



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**  
**TESIS DE DOCTOR EN BIOQUÍMICA**

**MECANISMOS MOLECULARES DE PROTECCIÓN  
EN LA RETINA**

**ANA JULIA CHUCAIR**

**BAHÍA BLANCA**

**ARGENTINA**

**2011**

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de **Doctor** en **Bioquímica**, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de **Biología, Bioquímica y Farmacia** durante el período comprendido entre el **14 de marzo de 2006** y el **6 de diciembre de 2011** bajo la dirección del **Dr. Luis E. Politi**, de la co-directora **Nora P. Rotstein (2006-2007)**, y bajo la co-dirección del **Dr. John D. Ash (2008-2011)** en el Departamento de **Oftalmología**, en la **Universidad de Oklahoma Health Sciences Center (OUHSC), Oklahoma City, OK, USA.**

**Bioquímica Ana Julia Chucair**



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

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

**Dedicatoria:**

A mis padres, Ana y David,

A mi esposo, Michael

A mi hija, Inés

A la preciosa memoria de mi abuela, Julia.

## **Agradecimientos:**

Quisiera expresar mi más profunda gratitud al Dr. Luis Politi y a la Dra. Nora Rotstein, del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, en la Universidad Nacional del Sur, y al Dr. John Ash, del Departamento de Oftalmología, en la Universidad de Oklahoma Health Sciences Center, U.S.A, por asumir el compromiso de ser mis mentores durante estos años académicos. Su excelente guía, paciencia, y la curiosidad y entusiasmo hacia la investigación transmitidos, especialmente en los tiempos difíciles, fueron un gran estímulo para el desarrollo de estos estudios.

Quisiera también agradecer a mis compañeros en el presente y en el pasado, miembros del laboratorio Politi/Rotstein, especialmente a la Dra. Carolina Abrahan, y miembros del laboratorio Ash, por todo lo que aprendí de nuestras interacciones, su apoyo, amistad, y continua ayuda.

Quisiera expresar mi gratitud hacia la Universidad Nacional del Sur, el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca, la Universidad de Oklahoma Health Sciences Center (OUHSC), y el Dean McGee Eye Institute (DMEI), por constituir un hogar dónde desarrollar los temas de estudio de esta tesis doctoral, y por proveer las herramientas necesarias para llevar a cabo este trabajo, y hago extensivo el agradecimiento a las instituciones que patrocinaron económicamente estos proyectos: la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), al National Eye Intitute (NEI), Foundation Fighting Blindness (FFB), y Research to Prevent Blindness (RPB).

Quiero agradecer a mi familia argentina y americana, por su amor y apoyo incondicionales, sin el que llegar a estas instancias no hubiese sido posible, y resaltar el rol de mis padres, Ana y David, por los años de esfuerzo dedicados a la causa de mi educación, por su confianza, y por promover la búsqueda de mis sueños, sin importar cuán lejos del hogar me llevasen mis decisiones. Especialmente, quiero agradecer a mi esposo, Michael Elliott, por el tesoro de su compañía, tremenda ayuda, paciencia, pasión por la ciencia, la crítica inteligente hacia mi trabajo, y principalmente, por la felicidad que trae a mi vida, junto con nuestra hija Inés.

Quiero agradecer a mis amigos alrededor del mundo, quienes con o sin ciencia de por medio, me han rodeado de afecto en los buenos y en los duros momentos.

A cada individuo que de cualquier forma contribuyó al desarrollo de este capítulo académico: ¡Gracias!

## RESUMEN

En este trabajo de tesis nos concentramos en dos componentes principales del sistema endógeno de defensa, implicados en el contexto de las enfermedades neurodegenerativas de la retina: la línea de defensa antioxidante, y las citoquinas de estrés.

En el capítulo I, investigamos si los antioxidantes zeaxantina (ZEA), luteína (LUT), y  $\beta$ -caroteno (BC), los principales carotenoides de la dieta, protegen a los fotorreceptores del estrés oxidativo y si esa protección es sinérgica con la impartida por el ácido docosahexaenoico (DHA). Realizando cultivos neuronales puros de retinas de rata, encontramos que los pretratamientos con DHA, ZEA, LUT y BC redujeron la muerte de los fotorreceptores inducida por dos tipos de agentes oxidantes, paraquat (PQ) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Además de este efecto, ZEA y LUT incrementaron la diferenciación de los fotorreceptores, aumentando la expresión de opsina y promoviendo el desarrollo de procesos característicos de fotorreceptores maduros. Nuestros resultados sugieren que las xantófilas ZEA y LUT junto al DHA podrían ser importantes factores ambientales que contribuyen a la promoción de la supervivencia y diferenciación de los fotorreceptores.

En el capítulo II, utilizamos los cultivos neuronales puros de retina de rata para estudiar el efecto protector directo de la neurocitoquina de estrés, el factor inhibidor de la leucemia (LIF), sobre fotorreceptores sujetos al estrés oxidativo inducido por PQ. Observamos que el pretratamiento con LIF redujo la muerte celular y disminuyó la expresión de opsina en los cultivos, en una forma dependiente de la concentración. LIF activó la vía de señalización gp130/STAT3, lo que sugiere que este modelo es una potente herramienta para facilitar el estudio de los mecanismos que dirigen los efectos en la protección y en la diferenciación de LIF en los fotorreceptores de la retina.

En el capítulo III investigamos mecanismos endógenos de neuroprotección de fotorreceptores *in vivo* en ratones usando un modelo de preconditionamiento con ciclos de luz/oscuridad (PC), seguido por exposición a daño agudo por luz (LD). Trabajos previos en el laboratorio del Dr. Ash demostraron que El PC induce la expresión de LIF y la activación de la vía gp130/STAT3. Aquí demostramos que el PC con luz moderada, previo al LD resultó en casi completa protección funcional y morfológica de los fotorreceptores. Estudiamos si el mecanismo de esta protección involucra la disminución en la acumulación de productos de oxidación. Hallamos que LD induce la oxidación de ADN en fotorreceptores. El PC previo redujo la oxidación de ADN como parte de la respuesta endógena de neuroprotección inducida por este modelo.

En el capítulo IV, investigamos si la activación de STAT3 inducida por LIF altera la actividad biológica de las células del epitelio pigmentado de la retina (RPE) *in vivo*. Generamos modelos de ratones knock-out para específicamente deletar STAT3 o gp130 en el RPE, en la retina, o en ambos retina y RPE y realizamos inyecciones intravítreas de LIF en estos modelos. Establecimos que LIF regula negativamente la expresión y actividad de la isomerohidrolasa RPE65, componente clave del ciclo visual en el RPE, de manera coordinada con una reducción en la expresión de la rodopsina en los fotorreceptores, para disminuir la síntesis del fotorpigmento visual. Dicha regulación se postula como neuroprotectora de la exposición al estrés por luz, o de enfermedades neurodegenerativas de la retina. Estos efectos en la retina y en el RPE fueron independientes y requirieron la activación de la vía de señalización gp130/STAT3 intrínseca de la retina y del RPE, respectivamente.

## **ABSTRACT**

In this thesis, we focused on two main components of the endogenous defense system implicated in neurodegenerative diseases in the retina: the antioxidant line of defense and stress cytokines.

In chapter I, we investigated whether the main carotenoids from the diet: zeaxantin (ZEA), lutein (LUT), and  $\beta$ -carotene (BC), protect photoreceptors from oxidative stress and whether this protection is synergistic with that given by docosahexaenoic acid (DHA). By performing pure neuronal cultures from rat retinas, we found that pretreatment with DHA, ZEA, LUT and BC reduced photoreceptor apoptotic cell death induced by two types of oxidants, paraquat (PQ) and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). Also, ZEA and LUT increased the expression of opsin and promoted the development of processes that are characteristic of mature photoreceptors. Our results suggest that the xanthophylls ZEA and LUT along with DHA could be important environmental cues contributing to the promotion of photoreceptor survival and differentiation.

In chapter II, we used pure neuronal cultures from rat retinas to study the direct effects of the stress neurocytokine, leukemia inhibitory factor (LIF), on photoreceptors exposed to oxidative stress induced by PQ. We observed that pretreatment with LIF reduced photoreceptor cell death and decreased opsin expression in primary retinal neurons, in a dose-dependent manner. LIF activated the gp130/STAT3 signaling pathway, which suggests this model as a potent tool that could ease the study on mechanisms involved in the effects induced by LIF on photoreceptor survival and differentiation.

In chapter III, we examined endogenous protective mechanisms of photoreceptor *in*



*vivo*, in mice exposed to a model of preconditioning with cycles of light/darkness (PC) followed by exposure to acute light damage (LD). Previous work in Dr. Ash's laboratory has demonstrated that the primary endogenous neuroprotective response in this model is the upregulation of LIF and increased gp130/STAT3 signaling in photoreceptors. Here, we demonstrated that PC with moderate levels of light prior to LD resulted in almost complete functional and morphological protection of photoreceptors. We studied whether the mechanism mediating this protection involved a reduction in the accumulations of oxidation products. We found that LD induced DNA oxidation in photoreceptors, but the prior treatment with PC decreased such oxidation as a part of the endogenous response induced by this model.

In chapter IV, we aimed to investigate whether the activation of STAT3 induced by LIF alters the biological activities of the retinal pigmented epithelium (RPE) *in vivo*. We generated conditional knock-out mouse models with specific deletion of STAT3 or gp130 in the RPE, in the retina, or in both retina and RPE and we performed intravitreal injections of LIF in these animals. Our studies allowed us to establish that LIF downregulates the expression and activity of the isomerohydrolase RPE65, a key component in the visual cycle in the RPE, which is coordinated with a decrease in the expression of rhodopsin in photoreceptors, to diminish the synthesis of the visual photopigment. This coordinated downregulation is postulated to be neuroprotective in both light stress and in neurodegenerative diseases in the retina. The effects induced by LIF in the retina and the RPE were independent from each other and required the activation of the gp130/STAT3 signaling pathway intrinsic to retina and RPE, respectively.

<b><u>ÍNDICE</u></b>	<b>Página</b>
<b>PREFACIO</b>	<b>2</b>
<b>DEDICATORIA</b>	<b>3</b>
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>ÍNDICE</b>	<b>10</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>14</b>
1. La retina como modelo de sistema nervioso	<b>18</b>
1.1. Fotorreceptores	<b>20</b>
1.2. RPE	<b>25</b>
2. Neuroprotección endógena en la retina	<b>30</b>
2.1. Sistema antioxidante de la retina	<b>30</b>
2.2. Pigmento macular: ZEA y LUT	<b>30</b>
2.3. Citoquinas de la familia de Interleuquina-6 (IL-6) y receptor gp130	<b>35</b>
2.4. Evidencia de protección retinal a través de la activación de gp130	<b>39</b>
3. Degeneraciones de la retina y modelos para estudiar neuroprotección	<b>40</b>
3.1. Degeneración de la mácula asociada a la edad (AMD) y enfermedad de Stargardt (SD)	<b>40</b>
3.2. Daño por luz y estrés oxidativo	<b>43</b>
3.3. Modelo de preconditionamiento por luz: buscando mecanismos endógenos de neuroprotección	<b>46</b>
3.4. Modelos <i>in vitro</i> de neurodegeneración y neuroprotección	<b>50</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	<b>51</b>
<b>La luteína y zeaxantina protegen contra la apoptosis inducida por el estrés oxidativo en los fotorreceptores de retina.</b>	
<b>Introducción</b>	<b>52</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>56</b>
Materiales	<b>56</b>
Cultivos neuronales	<b>57</b>

Agregado de los carotenoides	58
Agregado de ácido docosahexaenoico	58
Tratamiento con Paraquat	59
Tratamiento con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	59
Métodos inmunohistoquímicos	61
Viabilidad celular y apoptosis	61
Evaluación del potencial de membrana mitocondrial	62
Translocación del citocromo C	63
Análisis estadístico	63
<b>Resultados</b>	<b>64</b>
Efecto protector de los carotenoides contra la muerte celular inducida por estrés oxidativo	64
Efecto de los carotenoides y DHA en la prevención de la apoptosis de fotorreceptores inducida por estrés oxidativo.	67
Efecto de los carotenoides en la preservación del potencial de membrana mitocondrial de los fotorreceptores.	74
Efectos de ZEA y LUT sobre la diferenciación de los fotorreceptores	80
Efecto de los carotenoides sobre la supervivencia y diferenciación de las neuronas amacrinas	80
<b>Discusión</b>	<b>84</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>90</b>
<b>El factor inhibidor de la leucemia (LIF) protege a los fotorreceptores del estrés oxidativo inducido en cultivos neuronales puros de retina.</b>	
<b>Introducción</b>	<b>91</b>
<b>Materiales y Métodos</b>	<b>93</b>
Agregado de LIF	93
Tratamiento con Paraquat	93
Viabilidad celular y apoptosis	94
Detección inmunocitoquímica de la expresión de opsina	94
Western blot	94
Análisis estadístico	95
<b>Resultados</b>	<b>97</b>
<b>Discusión</b>	<b>105</b>

<b>CAPÍTULO III</b>	<b>107</b>
<b>El preconditionamiento por luz cíclica previene la oxidación de ADN en los fotorreceptores y la degeneración retinal inducida por daño por luz.</b>	
<b>Introducción</b>	<b>108</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>111</b>
Animales y exposición lumínica	<b>111</b>
Electrorretinografía (ERG)	<b>113</b>
Análisis morfométrico de la retina	<b>113</b>
Western Blot	<b>114</b>
Inmunohistoquímica	<b>116</b>
Análisis estadístico	<b>117</b>
<b>Resultados</b>	<b>118</b>
El preconditionamiento protege la función y morfología de los fotorreceptores en correlación con la activación de STAT3 retinal	<b>118</b>
La oxidación de ADN en fotorreceptores aumenta con el tiempo de exposición a la luz	<b>124</b>
El efecto protector del preconditionamiento reduce el porcentaje de fotorreceptores 8-OHdG positivos luego del daño por luz.	<b>124</b>
El preconditionamiento por luz cíclica brillante disminuye el porcentaje de fotorreceptores TUNEL positivos tras el daño por luz.	<b>125</b>
El preconditionamiento por luz no disminuyó la oxidación de proteínas siguiendo la exposición al daño por luz.	<b>126</b>
<b>Discusión</b>	<b>131</b>
<b>CAPÍTULO IV</b>	<b>133</b>
<b>El factor inhibidor de la leucemia (LIF) regula la síntesis de 11- <i>cis</i> retinaldehído por el epitelio pigmentado de la retina y su utilización por los fotorreceptores</b>	
<b>Introducción</b>	<b>134</b>
<b>Materiales y métodos</b>	<b>138</b>
Animales	<b>138</b>
Inyecciones intravítreas	
Extracción de RNA y PCR cuantitativo en tiempo real PCR (RTq-PCR)	<b>142</b>
Western blot	<b>144</b>
Inmunohistoquímica (IHC)	<b>145</b>
Actividad isomerohidrolasa de la proteína RPE65	<b>146</b>
Medición de la regeneración de la rodopsina	<b>147</b>
Electrorretinografía (ERG)	<b>148</b>
Análisis histológico	<b>149</b>

Análisis estadístico	149
<b>Resultados</b>	<b>151</b>
LIF activa STAT3 e induce la disminución de los niveles de compuestos del ciclo visual en el RPE.	151
LIF reduce la actividad isomerohidrolasa de RPE65.	153
La regulación negativa de RPE65 es dependiente de la cascada de señalización gp130/STAT3 en el RPE.	160
LIF retrasa la regeneración de la rodopsina después del fotoblanqueo.	174
LIF no altera la función fagocítica del RPE.	178
<b>Discusión</b>	<b>180</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES DE ESTA TESIS</b>	<b>185</b>
<b>PUBLICACIONES ORIGINADAS DURANTE ESTA TESIS</b>	<b>186</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>187</b>

# INTRODUCCIÓN

La patogénesis de los desórdenes degenerativos del cerebro y la espina dorsal, tales como la enfermedad de Alzheimer o el mal de Parkinson, y de la retina, por ejemplo la degeneración de la mácula asociada a la edad (AMD), la enfermedad de Stargardt, y retinitis pigmentosa, comparten el estrés oxidativo como factor desencadenante para la pérdida de función neuronal debido a la muerte de las células neuronales. En situaciones fisiológicas, los niveles de estrés oxidativo no alcanzan a ser patológicos y las células sobreviven. En situaciones patológicas, no obstante, estos compuestos alcanzan niveles citotóxicos ocasionando la muerte celular por apoptosis. Mientras que la identificación de la “causa” de la muerte neuronal en estas enfermedades ha sido tema de intenso estudio durante las últimas décadas, recientes avances en investigación sugieren fuertemente que entender “protección endógena” es clave para dilucidar mecanismos sobre cómo prevenir o retardar la muerte neuronal. En el curso de estos estudios, nosotros (a la vez que otros grupos) hemos encontrado que tanto moléculas antioxidantes, como también factores que son sobreexpresados en respuesta a niveles moderados de estrés oxidativo, previamente a la degeneración, sirven para prevenir o retardar la muerte celular. Identificar estos mecanismos, como sus reguladores, podría potencialmente ser aplicado al diseño de terapias neuroprotectoras para tratar enfermedades. En este trabajo de tesis, nos concentramos en dos componentes principales del sistema endógeno de defensa en la retina: la línea de defensa antioxidante, y las citoquinas de estrés, y analizamos su contribución en el contexto de enfermedades neurodegenerativas. A continuación, presentaremos una reseña sobre los temas principales que apoyaron el diseño de nuestras hipótesis y las observaciones realizadas en el curso de nuestras investigaciones. En primer lugar, describiremos a la retina como modelo de sistema

nervioso, adecuado para nuestros estudios, particularmente refiriéndonos a las neuronas fotorreceptoras y a las células del epitelio pigmentado de la retina (RPE), y sus funciones. También introduciremos componentes del sistema antioxidante endógeno de la retina, resaltando los roles descritos hasta la fecha de las xantófilas luteína (LUT) y zeaxantina (ZEA).

Por su relevancia como parte de los mecanismos endógenos de protección en la retina, describiremos la familia de citoquinas Interleukina-6 (IL-6), el receptor de transducción de señales gp130, común a todos sus miembros, y las vías de señalización intracelular activadas luego de la activación de este receptor por sus ligandos. Por último, describiremos la patología de algunas enfermedades neurodegenerativas, para las cuales entender los mecanismos endógenos de neuroprotección podría ser crítico para el desarrollo de terapias, usando como herramientas de trabajo paradigmas *in vitro* e *in vivo*.

