



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA**



**“EFECTO DE LA CERAMIDA-1-  
FOSFATO (C1P) EN LA  
PROLIFERACIÓN y DE-  
DIFERENCIACIÓN DEL EPITELIO  
PIGMENTADO DE LA RETINA”**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESTUDIANTE: PÉREZ, MARÍA SOL**

**DIRECTORA: MARÍA VICTORIA SIMÓN**

*Bahía Blanca, Abril 2023*



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, BIOQUÍMICA Y FARMACIA

**“EFECTO DE LA CERAMIDA-1-  
FOSFATO (C1P) EN LA  
PROLIFERACIÓN y DE-  
DIFERENCIACIÓN DEL EPITELIO  
PIGMENTADO DE LA RETINA”**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADA EN  
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

*Firma del Alumno*

María Victoria Simón

*Firma del Director*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi mamá, Carmen, por ser una persona extraordinaria y hacer desde que nací todo lo posible porque alcance mis sueños respetando siempre el camino que elija para llegar a ellos.

A mis hermanas, Flor y Angy, mis pilares. Gracias por estar siempre caminando junto a mí y cuidarme en el trayecto. Por ser, no solo mis hermanas sino también mis amigas.

A mis sobris, Ali, Mariano y Rufi, que llegaron para hacer todo más lindo y con su curiosidad me incentivaron a estudiar cada vez más.

A mi compañero de vida, Carlos Gustavo, por su calidad humana y su humor sanador. Por bancarme en todas y devolverme siempre la confianza en mí misma.

A mi familia grande, mi tía Teresa, primos y primas, que estuvieron presentes en mis primeros años y siguen acompañando siempre.

A las amigas de mi vida, mi enorme familia elegida, por hacer hogar en cada lugar que vamos y darme esos momentos de risas fundamentales para seguir adelante.

A mis amigas biólogas, Lucha, Agus, Ani, Aniluz, Mica, Mai y Lule por hacer más que llevadero este proceso de aprendizaje. Por las horas de estudio, de risas y de apoyo. Todo fue más fácil así.

A mi amigo personal, David, que me bancó en los momentos más difíciles y me regaló la posibilidad de ser parte de su vida.

A mi Directora, Victoria, por su tiempo, paciencia, calidez, humildad, respeto, compañía y comprensión. Durante el desarrollo de esta tesis pasaron cosas muy difíciles y sin dudas haber estado bajo tu dirección fue una ayuda enorme.

A Nora, directora del Laboratorio de Neurobiología del INIBIBB, por abrirme las puertas y estar pendiente de mi progreso.

A Cami y Tami, integrantes del laboratorio, por su predisposición en ayudarme siempre.

A Leo del Laboratorio de Canales Iónicos, por su aporte en el desarrollo de esta tesis.

A mi Consejera, Constanza, por siempre tener la palabra justa ante cada duda que me surgía en estos últimos años.

A la UNS, por formarme académica social y políticamente, lo cual fue gracias a su gente. Estudiantes, Docentes y No docentes que dan vida a esta institución. Sobre todo debo agradecer a mis compañeras/os de agrupación (Mari y Mili, gracias), de carrera y a muchas/os docentes que me ayudaron a lo largo de estos años.

Y por último quiero agradecer a quienes hoy viven en mí y forman parte de quien soy:

A mi grandota, mi hermana, la luz de mis ojos por haberme enseñado tanto, por sus abrazos y por haberme

permitido encontrarme siempre en la tranquilidad y pureza de su mirada.

A mi papá, Ricardo, por haber sido su mejor versión para mí. Sé que estarías orgulloso de verme terminando esta etapa.

A mi abuela, la Iaia, que siempre confió en que lo podía lograr y me dio todo lo que pudo para asegurarse que esté bien.

Y a mí Tía Norma, la mamá de la familia, por estar siempre que necesité sin importar el momento.

## ÍNDICE

Agradecimientos.....	1
Índice.....	3
Resumen.....	4
Introducción.....	5
Objetivos.....	9
Materiales y Métodos.....	10
Resultados.....	14
Discusión.....	20
Bibliografía.....	24

## RESUMEN

---

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células presente entre la retina y la capa coroides del ojo que cumple un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del tejido. En diversas patologías retinianas proliferativas, las células del EPR proliferan y experimentan una transición epitelio-mesénquima (TEM) que desregula sus funciones naturales. Mediante la TEM las células del EPR modifican su morfología cuboide a la forma de huso típica de las células mesenquimales, muestran una remodelación de su citoesqueleto y aumentan el nivel de expresión de marcadores mesenquimales lo que conduce a un comportamiento migratorio e invasivo de las células que conlleva a una lesión de tipo fibrosa, alterando el normal funcionamiento de la retina.

La proliferación y la TEM son procesos que se desencadenan por la presencia de diferentes factores moleculares que actúan mediante vías de señalización específicas, establecer cuáles son es un componente fundamental para diseñar tratamientos efectivos que potencialmente den solución a las enfermedades proliferativas de la retina. Si bien en la retina los mecanismos que promueven dichos procesos aún no son claros, al día de hoy se sabe que el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) induce la transición mesenquimal de las células gliales de Müller y de las células del epitelio pigmentario de la retina (Kanda et al., 2019), que la esfingosina-1-fosfato (S1P) promueve la secreción de citocinas proinflamatorias, la proliferación, transdiferenciación y migración de las células gliales de Müller y del EPR (Simón et al., 2021) y que la ceramida-1-fosfato (C1P) induce la migración de las células gliales de Müller (Vera et al., 2021) y del EPR (Simón et al., 2022).

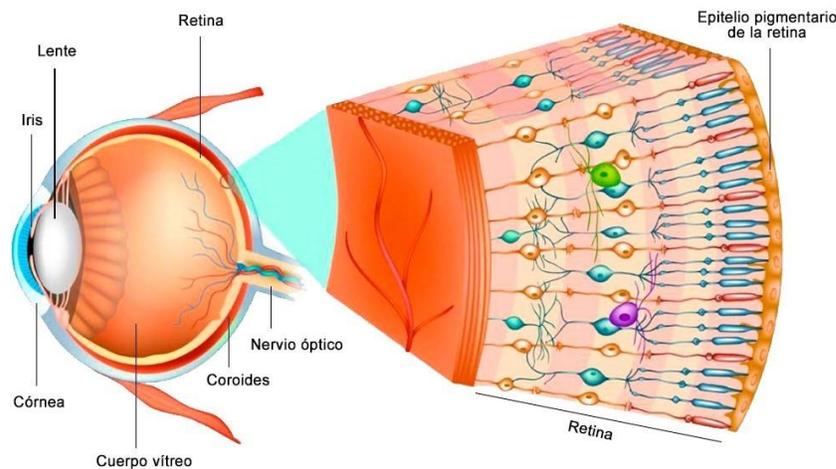
El hecho de que C1P tenga un rol inductor en la migración permite pensar que también podría inducir la TEM. Por tanto, el objetivo de este trabajo es analizar el rol de la C1P en la proliferación y transición epitelio-mesénquima de las células del epitelio pigmentario dentro del marco de las enfermedades proliferativas de la retina. Para ello, expusimos cultivos de dos líneas celulares derivadas del EPR al tratamiento con C1P y luego determinamos sus efectos en la proliferación, morfología celular y expresión de marcadores mesenquimales.

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que C1P no induce la proliferación de las células del EPR. Sin embargo, hemos observado que C1P induce cambios morfológicos en estas células y también aumenta el nivel de expresión de marcadores mesenquimales, como actina de músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA), vimentina, N-cadherina y fibronectina, lo que permite considerar a C1P como una posible inductora de la TEM en las células del EPR. A su vez, resultados preliminares evidencian que el tratamiento con C1P generó un aumento en la expresión de TGF- $\beta$  y SphK1, estableciendo un antecedente positivo para profundizar en el análisis de C1P como una posible reguladora de otras vías de señalización que también conducen al desarrollo de fibrosis en la retina.

# INTRODUCCIÓN

---

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células pigmentadas con microvellosidades que se ubica entre la retina y la capa coroides del ojo (Figura 1). Como todo tejido epitelial, las células del EPR exhiben polaridad, es decir las proteínas, las organelas y algunas funciones celulares se distribuyen asimétricamente en los dominios apical y basolateral de cada una de ellas (Chiba, 2013; Sparrow et al., 2010). Las células del EPR son un componente central para mantener la salud y la integridad funcional de los fotorreceptores de la retina. Constituyen la barrera hematorretiniana externa, juegan un papel importante en la absorción de la luz, en la protección contra la fotooxidación, en la regulación de los nutrientes, iones y agua entre la retina y los capilares de la capa coroides, en la fagocitosis de sustancias extrañas y en la secreción de varios factores de crecimiento (Ponnalagu et al., 2017).

