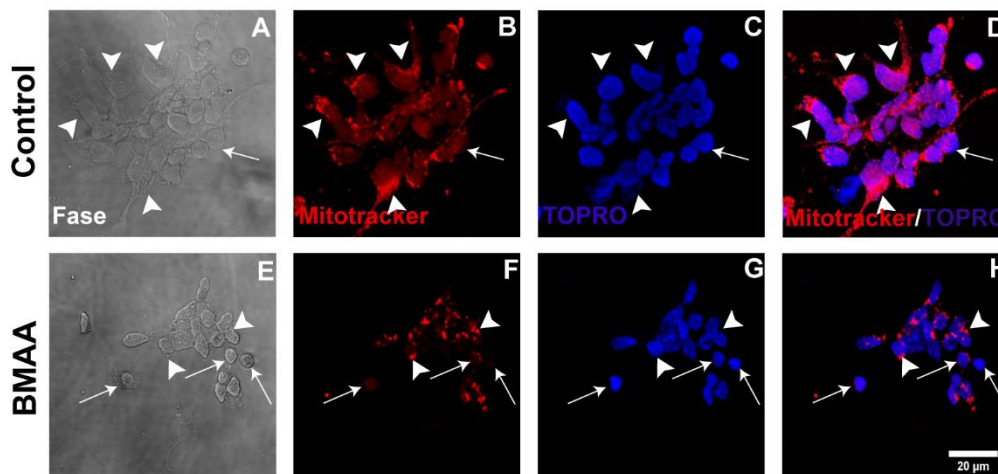


Figura 13. La BMAA promovió la pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Imágenes de fase (A, E) y de fluorescencia (B-D, F-H) de cultivos neuronales de 5 días incubados con la BMAA o el vehículo (control) durante 3 días. La despolarización mitocondrial fue evaluada mediante la sonda Mitotracker (B, D, F, H, I) y la fragmentación nuclear con TOPRO (C, D, G, H). Las flechas y cabezas de flechas señalan mitocondrias no funcionales y células viables con mitocondrias funcionales, respectivamente. La escala representa 20 µm. Los valores corresponden al promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por test de *student* (I). * $p \leq 0,05$.

El bloqueo de los receptores NMDA, protegió a las neuronas amacrinas de la muerte inducida por la BMAA

Previamente se mencionó que los efectos de la BMAA dependen, en parte, de la activación de los receptores ionotrópicos de Glut del tipo de los NMDA. Para investigar la participación de esta vía en los daños neuronales, se utilizó un antagonista de estos receptores, el MK-801. Como se observa en la Figura 14, el porcentaje de neuronas amacrinas que mostraron sus núcleos fragmentados o picnóticos ascendió de un 30 % en los cultivos controles, a un 52,6 % en los que fueron tratados con la BMAA. Por el contrario, cuando los cultivos fueron pre-incubados con el MK-801, el porcentaje de neuronas que preservaron su integridad nuclear fue similar al de los controles (29,4 %) (Fig. 14). Por su parte, en los cultivos controles, el porcentaje de FRs que mostraron sus núcleos fragmentados o picnóticos fue de 39,4 %, el cual aumentó hasta alcanzar un 58,4 % en los cultivos tratados con la toxina (Fig. 14 F). Sin embargo, en este caso la presencia del MK-801 no protegió a los FRs de la toxina, ya que los porcentajes de fragmentación nuclear no mostraron una disminución significativa (Fig. 14 F).

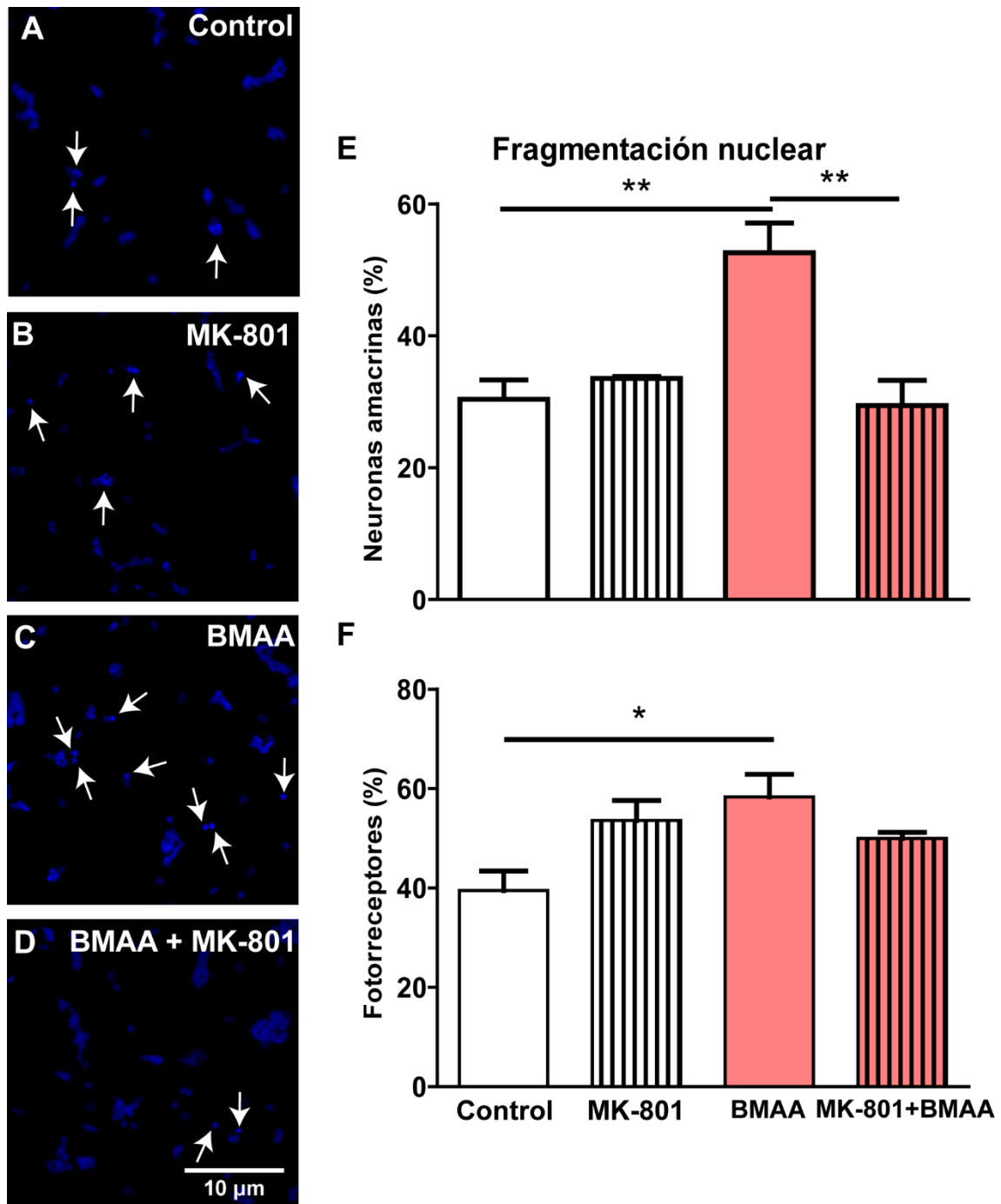


Figura 14. Participación de los receptores NMDA en los daños nucleares inducidos por la BMAA. Imágenes de fluorescencia (A-D) de cultivos neuronales de 5 días controles (A), tratados con MK-801 (B), BMAA (C), o BMAA previa incubación con MK-801 (D), mostrando núcleos fragmentados o picnóticos (flechas) marcados con DAPI. La barra representa 10 μ m. Los gráficos de barras indican el porcentaje de neuronas amacrinias (E) o FRs (F) con fragmentación nuclear. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido del test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$.

La activación de los receptores de Glut por la BMAA en neuronas amacrinas requirió de la presencia de iones bicarbonato

Trabajos previos demostraron que los efectos excitatorios de la BMAA sobre los receptores de Glut en células de la *sustancia nigra* (Cucchiaroni y col., 2010), neuronas corticales y astrocitos (Lobner y col., 2007), e incluso sobre neuronas de la retina (Santucci y col., 2009), requieren de la combinación con HCO_3^- para formar el compuesto carbamato (Diaz-parga y col., 2018; J. H. Weiss y col., 1989). Este aducto presenta una estructura química similar al Glut, lo cual le permite interactuar con sus receptores. Para investigar si en nuestro modelo de estudio el HCO_3^- era un requerimiento para la inducción de toxicidad sobre las neuronas amacrinas, los cultivos neuronales fueron incubados con buffer HEPES, en reemplazo del NaHCO_3 . Así, se evita la formación de estos iones libres y, como consecuencia, de carbamato. Los resultados revelaron que, en los cultivos que contenían NaHCO_3 en el medio de cultivo, la BMAA indujo un aumento de los núcleos fragmentados o picnóticos de las neuronas amacrinas de un 32 % en los controles, a un 53,6 % en los cultivos tratados (Fig. 15). Contrariamente, en presencia de HEPES este valor se redujo a un 28 %, similar a su control. Por lo tanto, la toxicidad sobre neuronas amacrinas fue asociada a la formación de carbamato y la consecuente activación de receptores NMDA. Los efectos de la BMAA sobre los FRs no variaron luego del reemplazo de NaHCO_3 por HEPES, un efecto no sorprendente dado que la activación de los receptores de NMDA no tuvo participación en los daños de la BMAA sobre los mismos (datos no mostrados).

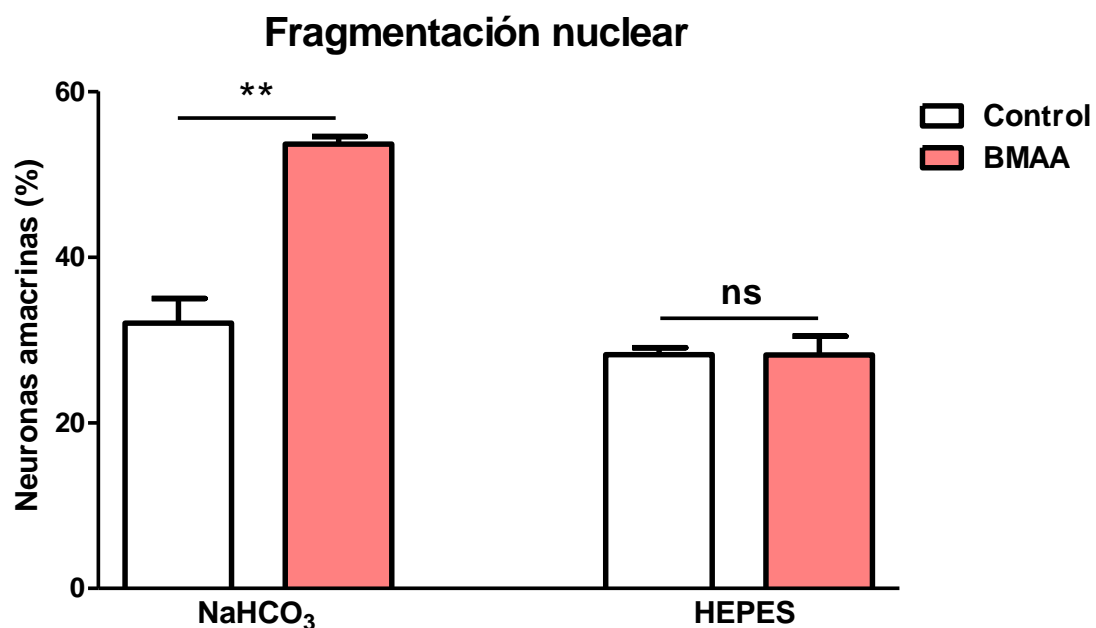


Figura 15. Los daños nucleares inducidos por la BMAA en neuronas amacrinas dependieron de la presencia de iones HCO_3^- . Cultivos neuronales de 5 días, incubados con la toxina o su vehículo (condición control), fueron mantenidos en un medio que contenía NaHCO_3 o HEPES como buffer. La fragmentación nuclear fue evaluada mediante la tinción de los núcleos con la sonda DAPI. Los datos corresponden a resultados de al menos 3 experimentos ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por el test de *student*. (**): $p \leq 0,01$.

La BMAA promovió el crecimiento axonal en neuronas amacrinas

Seguidamente, se evaluó el efecto de la BMAA sobre el desarrollo de los axones. En forma similar a lo que ocurre *in vivo*, en los cultivos de 5 días *in vitro* (equivalente a 7 días *in vivo*), dado su temprano periodo de desarrollo, sólo una fracción minoritaria de las neuronas que conforman la retina presenta axones visibles (Fig. 16). Notablemente, al tratar a los cultivos con la BMAA, se observó que ésta estimula el crecimiento de los axones en las neuronas amacrinas, aumentando su largo en unas 0,5 veces respecto de los cultivos controles (Fig. 16 E, M). Por el contrario, la BMAA no ejerció efectos significativos sobre la longitud de los axones en los FRs (Fig. 16 J, M).

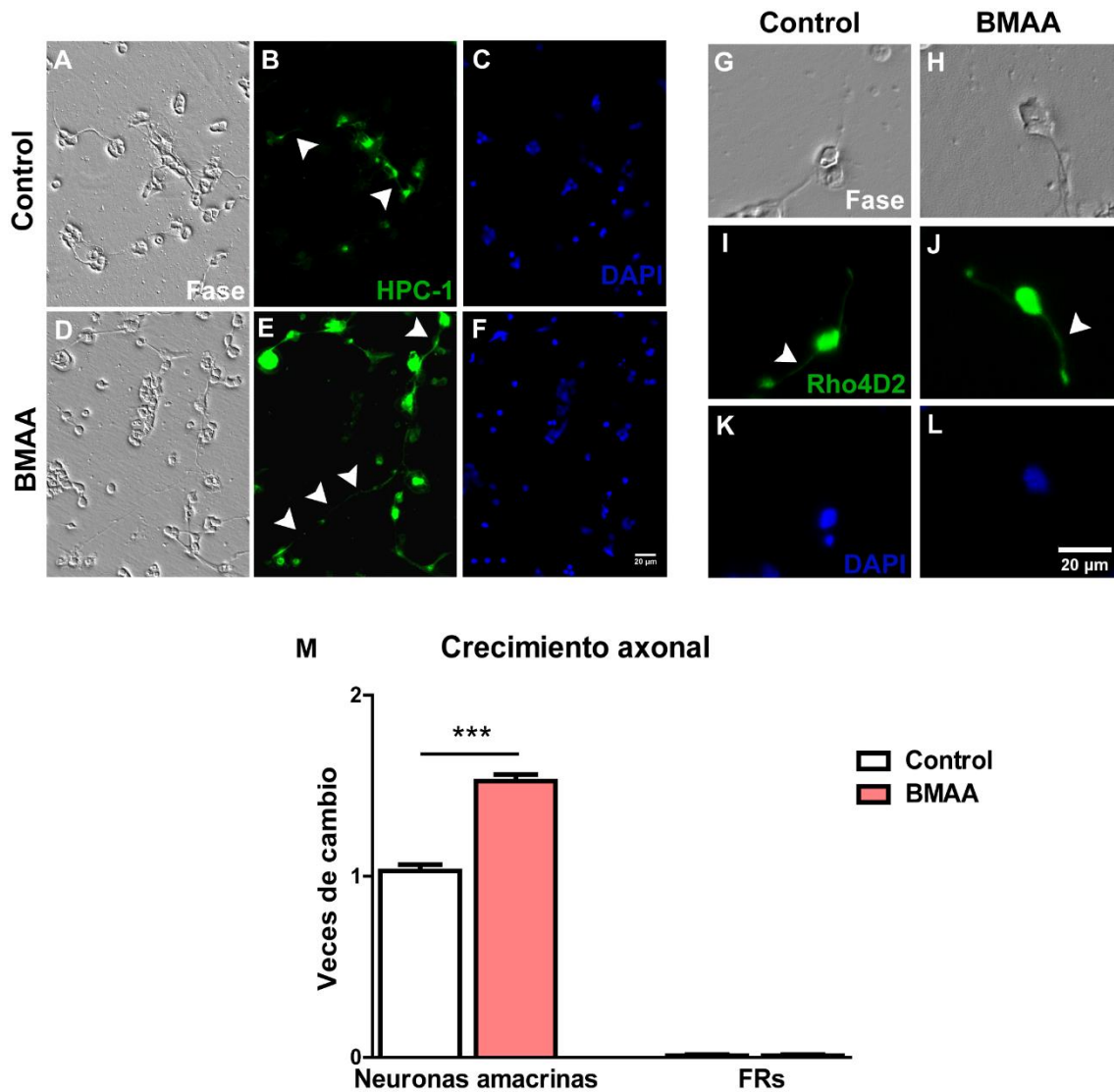


Figura 16. La BMAA indujo el crecimiento axonal en neuronas amacrininas. Imágenes de fase (A, D, G, H) y de fluorescencia (B, C, E, F, I, J, K, L), de cultivos neuronales de 5 días incubados con la toxina o su vehículo (control). Las neuronas amacrininas (A-F) y los FRs (G-L) fueron identificados por su morfología característica y por inmunocitoquímica con los anticuerpos HPC-1 y Rho4D2, respectivamente. Los núcleos fueron marcados con la sonda DAPI (C, F, K, L). Las neuronas amacrininas presentaron axones más largos en los cultivos tratados con la BMAA, que en los controles (cabezas de flecha en B, E), mientras que los FRs no presentaron diferencias (cabezas de flecha en I, J). Las barras en las imágenes representan 20 μm . El gráfico de barras (M) muestra el aumento en el número de neuronas con axones largos, comparando controles y tratados. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por test de *student* (M). (***) : $p \leq 0,001$. El crecimiento axonal se evaluó utilizando el software ImageJ, que identificó neuronas amacrininas con núcleos marcados con DAPI y axones con Tuj-1; se analizaron 10 campos por cápsula. Se utilizaron 3 cápsulas por condición para cada experimento.

La BMAA indujo la desorganización de los conos axonales en neuronas amacrininas

Dados los efectos deletéreos de la toxina, su inesperado efecto estimulador sobre el crecimiento de los axones planteó la pregunta respecto de la integridad de los mismos. Por ello, se investigó este aspecto analizando la estructura y la distribución de las proteínas tubulina y actina. En los cultivos controles, las neuronas amacrininas marcadas con Tuj-1 y faloidina mostraron su morfología característica, con una distribución normal de tubulina y actina (Fig. 17 A-C). Por el contrario, en los cultivos tratados con la BMAA, la tinción con Tuj-1 fue difusa y los extremos de los conos de crecimiento marcados con faloidina mostraron la distribución de actina de manera desorganizada (Fig. 17 D-F). El análisis cuantitativo de estos resultados, mostró que la BMAA incrementó 0,6 veces el número de neuronas amacrininas con conos desorganizados, en comparación con los cultivos controles (Fig. 17).

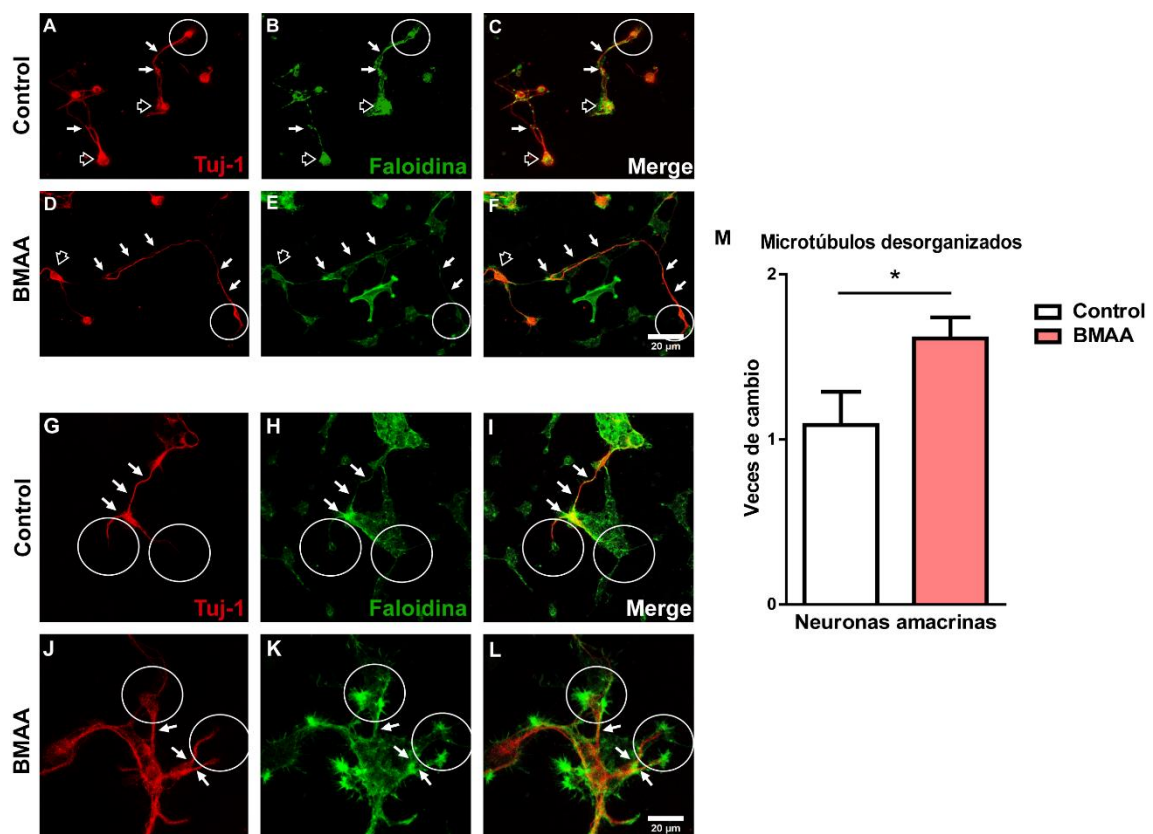


Figura 17. La BMAA indujo alteraciones en los conos de crecimiento de las neuronas amacrininas. Imágenes de fluorescencia (A-L) de cultivos neuronales de 5 días, incubados con BMAA o Hank's (control) durante 3 días. Los axones fueron identificados con el anticuerpo Tuj-1 (marcación roja en A, C, D, F, G, I, J, L) y los filamentos de actina con faloidina (marcación verde en B, C, E, F, H, I, K, L). Las flechas (A-F) y los círculos (G-L) señalan el crecimiento axonal y los conos de crecimiento, respectivamente. Nótese que el largo de los axones en los cultivos tratados (D-F), fue superior al de los controles (A-C). También se pueden observar los extremos

distales de los axones con la distribución desorganizada de faloidina luego del tratamiento con la BMAA (J-L). La barra en las imágenes corresponde a 20 μm . El gráfico de barras (M) muestra el incremento en el número de conos de crecimiento desorganizados de neuronas amacrin, en los cultivos tratados con la BMAA respecto de los controles. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se realizó mediante el test de *student* (I). (*): $p \leq 0,05$.

El crecimiento axonal generado por la BMAA dependió de la activación de los receptores NMDA

Para investigar si la estimulación del crecimiento de los axones por la BMAA en las neuronas amacrin dependía de la activación de los receptores NMDA, cultivos neuronales de 2 días fueron incubados con el antagonista MK-801, previo al agregado de la BMAA o su vehículo. Como se muestra en la figura 18, la presencia del MK-801 evitó el desarrollo anormal promovido por la BMAA (Fig. 18 D). Los incrementos en el largo de los axones inducidos por la BMAA, fueron de 0,5 veces más que en los controles (Fig. 18 C, E), mientras que en cultivos pre-tratados con MK-801 y luego con BMAA los axones presentaron la misma longitud que en los controles (Fig. 18 D, E). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que el efecto de la BMAA sobre el largo de los axones fue dependiente de la activación de los receptores NMDA.

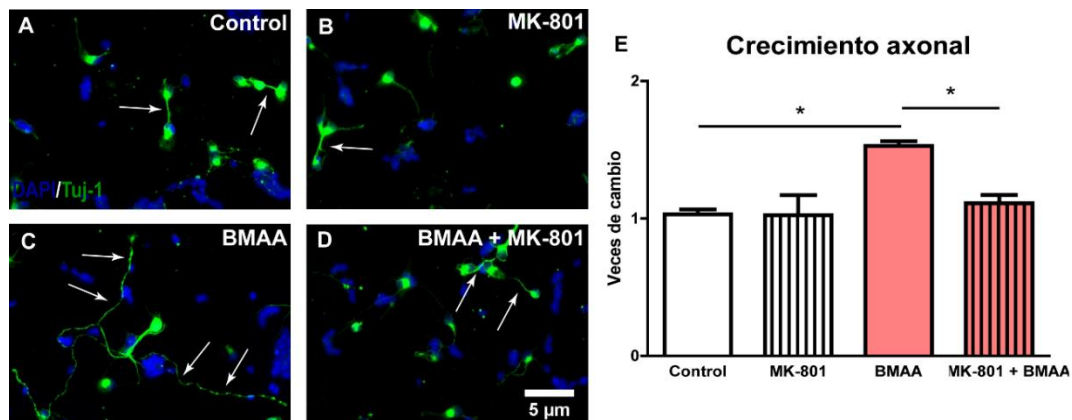


Figura 18. La pre-incubación con el MK-801 evitó el crecimiento axonal promovido por la BMAA en neuronas amacrin. (A-D) Imágenes de fluorescencia de cultivos neuronales pre-tratados con el antagonista MK-801 durante 3 días, previo al agregado de BMAA o Hank's (control). Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul) y las neuronas amacrin con Tuj-1 (verde). Nótese que los axones de las neuronas amacrin (flechas) son más largos en los cultivos tratados con la BMAA (C) que en las demás condiciones (A, D). La barra corresponde a 5 μm . El gráfico de barras (E) indica los cambios del largo axonal en neuronas amacrin en las distintas condiciones de cultivo. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3

experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido del test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$.

La pre-incubación con Ser protegió a las neuronas de la toxicidad inducida por la BMAA

Como se expusiera anteriormente, la BMAA es un aminoácido capaz de reemplazar a la serina (Ser) en las cadenas aminoacídicas de las proteínas ocasionando plegamientos anómalos que pueden impactar sobre la viabilidad celular.

Para determinar la importancia sobre la degeneración neuronal del reemplazo de Ser por la BMAA, se realizaron experimentos de competencia entre ambos aminoácidos. Para ello, se pre-incubaron los cultivos neuronales con concentraciones crecientes de Ser en un rango entre 25 μM y 100 μM de Ser. Mientras que, en los cultivos tratados con BMAA, los porcentajes de FRs con núcleos fragmentados alcanzaron un 60 %, en aquellos pre-incubados con 25 μM a 100 μM de Ser, presentaron porcentajes similares al control. Sin embargo, en neuronas amacrinas sólo se observó dicho efecto protector con las concentraciones 25 μM y 50 μM de Ser; mientras que la concentración de 100 μM , resultó tóxica *per se* y no tuvo efectos protectores (Fig. 19 A). Por lo tanto, se utilizó la concentración más baja de Ser (25 μM) para los experimentos subsiguientes.