Los objetivos generales de este trabajo fueron:

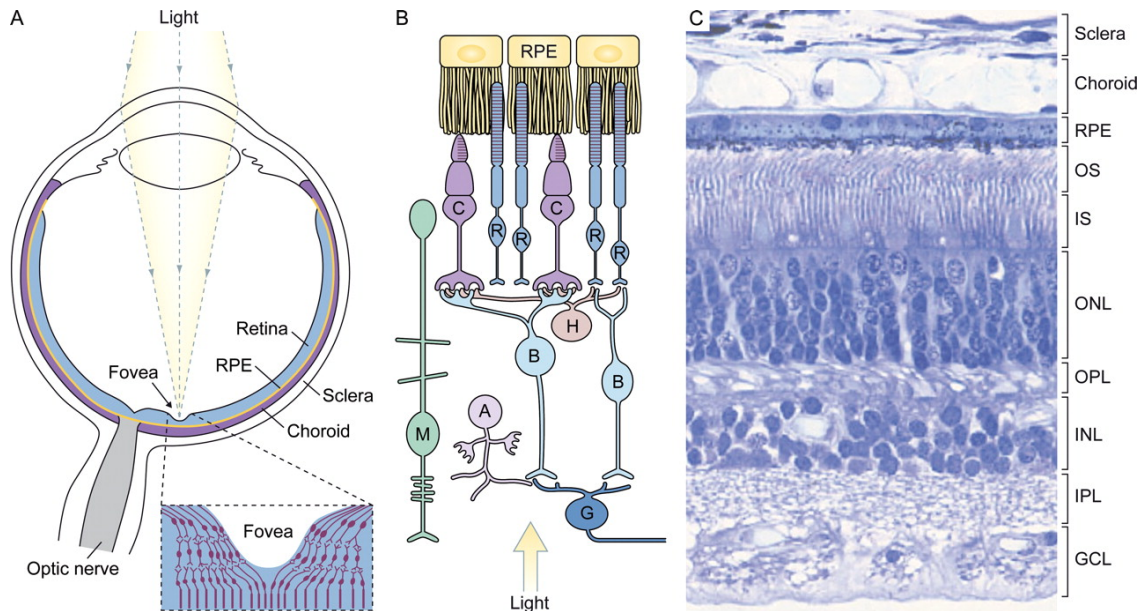
- A) Investigar los efectos protectores directos de moléculas antioxidantes, específicamente ZEA y LUT, y de beta-caroteno (B-C) en cultivos primarios puros de fotorreceptores de retina de rata (capítulo I).
- B) Generar un sistema *in vitro* para estudiar el efecto protector de neurocitoquinas de estrés, como el factor inhibidor de la leucemia (LIF), sobre fotorreceptores de retina de rata sujetos a tratamiento con agentes oxidantes como paraquat (capítulo II).
- C) Investigar mecanismos endógenos de neuroprotección de fotorreceptores *in vivo* en ratones usando un modelo de preconditionamiento con ciclos de luz/oscuridad seguido por exposición a daño agudo por luz (capítulo III).



D) Estudiar el rol de la vía de neuroprotección gp130/STAT3, específicamente en RPE, usando un ligando para el receptor gp130, LIF, y modelos de ratones transgénicos (capítulo IV).

## 1. La retina como modelo de sistema nervioso

La retina es la lámina más interna del ojo; está compuesta por células con funciones diversas (**Ilustración 1.A**). Por su origen embrionario derivado del neuroectodermo, la retina es considerada parte del sistema nervioso central (CNS). La accesibilidad de la retina, comparada con otras partes del CNS, así como su laminación estructural similar al córtex, hacen de la retina un modelo ideal para el estudio de fenómenos observados en cualquier otro tejido del CNS. La monocapa externa se conoce como el epitelio pigmentado de la retina (RPE), mientras que hacia el interior se encuentra la retina neurosensorial, que consiste en neuronas fotorreceptoras, neuronas bipolares, neuronas ganglionares, neuronas horizontales, neuronas amacrinas, y células interplexiformes. Los núcleos de los fotorreceptores se encuentran en la capa nuclear externa (ONL), mientras que los núcleos de las neuronas bipolares, amacrinas, horizontales, y células gliales de Müller se encuentran en la capa nuclear interna (INL). Los núcleos de las células ganglionares se encuentran en la capa celular ganglionar (GCL). La capa plexiforme externa (OPL) contiene los procesos y terminales sinápticos de los fotorreceptores, neuronas horizontales y neuronas bipolares. La capa plexiforme interna (INL) contiene los procesos y terminales sinápticas de neuronas bipolares, amacrinas y ganglionares. Los procesos de las células gliales de Müller llenan el espacio en la retina que no es ocupado por neuronas o vasos sanguíneos (Sung and Chuang, 2010) (**Ilustración 1.B , 1.C**). Las células de la retina no sólo están altamente especializadas para ejercer sus funciones, sino que a su vez, diferentes áreas de este tejido, tales como la mácula, en la región de la fovea, y áreas periféricas están diferencialmente especializadas.



*Sung and Chuang. J Cell Biol 2010;190:953-963*

**Ilustración 1. Organización de la retina.** (A) Diagrama del ojo; con más detalle se muestra la región de la fovea, cerca de nervio óptico (recuadro, líneas discontinuas). El RPE se encuentra entre la retina y coroides (tejido conectivo pigmentado vascularizado). (B) Diagrama de la organización de las células retinales. Bastones (R); conos (C); células bipolares (B); células horizontales (H); células amacrinas (A); células ganglionares (G); células gliales de Müller (M). (C) Tinción con hematoxilina-eosina de una sección transversal de retina humana. Se indican las capas retinales: capa nuclear externa (ONL); capa nuclear interna (INL); capa celular ganglionar (GCL); capa plexiforme externa (OPL); capa plexiforme interna (IPL).

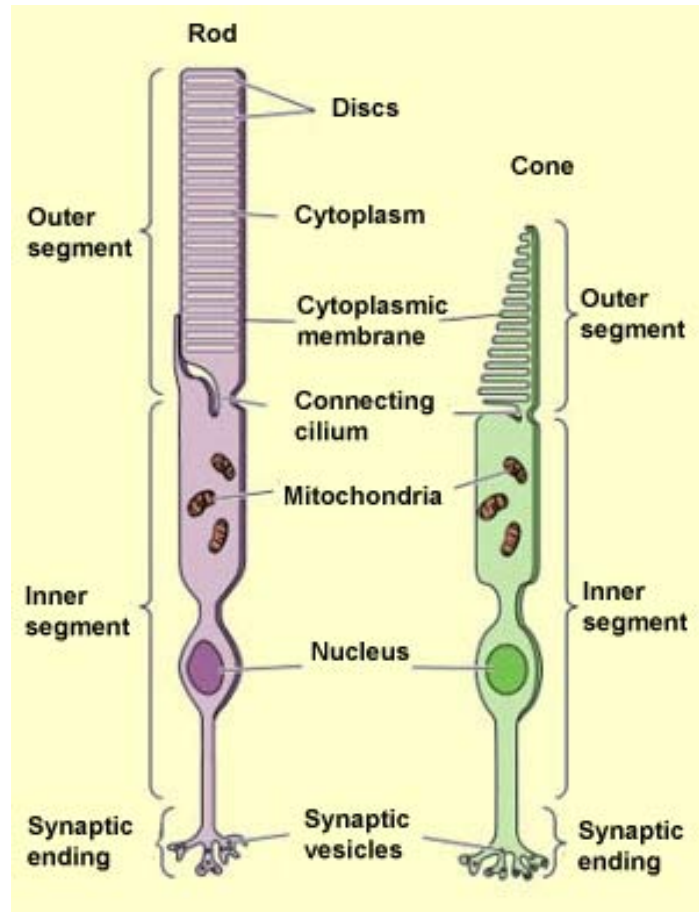
## 1.1. Fotorreceptores

Los fotorreceptores se encuentran entre las células más polarizadas y compartimentalizadas de los vertebrados. Son las neuronas responsables de detectar la luz y de iniciar nuestra percepción visual. Los dos tipos de fotorreceptores, conos y bastones, se alinean en la superficie apical de la retina, presentando en su extremo apical los segmentos externos (OS), los cuales son seguidos del cilio, el segmento interno (IS), la región nuclear, y las terminales sinápticas. El IS puede definirse como una región elipsoide rica en mitocondrias, retículo endoplásmico, y complejo de Golgi (Randlett et al., 2010). Inicialmente, ambos tipos de fotorreceptores fueron clasificados de acuerdo a su morfología. Los OS, consistentes en múltiples capas de pliegues membranosos, contienen los pigmentos fotosensibles, llevan a cabo la captura de fotones y la fototransducción, y difieren entre conos y bastones. En el bastón, los discos membranosos están separados de y envueltos por la membrana plasmática. En cambio, en el cono, los OS están formados por invaginaciones apiladas de membrana plasmática (Mustafi et al., 2009). Además de sus diferencias estructurales (**Ilustración 2**), conos y bastones tienen distintas propiedades funcionales. Sus diferencias en sensibilidad a la luz hacen a los conos y bastones apropiados para funcionar en condiciones de luz tenue y brillante, respectivamente (Fu and Yau, 2007; Wang and Kefalov, 2011). Los conos están altamente concentrados en el centro de la retina (fóveola), y operan en rangos de intensidad lumínica entre  $10^{-1}$  y  $10^5$  luxes, mediando la visión fotópica, rica en color y caracterizada por una alta resolución temporal. Los conos responden al estímulo por luz tenue de forma rápida, y recuperan su actividad velozmente luego de ser expuestos a luz brillante. En contraste, los bastones están presentes en toda la retina, excepto en la región

más central, y son mucho más sensibles a la luz que los conos, ya que tienen la capacidad de detectar un único fotón de luz. Los bastones proveen visión escotópica hasta una intensidad lumínica de  $10^{-2}$  luxes con baja resolución, y carente de información crómica, a comparación de los conos. Las respuestas de los bastones a luz tenue son lentas, con largos períodos refractarios luego de ser expuestos a luz brillante (Fu and Yau, 2007; Wang and Kefalov, 2011; Wu et al., 2006a). Cada fotorreceptor usualmente contiene sólo un tipo de opsina, lo que determina el espectro de absorción y sensibilidad espectral del pigmento asociado a ese fotorreceptor. Los ratones son una excepción, ya que coexpresan opsina-S y opsina-M (Applebury et al., 2000). A continuación, describiremos la función de los fotorreceptores, ya sean conos o bastones, en la fototransducción.

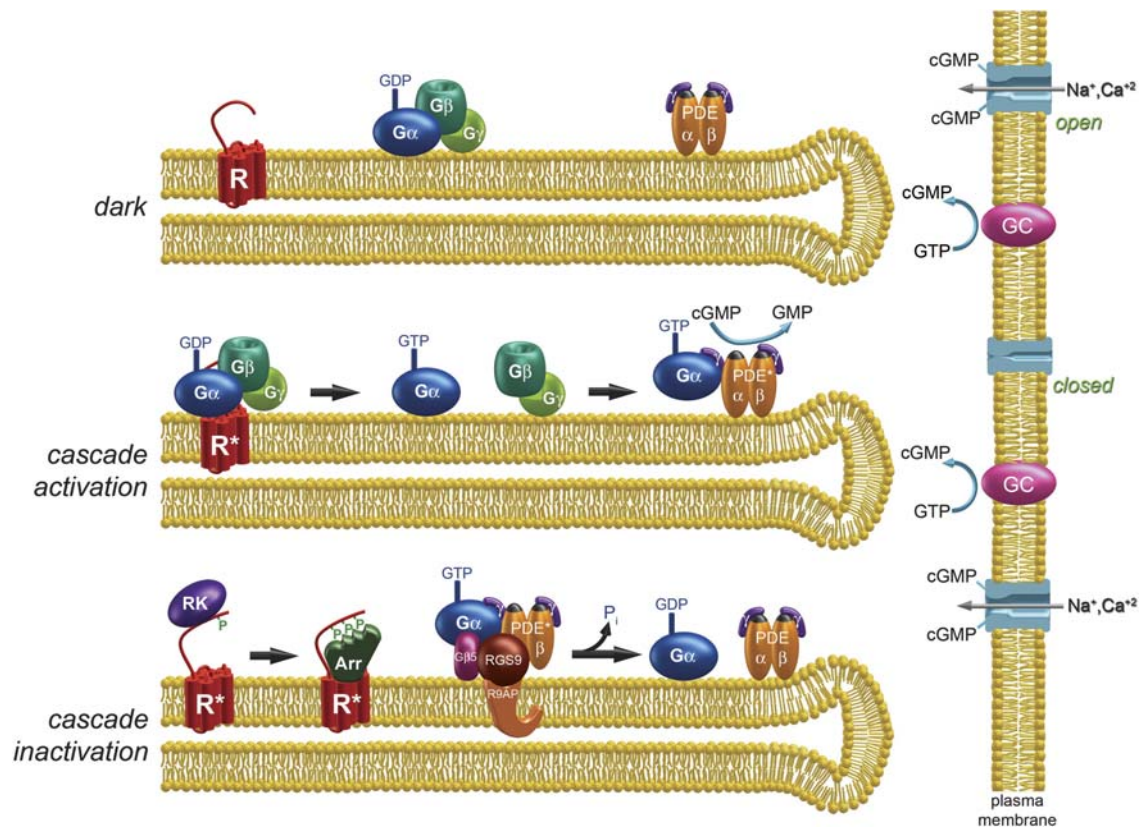
**Fototransducción:** Este es un mecanismo altamente conservado en los OS de conos y bastones, a través de diferentes especies, para la conversión de la luz en señales eléctricas neurales (Arshavsky et al., 2002), extensamente revisados en la literatura (Burns and Arshavsky, 2005; Fain et al., 2010; Fu and Yau, 2007; Kefalov et al., 2003; Luo et al., 2008; Mustafi et al., 2009), y esquematizado en la **Ilustración 3**. El segundo mensajero que transmite la señal lumínica a señal neural es el GMP cíclico (GMPc), que abre canales no selectivos catiónicos gatillados por nucleótidos cíclicos (CNG) localizados en la membrana plasmática de los OS (Yau, 1994). En la oscuridad, una fracción de los canales CNG permanecen abiertos, unidos a GMPc, permitiendo la entrada de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ . Esta corriente interna en los fotorreceptores en la oscuridad mantiene la liberación sostenida del neurotransmisor glutamato desde las terminales sinápticas. La concentración de GMPc dentro de los OS es regulada por su síntesis a cargo de la enzima guanidil ciclasa (GC), y su degradación por la enzima fosfodiesterasa (PDE). Siguiendo

la absorción de luz, la rodopsina activada ( $R^*$ ) activa la proteína G transducina, que luego activa PDE. La PDE activada hidroliza GMPc a GMP, reduciendo su concentración. Esto causa el cierre de los canales CNG y la hiperpolarización de la membrana de los fotorreceptores. La reducción en la liberación de glutamato desde las terminales sinápticas convierte la señal lumínica y la transmite a las neuronas postsinápticas como señal eléctrica (Lamb and Pugh, Jr., 2006; Yau and Hardie, 2009). Para mantener la sensibilidad de los fotorreceptores al estímulo lumínico, la fototransducción en los OS es terminada a través de la inactivación de todos los componentes de la cascada de fototransducción, con la recuperación final de los niveles de GMPc (Fu and Yau, 2007; Lamb and Pugh, Jr., 2004).



<http://lolatbio.wikispaces.com/The+Eye>

**Ilustración 2. Comparación estructural entre conos y bastones**



*Burns and Arshavsky(2005). Neuron 48:387-401*

**Ilustración 3. Representación esquemática de la activación e inactivación de la cascada de fototransducción.** El disco superior ilustra los componentes rodopsina, transducina (subunidades  $G\alpha$ ,  $G\beta$ , y  $G\gamma$ ) y fosfodiesterasa (PDE) inactivas en la oscuridad. Las reacciones en el medio representan la activación de transducina y PDE, inducidas por luz. Las reacciones en el disco inferior representan la inactivación de esta cascada, no discutida en detalle en esta tesis.



## 1.2 RPE

Las células del RPE conforman un epitelio polarizado, situado entre la retina neural y la coroides. Las largas microvellosidades de estas células se interdigitan en su superficie apical con los segmentos externos de los fotorreceptores, mientras que su superficie basal con sus múltiples invaginaciones, es adyacente a la membrana de Bruch, que separa al epitelio del endotelio de los coriocapilares (Simo et al., 2010). A continuación, describiremos algunas de las funciones más estudiadas del RPE, las cuales están resumidas en la **Ilustración 4**.

**Transporte transepitelial:** El RPE efectúa el transporte bidireccional de electrolitos y agua desde el espacio subretinal hacia la coroides, y de glucosa y otros nutrientes desde la sangre hacia los fotorreceptores. El transporte de agua es requerido para el establecimiento de fuerzas adhesivas entre el RPE y la retina (Kita and Marmor, 1992). El RPE toma nutrientes como glucosa, retinol, ácido ascórbico, y ácidos grasos de la sangre para ser entregados a los fotorreceptores en la retina. El suministro de retinal a los fotorreceptores, asegura el mantenimiento de la función visual (Baehr et al., 2003; Bok, 1990). Por otro lado, la entrega de ácido docosahexaenoico DHA desde el RPE hacia los fotorreceptores es otro transporte crucial que provee al tejido neural del ácido graso esencial omega-3, para servir su rol estructural y protector en las membranas de los fotorreceptores (Bazan, 2005; Mukherjee et al., 2007; Rotstein et al., 1996).

**Ciclo visual:** Durante las últimas décadas, numerosos estudios han contribuido a nuestro conocimiento sobre la vía de reciclado del cromóforo en el RPE que provee 11-*cis*-retinal (11-*cis* RAL) para la regeneración del fotorreceptor en conos y bastones. La

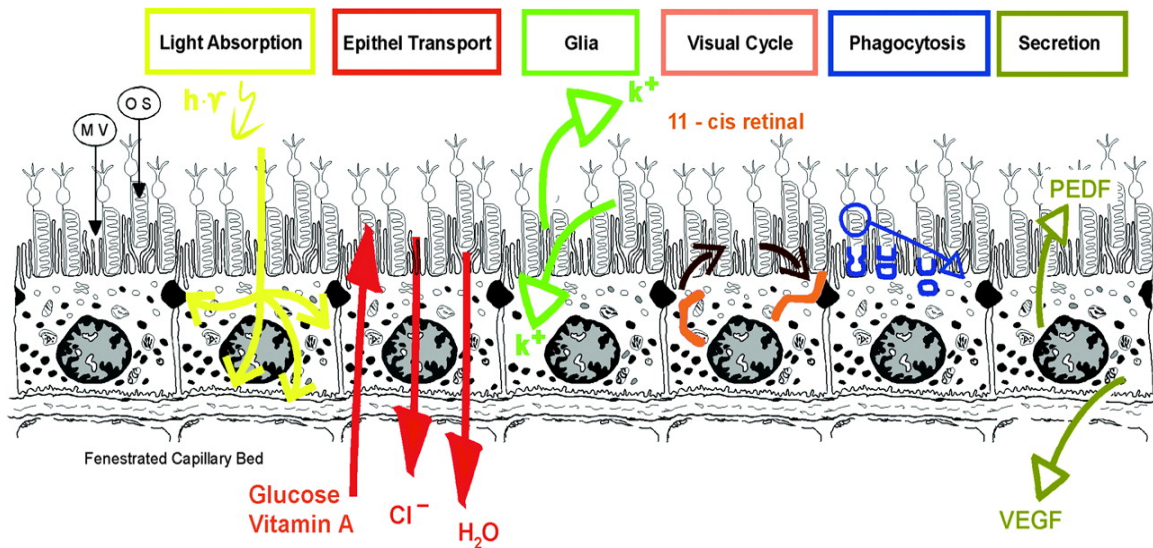
fuelle de cromóforo en el sistema visual es el todo-*trans* retinol (11-*trans* ROL/ vitamina A), derivado de la circulación sanguínea (Dowling and Wald, 1960), que es capturado por las células del RPE (Chen and Heller, 1977), convertido a 11-*cis* RAL e introducido a los fotorreceptores, donde se combina con la opsina para formar el pigmento visual (Wang and Kefalov, 2011). En los fotorreceptores, la absorción de fotones por la rodopsina en bastones y por la yodopsina en conos, induce la fotoisomerización de 11-*cis*-RAL a todo-*trans*-RAL, el cual se disocia del receptor, dejándolo insensible a la luz. Para que los fotorreceptores puedan sostener la sensibilidad al estímulo lumínico, el cromóforo 11-*cis*-RAL debe ser regenerado a través de una vía multienzimática que metaboliza y transporta retinoides entre el RPE y los fotorreceptores, conocido como el ciclo canónico visual (**Ilustración 5**). Inicialmente, el todo-*trans*-RAL es reducido a todo-*trans*-retinol (todo-*trans*-ROL) por todo-*trans*-retinol deshidrogenasas en los fotorreceptores. El todo-*trans*-ROL es luego transportado a las células del RPE donde la enzima lecitin retinol aciltransferasa (LRAT) lo convierte en todo-*trans*-retinil ésteres (todo-*trans*-RE). La enzima RPE65 (RPE specific protein 65) isomeriza el todo-*trans*-RE a 11-*cis*-retinol (11-*cis*-ROL), que luego es oxidado a 11-*cis*-RAL mediante las 11-*cis*-retinol deshidrogenasas (11-*cis*-RDHs), principalmente RDH5, en el RPE. El ciclo culmina cuando el 11-*cis*-RAL es transportado de vuelta a los OS y es combinado con rodopsinas o yodopsinas para regenerar la función de los pigmentos visuales. Aparte de rodopsina y yodopsina, los vertebrados contienen varias opsinas “no visuales”, incluyendo RGR (RPE-retinal G protein receptor opsin). La exposición de RGR a la luz induce fotoisomerización del todo-*trans*-RAL a 11-*cis*-RAL, pero a diferencia de la rodopsina,

RGR no libera su cromóforo luego de la fotoisomerización (Driessen et al., 2000;Farjo et al., 2009;Jang et al., 2001;Moiseyev et al., 2005;Radu et al., 2008)

**Fagocitosis:** Los fotorreceptores están expuestos a intensos niveles de luz, lo que conduce a la acumulación de proteínas y lípidos fotodañados. Además, la alta demanda metabólica de los fotorreceptores resulta en la acumulación de radicales libres oxidantes. Esta situación expone a los fotorreceptores a niveles de compuestos tóxicos que van en aumento durante cada día (Beatty et al., 2000). Con el fin de mantener la función visual en los fotorreceptores, el RPE ejecuta el proceso coordinado de renovación de OS, el cual ha sido descrito extensamente en la literatura (Bok, 1993;Bosch et al., 1993;Kevany and Palczewski, 2010;LaVail, 1983;Nandrot et al., 2007;Strauss, 2005). Los extremos de los OS de los fotorreceptores, con la mayor concentración de radicales, proteínas y lípidos fotodañados, son removidos y reconstruidos nuevamente desde la base de los OS, a la altura del cilio. Los OS removidos son fagocitados y digeridos por el RPE, liberándose así moléculas esenciales, como el DHA, y RAL, que son reentregados a los fotorreceptores, de una forma comparable al ciclo visual (Bibb and Young, 1974;Bok, 1993;Kevany and Palczewski, 2010;Nguyen-Legros and Hicks, 2000). El proceso de remoción de OS y fagocitosis está controlado de manera circadiana (LaVail, 1980), y la tasa de recambio de un OS entero es de aproximadamente 10 días (Young, 1971).