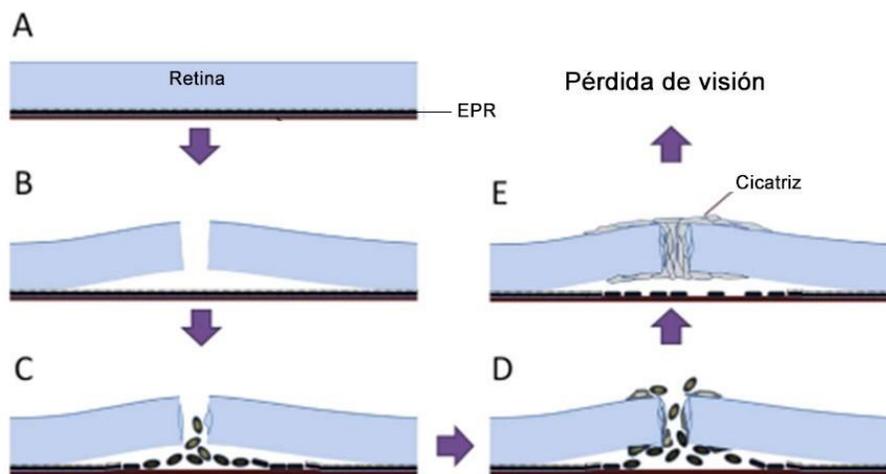


**Figura 1.** Esquema de la estructura general del ojo y la retina. *Nota.* Adaptado de <https://www.brillpharma.com/retina/>

En el ojo sano y desarrollado, las células del EPR no sufren mitosis; sin embargo, en ciertas condiciones patológicas, incluidos casos complicados de desprendimiento de retina, en la degeneración macular relacionada con la edad (AMD), la retinopatía diabética (DR) y la vitreoretinopatía proliferativa (PVR), las células proliferan y migran hacia la retina neural, provocando una lesión de tipo fibrosa o cicatriz (Figura 2) que altera el normal funcionamiento del tejido (Gelat et al., 2022; Zhou et al., 2020). La cicatrización es un proceso biológico fundamental que permite el reemplazo sistemático de las células lesionadas. Sin embargo, cuando se produce de forma prolongada y exagerada puede resultar en una condición patológica, denominada fibrosis, caracterizada por la producción, depósito y contracción excesiva de la matriz extracelular mediante la acción de los miofibroblastos (Leask y Abraham, 2004; Shu y Lovicu, 2017).

Cuando la retina se desprende del EPR (Figura 2), las células epiteliales experimentan una transición epitelio-mesénquima (TEM) que involucra el inicio de una intrincada cascada de eventos genéticos y epigenéticos,

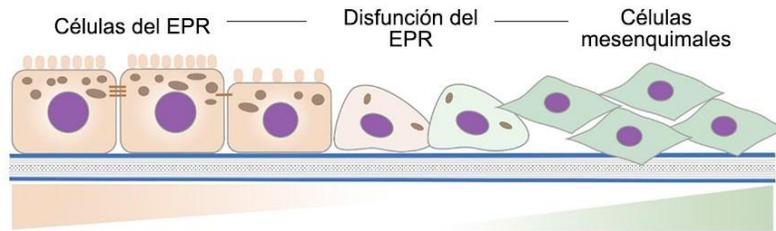
culminando en una serie de cambios morfológicos y moleculares que conduce a la pérdida de características epiteliales para dar lugar a células mesenquimales productoras de matriz extracelular, denominadas miofibroblastos (Shu y Lovicu, 2017). Dentro de dichos cambios, las células del EPR modifican su morfología cuboide regular y adquieren forma de huso (Figura 3). Además, experimentan la pérdida de complejos de unión estrecha, incluidas las ocludinas zonulares (ZO)-1, seguido de la disminución de la expresión de E-cadherina en la membrana celular y el aumento en la expresión de N-cadherina, un marcador mesenquimal típico. En este proceso las células epiteliales muestran una importante remodelación del citoesqueleto, con la expresión *de novo* de actina de músculo liso  $\alpha$  ( $\alpha$ -SMA) y de otros marcadores mesenquimales, como vimentina y fibronectina (Shu y Lovicu, 2017; Zhou et al., 2020). De esa manera pierden su polaridad y adquieren un comportamiento invasivo y migratorio.



**Figura 2.** Esquema de un proceso de vitreorretinopatía proliferativa, trastorno retiniano mediado por RPE en humanos. (A) ojo intacto, la retina neural está fuertemente adherida al EPR que se encuentra a lo largo de la membrana de Bruch. (B) El ojo sufre un trauma severo, la retina neural se desprende del EPR y, en ocasiones, se lesiona. (C) Las células del EPR experimentan una transición epitelio-mesénquima y migran hacia la cavidad vítrea. (D y E) Las células del EPR que migran se adhieren a las superficies epi y subretiniana, proliferan y forman las membranas epi y subretiniana exhibiendo un fenotipo similar a los miofibroblastos. La membrana epirretiniana crece y se contrae, dando como resultado el progreso del desprendimiento de retina y la pérdida de la visión. *Nota.* Adaptado de “The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration” (p. 107-114), por C. Chiba, 2014, *Experimental eye research*, 123.

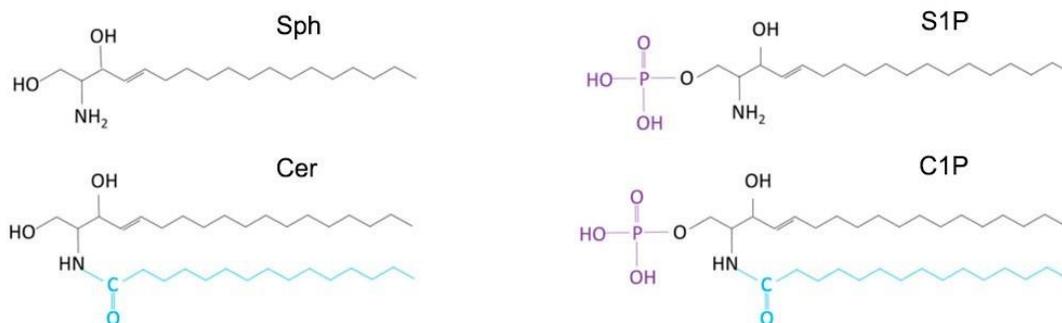
Los mecanismos a través de los cuales se promueve la TEM en las células del EPR aún no son claros. Investigaciones realizadas en los últimos años demuestran que los esfingolípidos, una de las tres clases principales de lípidos de membrana, además de su rol canónico como componentes estructurales, promueven la transición hacia el fenotipo mesenquimal. Los esfingolípidos tienen un papel relevante en la patogenia del cáncer y en muchas enfermedades crónicas, como la diabetes, debido a su papel en la regulación de la respuesta inflamatoria, la angiogénesis, la proliferación, la migración y la apoptosis (Gómez-Larrauri et al., 2020; Nagahashi et al., 2018; Spiegel y Milstien, 2003). En la retina, la esfingosina-1-fosfato (S1P) y la ceramida-1-

fosfato (C1P), dos de los esfingolípidos más importantes y estudiados, ocupan un lugar central en el control de dichos procesos celulares (Simón et al., 2021).



**Figura 3.** Representación esquemática del proceso de transición epitelio mesénquima en las células del epitelio pigmentario de la retina. *Nota.* Adaptado de “Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelium Dysfunction” (501), por M. Zhou et al., 2020, *Frontiers in cell and developmental biology*, 8.

La S1P (Figura 4) es un lípido intermedio producido por la acción catalítica de dos esfingosinas quinazas (SphK) diferentes, SphK1 y SphK2, que promueven la fosforilación de un aminoalcohol de cadena recta y larga (18–20 átomos de carbono) denominado esfingosina (Sph). La SphK1 está presente en todos los tipos celulares, se ubica en el citosol y sus roles en la enfermedad están ampliamente identificados; mucho menos se sabe de la SphK2, localizada predominantemente en núcleos y mitocondrias. La S1P puede actuar como mensajero intracelular o como ligando extracelular, en un mecanismo de señalización conocido como “de adentro hacia afuera”, al ser exportada por transportadores específicos para luego activar 5 receptores de membrana (S1PR1 a 5) (Spiegel y Milstien, 2003). Por su parte, C1P (Figura 4) se genera por la fosforilación de la ceramida (Cer) -una molécula central en el metabolismo de los esfingolípidos- cuya síntesis deriva de la adición de un ácido graso a la Sph a través de un enlace amida. C1P se sintetiza en el trans Golgi por la acción de la ceramida quinasa (CerK), única enzima descrita en mamíferos, y luego puede liberarse para la señalización autocrina o paracrina (Simón et al., 2019).



**Figura 4.** Estructuras químicas de los diferentes tipos de esfingolípidos. Todos los esfingolípidos comparten un esqueleto de esfingosina (negro). En Cer y C1P dicha cadena se encuentra unida a un ácido graso a través del enlace amida (azul). *Nota.* Adaptado de “Sphingolipids as Emerging Mediators in Retina Degeneration”, por M. V. Simón et al., 2019, *Frontiers in cellular neuroscience*, 13.