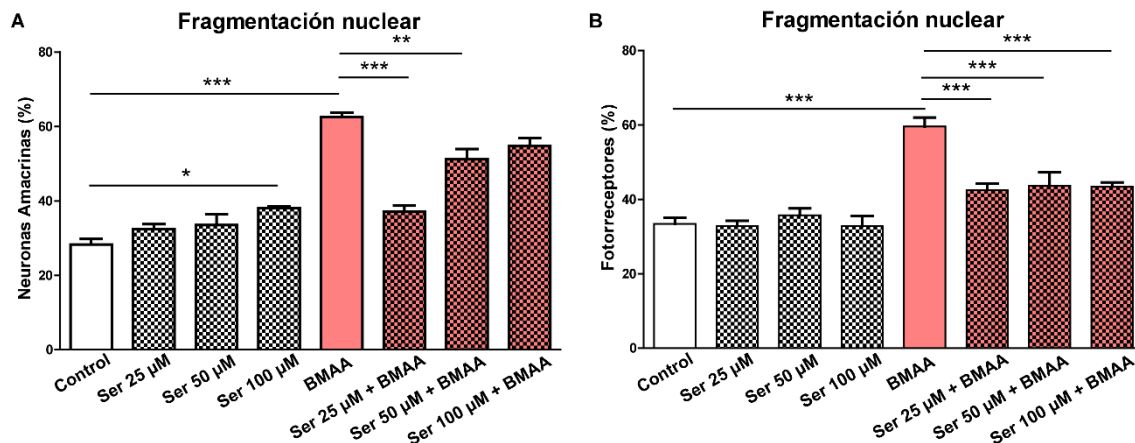


Figura 19. El aminoácido Ser previno la fragmentación nuclear inducida por la BMAA. Los gráficos indican el porcentaje de neuronas amacrinas y FRs que exhibieron fragmentación nuclear en cultivos neuronales puros de 5 días, pre-incubados con concentraciones crecientes de Ser en un rango entre 25 μM a 100 μM , y tratados con BMAA o Hank's (control) durante 3 días. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido del test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$, (***) : $p \leq 0,001$.

Además, en los cultivos controles sólo un 1,7 % de neuronas amacrinias y 2,5 % de FRs sufrieron apoptosis (Fig. 20 M, N). Sin embargo, en presencia de BMAA, estos valores se incrementaron hasta alcanzar porcentajes de 4 % y 5,5 %, respectivamente. Asimismo, la pre-incubación de los cultivos con Ser disminuyó los porcentajes de apoptosis en neuronas amacrinias y FRs, hasta valores de un 1 % y 3 %, respectivamente (Fig. 20). En conclusión, la presencia de Ser, en concentraciones adecuadas, previno la toxicidad generada por la BMAA.

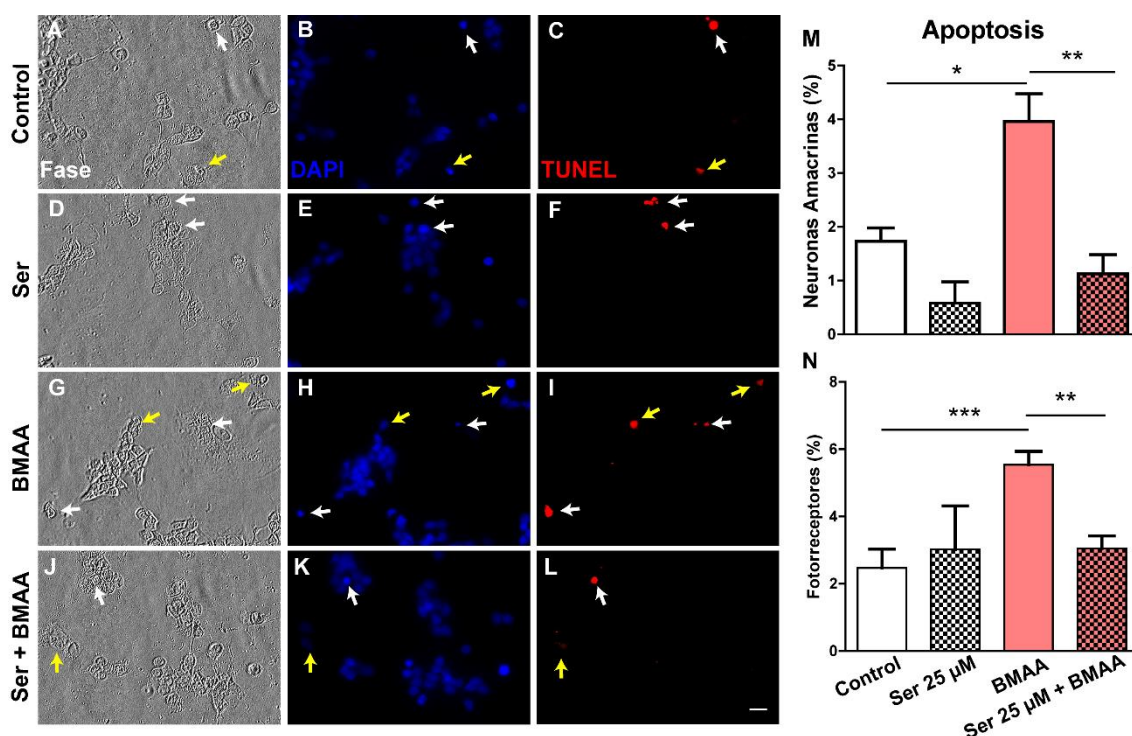


Figura 20. La Ser protegió a las neuronas de la apoptosis inducida por la BMAA. Imágenes de fase (A, D, G, J) y fluorescencia (B, C, E, F, H, I, K, L) de cultivos neuronales de 5 días, pre-incubados con Ser 25 μ M y tratados con BMAA o Hank's (control) durante 3 días. La fragmentación nuclear fue evaluada por DAPI (B, E, H, K) y la apoptosis por TUNEL (C, F, I, L). Las flechas muestran neuronas apoptóticas, con núcleos fragmentados o picnóticos. La barra representa 20 μ m. Los gráficos (M) y (N) muestran el porcentaje de neuronas amacrinias y FRs apoptóticas respectivamente. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de Tukey. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$, (***): $p \leq 0,001$.

La activación de los RXRs protegió a las neuronas de la muerte inducida por la toxina

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron que la activación de los Receptores nucleares X Retinoides (RXRs) protegen a los FRs (German y col., 2013). Para investigar si su activación protegía a las neuronas de la retina de los daños inducidos

por la BMAA, los cultivos se pre-incubaron con el agonista de estos receptores, el HX630, en un rango de concentraciones de 0,01 μM , 0,1 μM y 1 μM , establecidas previamente (Ayala-Peña y col., 2016; German y col., 2013). Los resultados mostraron que en los cultivos tratados con la BMAA, el porcentaje de neuronas amacrinicas y FRs con núcleos fragmentados o picnóticos alcanzó un 64 % y 57 %, respectivamente. En contraste, cuando los cultivos fueron pretratados con HX630 1 μM , los porcentajes de neuronas amacrinicas y FRs con fragmentación nuclear se redujeron a 30 % y 45 %, respectivamente (Fig. 21 A, B). Por su parte, concentraciones menores de HX630 sólo protegieron parcialmente a ambas poblaciones neuronales (Fig. 21 A, B).

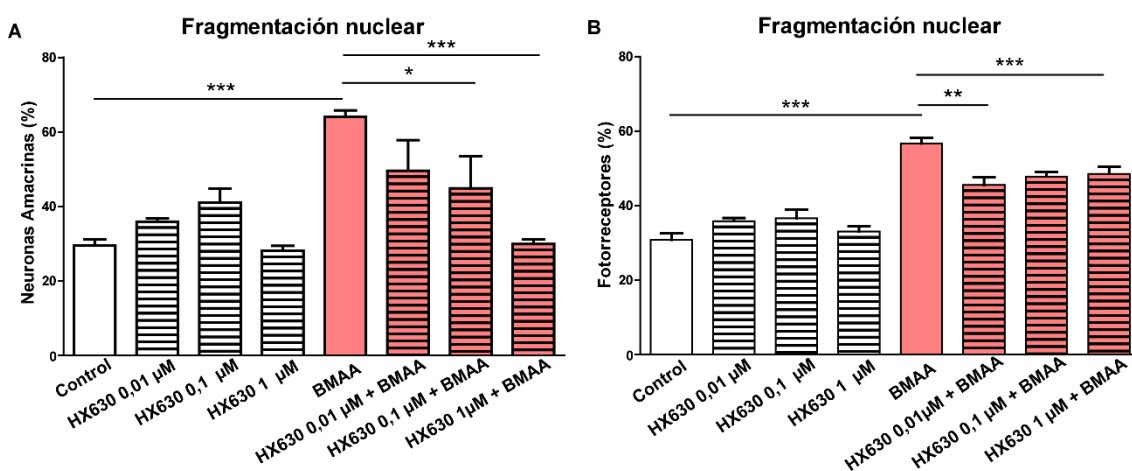


Figura 21. El agonista HX630 protegió a las neuronas de los daños inducidos por la BMAA.

Los gráficos indican el porcentaje de fragmentación nuclear en neuronas amacrinicas (A) y FRs (B) en cultivos neuronales de 5 días, pre-incubados con el agonista HX630 (0,01 μM , 0,1 μM y 1 μM), y tratados con BMAA o Hank's (control) durante 3 días. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido del test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$, (***) : $p \leq 0,001$.

La pre-incubación con el agonista HX630 previno la disminución del potencial de membrana mitocondrial neuronal

Para evaluar el posible efecto protector de los RXRs sobre los daños inducidos por la BMAA en las mitocondrias, se evaluó el estado del potencial de membrana mitocondrial en cultivos pre-incubados con distintas concentraciones del agonista HX630, y luego tratados con BMAA. En los cultivos controles, en forma similar a los tratados solamente con HX630 1 μM , los porcentajes de neuronas amacrinicas y FRs que mostraron mitocondrias activas alcanzaron valores de 80 % y 73 %, respectivamente (Fig. 22 B, D, I, J). Estos porcentajes disminuyeron significativamente, hasta valores de 45 % y 48,6 % luego de los tratamientos con la BMAA, en neuronas amacrinicas y FRs, respectivamente (Fig. 22 F, I, J). Sin embargo, la pre-incubación con HX630 1 μM previno estos efectos de la BMAA: el porcentaje de neuronas amacrinicas con

mitocondrias activas fue del 79 %, y el de FRs, 72,5 % (Fig. 22 H, I, J). En base a estos resultados, se eligió la concentración de HX630 1 μM para realizar los experimentos siguientes.

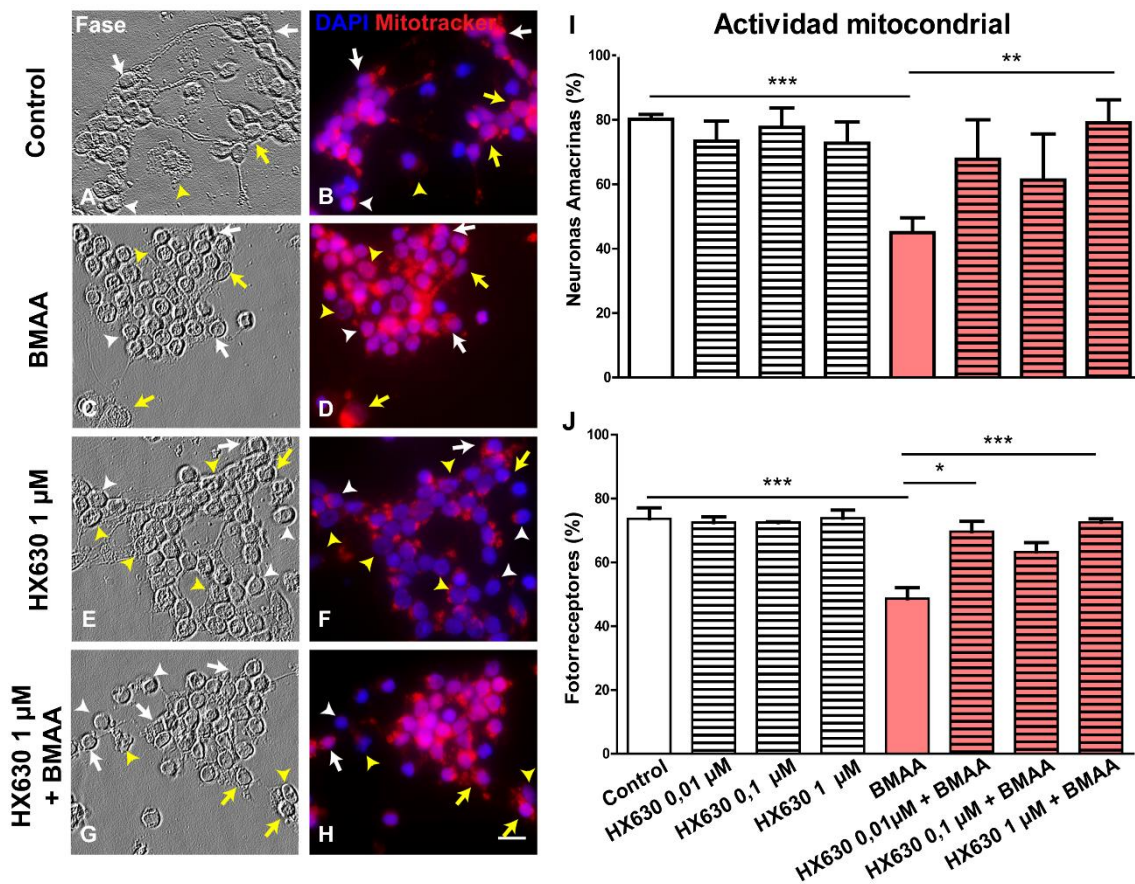


Figura 22. Alteraciones en la actividad mitocondrial inducidas por la BMAA y su prevención mediante la activación de los RXRs. Imágenes de fase (A, C, E, G) y de fluorescencia (B, D, F, H) de cultivos neuronales de 5 días, pre-incubados con HX630 0,01 μM , 0,1 μM y 1 μM (I, J), y tratados con la BMAA o Hank's (control) durante 3 días. El estado del potencial de membrana mitocondrial fue evaluado a través de la sonda Mitotracker (B, D, F, H). Las flechas amarillas señalan las neuronas amacrinas y las flechas blancas los FRs con actividad mitocondrial intacta, mientras que las cabezas de flecha señalan aquellas neuronas con actividad mitocondrial alterada. La escala representa 20 μm . Las barras muestran el porcentaje de actividad mitocondrial en neuronas amacrinas (I) y FRs (J). Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$, (***) : $p \leq 0,001$.

El agonista de los RXRs, el HX630, previno la apoptosis y el estrés oxidativo promovidos por la BMAA

Seguidamente se analizó, a través de la técnica de TUNEL, si la activación de los RXRs protegía de la apoptosis a las neuronas en cultivo (Fig. 23). Como se mencionó previamente, en los cultivos controles los porcentajes de neuronas que sufrieron apoptosis fueron de un 2 % y un 2,5 % para neuronas amacrinicas y FRs, respectivamente. Estos valores se incrementaron al doble cuando los cultivos fueron tratados con la BMAA (4 % en neuronas amacrinicas y 5,5 % en FRs) (Fig. 23 I, M, N). Por el contrario, cuando los cultivos incubados con BMAA fueron pre-tratados con HX630 1 μ M, los porcentajes de apoptosis en los FRs se redujeron a un 2,8 % (Fig. 23 L, N). Sin embargo, en neuronas amacrinicas no se observó dicha protección ya que, si bien el porcentaje de neuronas apoptóticas se redujo al 3 %, esta diferencia no fue significativa (Fig. 23 L, M).

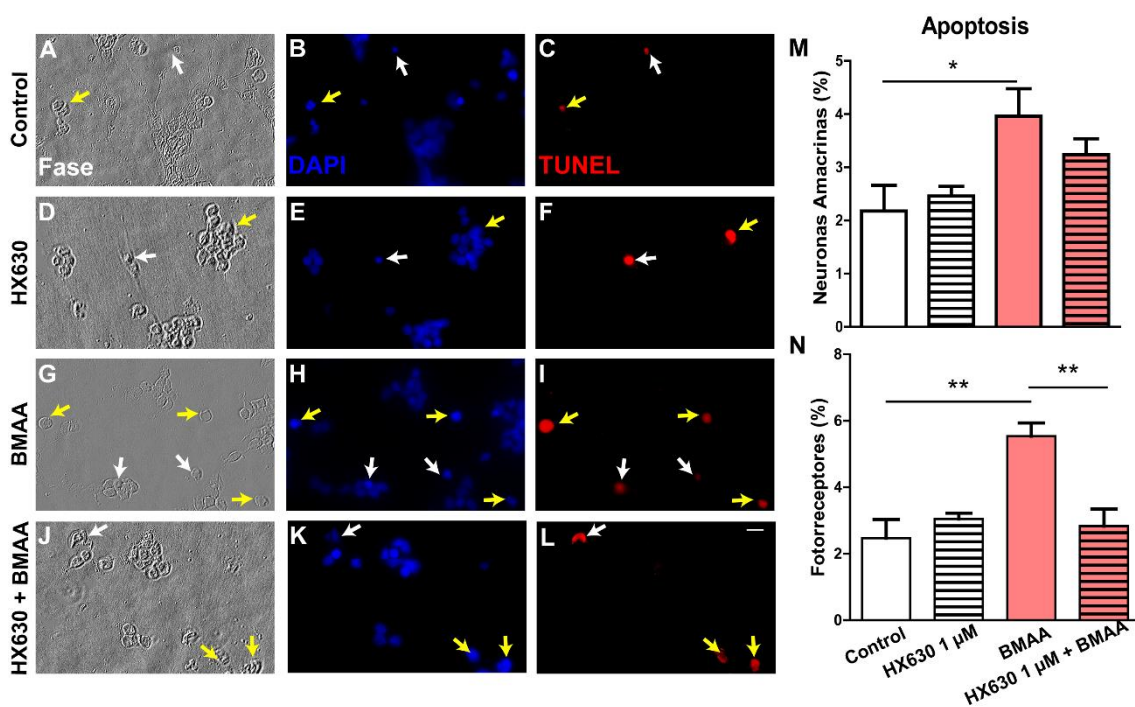


Figura 23. Protección de la apoptosis inducida por la BMAA, por el HX630, un agonista de los RXRs. Imágenes de fase (A, D, G, J) y de fluorescencia (B, C, E, F, H, I, K, L) de cultivos neuronales de 5 días, pre-incubados con HX630 1 μ M y tratados con BMAA o Hank's (control) durante 3 días. La fragmentación nuclear fue evaluada por DAPI (B, E, H, K) y la apoptosis por TUNEL (C, F, I, L). Las flechas muestran neuronas apoptóticas con núcleos fragmentados o picnóticos. La escala representa 20 μ m. Las barras muestran el porcentaje de apoptosis en neuronas amacrinicas (M) y FRs (N). Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de Tukey. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$.

Por otro lado, se investigó si el HX630 podía prevenir la producción de ROS inducida por la BMAA en los cultivos. Para ello, se utilizó la sonda DCDCDHF. Los resultados demostraron que la toxina condujo a un incremento de 2,5 unidades arbitrarias (UA), respecto de los controles, en la generación de ROS, tanto en las neuronas amacrinas como en los FRs. Por el contrario, cuando estos cultivos fueron pre-incubados con HX630 1 μ M, estos valores disminuyeron a niveles similares al control (0,85 UA y 0,96 UA, en neuronas amacrinas y en FRs respectivamente) (Fig. 24 H-J).

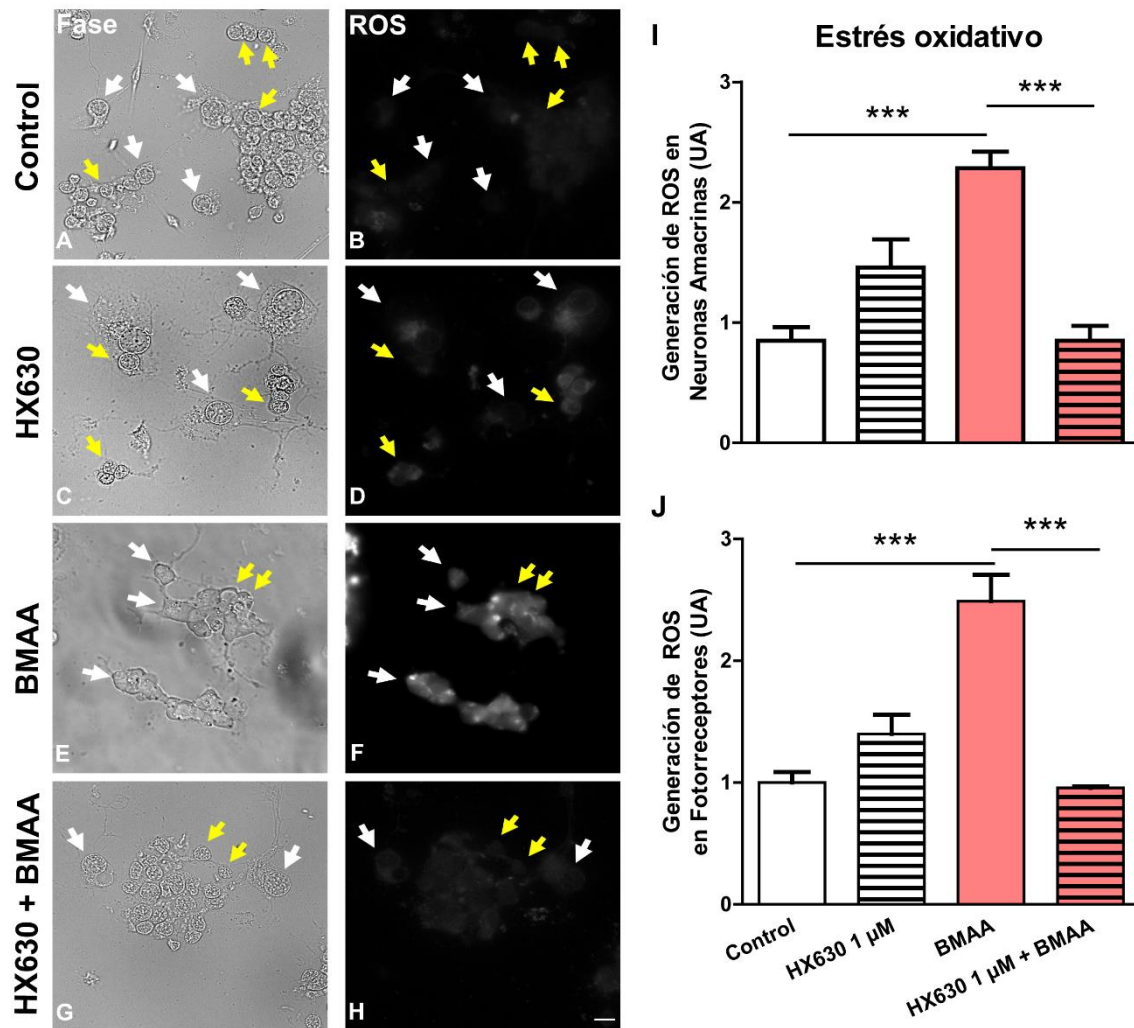
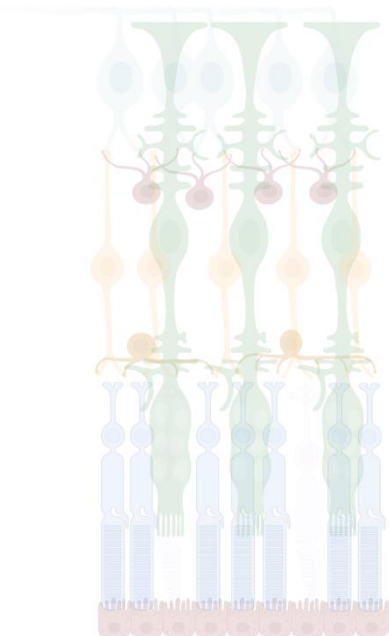


Figura 24. La producción de ROS promovida por la BMAA fue prevenida por el agonista HX630. Imágenes de fase (A, C, E, G) y de fluorescencia (B, D, F, H) de cultivos neuronales de 5 días, pre-incubados con HX630 1 μ M y tratados con BMAA o Hank's (control) durante 3 días. La producción de ROS fue evaluada según la intensidad de fluorescencia emitida por las células neuronales. Las flechas blancas señalan neuronas amacrinas y las flechas amarillas FRs que sufrieron estrés oxidativo. La escala representa 20 μ m. Las barras muestran el incremento en la generación de ROS en neuronas amacrinas (I) y FRs (J). Los resultados representan el promedio

± SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (**): $p \leq 0,001$.

Efectos de la BMAA sobre células PC12 diferenciadas



La BMAA promovió la muerte de células PC12

Dado que las células PC12, una vez diferenciadas, comparten propiedades similares a las neuronas, se evaluó si la BMAA también promovía alteraciones en este tipo de células. Para ello, luego de 2 días de inducida la diferenciación neuronal, se las incubó con 0,4 μM y 1 μM de BMAA durante 3 días. Los resultados mostraron que sólo la concentración de BMAA 1 μM generó un aumento significativo, cercano al doble, en el número de células con núcleos fragmentados respecto al control (Fig. 25 A). Cuando se evaluó la muerte celular mediante la técnica de Trypan Blue, también se observó un incremento de 0,8 veces en los valores de muerte celular (Fig. 25 B). Por lo tanto, la BMAA también resultó tóxica para las células PC12 diferenciadas.