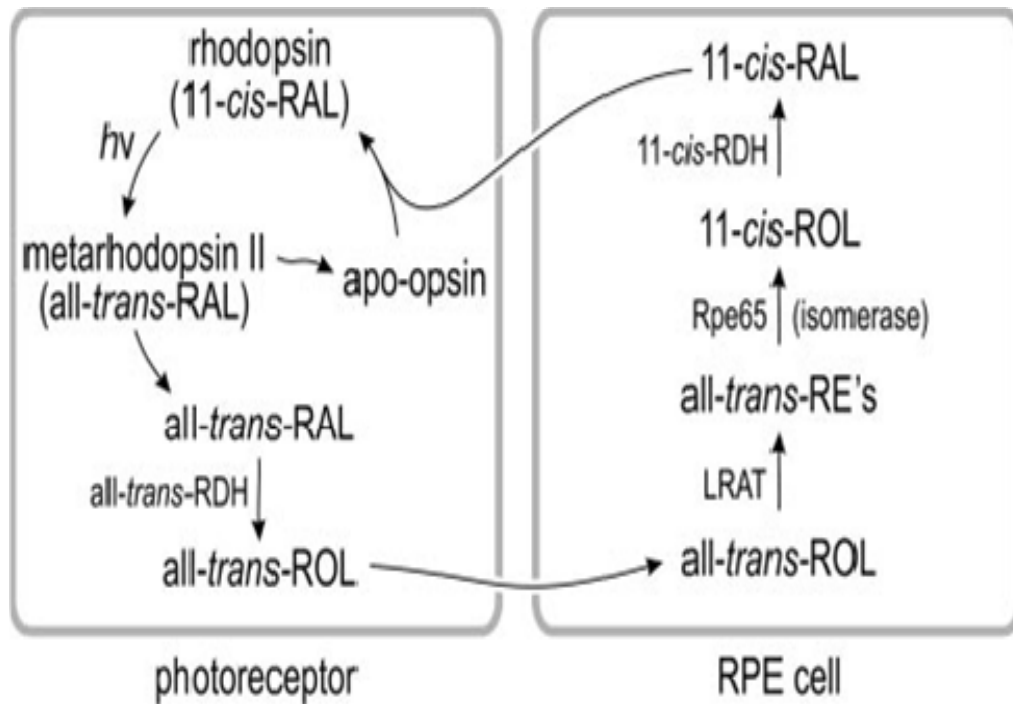
**Secreción:** El RPE produce y secreta una variedad de factores de crecimiento esenciales para el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de la retina (Cao et al., 1999;Steele et al., 1993) y coriocapilares (Saint-Geniez et al., 2009;Witmer et al., 2003). Así, el RPE produce moléculas que apoyan la supervivencia de los fotorreceptores y

aseguran las bases estructurales para la circulación y suministro óptimos de nutrientes. El RPE secreta factor derivado del epitelio pigmentado(PEDF) (King and Suzuma, 2000), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (D'Amore, 2007;Witmer et al., 2003), factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF-1, FGF-2, y FGF-5) (Bost et al., 1992;Connolly et al., 1992;Dunn et al., 1998;Walsh et al., 2001), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), y factor neurotrófico ciliar (CNTF) (Cao et al., 1997;Simo et al., 2010;Walsh et al., 2001) entre otros. Además, el RPE es responsable de establecer el privilegio inmune del ojo, probablemente debido a la secreción de factores inmunosupresores solubles (Enzmann et al., 2002;Liversidge et al., 1993).



*Strauss (2005) Physiol Rev 85:845-881*

#### **Ilustración 4. Resumen de las funciones del RPE.**



Minghao et al., *J. Neurosci.*, 2009 - 29(5):1486–1495

**Ilustración 5. Representación esquemática del ciclo visual canónico del RPE.** Las células del RPE interactúan íntimamente con los fotorreceptores para mantener la función del ciclo visual. Los detalles que explican la regeneración del fopigmento se presentan resumidamente en el texto.

## **2. Neuroprotección endógena en la retina.**

La retina es particularmente susceptible al daño oxidativo por varias razones: está sujeta a una alta tensión de oxígeno (Alder and Cringle, 1990; Braun and Linsenmeier, 1995), tiene alto contenido de pigmentos, y tiene una alta tasa metabólica, que por ejemplo, durante la fagocitosis de los OS de los fotorreceptores origina altas concentraciones extracelulares de  $H_2O_2$  (Tate, Jr. et al., 1995). De todas formas, para subsistir al desafío de tales condiciones, la retina cuenta con mecanismos endógenos de protección.

### **2.1 Sistema antioxidante de la retina**

El daño fotoquímico en la retina dura toda la vida, por lo cual resulta esencial la existencia de mecanismos de protección en este tejido contra la formación de especies reactivas tóxicas. Tal protección está provista por enzimas como la superóxido dismutasa (SOD), catalasa, hemooxigenasa (HO), varias isoformas de la glutatión peroxidasa (GP), y fosfolipasa, y por antioxidantes no enzimáticos como las vitaminas E, A, y C, melanina, LUT, y ZEA (Beatty et al., 2000). La exposición de roedores a modelos de daño por luz ha revelado que varios genes que codifican enzimas antioxidantes son sobreexpresados en respuesta a dicho estrés, incluyendo HO (Kutty et al., 1995), tioredoxina (Tanito et al., 2002b) y GP (Ohira et al., 2003), y sugiriendo su participación en la neuroprotección.

### **2.2 Pigmento macular: zeaxantina y luteína**

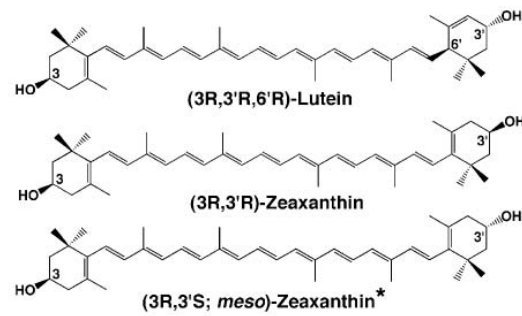
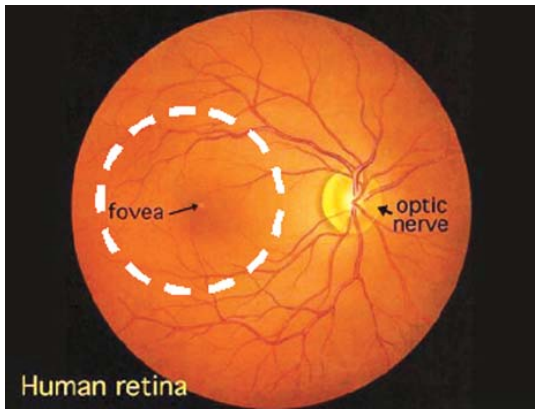
Sintetizados por plantas para coloración y absorción de energía lumínica, los carotenoides deben ser obtenidos exclusivamente de la dieta, ya que el cuerpo no los sintetiza (Mangels et al., 1993). Se dividen en dos clases: xantófilas y carotenos.

zeaxantina (ZEA) y luteína (LUT) son bioquímicamente distintas de otros carotenoides debido a la presencia de grupos hidroxilos localizados en las terminaciones de estas moléculas. De los cientos de carotenos encontrados en la naturaleza, solo 14 han sido detectados en suero, y de ellos, sólo ZEA y LUT, y sus metabolitos (**Ilustración 6**) se encuentran en el centro de la mácula, en la fovea, donde alcanzan concentraciones 1.000 veces mayores que en cualquier otro tejido (Landrum and Bone, 2001), lo que sugiere importantes roles funcionales de estos compuestos en el ojo (Bernstein et al., 2010; Handelman et al., 1988; Li et al., 2010). En la retina, ZEA y LUT tienen una distribución preferencial; mientras ZEA es más prevalente en el centro, LUT se concentra en la retina periférica (Bone et al., 1997). La presencia exclusiva de ZEA y LUT en la mácula podría explicarse por un comportamiento diferencial de estos compuestos en las membranas biológicas (Krinsky, 2002; Krinsky et al., 2003), como por ejemplo, alta solubilidad en membrana y una orientación y localización específicas de ZEA y LUT que maximicen su acción protectora en las membranas retinales (Subczynski et al., 2010). También, la unión selectiva de ZEA y LUT por lipoproteínas o apolipoproteínas del suero tendría un rol en la captura selectiva de estas xantófilas por parte de la retina (Loane et al., 2008). Trabajos previos han identificado y caracterizado una proteína que se une a ZEA en la mácula que aumenta la actividad antioxidante de ZEA (Bhosale et al., 2004; Bhosale and Bernstein, 2005). Más recientemente, también ha sido reportada la presencia de una proteína que se une a LUT en la mácula humana (Bhosale et al., 2009). Los roles protectores de ZEA y LUT en la retina han sido objeto de intenso estudio. Los pigmentos de la mácula son responsables de la absorción de la luz azul filtrada (Kirschfeld, 1982), previniendo la generación de ROS que pueden dañar los

fotorreceptores (Wooten and Hammond, 2002) y ejercen propiedades antioxidantes (Snodderly, 1995). Al reaccionar con radicales libres y ROS, los pigmentos maculares fueron postulados como protectores contra la peroxidación y el fotodaño en la retina (Edge et al., 1997; Krinsky, 1989), en parte gracias a la habilidad de extinguir estados singulete de oxígeno y estados triplete de moléculas fotoactivas (Cantrell et al., 2003). La localización de las xantófilas maculares en dominios ricos en lípidos insaturados para así ejercer su acción antioxidante es generalmente aceptada como un mecanismo que permite a ZEA y LUT proteger a la retina de enfermedades de la mácula asociadas a la edad. El ácido graso poliinsaturado DHA, localizado en estos dominios, es extremadamente sensible a la peroxidación lipídica, por lo que debe ser protegido (Wisniewska and Subczynski, 2006b). Además, la fotoactivación de rodopsina (también localizada en la región de la membrana constituida por lípidos mayoritariamente insaturados) da lugar a la isomerización de su cromóforo 11-*cis*-RAL a todo-*trans*-RAL. El todo-*trans*-RAL libre puede absorber luz y transferir energía desde su triplete excitado a oxígeno molecular (Delmelle, 1978). Dada la gran proximidad de las xantófilas, capaces de extinguir efectivamente estados triplete excitados de las moléculas, la transferencia de energía desde el todo-*trans*-RAL excitado a las xantófilas, previniendo así la generación de singuletes oxígeno proporcionaría un mecanismo protector (Kim et al., 2006). La masa insaturada en las membranas es fluída, de manera que las xantófilas pueden difundir rápidamente y enfrentar un gran número de especies reactivas (Subczynski et al., 2010). Como indica la **Ilustración 7**, el dominio de lípidos insaturados en la membrana retinal contiene rodopsina rodeada de lípidos insaturados y poliinsaturados, que durante la iluminación contribuyen a la mayor susceptibilidad de este dominio al daño oxidativo.

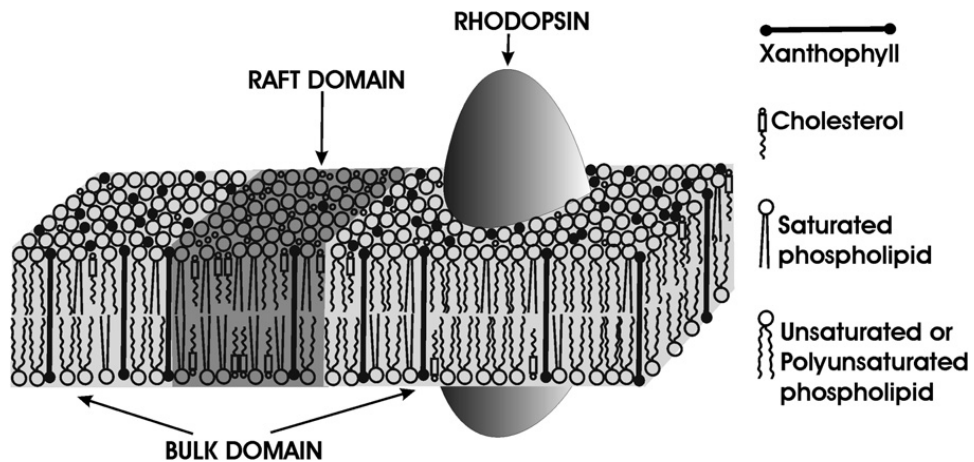


Así, la acumulación de xantófilas en este dominio lipídico constituye una directa estrategia de protección visual (Subczynski et al., 2010). Aunque convencionalmente se acepta al pigmento macular como neuroprotector, carecemos de evidencia directa de sus roles en los fotorreceptores de retina. Nuestros estudios en el capítulo I abordarán esa pregunta.



Li, Vachali, and Bernstein (2010). *Photochem Photobiol Sci* 9:1418-1425.

**Ilustración 6. Vista oftalmoscópica de la retina humana (izquierda) y estructura química de los principales pigmentos maculares (derecha).** El pigmento macular se concentra en los 500  $\mu\text{m}$  centrales en la mácula. La estructura química de los principales carotenoides en la mácula se muestra a la derecha.



Subczynski, Wisniewska, and Widomska (2010) *Arch Biochem Biophys* 504:61-66.

**Ilustración 7. Modelo de distribución de moléculas de xantófilas en la membrana de segmento externo de los fotorreceptores.**

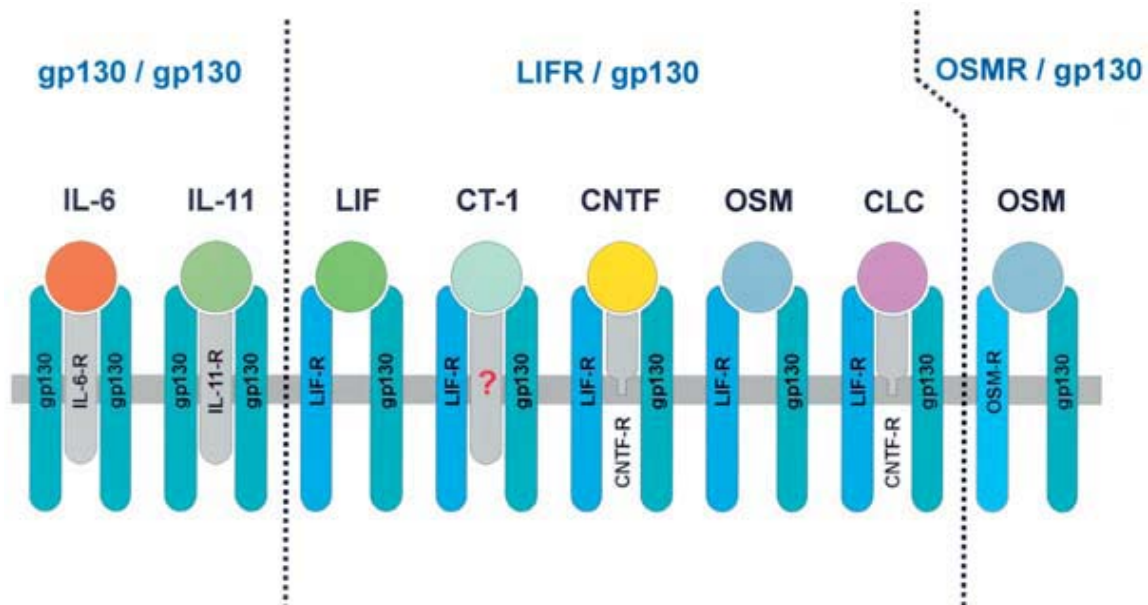
### 2.3 Citoquinas de la familia de Interleuquina-6 (IL-6) y receptor gp130

La familia IL-6 es un grupo de citoquinas proinflamatorias de aproximadamente 20 kDa, liberadas de manera endógena durante situaciones de estrés. Las citoquinas de esta familia comparten el receptor transductor de señal gp130 (**Ilustración 8**), y como consecuencia inducen actividades fisiológicas similares y solapadas. Estas citoquinas son: IL-6, IL-11, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor inhibidor de la leucemia (LIF), oncostatina M (OSM), cardiotrofina 1 (CT-1), y citoquina cardiotrofina-like (CLC) (Heinrich et al. 1998). El complejo receptor que reconoce la familia IL-6 se conforma de un receptor que no transduce señales, receptor  $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ , IL-11R $\alpha$ , and CNTFR $\alpha$ ) y un dímero de receptor de transducción de señales (Davis et al., 1991). Al unirse el ligando a su receptor, se forma el complejo receptor de transducción de señales. Dicho complejo puede estar conformado por un homodímero entre dos subunidades gp130 (Hibi et al., 1990), o un heterodímero entre gp130 y el receptor de LIF (LIFR) (Gearing et al., 1991), o un heterodímero entre gp130 y el receptor de OSM (OSMR) (Mosley et al., 1996). La activación de todos estos complejos de señalización es capaz de activar las Janus kinasas (Jaks) y de reclutar factores de transcripción de la familia de transductores de señales y activadores de la transducción (STAT) (Heinrich et al. 1998; Heinrich et al. 2003).