En la retina, la S1P tiene propiedades beneficiosas y perjudiciales, actuando como mensajero extracelular e

intracelular. Por un lado, promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia de los fotorreceptores al suprimir la apoptosis (Miranda et al., 2009) y facilita la señalización en las células retinianas internas. Por otro lado, S1P desencadena en las células con funciones de soporte (las células gliales de Müller y el EPR) procesos amenazantes de tipo fibroso que alteran la estructura de la retina y pueden contribuir a la disfunción visual, como la secreción de citoquinas proinflamatorias, la proliferación, la transdiferenciación y la migración celular (Mondal y Mandal, 2019; Simón et al., 2021). En el caso de C1P las funciones que cumple en la retina aún son poco conocidas. Al día de hoy se sabe que C1P promueve la proliferación de progenitores de fotorreceptores, su diferenciación y supervivencia (Miranda et al., 2011). Por otra parte, estimula la migración de las células gliales de Müller (Vera et al., 2021) y del EPR (Simón et al., 2022). El hecho de que C1P sea una molécula de señalización involucrada en inducir procesos de migración en las células del EPR permite hipotetizar sobre un posible rol de inducción en la proliferación y de-diferenciación de dichas células.

Entre las citoquinas y factores tróficos implicados en el desarrollo de la fibrosis se destaca el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), un potente inductor de la diferenciación de los miofibroblastos que, a su vez, promueve la síntesis de matriz extracelular jugando así un rol central en el desarrollo de fibrosis en varios órganos, incluyendo la retina (Leask y Abraham 2004). Específicamente en la fibrosis retiniana se demostró que TGF- $\beta$  induce la transición mesenquimal de las células gliales de Müller durante el desarrollo de membranas epiretinales idiopáticas y de las células del epitelio pigmentario de la retina (Kanda et al., 2019). En investigaciones recientes se ha demostrado que en órganos tales como hígado, pulmón, riñón, corazón e intestino TGF- $\beta$  promueve la fibrosis y aumenta los niveles de SphK1, S1P y algunos de sus receptores, confirmando la presencia de un *crossstalk* entre ambas vías de señalización (Jiménez-Uribe et al., 2021). Sin embargo, se desconoce aún si existe una interacción entre TGF- $\beta$ , S1P y/o C1P en las patologías fibróticas de la retina.

Analizar los mecanismos moleculares involucrados en la proliferación y transición epitelio mesénquima de las células del EPR reviste una gran importancia en el campo de la salud. Como se mencionó, son procesos fundamentales involucrados en el desarrollo de las patologías proliferativas de la retina, como la retinopatía diabética, una de las principales causas de pérdida de la visión en países desarrollados y la complicación ocular más frecuente y grave asociada a la diabetes (Cheung et al., 2010). Conocer las vías de señalización que promueven la proliferación y transición epitelio mesénquima del EPR, indagando particularmente en el rol de C1P en dichos procesos y en la probable existencia de un *crossstalk* con otras vías de señalización, establecen las bases biológicas que potencialmente permitirán desarrollar herramientas farmacológicas para dar solución a esta problemática.

A la luz de estos antecedentes es que planteamos, como **hipótesis central** de este trabajo de tesis, que la C1P podría ser inductora de la TEM en las células del EPR mediante la promoción de la proliferación, la de-diferenciación y la activación cruzada con otras vías de señalización que también participan del desarrollo de fibrosis en la retina.

# OBJETIVOS

---

## Objetivo General

Analizar el rol de la C1P en la proliferación y transición epitelio- mesénquima (TEM) de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) durante el desarrollo de las enfermedades proliferativas del tejido.

## Objetivos específicos

- ❖ Determinar si C1P estimula la proliferación de las células del EPR.
- ❖ Evaluar si C1P promueve la de-diferenciación de las células del EPR.
- ❖ Indagar si C1P regula otras vías de señalización que también conducen a la fibrosis de la retina, como TGF- $\beta$  y S1P.

# MATERIALES Y METODOS

---

## **Cultivos celulares epiteliales y tratamiento**

Para la obtención de los cultivos de células epiteliales se utilizaron las líneas celulares humanas ARPE-19 y D407 (ambas derivadas del EPR) sembradas en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% o 5%, respectivamente. Las líneas celulares se mantuvieron viables a través del repique o pasaje de frascos de línea incubados a una temperatura de 36,5°C con 5% de CO<sub>2</sub> en un Incubador Sanyo con CO<sub>2</sub>. El proceso de repique consiste en “levantar” las células que crecen adheridas al sustrato con Tripsina/EDTA y transferirlas a un frasco o cápsula en una dilución 1:10 con nuevo medio de cultivo.

Para los ensayos, las células se cultivaron en cápsulas plásticas de 35 mm sembradas en DMEM suplementado con SFB. Una vez que los cultivos llegaron a un estado de confluencia del 80%, el medio de cultivo se reemplazó por DMEM sin suero por 24 hs. Transcurrido ese período los cultivos celulares fueron suplementados por 24 o 48hs con C1P 10 µM o su respectivo vehículo, dimetilsulfóxido (DMSO) o hidróxido de sodio (NaOH), dependiendo del ensayo.

## **Análisis de Proliferación**

El análisis de proliferación celular se realizó incubando las células por 24hs con C1P o su vehículo. En la línea D407 se contabilizó el número de figuras mitóticas (células que se encuentran en metafase) y núcleos totales utilizando la sonda DAPI, mientras que en las ARPE-19 se evaluó la incorporación del nucleótido 5-bromo-2-desoxiuridina (BrdU).

### Tinción de núcleos

Consiste en la tinción fluorescente de los núcleos celulares con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol), una sonda que emite un color azul fluorescente tras su unión a regiones enriquecidas de adenina y timina en la secuencia de ADN.

Para poder realizar la tinción, las células fueron fijadas con paraformaldehído (PF) 4% durante 15 min. Luego, se sometieron a tres lavados con buffer fosfato salino (PBS) para posteriormente ser permeabilizadas durante 15 min con Tritón X100 (0,1%). Finalmente se procedió a incubarlas con la sonda DAPI (1:1000) por 15 min en cámara húmeda. Culminado este tiempo se realizaron nuevamente 3 lavados con PBS para proceder con el montaje y la visualización al microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E600.

### Técnica inmunocitoquímica para BrdU

La bromodesoxiuridina es un nucleótido sintético análogo a la timidina que actúa como marcador al incorporarse al ADN durante el proceso de replicación, de esa manera permite determinar el número de células de una muestra que se encuentran en división.

Para esta técnica, luego del agregado de C1P - o su vehículo- los cultivos de ARPE-19 fueron sometidos a un

pulso de BrdU 30  $\mu$ M (concentración final en el cultivo) durante 4hs. Posteriormente, las células se fijaron con PF 4% y se permeabilizaron con Tritón X100 durante 15 min. Luego, fueron tratadas con HCl 2N por 30 min para desnaturalizar el ADN y, a continuación, se neutralizó con borato de sodio (buffer borato) 0,1 M.

La incorporación de BrdU se determinó por inmunocitoquímica, utilizando anticuerpos monoclonales. Finalizados los lavados de neutralización y de PBS, se incubaron los cultivos con el anticuerpo 1° (mouse anti-BrdU) por 1 hora. Posteriormente se realizaron dos lavados con PBS y se agregó el anticuerpo 2° (Cy2 goat anti-mouse) que actuó sobre los cultivos por 1 hora. Luego de los lavados correspondientes se procedió con el montaje y la visualización al microscopio de fluorescencia.

#### Contabilización celular

Para evidenciar cuantitativamente el porcentaje de células en proliferación se realizó el conteo de figuras mitóticas (núcleos en metafase fácilmente identificables con la sonda DAPI) y de núcleos positivos para BrdU junto con el número de células totales presentes en 10 campos tomados al azar de cada réplica por condición y experimento. Cada imagen se obtuvo a través de la cámara digital Amscope MU1403 adosada al microscopio de fluorescencia y fue analizada mediante el programa de procesamiento digital de imagen, ImageJ.

#### **Análisis de De-diferenciación**

Para evaluar la de-diferenciación celular se utilizaron cultivos expuestos por 24 o 48hs a C1P o su vehículo. Tanto en la condición tratada con C1P como en el control se observó el aspecto morfológico general de sus células en el microscopio de fluorescencia y se analizó el nivel de expresión de marcadores mesenquimales mediante qRT-PCR.

Cabe destacar que en los cultivos correspondientes a la línea celular ARPE-19, la evaluación sobre el efecto de C1P en la expresión de marcadores mesenquimales se llevó adelante en cultivos con y sin ensayo de la herida (también denominado *scratch wound assay*). En estos experimentos, previo al agregado de C1P, se realizó una lesión mecánica (*scratch*) con la punta de un tip estéril de 200  $\mu$ L, de manera de dejar una zona libre de células (Simón et al., 2015). Inmediatamente se suplementaron con C1P y se incubaron por 24hs.

#### Análisis de la morfología celular

Las células de la línea D407 tratadas con C1P, o su vehículo, por 24hs fueron fijadas y observadas por microscopía de contraste de fase. En cada condición se procesaron 10 imágenes al azar obtenidas a través de la cámara digital Amscope MU1403. En cada una se contabilizó el número de células irregulares (células que presentan una forma ahusada o estrellada y cuya conexión celular no es claramente distinguible) y células regulares (firmemente adheridas entre sí y con el aspecto de empedrado característico del epitelio) mediante el programa de procesamiento digital de imagen, ImageJ.