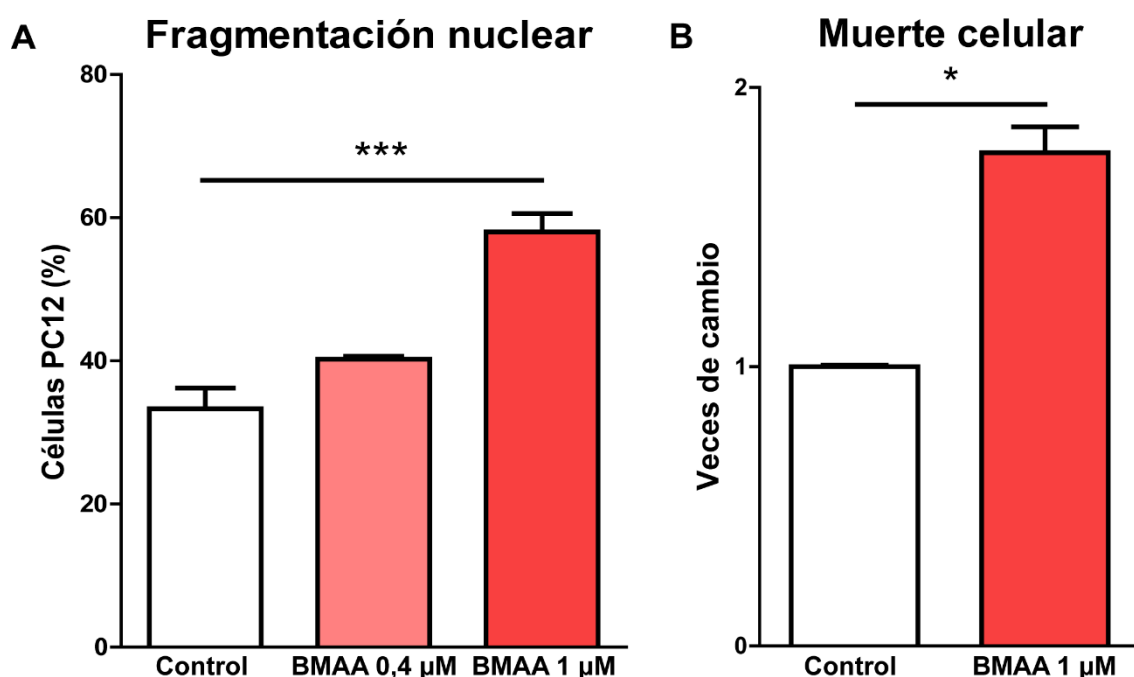


Figura 25. La BMAA promovió la muerte en células de la línea PC12. Las células PC12 diferenciadas a neuronas fueron incubadas durante 3 días con 2 concentraciones de la BMAA (0,4 μM y 1 μM). Las barras muestran el porcentaje de fragmentación nuclear (A) y los valores relativos de muerte celular (B), evaluados por DAPI y Trypan Blue, respectivamente. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*, y por el test de *student*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$, (***): $p \leq 0,001$.

La BMAA indujo el crecimiento de prolongaciones similares a axones en células PC12

También se investigó si el efecto de la BMAA sobre el crecimiento de los axones en las neuronas amacrinas, podría repetirse en las células PC12 diferenciadas. En los cultivos

controles, sólo unas pocas células (Fig. 26 A) mostraron procesos similares a axones. En contraste, al analizar los cultivos tratados con la BMAA, se evidenció un aumento de estos procesos, un efecto que fue acompañado por la intensa fluorescencia del marcador neuronal Tuj-1 (Fig. 26 B). Por su parte, en los cultivos incubados con la BMAA, la expresión de la proteína Tuj-1 analizada mediante la técnica de Western Blot mostró una disminución significativa de la misma respecto al control (Fig. 26 C, D). No obstante, el marcador Tuj-1 acompañó la casi totalidad de los procesos similares a axones. Por lo tanto, la BMAA, por un lado, indujo un incremento en el número de procesos similares a axones, mientras que, por otro, provocó una reducción significativa en la expresión de Tuj-1, aunque esta expresión se mantuvo marcando en forma intensa los procesos similares a axones.

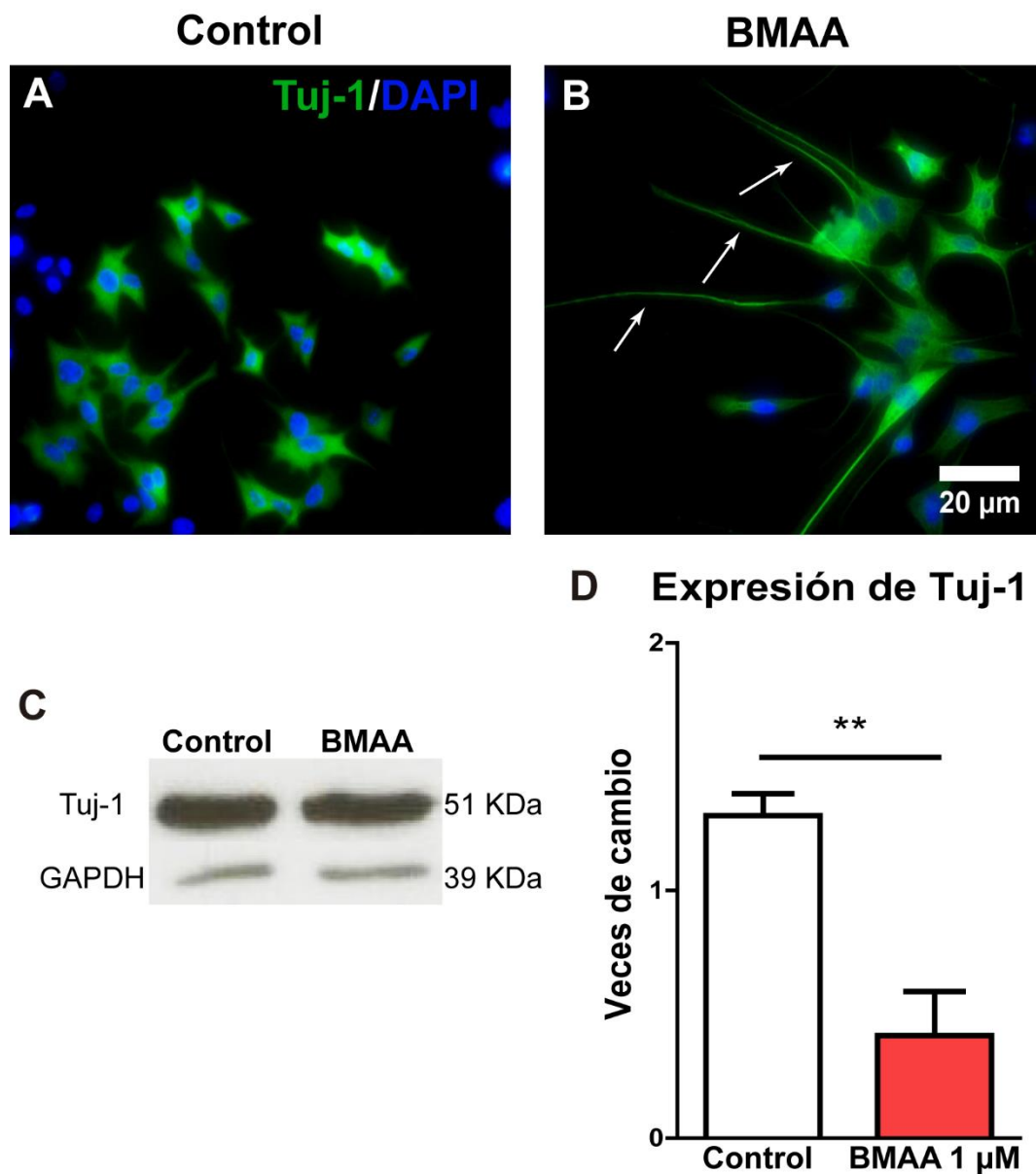


Figura 26. La BMAA estimuló el crecimiento de procesos similares a axones en células PC12, y redujo la expresión de tubulina. Imágenes de fluorescencia de las células PC12 diferenciadas, incubadas durante 3 días con Hank's (control) (A) o BMAA (B). Las flechas indican el crecimiento de procesos similares a axones en los cultivos tratados con la toxina y marcados con Tuj-1 y DAPI. Nótese el aumento de prolongaciones similares a axones en los cultivos tratados con la BMAA, y que los mismos evidenciaron una intensa marcación con Tuj-1. La barra de escala representa 20 μm . La expresión de la proteína tubulina fue evaluada mediante la técnica de Western Blot (C), y el análisis de la misma se muestra en el gráfico de barras (D). Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por el test de *student*. (**): $p \leq 0,01$.

La BMAA no alteró el ciclo celular de las células PC12 diferenciadas

Trabajos previos han reportado que la BMAA puede alterar el ciclo celular de células en cultivo (Okamoto y col., 2018). Por lo tanto, se evaluó el ciclo celular de las células PC12 en ambos estadios. Los posibles efectos de la BMAA sobre el ciclo celular en las células PC12 diferenciadas se evaluaron mediante citometría de flujo. Los resultados mostraron que el número de eventos en los diferentes estados del ciclo, tanto en los cultivos tratados con la toxina como en los controles, no arrojaron diferencias en el porcentaje de células (Fig. 27 A, B). A su vez, utilizando la sonda DAPI se contabilizó el número de cuerpos mitóticos, y se determinó que no hubo cambios significativos entre los cultivos controles y tratados (Fig. 27 C). Por lo tanto, la BMAA no generó modificaciones en el ciclo celular de la línea PC12.

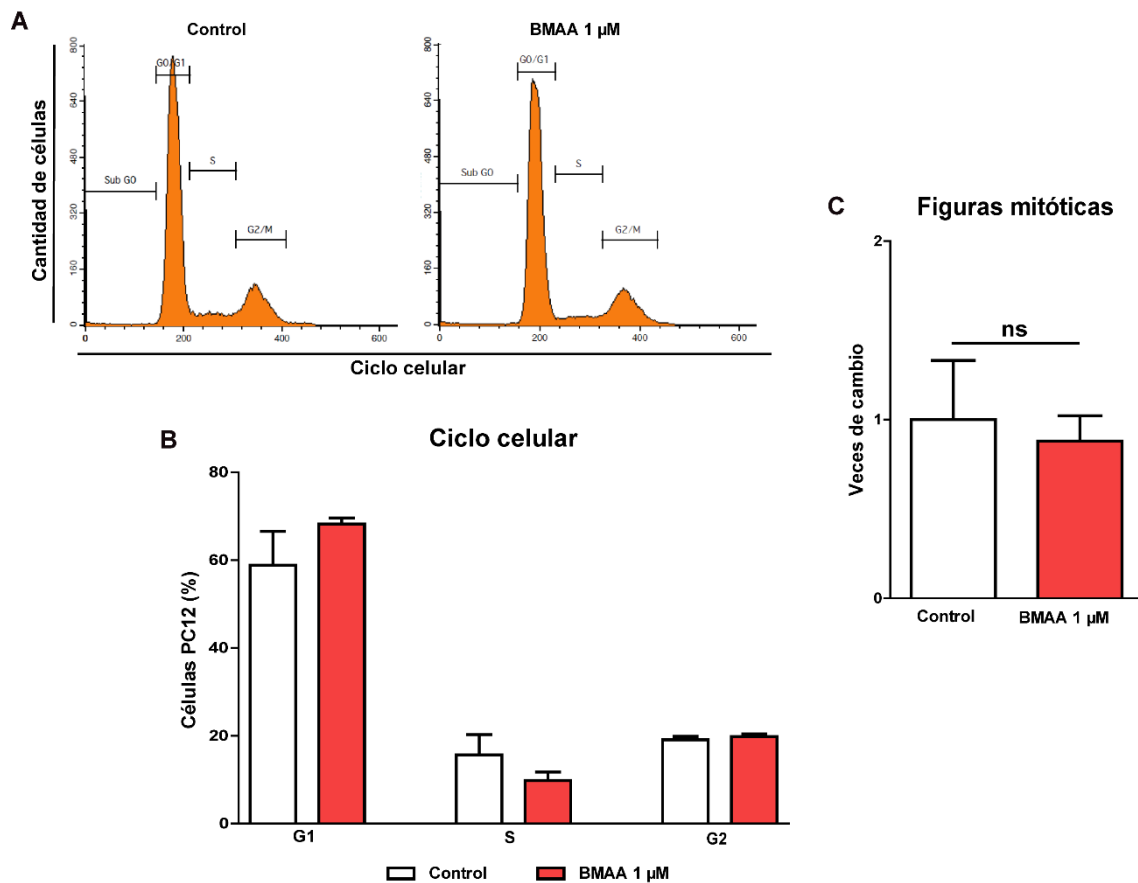
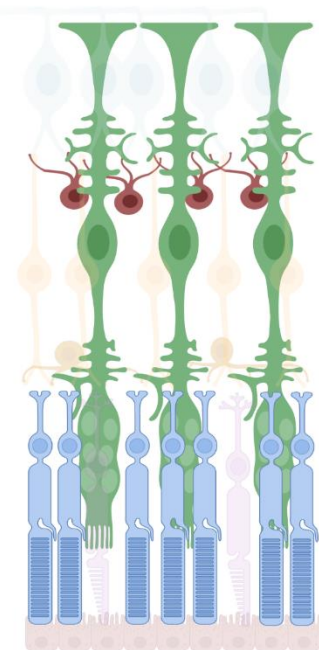


Figura 27. La BMAA no alteró el ciclo celular de las células PC12 diferenciadas. Evaluación del ciclo celular de las células PC12 diferenciadas, mediante citometría de flujo luego de incubar las células durante 3 días con Hank's (control) o BMAA (A). El gráfico de barras indica el porcentaje de células PC12 en cada fase del ciclo celular (B). El gráfico C muestra el número de cuerpos mitóticos en las células diferenciadas y tratadas con la toxina o no (control). Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por el test de *student*.

Efectos de la BMAA sobre cultivos mixtos neuro-gliales



La BMAA indujo daños sobre las CGM e impidió su acción protectora sobre las células neuronales

Para evaluar si las CGM previenen la muerte celular inducida por la BMAA, se analizó la viabilidad celular en cultivos mixtos neuro-gliales en comparación con cultivos neuronales puros. Para estos estudios en particular, dado que las CGM necesitan mayor tiempo de desarrollo *in vitro*, utilizamos cultivos mixtos de 7 días. En los cultivos neuronales puros, la BMAA indujo un incremento en el porcentaje de neuronas IP positivas, de un 5,6 % en cultivos controles a un 9,4 % en los tratados (Fig. 28 A). Por su parte, en los cultivos mixtos neuro-gliales en condiciones control, el porcentaje de muerte neuronal fue de 28 %, mientras que en los tratados con la BMAA este valor aumentó a 48,5 % (Fig. 28 A). Notablemente, al incubar con la toxina, la fragmentación nuclear se incrementó de manera similar tanto en cultivos neuronales como en cultivos mixtos. El porcentaje de fragmentación nuclear aumentó de un 27 % a un 47 %, y desde un 27,7 % a un 48,6 %, en los cultivos neuronales puros y neuro-gliales, respectivamente (Fig. 28 B). Estos resultados demostraron que, pese a la protección que se sabe ejercen las CGM a diferentes daños (De Melo y col., 2008; Bringmann y col., 2006), no previnieron la muerte neuronal inducida por la BMAA.

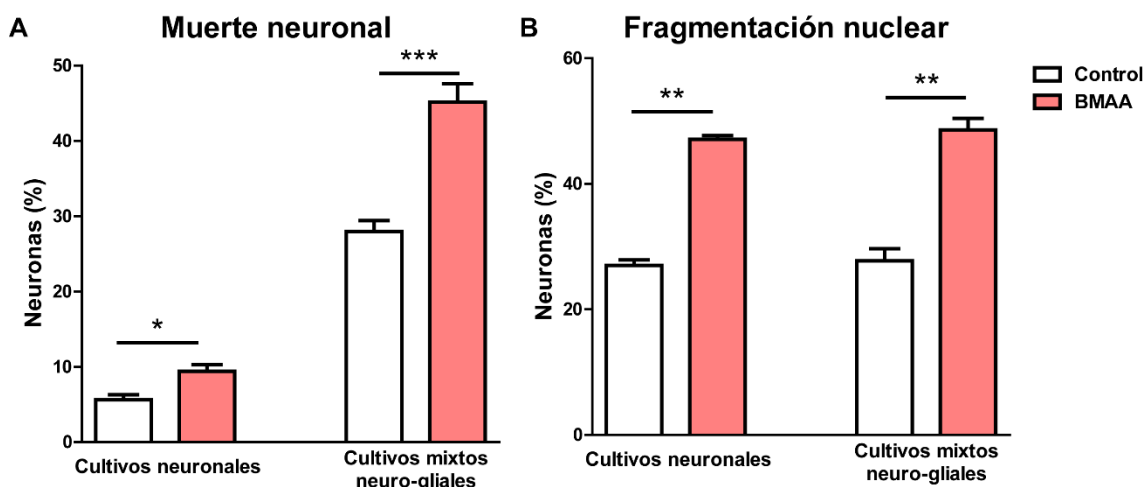


Figura 28. Las CGM no protegieron a las neuronas de la toxicidad inducida por la BMAA.

Cultivos neuronales de 5 días y cultivos mixtos neuro-gliales de 7 días fueron incubados con la toxina o Hank's (control), durante 3 y 5 días, respectivamente. Las barras muestran (A) el porcentaje de neuronas IP positivas (no viables) y (B) el porcentaje de neuronas con fragmentación nuclear, determinado por la sonda DAPI. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por el test de *student*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$, (***) : $p \leq 0,001$.

Para determinar si la incapacidad de protección se debió a que la BMAA afectaba a las CGM, se analizó su viabilidad y la integridad nuclear en cultivos neuro-gliales, tanto a corto como a largo plazo (7 y 13 días, respectivamente). Los resultados mostraron que

las CGM fueron menos afectadas que las células neuronales por la BMAA: a corto plazo, la muerte en las CGM se incrementó de 0 % a 0,6 % y la fragmentación nuclear de 0 % a 4,4 % (Fig. 29 A, B). A largo plazo, sin embargo, la toxicidad de la BMAA fue mayor; así, el porcentaje de las CGM no viables aumentó desde 1,4 % a 3,5 %, en cultivos controles y tratados, respectivamente, mientras que, para la fragmentación nuclear, estos valores aumentaron de 1,7 % a 10 % (Fig. 29 A, B). Estos resultados indicaron que la BMAA disminuyó la viabilidad de las CGM, induciendo su fragmentación nuclear e impidiendo así que ejerzan su efecto neuro-protector.

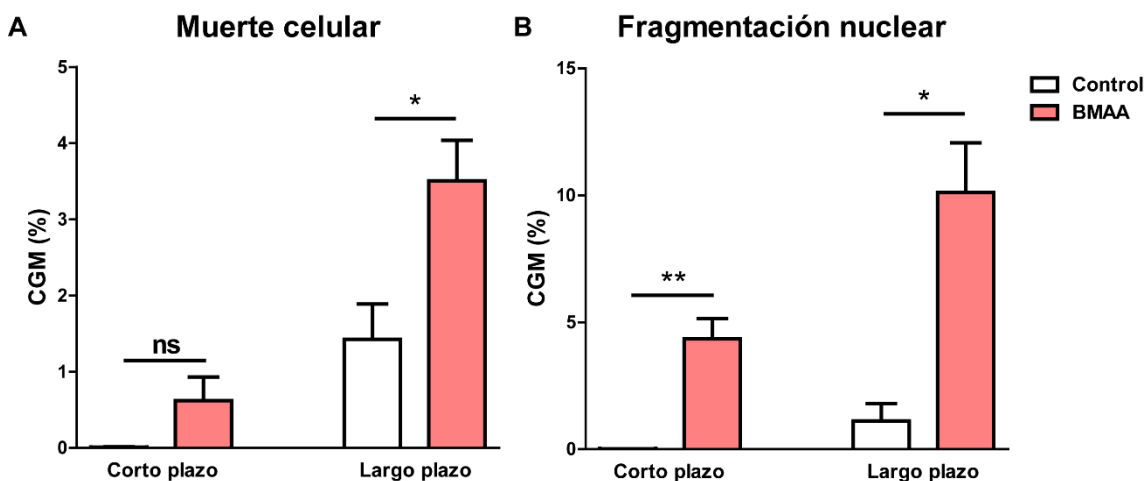


Figura 29. Alteraciones de la viabilidad de las CGM inducidas por la BMAA. Las barras muestran (A) el porcentaje de CGM IP positivas (no viables), y (B) el porcentaje de CGM con fragmentación nuclear determinado por la sonda DAPI, en cultivos mixtos neuro-gliales luego de 7 y 13 días *in vitro*, incubados con Hank's o la toxina al día 2. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por el test de *student*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$.

La BMAA indujo la retracción de los lamelipodios de las CGM

Para profundizar en el análisis de los cambios inducidos por la BMAA en las CGM, otro de los aspectos evaluados en esta Tesis fue la integridad del citoesqueleto de actina de estas células en los cultivos mixtos neuro-gliales. La BMAA alteró la morfología de las CGM al desorganizar el citoesqueleto de actina y promover la retracción de los lamelipodios (Figs. 30 D-F). En los cultivos controles, las CGM presentaron su morfología característica mostrando al citoesqueleto de actina abarcando todo el cuerpo celular y los extensos lamelipodios, los cuales exhibieron una marcación intensa con la sonda faloidina. En todos ellos, las fibras de actina mostraron una distribución ordenada acompañando la morfología celular (Fig. 30 B). En contraste, los cultivos incubados con la BMAA mostraron una evidente retracción de los lamelipodios, con un citoesqueleto

de actina desorganizado. A su vez, el citoesqueleto evidenció una menor marcación con faloidina, la cual se mantuvo más intensa en los bordes retraídos de los lamelipodios (Fig. 30 E).

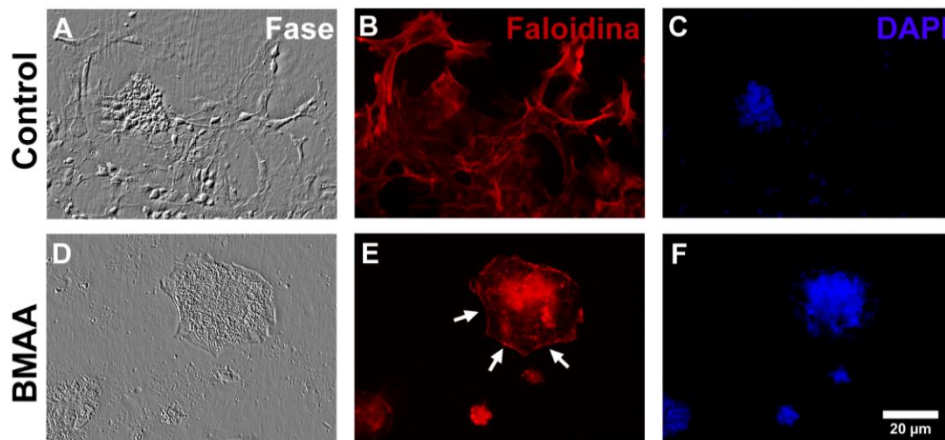


Figura 30. La BMAA ocasionó alteraciones en el citoesqueleto de actina. Imágenes de fase (A, D) y de fluorescencia (B, C, E, F) de cultivos mixtos neuro-gliales de 7 días tratados con Hank's o con la toxina al día 2. Los núcleos fueron marcados con DAPI (C, F) y el citoesqueleto de actina con faloidina (B, E). Obsérvese la retracción de los lamelipodios de las CGM en los cultivos tratados con la BMAA (flechas en E). Barra de escala: 20 µm.

La BMAA promovió el crecimiento de axones en cultivos mixtos neuro-gliales

De manera similar a lo observado en cultivos neuronales puros y en células PC12, cuando se evaluó el efecto de la BMAA sobre el crecimiento de los axones de neuronas en cultivos mixtos neuro-gliales, se observó que la BMAA promovió un aumento en el largo de los mismos (Fig. 31 B, D). Este efecto pudo observarse tanto en los cultivos desarrollados a corto, como a largo plazo. Sin embargo, en los cultivos de mayor tiempo (13 días) marcados con el anticuerpo Tuj-1, las neuronas mostraron evidencias de fragmentación en sus axones (Fig. 31 D).

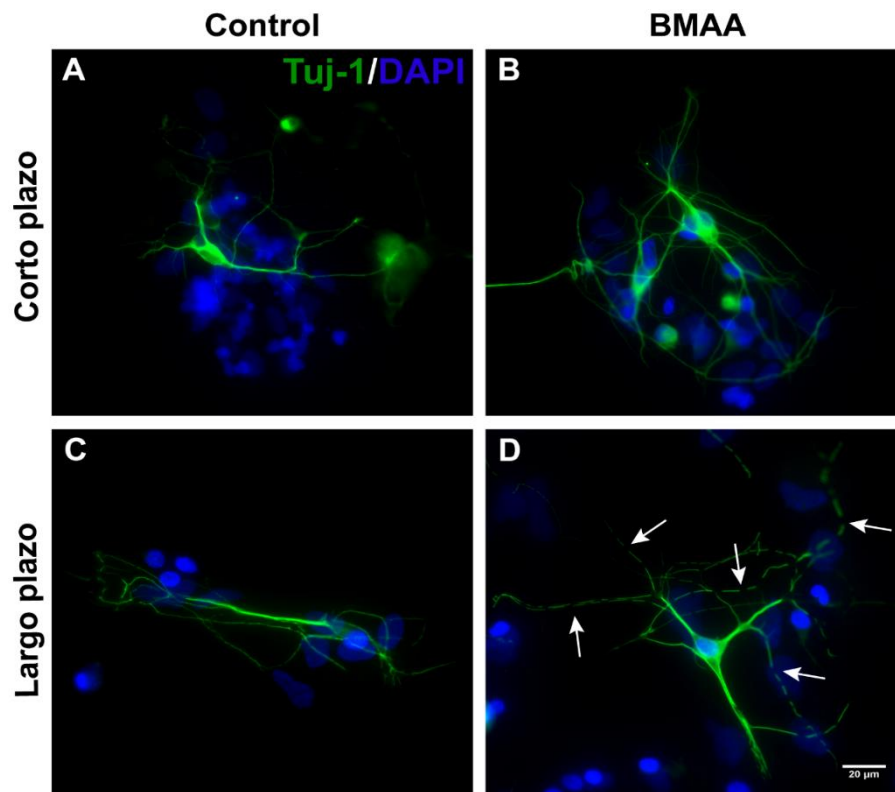
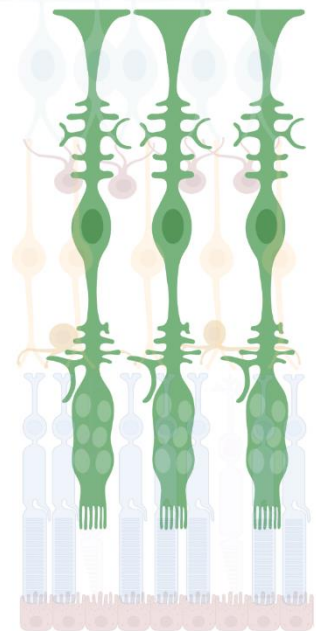


Figura 31. La BMAA indujo el crecimiento y la fragmentación de los axones en cultivos mixtos neuro-gliales a largo plazo. Imágenes de fluorescencia (A-D) de cultivos mixtos neuro-gliales a corto (A, B) y largo plazo (C, D) (7 y 13 días, respectivamente), incubados con la toxina o Hank's (control). Los axones fueron identificados con el anticuerpo Tuj-1 (verde) y los núcleos con la sonda DAPI (azul). Las flechas (D) señalan la fragmentación de los axones en los cultivos a largo plazo. La barra de escala corresponde a 20 µm.