El componente receptor transductor de señales de la familia IL-6 (gp130, LIFR, y OSMR) está asociado con la familia de tirosinas kinasas Jak. La Jak kinasa se asocia a la membrana celular en la región proximal al receptor, y es activada rápidamente tras la unión de la citoquina ligando del receptor. Los miembros de la familia Jak: Jak1, Jak2, y Tyk2 se asocian con los receptores gp130, LIFR, y OSMR (Lutticken et al. 1994; Stahl et al. 1994; Radtke et al. 2002). De éstos, Jak1 parece ser el que juega el rol mayor mediando la señalización intracelular, dado que su inactivación perjudica

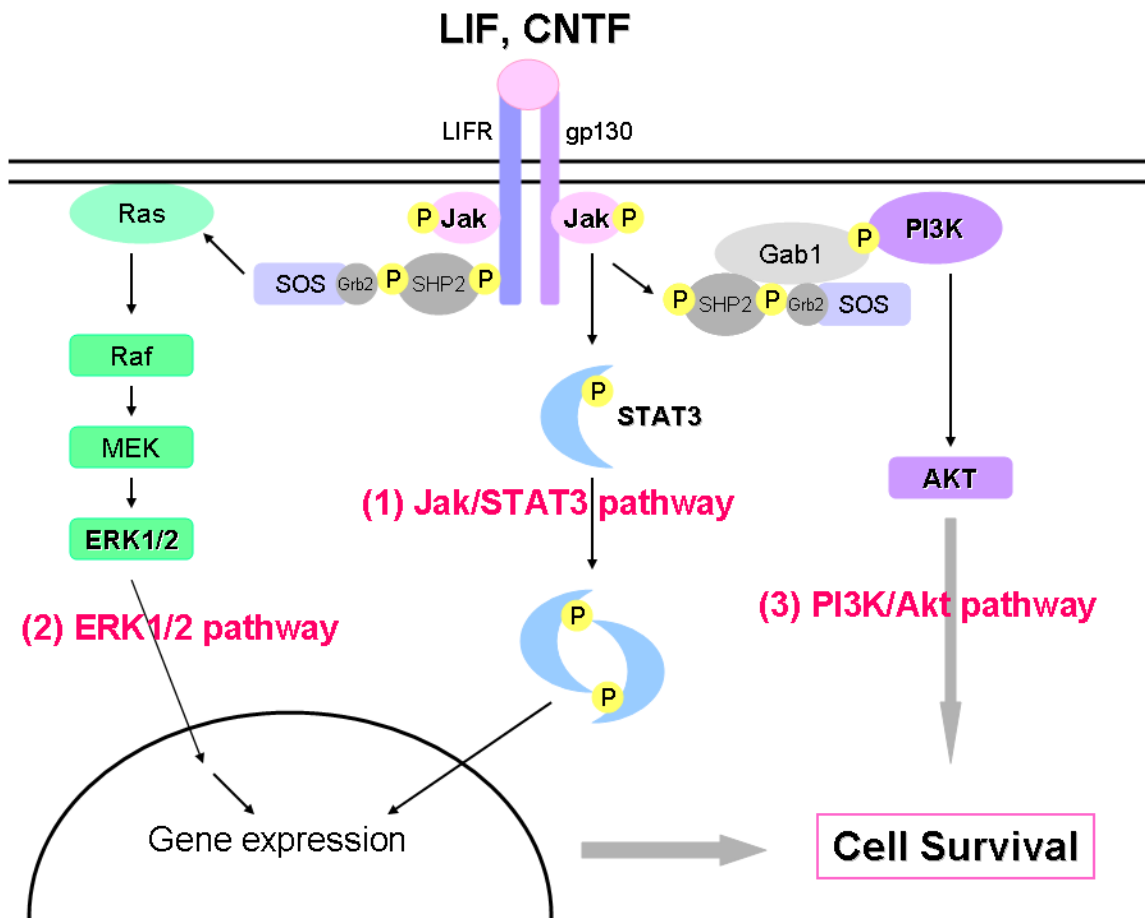
significativamente la respuesta celular a IL-6 (Guschin et al. 1995; Rodig et al. 1998). La fosforilación de residuos tirosina en la cola citoplasmática de gp130, LIFR, y OSMR recluta y activa las proteínas STAT (principalmente STAT3, y en menor medida STAT1) a través de interacciones entre fosfotirosinas en gp130 y dominios SH2 en STAT3 (Darnell, Jr. et al., 1994; Stahl et al., 1995). La subsecuente fosforilación de STAT induce la dimerización de STAT, translocación nuclear, y cambios en la expresión génica (Darnell, Jr., 1997).

En respuesta a la activación del receptor gp130 por ligandos de la familia de citoquinas IL-6, pueden ser activadas otras vías de supervivencia celular. Entre ellas se conocen la vía de señalización ERK1/2 (Schiemann et al., 1997; Gu et al., 1998), y la vía de señalización PI3/AKT (Heinrich et al., 2003), no descritas en este trabajo de tesis. En la **Ilustración 9** se muestran las vías de señalización conocidas activadas corriente abajo de la activación del receptor gp130.



Heinrich et al. (2003). *Biochem J* 374:1-20.

**Ilustración 8. Familia de citoquinas IL-6 y sus receptores.** La familia IL-6 de citoquinas usa diferentes combinaciones de receptores (gp130, LIFR, or OSMR), incluyendo el componente receptor obligatorio gp130.



Adaptado de *Heinrich et al. (2003). Biochem J 374:1-20.*

**Ilustración 9. Vías de señalización corriente abajo de la activación de gp130.** Hay 3 vías intracelulares de señalización conocidas. Estas son (1) Jak/STAT3, (2) ERK1/2, y (3) PI3K/Akt.

#### **2.4. Evidencia de protección retinal a través de la activación de gp130.**

La sobreexpresión de ligandos del receptor gp130 es parte de la respuesta endógena de la retina expuesta a estrés, tal como describiremos en la sección 2.3. Los roles neuroprotectores de gp130 activado por estas citoquinas en la retina han sido bien establecidos por trabajos realizados en distintos laboratorios. Se ha demostrado que el tratamiento con CNTF exógeno previene o retarda la muerte celular de fotorreceptores en modelos de daño por luz o debido a mutaciones genéticas en varias especies, incluyendo ratas (LaVail et al., 1992b), ratones (LaVail et al., 1998; Cayouette et al., 1998; Liang et al., 2001; Bok et al., 2002), perros (Tao et al., 2002), y gatos (Chong et al., 1999). El tratamiento con otra citoquina IL-6, CT-1, demostró promover la supervivencia de fotorreceptores en un modelo de degeneración retinal en rata (s344ter) (Song et al., 2003). La actividad neuroprotectora de CNTF en otros tipos de neuronas retinales ha sido también sólidamente demostrada. Por ejemplo, la aplicación de CNTF exógeno promovió la supervivencia de células ganglionares luego del corte del nervio óptico (van Adel et al., 2003; Leaver et al., 2006), luego de isquemia retinal (Unoki and LaVail, 1994), aplastamiento del nervio óptico (Leaver et al., 2006), y aumento de la presión ocular (Ji et al., 2004). Trabajos realizados en el laboratorio del Dr. Ash demostraron que inyecciones intravítreas de LIF protegen a los fotorreceptores de ratones expuestos subsecuentemente a niveles perjudiciales de luz, y correlacionaron esta protección con la activación de la vía de señalización gp130/STAT3 (Ueki et al., 2008). Recientemente, se demostró la expresión de CNTF, CT1, LIF, y OSM, sus receptores en células de RPE humano (Li et al., 2011). En este modelo, la activación de gp130 gatilló la activación de Jak/STAT3, sugiriendo que CNTF y la liberación de citoquinas podrían influenciar el

comportamiento del RPE *in vivo* al causar alteraciones en el volumen y composición química del espacio subretinal y alrededor de la membrana de Bruch, facilitando en última instancia la supervivencia y función de los fotorreceptores.

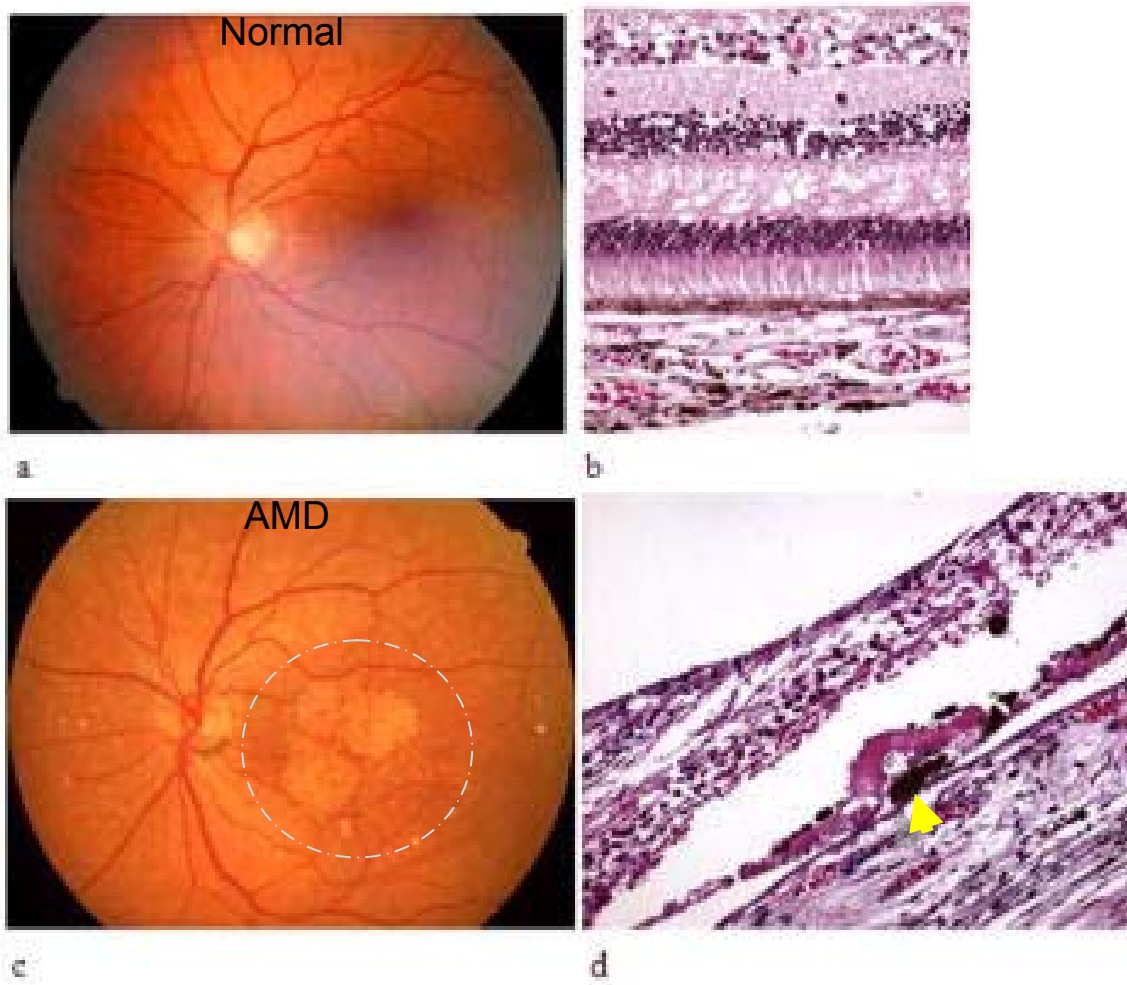
### **3. Degeneraciones de la retina y modelos para estudiar neuroprotección**

#### **3.1. Degeneración de la mácula asociada a la edad (AMD) y enfermedad de Stargardt (SD)**

La AMD es una enfermedad progresiva que abarca un amplio espectro de hallazgos clínicos y afecta primariamente a la región central (macular) de la retina (Ambati et al., 2003; Bressler et al., 1988). Las manifestaciones tempranas de AMD incluyen la aparición de acumulaciones de restos acelulares (debris) en la membrana basal del RPE, y anomalías pigmentarias en la región macular (**Ilustración 10**). Aunque en la mácula envejecida pueden comúnmente observarse pequeñas drusas, la presencia de grandes drusas es considerada diagnóstica de AMD (Bird et al., 1995). Los estadios tardíos de AMD son típicamente agrupados en dos formas: (1) Forma “seca” o “atrofia geográfica” (GA), con pérdida de RPE y fotorreceptores y disminuída función retinal, y (2) forma exudativa “húmeda”, asociada con la formación de neovascularización coroidal (CNV), que conduce a hemorragias subretinales o subRPE, fluído subretinal, edema macular, y eventualmente cicatrización fibrótica. El estrés oxidativo y los procesos mediados por inmunidad se cree contribuyen a la patogénesis de AMD (Ambati et al., 2003; Crabb et al., 2002; Johnson et al., 2002).



La SD se caracteriza por el rápido desencadenamiento de la pérdida de visión central y atrofia progresiva del RPE que cubre la mácula. Una característica de esta enfermedad es la presencia de motas amarillo-blancuzcas alrededor de la mácula y en la periferia de la retina al nivel de las células del RPE. Mediante análisis inmunohistoquímico de ojos de pacientes donantes se demostró una pérdida significativa de fotorreceptores, y excesiva acumulación de depósitos de lipofucsina en el RPE (Birnbach et al., 1994; Steinmetz et al., 1991). Estos depósitos están compuestos por una mezcla heterogénea de lípidos oxidados, bisretinoides, y otros compuestos derivados de la fagocitosis incompleta de OS de los fotorreceptores por el RPE (Delori et al., 1995; Eldred and Lasky, 1993). La acumulación de A2E contribuye a la formación de lipofucsina en el RPE en un proceso gatillado por la exposición a la luz, que eventualmente conduce a la disfunción y muerte celular (Weleber, 2005), y ha sido ligado a ambas, AMD y SD. Entre otros, el desarrollo de AMD ha sido correlacionado con la depleción dietaria a largo plazo de los pigmentos maculares ZEA y LUT, que al absorber longitudes de onda de la luz azul contribuyen a disminuir la acumulación de A2E encontrada en la lipofucsina (Lim et al., 1992). La inhibición de la enzima RPE65 con el empleo de derivados retinoides (Radu et al., 2003), y con compuestos no retinoides (Kubota et al., 2011; Mandal et al., 2011) es efectiva para disminuir la acumulación de A2E, y es postulada como una posible intervención terapéutica para tratar AMD y SD. En el capítulo IV discutiremos el novedoso efecto de la vía de señalización gp130/STAT3 en la inhibición de la expresión y actividad de RPE65, como potencial contribución al tratamiento de AMD y SD.



Adaptado de Ramkumar, Zhang , and Chan (2010). *Prog Retin Eye Res* 29:169-190.

**Ilustración 10. Hallazgos fundoscópicos e histológicos en ojos de donantes con AMD.**

a) Fundus humano normal, b) micrografía mostrando histología humana de la mácula normal, c) Fundus de paciente con AMD “seco”, con drusa y cicatriz en la mácula (ver área delineada con puntos), d) micrografía mostrando histología humana de la mácula con AMD “seco”(ver drusa señalada con flecha amarilla).

### 3.2. Daño por luz y estrés oxidativo

Como fuera expuesto por Wu y colaboradores, “ La luz es necesaria para la visión pero puede dañar el órgano de la vista”(Wu et al., 2006). La exposición de animales a niveles de luz perjudiciales, referidos como daño por luz (LD), ha sido un modelo útil para estudiar mecanismos de degeneración de los fotorreceptores y para evaluar la eficacia de potenciales factores terapéuticos *in vivo*. Noell y colaboradores descubrieron que exponiendo ratas a condiciones de iluminación constante, ésta causaba una muerte extensiva de fotorreceptores, acompañada de degeneración del RPE y pérdida irreversible o ausencia de respuesta electroretinográfica (Noell et al., 1966). El LD es mediado, al menos en parte, por el pigmento visual en conos y bastones (Gorn and Kuwabara, 1967;Noell et al., 1966), y el grado de daño retinal se correlaciona con el contenido de rodopsina previo a la exposición a la luz (Noell and Albrecht, 1971;Organisciak and Noell, 1977). El daño fotoquímico disminuye cuando el ciclo visual es inhibido, por ejemplo con el anestésico halotano o ácido 13-*cis*-retinoico, y cuando la tasa de regeneración de rodopsina ha sido reducida por la depleción casi completa de DHA, o por la falta de la proteína RPE65 (Bush et al., 1991;Keller et al., 2001;Sieving et al., 2001).

El estrés oxidativo es un candidato probable en la patogénesis del daño retinal inducido por luz, ya que dicho daño puede ser reducido o evitado con el uso de varios tipos de antioxidantes (Organisciak et al., 1985;Ranchon et al., 2003a). Varias líneas de evidencia sugieren que el estrés oxidativo gatilla la modificación de proteínas retinales, y

que los productos de oxidación están implicados en la pérdida patológica de fotorreceptores.

Las especies reactivas del oxígeno generan una variedad de modificaciones en los residuos de aminoácidos, como cisteína, metionina, triptófano, arginina, lisina, prolina e histidina (Levine, 1983; Stadtman and Berlett, 1991). El aumento de inmunorreactividad de proteínas carboniladas ha sido reportado en varios modelos, por ejemplo en glaucoma inducido por presión ocular crónica (Tezel et al., 2005). En ratas inyectadas con el oxidante paraquat, fue reportado un significativo incremento en el contenido de carbonilos en la coroides y la retina (Cingolani et al., 2006). Otra modificación en proteínas cuando las células son enfrentadas a un ambiente altamente oxidante es la nitración de residuos tirosina en proteínas (Haddad et al., 1994). En ratas expuestas a la luz (Miyagi et al., 2002), fue identificada la presencia de nitrotirosinas modificadas, las cuales aumentan con el radical libre gaseoso óxido nítrico (NO), que es una molécula precursora de agentes nitrantes como el peroxinitrito. Estudios sugieren que el NO es mediador de la degeneración de los fotorreceptores inducida por luz. La óxido nítrico sintetasa inducida (iNOS), que no se expresa constitutivamente, pero es inducida en respuesta a condiciones de estrés desafiantes, conduce a la producción de grandes cantidades de NO citotóxico (Bredt and Snyder, 1994). El tratamiento de las ratas con inhibidores de NOS parcialmente las protege contra la pérdida de fotorreceptores inducida por luz (Goureau et al., 1993), lo cual es una indicación de la implicación de esta enzima en la patogénesis asociada a la exposición a luz brillante.

Además de mecanismos primarios de modificaciones oxidativas, las proteínas también pueden ser modificadas por procesos oxidativos vía mecanismos secundarios,

resultantes de reacciones con radicales libres de otros constituyentes celulares como lípidos, carbohidratos, y ácidos nucleicos (Grune and Davies, 2003). Un producto principal de la peroxidación lipídica, asociado con citotoxicidad y mutagénesis es el hidroxinonenal (HNE), que reacciona con residuos histidilo, lisilos, o cisteinilos de las proteínas para formar aductos de Michael estables (Uchida and Stadtman, 1992). HNE es el marcador más confiable de peroxidación lipídica (Toyokuni et al., 1994). En retinas de ratas expuestas a la luz, se han detectado modificaciones por 4-HNE y por 4-hidroxihexenal (Tanito et al., 2005). Se cree que el grado de oxidación proteica causada por agentes oxidantes depende de muchos factores, incluyendo la naturaleza, localización, y tasa de flujo del oxidante, y de la presencia (o ausencia) de antioxidantes (Grune and Davies, 2003).

Además de las proteínas, los ácidos nucleicos también son “blanco” de modificaciones oxidativas (Pluskota-Karwatka, 2008). El principal producto de modificación en bases de DNA es la 8-hydroxi-deoxiguanosina (8-OHdG), inducido por el radical hidroxilo, el singlete oxígeno, o la acción fotodinámica (Shibutani et al., 1991a) y es un marcador establecido de oxidación de DNA inducida por el estrés oxidativo (Toyokuni et al., 1997; Toyokuni et al., 1999). Tanto el envejecimiento, como la exposición a luz brillante, inducen incrementos en OHdG (Organisciak et al., 1999; Tanito et al., 2002a).

Como ha sido descrito en esta sección, existen abundantes evidencias sobre modelos de daño con luz que reproducen los procesos inducidos por el estrés oxidativo, un denominador común en la patogénesis de las enfermedades neurodegenerativas de la retina. En la búsqueda de tratamientos potenciales para la enfermedad, se han evaluado las

propiedades protectoras de una variedad de factores y tratamientos usando variaciones de modelos de LD, como reseñaremos a continuación.