A su vez, se realizó una inmunocitoquímica para evidenciar los filamentos intermedios de vimentina. Luego de la fijación, las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 durante 15 min y, posteriormente, incubadas con

el anticuerpo 1° (mouse anti- vimentina) por 1 hora. Posteriormente, se realizaron dos lavados con PBS y se agregó el anticuerpo 2° (Cy3 goat anti-mouse) que actuó sobre los cultivos por 1 hora. Luego de los lavados correspondientes se procedió con el montaje y la visualización al microscopio de fluorescencia.

### Extracción de ARN

El aislamiento del ARN se realizó mediante tratamiento en frío de los cultivos con 500µl de Quick-Zol plus y posterior centrifugación en microcentrífuga de mesa Biofuge Pico de Heraeus. El homogeneado obtenido se trató de forma secuencial con 100µl cloroformo, 250µl isopropanol y 500µl etanol 75% con el fin de lograr la separación de fases y el precipitado del ARN. La concentración y pureza del ARNm obtenido fueron determinadas mediante la cuantificación de absorbancias a 260nm y 280nm mientras que su integridad fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%.

### Retrotranscripción

La reacción de transcripción reversa (RT) del ARNm previamente extraído se realizó a partir de 1 µg de ARN (molde) utilizando random primers, dNTPs, inhibidor a ARNasa (RNAsin) y la enzima Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase (M-MLV RT - Promega). La reacción se incubó a 37°C por 1 hora en Mini Cyclertm (MJ Research, USA), permitiendo obtener el correspondiente cDNA.

### qPCR

Para determinar si C1P promueve la de-diferenciación de las células del EPR, se amplificó el ADNc obtenido en la retrotranscripción para así evaluar si se generan aumentos en los niveles de expresión de los marcadores mesenquimales actina de músculo liso ( $\alpha$ -SMA), vimentina, fibronectina y N-cadherina. En cada eppendorf se colocaron 3µl de ADNc 40ng/µl con 3µl de primers (*forward* y *reverse*) dependiendo de la secuencia evaluar (ver Tabla 1) y 6µl de SENSI FAST SYBRGreen qPCR kit; una vez listos se llevó adelante la reacción en cadena utilizando un ciclador térmico para qPCR Eppendorf 900E.

En cada corrida se incluyeron 2 controles negativos por condición, uno sin templado reemplazando los 3µl de ADNc por agua (NTC) y otro reemplazando la muestra de cDNA por ARNm (RT-). Los resultados se analizaron con el método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para obtener una cuantificación relativa de los niveles de expresión de ARNm de  $\alpha$ -SMA, vimentina, fibronectina y N-cadherina utilizando como genes endógenos de referencia GAPDH o 18S.

**Tabla 1***Lista de primers utilizados.*

Nombre del gen	Símbolo genético	Primer Secuencia 5'- 3'
Actina de músculo liso $\alpha$	Human $\alpha$ SMAFW Human $\alpha$ SMARV	CCGACCGAATGCAGAAGG ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA
Fibronectina	HumanFribonectinF HumanFribonectinR	CGGGACTCAATCCAAATGCC GTTGTAGGTGGCACCTCTGG
Vimentina	HumanVimentinFW HumanVimentinRV	GGACCAGCTAACCAACGACA AAGGTCAAGACGTGCCAGAG
N-cadherina	HumanNCadherinFW HumanNCadherinRV	GTGCATGAAGGACAGCCTCT TGGAAAGCTTCTCACGGCAT
Esfingosina quinasa 1	HumanSphK1FW HumanSphK1RV	GGCAGCTTCCTTGAACCATT TGCAGAGACAGCAGGTTTAT
Factor de crecimiento transformante beta	HumanTGF $\beta$ FW HumanTGF $\beta$ RV	GGGCTACCATGCCAACTT GCACGATCATGTTGGACAC
18s	18s-humanFW 18s-humanRW	CGTCGTCCTCCTCGCTTG TAGGTAGAGCGCGGCGA
Gliceraldehído -3- fosfato deshidrogenasa	Human_GAPDHFV Human_GAPDHRV	CACTGAATCTCCCCTCCTCACA TGATGGTACATGACAAGGTGCG

**Análisis estadístico**

Los resultados muestran el porcentaje de al menos 3 experimentos independientes ( $\pm$  desvío estándar). La significancia estadística se evaluó mediante la prueba estadística ANOVA unidireccional, considerando significativo un valor  $p < 0,05$ . Para realizar los gráficos se utilizó el programa GraphPad Prism (versión 5.0).

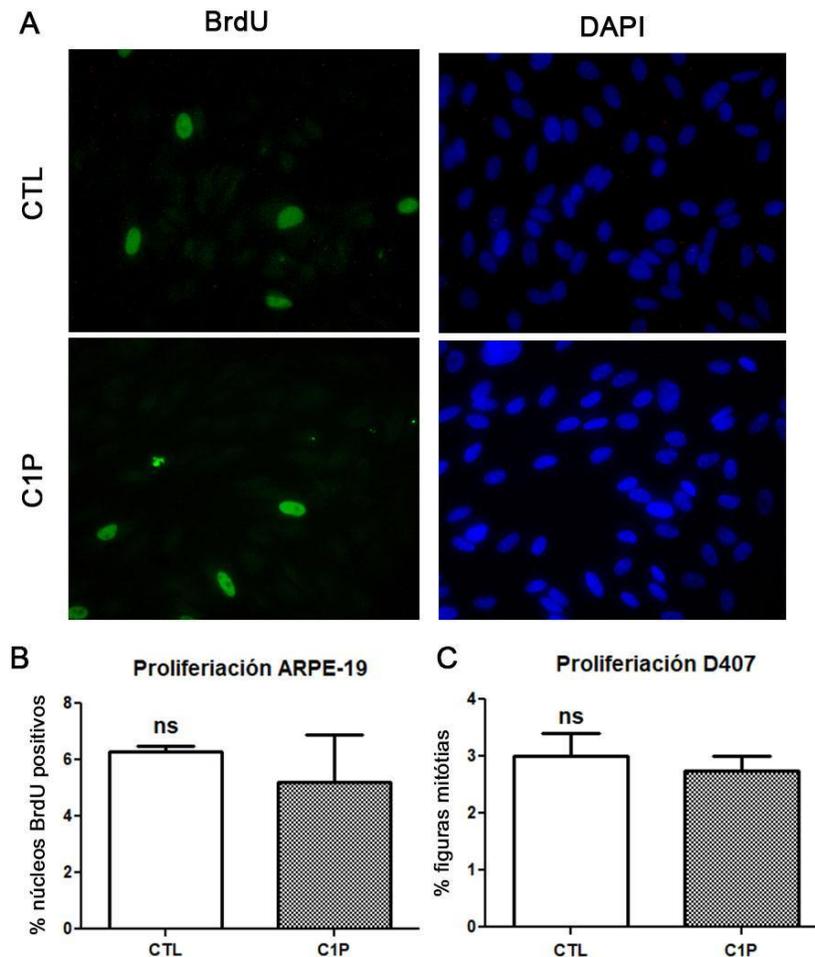
## RESULTADOS

### C1P no induce proliferación en las células del epitelio pigmentario de la retina

Para este ensayo, se utilizaron cultivos celulares de las líneas D407 y ARPE-19, en un 80 % de confluencia, los cuales se expusieron a 10  $\mu$ M C1P por 24hs.

En células de la línea ARPE-19, se contabilizaron los núcleos positivos para BrdU (Figura 5A) y los núcleos totales presentes en cápsulas control y tratadas con C1P. Los cultivos controles presentan  $6,3 \pm 0,28\%$  de células positivas para BrdU y los tratados con C1P un valor  $5,4 \pm 2,4\%$  (Figura 5B). El análisis estadístico ANOVA empleado para comparar ambas condiciones determinó un valor  $p > 0,05$ , lo que indica que las muestras no son significativamente diferentes.