Efectos de la BMAA sobre cultivos gliales



La BMAA indujo alteraciones nucleares en cultivos de CGM a largo plazo

Teniendo en cuenta el rol importante que cumplen las CGM como soporte en la retina entera, y que un daño sobre éstas puede impactar en las células de su entorno, se investigó el efecto de la BMAA sobre las CGM en ausencia de su interacción con las neuronas. Para ello, se utilizaron cultivos gliales puros sobre los que se realizó el tratamiento con la toxina a distintas concentraciones (0,4 μM , 1 μM y 10 μM), y se analizaron sus efectos a corto (4 días) y largo plazo (10 días). En los cultivos controles en ambos tiempos, y en los tratados a corto plazo, las células mostraron núcleos circulares con su morfología característica (Fig. 32 A, 1). Sin embargo, en los cultivos mantenidos a largo plazo, la BMAA generó alteraciones en la morfología nuclear de las CGM, los cuales presentaron invaginaciones y evaginaciones anómalas (Fig. 32 B, 2-4). Luego del tratamiento con la toxina, el número de estos núcleos irregulares fue de unas 2,5 veces con 0,4 μM , 2,8 veces con 1 μM y 2,6 veces con 10 μM de BMAA (Fig. 32 C).

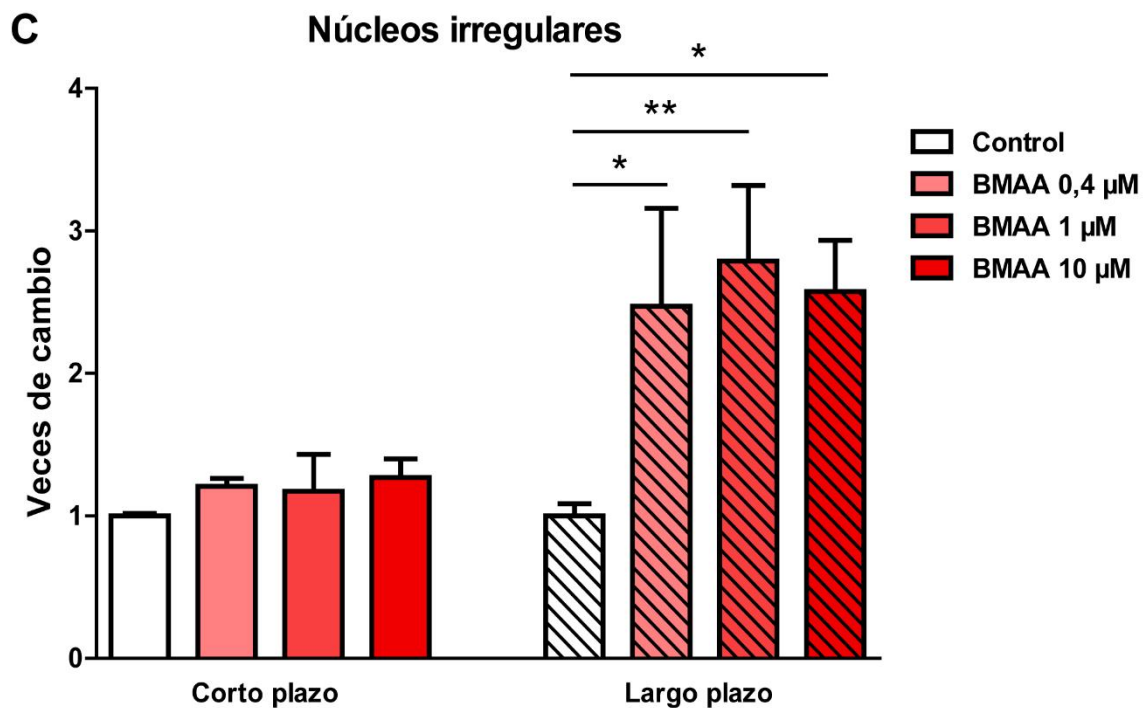
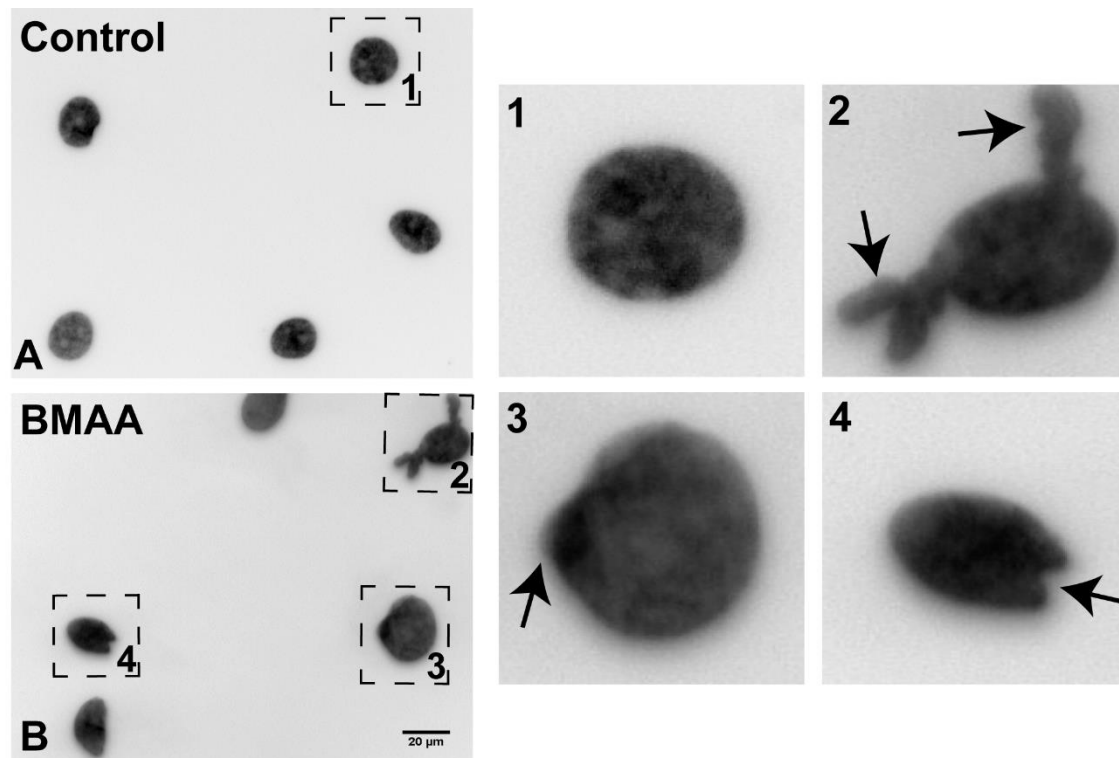


Figura 32. La BMAA indujo alteraciones en la morfología nuclear de las CGM. Imágenes de fluorescencia (A, B 1-4) de cultivos gliales puros de 10 días (largo plazo), incubados con la toxina o Hank's (control). Los núcleos fueron marcados con la sonda DAPI (negro), y pueden observarse con morfología normal (1), con evaginaciones (2 y 3) o con invaginaciones (4). La barra de escala corresponde a 20 μm. El gráfico de barras muestra el número de CGM que presentan núcleos con alteraciones (C) en cultivos gliales puros a corto (4 días) y largo plazo (10 días). Los

resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$.

La BMAA no afectó la viabilidad celular de las CGM

Dado que los daños y alteraciones nucleares podrían afectar la viabilidad celular, se determinó si la toxina alteraba la misma en las CGM. Para ello, se utilizaron cultivos gliales puros obtenidos a corto y largo plazo, los cuales fueron incubados con 0,4 μM , 1 μM y 10 μM de BMAA, y luego marcados con Trypan Blue. El análisis cuantitativo mostró que, a los dos tiempos estudiados, de corto y largo plazo, la toxina no afectó la viabilidad de las CGM (Fig. 33).

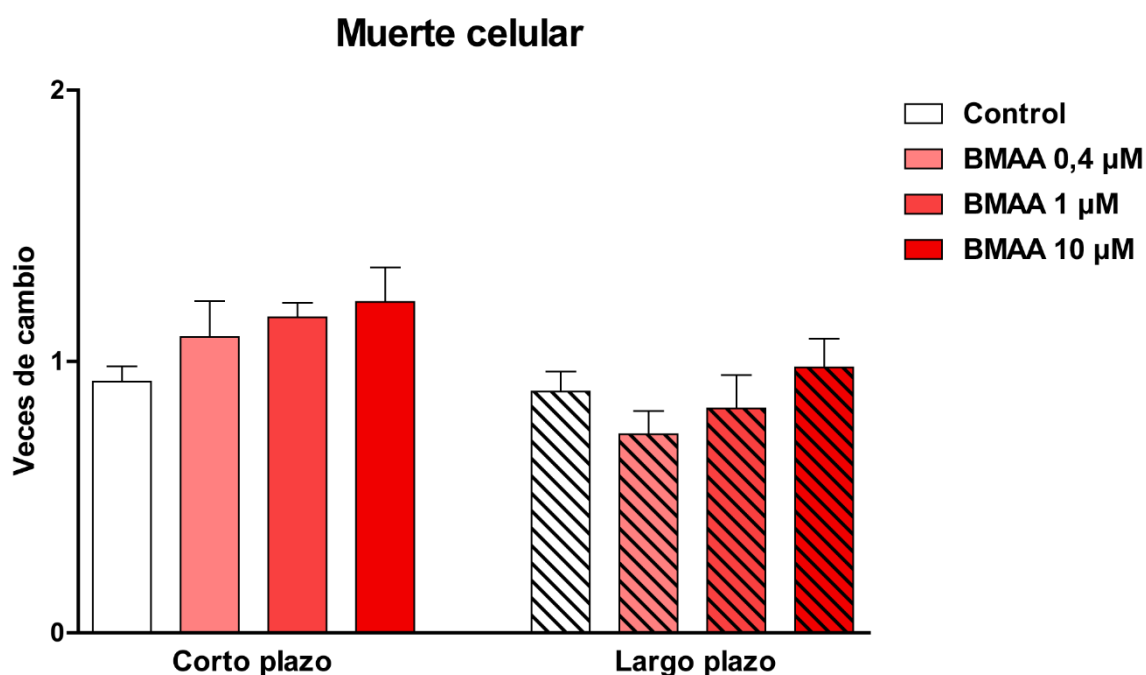


Figura 33. La BMAA no alteró la viabilidad de las CGM. Cultivos gliales puros de 4 días (corto plazo) y 10 días (largo plazo) fueron incubados con distintas concentraciones de la toxina o no (controles), durante 3 y 9 días, respectivamente. Las barras muestran la variación en el número de CGM Trypan Blue positivas en las tratadas respecto a los cultivos controles. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*.

La BMAA no modificó el ciclo celular de las CGM

Posteriormente se evaluó mediante citometría de flujo el efecto de la BMAA sobre el ciclo celular en cultivos gliales puros a corto y largo plazo. Luego de analizar aproximadamente 10.000 eventos, los resultados mostraron un número de eventos similar en todas las concentraciones de la toxina y en ambos tiempos, sin diferencias en el porcentaje de células en los diferentes estados del ciclo (G0/G1, S y G2/M). Por lo tanto, la BMAA no afectó el ciclo celular de las CGM a ninguno de los tiempos analizados ni de las fases, del ciclo (Fig. 34).

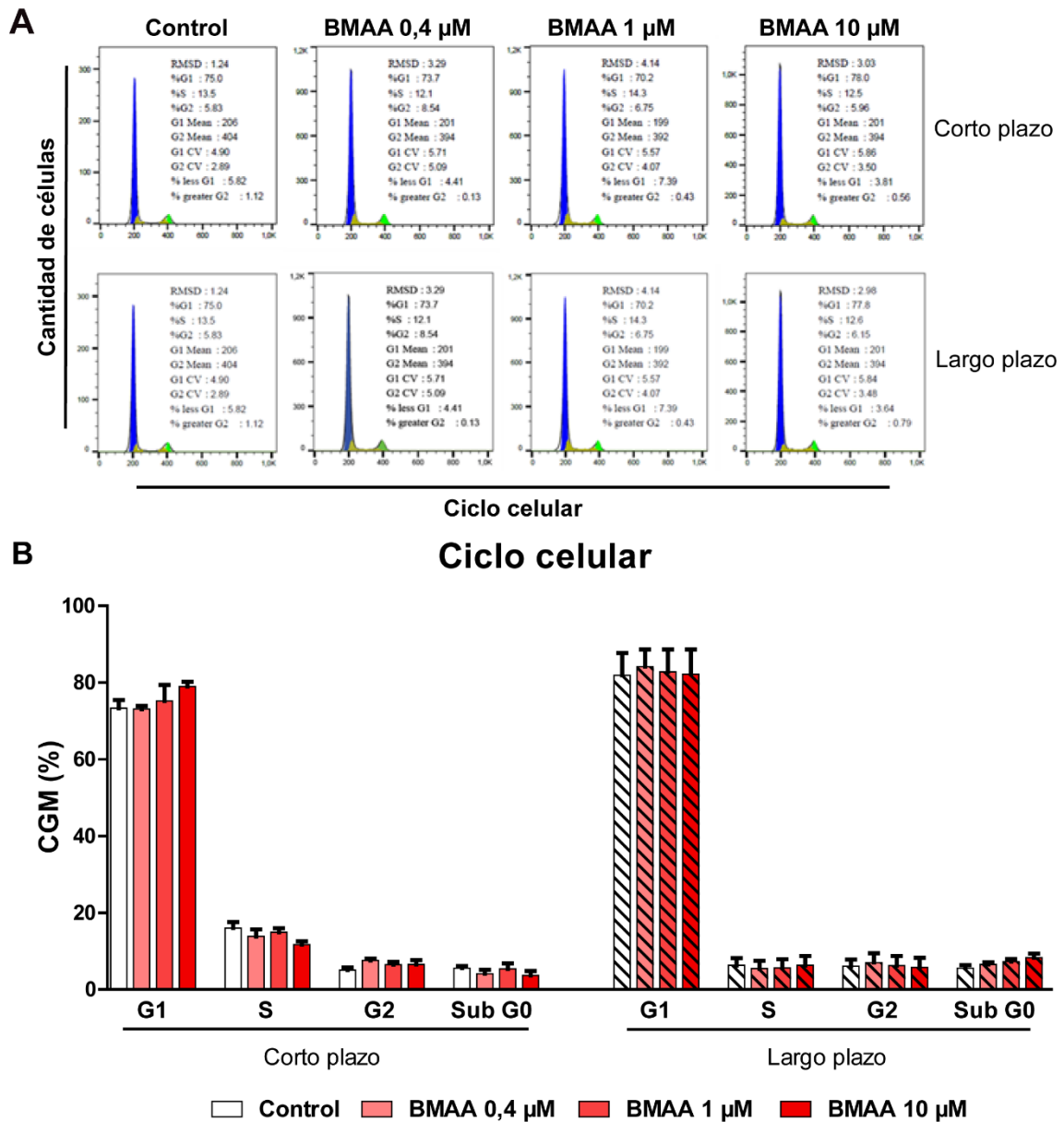


Figura 34. La BMAA no alteró el ciclo celular de las CGM en los tiempos estudiados de corto y largo plazo. Cultivos gliales puros de 4 días (corto plazo) y 10 días (largo plazo) fueron incubados con distintas concentraciones de la toxina, durante 3 y 9 días, respectivamente. (A) Los histogramas muestran el análisis del ciclo celular en cultivos a corto (panel superior) y largo plazo (panel inferior). Los gráficos de barras indican el porcentaje de CGM en las distintas etapas del ciclo (B). Los resultados representan el promedio ± SEM de al menos 3 experimentos separados (n ≥3). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*.

La BMAA alteró la actividad metabólica de las CGM en cultivos desarrollados a corto plazo

Teniendo en cuenta que la BMAA afectó la morfología de los núcleos, pero no la viabilidad celular, se evaluó la actividad metabólica de las CGM. Para ello, se incubaron cultivos gliales puros a corto y largo plazo con 3 concentraciones de la BMAA (0,4 μM , 1 μM , y 10 μM), y se realizaron ensayos de MTT. En los cultivos de 4 días *in vitro*, tratados con 1 μM de BMAA, la actividad metabólica aumentó significativamente 0,7 veces respecto del control (Fig. 35). Por el contrario, a concentraciones menores y en los cultivos a largo plazo, las incubaciones con la toxina no mostraron efectos significativos en comparación con los cultivos controles (Fig. 35).

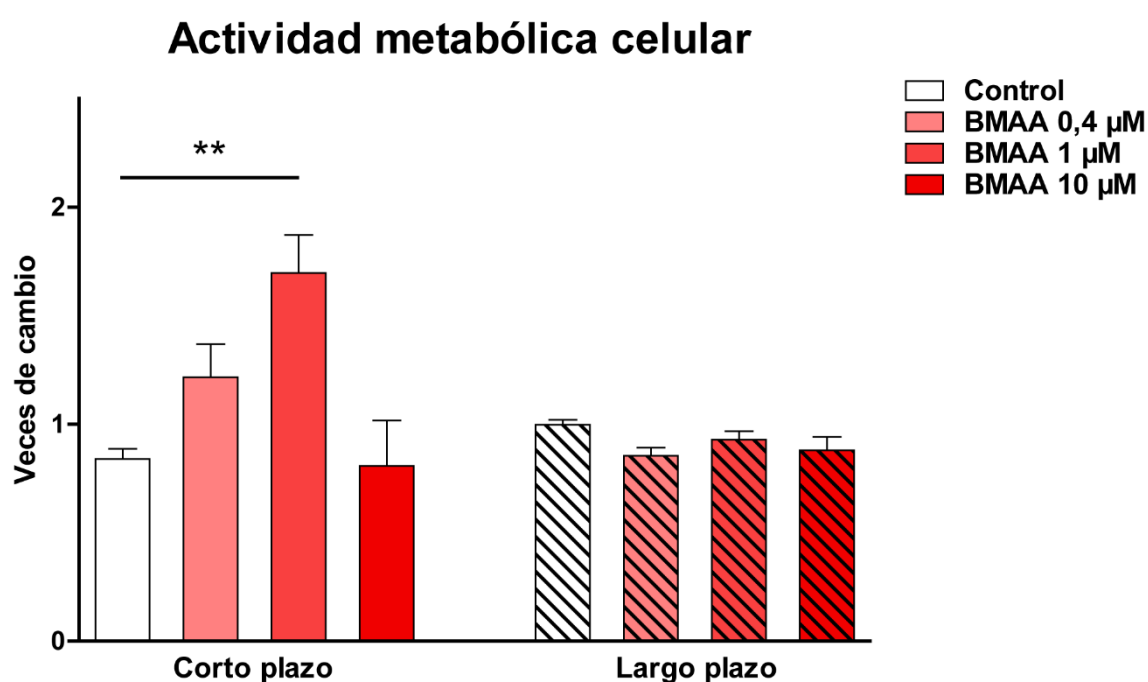
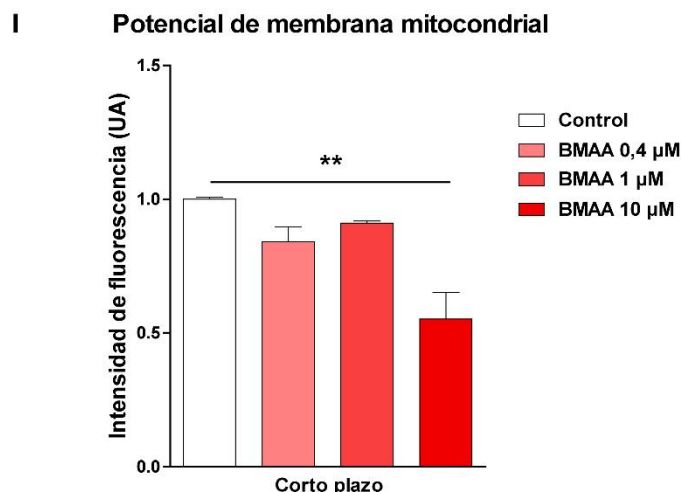
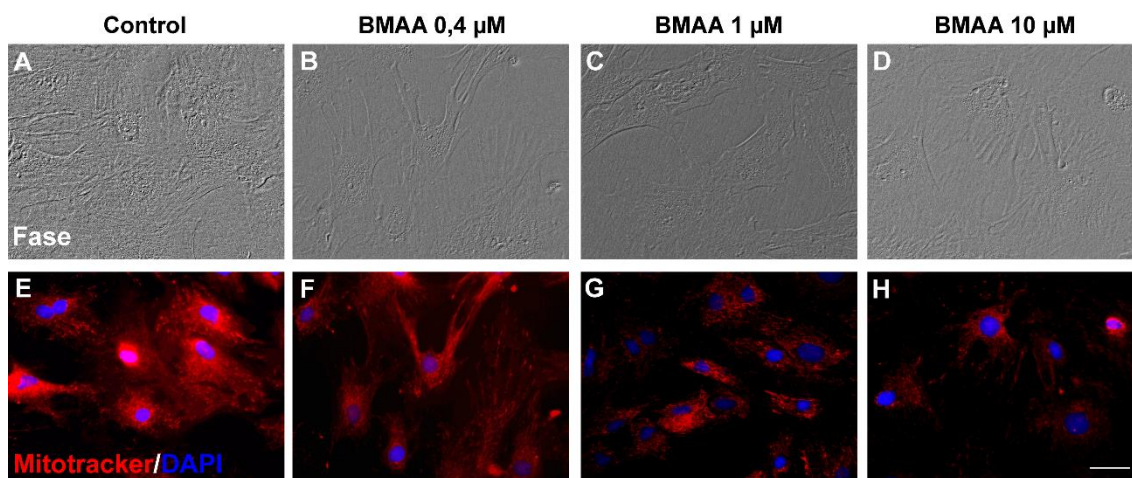


Figura 35. La BMAA indujo alteraciones en la actividad metabólica de las CGM. Cultivos gliales puros de 4 días y 10 días fueron incubados con la toxina, o no (control), durante 3 y 9 días, respectivamente. Las barras muestran la actividad metabólica de las CGM analizadas mediante el ensayo de MTT. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de Tukey. (**): $p \leq 0,01$.

La BMAA disminuyó el potencial de membrana mitocondrial en las CGM obtenidas en cultivos a corto plazo

Si bien a corto plazo, la BMAA no afectó la viabilidad de las CGM, sí afectó su actividad metabólica, por lo que su toxicidad podría a este tiempo alterar el funcionamiento mitocondrial. Por ello, se evaluó el estado del potencial de membrana mitocondrial en las CGM incubadas con la BMAA en cultivos a corto plazo, utilizando la sonda

Mitotracker (Fig. 36). Luego del tratamiento con la toxina, con la concentración de BMAA 10 μM se observó una reducción de la actividad mitocondrial, reflejada en una disminución de la intensidad de fluorescencia emitida por la sonda de 0,55 UA respecto



al control (Figs. 36 H, I).

Figura 36. Pérdida del potencial de membrana mitocondrial de las CGM inducido por la BMAA. Imágenes de fase (A-D) y de fluorescencia (E-H) de cultivos gliales puros de 4 días incubados con la BMAA o el vehículo (control) durante 3 días. La despolarización mitocondrial fue evaluada mediante la sonda Mitotracker (E-H, I) y la fragmentación nuclear con DAPI (E-H). La escala representa 20 μm . El gráfico de barras representa la intensidad de fluorescencia de la sonda Mitotracker (I). Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. * $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,001$.

La BMAA incrementó la producción de ROS en las CGM

Dadas las alteraciones mitocondriales inducidas por la toxina, se evaluó la producción de ROS en las CGM. Para ello, se incubaron cultivos gliales puros con la toxina o no (controles), durante 3 y 9 días (corto y largo plazo, respectivamente). Posteriormente,

utilizando la sonda DCDCDHF para evaluar la producción de ROS, se determinó la intensidad de fluorescencia emitida por las células. En los cultivos a corto plazo se observó que las concentraciones de BMAA 0,4 μM y 1 μM generaron aumentos en la producción de ROS que alcanzaron valores de 1,9 UA y 2,7 UA, respectivamente (Fig. 37 A-H, Q). Por otro lado, en los cultivos a largo plazo, el tratamiento con la BMAA no mostró diferencias significativas respecto al control en ninguna de sus concentraciones (Fig. 37 I-Q).

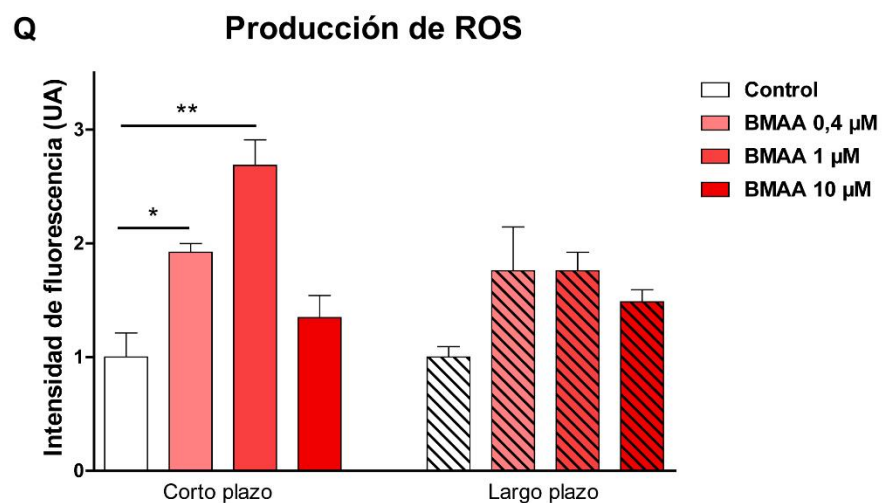
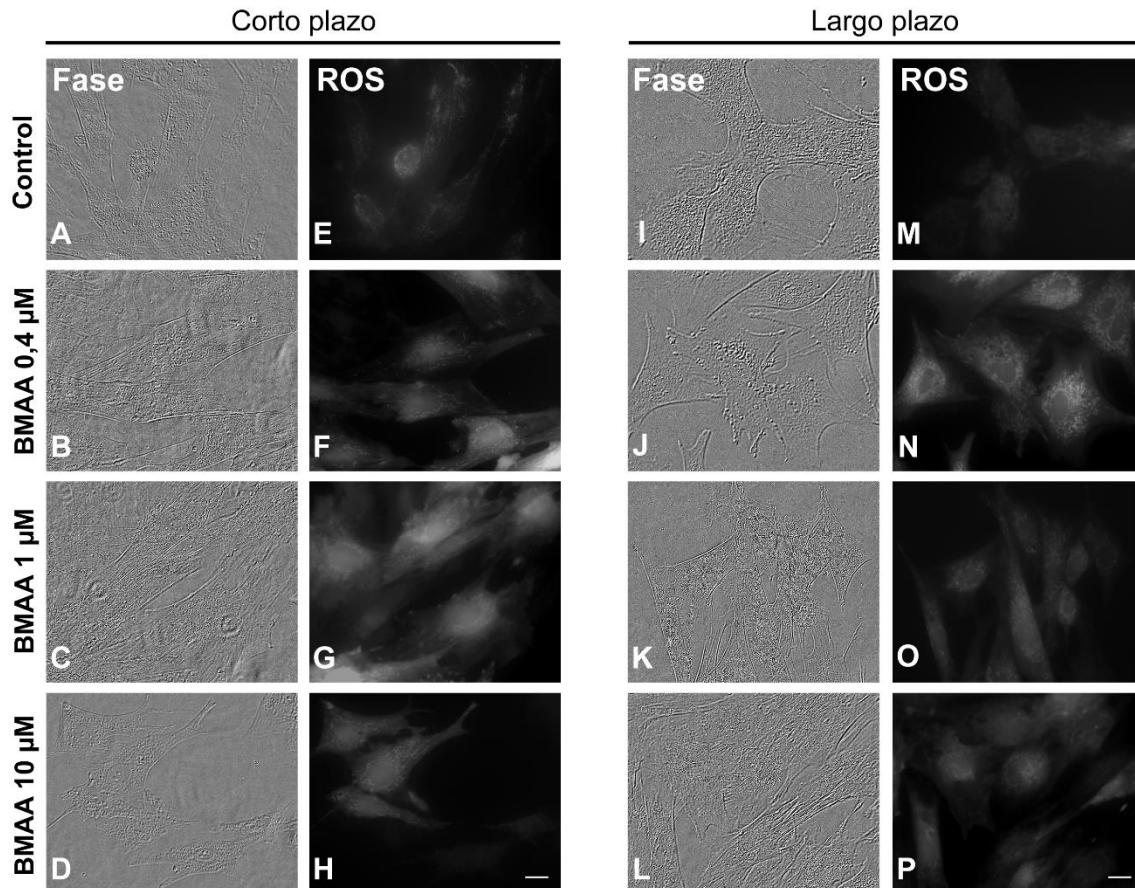


Figura 37. La BMAA promovió la producción de ROS en las CGM. Imágenes de fase (A-D; I-L) y de fluorescencia (E-H; M-P) de cultivos gliales puros de 4 y 10 días, incubados con la toxina o el vehículo (control), durante 3 y 9 días, respectivamente. La producción de ROS se evaluó según la intensidad de fluorescencia emitida por las CGM. La escala representa 20 μm . Las barras muestran el incremento en la generación de ROS (Q). Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$.