### **3.3. Modelo de preconditionamiento por luz: buscando mecanismos endógenos de neuroprotección**

A partir de los estudios pioneros de Noell, se sugirió que la susceptibilidad de los animales sometidos a niveles perjudiciales de luz es dramáticamente afectada por varios factores, tales como la edad (O'Steen et al., 1974; Penn et al., 1985), dieta (Noell et al., 1971), temperatura corporal (Barbe et al., 1988; Noell et al., 1966), genotipo (LaVail et al., 1987), e “historia de exposición a luz” (Li et al., 2001; Li et al., 2003; Penn et al., 1987). En 1971, Noell y Albrecht observaron que las retinas de ratas criadas en la oscuridad eran dañadas más severamente que aquellas criadas bajo ciclos de 12hs/12hs de luz/oscuridad (Noell et al., 1971). Esto sugiere un estado de “adaptación celular” a la luz cíclica como mayor contribuyente a la protección contra el daño inducido por la luz.

La protección inducida por preconditionamiento ha sido definida como una respuesta protectora generada por niveles subletales de estrés que pueden proteger células o tejidos de un subsecuente nivel de estrés mucho mayor que de otra manera sería letal. En apoyo a las observaciones de Noell y Albrecht acerca de las susceptibilidades diferenciales al daño por luz, Penn y colaboradores (Penn et al., 1987) ofrecieron la primera evidencia de protección retinal por preconditionamiento inducido por luz, cuando reportaron que ratas albinas criadas en luz cíclica estaban protegidas de la degeneración inducida por luz brillante, mientras que ratas nacidas y criadas bajo luz tenue no lo estaban.

Entre las diferencias entre las ratas criadas en condiciones de luz brillante versus luz tenue, Penn encontró niveles aumentados de vitaminas antioxidantes C y E,

enzimas GSH, GSH S-transferasa, GSH peroxidasa, y GSH reductasa, en las retinas de las primeras. Observaciones adicionales por Penn y colegas (Penn and Williams, 1986; Penn and Anderson, 1987) demostraron que los contenidos de DHA, el ácido graso mayoritario en los OS de los fotorreceptores, estaban dramáticamente disminuídos en los fotorreceptores de ratas criadas en condiciones de luz cíclica, y que tanto la rodopsina, como la densidad de empaquetamiento de rodopsina en las bicapas lipídicas estaban reducidas. Además, observaron cambios significativos en la morfología de los fotorreceptores expuestos a luz cíclica, como el acortamiento y desorganización de los OS. Estas observaciones pueden al menos parcialmente, explicarse con la teoría de la “fotostásis”, fenómeno descrito por Penn y Williams (Penn and Williams, 1986) como un mecanismo de adaptación morfológica y bioquímica de los fotorreceptores para mantener una captura diaria de fotones constante en respuesta a cambios de iluminación ambiental. La susceptibilidad al daño inducido por luz podría estar asociada a los niveles funcionales del fopigmento rodopsina. Esto podría, tal vez, explicar parcialmente el efecto protector del acondicionamiento por la reducción del contenido de rodopsina.

La plasticidad de la retina a los cambios en intensidades de luz cíclica en el ambiente fue observada además cuando ratas adultas fueron cambiadas de intensidades de luz tenue a intensidades más brillantes (Li et al., 2001). En este paradigma de acondicionamiento, las retinas de ratas albinas expuestas a 800 luxes por una semana estuvieron protegidas funcional y morfológicamente contra los efectos deletéreos de la subsecuente exposición a iluminación brillante constante (1 a 7 días a 1.500 luxes).

El efecto protector del acondicionamiento contra el LD fue atribuído a la liberación de factores neurotróficos durante este tratamiento (Liu et al., 1998a). De acuerdo con la

hipótesis de que la retina en respuesta al daño por daño con luz o debido a estrés genético (Gao and Hollyfield, 1995;Gao and Hollyfield, 1996;LaVail et al., 1992a;Rhee et al., 2007;Wen et al., 1995a;Wen et al., 1998) regula positivamente la expresión de factores neurotróficos, como bFGF y CNTF para protegerse, Liu y colaboradores encontraron que ratas albinas bajo períodos cíclicos de luz brillante seguidos por una “fase de descanso” en luz cíclica normal, presentaron una notable resistencia al daño por luz, e indujeron la expresión prolongada de bFGF y CNTF en la retina. La evidencia experimental mostrada en ratas también fue reproducida en ratones albinos (Kaldi et al., 2003), un modelo más ventajoso para identificar factores endógenos regulados en forma positiva o negativa por la luz ambiental. Trabajos realizados en diferentes laboratorios identificaron en ratones, que las citoquinas de la familia IL-6, como LIF, OSM, CT1 y CLC son regulados positivamente durante el preconditionamiento por luz cíclica (Burgi et al., 2009;Chollangi et al., 2009). Estos factores han sido implicados como parte de la respuesta de supervivencia endógena en contra del daño, ya que cuando son administrados exógenamente, CNTF, LIF o bFGF, sin preconditionamiento previo, protegen del daño por luz (Faktorovich et al., 1992;LaVail et al., 1992a;Ueki et al., 2008).

Excepto el FGF2, los factores mencionados anteriormente señalizan a través de la heterodimerización del receptor de LIF (LIFR) y la glicoproteína 130 (gp130), como ha sido descrito previamente en este capítulo. Estos ligandos y sus receptores son funcionales en la retina (Sherry et al., 2005;Wen et al., 1998), al igual que en cualquier otra parte del sistema nervioso. Trabajo realizados por el grupo del Dr. Ash, demostraron que LIF induce su efecto neuroprotector a través de la vía de transducción de señales



gp130/STAT3 y que éste es parte del mecanismo de protección inducido por el preconditionamiento por luz (Chollangi et al., 2009; Ueki et al., 2008; Ueki et al., 2009). El bloqueo de la activación del complejo LIFR:gp130, mediante el tratamiento de ratones con una versión mutante de la molécula LIF, previo a la exposición al preconditionamiento, condujo a la pérdida de protección morfológica y funcional de la retina preconditionada y expuesta después al LD. Acompañando este efecto, se observó fosforilación (activación) reducida de STAT3 (Chollangi et al., 2009), el “blanco” de la activación “corriente abajo” de la activación de gp130. El rol del receptor gp130 como mediador de la protección de los fotorreceptores inducida por preconditionamiento ha sido demostrado en modelos de ratón knock-out con delección de gp130 específica en fotorreceptores (Ueki et al., 2009). Dicho estudio mostró que la activación de gp130, intrínseca a los fotorreceptores, es requerida para prevenir la muerte celular de estas neuronas en situaciones de daño agudo por luz o de daño por estrés genético, sugiriendo que gp130 es esencial para prevenir o retardar la muerte celular en el escenario de enfermedades neurodegenerativas o daños crónicos.

Dado que las citoquinas de la familia IL-6, por ejemplo LIF, son sobreexpresadas en la retina preconditionada y que su receptor, gp130, es crítico para el efecto de protección de los fotorreceptores contra el daño inducido por luz, es probable que la vía gp130/STAT3 sea uno de los principales componentes de los mecanismos implicados en este tipo de protección. La observación de que bloqueando el receptor de LIF se elimina el efecto protector del preconditionamiento, sugiere que LIF es una citoquina esencial en la regulación de los mecanismos endógenos de supervivencia neuronal. En apoyo de este rol, ratones transgénicos que carecen de expresión de la citoquina LIF mostraron una

acelerada degeneración retinal debido a estrés mutacional, y falta de activación de STAT3 (Joly et al., 2008b).

Aunque resulta claro que la activación del receptor gp130 y la concomitante activación de STAT3 son componentes importantes de la respuesta endógena inducida por bajos niveles de estrés por luz, se requiere también identificar cuáles son los genes cuya transcripción es regulada por STAT3 en este modelo, y cuáles son los efectores directos que median esta protección endógena. En el capítulo III, discutiremos la prevención de la oxidación de DNA en fotorreceptores como mecanismo de protección inducido por el preconditionamiento por luz.

### **3.4 Modelos *in vitro* de neurodegeneración y neuroprotección**

Las neurotoxinas son las herramientas más extensamente aceptadas para reproducir experimentalmente modelos de enfermedades neurodegenerativas *in vitro*. Los agentes más comúnmente aceptados incluyen el 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina, 6-hidroxi-dopamina, rotenona, y paraquat (PQ) (Bove et al., 2005). Entre estos agentes, el PQ, derivado biperidilo usado como herbicida, es conocido también por ejercer efectos tóxicos vía estrés oxidativo, dada su capacidad de incrementar la producción de especies oxígeno reactivas (ROS) (Lu et al., 2006). El hecho de que PQ causara daño cerebral en individuos expuestos a dosis letales de este herbicida (Grant et al., 1980; Hughes, 1988), condujo al creciente interés en las acciones neurotóxicas del PQ. Por lo tanto, en los últimos años, PQ ha sido ampliamente usado como modelo para estudiar la etiología de enfermedades neurológicas, tales como el mal de Parkinson (Castello et al., 2007; Di Monte, 2003).

El metabolismo oxidativo, la reducción de oxígeno molecular a agua en la mitocondria para producir ATP, resulta en la producción de radicales superóxido que generan otros ROS, tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). Concentraciones de  $H_2O_2$  por encima de los niveles fisiológicos pueden causar daño mitocondrial, y “escapar” al citosol dañando otras organelas (Ames et al., 1995). Dado que la producción desequilibrada de  $H_2O_2$  o radicales hidroxilo observada en las condiciones patológicas *in vivo* puede ser imitada por el tratamiento de células en cultivo con agentes oxidantes como el PQ o  $H_2O_2$ , el desarrollo de modelos de cultivos celulares ha resultado una atractiva estrategia para estudiar vías de degeneración, como también los efectos protectores de una variedad de compuestos (Cantu et al., 2011; Gelinas et al., 2004; Lu et al., 2006; McCarthy et al., 2004; Rotstein et al., 2003). Particularmente en cultivos puros de fotorreceptores, la Dra. Rotstein y colaboradores (Rotstein et al., 2003) encontraron que el DHA protegió estas neuronas contra concentraciones letales de PQ, ofreciendo un modelo para ulteriores investigaciones sobre mecanismos de neuroprotección de otros compuestos contra el daño oxidativo. En los capítulos I y II mostraremos el uso de modelos *in vitro* para evaluar los roles protectores directos de los pigmentos maculares ZEA y LUT, y de la neurocitoquina LIF, respectivamente sobre fotorreceptores aislados de retina, expuestos a daño oxidativo inducido por los agentes  $H_2O_2$  y/o PQ.

# **Capítulo I**

## **La luteína y zeaxantina protegen contra la apoptosis inducida por el estrés oxidativo en los fotorreceptores de retina**

## INTRODUCCIÓN

La degeneración de la mácula asociada a la edad (AMD) es la causa líder de pérdida irreversible de la visión y ceguera en la población de edad avanzada del mundo occidental (Congdon et al., 2004;Friedman et al., 2004). En esta degeneración multifactorial, la pérdida de la agudeza visual podría surgir en definitiva de la muerte del epitelio pigmentado de la retina (RPE), conos, o de neovascularización coroidal en la fóvea. La fóvea es un área en la mácula altamente enriquecida en conos; el denso empaquetamiento y la pequeña apertura de los fotorreceptores en la fóvea proveen alta resolución espacial a la visión (Eckmiller, 2004). De todas formas, los cambios patológicos atróficos iniciales en AMD parecen afectar la función de los bastones que circundan la fóvea (Curcio et al., 1996), por lo que la disfunción de los bastones ha sido reportada antes que cualquier degeneración anatómica notable o muerte celular (Adler et al., 1999). Las intervenciones terapéuticas para la AMD se han centrado en la neovascularización coroidal (CNV), que caracteriza al 90% de los casos de ceguera por AMD. Sin embargo, la prevención de la muerte de los fotorreceptores es esencial para disminuir o evitar la progresión de AMD hacia la atrofia geográfica de fotorreceptores, RPE, y la CNV asociada.

El estrés oxidativo es aceptado como un factor patogénico principal para AMD (Beatty et al., 1999a), ya que en el ojo envejecido, la batería de sistemas de defensa y reparación necesarios para operar en respuesta al estrés metabólico y ambiental crónicos está sensiblemente reducida (Beatty et al., 2000;Winkler et al., 1999). La retina es particularmente susceptible al daño oxidativo dado su alto consumo de O<sub>2</sub> y su constante

exposición a la luz. La exposición a luz y estrés oxidativo induce la muerte de de fotorreceptores *in vitro* (Rotstein et al., 2003;Wiegand et al., 1983); este proceso es acompañado por un incremento en los niveles de especies oxígeno reactivas (ROS) y es disminuído por el uso de antioxidantes (Carmody et al., 1999). En este contexto, el Age-Related Eye Disease Study (AREDS), ha demostrado la eficacia de suplementación con vitaminas (Beatty et al., 1999b) y minerales con propiedades antioxidantes en prevenir la progression de AMD en pacientes con grandes drusas, atrofia geográfica (GA), o CNV (Chew et al., 2009).

Varios sistemas de defensa y reparación podrían ser modulados por moléculas que se concentren en la retina, como el DHA. Este ácido graso poliinsaturado (PUFA) *n-3* es el principal componente estructural de los fotorreceptores, y también actúa como ligando de receptore nucleares de hormonas afectando la transcripción de genes sensores del estado redox (de Urquiza et al., 2000;Lin et al., 1999), y como precursor de un número de potentes autocoides (Serhan and Savill, 2005). Las evidencias disponibles actualmente sugieren que DHA tiene un rol protector contra las patologías vasculares y retinales asociadas a isquemia, luz, oxígeno, inflamación, y a la edad (Fliesler and Anderson, 1983;Sangiovanni and Chew, 2005). Los primeros estudios mecanísticos que dilucidaron las vías moleculares a través de las cuales el DHA efectúa su rol protector contra en estrés oxidativo en fotorreceptores fueron reportados por German y colaboradores (German et al., 2006b;German et al., 2006a;Rotstein et al., 2003). Por su parte, el trabajo epidemiológico de AREDS (Sangiovanni et al., 2007a) contribuyó a establecer un conjunto de evidencias (Cho et al., 2001;Seddon et al., 2001;Seddon et al., 2003) apoyando el rol protector putativo de DHA en AMD avanzada. En AREDS tambien se

observó la protección contra GA y CNV con los pigmentos maculares de origen dietario: luteína (LUT) y zeaxantina (ZEA) (Sangiovanni et al., 2007b).

LUT and ZEA son carotenoides oxigenados (xantófilas) presentes en el pigmento macular (Krinsky et al., 2003; Landrum and Bone, 2001). En primates, las concentraciones más altas de estos compuestos en el cuerpo existen en la retina central, con mayor densidad en la fovea. Las xantófilas maculares podrían actuar como componentes de complejos proteína-carotenoide (Demmig-Adams and Adams, III, 2002), cromóforos que absorben y atenúan radiaciones de longitud de onda corta capaces de generar ROS (Krinsky et al., 2003), moduladores del balance reducción-oxidación (Krinsky, 2002; Krinsky and Yeum, 2003); y componentes clave en cascadas de transducción de señales (Demmig-Adams and Adams, III, 2002). Tanto la LUT como la ZEA han sido implicados como factores claves en las rutas de reciclado de vitaminas E y C oxidadas (Mortensen et al., 2001). Aunque no es constituyente del tejido retinal,  $\beta$ -caroteno (BC), un carotenoide provitamina, es también un eficiente antioxidante fisiológico y fue incluido en la formulación original de AREDS (Chew et al., 2009). En este trabajo, hemos investigado si LUT, ZEA, y BC tienen efectos directos en la neuroprotección de fotorreceptores de retina. Usando neuronas de retina en cultivo, hemos evaluado si estos carotenoides protegen a los fotorreceptores contra el estrés oxidativo, y si esta protección es sinérgica con la del DHA. Usamos dos tipos de agentes oxidantes, paraquat (methyl viologen dichloride hydrate) y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), dado que se ha demostrado que diferentes tipos de estrés afectan de diferentes maneras la supervivencia celular y la protección antioxidante (Lu et al., 2006). Paraquat (PQ) induce la generación de aniones superóxido y promueve la apoptosis de

fotorreceptores (Rotstein et al., 2003). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es por sí mismo una ROS, ampliamente usado para inducir estrés oxidativo en distintos tipos celulares (Hoyt et al., 1997; Lu et al., 2006; Takeyama et al., 2002; Tate, Jr. et al., 1999). Nuestros resultados demuestran un rol protector directo de ZEA y LUT sobre los fotorreceptores; estas xantófilas no sólo previnieron el estrés oxidativo, sino también promovieron la diferenciación de los fotorreceptores.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Materiales**

Se usaron ratas Albino Wistar criadas en nuestra colonia en todos los experimentos. Todos los procedimientos relacionados con animales fueron realizados de acuerdo a la Declaración ARVO para el Uso de Animales Investigación en Oftalmología y Visión (Statement for the Use of Animales in Ophthalmic and Vision Research). Las cápsulas plásticas de cultivo (35-mm de diámetro) (NUNC) fueron compradas a Inter Med. El medio Dulbecco's Eagle's (DME) (GIBCO) fue adquirido de Life Technologies. La albúmina bovina sérica (Fracción V; libre de ácidos grasos; bajas endotoxinas, testada para cultivo de tejidos), dicloruro paraquat (methyl viologen, 1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridinium dichloride, PQ), poli-DL-ornitina, tripsina, inhibidor de tripsina, transferrina, hidrocortisona, putrescina, insulina, , selenio, gentamicina, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), anticuerpo monoclonal anti-sintaxina HPC-1, ácido docosaheptaenoico, yoduro de propidio, paraformaldehído y todo-*trans* β-caroteno (tipo IV, >95% pureza) provinieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). El kit de amplificación de señal de Tiramida fue de NEN (Boston, MA). El anticuerpo secundario



conjugado con *Alexa 488* cabra anti-ratón, MitoTracKer Red CMXRos, Anexina V conjugada Fluor-488 V, la enzima Deoxinucleotidil Transferasa Terminal recombinante (TdT), TdT-buffer, 5-bromo-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (BrdUTP) fueron de Molecular Probes, Invitrogen (Argentina). Tween 20 fue de USB Corp. (Cleveland, OH). En anticuerpo primario monoclonal anti-Bromodeoxiuridina (anti BrdUrd) fue de DSHB (desarrollado bajo el auspicio del NICHD y mantenido por la Universidad Iowa). El anticuerpo policlonal de conejo contra citocromo c fue de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). El anticuerpo monoclonal contra rodopsina, Rho4D2 fue generosamente provisto por el Dr. R. Molday (Universidad de British Columbia, Canadá). La luteína y zeaxantina fueron de Indofine Chemical Co. (Hillsborough, NJ). El peróxido de hidrógeno 30% fue de Baker, Argentina. Los solventes fueron de grado HPLC y demás reactivos de grado analítico.

### **Cultivos neuronales**

Los cultivos purificados de neuronas de retina de rata fueron preparados como se describiera previamente (Politi et al., 1996; Rotstein et al., 1996; Rotstein et al., 1997). En breve, se disecaron retinas de rata de 2 días de edad y se disociaron por digestión con tripsina seguida de disociación mecánica. Luego, las células fueron resuspendidas en un medio químicamente definido, carente de factores tróficos específicos requeridos por las células fotorreceptoras. Se sembraron alrededor de  $1-1.2 \times 10^6$  células por cápsula (35-mm de diámetro), previo tratamiento de la cápsula con poliornitina y medio condicionado de Schwannoma (Adler, 1982). Los cultivos fueron incubados a 36 °C en una atmósfera humidificada de 5% de CO<sub>2</sub>. En el cultivo, los fotorreceptores y neuronas amacrinas fueron los tipos celulares mayoritarios. Los fotorreceptores en estos cultivos tienen un

cuerpo celular pequeño redondeado de 5-8  $\mu\text{m}$  de diámetro, con axón único en uno de sus extremos que usualmente finaliza en una “esférula” sináptica conspicua. A veces también muestran un cilio conector en el extremo opuesto pero no desarrollan el segmento externo característico, y la opsina está difusamente distribuida sobre el cuerpo celular, usualmente más oscuro que el de las neuronas amacrinas. Para identificar células como fotorreceptores, deben cumplir al menos tres de los criterios mencionados anteriormente. Las neuronas amacrinas son más grandes que los fotorreceptores (8-20  $\mu\text{m}$ ) y tienen múltiples neuritas (**Ilustración 11**).