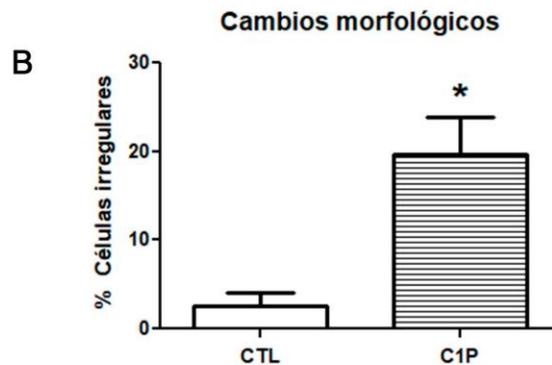
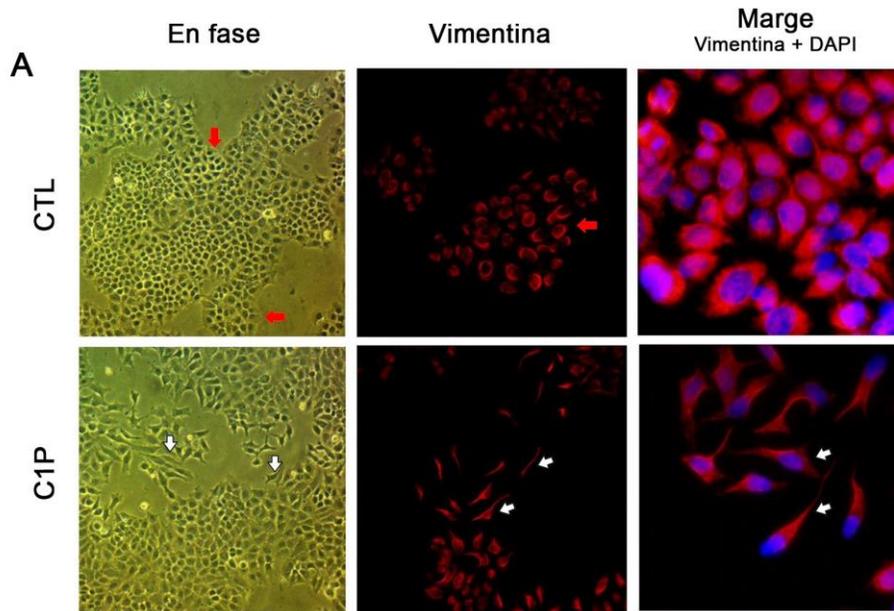
En la línea D407, se contabilizaron las figuras mitóticas (núcleos en metafase identificables por DAPI) y los núcleos totales presentes en cada condición. Los cultivos controles presentan una proliferación de  $3 \pm 0,8\%$  y los tratados con C1P una proliferación de  $2,75 \pm 0,5\%$  (Figura 5C). El análisis ANOVA utilizado para comparar estadísticamente las muestras arrojó un valor  $p > 0,05$  lo que sugiere que las muestras no son significativamente diferentes. Por tanto, C1P no induce proliferación en las células del EPR.



**Figura 5.** (A) Fotomicrografía de cultivos celulares de la línea ARPE-19 con microscopía de fluorescencia donde se destacan los núcleos positivos para BrdU (verde) y los núcleos totales con tinción DAPI (azul). (B) Las barras representan el porcentaje promedio de núcleos BrdU positivos (medias  $\pm$  SD; n=2) en células ARPE-19 tratadas con C1P o su vehículo (CTL). (C) Gráfico de barras representando el porcentaje de figuras mitóticas, identificadas como núcleos en metafase, en cultivos de D407 tratados con C1P o su vehículo (CTL) (medias  $\pm$  SD; n=4). ns= no significativo.

### C1P induce cambios morfológicos en las células del epitelio pigmentario de la retina

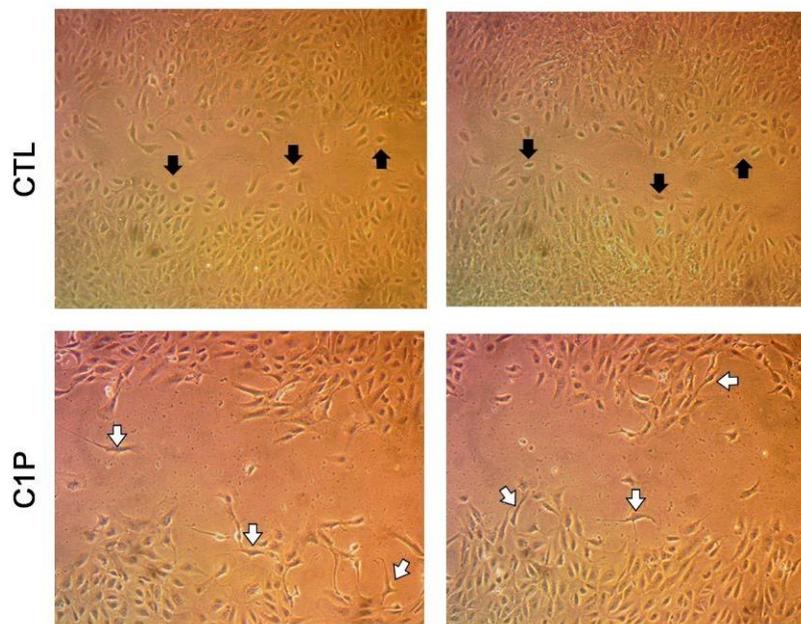
Los cultivos celulares de la línea D407 se trataron de la misma forma que para el ensayo de proliferación. Al visualizar las células por microscopía de contraste de fase se observa un sorprendente cambio morfológico entre las cápsulas control y las tratadas con C1P, situación que se manifiesta de forma más evidente al observar las células luego de realizar una inmunocitoquímica para observar los filamentos de vimentina (Figura 6A). Las células tratadas con C1P presentan una morfología irregular, muy similar a la forma de huso de los miofibroblastos, perdiendo en varios casos la conexión celular con el resto de las células del epitelio (flechas blancas, Figura 6A). Por el contrario, las células control mantienen las uniones celulares y la forma de empedrado característica del tejido epitelial (flechas rojas, Figura 6A).



**Figura 6.** (A) Fotomicrografía de cultivos celulares de la línea D407 en fase (panel izquierdo) y con microscopía de fluorescencia (panel central y derecho), destacando los filamentos de vimentina (rojo) del citoesqueleto y el núcleo con tinción DAPI (azul). En la condición C1P se observan numerosas células con morfología irregular, de aspecto alargado o de huso (flechas blancas), similar a los miofibroblastos, mientras que en la condición control las células mantienen la forma cuboide característica de las células epiteliales al igual que su organización en empalizada (flechas rojas), propia del epitelio. En (B) las barras representan el porcentaje promedio de células irregulares respecto al número de células totales presentes en cada condición. (medias  $\pm$  SD; n=4);\* p<0.05 diferencia significativa con respecto al control .

Al contabilizar las células irregulares y regulares presentes en los cultivos, se observó un resultado cuantitativo que fortalece lo observado al microscopio. En los cultivos controles la presencia de células irregulares es de  $3 \pm 2\%$  mientras que en los tratados es de  $20 \pm 7\%$  (Figura 6B). El análisis estadístico de las muestras arrojó un valor  $p < 0,05$  lo que sugiere que las mismas son significativamente diferentes. Estos resultados sugieren que el tratamiento con C1P aumenta la aparición de células con morfología irregular, similar a los miofibroblastos.

Estudios preliminares realizados en las células de la línea ARPE-19 muestran cambios morfológicos que concuerdan con los obtenidos en la línea D407. En la Figura 7 se observan cultivos control con células mayoritariamente de aspecto típico de epitelio (flechas negras), mientras que en los cultivos tratados con C1P hay una importante presencia de células con morfología irregular (flechas blancas), asemejable al fenotipo que expresan los miofibroblastos.

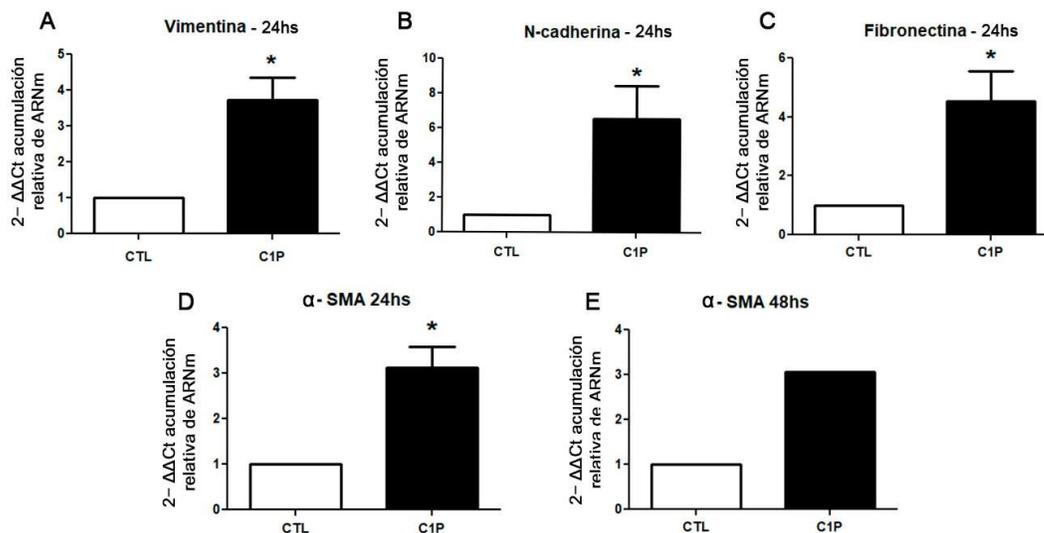


**Figura 7.** Fotomicrografía de contraste de fase de cultivos de la línea ARPE-19 pertenecientes a células control, incubadas con el vehículo de C1P (panel superior), y a células tratadas con C1P (panel inferior). En cultivos control, se destaca la presencia de un mayor número de células cuboides (flechas negras) correspondiente al fenotipo de las células epiteliales; mientras que en los cultivos tratados con C1P hay mayor presencia de células alargadas (flechas blancas), morfología que se asemeja a la de los miofibroblastos.