La BMAA alteró el citoesqueleto de actina en cultivos puros de CGM

Posteriormente, se evaluó el efecto de la BMAA sobre el citoesqueleto de actina de las CGM en cultivos puros, marcando los mismos con faloidina. En los cultivos controles a corto plazo, observamos la morfología característica de las CGM, las cuales mostraron un cuerpo celular extenso (Fig. 38 A). En contraste, en presencia de BMAA (0,4 μM) se destacaron marcadas fibras de estrés y diferentes alteraciones tales como la formación de repliegues en los bordes del cuerpo celular, similar a lo observado en cultivos mixtos neuro-gliales (Fig. 38 B). Además, a concentraciones de BMAA 1 μM se observaron los repliegues mencionados y zonas de actina densa (Fig. 38 C). Finalmente, a concentraciones de BMAA 10 μM , se observó que las células formaban repliegues y adquirían un mayor tamaño, aunque con bordes indefinidos (Fig. 38 D). Por su parte, en los cultivos a largo plazo se mantuvieron estas variaciones, aunque de manera más acentuada (Fig. 38 E-H).

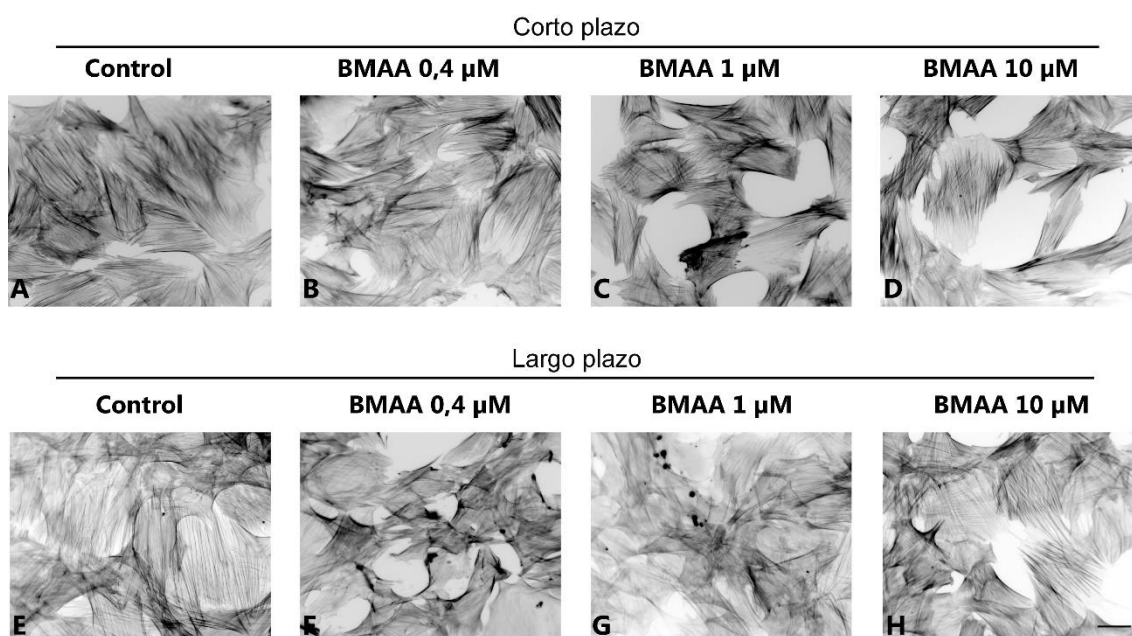
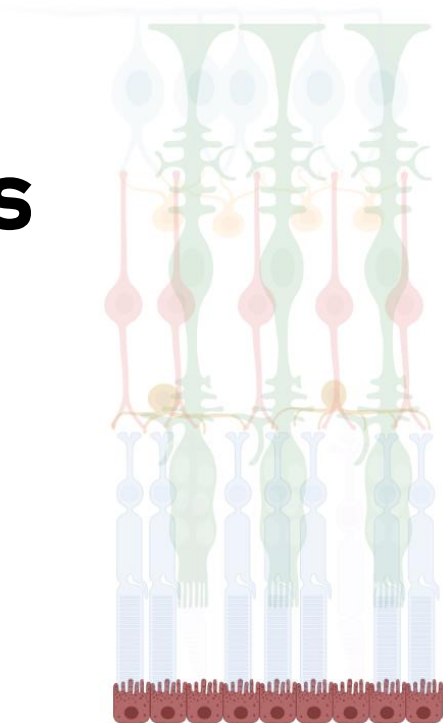


Figura 38. La BMAA indujo alteraciones en el citoesqueleto de actina de las CGM. Imágenes de fluorescencia de cultivos gliales a corto (A-D) y largo plazo (E-H) tratados con Hank's o la toxina durante 3 y 9 días, respectivamente. El citoesqueleto de actina se marcó con la sonda faloidina (negro). Escala de barra: 20 μm .

Efectos de la BMAA sobre las células de la línea celular ARPE-19



La BMAA indujo la muerte de células del EPR

Trabajos previos demostraron que la BMAA puede inducir retinopatías afectando las células del EPR (Abdulla y Campbell, 1993; Chernoff y col., 2017). Dada la importancia de estas células para el correcto funcionamiento de la retina, se estudiaron los efectos de la BMAA sobre la viabilidad de las células de la línea ARPE-19, incubando estos cultivos con 3 concentraciones de la toxina (0,4 μM , 1 μM y 10 μM) o su vehículo (control). El porcentaje de células Trypan Blue positivas mostró un incremento con la concentración de BMAA 10 μM , de 30 % a 66,5 %, en las condiciones control y tratado respectivamente (Fig. 39). Por lo tanto, la toxina alteró la viabilidad de las células del EPR.

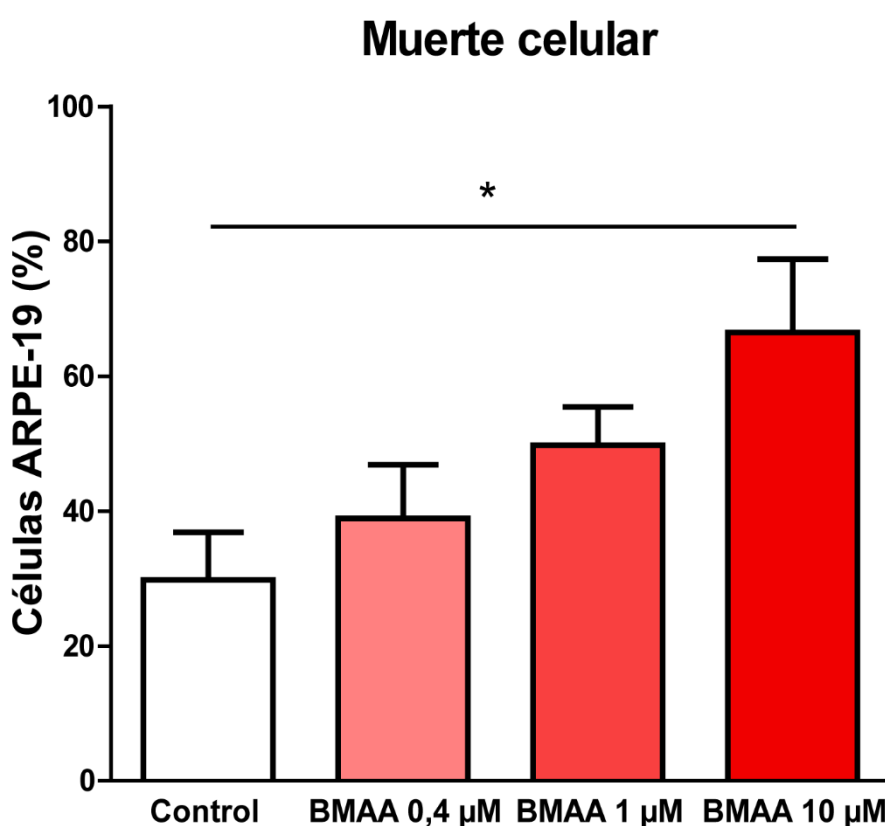


Figura 39. La BMAA indujo la muerte en células de la línea ARPE-19. Las células de la línea ARPE-19 fueron incubadas durante 3 días con 3 concentraciones de la BMAA (0,4 μM , 1 μM y 10 μM). Las barras muestran los porcentajes de muerte determinados con Trypan Blue. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (**): $p \leq 0,01$.

La BMAA alteró la actividad metabólica de las células del EPR

Los resultados anteriores indicaron que la BMAA podría afectar la capacidad metabólica de las células del EPR. Para investigar esta posibilidad, se utilizaron cultivos de células

de la línea ARPE-19, que fueron tratados con 0,4 μM , 1 μM y 10 μM BMAA durante 3 días, evaluando dicho parámetro mediante el ensayo de MTT. Luego del tratamiento con BMAA 10 μM , se observó una disminución significativa en la actividad metabólica de aproximadamente 0,2 veces respecto al control (Fig. 40). Por el contrario, las concentraciones menores no tuvieron efectos significativos en el metabolismo celular. En conclusión, la BMAA también indujo alteraciones a nivel metabólico en las células ARPE-19.

Actividad metabólica celular

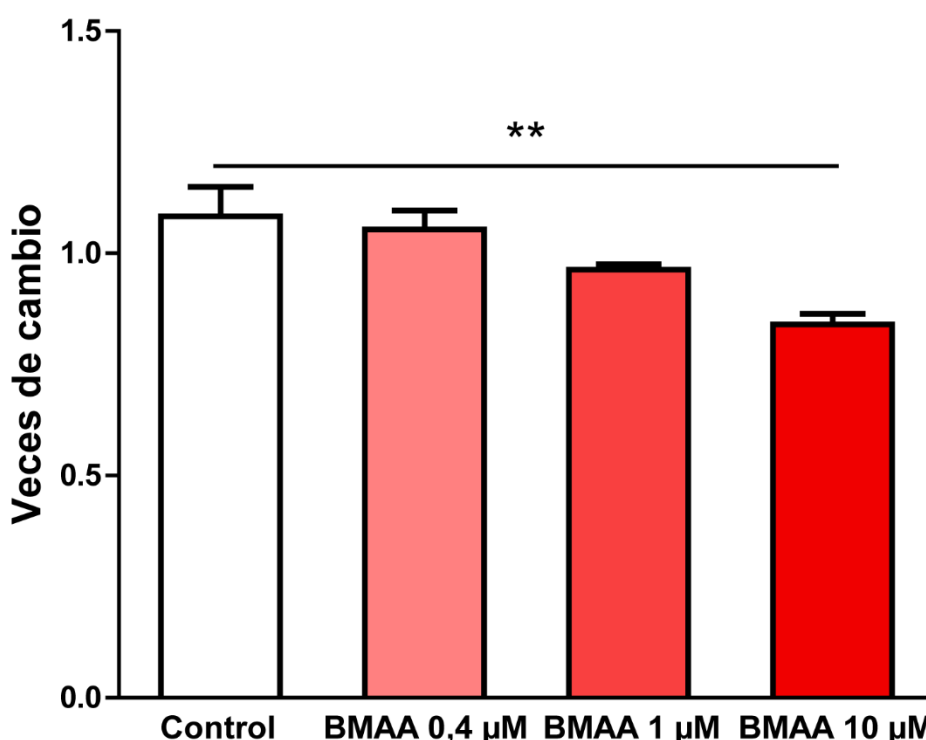


Figura 40. La BMAA indujo disminuciones de la actividad metabólica de las células ARPE-19. Las células de la línea ARPE-19 fueron incubadas durante 3 días con 3 concentraciones de BMAA (0,4 μM , 1 μM y 10 μM). Las barras muestran la actividad metabólica de las células del EPR analizado mediante el ensayo de MTT. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de Tukey. (*): $p \leq 0,05$.

La BMAA promovió la producción de ROS en las células del EPR

Como se mencionara previamente, debido a la estrecha relación entre la producción excesiva de ROS y la muerte celular, se evaluó si la misma intervino en la toxicidad promovida por la BMAA. Para ello, se trataron los cultivos de la línea celular ARPE-19 con la toxina (0,4 μM , 1 μM y 10 μM) durante 3 días. Posteriormente se incubaron con la sonda DCDCDHF, y se evaluó la intensidad de fluorescencia que reflejó la producción

de ROS. Los resultados mostraron que los tratamientos con 1 μM y 10 μM BMAA generaron un incremento en la producción de ROS a 1,5 UA y 1,7 UA, respectivamente (Fig. 41 G-I). Por su parte la concentración más baja (0,4 μM) no tuvo efectos significativos respecto al control. Por lo tanto, el estrés oxidativo forma parte del mecanismo de toxicidad inducido por la BMAA sobre el EPR.

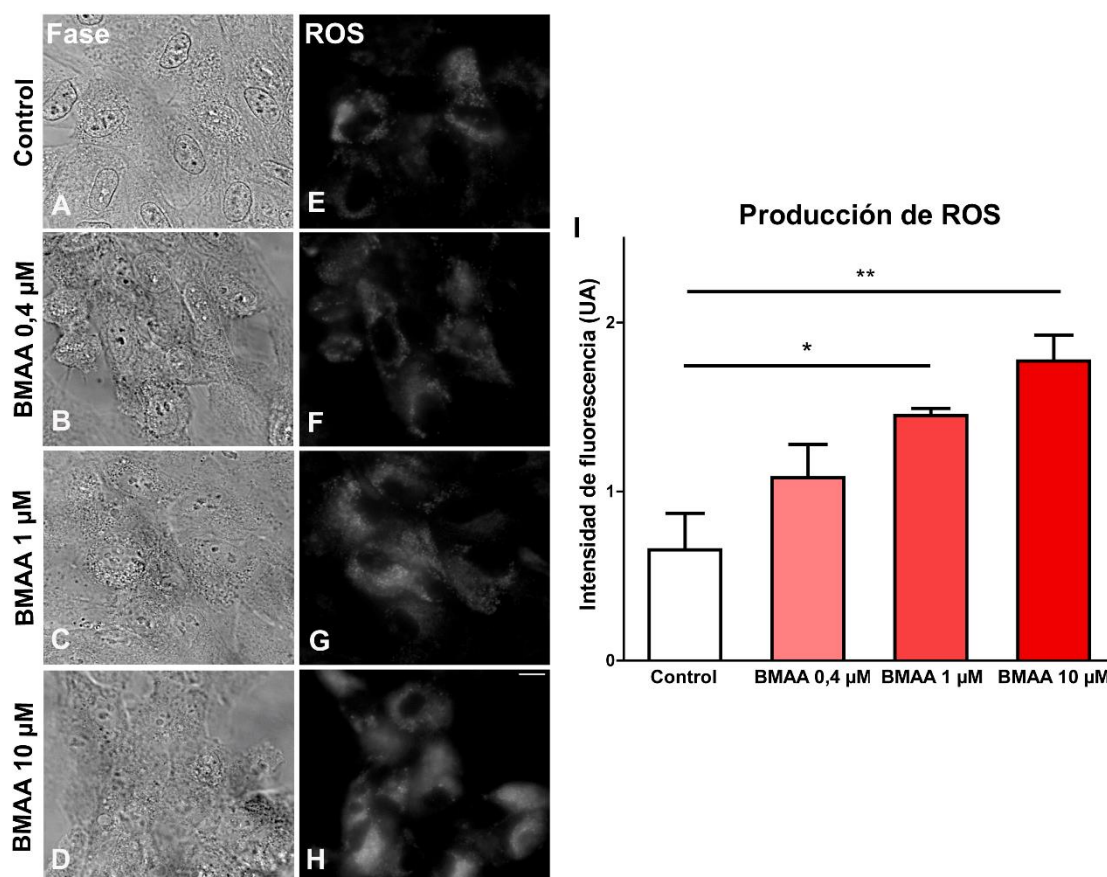


Figura 41. La BMAA incrementó la producción de ROS en las células del EPR. Imágenes de fase (A-D) y de fluorescencia (E-H) de la línea celular ARPE-19, tratada con 3 concentraciones de BMAA (0,4 μM , 1 μM y 10 μM) o Hank's (control) durante 3 días. La producción de ROS fue evaluada según la intensidad de fluorescencia emitida por las células epiteliales. La escala representa 20 μm . Las barras muestran el incremento en la generación de ROS (I). Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$.

La activación de los RXRs protegió a las células del EPR de la toxicidad inducida por la BMAA

Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la activación de los RXRs en presencia de sus agonistas, protegen a las células del EPR de daños oxidativos (Ayala-Peña y col., 2016). Por ello, se investigó si la activación de estos receptores también protegía a estas células de los daños inducidos por la BMAA. Con este objetivo,

cultivos de células ARPE-19 fueron incubados con el agonista HX630 1 μM , y posteriormente con la toxina en su concentración más alta (10 μM BMAA), la cual mantuvo sus efectos en los diferentes parámetros evaluados previamente. Al analizar la viabilidad, se observó que el tratamiento con la toxina incrementó la muerte al doble respecto al control, mientras que en presencia del agonista, los efectos tóxicos de la BMAA disminuyeron significativamente (Fig. 42). Por su parte, el HX630 *per se* no afectó la viabilidad de las células del EPR.

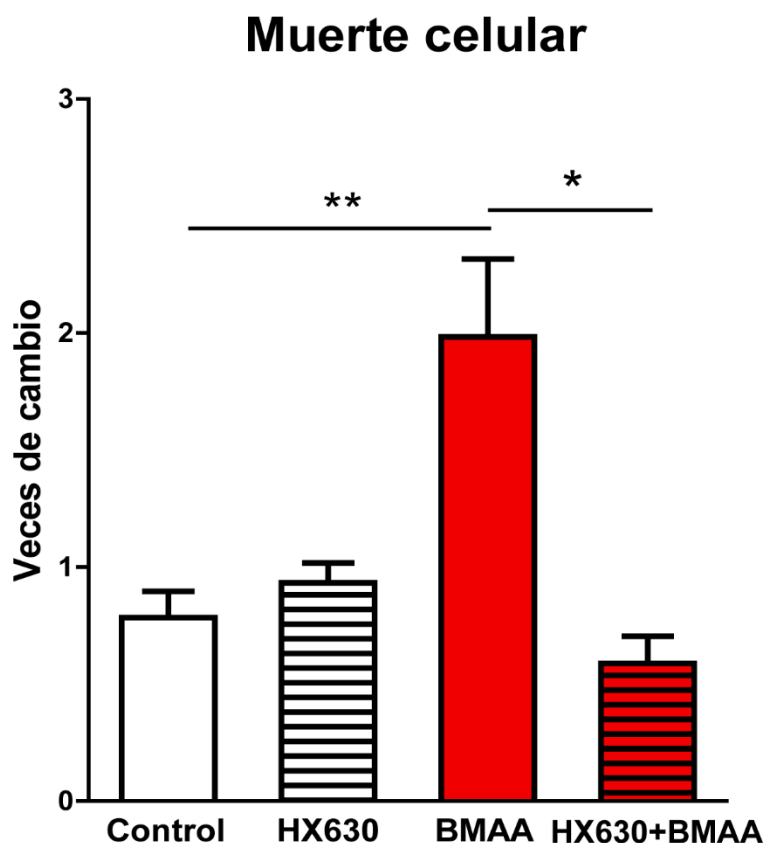


Figura 42. La muerte celular de la línea ARPE-19 inducida por la BMAA, fue prevenida por el agonista HX630. Las células de la línea ARPE-19 fueron pre-incubadas con HX630 1 μM y tratadas con BMAA 10 μM o Hank's (control) durante 3 días. Las barras muestran el aumento de la muerte celular determinada con Trypan Blue. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$.

Por otro lado, también se evaluó la actividad metabólica celular mediante la técnica de MTT. Tal como se mencionara previamente, el tratamiento con la BMAA disminuyó los valores en la actividad metabólica (0,78 veces) (Fig. 43). La activación de los RXRs por su agonista previno este efecto y elevó los valores a 1,18 veces (Fig. 43).

Actividad metabólica celular

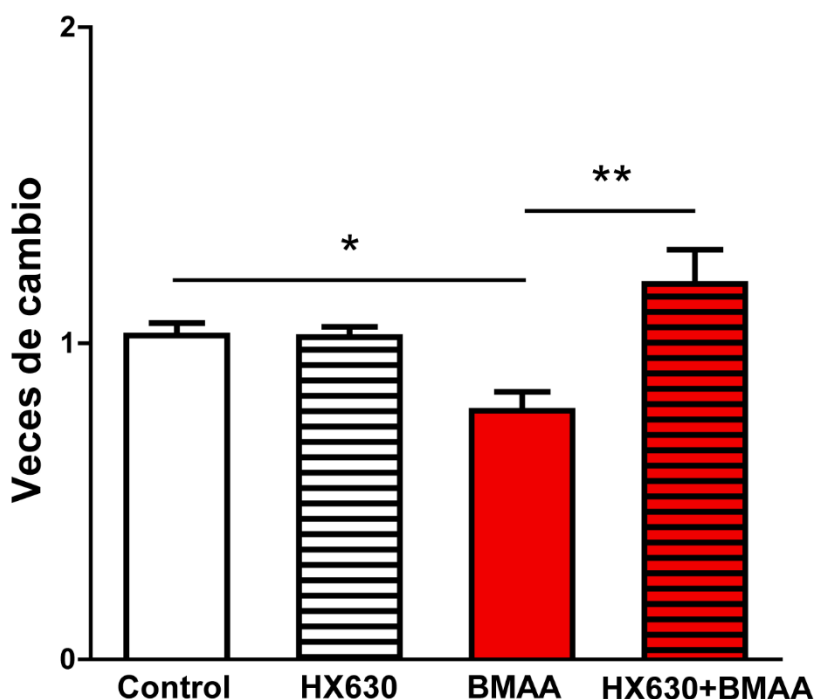


Figura 43. Las alteraciones en la actividad metabólica de las células del EPR, fueron prevenidas mediante la activación de los RXRs. Las células de la línea ARPE-19 fueron pre-incubadas con HX630 1 μ M y tratadas luego con BMAA 10 μ M o Hank's (control) durante 3 días. Las barras muestran la actividad metabólica de las células del EPR analizada mediante el ensayo de MTT. Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$.

El estrés oxidativo inducido por la BMAA en las células del EPR, disminuyó en presencia del agonista HX630

Teniendo en cuenta la protección ejercida por la activación de los RXRs sobre las células del EPR respecto a la toxicidad inducida por la BMAA, se evaluó su efecto sobre el estrés oxidativo. Luego de tratar a las células de la línea ARPE-19 con HX630 1 μ M y BMAA 10 μ M durante 3 días, las mismas se incubaron con la sonda DCDCDHf y se evaluó la intensidad de fluorescencia emitida. De manera similar a lo observado previamente, la BMAA 10 μ M incrementó los niveles de ROS en 1,9 UA (Fig. 44 G, I). La pre-incubación con el HX630 previno este incremento y redujo los valores de intensidad de fluorescencia hasta alcanzar valores similares al control (Fig. 44 H-I).