#### **Agregado de los carotenoides**

ZEA, LUT and BC, preparados en una solución de 0.05% Tween fueron agregados a los cultivos inmediatamente luego de sembrar las células. Se realizaron curvas dosis-respuesta para los tres carotenoides, evaluando los efectos de concentraciones en aumento de estos compuestos en la apoptosis de los fotorreceptores (**Figura 4**). Las concentraciones finales elegidas fueron 170, 140 y 80 nM para ZEA, LUT y BC, respectivamente. Los cultivos control fueron tratados con o sin el mismo volumen de solución 0.05% Tween, que no tuvo ningún efecto en la apoptosis neuronal.

#### **Agregado de ácido docosahexaenoico**

El DHA, a una concentración final de a 6.7  $\mu\text{M}$  en el cultivo, se agregó al día 1 en cultivo, en un complejo con albúmina sérica bovina (BSA), en una relación molar in 2:1 (DHA: BSA) (Rotstein et al., 1996). El mismo volumen y concentración de BSA fue agregado simultáneamente a cultivos control. Las concentraciones de DHA por debajo de 2  $\mu\text{M}$  o por encima de 10  $\mu\text{M}$  no mostraron efectos protectores e indujeron muerte celular, respectivamente (Rotstein et al., 1996).

### **Tratamiento con Paraquat**

El PQ (concentración final de 48  $\mu\text{M}$  en el medio de incubación), preparado en una solución libre de calcio y magnesio fue agregado a cultivos de 3 días *in vitro* (Rotstein et al., 2003). Las neuronas fueron incubadas por 24 hs antes de ser fijadas.

### **Tratamiento con $\text{H}_2\text{O}_2$**

El tratamiento de los cultivos con  $\text{H}_2\text{O}_2$  fue hecho de acuerdo a Cookson y colaboradores (Cookson et al., 1998), con ligeras modificaciones. Brevemente, se removió 1 ml de medio neuronal de cápsulas de cultivos de 3 días y se agregaron diferentes volúmenes de una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  de manera de obtener concentraciones finales en un rango de 1  $\mu\text{M}$ -1.0 mM. Los cultivos fueron incubados por 30 min a 36°C, se removió el medio, y se reemplazó por 2ml de medio neuronal fresco, y los cultivos se devolvieron al incubador por 8 hs antes de ser fijados. Una concentración final de 10  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  fue elegida para los siguientes experimentos; concentraciones menores tuvieron efectos insignificantes en la apoptosis, y concentraciones mayores afectaron la reproducibilidad de los experimentos.

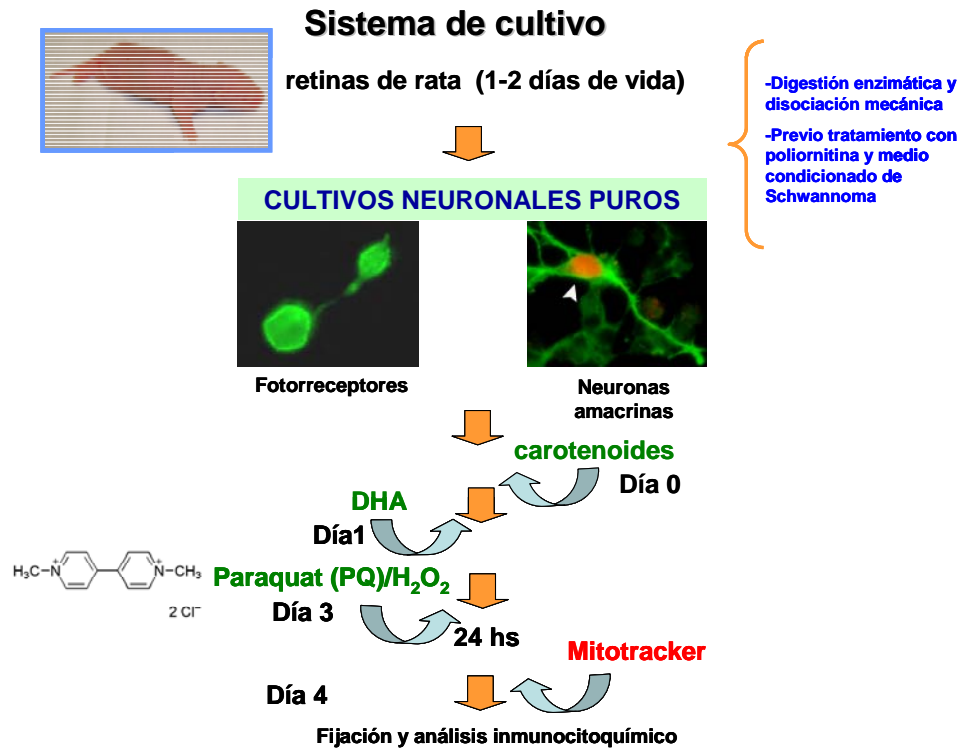


Ilustración 11. Representación esquemática del procedimiento para obtener cultivos puros de retina de rata y pasos experimentales (descrito en Materiales y Métodos)

### **Métodos inmunohistoquímicos**

Las neuronas fueron fijadas en 2% paraformaldehído (PF) en buffer fosfato salino (PBS) durante 15 min, usualmente seguido por permeabilización con usually followed by permeation (0.1 % en PBS). Los distintos tipos neuronales fueron identificados por inmunocitoquímica, usando anticuerpos monoclonales anti-sintaxina (HPC-1) y anti-rodopsina (Rho4D2), que selectivamente reaccionan selectivamente con las neuronas amacrinias y fotorreceptoras respectivamente (Barnstable, 1980; Hicks and Barnstable, 1987; Kljavin et al., 1994), y por sus características morfológicas usando microscopía de contraste de fase. El anticuerpo cabra anti ratón conjugado a *Alexa 488* fue usado como anticuerpo secundario. La amplificación de señal con tiramida fue ocasionalmente usada para mejorar la visualización, siguiendo instrucciones de los proveedores. Los controles para inmunocitoquímica fueron realizados omitiendo el anticuerpo primario o secundario.

### **Viabilidad celular y apoptosis**

La viabilidad celular fue determinada por la exclusión de yoduro de propidio (PI), 0.5 µg/ml en cultivo, luego de 30 min de incubación (Jordan et al., 1997). Las células sobrevivientes fueron cuantificadas teniendo en cuenta la ausencia simultánea de tinción con PI y apariencia morfológica saludable.

La apoptosis fue determinada por tres métodos: tinción con DAPI, el método TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling), y tinción con Anexina V.

La integridad nuclear fue evaluada luego de teñir los núcleos celulares con DAPI, una sonda fluorescente que se une al DNA. Las células fueron permeabilizadas con Tritón X-100 en PBS, lavadas con PBS, e incubadas con DAPI por 20 min. Las células fueron

consideradas apópticas cuando presentaron núcleo fragmentado o picnótico. La cantidad de fotorreceptores o células amacrinas apoptóticas en los cultivos fue contada en cultivos doblemente marcados con DAPI y Rho4D2 o HPC-1, para determinar sin ambigüedades la identidad de las neuronas como fotorreceptores o amacrinas respectivamente, y para establecer el número total de ambos tipos. Para la tinción TUNEL, 2% PF por 15 min, y luego reservadas en 70% etanol por 48 hs a -20 °C. Antes de ser marcadas, las células fueron lavadas dos veces a temperatura ambiente por 5 min cada vez. Las muestras se preincubaron con 1X buffer TdT por 10 min, y luego se incubaron con la mezcla de reacción (0.05 mM BrdUTP, 0.3 U/μl TdT en buffer TdT) a 37°C en atmósfera humidificada por 1 h. La reacción se frenó con 15 min de incubación con stop buffer (300mM NaCl, 30 mM citrato de sodio, pH 7,4) a temperatura ambiente. Controles negativos fueron preparados omitiendo la enzima TdT. La presencia de BrdU fue determinada usando un anticuerpo monoclonal anti-Bromodeoxiuridina (anti BrdU), siguiendo la técnica inmunocitoquímica estándar. Para la tinción con Anexina V, el medio de incubación fue removido y las cápsulas lavadas dos veces con PBS frío. Las células fueron luego incubadas con una solución 1: 4 de Anexina V conjugada con *Alexa 488* en buffer de unión (10 mM HEPES, 140 mM NaCl and 2.5 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 7.4) a temperatura ambiente, en la oscuridad durante 15 min. Inmediatamente después, se incubaron con PI en las mismas condiciones. Las células fueron luego lavadas con PBS frío, fijadas en 1% PF en Buffer de unión por 1 h, y finalmente lavadas en PBS frío. El análisis inmunocitoquímico fue realizado por microscopía de epifluorescencia o confocal.

### **Evaluación del potencial de membrana mitocondrial**

Para evaluar la cantidad de células que preservaron su potencial de membrana mitocondrial, los cultivos previamente fijados, fueron incubados con la sonda fluorescente MitoTracker (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) por 30 miny finalmente se evaluó la cantidad de fotorreceptores exhibiendo mitocondrias fluorescentes con respecto al número total de fotorreceptores.

### **Translocación del citocromo C**

Para evaluar liberación mitocondrial de citocromo C, primero las células fueron incubadas con MitoTracker y luego fijadas con metanol por 15 min. La marcación inmunocitoquímica del citocromo C fue realizada usando un anticuerpo policlonal.

### **Análisis estadístico**

Para los estudios citoquímicos, en cada caso se eligieron 10 campos por muestra al azar y se analizaron. Cada valor representa el promedio de al menos 3 experimentos, con 3 cápsulas para cada condición  $\pm$  SD, excepto indicado de otra manera.

Para las comparaciones múltiples de medias se realizó un ANOVA doble, seguido de la prueba de Bonferroni.

## RESULTADOS

### Efecto protector de los carotenoides contra la muerte celular inducida por estrés oxidativo

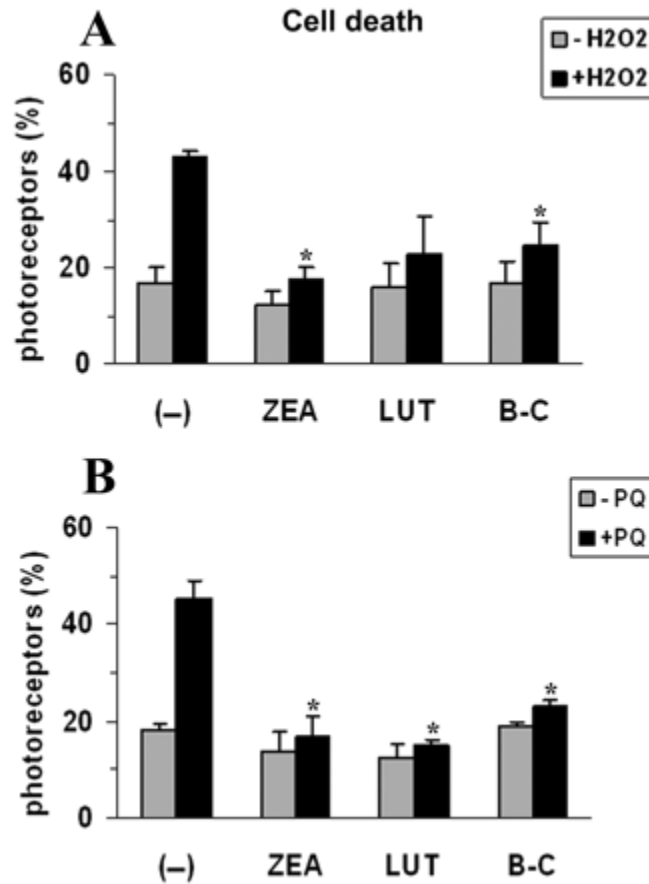
En los cultivos neuronales puros de retina de rata, los fotorreceptores sobrevivieron por 4 días *in vitro*, a pesar de la ausencia de factores tróficos para estas células en el medio de cultivo (**Figura 1**). En este momento del desarrollo, alrededor del 18% de los fotorreceptores incorporaron PI en cultivos no permeabilizados, indicando muerte celular. La suplementación con ZEA o LUT al día 0 *in vitro* no mostró cambios significativos en el porcentaje de fotorreceptores marcados con PI, en comparación con cultivos control. La generación de daño oxidativo con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indujo un aumento de 2.5 veces en la muerte de fotorreceptores relativa a cultivos control (**Figura 1A**). Los carotenoides fueron eficaces para prevenir esta muerte; cultivos suplementados con ZEA, LUT o BC mostraron, luego del tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, niveles de muerte celular de fotorreceptores comparables a los cultivos control no sometidos a estrés oxidativo (**Figura 1A**).

El tratamiento con 48 µM PQ por 24 hs incrementó la muerte de fotorreceptores; la marcación con PI en estos cultivos fue de un 45%, casi 3 veces mayor que las condiciones control (**Figura 1B**), un incremento similar al inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ZEA y LUT fueron tan efectivas previniendo la muerte de los fotorreceptores en los cultivos tratados con PQ como en los cultivos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Las xantófilas bloquearon completamente el incremento de la muerte de los fotorreceptores inducido por PQ. En grado similar, con ZEA o LUT, el porcentaje de fotorreceptores marcados con PI disminuyó en cultivos con o sin PQ (**Figura 1B**),



indicando que las xantófilas protegieron a los fotorreceptores del daño oxidativo. El agregado de BC mostró un efecto similar al de ZEA y LUT (**Figura 1A**).



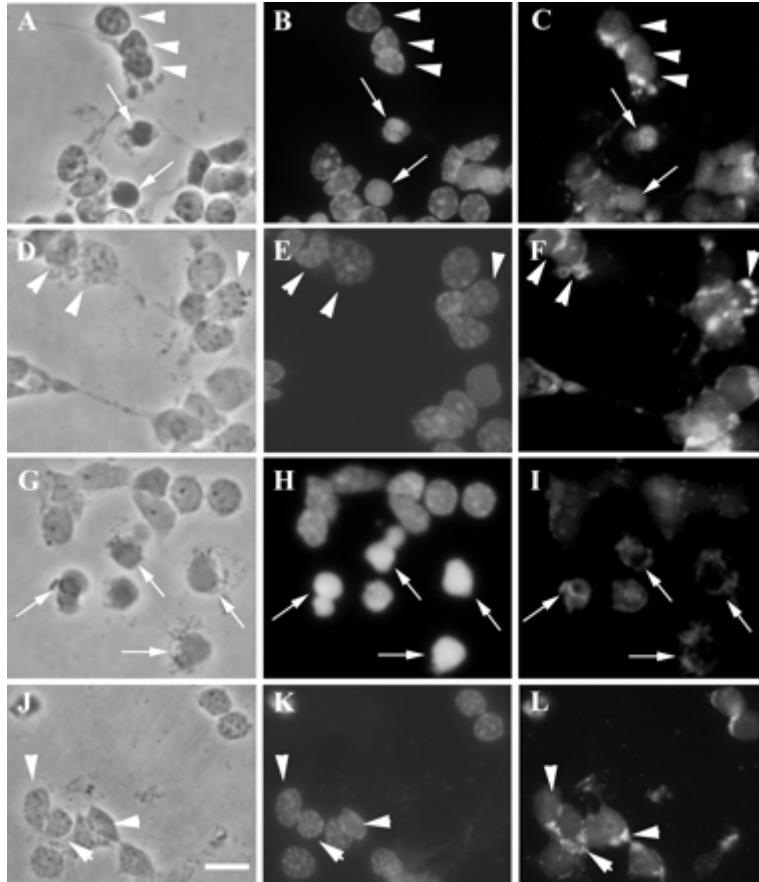
**Figura 1. Efecto de los carotenoides sobre la muerte celular de los fotorreceptores inducida por estrés oxidativo.**

Cultivos neuronales puros de retina de rata fueron suplementados con 170 nM ZEA, 140 nM LUT, 80nM BC, o solución 0.05 % Tween usado como vehículo para los carotenoides (-) al día 0, inmediatamente luego de sembradas las células. Al día 3, los cultivos se trataron con 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) por 30 min o con 48  $\mu$ M PQ por 24 hs, como descrito en Métodos (B). Las barrras indican el porcentaje de de fotorreceptores marcados con PI. El número total de células por cápsula fue  $1.4 \times 10^6 \pm 112,376$  (n=3) en (A) y  $1.10 \times 10^6 \pm 45,500$  (n=5) en (B). \* p< 0.05 comparado con cultivos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o PQ en ausencia de carotenoides.

## **Efecto de los carotenoides y DHA en la prevención de la apoptosis de fotorreceptores inducida por estrés oxidativo.**

Trabajos previos realizados en laboratorio de la Dra. Rotstein demostraron que el PQ induce la muerte apoptótica de los fotorreceptores (Rotstein et al., 2003). Ahora, evaluamos si los carotenoides podían proteger de la apoptosis inducida por PQ. En cultivos control, al día 4, la mayoría de los fotorreceptores mostró integridad nuclear (**Figura 2B**); El tratamiento con PQ incrementó marcadamente la cantidad de núcleos fragmentados o apoptóticos en los fotorreceptores (**Figura 2H**), como ha sido previamente descrito (Rotstein et al., 2003). El efecto del PQ en los niveles de apoptosis fue mucho menor en cultivos suplementados con ZEA; la presencia de ZEA preservó notablemente la integridad nuclear en los fotorreceptores, previniendo su apoptosis (**Figura 2K**).

La prevención de la apoptosis por ZEA implicó el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial. Los cultivos control y suplementados con ZEA mostraron mitocondrias marcadas brillantemente, indicando el mantenimiento de potencial de membrana de las mitocondrias. (**Figura 2C, 2F**). El tratamiento con PQ promovió la pérdida de potencial de membrana mitocondrial en fotorreceptores (**Figura 2I**). La suplementación con ZEA previno dicha pérdida y preservó el potencial de membrana aún después del tratamiento con PQ (**Figura 2L**).



**Figura 2. Efecto de la ZEA sobre la apoptosis de fotorreceptores inducida por PQ.**

Micrografías de fase (columna izquierda) muestran cultivos neuronales no suplementados (A-C, G-I) o suplementados con ZEA (D-F, J-L) y tratados (G-L) o no (A-F) con PQ.

Micrografías de fluorescencia muestran cultivos marcados con DAPI para analizar la fragmentación/picnosis nuclear (columna central) y con MitoTracker para evaluar el mantenimiento de potencial de membrana mitocondrial (columna derecha). La adición de PQ indujo apoptosis en los fotorreceptores (flechas delgadas). ZEA preservó la integridad del potencial de membrana mitocondrial (puntas de flecha) pese al agregado de PQ.

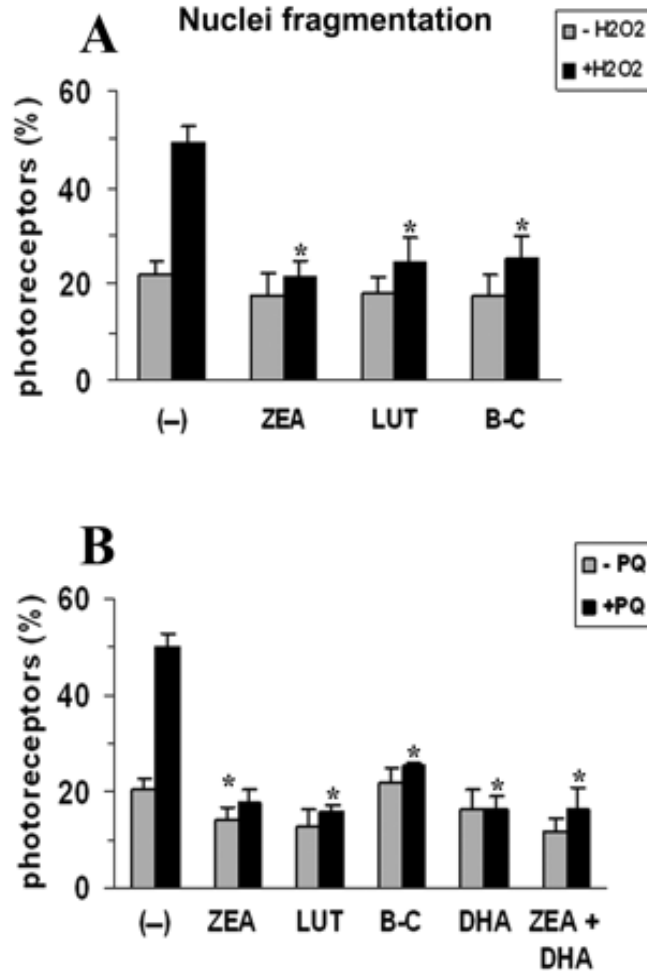
Escala: 10  $\mu$ m.