## C1P induce la expresión de marcadores mesenquimales

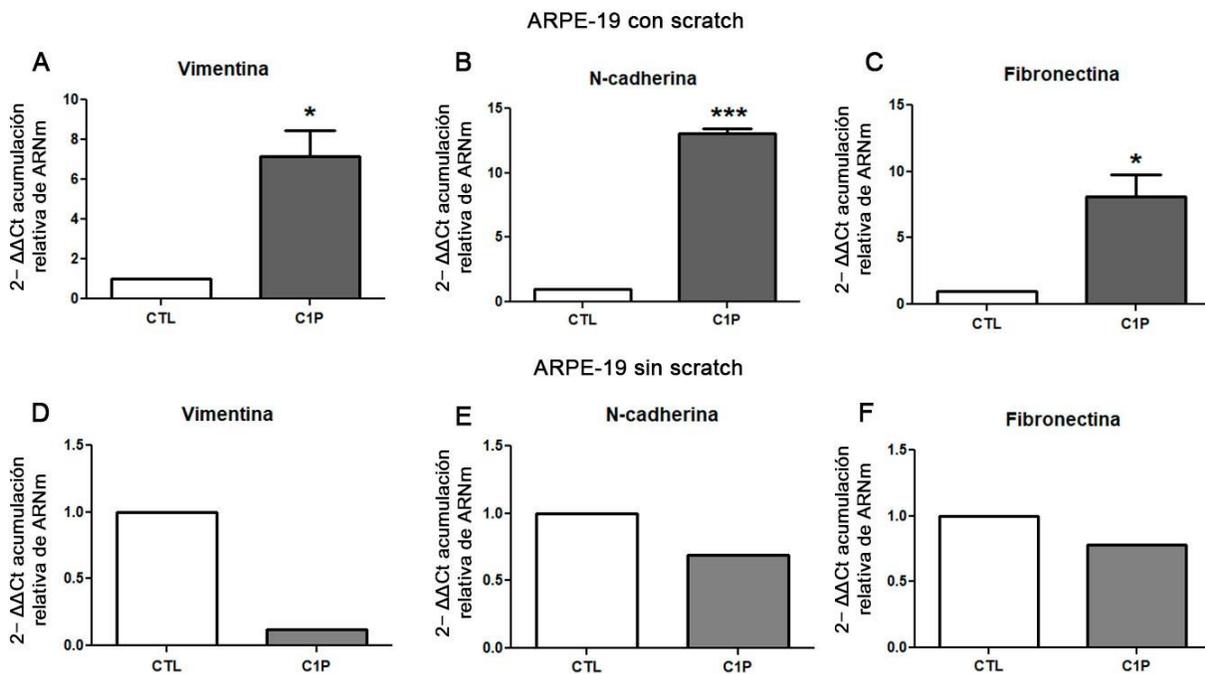
Cuando las células atraviesan el proceso de TEM se observa un aumento en la expresión de genes correspondientes a marcadores mesenquimales, como  $\alpha$ -SMA, vimentina, fibronectina y N-cadherina (Shu y Lovicu, 2017). En este trabajo, para analizar si existe expresión diferencial de los genes correspondientes a estos marcadores mesenquimales, luego de 24hs de tratamiento con C1P o su vehículo (CTL), se tomaron muestras de los cultivos de cada condición y se cuantificó la expresión génica mediante qRT-PCR.

Los resultados obtenidos en las muestras provenientes de la línea D407 establecen que vimentina aumenta  $3,72 \pm 1,1$  veces respecto al control (Figura 8A), N-cadherina aumenta  $6,55 \pm 3,33$  veces (Figura 8B) y fibronectina aumenta  $4,5 \pm 1,7$  veces (Figura 8C). El análisis estadístico ANOVA comprueba que la diferencia entre las condiciones para cada marcador resultó ser significativa. Los resultados obtenidos para  $\alpha$ -SMA concuerdan con lo visto en los otros marcadores mesenquimales, aumenta significativamente  $3,13 \pm 0,65$  veces respecto al control (Figura 8D). Particularmente para este marcador también se indagó el efecto de C1P a 48hs, y los resultados preliminares sugieren un aumento de 3,07 veces respecto al control. De esta forma, podemos concluir que el tratamiento de las células D407 con C1P aumenta la expresión de marcadores mesenquimales, reforzando nuestra hipótesis sobre la participación de C1P en la inducción de la TEM en las células del EPR.



**Figura 8.** Análisis por qPCR de la expresión génica relativa a un gen endógeno, mediante el método de cuantificación  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Las barras representan las veces de aumento en la expresión de (A) vimentina, (B) N-cadherina, (C) fibronectina y (D)  $\alpha$ -SMA en células de la línea D407 tratadas con C1P o su vehículo (CTL) durante 24hs (medias  $\pm$  SD; n=3); \*  $p < 0.05$  diferencia estadísticamente significativa con respecto al control. En (E) se muestra el resultado preliminar del número de veces de aumento para  $\alpha$ -SMA en células expuestas a C1P por 48hs.

El nivel de expresión de los marcadores mesenquimales vimentina, fibronectina y N-cadherina se evaluaron también en cultivos de la línea celular ARPE-19. En este caso, se observa un comportamiento diferencial en la expresión génica de los mencionados marcadores dependiendo de la presencia o no del *scratch*. Por un lado, en los cultivos celulares con *scratch* se evidencia la misma tendencia que los cultivos correspondientes a D407: la expresión de vimentina aumenta  $7,17 \pm 0,8$  veces respecto al control (Figura 9A), N-cadherina aumenta  $13 \pm 0,5$  veces (Figura 9B) y fibronectina  $8 \pm 2$  veces (Figura 9C), siendo todos estos aumentos estadísticamente significativos. Por otro lado, en los cultivos de ARPE-19 que no tienen *scratch* los resultados fueron opuestos: resultados preliminares del tratamiento con C1P sugieren una leve tendencia a disminuir la expresión de los marcadores vimentina, N-cadherina y fibronectina tras 24 hs de incubación (Figura 9 D,E, y F respectivamente).



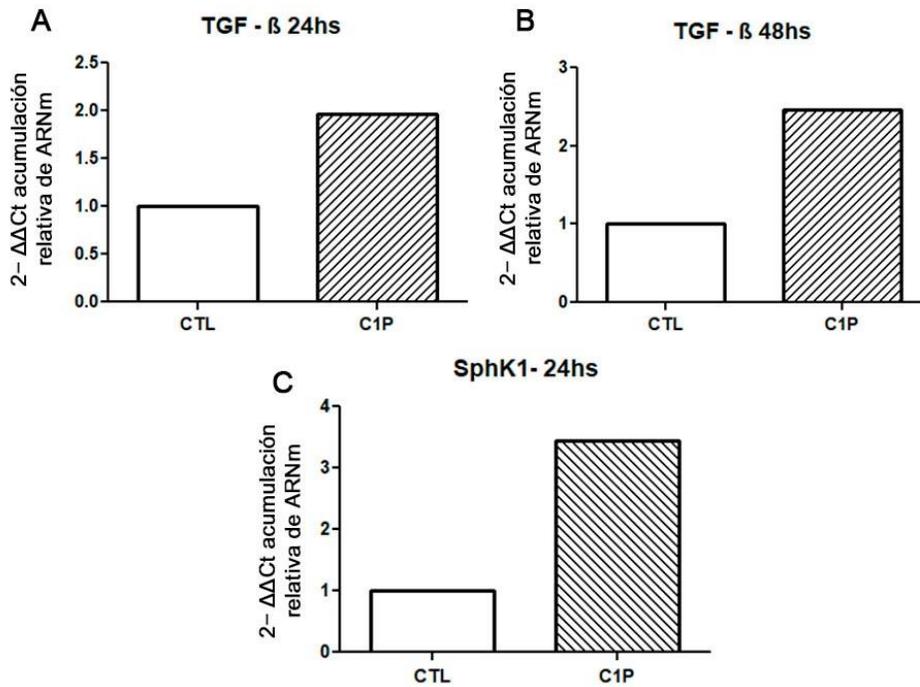
**Figura 9.** Resultados del análisis por qPCR mediante el método de cuantificación relativa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Las barras en (A), (B) y (C) representan las veces de aumento para vimentina, N-cadherina y fibronectina, respectivamente, en células de la línea ARPE-19 a las cuales se les hizo una herida mecánica (*scratch*) previo al agregado de C1P o su vehículo (CTL) (medias  $\pm$  SD; n=2); \*p<0.05; \*\*\*p < 0.001, diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles correspondientes. En (D), (E) y (F) se muestran los resultados preliminares del cambio en la expresión de vimentina, N-cadherina y fibronectina respectivamente, en células de la línea ARPE-19 carentes del *scratch* y tratadas con C1P o su vehículo (CTL).

### C1P podría inducir TEM a través de la señalización cruzada con otras vías

La existencia de un *crosstalk* entre TGF- $\beta$ , SphK1 y S1P en diversos órganos (Jiménez-Urbe et al., 2021) constituye un antecedente positivo para considerar a la TEM como un proceso dependiente de varias vías de señalización. Para indagar si C1P también está involucrada dentro de una señalización cruzada con TGF- $\beta$  y

SphK1, luego de 24 y 48hs de tratamiento con C1P o su vehículo (CTL), se tomaron muestras de los cultivos para cada condición y se llevó adelante una qRT-PCR.