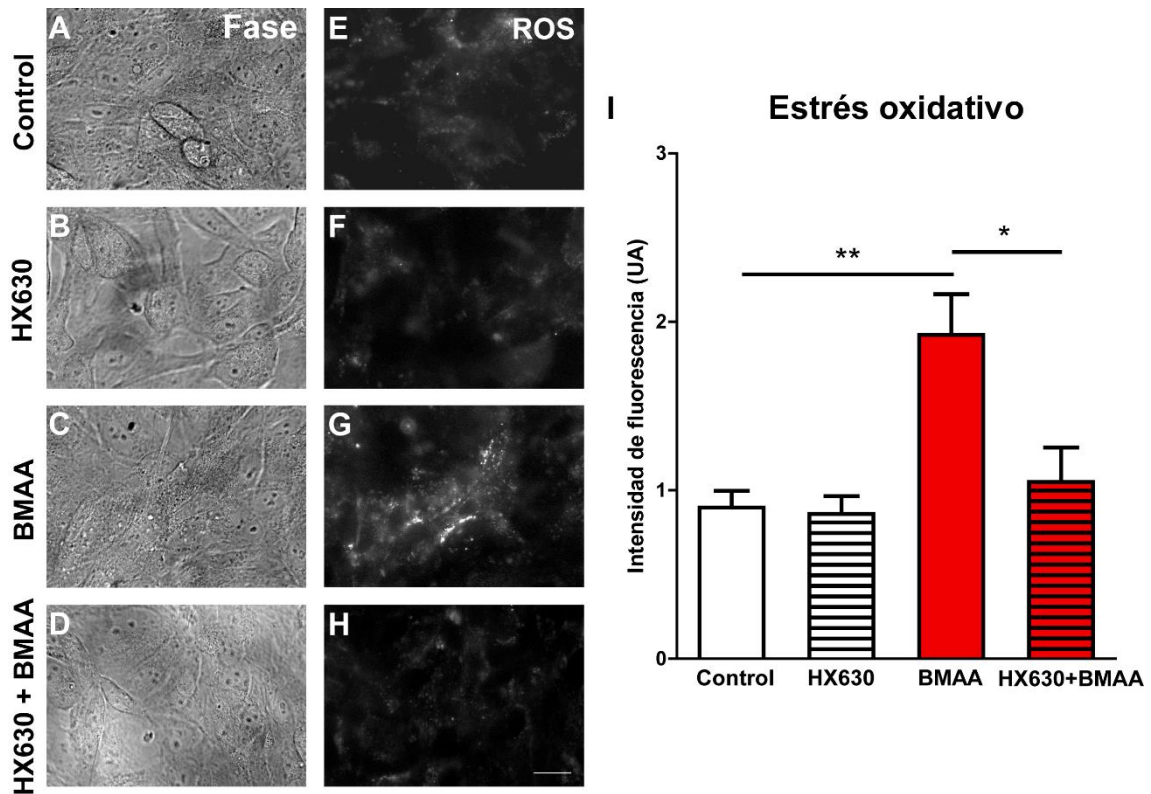


Figura 44. La producción de ROS promovida por la BMAA en la línea celular ARPE-19, fue prevenida por el agonista HX630. Imágenes de fase (A-D) y de fluorescencia (E-H) de las células de la línea ARPE-19, pre-incubados con HX630 1 μ M y tratados con BMAA 10 μ M o Hank's (control) durante 3 días. La producción de ROS fue evaluada según la intensidad de fluorescencia emitida por las células epiteliales. La escala representa 20 μ m. Las barras muestran el incremento en la generación de ROS (I). Los resultados representan el promedio \pm SEM de al menos 3 experimentos separados ($n \geq 3$). El análisis estadístico se hizo por ANOVA seguido de test de *Tukey*. (*): $p \leq 0,05$, (**): $p \leq 0,01$.

DISCUSIÓN



La BMAA es una cianotoxina nociva para diferentes tipos celulares, que está involucrada en el desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el complejo ELA/PDC (Banack y col., 2006; P. A. Cox y col., 2003b; T. A. Cox y col., 1989; Murch y col., 2004; X. Shen y col., 2005). Si bien se sabe que contribuye también a originar diversas retinopatías (Abdulla y Campbell, 1993; Chernoff y col., 2017), aún se desconoce su toxicidad sobre las células que componen la retina. Por ello, el principal objetivo de esta Tesis fue investigar los procesos degenerativos promovidos por la BMAA en las células de la retina.

Los resultados obtenidos en este trabajo demostraron que la BMAA altera la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial de las neuronas amacrinas y FRs; en particular, en las primeras promueve el crecimiento de los axones, aunque altera sus conos de crecimiento. Además, su toxicidad es mediada por la activación de receptores NMDA y requiere de la presencia de iones HCO_3^- . También se estableció que la presencia de Ser en el medio y la activación de los receptores nucleares RXRs previenen los efectos tóxicos de la BMAA en ambos tipos neuronales. Por otro lado, en células de la línea PC12 diferenciadas a neuronas, la BMAA induce la muerte y promueve el crecimiento de procesos similares a axones. Asimismo, en las células gliales de Müller, la BMAA afecta la actividad metabólica, la producción de ROS y el citoesqueleto de actina, todo lo cual disminuye su viabilidad y su capacidad de protección neuronal. Además, la toxina altera el metabolismo e induce la muerte de células del EPR, efectos que son bloqueados mediante la activación de los RXRs.

En concordancia con estos hallazgos, trabajos previos en otros laboratorios demostraron que la BMAA promueve la muerte de otros tipos neuronales en el SNC, tales como las células del hipocampo CA1 en cerebros de ratones (Buenz y Howe, 2007). A su vez, la inyección intraocular de la BMAA en ratones, induce apoptosis en las células de las capas internas y externas, e incluso en las células ganglionares, disminuyendo la amplitud de las *ondas b* de manera irreversible sin afectar las *ondas a* (Santucci y col., 2009). Esto sugiere que las neuronas de las capas internas y externas, así como las ganglionares, se ven más afectadas que los FRs.

Nuestros resultados mostraron que la BMAA provocó la fragmentación nuclear seguida de la muerte de neuronas amacrinas y FRs en cultivo, siendo ambos tipos de neuronas igualmente susceptibles a la fragmentación nuclear. Notablemente, alrededor del 50 % de FRs y neuronas amacrinas presentaron sus núcleos fragmentados al tratar con 0,4 μM , aunque este porcentaje no se vio incrementado con concentraciones más altas; esto sugiere que alrededor de la mitad de estas neuronas fueron resistentes a la BMAA.

La diferencia de susceptibilidad observada en las neuronas amacrinas podría deberse a que existen entre 20 y 30 sub-tipos diferentes en la retina de los mamíferos (Masland, 2001), expresando diferentes receptores para distintos neurotransmisores, incluyendo glutamatérgicos, colinérgicos y GABAérgicos. Por lo tanto, esta diversidad podría explicar la resistencia de una población de neuronas amacrinas a la muerte inducida por la BMAA (Massey y col., 1991; Strettoi y Masland, 1996). Si bien los cultivos neuronales tratados con la BMAA mostraron alteraciones en la integridad nuclear, el porcentaje de neuronas amacrinas y FRs no viables fue bajo, aunque significativo, aún al día 5, evidenciando que la fragmentación nuclear es un efecto temprano en ambos tipos neuronales. En concordancia con los bajos índices de muerte observados en neuronas amacrinas y FRs, se ha reportado que la integridad de la membrana celular se mantiene intacta hasta estadios tardíos de la apoptosis o necrosis secundaria *in vitro* (Elmore, 2007; M. T. Silva, 2010); sugiriendo que la muerte requeriría una exposición más prolongada a la toxina.

Los efectos neurotóxicos inducidos por la BMAA han sido previamente relacionados con la pérdida de la función mitocondrial. Así, en la línea celular de neuroblastoma N2a, la toxina promueve la apoptosis y la disminución de la actividad mitocondrial (Takser y col., 2016); mientras que en la línea de motoneuronas NSC-34, induce estrés oxidativo, lo cual conduce a la pérdida de la funcionalidad mitocondrial (Beri y col., 2017). Además, en cultivos primarios de células neuronales humanas incrementa la generación de ROS, induce daños en el ADN y promueve la liberación de caspasa-3 (Chiu y col., 2012). Por su parte, la inyección intravítrea de esta toxina en ojos de ratones, también incrementa la producción de ROS y la activación de caspasa-3 (Santucci y col., 2009). Al respecto, en nuestro laboratorio se ha determinado que la vía mitocondrial se ve afectada en los procesos apoptóticos en neuronas amacrinas y FRs cuando son expuestos a daños oxidativos, tal como la inducción de muerte con paraquat o con peróxido de hidrógeno (Abraham y col., 2010; German y col., 2006; Rotstein y col., 2003); asimismo, la despolarización mitocondrial presenta un rol fundamental en la muerte de FRs mediante la vía de *parthanatos* (Prado Spalm y col., 2019). En concordancia con estos antecedentes, nuestros datos sugieren que los efectos neurotóxicos inducidos por la BMAA en neuronas amacrinas y FRs involucran la pérdida de la funcionalidad mitocondrial, evidenciada por la marcada disminución en el porcentaje de neuronas que preservaron su potencial de membrana mitocondrial. Esto sugiere que la pérdida del potencial de membrana mitocondrial estaría involucrada en los procesos degenerativos en neuronas amacrinas y FRs.

Se ha sugerido que los RXRs serían posibles blancos terapéuticos para diferentes enfermedades, incluyendo las neurodegenerativas. En modelos de EP, ligandos de los RXRs rescatan a las neuronas dopaminérgicas de la degeneración causada tanto por la 6-OH dopamina como por hipoxia (Friling y col., 2009). Además, en modelos de EA, el pretratamiento con el agonista sintético de los RXRs, el bexaroteno, promueve la supervivencia de las neuronas 5XFAD en cultivos sometidos a excitotoxicidad inducida por Glut (Mariani y col., 2017). Previamente, en nuestro laboratorio se estudió la expresión de estos receptores en las neuronas de retina de rata (German y col., 2013); y se estableció que la activación de los mismos, ya sea mediante la unión de ligandos naturales (como el DHA) o sintéticos (como el PA024 y el HX630) disminuye la muerte de neuronas FRs ante diferentes tipos de daños (German y col., 2006; Volonté y col., 2021). Al evaluar la activación de los RXRs como posibles protectores de la toxicidad inducida por la BMAA sobre neuronas amacrinas y FRs, los resultados arrojados demostraron que la pre-incubación con el agonista HX630, previno las alteraciones mitocondriales que promovió la toxina, así como también la producción de ROS. A su vez, cuando se evaluó la integridad nuclear de ambos tipos neuronales, los porcentajes de fragmentación nuclear disminuyeron significativamente. Notablemente, la activación de los RXRs bloqueó la apoptosis en los FRs, pero no en neuronas amacrinas. Estos resultados, junto a los de otros laboratorios, sugieren que la activación de los RXRs protegería a algunos tipos neuronales ante distintos daños actuando, por lo menos, sobre un punto en común en las vías de muerte. Es posible que en los FRs, la disfuncionalidad mitocondrial conduzca a la muerte, un proceso que podría ser frenado por la activación de los RXRs. Por su parte, la BMAA podría activar más de una vía de muerte en las neuronas amacrinas, siendo la disfuncionalidad mitocondrial y la muerte, posiblemente, dos procesos relacionados. Futuras investigaciones permitirán elucidar la relación entre ambos eventos.

Se sabe que las vías de muerte que activa la BMAA son diversas (Chernoff y col., 2017; Chiu y col., 2013; de Munck y col., 2013; Karlsson y col., 2009; Takser y col., 2016; van Onselen y col., 2018; J. Weiss y col., 1989). Entre los mecanismos de toxicidad más estudiados se pueden mencionar la activación de los receptores NMDA y mGluR5 (Esterhuizen-Londt y col., 2011; Liu y col., 2009; Nunn y O'Brien, 1989; Rao y col., 2006; J. Weiss y col., 1989). También se ha propuesto que la cianotoxina actúa junto a otros compuestos y genera daños neuronales corticales, promoviendo efectos sinérgicos (Lobner y col., 2007). En retinas embrionarias de pollo, la BMAA genera lesiones similares a las causadas por aminoácidos excitatorios, como Glut (Zeevalk y Nicklas, 1989). Por su parte, Arif y colaboradores demostraron que las alteraciones en cerebro

inducidas por la BMAA, pueden revertirse completamente con antagonistas de los receptores NMDA, como el MK-801, lo cual justifica su empleo ante los daños promovidos por la cianotoxina (Arif y col., 2014). Los resultados de esta Tesis evidenciaron que el pre-tratamiento con el antagonista de los receptores de NMDA MK-801, protegió de manera selectiva a las neuronas amacrinas de los daños impulsados por la BMAA. Este efecto es consistente con estudios previos de electroretinogramas, que demostraron que la inyección intraocular de MK-801 con BMAA, NMDA o una mezcla de ambos, revierte significativamente la disminución en la amplitud de la *onda b*, y protege a las neuronas de la retina de la muerte celular apoptótica inducida por la BMAA y por NMDA (Santucci y col., 2009). Nuestros resultados sugieren que la BMAA promovió la muerte de neuronas amacrinas por un mecanismo excitotóxico, que incluye la activación de los receptores NMDA.

Además de las alteraciones indicadas anteriormente, la BMAA actúa junto a iones HCO_3^- a pH fisiológico, formando aductos de carbamato, químicamente similares al Glut, que coexisten con la BMAA en solución (Myers y Nelson, 1990; Zimmerman y col., 2016). Los resultados de esta Tesis, demostraron que fue necesaria la presencia de iones HCO_3^- en el medio de cultivo, para que la BMAA genere la muerte de las neuronas amacrinas. La fragmentación nuclear inducida por la BMAA se vio claramente incrementada en cultivos con NaHCO_3 en el medio; sin embargo, en un medio de cultivo con HEPES como buffer, se previno completamente la fragmentación nuclear. Esto sugiere que, en neuronas amacrinas, el mecanismo de neurotoxicidad promovido por la BMAA es mediado por la formación de aductos de carbamato que conducen a la excitotoxicidad mediada por receptores de NMDA.

Notablemente, el MK-801 no previno la muerte de FRs inducida por la BMAA, demostrando que, en estas células, la activación de los receptores NMDA no estaría involucrada. Esto podría ser consecuencia, ya sea, de que no expresen estos receptores NMDA a ningún tiempo (Fletcher y col., 2000; Zhou y col., 2016) o que los expresen escasamente a los 5 d.i.v., ya que a este estadio del desarrollo los FRs aún no se encuentran totalmente diferenciados. La funcionalidad de los receptores NMDA requiere de dos subunidades: NR1 y NR2 (Yuan y col., 2009); la transcripción de las subunidades NR2 es restringida y presentan una distribución heterogénea en la retina de rata, encontrándose en los somas de las células neuronales de la capa nuclear interna, donde se encuentran las neuronas amacrinas (Brandstätter y col., 1998). Por lo tanto, es poco probable que los FRs al tiempo estudiado presenten receptores NMDA funcionales.

El conjunto de resultados mostrados en esta Tesis, indica que la BMAA activó mecanismos celulares de neurotoxicidad selectivos, que concluyeron en la pérdida de la viabilidad de neuronas amacrinias y FRs.

Teniendo en cuenta que uno de los objetivos planteados fue analizar cómo la BMAA induce la muerte de los FRs, un mecanismo alternativo para estos efectos podría ser la incorporación errónea de la BMAA, en reemplazo de Ser, en las cadenas polipeptídicas, generando plegamientos anómalos y agregados de proteínas que conducen a la apoptosis (Main y col., 2016; Okle y col., 2013). Se ha establecido que el plegamiento anómalo de proteínas contribuye al progreso de enfermedades neurodegenerativas causando la formación de ovillos neurofibrilares, placas seniles, inclusiones en los cuerpos de Lewy y tauopatías (Dunlop y col., 2013). En este contexto, cuando se pre-incubaron cultivos neuronales con Ser, se previno la fragmentación nuclear y la apoptosis, tanto en neuronas amacrinias como en FRs, indicando que podría generarse una competencia entre ambos aminoácidos, y que la mayor concentración de uno (Ser) evite que el otro (BMAA) pueda insertarse en las proteínas, generando el plegamiento incorrecto de las mismas.

Para corroborar si los efectos que induce la BMAA sobre las neuronas de la retina son semejantes en otros tipos neuronales, evaluamos los efectos de la cianotoxina sobre las células PC12 diferenciadas, que adquieren un fenotipo neuronal, y expresan también receptores de Glut (Casado y col., 1996; Kane y col., 1998). Se ha demostrado que la sensibilidad de las células PC12 a la BMAA depende de su estadio de diferenciación, ya que la BMAA a una concentración de 2 mM induce apoptosis en las células ya diferenciadas después del tratamiento, mientras que las células no diferenciadas se muestran más resistentes (van Onselen y col., 2018). Los resultados de esta Tesis demostraron que bajas concentraciones de BMAA indujeron la fragmentación nuclear y la muerte de las células PC12 diferenciadas. Además, también en estas células diferenciadas, la toxina promovió el crecimiento de procesos similares a axones. Por otro lado, la activación de receptores de Glut, ya sea por la acción del neurotransmisor mismo o bien por la BMAA, induce apoptosis sobre la línea PC12 (van Onselen y col., 2018). Por lo tanto, nuestros resultados sobre los efectos en las células PC12 diferenciadas, fueron semejantes a los observados en neuronas amacrinias, y apoyan la hipótesis de que la apoptosis y el crecimiento de axones requieren la activación de los receptores NMDA por acción de la BMAA.

Debido a la estrecha relación entre las células gliales y las neuronales, fallas en las primeras, pueden conducir al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas, como

sucede en ELA con la degeneración de astrocitos y microglía, y la consecuente pérdida de neuronas motoras (D'Mello y col., 2017; Tan, Mazzocco, y col., 2018). Asimismo, se sabe que las células gliales son más resistentes que las neuronas a diferentes daños. Sin embargo, aún bajas concentraciones de la BMAA afectan la proliferación, e inducen incrementos en la producción de ROS y en la liberación de Ca^{2+} en astrocitos (Dias Pereira y col., 2022; D'Mello y col., 2017), y generan daños sobre las CGM al activar receptores NMDA (Santucci y col., 2009).

Nuestros resultados demostraron que la BMAA indujo porcentajes similares de fragmentación nuclear en las neuronas, tanto en cultivos neuronales puros como en cultivos mixtos neuro-gliales, lo cual indica que la presencia de las CGM no fue suficiente para prevenir sus efectos tóxicos. Las CGM tienen un importante rol en el mantenimiento de la funcionalidad de la retina, modulan los niveles de neurotransmisores excitatorios, regulan mecanismos de detoxificación, y actúan como soporte trófico, entre otras, y son muy resistentes a distintos tipos de daño (Guidry, 2005; Harada y col., 2000; Poitry y col., 2000; Politi y col., 2001a; Politi y col., 2001b; Simón y col., 2012; Wahlin y col., 2001). La pérdida de esta capacidad neuroprotectora frente a la BMAA resultó llamativa y nos llevó a plantearnos si la toxina estaría afectando la funcionalidad de las CGM.

Nuestros resultados determinaron que las CGM presentes en los cultivos mixtos neuro-gliales también fueron afectadas por la BMAA, lo cual les impidió ejercer su efecto neuroprotector. A pesar de esto, las CGM fueron más resistentes a la toxina que las neuronas, ya que requirieron tiempos más prolongados de exposición para evidenciar diversas alteraciones. Así, mientras que, en neuronas, sólo 3 días de tratamiento con la toxina fueron suficientes para que promueva degeneración neuronal (5 d.i.v.), en las CGM se observaron bajos porcentajes de muerte aún después de 5 días de exposición a la BMAA (7 d.i.v.). Por el contrario, en cultivos mixtos neuro-gliales de mayor tiempo de desarrollo, las CGM incrementaron sus porcentajes de muerte y fragmentación nuclear. Por lo tanto, para que la BMAA afecte la viabilidad de las CGM en cultivos mixtos, fue necesaria una exposición prolongada. Sin embargo, estas células gliales presentaron anomalías en el citoesqueleto de actina, previas a la muerte inducida por el tratamiento con la toxina. Como se indicara anteriormente, estas células son altamente resistentes a diferentes daños, tanto en el cerebro (Bolaños y col., 1995) como en la retina (Abraham y col., 2009; Stone y col., 1999); es por esto que es trascendente el daño que induce la BMAA sobre las CGM en los cultivos mixtos neuro-gliales, ya que bajas dosis son suficientes para alterar el funcionamiento de estas células y, en consecuencia, podrían también afectarlas en la retina *in vivo*. Precisamente, la disminución de la viabilidad de las CGM fue consistente con la disminución en la

amplitud de las *ondas b* luego de inyectar de manera intraocular la toxina, la cual incluye la actividad de las CGM (Santucci y col., 2009), respaldando la toxicidad de la BMAA en estas células *in vivo*.

Por su parte, el análisis de las CGM presentes en los cultivos gliales puros a tiempos equivalentes a los estudiados en los cultivos mixtos neuro-gliales, pero sin la interacción con células neuronales, demostró que la BMAA también altera la morfología celular, tanto a corto como a largo plazo. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre en los cultivos mixtos neuro-gliales, la BMAA no afectó la viabilidad de las CGM en ninguno de los tiempos estudiados. Esto apoya la hipótesis que, debido a la interacción entre ambos tipos celulares (neuronas y CGM), las alteraciones ocasionadas sobre uno de ellos impactan sobre el funcionamiento del otro (Volonté y col., 2019). Por su parte, cabe destacar que las alteraciones manifestadas en las CGM les impide ejercer los mecanismos de protección y soporte sobre las neuronas, agudizando aún más los daños sobre éstas.

Otro de los efectos tóxicos promovidos por la BMAA sobre las CGM son las alteraciones nucleares. Trabajos previos realizados en otros laboratorios han observado alteraciones nucleares como la formación de puentes, micro-núcleos e incluso “brotes” o “burbujas” (*blebs*) nucleares, como consecuencias de los daños genotóxicos inducidos por la BMAA (Gerić y col., 2019). Estas transformaciones han sido sugeridas como un indicio de senescencia celular (Matias y col., 2022; Pathak y col., 2021), un mecanismo que desarrollan diferentes tipos de células cuando se encuentran frente a un daño permanente durante un tiempo determinado, evitando la muerte celular programada. Diferentes características distinguen a las células senescentes del resto: suelen aumentar su volumen y desarrollar *blebs*, cambios que son acompañados de alteraciones en las membranas nucleares e incluso en el ADN (Matias y col., 2022; Pathak y col., 2021). Este tipo de aberraciones se han manifestado en astrocitos, donde además de modificarse su morfología característica, también se vieron alteraciones en la lámina B1 (Matias y col., 2022). Al analizar los núcleos de las CGM en nuestros cultivos puros, observamos alteraciones nucleares luego del tratamiento con la BMAA que se manifestaron como evaginaciones e invaginaciones. Sin embargo, al evaluar el estado del ciclo celular luego del tratamiento con la toxina no se vieron diferencias en cada etapa del ciclo, en los tiempos analizados.

Además, la BMAA estimula la producción de ROS sobre las CGM (Chiu y col., 2013; Dias Pereira y col., 2022; D’Mello y col., 2017). Los resultados obtenidos aquí demostraron que, aún bajas concentraciones de BMAA incrementaron la producción de

ROS a corto plazo. Estos resultados fueron acompañados de un aumento en la actividad metabólica, lo que indicaría que las células están utilizando sus recursos para contrarrestar los efectos de la toxina. La mayor concentración de BMAA utilizada en esta Tesis a corto plazo no alteró la actividad metabólica de las CGM, tampoco indujo estrés oxidativo, pero sí redujo la funcionalidad mitocondrial. Takser y colaboradores utilizando concentraciones de BMAA similares a las establecidas en esta Tesis, señalaron que al realizar la técnica de MTT sobre células de neuroblastoma, 1 y 2 días después del tratamiento con la toxina, se presentan alteraciones que con exposiciones prolongadas, desaparecen (Takser y col., 2016). Algo similar sucede en nuestro modelo de estudio, siendo probable que los efectos que produce el tratamiento con altas concentraciones de BMAA se desarrollen de manera rápida, visibles en tiempos previos a los estudiados. Por lo tanto, el aumento temprano de la actividad metabólica de las CGM podría deberse a la activación de mecanismos de resistencia de estas células a la BMAA.

Se ha propuesto que la BMAA puede contribuir al desarrollo de ELA. Asimismo, en el desarrollo de esta enfermedad, se destaca un marcado crecimiento de neuritas en motoneuronas, desencadenado como un mecanismo de resistencia (Osling y col., 2019).

Como se mencionara previamente, en nuestros cultivos se encuentran diferentes subtipos de neuronas amacrinas con diversidad de formas y axones; algunos de ellos presentan formas aracnoideas con axones ramificados, mientras que otros presentan la forma típica con un único axón. Más allá de presentar fragmentación nuclear y muerte celular, los cultivos tratados con BMAA mostraron neuronas amacrinas con axones más largos que los cultivos controles. Sin embargo, la BMAA no afectó el largo de los axones de FRs, los cuales presentaron la misma elongación tanto en los cultivos controles como en los tratados. Además, el tratamiento con el antagonista MK-801 previno el crecimiento axonal de las neuronas amacrinas, sugiriendo que la activación de los receptores NMDA también está involucrada en este proceso. Este hallazgo, junto con la inhibición en la fragmentación nuclear al bloquear los receptores NMDA, apoya la hipótesis de que ambos procesos, el de fragmentación nuclear y el de crecimiento axonal inducidos por la BMAA, requieren la activación de esta vía en neuronas amacrinas, pero no en FRs. El Glut es uno de los neurotransmisores excitatorios más importantes del SNC, siendo fundamental en la regulación de diferentes procesos neuronales. Sin embargo, un exceso del mismo resulta perjudicial, y genera excitotoxicidad incrementando el flujo de Ca^{2+} activando diferentes vías que conducen a la muerte neuronal (Chiu y col., 2012; Gilman y Mattson, 2002); y también regulando los procesos de crecimiento y dinámica axonal, ya que el flujo de Ca^{2+} promueve la

polimerización de actina en los conos de crecimiento e inhibe la de tubulina, generando la elongación de los mismos (Mattson, 2008). Aunque el inesperado impacto de la BMAA incrementando el largo axonal de neuronas amacrinas podría ser considerado beneficioso para estas neuronas, los resultados también demostraron que la BMAA indujo la desorganización en los conos de crecimiento, tanto de la tubulina como de los filamentos de actina. El aumento en el largo axonal fue paralelo a la desorganización de los conos de crecimiento en una proporción significativa de esos axones. Estos efectos podrían ocurrir en forma secuencial: inicialmente, la BMAA podría promover el crecimiento axonal en neuronas amacrinas, y luego, este crecimiento exacerbado, se continuaría con la desorganización y el colapso de los conos de crecimiento. La organización del citoesqueleto de actina en los conos de crecimiento es regulada por varias señales de orientación, y los filamentos de actina son los principales blancos para esas señales (Grabham y col., 2003). Los filamentos de actina son altamente influenciados por las propiedades dinámicas de los microtúbulos (Conde y Cáceres, 2009); incluso se ha propuesto que los “arcos de F-actina” generan fuerzas de compresión sobre los microtúbulos para organizar los conos de crecimiento (Geraldo y Gordon-Weeks, 2009). Es decir que la organización de los conos de crecimiento depende fuertemente de la organización de la actina. Nuestros resultados mostraron que la BMAA indujo la desorganización de los filamentos de actina en los conos de crecimiento de las neuronas amacrinas, por lo tanto, esta desorganización podría contribuir al colapso de estos conos. Un efecto similar fue observado sobre las CGM, tanto en cultivos mixtos neuro-gliales como en cultivos puros tratados con la BMAA, al alterar la organización de los filamentos de actina en sus lamelipodios.

Sorprendentemente, cerebros de pacientes que han sufrido EP-demencia en la Isla de Guam como consecuencia de la exposición a BMAA, presentan una reducción en la actividad de la enzima fosfatasa A, que conduce a la hiperfosforilación de la proteína Tau (Arif y col., 2014). En nuestro modelo de estudio existiría la posibilidad de que la BMAA también promueva la hiperfosforilación de Tau en neuronas amacrinas, afectando la estabilidad de los microtúbulos y la consecuente desorganización de los conos de crecimiento. El colapso de éstos impediría que las neuronas amacrinas puedan realizar los contactos sinápticos necesarios, cruciales para cumplir su rol, y eventualmente, conduciría a la muerte de las mismas. Estudios posteriores permitirán evaluar esta posibilidad.