El daño oxidativo inducido por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> también activó la apoptosis en los fotorreceptores, duplicando la cantidad de fotorreceptores muertos, de un 22% en los cultivos control, a casi un 50% en los cultivos tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 3A**). La suplementación con ZEA, LUT o BC previo al tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> previno la apoptosis (**Figura 3A**); los tres carotenoides resultaron igualmente protectores.

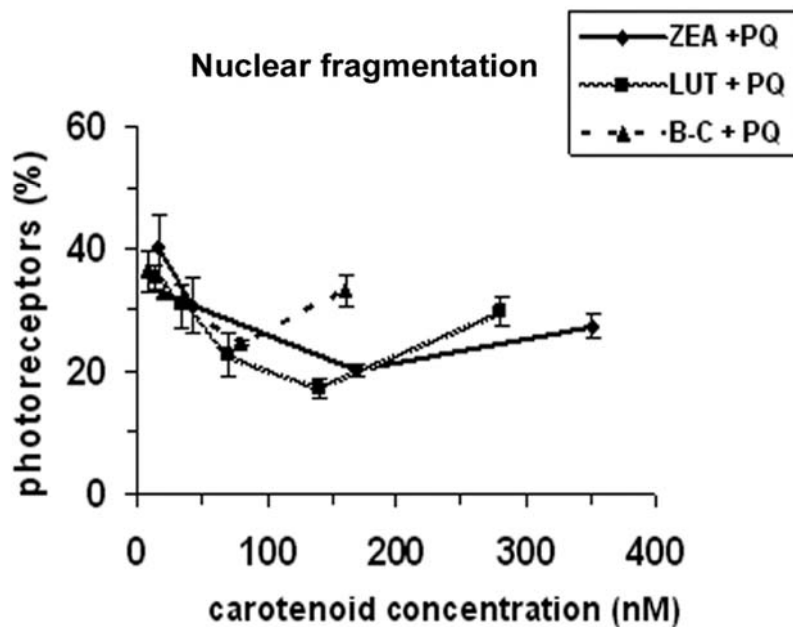
Cuando el estrés oxidativo fue inducido por PQ, el porcentaje de fotorreceptores apoptóticos en cultivo en ausencia de carotenoides alcanzó el 50% comparado al 20% obtenido en los cultivos control (**Figura 3B**). La adición de ZEA o LUT a los cultivos previno completamente la apoptosis inducida por PQ, reduciendo el porcentaje de fotorreceptores apoptóticos a niveles aún menores que en las condiciones control. La suplementación con BC redujo la apoptosis de fotorreceptores, aunque no tan eficientemente como ZEA y LUT (**Figura 3B**).

Trabajos previos demostraron que el DHA protege a los fotorreceptores de la apoptosis inducida a tiempos tempranos del desarrollo *in vitro* (Politi et al., 2001a; Politi et al., 2001b; Rotstein et al., 1996; Rotstein et al., 1997) y luego del estrés oxidativo (German et al., 2006a; Rotstein et al., 2003). Aquí, hemos comparado los efectos protectores de DHA con el de los carotenoides. Como se observa en la **Figura 3B**, ZEA, LUT y DHA tienen efectos similares previniendo la apoptosis de fotorreceptores inducida por PQ. Además, cuando los cultivos neuronales fueron sometidos a un tratamiento simultáneo con ZEA y DHA, el efecto protector combinado de ambos compuestos fue similar al de cada uno adicionado separadamente a los cultivos (**Figura 3B**). Del mismo modo, la adición combinada de DHA y LUT no proveyó protección adicional alguna, previniendo la apoptosis en la misma medida que DHA y LUT agregados por separado (no mostrado).

Estudiamos el efecto de concentraciones en aumento de carotenoides en la apoptosis de los fotorreceptores inducida por PQ. Como se muestra en **Figura 4**, las curvas indican que existe un rango pequeño de concentraciones en las cuales los carotenoides son efectivos en la neuroprotección, que es diferente para cada compuesto. Para los siguientes experimentos, las concentraciones elegidas, a las que cada carotenoide demostró su mayor efectividad fueron: 170, 140 y 80 nM, for ZEA, LUT y BC, respectivamente. Por debajo de esas concentraciones, el efecto protector de estos compuestos en los fotorreceptores fue bajo, y por encima resultó deletéreo.



**Figura 3. Efecto protector de los carotenoides y DHA en la apoptosis de los fotorreceptores sujetos a estrés oxidativo.** Cultivos sin (-) o suplementados con ZEA, LUT, y BC al día 0, y con 6.7  $\mu$ M DHA al día1 fueron tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A) o PQ (B) al día 3, como se describió en Métodos. El porcentaje de fotorreceptores apoptóticos fue evaluado analizando la fragmentación nuclear con tinción con DAPI. El número total de células por cápsula (35mm diámetro) fue  $1.4 \times 10^6 \pm 112,376$  (n=3) en (A) y  $1.08 \times 10^6 \pm 101,380$  (n=6) en (B). \*p < 0.05 comparado con cultivos solo tratados con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o PQ.



**Figura 4. Curvas de dosis-respuesta para distintas concentraciones de carotenoides.**

Cultivos retinales fueron suplementados al día 0 con distintas concentraciones de ZEA, LUT o BC, tratados al día 3 con PQ, y fijados al día 4. El porcentaje de fotorreceptores apoptóticos fue establecido con tinción con DAPI. Las concentraciones testeadas de ZEA fueron 17 nM, 43 nM, 170 nM y 280 nM; las de LUT fueron 14 nM, 35 nM, 70 nM, 140 nM y 280 nM; las de BC fueron 8 nM, 20 nM, 80 nM y 160 nM. Las concentraciones experimentales elegidas luego de realizar esta curva fueron 170, 140 y 80 nM, para ZEA, LUT y BC, respectivamente. Concentraciones menores resultaron en una protección insignificante, mientras que concentraciones mayores resultaron en desprendimiento celular del sustrato. El número total de células fue  $1.13 \times 10^6 \pm 115,884$  por cápsula (n=2).



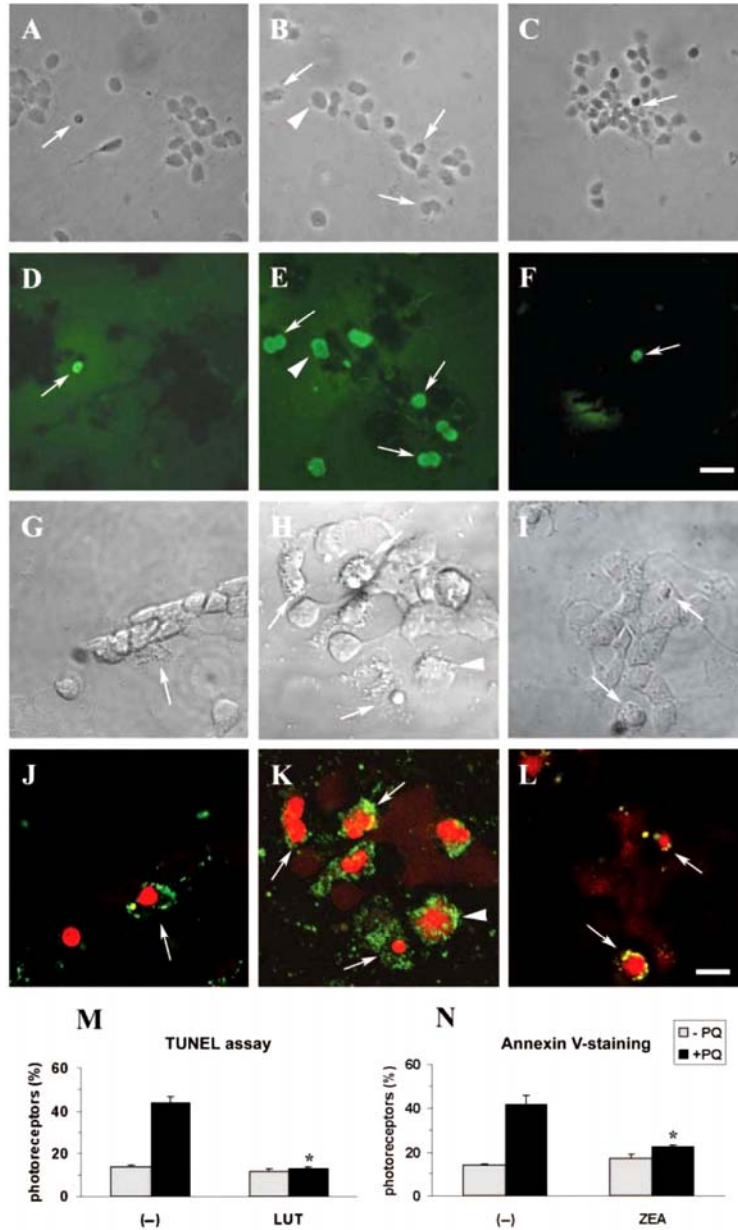
El efecto protector de los carotenoides también fue analizado mediante la técnica de TUNEL. Muy pocas células fueron identificadas como TUNEL-positivas en los cultivos control o con LUT (**Figura 5A, 5D**). Análisis cuantitativos en estos cultivos revelaron que el porcentaje de células TUNEL-positivas fue menor al 15% (**Figura 5M**). El tratamiento con PQ incrementó notablemente la cantidad de células TUNEL-positivas cells, a aproximadamente un 45% (**Figura 5B, 5E, 5M**). La suplementación con LUT previno el aumento en células TUNEL-positivas inducido por PQ, confirmando el efecto antiapoptótico de este carotenoide (**Figura 5C, 5F, 5M**).

La tinción de los cultivos con Anexina V-PI proveyó un respaldo adicional al efecto antiapoptótico de los carotenoides. La tinción de células no permeabilizadas con Anexina V evidencia la translocación de fosfatidilserina de la capa interna de la membrana plasmática, siendo un evento temprano característico en la apoptosis. Los núcleos teñidos con PI, en combinación con tinción positiva con Anexina V sin previa permeabilización, son característicos de los estadios tardíos de muerte apoptótica o necrótica. Los cultivos control mostraron pocas células marcadas con Anexina V y PI, reflejando el bajo número de células apoptóticas en dicha condición (**Figura 5G, 5J, 5N**). Luego del tratamiento con PQ, la doble marcación de fotorreceptores con Anexina V y PI alcanzó cerca del 40% (**Figura. 5H, 5K, 5N**). La protección de los fotorreceptores por la ZEA fue corroborada con un bajo porcentaje de fotorreceptores doblemente marcados en cultivos suplementados con LUT y luego tratados con PQ (**Figura 5I, 5L, 5N**).

## **Efecto de los carotenoides en la preservación del potencial de membrana mitocondrial de los fotorreceptores.**

El incremento observado en la apoptosis fue paralelo a la disminución en el porcentaje de fotorreceptores que preservaron su potencial de membrana mitocondrial; desde cerca del 60% en controles a un 30% en los cultivos tratados sólo con PQ (**Figura 6J**). El efecto protector de los carotenoides sobre la apoptosis de los fotorreceptores fue acompañado de la preservación del potencial de membrana mitocondrial; en cultivos suplementados con ZEA, LUT y BC alrededor del 60% de los fotorreceptores mantuvieron el potencial de membrana de sus mitocondrias luego del tratamiento con PQ, al igual que en cultivos control o tratados sólo con carotenoides (**Figura 6J**). Como se ha demostrado previamente (Rotstein et al., 2003), el DHA también fue efectivo preservando el potencial de membrana mitocondrial de los fotorreceptores luego del tratamiento con PQ. La adición combinada de DHA y ZEA tuvo el mismo efecto previniendo la despolarización de membrana mitocondrial que cuando cada uno se usó para tratar los cultivos por separado (**Figura 6J**). Resultados similares se observaron con el tratamiento simultáneo de LUT y DHA (no mostrado). Luego, investigamos si el estrés oxidativo inducía la liberación del citocromo C de la mitocondria y si ZEA podría prevenirla. El cuerpo celular del fotorreceptor es muy pequeño y se halla casi enteramente ocupado por su núcleo; solo queda un mínimo espacio para el citosol, mitocondrias, y restantes organelas. Como consecuencia, cuando el citocromo C fue liberado durante la fase temprana de apoptosis inducida por PQ, éste permaneció muy próximo a la región mitocondrial, resultando difícil evaluar la translocación de citocromo C al citosol por técnicas inmunocitoquímicas. En algunos fotorreceptores, pudimos evidenciar un

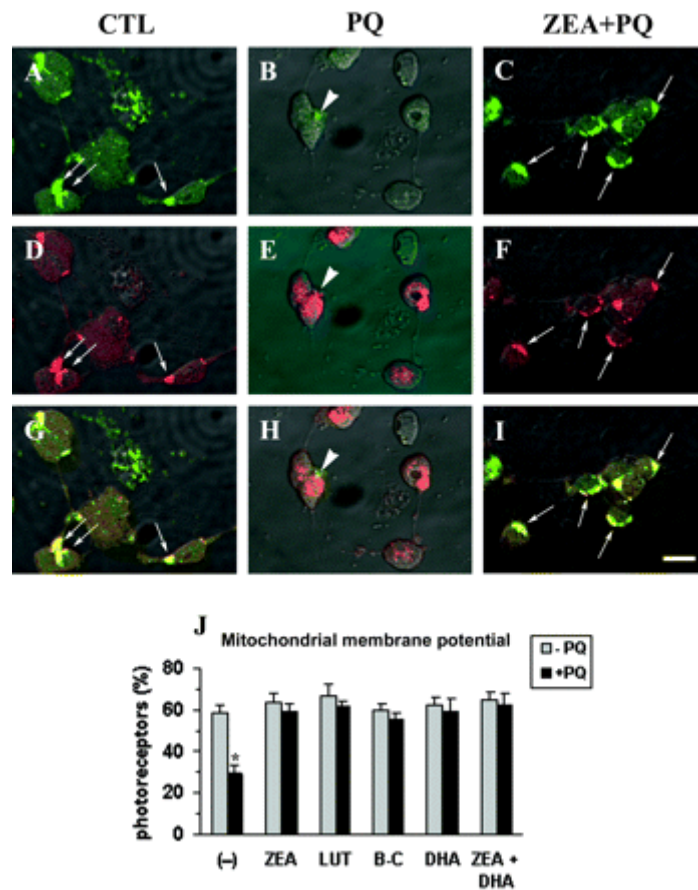
espacio pequeño de forma triangular, próximo al segmento externo y/o cono axonal, correspondiente al compartimento citosólico. La colocación de fluorescencia de citocromo C y mitocondrias teñidas con MitoTracker fue usualmente observada en condiciones control (puntas de flecha en **Figura 6A, 6D, 6G**). El tratamiento con PQ condujo a la pérdida de dicha colocación en algunos fotorreceptores (flechas blancas en **Figura 6B, 6E, 6H**), sugiriendo que la translocación de citocromo C desde la mitocondria al citosol acompañó el comienzo de la apoptosis. La adición de ZEA a los cultivos, previa al tratamiento con PQ, preservó el potencial de membrana mitocondrial, y por ende la localización mitocondrial del citocromo C (flechas blancas en **Figura 6C, 6F, 6I**).



**Figura 5. Efecto protector de LUT y ZEA sobre la apoptosis inducida por PQ en fotorreceptores**

Micrografías de cultivos control (A, D, G, J), tratados sólo con PQ (B, E, H, K), o con LUT y PQ (C, F) o con ZEA y PQ (I, L) procesados al día 4 para TUNEL (A-F) o Anexina V-PI (G-L). Las células TUNEL-positivas se muestran marcadas con

fluorescencia verde en D-F. La marcación de células con Anexina V y PI se visualiza verde y roja respectivamente, en J-L. El porcentaje de fotorreceptores marcados con las técnicas TUNEL o Annexin V y/o PI está indicado en M y N, respectivamente. En cultivos control, pocos fotorreceptores (flechas delgadas) mostraron marcación con TUNEL o Anexina V/PI. El tratamiento con PQ incrementó dramáticamente ambas marcaciones en fotorreceptores (flechas delgadas) y células amacrinas (cabeza de flechas). La suplementación con LUT y ZEA redujo significativamente el número de células TUNEL o Annexin V/PI positivas (C, F, e I, L, respectivamente). Las imágenes A-F fueron obtenidas por microscopía de epifluorescencia convencional, y las imágenes G-L por microscopía confocal. \* $p < 0.05$  comparado con tratamiento solo con PQ. Escala A-F: 20 $\mu\text{m}$ , escala G-H: 10 $\mu\text{m}$ .



**Figura 6. Efectos de los carotenoides en la liberación de citocromo C y la preservación del potencial de membrana mitocondrial luego de la inducción de estrés oxidativo con PQ.**

Cultivos sin (A, D, G) o tratados con PQ (B, E, H) o con ZEA y PQ (C, F, I) fueron incubados con la sonda MitoTracker para marcar mitocondrias (fluorescencia roja en D, E, F) antes de ser fijados con metanol. La marcación inmunocitoquímica del citocromo C (fluorescencia verde en A, B, C) fue realizada usando un anticuerpo policlonal. El merge de ambas marcas se muestra en G-I. Mientras los cultivos control y en los suplementados con ZEA y tratados con PQ mostraron colocación de citocromo C y Mitotracker

(flechas delgadas blancas), los fotorreceptores tratados sólo con PQ mostraron falta de colocalización de ambas tinciones (puntas de flecha en H). Escala: 10  $\mu\text{m}$ .

Cultivos sin (-) o suplementados con ZEA, LUT, o BC al día 0, o 6.7  $\mu\text{M}$

DHA al día 1, fueron tratados con PQ al día 3. El porcentaje de fotorreceptores que mantuvo la integridad del potencial de membrana mitocondrial bajo las distintas

condiciones en cultivo está indicado en J. El número de células por cápsula fue  $1.08 \times 10^6 \pm 101,380$  (n=6). \*p < 0.05 comparado al resto de las condiciones.

### **Efectos de ZEA y LUT sobre la diferenciación de los fotorreceptores**

En condiciones control (-), sólo unos pocos fotorreceptores presentaron un cilio corto (**Figura 7A, 7C**), y casi ninguno de ellos desarrolló segmentos externos semejantes a los que presentan los fotorreceptores *in vivo*. Notablemente, en cultivos suplementados con ZEA, el número de fotorreceptores que presentaron procesos apicales similares a segmentos externos rudimentarios intensamente marcados con el anticuerpo Rho4D2 aumentó (**Figura 7B, 7D**), sugiriendo que la adición de ZEA acentuó la diferenciación de los fotorreceptores. El efecto observado tras la adición de LUT a los cultivos neuronales neuronal cultures fue similar, promoviendo el desarrollo de procesos apicales semejantes a segmentos externos (no mostrado).