Los resultados preliminares de este trabajo arrojan resultados prometedores. En los cultivos tratados con C1P por 24hs los niveles de TGF- $\beta$  llegaron a 1,96 veces de aumento respecto al control (Figura 10A) mientras que en cultivos tratados con C1P por 48hs el aumento es de 2,46 veces comparado al control (Figura 10B). En el caso de SphK1 la tendencia fue la misma, aumentando 3,45 veces respecto al control (Figura 10C).



**Figura 10.** Resultados preliminares del análisis por qPCR mediante el método de cuantificación relativa 2<sup>-ΔΔCt</sup> en cultivos celulares de la línea D407 tratados con C1P por 24hs (A y C) o por 48hs (B). Las barras representan las veces de aumento de TGF-β (A y B) y de SphK1 (C); en cada caso comparado con su respectivo control (CTL).

## DISCUSIÓN

---

La C1P es un esfingolípidio bioactivo que promueve la proliferación celular en macrófagos, progenitores de fotorreceptores y en diversos tipos de células cancerosas (Gómez-Muñoz A, 2018). Los resultados obtenidos al analizar la proliferación del EPR bajo los efectos de C1P permiten concluir que dicho esfingolípidio no induce la proliferación, al menos en los tiempos y condiciones ensayados. Tal afirmación está sostenida porque en ambas líneas epiteliales (D407 y ARPE-19) el porcentaje de células en proliferación no fue significativamente diferente al control. El hecho de haber empleado dos técnicas diferentes para analizar el rol de C1P en la división celular también robustece nuestro resultado; si bien la morfología de los núcleos con tinción DAPI permite claramente distinguir un núcleo que se encuentra en mitosis (por ejemplo en metafase) de otro que no, es posible que ocurra un sesgo por interpretación del investigador a la hora de procesar las imágenes obtenidas o que se obvие la presencia de núcleos en división porque aún no se encuentran en metafase. Emplear la técnica inmunocitoquímica para BrdU en las ARPE-19 reforzó lo observado en las D407, dado que este nucleótido modificado se incorpora en el ADN de células en la fase S del ciclo celular, existe mayor probabilidad de detectar los núcleos en división y, además, los núcleos BrdU positivos se evidencian claramente sin dejar lugar a dudas, como se observa en la Figura 5A.

Por otro lado, hemos logrado concluir que C1P induce cambios morfológicos en las células del EPR. Cuando se observa un cultivo *in vitro* correspondiente a una tejido epitelial se espera encontrar células de forma cuboide, con aspecto de empedrado, íntimamente conectadas entre sí (Yang et al., 2020); sin embargo, los cultivos del EPR tratados con C1P presentaron células de aspecto irregular en un porcentaje mayor que en los cultivos control, diferencia que estadísticamente es significativa y que nos permite llegar a la conclusión mencionada. Cabe destacar que en las células tratadas con C1P aún se observaban células morfológicamente similares a las células epiteliales porque el cambio fenotípico de las células del EPR durante la TEM inicia tras la pérdida de contacto célula-célula (Tamiya et al., 2010), por tal motivo las células que se ubican en las región central de los parches de tejidos presentes en las cápsulas mantienen la morfología epitelial y la transformación celular comienza en los bordes.

Como se describió en secciones previas, se consideraron como células irregulares aquellas que presentaban la forma de huso típica de los miofibroblastos con polaridad posterior-frontal debido a sus fibras de estrés de actina (Yang et al., 2020) y también células con forma estrellada. Según Zhou et al (2021) la TEM es un proceso continuo que da lugar a fenotipos celulares intermedios de forma estrellada, por lo cual en este trabajo las células que presentaban proyecciones de membrana ricas en actina, denominadas filopodios, producidas por reordenamientos del citoesqueleto de actina y que evidencian el comienzo de la movilidad celular (Troncoso et al., 2017) fueron consideradas como un fenotipo intermedio de la TEM y por tal motivo contabilizadas de igual forma que las células con forma de huso.

Si bien los cambios morfológicos solo fueron comprobados estadísticamente en la línea celular D407, pudimos

observar la misma tendencia en los cultivos de ARPE-19, lo que nos motiva a profundizar en estos resultados para así confirmar nuestra hipótesis. No obstante, el hecho de que C1P induzca cambios morfológicos en la línea D407, característica observable durante la TEM, otorga una importante evidencia para considerar que C1P induce la de-diferenciación de las células del EPR.

Otro aspecto de esta tesis que fortalece a C1P como inductora de la TEM son los resultados obtenidos en la expresión de marcadores mesenquimales. Vale la pena recordar que en las células mesenquimales las citoqueratinas propias de las células epiteliales desaparecen y se sintetiza vimentina. La E-caderina se pierde o se redistribuye como consecuencia de la represión y activación simultánea de genes relacionados con N-cadherina, lo que debilita las uniones entre células epiteliales y facilita la migración producto de interacciones débiles. Las uniones celulares se rompen, aparecen nuevos receptores de matriz extracelular, siendo reemplazada la laminina de las células epiteliales por fibronectina (Montenegro y Rojas, 2001; Troncoso et al., 2017). Al analizar el rol de C1P sobre la expresión de vimentina, N-cadherina y fibronectina observamos que C1P aumenta su expresión de forma estadísticamente significativa, pudiendo concluir que C1P induce la expresión de marcadores mesenquimales en las células del EPR.

El incremento en la expresión de los marcadores mencionados fue contundente en las muestras correspondientes a la línea D407; sin embargo en la línea ARPE-19 se observó un comportamiento diferencial según la presencia o no del *scratch*: los cultivos celulares que sufrieron la lesión mecánica revelaron un aumento en la expresión génica de los marcadores ensayados tras la exposición a C1P, al igual que lo observado en la línea D407. Sin embargo, los cultivos de ARPE-19 que no se sometieron al *scratch* previo al suplemento con C1P evidenciaron, al menos de forma preliminar, una pequeña disminución en la expresión de los marcadores. Tal discordancia en los resultados debe ser corroborada en futuros experimentos, pero en principio podría explicarse en la diferencia de comportamiento que presentan ambas líneas derivadas del EPR (Dunn et al., 1996). Las células D407, por sus características intrínsecas, nunca alcanzan a formar una monocapa estable y pareja por muchos días *in vitro*, requiriendo de pasajes periódicos para mantenerlas en cultivo. Por el contrario, las ARPE-19 rápidamente establecen el aspecto de empedrado típico del epitelio, el cual se estabiliza y se hace más compacto a medida que pasan los días en cultivo. Así, es probable que en las ARPE-19 se necesite una lesión mecánica, que irrumpa la integridad del tejido, para que se dispare la expresión de marcadores mesenquimales, los cuales se incrementan significativamente si las células están expuestas a C1P. Las células D407, al ser naturalmente menos estables, no requieren de una lesión mecánica que gatille la expresión de dichos marcadores.

Por otro lado los resultados obtenidos para el marcador  $\alpha$ -SMA, cuya síntesis *de novo* aumenta durante la TEM incrementando significativamente la actividad contráctil de las células y en consecuencia su capacidad migratoria (Shu y Lovicu, 2017), también avalan nuestra hipótesis. La expresión de  $\alpha$ -SMA en células tratadas con C1P por 24hs aumenta de forma significativa, lo mismo se observa en los resultados preliminares en tratamientos con C1P por 48hs. Considerando que la TEM es un proceso que inicia a partir de una señal, ya sea interna o externa, que genera un cambio en la expresión génica (Troncoso et al., 2017) es lógico pensar que

siendo las células tratadas por más tiempo con un posible inductor de la TEM el cambio de expresión génica se mantenga.

Como último aspecto evaluado en esta tesis indagamos sobre la posibilidad de que C1P aumente la expresión de otros factores que promueven la TEM en el EPR, como es el caso de TGF- $\beta$  (Kanda et al., 2019) y de la enzima SphK1, encargada de la síntesis citoplasmática de S1P - esfingolípido que promueve procesos fibróticos de la retina (Swaney et al., 2008)-. Los resultados preliminares obtenidos son alentadores, en los cultivos tratados con C1P por 24hs se observa un aumento de la expresión de TGF- $\beta$  y de SphK1, tendencia que en TGF- $\beta$  se mantiene incluso en cultivos tratados con C1P por 48hs.

Nuestros hallazgos están en concordancia con otros estudios, en los cuales se ha demostrado que C1P modula las funciones de SphK1 al interactuar con múltiples sitios de la misma (Nishino et al., 2019) y que inhibe la producción del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) (Lamour et al., 2011), una citoquina antagonista de TGF- $\beta$ . Colectivamente, estos antecedentes y nuestros resultados preliminares refuerzan la hipótesis aquí planteada sobre la posibilidad de que C1P induzca la TEM por señalización cruzada con TGF- $\beta$  y SphK1.