Por su parte, en células PC12 diferenciadas tratadas con la BMAA también se observó un incremento en las prolongaciones similares a axones, aunque fue acompañado por una disminución en la expresión de la proteína β III tubulina. Los microtúbulos están

formados por subunidades de α y β tubulina, existen varios isotipos de la subunidad β que cumplen diferentes funciones (Joshi y Cleveland, 1989). La presencia de los mismos varía de acuerdo al estado en la formación de los microtúbulos. En particular, en este trabajo se estudió el isotipo III, el cual se considera poco eficaz frente al ensamblaje de estas estructuras (Joshi y Cleveland, 1989). Asimismo, se ha determinado que la concentración de β III tubulina se correlaciona con la presencia de Tau, proteína importante en la estabilidad. Trabajos posteriores evaluarán el estado del resto de los isotipos partícipes en el crecimiento de los microtúbulos.

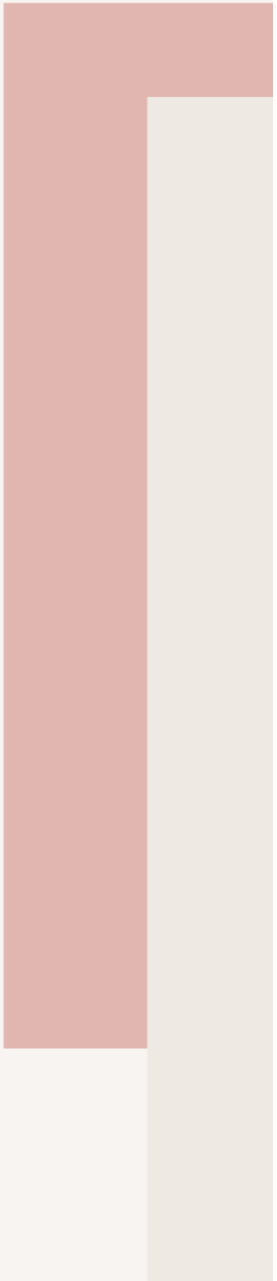
Además de estimular el crecimiento axonal, en cultivos mixtos neuro-gliales la BMAA indujo la fragmentación de los axones de neuronas amacrinias. Si bien la muerte marca el punto final en la degeneración neuronal, las alteraciones axonales y sinápticas son eventos críticos en el desarrollo de la misma; tal es así que, en enfermedades como ELA suelen aparecer tiempo antes de que se manifiesten los síntomas clínicos. Se ha demostrado que la BMAA desarrolla daños similares a los ocurridos en la degeneración Walleriana, en la región distal de los axones y que alteran el transporte neuronal (Tan, Lassus, y col., 2018).

Una de las características más destacadas que presenta la BMAA es la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica (Chernoff y col., 2017; Smith y col., 1992). La BBB es una barrera de permeabilidad altamente selectiva que protege al cerebro, permitiendo el paso de ciertas moléculas como agua, gases y metabolitos importantes, e impide el paso de otras que puedan resultar dañinas. Existen transportadores de aminoácidos, utilizados para el ingreso de aquellos que no son sintetizados en el cerebro, pero que sí son necesarios para el metabolismo proteico, y es a través de éstos por donde ingresa la BMAA (Chernoff y col., 2017; Smith y col., 1992). Por su parte, la barrera hemoretiniana conformada por el EPR y el endotelio vascular actúa de manera similar, regulando el paso de moléculas hacia la retina (Strauss, 2005). Teniendo en cuenta que la toxina puede atravesar la BBB, se ha sugerido que también podría utilizar los mismos mecanismos de ingreso sobre la BRB (P. A. Cox y col., 2003b; Murch y col., 2004). Los resultados mostrados en esta Tesis indicaron que, si bien las células del EPR son resistentes a diferentes daños, bajas concentraciones de la BMAA fueron suficientes para inducir la muerte de las células de la línea ARPE-19, y disminuir su actividad metabólica. Las alteraciones sobre estas células impactan sobre la viabilidad del resto de los componentes de la retina, ya que se generan deficiencias sobre el transporte de nutrientes y la remoción de metabolitos, conduciendo al desarrollo de enfermedades que afecten la visión (Strauss, 2005). Además, la combinación llamativa de patologías que incluyen EP y retinopatías, entre otras, podría tener como punto en común la

presencia de melanina en las células del EPR, y de neuromelanina en las células de la *sustancia nigra* (Delcourt y col., 2018; Karlsson y col., 2009). Las funciones principales de ambos pigmentos son las de protección y remoción de diferentes compuestos tóxicos para la célula, ya sean drogas, metales y toxinas, o bien productos del metabolismo celular, como son las ROS o los radicales libres (Karlsson y Lindquist, 2016). Sin embargo, la exposición prolongada de compuestos con alta afinidad por ellos, como sucede con la BMAA, conduce a su acumulación y posterior degeneración celular (Karlsson y col., 2009). Al tratar los cultivos de la línea ARPE-19 con la BMAA, se determinó un incremento en la producción de ROS en las células del EPR. Por un lado, éste podría ser el efecto directo de la BMAA, ya observado previamente en neuronas amacrinas y FRs; aunque también podría sumarse la acumulación de la toxina, ya que se detectó un mayor efecto con la concentración más alta, y la ineficiencia de la melanina para remover las ROS.

El estrés oxidativo es uno de los procesos principales que desencadena la pérdida de la visión afectando al EPR y a los FRs, principalmente (Cai y col., 2000; Jin y col., 2001; Lu y col., 2006; Winkler y col., 1999). Se ha establecido el rol protector de los RXRs a este tipo de daños sobre las células del EPR. La activación de estos receptores previene la muerte celular inducida por el estrés oxidativo, la activación de caspasas y consecuente apoptosis (Ayala-Peña y col., 2016). En relación a esto, el pre-tratamiento de las células ARPE-19 con el agonista de los RXRs, el HX630, bloqueó la producción de ROS promovida por la BMAA. Además, redujo los valores de muerte y evitó la disminución de la actividad metabólica. Este hallazgo, sumado a los efectos protectores establecidos para este agonista en las neuronas, permite sugerir que la activación de los RXR podría ser un eventual blanco terapéutico a evaluar para prevenir los daños originados por la BMAA.

CONCLUSIONES



En conclusión, en esta Tesis se ha demostrado que la exposición a la BMAA resultó tóxica para las células que componen la retina. Nuestros resultados mostraron que la BMAA induce cambios subcelulares nocivos tanto en neuronas, y CGM como en células del EPR. Además, la BMAA altera la funcionalidad de las CGM, afectando su efecto neuroprotector. También se ha determinado que la presencia de Ser y la activación de los receptores RXRs tienen un rol relevante en la promoción de la supervivencia de las neuronas FRs y amacrinas frente al daño inducido por la BMAA. Por su parte, la activación de los RXRs también exhibió efectos protectores sobre las células del EPR, previniendo el daño oxidativo inducido por la BMAA en estas células.

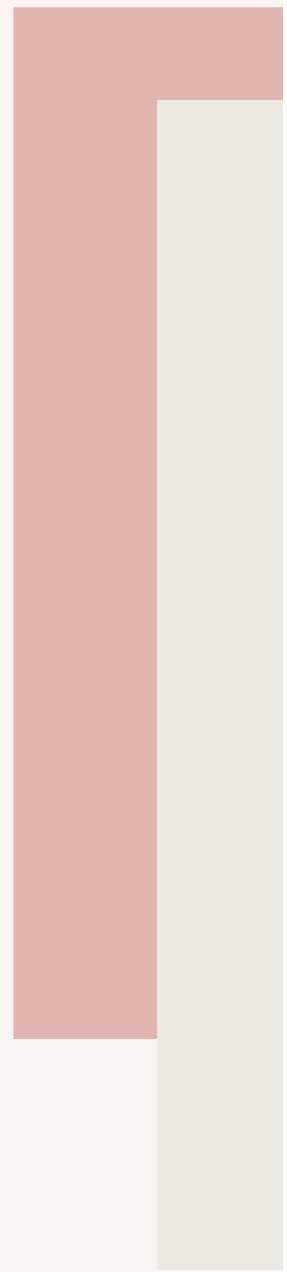
Los resultados obtenidos aquí contribuyen a ampliar nuestro conocimiento sobre los procesos que conducen al desarrollo de enfermedades neurodegenerativas como el complejo CPD/ELA, y a las retinopatías asociadas. Por último, nuestros hallazgos permiten proponer un potencial rol protector de los RXR frente a los cambios degenerativos inducidos en distintos tipos celulares de la retina, cuya implicancia terapéutica apoya su indudable relevancia médica.

PUBLICACIONES ORIGINADAS DE ESTA TESIS

Parte de estos resultados fueron publicados en la revista *Experimental Eye Research*:

Soto, T., Buzzi, E. D., Rotstein, N. P., German, O. L., & Politi, L. E. (2020). Damaging effects of BMAA on retina neurons and Müller glial cells. *Experimental Eye Research*, May, 108342. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108342>

BIBLIOGRAFÍA



- Abdulla, E. M., & Campbell, I. C. (1993). I-BMAA and kainate-induced modulation of neurofilament concentrations as a measure of neurite outgrowth: Implications for an in vitro test of neurotoxicity. *Toxicology in Vitro*, 7(4), 341–344. [https://doi.org/10.1016/0887-2333\(93\)90025-Z](https://doi.org/10.1016/0887-2333(93)90025-Z)
- Abrahan, C. E., Insua, M. F., Politi, L. E., German, O. L., & Rotstein, N. P. (2009). Oxidative stress promotes proliferation and dedifferentiation of retina glial cells in vitro. *Journal of Neuroscience Research*, 87(4), 964–977. <https://doi.org/10.1002/jnr.21903>
- Abrahan, C. E., Miranda, G. E., Agnolazza, D. L., Politi, L. E., & Rotstein, N. P. (2010). Synthesis of sphingosine is essential for oxidative stress-induced apoptosis of photoreceptors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(2), 1171–1180. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3909>
- Adler, R. (1982). Regulation of neurite growth in purified retina neuronal cultures: Effects of PNPf, a substratum-bound, neurite-promoting factor. *Journal of Neuroscience Research*, 8(2–3), 165–177. <https://doi.org/10.1002/jnr.490080207>
- Afanasiev, V., Boisseau, W., Ducoudray, R., & Peskine, A. (2016). *b-N-METHYLAMINO-L-ALANINE ANALYSIS IN THE BRAINS OF PATIENTS WITH KII ALS/PDC*. 112–113. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000021>
- Albano, R., Liu, X. Q., & Lobner, D. (2013). Regulation of system xc- in the SOD1-G93A mouse model of ALS. *Experimental Neurology*, 250, 69–73. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2013.09.008>
- Albano, R., & Lobner, D. (2018). Transport of BMAA into Neurons and Astrocytes by System xc-. *Neurotoxicity Research*, 33(1). <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9739-4>
- Amé, M. V., del Pilar Díaz, M., & Wunderlin, D. A. (2003). Occurrence of toxic cyanobacterial blooms in San Roque Reservoir (Córdoba, Argentina): A field and chemometric study. *Environmental Toxicology*, 18(3), 192–201. <https://doi.org/10.1002/tox.10114>
- Ames, A., & Nesbett, F. B. (1981). In Vitro Retina as an Experimental Model of the Central Nervous System. *Journal of Neurochemistry*, 37(4), 867–877. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1981.tb04473.x>
- Arif, M., Kazim, S. F., Grundke-Iqbal, I., Garruto, R. M., & Iqbal, K. (2014). Tau pathology involves protein phosphatase 2A in Parkinsonism-dementia of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(3), 1144–1149. <https://doi.org/10.1073/pnas.1322614111>
- Augusto De Melo, R., Ae, R., Lú, A., Ae, M. V., Sampaio, C., Ae, S., Fialho De Mello, M. C., Fernando, A. E., & de Mello, G. (2008). Müller Glia as an Active Compartment Modulating Nervous Activity in the Vertebrate Retina: Neurotransmitters and Trophic Factors. *Neurochem Research*. <https://doi.org/10.1007/s11064-008-9604-1>
- Ayala-Peña, V. B., Pilotti, F., Volonté, Y., Rotstein, N. P., Politi, L. E., & German, O. L. (2016a). Protective effects of retinoid x receptors on retina pigment epithelium cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.02.010>

- Ayala-Peña, V. B., Pilotti, F., Volonté, Y., Rotstein, N. P., Politi, L. E., & German, O. L. (2016b). Protective effects of retinoid x receptors on retina pigment epithelium cells. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(6), 1134–1145. <https://doi.org/10.1016/J.BBAMCR.2016.02.010>
- Banack, S. A., Murch, S. J., & Cox, P. A. (2006). Neurotoxic flying foxes as dietary items for the Chamorro people, Marianas Islands. *Journal of Ethnopharmacology*, 106(1), 97–104. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.12.032>
- Beri, J., Nash, T., Martin, R. M., & Bereman, M. S. (2017). Exposure to BMAA mirrors molecular processes linked to neurodegenerative disease. *Proteomics*, 17(17–18), 1700161. <https://doi.org/10.1002/pmic.201700161>
- Bolaños, J. P., Heales, S. J. R., Land, J. M., & Clark, J. B. (1995). Effect of Peroxynitrite on the Mitochondrial Respiratory Chain: Differential Susceptibility of Neurones and Astrocytes in Primary Culture. *Journal of Neurochemistry*, 64(5), 1965–1972. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.64051965.x>
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Brandstätter, J. H., Koulen, P., & Wässle, H. (1998). Diversity of glutamate receptors in the mammalian retina. *Vision Research*, 38(10), 1385–1397. [https://doi.org/10.1016/S0042-6989\(97\)00176-4](https://doi.org/10.1016/S0042-6989(97)00176-4)
- Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., & Reichenbach, A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 25(4), 397–424. <https://doi.org/10.1016/J.PRETEYERES.2006.05.003>
- Buenz, E. J., & Howe, C. L. (2007). Beta-methylamino-alanine (BMAA) injures hippocampal neurons in vivo. *NeuroToxicology*, 28(3), 702–704. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.02.010>
- Cai, J., Nelson, K. C., Wu, M., Sternberg, P., & Jones, D. P. (2000). Oxidative damage and protection of the RPE. *Progress in Retinal and Eye Research*, 19(2), 205–221. [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(99\)00009-9](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(99)00009-9)
- Casado, M., López-Guajardo, A., Mellstrom, B., Naranjo, J. R., & Lerma, J. (1996). Functional N-methyl-D-aspartate receptors in clonal rat phaeochromocytoma cells. In *Journal of Physiology* (Issue 2).
- Cepko, C. (2014). Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nature Reviews Neuroscience*, 15(9), 615–627. <https://doi.org/10.1038/nrn3767>
- Chen, L., Yang, P., & Kijlstra, A. (2009). Distribution, markers, and functions of retinal microglia. <Http://Dx.Doi.Org/10.1076/Ocii.10.1.27.10328>, 10(1), 27–39. <https://doi.org/10.1076/Ocii.10.1.27.10328>
- Chernoff, N., Hill, D. J., Diggs, D. L., Faison, B. D., Francis, B. M., Lang, J. R., Larue, M. M., Le, T. T., Loftin, K. A., Lugo, J. N., Schmid, J. E., & Winnik, W. M. (2017). A critical review of the postulated role of the non-essential amino acid, β -N-methylamino-L-alanine, in neurodegenerative disease in humans. *Journal of*

- Toxicology and Environmental Health - Part B: Critical Reviews*, 20(4), 183–229. <https://doi.org/10.1080/10937404.2017.1297592>
- Chiu, A. S., Gehringer, M. M., Braidy, N., Guillemin, G. J., Welch, J. H., & Neilan, B. A. (2012). Excitotoxic potential of the cyanotoxin β -methyl-amino-L-alanine (BMAA) in primary human neurons. *Toxicol*, 60(6), 1159–1165. <https://doi.org/10.1016/j.toxicol.2012.07.169>
- Chiu, A. S., Gehringer, M. M., Braidy, N., Guillemin, G. J., Welch, J. H., & Neilan, B. A. (2013). Gliotoxicity of the cyanotoxin, β -methyl-amino-L-alanine (BMAA). *Scientific Reports*, 3, 1–5. <https://doi.org/10.1038/srep01482>
- Conde, C., & Cáceres, A. (2009). Microtubule assembly, organization and dynamics in axons and dendrites. In *Nature Reviews Neuroscience* (Vol. 10, Issue 5, pp. 319–332). Nat Rev Neurosci. <https://doi.org/10.1038/nrn2631>
- Cowan, K., Anichtchik, O., & Luo, S. (2019). *Mitochondrial integrity in neurodegeneration*.
- Cox, P. A., Banack, S. A., & Murch, S. J. (2003a). Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(23), 13380–13383. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235808100>
- Cox, P. A., Banack, S. A., & Murch, S. J. (2003b). Biomagnification of cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease among the Chamorro people of Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(23), 13380–13383. <https://doi.org/10.1073/pnas.2235808100>
- Cox, P. A., Banack, S. A., Murch, S. J., Rasmussen, U., Tien, G., Bidigare, R. R., Metcalf, J. S., Morrison, L. F., Codd, G. A., & Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce β -N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 5074–5078. <https://doi.org/10.1073/pnas.0501526102>
- Cox, P. A., Kostrzewa, R. M., & Guillemin, G. J. (2018). BMAA and Neurodegenerative Illness. *Neurotoxicity Research*, 33(1), 178–183. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9753-6>
- Cox, T. A., McDarby, J. v., Lavine, L., Steele, J. C., & Calne, D. B. (1989). A Retinopathy on Guam with High Prevalence in Lytico-Bodig. *Ophthalmology*, 96(12), 1731–1735. [https://doi.org/10.1016/S0161-6420\(89\)32656-X](https://doi.org/10.1016/S0161-6420(89)32656-X)
- Cramer, P. E., Cirrito, J. R., Wesson, D. W., Lee, C. Y. D., Karlo, J. C., Zinn, A. E., Casali, B. T., Restivo, J. L., Goebel, W. D., James, M. J., Brunden, K. R., Wilson, D. A., & Landreth, G. E. (2012). ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science*, 335(6075), 1503–1506. <https://doi.org/10.1126/science.1217697>
- Cucchiaroni, M. L., Viscomi, M. T., Bernardi, G., Molinari, M., Guatteo, E., & Mercuri, N. B. (2010). Metabotropic Glutamate Receptor 1 Mediates the Electrophysiological and Toxic Actions of the Cycad Derivative -N-Methylamino-L-Alanine on Substantia Nigra Pars Compacta DAergic Neurons. *Journal of Neuroscience*, 30(15), 5176–5188. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5351-09.2010>

- Davis, D. A., Cox, P. A., Banack, S. A., Lecusay, P. D., Garamszegi, S. P., Hagan, M. J., Powell, J. T., Metcalf, J. S., Palmour, R. M., Beierschmitt, A., Bradley, W. G., & Mash, D. C. (2020). L-Serine Reduces Spinal Cord Pathology in a Vervet Model of Preclinical ALS/MND. *J Neuropathol Exp Neurol*, 79, 393–406. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlaa002>
- Dawson, M. I., & Xia, Z. (2012). The retinoid X receptors and their ligands. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1821(1), 21–56. <https://doi.org/10.1016/J.BBALIP.2011.09.014>
- de Genaro, P., Simón, M. V., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2013). Retinoic acid promotes apoptosis and differentiation in photoreceptors by activating the p38 MAP kinase pathway. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 54(5), 3143–3156. <https://doi.org/10.1167/iovs.12-11049>
- de Munck, E., Muñoz-Sáez, E., Miguel, B. G., Solas, M. T., Ojeda, I., Martínez, A., Gil, C., & Arahetes, R. M. (2013). β -N-methylamino-l-alanine causes neurological and pathological phenotypes mimicking Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS): The first step towards an experimental model for sporadic ALS. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(2), 243–255. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2013.04.007>
- de Vos, K. J., Grierson, A. J., Ackerley, S., & Miller, C. C. J. (2008). Role of Axonal Transport in Neurodegenerative Diseases. *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 151–173. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.31.061307.090711>
- Degano, M. F., & Rodríguez, M. I. (2016). *Embalse San Roque*. 3(1).
- Delcourt, N., Claudepierre, T., Maignien, T., Arnich, N., & Mattei, C. (2018). Cellular and molecular aspects of the β -N-Methylamino-l-alanine (BMAA) mode of action within the neurodegenerative pathway: Facts and controversy. *Toxins*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/toxins10010006>
- Dias Pereira, F. R., de Souza Almeida, R. R., Sovrani, V., Thomaz, N. K., Gonçalves, C.-A., Quincozes-Santos, A., & Bobermin, L. D. (2022). Glioprotective Effects of Resveratrol Against BMAA-Induced Astroglial Dysfunctions. *Neurotoxicity Research*, 40, 530–541. <https://doi.org/10.1007/s12640-022-00492-9>
- Diaz-parga, P., Goto, J. J., & Krishnan, V. v. (2018). Chemistry and Chemical Equilibrium Dynamics of BMAA and Its Carbamate Adducts. *Neurotoxicity Research*, 33(1), 76–86. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9801-2>
- D'Mello, F., Braidy, N., Marçal, H., Guillemin, G., Rossi, F., Chinian, M., Laurent, D., Teo, C., & Neilan, B. A. (2017). Cytotoxic Effects of Environmental Toxins on Human Glial Cells. *Neurotoxicity Research*, 31(2), 245–258. <https://doi.org/10.1007/s12640-016-9678-5>
- Dunlop, R. A., Cox, P. A., Banack, S. A., & Rodgers, K. J. (2013). The Non-Protein Amino Acid BMAA Is Misincorporated into Human Proteins in Place of l-Serine Causing Protein Misfolding and Aggregation. *PLoS ONE*, 8(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075376>
- Dunlop, R. A., & Guillemin, G. J. (2019). The Cyanotoxin and Non-protein Amino Acid β -Methylamino-L-Alanine (L-BMAA) in the Food Chain: Incorporation into Proteins and Its Impact on Human Health. *Neurotoxicity Research* (2019), 36:602–611. <https://doi.org/10.1007/s12640-019-00089-9>

- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicologic Pathology*, 35, 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- Esterhuizen-Londt, M., Pflugmacher, S., & Downing, T. G. (2011). The effect of β -N-methylamino-l-alanine (BMAA) on oxidative stress response enzymes of the macrophyte *Ceratophyllum demersum*. *Toxicon*, 57(5), 803–810. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.02.015>
- Fletcher, E. L., Hack, I., Brandstätter, J. H., & Wässle, H. (2000). Synaptic localization of NMDA receptor subunits in the rat retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 420(October 1999), 98–112. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9861\(20000424\)420:1<98::AID-CNE7>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9861(20000424)420:1<98::AID-CNE7>3.0.CO;2-U) [pii]
- Friling, S., Bergsland, M., & Kjellander, S. (2009). Activation of Retinoid X Receptor increases dopamine cell survival in models for Parkinson's disease. *BMC Neuroscience*, 10. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-10-146>
- Gaballah, H. H., Zakaria, S. S., Elbatsh, M. M., & Tahoona, N. M. (2016). Modulatory effects of resveratrol on endoplasmic reticulum stress-associated apoptosis and oxido-inflammatory markers in a rat model of rotenone-induced Parkinson's disease. *Chemico-Biological Interactions*, 251, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.03.023>
- Gademann, K., & Portmann, C. (2008). Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Current Organic Chemistry*, 12(4), 326–341. <https://doi.org/10.2174/138527208783743750>
- Geraldo, S., & Gordon-Weeks, P. R. (2009). Cytoskeletal dynamics in growth-cone steering. *Journal of Cell Science*, 122(20), 3595–3604. <https://doi.org/10.1242/jcs.042309>
- Gerić, M., Gajski, G., Domijan, A. M., Garaj-Vrhovac, V., Filipič, M., & Žegura, B. (2019). Genotoxic effects of neurotoxin β -N-methylamino-l-alanine in human peripheral blood cells. *Chemosphere*, 214, 623–632. <https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2018.09.155>
- German, O. L., Insua, M. F., Gentili, C., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2006). Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *Journal of Neurochemistry*, 98(5), 1507–1520. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.04061.x>
- German, O. L., Monaco, S., Agnolazza, D. L., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2013). Retinoid X receptor activation is essential for docosahexaenoic acid protection of retina photoreceptors. *Journal of Lipid Research*, 54(8), 2236–2246. <https://doi.org/10.1194/jlr.M039040>
- Giannuzzi, L., Sedan, D., Echenique, R., & Andrinolo, D. (2011). An acute case of intoxication with cyanobacteria and cyanotoxins in recreational water in Salto Grande Dam, Argentina. *Marine Drugs*, 9(11), 2164–2175. <https://doi.org/10.3390/md9112164>
- Gilman, C. P., & Mattson, M. P. (2002). Do Apoptotic Mechanisms Regulate Synaptic Plasticity and Growth-Cone Motility? *NeuroMolecular Medicine*, 197.
- Goldman, D. (2014). Müller glia cell reprogramming and retina regeneration. *Nat Rev Neurosci*, 431–442. <https://doi.org/10.1038/nrn3723>

- Grabham, P. W., Reznik, B., & Goldberg, D. J. (2003). Microtubule and Rac 1-dependent F-actin in growth cones. *Journal of Cell Science*, 116(18), 3739–3748. <https://doi.org/10.1242/jcs.00686>
- Guidry, C. (2005). The role of Müller cells in fibrocontractive retinal disorders. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 24, Issue 1, pp. 75–86). <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2004.07.001>
- Haque, F., Banayan, S., Yee, J., & Chiang, Y. W. (2017). *Extraction and applications of cyanotoxins and other cyanobacterial secondary metabolites*. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.05.106>
- Harada, T., Harada, C., Nakayama, N., Okuyama, S., Yoshida, K., Kohsaka, S., Matsuda, H., & Wada, K. (2000). Modification of glial-neuronal cell interactions prevents photoreceptor apoptosis during light-induced retinal degeneration. *Neuron*, 26(2), 533–541. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)81185-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)81185-X)
- Hicks, D., & Barnstable, C. J. (1987). Different rhodopsin monoclonal antibodies reveal different binding patterns on developing and adult rat retina. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry: Official Journal of the Histochemistry Society*, 35(11), 1317–1328. <https://doi.org/10.1177/35.11.3655327>
- Hicks, D., & Courtois, Y. (1990a). The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro 1. An improved method for isolation and culture. *Experimental Eye Research*, 51(2), 119–129. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(90\)90063-Z](https://doi.org/10.1016/0014-4835(90)90063-Z)
- Hicks, D., & Courtois, Y. (1990b). The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro 1. An improved method for isolation and culture. *Experimental Eye Research*, 51(2), 119–129. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(90\)90063-Z](https://doi.org/10.1016/0014-4835(90)90063-Z)
- Insua, M. F., Garelli, A., Rotstein, N. P., German, O. L., Arias, A., & Politi, L. E. (2003). Cell cycle regulation in retinal progenitors by glia-derived neurotrophic factor and docosahexaenoic acid. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 44(5), 2235–2244. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0952>
- Insua, M. F., Simón, M. V., Garelli, A., de Los Santos, B., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2008). Trophic factors and neuronal interactions regulate the cell cycle and Pax6 expression in Müller stem cells. *Journal of Neuroscience Research*, 86(7), 1459–1471. <https://doi.org/10.1002/jnr.21606>
- Jang, M. H., Ha, K., Joo, G. J., & Takamura, N. (2003). Toxin production of cyanobacteria is increased by exposure to zooplankton. In *Freshwater Biology* (Vol. 48, Issue 9). <https://doi.org/10.1046/j.1365-2427.2003.01107.x>
- Jin, G. F., Hurst, J. S., & Godley, B. F. (2001). Hydrogen peroxide stimulates apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Current Eye Research*, 22(3), 165–173. <https://doi.org/10.1076/CEYR.22.3.165.5517>
- Jordán, J., Galindo, M. F., Prehn, J. H., Weichselbaum, R. R., Beckett, M., Ghadge, G. D., Roos, R. P., Leiden, J. M., & Miller, R. J. (1997). p53 expression induces apoptosis in hippocampal pyramidal neuron cultures. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(4), 1397–1405.
- Joshi, H. C., & Cleveland, D. W. (1989). Differential Utilization of b-Tubulin Isotypes in Differentiating Neurites. *Journal of Cell Biology*, 109, 663–673.