En síntesis, los datos obtenidos en este trabajo permiten descartar a C1P como inductora de la proliferación y establecer un rol como promotora de la de-diferenciación de las células del EPR, proceso que junto a la inducción de la migración epitelial previamente reportado por el grupo de investigación en el que se llevó adelante esta tesis (Simón et al., 2022), dan fundamentos relevantes para considerarla como un esfingolípido que facilita el proceso de TEM. Los hallazgos aquí presentados no sólo avalan nuestra hipótesis sino que invitan a seguir trabajando en futuras investigaciones que permitan ampliar el conocimiento sobre las funciones de C1P y su interacción con otras vías de señalización que disparen el desarrollo de fibrosis en la retina.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Chiba, C. (2014). The retinal pigment epithelium: an important player of retinal disorders and regeneration. *Experimental eye research*, 123, 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2013.07.009>
- Cheung, N., Mitchell, P. y Wong, T.Y. (2010). Retinopatía diabética. *Lancet (Londres, Inglaterra)*, 376 (9735), 124–136. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)62124-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)62124-3)
- Dunn, K.C., Aotaki-Keen, A.E., Putkey, F.R. y Hjelmeland, L.M. (1996). ARPE-19, a human retinal pigment epithelial cell line with differentiated properties. *Experimental eye research*, 62(2), 155–169. <https://doi.org/10.1006/exer.1996.0020>
- Gelat, B., Rathaur, P., Malaviya, P., Patel, B., Trivedi, K., Johar, K. y Gelat, R. (2022). The intervention of epithelial-mesenchymal transition in homeostasis of human retinal pigment epithelial cells: a review. *Journal of histotechnology*, 45(4), 148–160. <https://doi.org/10.1080/01478885.2022.2137665>
- Gómez-Larrauri, A., Presa, N., Dominguez-Herrera, A., Ouro, A., Trueba, M. y Gómez-Muñoz, A. (2020). Role of bioactive sphingolipids in physiology and pathology. *Essays in biochemistry*, 64(3), 579–589. <https://doi.org/10.1042/EBC20190091>
- Gómez-Muñoz A. (2018). The Role of Ceramide 1-Phosphate in Tumor Cell Survival and Dissemination. *Advances in cancer research*, 140, 217–234. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2018.04.012>
- Jiménez-Uribe, A.P., Gómez-Sierra, T., Aparicio-Trejo, O.E., Orozco-Ibarra, M. y Pedraza-Chaverri, J. (2021). Backstage players of fibrosis: NOX4, mTOR, HDAC, and S1P; companions of TGF- $\beta$ . *Cellular signalling*, 87, 110123. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2021.110123>
- Kanda, A., Noda, K., Hirose, I. y Ishida, S. (2019). TGF- $\beta$ -SNAIL axis induces Müller glial-mesenchymal transition in the pathogenesis of idiopathic epiretinal membrane. *Scientific reports*, 9(1), 673. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36917-9>
- Lamour, N.F., Wijesinghe, D.S., Mietla, J.A., Ward, K.E., Stahelin, R.V. y Chalfant, C.E. (2011). Ceramide kinase regulates the production of tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) via inhibition of TNF $\alpha$ -converting enzyme. *The Journal of biological chemistry*, 286(50), 42808–42817. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.310169>
- Leask, A. y Abraham, D.J. (2004). TGF-beta signaling and the fibrotic response. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(7), 816–827. <https://doi.org/10.1096/fj.03-1273rev>

- Miranda, G.E., Abrahan, C.E., Agnolazza, D.L., Politi, L.E. y Rotstein, N.P. (2011). Ceramide-1-phosphate, a new mediator of development and survival in retina photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(9), 6580–6588. <https://doi.org/10.1167/iovs.10-7065>
- Miranda, G.E., Abrahan, C.E., Politi, L.E. y Rotstein, N.P. (2009). Sphingosine-1-phosphate is a key regulator of proliferation and differentiation in retina photoreceptors. *Investigative ophthalmology & visual science*, 50(9), 4416–4428. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-3388>
- Mondal, K. y Mandal, N. (2019). Role of Bioactive Sphingolipids in Inflammation and Eye Diseases. *Advances in experimental medicine and biology*, 1161, 149–167. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-21735-8\\_14](https://doi.org/10.1007/978-3-030-21735-8_14)
- Montenegro, M.A. y Rojas, M.A. (2001). Transformación epitelio-mesenquimática durante el desarrollo embrionario. *Revista Chilena de Anatomía*, 19(3), 301-10. <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-98682001000300012>
- Nagahashi, M., Abe, M., Sakimura, K., Takabe, K. y Wakai, T. (2018). The role of sphingosine-1-phosphate in inflammation and cancer progression. *Cancer science*, 109(12), 3671–3678. <https://doi.org/10.1111/cas.13802>
- Nishino, S., Yamashita, H., Tamori, M., Mashimo, M., Yamagata, K., Nakamura, H. y Murayama, T. (2019). Translocation and activation of sphingosine kinase 1 by ceramide-1-phosphate. *Journal of cellular biochemistry*, 120(4), 5396–5408. <https://doi.org/10.1002/jcb.27818>
- Ponnalagu, M., Subramani, M., Jayadev, C., Shetty, R. y Das, D. (2017). Retinal pigment epithelium-secretome: A diabetic retinopathy perspective. *Cytokine*, 95, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.02.013>
- Simón, M.V., Basu, S.K., Qaladize, B., Grambergs, R., Rotstein, N.P. y Mandal, N. (2021). Sphingolipids as critical players in retinal physiology and pathology. *Journal of lipid research*, 62, 100037. <https://doi.org/10.1194/jlr.TR120000972>
- Simón, M.V., Prado Spalm, F.H., Politi, L.E. y Rotstein, N.P. (2015). Sphingosine-1-Phosphate Is a Crucial Signal for Migration of Retina Müller Glial Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(10), 5808–5815. <https://doi.org/10.1167/iovs.14-16195>
- Simón, M.V., Prado Spalm, F.H., Vera, M.S. y Rotstein, N.P. (2019). Sphingolipids as Emerging Mediators in Retina Degeneration. *Frontiers in cellular neuroscience*, 13, 246. <https://doi.org/10.3389/fncel.2019.00246>
- Simón, M.V., Vera, M.S., Tenconi, P.E., Soto, T., Prado Spalm, F.H., Torlaschi, C., Mateos, M.V. y Rotstein, N.P. (2022). La esfingosina-1-fosfato y la ceramida-1-fosfato promueven respuestas migratorias,

proinflamatorias y profibróticas en las células del epitelio pigmentario de la retina. *Investigación ocular experimental*, 224, 109222. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2022.109222>

Shu, D.Y. y Lovicu, F.J. (2017). Myofibroblast transdifferentiation: The dark force in ocular wound healing and fibrosis. *Progress in retinal and eye research*, 60, 44–65. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2017.08.001>

Sparrow, J.R., Hicks, D. y Hamel, C.P. (2010). The retinal pigment epithelium in health and disease. *Current molecular medicine*, 10(9), 802–823. <https://doi.org/10.2174/156652410793937813>

Spiegel, S. y Milstien, S. (2003). Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(5), 397–407. <https://doi.org/10.1038/nrm1103>

Swaney, J.S., Moreno, K.M., Gentile, A.M., Sabbadini, R.A. y Stoller, G.L. (2008). Sphingosine-1-phosphate (S1P) is a novel fibrotic mediator in the eye. *Experimental eye research*, 87(4), 367–375. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2008.07.005>

Tamiya, S., Liu, L. y Kaplan, H.J. (2010). Epithelial-mesenchymal transition and proliferation of retinal pigment epithelial cells initiated upon loss of cell-cell contact. *Investigative ophthalmology & visual science*, 51(5), 2755–2763. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4725>

Troncoso, D., Madariaga, I., Aldana, S., Herreno, A., Chaparro, V., Molina, M., Rey, L., Ramírez, A., Montoya, C., Valderrama, A., Cañas, A. y Rojas, A. (2017). Transición mesenquimal epitelial: de lo molecular a lo fisiológico. *Universitas Medica*, 58 (4). <https://doi.org/https://dx.doi.org/10.11144/Javeriana.umed58-4.temm>

Vera, M. S., Simón, M.V., Prado Spalm, F.H., Ayala-Peña, V.B., German, O.L., Politi, L.E., Santiago Valtierra, F.X. y Rotstein, N.P. (2021). Ceramide-1-phosphate promotes the migration of retina Müller glial cells. *Experimenta eye research*, 202, 108359. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108359>

Yang, J., Antin, P., Berx, G., Blanpain, C., Brabletz, T., Bronner, M., Campbell, K., Cano, A., Casanova, J., Christofori, G., Dedhar, S., Derynck, R., Ford, H.L., Fuxe, J., García de Herreros, A., Goodall, G. J., Hadjantonakis, A. K., Huang, R. Y. J., Kalcheim, C., Kalluri, R., ... EMT International Association (TEMTIA) (2020). Guidelines and definitions for research on epithelial-mesenchymal transition. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 21(6), 341–352. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0237-9>

Zhou, M., Geathers, J.S., Grillo, S.L., Weber, S.R., Wang, W., Zhao, Y. y Sundstrom, J.M. (2020). Role of Epithelial-Mesenchymal Transition in Retinal Pigment Epithelium Dysfunction. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8, 501. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00501>