- Just, C. S. S., & Pintor, J. (2009). 12. *El ojo, ventana al sistema nervioso central* (M. T. M. Portugal & A. R. Artalejo, Eds.; pp. 347–406).
- Kakaroubas, N., Brennan, S., Keon, M., & Saksena, N. K. (2019). *Pathomechanisms of Blood-Brain Barrier Disruption in ALS*. <https://doi.org/10.1155/2019/2537698>
- Kane, M. D., vanden Heuvel, J. P., Isom, G. E., & Schwarz, R. D. (1998). Differential expression of group I metabotropic glutamate receptors (mGluRs) in the rat pheochromocytoma cell line PC12: Role of nerve growth factor and ras. *Neuroscience Letters*, 252(1), 1–4. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(98\)00484-4](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(98)00484-4)
- Karlsson, O., Berg, C., Brittebo, E. B., & Lindquist, N. G. (2009). Retention of the cyanobacterial neurotoxin b-N-methylamino-L-alanine in melanin and neuromelanin-containing cells - A possible link between Parkinson-dementia complex and pigmentary retinopathy. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 22(1), 120–130. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2008.00508.x>
- Karlsson, O., Jiang, L., Andersson, M., Ilag, L. L., & Brittebo, E. B. (2014). Protein association of the neurotoxin and non-protein amino acid BMAA (β -N-methylamino-L-alanine) in the liver and brain following neonatal administration in rats. *Toxicology Letters*, 226(1), 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.01.027>
- Karlsson, O., & Lindquist, N. G. (2016). Melanin and neuromelanin binding of drugs and chemicals: toxicological implications. In *Archives of Toxicology* (Vol. 90, Issue 8, pp. 1883–1891). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1757-0>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970 227:5259, 227(5259), 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lance, E., Arnich, N., Maignien, T., & Biré, R. (2018). Occurrence of β -N-methylamino-L-alanine (BMAA) and isomers in aquatic environments and aquatic food sources for humans. In *Toxins* (Vol. 10, Issue 2, p. 83). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/toxins10020083>
- Lara, R. J., Islam, M. S., Yamasaki, S., Neogi, S. B., & Nair, G. B. (2011). Aquatic Ecosystems, Human Health, and Ecohydrology. *Treatise on Estuarine and Coastal Science*, 263–299. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374711-2.01015-9>
- Lau, A., & Tymianski, M. (2010). Glutamate receptors, neurotoxicity and neurodegeneration. *Pflugers Arch - Eur J Physiol*, 460 (2), 525–542. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0809-1>
- Lewerenz, J., Hewett, S. J., Huang, Y., Lambros, M., Gout, P. W., Kalivas, P. W., Massie, A., Smolders, I., Methner, A., Pergande, M., Smith, S. B., Ganapathy, V., & Maher, P. (2013). The cystine/glutamate antiporter system xc⁻ in health and disease: From molecular mechanisms to novel therapeutic opportunities. *Antioxidants and Redox Signaling*, 18(5), 522–555. <https://doi.org/10.1089/ars.2011.4391>
- Liao, C., Xu, J., Chen, Y., Ip, N. Y., Lim, D., & Spampinato, S. F. (2021). *biomolecules Retinal Dysfunction in Alzheimer's Disease and Implications for Biomarkers*. <https://doi.org/10.3390/biom11081215>

- Lin, F., & Luo, S. Q. (2019). Mitochondria in neurodegenerative diseases. *CNS Neuroscience and Therapeutics*, 25(7), 813–815. <https://doi.org/10.1111/CNS.13183>
- Liu, X., Albano, R., & Lobner, D. (2013). *FGF-2 induces neuronal death through upregulation of system xc*. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2013.12.018>
- Liu, X., Rush, T., Zapata, J., & Lobner, D. (2009). β -N-methylamino-l-alanine induces oxidative stress and glutamate release through action on system Xc-. *Experimental Neurology*, 217(2), 429–433. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2009.04.002>
- Lobner, D., Piana, P. M. T., Salous, A. K., & Peoples, R. W. (2007). β -N-methylamino-l-alanine enhances neurotoxicity through multiple mechanisms. *Neurobiology of Disease*, 25(2), 360–366. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2006.10.002>
- Lu, L., Hackett, S. F., Mincey, A., Lai, H., & Campochiaro, P. A. (2006). Effects of different types of oxidative stress in RPE cells. *Journal of Cellular Physiology*, 206(1), 119–125. <https://doi.org/10.1002/JCP.20439>
- Ma, M., Ferguson, T. A., Schoch, K. M., Li, J., Qian, Y., Shofer, F. S., Saatman, K. E., & Neumar, R. W. (2013). Calpains mediate axonal cytoskeleton disintegration during Wallerian degeneration. *Neurobiology of Disease*, 56, 34–46. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.03.009>
- Main, B. J., Dunlop, R. A., & Rodgers, K. J. (2016). The use of l-serine to prevent β -methylamino-l-alanine (BMAA)-induced proteotoxic stress in vitro. *Toxicon*, 109, 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.11.003>
- Mariani, M. M., Malm, T., Lamb, R., Jay, T. R., Neilson, L., Casali, B., Medarametla, L., & Landreth, G. E. (2017). Neuronally-directed effects of RXR activation in a mouse model of Alzheimer's disease. *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/srep42270>
- Masland, R. H. (2001). *The fundamental plan of the retina*. <http://neurosci.nature.com>
- Massey, S. C., Blankenship, K., & Mills, S. L. (1991). Cholinergic amacrine cells in the rabbit retina accumulate muscimol. *Visual Neuroscience*, 6(2), 113–117. <https://doi.org/10.1017/S0952523800010506>
- Matias, I., Diniz, L. P., Damico, I. V., Araujo, A. P. B., Neves, L. da S., Vargas, G., Leite, R. E. P., Suemoto, C. K., Nitrini, R., Jacob-Filho, W., Grinberg, L. T., Hol, E. M., Middeldorp, J., & Gomes, F. C. A. (2022). Loss of lamin-B1 and defective nuclear morphology are hallmarks of astrocyte senescence in vitro and in the aging human hippocampus. *Aging Cell*, 21(1), e13521. <https://doi.org/10.1111/ACEL.13521>
- Mattson, M. P. (2008). Glutamate and Neurotrophic Factors in Neuronal Plasticity and Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1144, 97–112. <https://doi.org/10.1196/annals.1418.005>
- Mesci, P., Zaïdi, S., Lobsiger, C. S., Millecamps, S., Escartin, C., Seilhean, D., Sato, H., Mallat, M., & Boillée, S. (2015). System xC- is a mediator of microglial function and its deletion slows symptoms in amyotrophic lateral sclerosis mice. *Brain : A Journal of Neurology*, 138(2014), 53–68. <https://doi.org/10.1093/brain/awu312>
- Metcalfe, J. S., Lobner, D., Banack, S. A., Cox, G. A., Nunn, P. B., Wyatt, P. B., & Cox, P. A. (2017). Analysis of BMAA enantiomers in cycads, cyanobacteria, and mammals:

- in vivo formation and toxicity of d-BMAA. *Amino Acids*, 49(8), 1427–1439. <https://doi.org/10.1007/s00726-017-2445-y>
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1–2), 55–63. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)
- Murch, S. J., Cox, P. A., & Banack, S. A. (2004). A mechanism for slow release of biomagnified cyanobacterial neurotoxins and neurodegenerative disease in Guam. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(33), 12228–12231. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404926101>
- Myers, T. G., & Nelson, S. D. (1990). Neuroactive carbamate adducts of beta-N-methylamino-L-alanine and ethylenediamine. Detection and quantitation under physiological conditions by ¹³C NMR. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(18), 10193–10195. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2113048>
- Nakano, M., Lockhart, C. M., Kelly, E. J., & Rettie, A. E. (2014). Ocular cytochrome P450s and transporters: roles in disease and endobiotic and xenobiotic disposition. *Drug Metabolism Reviews*, 46(3), 247. <https://doi.org/10.3109/03602532.2014.921190>
- Nunn, P. B., & O'Brien, P. (1989). The interaction of β-N-methylamino-L-alanine with bicarbonate: an ¹H-NMR study. *FEBS Letters*, 251(1–2), 31–35. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(89\)81423-1](https://doi.org/10.1016/0014-5793(89)81423-1)
- Okamoto, S., Esumi, S., Hamaguchi-Hamada, K., & Hamada, S. (2018). β-N-methylamino-L-alanine (BMAA) suppresses cell cycle progression of non-neuronal cells. *Scientific Reports*, 8(1), 17995. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36418-9>
- Okle, O., Stemmer, K., Deschl, U., & Dietrich, D. R. (2013). L-BMAA induced ER stress and enhanced caspase 12 cleavage in human neuroblastoma SH-SY5Y cells at low nonexcitotoxic concentrations. *Toxicological Sciences*, 131(1), 217–224. <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfs291>
- Osking, Z., Ayers, J. I., Hildebrandt, R., Borchelt, D. R., Read, T.-A., & Vitriol, E. A. (2019). *ALS-Linked SOD1 Mutants Enhance Neurite Outgrowth and Branching in Adult Motor Neurons*. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2018.12.026>
- Paerl, H. W., & Otten, T. G. (2013). Harmful Cyanobacterial Blooms: Causes, Consequences, and Controls. *Microbial Ecology*, 65(4), 995–1010. <https://doi.org/10.1007/s00248-012-0159-y>
- Pathak, R. U., Soujanya, M., & Mishra, R. K. (2021). Deterioration of nuclear morphology and architecture: A hallmark of senescence and aging. *Ageing Research Reviews*, 67, 101264. <https://doi.org/10.1016/J.ARR.2021.101264>
- Poitry, S., Poitry-Yamate, C., Ueberfeld, J., MacLeish, P. R., & Tsacopoulos, M. (2000). Mechanisms of glutamate metabolic signaling in retinal glial (Muller) cells. *Journal of Neuroscience*, 20(5), 1809–1821. <https://doi.org/10.1523/jneurosci.20-05-01809.2000>
- Politi, L., & Adler, R. (1988). Selective failure of long-term survival of isolated photoreceptors from both homozygous and heterozygous rd (retinal degeneration) mice. *Experimental Eye Research*, 47(2), 269–282. [https://doi.org/10.1016/0014-4835\(88\)90010-3](https://doi.org/10.1016/0014-4835(88)90010-3)

- Politi, L. E., Bouzat, C., De Los Santos, E. B., & Barrantes, F. J. (1996). Heterologous retinal cultured neurons and cell adhesion molecules induce clustering of acetylcholine receptors and polynucleation in mouse muscle BC3H-1 clonal cell line. *Journal of Neuroscience Research*, 43(6), 639–651. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960315\)43:6<639::AID-JNR1>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960315)43:6<639::AID-JNR1>3.0.CO;2-F)
- Politi, L. E., Lehar, M., & Adler, R. (1988). Development of neonatal mouse retinal neurons and photoreceptors in low density cell culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 29(4), 534–543. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3281914>
- Politi, L. E., Rotstein, N. P., & Carri, N. G. (2001). Effect of GDNF on neuroblast proliferation and photoreceptor survival: Additive protection with docosahexaenoic acid. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(12), 3008–3015.
- Politi, L. E., Rotstein, N. P., Salvador, G., Giusto, N. M., & Insua, M. F. (2001). Insulin-like growth factor-I is a potential trophic factor for amacrine cells. *J. Neurochem.*, 76(0022-3042 (Print)), 1199–1211.
- Politi, L., Rotstein, N., & Carri, N. (2001). Effects of docosahexaenoic acid on retinal development: Cellular and molecular aspects. *Lipids*, 36(9), 927–935.
- Popova, D., Karlsson, J., & Jacobsson, S. O. P. (2017). Comparison of neurons derived from mouse P19, rat PC12 and human SH-SY5Y cells in the assessment of chemical- and toxin-induced neurotoxicity. *BMC Pharmacology and Toxicology*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s40360-017-0151-8>
- Prado Spalm, F. H., Vera, M. S., Dibo, M. J., Victoria Simón, M., Politi, L. E., & Rotstein, N. P. (2019). Ceramide Induces the Death of Retina Photoreceptors Through Activation of Parthanatos. *Molecular Neurobiology*, 56(7), 4760–4777. <https://doi.org/10.1007/s12035-018-1402-4>
- Rao, S. D., Banack, S. A., Cox, P. A., & Weiss, J. H. (2006). BMAA selectively injures motor neurons via AMPA/kainate receptor activation. *Experimental Neurology*, 201(1), 244–252. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2006.04.017>
- Reh, T. A., & Fischer, A. J. (2006). Retinal Stem Cells. In *Methods in Enzymology* (Vol. 419, pp. 52–73). Academic Press Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(06\)19003-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(06)19003-5)
- Rojas, P., Ramírez, A. I., Fernández-Albarral, J. A., López-Cuenca, I., Salobar-García, E., Cadena, M., Elvira-Hurtado, L., Salazar, J. J., de Hoz, R., & Ramírez, J. M. (2020). Amyotrophic Lateral Sclerosis: A Neurodegenerative Motor Neuron Disease With Ocular Involvement. *Frontiers in Neuroscience*, 14. <https://doi.org/10.3389/FNINS.2020.566858/FULL>
- Rotstein, N. P., Avelano, M. I., Barrantes, F. J., & Politi, L. E. (1996). Docosahexaenoic acid is required for the survival of rat retinal photoreceptors in vitro. *J Neurochem*, 66(5), 1851–1859.
- Rotstein, N. P., Politi, L. E., & Avelaño, M. I. (1998). Docosahexaenoic acid promotes differentiation of developing photoreceptors in culture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 39(13), 2750–2758. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9856786>

- Rotstein, N. P., Politi, L. E., German, O. L., & Girotti, R. (2003). Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *44*(5), 2252–2259. <https://doi.org/10.1167/iovs.02-0901>
- Santucci, S., Zsürger, N., & Chabry, J. (2009). β -N-methylamino-L-alanine induced in vivo retinal cell death. *Journal of Neurochemistry*, *109*(3), 819–825. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06022.x>
- Sharma, S., Shen, T., Chitranshi, N., Gupta, V., Veer, Devaraj Basavarajappa, S., Soumalya Sarkar, S., Mirzaei, M., Mehdi, You, Yuyi, Krezel, W., Stuart, S., Graham, L., & Gupta, V. (2022). Retinoid X Receptor: Cellular and Biochemical Roles of Nuclear Receptor with a Focus on Neuropathological Involvement Endonuclease/exonuclease/phosphatase family domain-containing protein 1 eNOS Endothelial nitric oxide synthase FoxO3A Forkhead box prote. *Molecular Neurobiology*, *59*, 2027–2050. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02709-y>
- Shen, H., Kim, K., Oh, Y., Yoon, K. S., Baik, H. H., Kim, S. S., Ha, J., Kang, I., & Choe, W. (2016). Neurotoxin N-methylamino-L-alanine induces endoplasmic reticulum stress-mediated neuronal apoptosis. *Molecular Medicine Reports*, *14*(5), 4873–4880. <https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5802>
- Shen, X., Valencia, C. A., Szostak, J. W., Dong, B., Liu, R., Davis, D., Chen, W., Jackson, H., Parente, P., Hopkins, W., Chen, Q., Dimo, N., Luke, T., Murphy, R., Scott, A. M., McArthur, G., Macgregor, D., Stur, S., Tai, T. Y., ... Bergman, B. (2005). Diverse taxa of cyanobacteria produce N-methylamino-L-alanine, a neurotoxic amino acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(17), 5074–5078.
- Silva, D. F., Candeias, E., Esteves, A. R., Magalhães, J. D., Ferreira, I. L., Nunes-Costa, D., Rego, A. C., Empadinhas, N., & Cardoso, S. M. (2020). Microbial BMAA elicits mitochondrial dysfunction, innate immunity activation, and Alzheimer's disease features in cortical neurons. *Journal of Neuroinflammation*, *17*:332 RES. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02004-y>
- Silva, M. T. (2010). Secondary necrosis: The natural outcome of the complete apoptotic program. *FEBS Letters*, *584*(22), 4491–4499. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.10.046>
- Silverstein, S. M., Demmin, D. L., Schallek, J. B., & Fradkin, S. I. (2020). Measures of Retinal Structure and Function as Biomarkers in Neurology and Psychiatry. *Biomarkers in Neuropsychiatry*, *2*. <https://doi.org/10.1016/J.BIONPS.2020.100018>
- Simón, M. V., Vera, M. S., Tenconi, P. E., Soto, T., Prado Spalm, F. H., Torlaschi, C., Mateos, M. v., & Rotstein, N. P. (2022). Sphingosine-1-phosphate and ceramide-1-phosphate promote migration, pro-inflammatory and pro-fibrotic responses in retinal pigment epithelium cells. *Experimental Eye Research*, *224*, 109222. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2022.109222>
- Simón, M. V., de Genaro, P., Abrahan, C. E., de los Santos, B., Rotstein, N. P., & Politi, L. E. (2012). Muller glial cells induce stem cell properties in retinal progenitors in vitro and promote their further differentiation into photoreceptors. *Journal of Neuroscience Research*, *90*(2), 407–421. <https://doi.org/10.1002/jnr.22747>

- Simón, M. V., Prado Spalm, F. H., Politi, L. E., & Rotstein, N. P. (2015). Sphingosine-1-phosphate is a crucial signal for migration of retina müller glial cells. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, *56*(10), 5808–5815. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-16195>
- Smith, Q. R., Nagura, H., Takada, Y., & Duncan, M. W. (1992). Facilitated transport of the neurotoxin, beta-N-methylamino-L-alanine, across the blood-brain barrier. *Journal of Neurochemistry*, *58*(4), 1330–1337. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb11346.x>
- Soldatov, V. O., Kukharsky, M. S., Belykh, A. E., Sobolev, A. M., & Deykin, A. v. (2021). Retinal damage in amyotrophic lateral sclerosis: Underlying mechanisms. *Eye and Brain*, *13*, 131–146. <https://doi.org/10.2147/EB.S299423>
- Staton, P. C., & Bristow, D. R. (1997). The dietary excitotoxins β -N-methylamino-L-alanine and β -N-oxalylamino-L-alanine induce necrotic- and apoptotic-like death of rat cerebellar granule cells. *Journal of Neurochemistry*, *69*(4), 1508–1518. <https://doi.org/10.1046/J.1471-4159.1997.69041508.X>
- Stone, J., & Dreher, Z. (1987). Relationship Between Astrocytes, Ganglion Cells and Vasculature of the Retina. In *THE JOURNAL OF COMPARATIVE NEUROLOGY*.
- Stone, J., Maslim, J., Valter-Kocsi, K., Kyle Mervin, Bowers, F., Chu, Y., Barnett, N., Provis, J., Lewis, G., Fisher, S. K., Bisti, S., Gargini, C., Cervetto, L., Merin, S., & Pe'er, J. (1999). Mechanisms of photoreceptor death and survival in mammalian retina. In *Progress in Retinal and Eye Research* (Vol. 18, Issue 6, pp. 689–735). [https://doi.org/10.1016/S1350-9462\(98\)00032-9](https://doi.org/10.1016/S1350-9462(98)00032-9)
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. In *Physiological Reviews* (Vol. 85, Issue 3, pp. 845–881). *Physiol Rev*. <https://doi.org/10.1152/physrev.00021.2004>
- Strettoi, E., & Masland, R. H. (1996). *The number of unidentified amacrine cells in the mammalian retina (starburstindoleamineAll cellsanatomy cortex)* (Vol. 93).
- Takser, L., Benachour, N., Husk, B., Cabana, H., & Gris, D. (2016). Cyanotoxins at low doses induce apoptosis and inflammatory effects in murine brain cells: Potential implications for neurodegenerative diseases. *Toxicology Reports*, *3*, 180–189. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.12.008>
- Tan, V. X., Lassus, B., Lim, C. K., Tixador, P., Courte, J., Bessedé, A., Guillemín, G. J., & Peyrin, J. M. (2018). Neurotoxicity of the Cyanotoxin BMAA Through Axonal Degeneration and Intercellular Spreading. *Neurotoxicity Research*, *33*(1), 62–75. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9790-1>
- Tan, V. X., Mazzocco, C., Varney, B., Bodet, D., Guillemín, T. A., Bessedé, A., & Guillemín, G. J. (2018). Detection of the Cyanotoxins L-BMAA Uptake and Accumulation in Primary Neurons and Astrocytes. *Neurotoxicity Research*, *33*(1), 55–61. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9787-9>
- Tenconi, P. E., Bermúdez, V., Oresti, G. M., Giusto, N. M., Salvador, G. A., & Mateos, M. v. (2019). High glucose-induced phospholipase D activity in retinal pigment epithelium cells: New insights into the molecular mechanisms of diabetic retinopathy. *Experimental Eye Research*, *184*, 243–257. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2019.04.028>

- Tischler, A. S. & L A Greene. (1978, August). *Morphologic and cytochemical properties of a clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor*. 39(2). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/682602/>
- Torriglia, A., Jaadane, I., & Lebon, C. (2016). Mechanisms of cell death in neurodegenerative and retinal diseases: Common pathway? In *Current Opinion in Neurology* (Vol. 29, Issue 1, pp. 55–60). Lippincott Williams and Wilkins. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000272>
- Turner, D. L., & Cepko, C. L. (1987). A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* 1987 328:6126, 328(6126), 131–136. <https://doi.org/10.1038/328131a0>
- van Onselen, R., Venables, L., van de Venter, M., & Downing, T. G. (2018). β -N-Methylamino-L-Alanine Toxicity in PC12: Excitotoxicity vs. Misincorporation. *Neurotoxicity Research*, 33(1), 15–23. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9743-8>
- Vera, M. S., Simón, M. V., Prado Spalm, F. H., Ayala-Peña, V. B., German, O. L., Politi, L. E., Santiago Valtierra, F. X., & Rotstein, N. P. (2021). Ceramide-1-phosphate promotes the migration of retina Müller glial cells. *Experimental Eye Research*, 202. <https://doi.org/10.1016/J.EXER.2020.108359>
- Volonté, Y. A., Ayala-Peña, V. B., Vallese-Maurizi, H., Garelli, A., Rotstein, N. P., Politi, L. E., & German, O. L. (2021). Retinoid X receptor activation promotes photoreceptor survival and modulates the inflammatory response in a mouse model of retinitis pigmentosa. *BBA - Molecular Cell Research*, 167–4889. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2021.119098>
- Volonté, Y. A., Vallese-Maurizi, H., Dibo, M. J., Ayala-Peña, V. B., Garelli, A., Zanetti, S. R., Turpaud, A., Craft, C. M., Rotstein, N. P., Politi, L. E., & German, O. L. (2019). A Defective Crosstalk Between Neurons and Müller Glial Cells in the rd1 Retina Impairs the Regenerative Potential of Glial Stem Cells. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 13. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00334>
- Wahlin, K. J., Adler, R., Zack, D. J., & Campochiaro, P. A. (2001). Neurotrophic signaling in normal and degenerating rodent retinas. *Experimental Eye Research*, 73(5), 693–701. <https://doi.org/10.1006/exer.2001.1078>
- Watanabe, T., & Raff, M. C. (1988). Retinal astrocytes are immigrants from the optic nerve. *Nature* 1988 332:6167, 332(6167), 834–837. <https://doi.org/10.1038/332834a0>
- Weiss, J. H., Christine, C. W., & Choi, D. W. (1989). Bicarbonate Dependence of Glutamate Receptor Activation by B-N-Methylamino-L-Alanine: Channel Recording and Study with Related Compounds. *Neuron*, 3, 321–326.
- Weiss, J., Koh, J.-Y., & Choi, D. (1989). Neurotoxicity of b-N-methylamino-L-alanine (BMAA) and b-N-oxalylamino-L-alanine (BOAA) on cultured cortical neurons. *Brain Research*, 497, 61–71.
- Winkler, B. S., Boulton, M. E., Gottsch, J. D., & Sternberg, P. (1999). Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Molecular Vision*, 5, 32. [/pmc/articles/PMC1773059/](https://pmc/articles/PMC1773059/)

- Wood, R. (2016). Acute animal and human poisonings from cyanotoxin exposure - A review of the literature. *Environment International*, 91, 276–282. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.02.026>
- Yuan, H., Hansen, K. B., Vance, K. M., Ogden, K. K., & Traynelis, S. F. (2009). Control of NMDA receptor function by the NR2 subunit amino-terminal domain. *Journal of Neuroscience*, 29(39), 12045–12058. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1365-09.2009>
- Zeevalk, G. D., & Nicklas, W. J. (1989). Acute excitotoxicity in chick retina caused by the unusual amino acids BOAA and BMAA: Effects of MK-801 and kynurenate. *Neuroscience Letters*, 102(2–3), 284–290. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90093-1](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90093-1)
- Zhou, Y., Tencerová, B., Hartveit, E., & Veruki, M. L. (2016). Functional NMDA receptors are expressed by both A11 and A17 amacrine cells in the rod pathway of the mammalian retina. *Journal of Neurophysiology*, 115(1), 389–403. <https://doi.org/10.1152/JN.00947.2015>
- Zimmerman, D., Goto, J. J., & Krishnan, V. v. (2016). *Equilibrium Dynamics of β -N-Methylamino-L-Alanine (BMAA) and Its Carbamate Adducts at Physiological Conditions*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160491>