En este estadio temprano del desarrollo (4 días), los niveles de opsina en los fotorreceptores son aún muy bajos (Rotstein et al., 1998), y sólo 3% de los fotorreceptores expresa opsina en los cultivos control (**Figura 7E**). La suplementación de los cultivos con ZEA, LUT, BC o DHA incrementó la expresión de opsina (**Figura 7E**), siendo DHA y ZEA los más efectivos, ya que mostraron un incremento en la diferenciación estadísticamente significativo. La combinación de ZEA y DHA no mostró efecto sinérgico en la diferenciación de los fotorreceptores; fue similar al efecto observado cuando cada compuesto se adicionó al cultivo por separado.

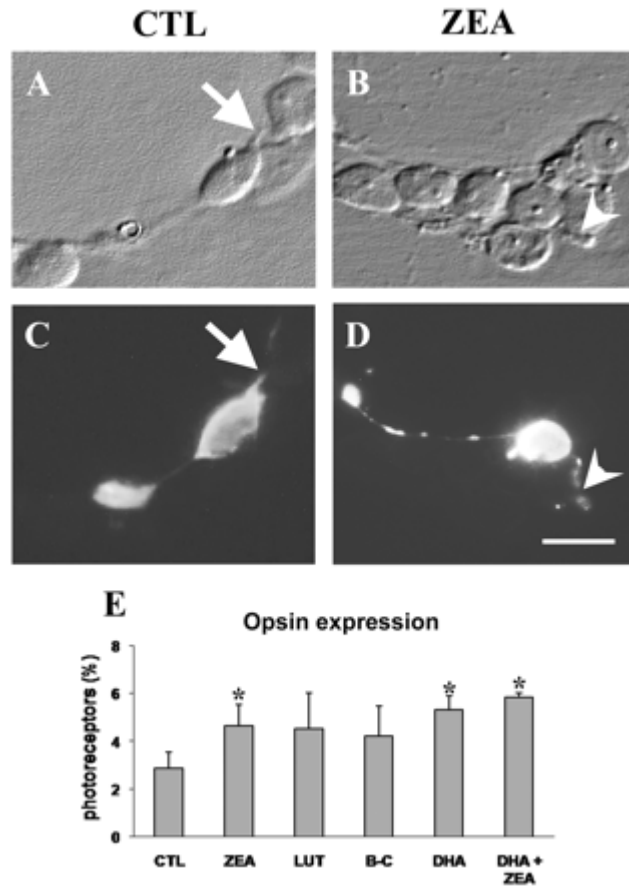
### **Efecto de los carotenoides sobre la supervivencia y diferenciación de las neuronas amacrinas**

A continuación, investigamos si estos carotenoides podían efectivamente prevenir el daño inducido por PQ en las neuronas amacrinas, el otro tipo celular mayoritario en estos cultivos. Como se ha establecido anteriormente (Rotstein et al., 2003), el estrés oxidativo



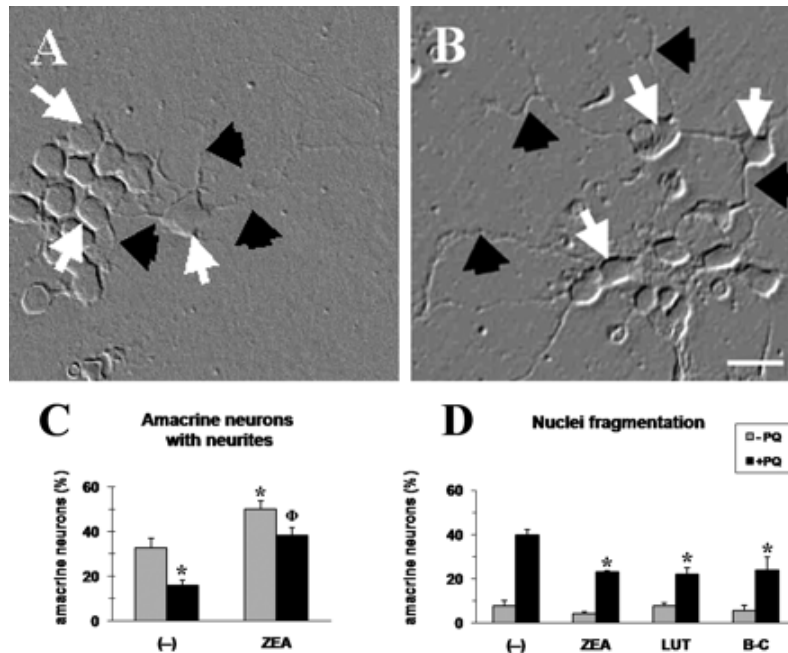
produjo un incremento en el número de neuronas amacrinas apoptóticas, que aumentó desde un 10% en los controles a cerca del 40% luego del tratamiento con PQ (**Figura 8D**). La suplementación con ZEA, LUT y BC protegió parcialmente a las neuronas amacrinas del daño inducido con PQ (**Figura 8D**); en estos cultivos la apoptosis fue reducida a la mitad en comparación a los cultivos sin carotenoides luego del tratamiento con PQ (**Figura 8D**). De esta manera, la protección ejercida por los carotenoides fue más efectiva para los fotorreceptores que para las neuronas amacrinas.

Los efectos de ZEA y LUT sobre la diferenciación neuronal no fueron exclusivos para los fotorreceptores; ambos estimularon marcadamente el crecimiento de neuritas en las células amacrinas (**Figura 8**). En este momento del desarrollo, las neuronas amacrinas en cultivos control son aún inmaduras (flechas blancas en **Figura 8A**); alrededor del 30% de ellas tienen neuritas (cabeza de flechas negras en **Figura 8A, 8C**), usualmente cortas, delgadas, y pobremente desarrolladas. En contraste, luego de la adición de ZEA, el 50% de las neuronas amacrinas extendieron neuritas largas y gruesas a lo largo del cultivo (cabezas de flecha negras en **Figura 8B, 8C**), asemejándose al extenso crecimiento de neuritas que tiene lugar en esas neuronas en estadios más avanzados del desarrollo. El tratamiento con PQ redujo el porcentaje de neuronas amacrinas con neuritas, que bajó a 15% en cultivos carentes de xantófilas (**Figura 8C**). La suplementación de los cultivos con ZEA previno efectivamente la pérdida de neuritas inducida por PQ en la mayoría de las neuronas amacrinas (**Figura 8C**). La suplementación con LUT tuvo un efecto similar en el crecimiento de neuritas (no mostrado), sugiriendo que las xantófilas promovieron eficientemente la diferenciación de estas células.



**Figura 7. Efecto de los carotenoides y DHA sobre la diferenciación de los fotorreceptores y en la expresión de opsina**

Los cultivos fueron suplementados o no (-) o con ZEA, LUT o B-C al día 0, y/o con DHA al día 1. Microscopía de fase (A, B) y fluorescencia (C, D) de cultivos neuronales sin (CTL) o con ZEA, marcados con anticuerpos monoclonales contra rodopsina, Rho4D2. Mientras los fotorreceptores control generalmente carecieron de procesos apicales (flechas en A, C), la suplementación con ZEA promovió el desarrollo de procesos apicales rudimentarios (cabezas de flecha en B, D), intensamente marcados con el anticuerpo Rho4D2. El porcentaje de fotorreceptores Rho4D2-positivos en cada condición está indicado en E. El número total de células por cápsula fue  $1.08 \times 10^6 \pm 101,380$  (n=4). Escala: 10  $\mu$ m. \*p <0.05 comparado a los controles.



**Figura 8. Efecto de los carotenoides en el desarrollo de neuritas y en la apoptosis de neuronas amacrinas inducida con PQ.**

Micrografías de fase de cultivos control (A), cultivos con ZEA (B) revelaron que hacia el día 4, la mayoría de las neuronas amacrinas (flechas blancas) en condiciones control presentaron una morfología de neuronas inmaduras, sin o con neuritas cortas y delgadas (flechas negras en A. En contraste, la adición de ZEA a los cultivos provocó el desarrollo de neuritas largas, ramificadas y conspicuas en muchas neuronas amacrinas (flechas negras). Los cultivos sin (-) o suplementados con ZEA, LUT, y BC al día 0, tratados con PQ al día 3; las neuronas amacrinas fueron identificadas por su marcación con el anticuerpo monoclonal HPC-1. El porcentaje de neuronas amacrinas está indicado en C. El porcentaje de neuronas amacrinas apoptóticas fue evaluado analizando fragmentación nuclear y morfología celular (D). \* y <sup>Φ</sup> p < 0.05 comparado a cultivos sin ZEA, con o sin tratamiento con PQ, respectivamente (C, D). Número total de células por cápsula:  $1.04 \times 10^6 \pm 41,885$  (n=5). Escala: 20µm

## DISCUSIÓN

Los nuevos hallazgos descritos en este capítulo muestran evidencias de neuroprotección directa de ZEA y LUT en fotorreceptores de retina en cultivo; BC fue levemente menos efectivo que las xantófilas maculares en proteger a los fotorreceptores de la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Además, ZEA y LUT promovieron la diferenciación de los fotorreceptores, mostrando una actividad similar a la de DHA. Estos resultados sugieren que ZEA y LUT, junto al DHA podrían ser parte de un sistema esencial basado en la dieta para mantener el desarrollo y sostener la viabilidad de los fotorreceptores.

Cinco análisis (Mares-Perlman et al., 2001;Sangiovanni et al., 2007b;Seddon et al., 1994;Snellen et al., 2002) de siete (Bone et al., 2001;Cho et al., 2004;Mares-Perlman et al., 2001) realizados examinando la asociación de la ingesta dietaria de LUT/ZEA en estadios de AMD avanzada proporcionaron relaciones protectoras estadísticamente significativas para estos compuestos. Estos estudios indicaron una reducción en la probabilidad de tener AMD avanzada para las personas que reportaron las mayores ingestas de LUT/ZEA (relativo a la gente con menor ingesta). Además, pacientes con AMD presentaron menores niveles de ZEA y LUT (Bone et al., 2001). Dado (1) que la concentración de LUT y ZEA por unidad de área fueron sustancialmente mayor en la retina que en cualquier otro tejido del cuerpo, y que (2) los contenidos de estos compuestos en la retina resultaron modificables dependiendo en su ingesta diaria, estos hallazgos sugieren un rol relevante de las xantófilas en el tratamiento de AMD.

De todas formas, al iniciar este trabajo, la evidencia directa del rol protector de las xantófilas en las neuronas retinales a la fecha era casi inexistente. Una dieta rica en xantófilas demostró proteger los fotorreceptores de codorniz al reducir *in vivo* la

apoptosis inducida por luz (Thomson et al., 2002). La exposición a largo plazo de iluminación intensa es considerado uno de los más relevantes factores de riesgo implicado en la patogénesis de AMD. Una característica común entre éste y otros factores de riesgo ambientales, tales como el humo de cigarrillo, es la generación de ROS que conduce a la acumulación de daño oxidativo. Se ha descrito que diferentes tipos experimentales de inducción de daño oxidativo en la retina siguen distintos comportamientos, afectan distintos compartimentos celulares, y pueden ser contrarrestados por distintos antioxidantes exógenos (Lu et al., 2006). Sin embargo, comparten una característica: inducen la muerte apoptótica de los fotorreceptores. Para establecer la existencia de acciones neuroprotectoras directas de ZEA y LUT sobre neuronas retinales, expusimos estas células a dos tipos distintos de estrés oxidativo: PQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Estos agentes oxidantes indujeron la muerte de fotorreceptores por la vía apoptótica, pero el pretratamiento con ZEA o LUT promovió la supervivencia de los fotorreceptores frente a ambos, disminuyendo su apoptosis. ZEA y LUT bloquearon completamente los efectos deletéreos de PQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sobre los fotorreceptores, sugiriendo que estas xantófilas podrían actuar en una paso común de la vía apoptótica, permitiendo a las células protegerse de distintos tipos de estrés oxidativo.

El tratamiento con PQ condujo a la muerte de los fotorreceptores en cultivo a través de una vía apoptótica que implica la pérdida de potencial de membrana mitocondrial (Rotstein et al., 2003). La protección de ZEA y LUT contra PQ y preservó el potencial de la membrana mitocondrial, y preservó la localización del citocromo C en este compartimento celular. La falta de liberación de citocromo C prevendría la activación de caspasas (Green and Kroemer, 2004). Esto sugiere que las xantófilas podrían actuar en un

paso de la apoptosis que precede las alteraciones mitocondriales. Se han propuesto dos hipótesis principales propuestas para explicar estos hallazgos: o las xantófilas actúan como antioxidantes, o activan vías de señalización para proteger a los fotorreceptores. La explicación más directa es la bien conocida actividad antioxidante de estos compuestos. Los carotenoides en general, y ZEA y LUT en particular, con su alto número de doble enlaces conjugados, pueden directamente extinguir ROS (Conn et al., 1991). Ambas xantófilas son eficientes neutralizando radicales superóxido e hidroxilo (Trevithick-Sutton et al., 2006), que podrían ser producidos por PQ y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, respectivamente (Farrington et al., 1973). Podrían así reducir los niveles de radicales libres citotóxicos, previniendo el daño a la función mitocondrial y consecuentemente evitando gatillar la muerte neuronal. En este contexto, es de interés señalar que en estudios en gatos y perros revelaron que la LUT de la dieta es incorporada significativamente en las mitocondrias (Chew and Park, 2004; Chew et al., 2003), una localización que les permitiría a los carotenoides impedir la injuria a esas organelas. ZEA y LUT mostraron los mayores efectos antiapoptóticos y fueron igualmente efectivos contra los dos tipos de oxidantes usados en este estudio. Por su parte, BC, si bien actúa como antioxidante (Burton and Ingold, 1984) fue menos efectivo disminuyendo la apoptosis por PQ. Coincidentemente, estudios epidemiológicos señalan los efectos protectores de ZEA y LUT, pero no de BC contra la AMD (Delcourt et al., 2006). Las propiedades biofísicas de estos carotenoides podrían explicar las diferencias en sus efectos protectores. ZEA y LUT están altamente enriquecidas en la mácula, y los grupos hidroxilo (ausentes en BC) en sus anillos imparte propiedades polares que afectan su solubilidad y disposición en membrana. Esto podría permitir a ZEA y LUT orientarse de forma que establezca la estructura de la membrana

(Snodderly, 1995) y proteger de peroxirradicales tanto hidrosolubles como liposolubles (Woodall et al., 1997). Tanto la LUT como la ZEA tienen el potencial de reducir las vitaminas C y E oxidadas a sus formas antioxidantes (Mortensen et al., 2001). Se ha mostrado que las xantófilas se acumulan en los dominios insaturados de las membranas biológicas (Wisniewska and Subczynski, 2006a). Además, su concentración en la fracción insaturada de modelos de membrana de segmentos externos de fotorreceptores (Wisniewska and Subczynski, 2006c) sugiere que son ideales para funcionar como antioxidantes endógenos en las membranas previniendo la peroxidación de los ácidos grasos altamente insaturados.

En adición a sus propiedades antioxidantes, LUT y ZEA podrían proteger a los fotorreceptores mediante la activación de vías de señalización. Ha sido demostrado que los carotenoides y/o sus metabolitos afectan las vías de señalización (Stahl et al., 2002) al controlar la comunicación intercelular vía unions gap (Stahl et al., 1997; Zhang et al., 1992) y al modular la expresión de genes implicados en la detoxificación de metabolitos reactivos (Stahl et al., 2002). LUT ha sido propuesto como regulador de la apoptosis y angiogénesis en tumores de ratón al controlar la expresión génica (Chew et al., 2003) y disminuir la apoptosis en leucocitos sanguíneos. También protege las células epiteliales mamarias, pero no las transformadas, de la apoptosis inducida por agentes quimioterapéuticos (Sumantran et al., 2000).

Además de nuestros datos sobre sus efectos antiapoptóticos, ZEA y LUT promueven la diferenciación de los fotorreceptores, incrementando la expresión de opsina y el desarrollo de procesos semejantes a segmentos externos, apoyando la hipótesis de que las xantófilas activan vías de señalización celulares para modular el desarrollo de nuevas

estructuras, y promueven la expresión de genes específicos de fotorreceptores, tales como la opsina. Mientras los efectos antiapoptóticos de ZEA y LUT podrían relacionarse con su capacidad de regular el estado redox, sus efectos en la diferenciación claramente van más allá de la capacidad antioxidante y nos permiten proponer que otros mecanismos podrían ser relevantes las xantófilas y nos permiten proponer que otro mecanismo podrían ser relevantes para sus roles en los fotorreceptores.

El hallazgo de que el tratamiento combinado de DHA con ZEA o LUT no mostró efecto aditivo en la supervivencia o diferenciación de los fotorreceptores sugiere que estos compuestos podrían afectar a la misma población celular y/o activar similares vías de señalización. DHA es un eficiente factor de supervivencia para los fotorreceptores (Politi et al., 2001a; Politi et al., 2001b; Rotstein et al., 1996; Rotstein et al., 1997), contra el estrés oxidativo (Rotstein et al., 2003), que DHA activa la vía de señalización de ERK/MAPK para promover la protección de los fotorreceptores (German et al., 2006a) a través de un aumento en la expresión de la proteína antiapoptóticas Bcl-2. Además, DHA evita el aumento de los niveles de ceramida inducidos por el estrés oxidativo, previniendo la muerte de los fotorreceptores (German et al., 2006b). Otro rol de DHA es permitir el avance de la diferenciación de los fotorreceptores (Garelli et al., 2006), que también involucra a la vía ERK/MAPK (German et al., 2006a). Determinar si las xantófilas pueden activar las mismas vías de señalización que el DHA para modular la supervivencia de los fotorreceptores requiere futuros estudios.

Es de interés señalar que los carotenoides no fueron tan efectivos protegiendo a las neuronas amacrinas del daño oxidativo. La adición de LUT, ZEA y BC redujo la muerte de las células amacrinas a la mitad en vez de prevenirla completamente como en el caso



de los fotorreceptores. Los tres carotenoides testeados indujeron el mismo grado de protección en estas células, lo que sugiere que bajo estrés oxidativo inducido por PQ, la supervivencia de las neuronas amacrinias por estos compuestos podría ser regulada por mecanismos similares, probablemente relacionados con sus propiedades antioxidantes. La ceramida es un mediador clave para la inducción de apoptosis en fotorreceptores pero no en células amacrinias (German et al., 2006b). En contraste, las xantófilas avanzaron la diferenciación en ambos tipos celulares. La extensa red de neuritas es una característica de las células amacrinias diferenciadas y es usualmente observada en cultivos a largo plazo (Rotstein et al., 1996). La suplementación de estos cultivos aumentó la diferenciación de las neuronas amacrinias, promoviendo notablemente la expansión de sus neuritas, y confiriéndoles morfología de neuronas más maduras aún a los 4 días *in vitro*. En conclusión, en este capítulo mostramos que ZEA y LUT protegen eficientemente a los fotorreceptores en cultivo de la apoptosis inducida por estrés oxidativo. Además, junto a DHA, ZEA y LUT promueven la diferenciación de los fotorreceptores. Por lo tanto, nuestros resultados proveen una explicación molecular en soporte a la evidencia epidemiológica que sugiere un rol de las xantófilas maculares y el DHA en la modulación de los procesos de patogénesis y progresión en AMD. Este conocimiento podría eventualmente contribuir a establecer la eficacia de la ingesta de compuestos naturalmente presentes en la dieta como una intervención preventiva para tratar enfermedades neurodegenerativas de la retina.

## **Capítulo II**

**El factor inhibidor de la leucemia (LIF) protege a  
los fotorreceptores del estrés oxidativo inducido  
en cultivos neuronales puros de retina**

Para profundizar mis estudios en la búsqueda de mecanismos de protección de los fotorreceptores sujetos a estrés oxidativo en modelos *in vitro*, como parte de una colaboración entre los laboratorios del Dr. Luis Politi y el Dr. John Ash en la Universidad de Oklahoma, Health Sciences Center, me integré al grupo que dirige el Dr. John Ash, con el fin de establecer un modelo de cultivo primario que permitiera investigar los mecanismos de neuroprotección ejercidos por la molécula recombinante humana purificada LIF, en células retinales. Estos estudios los describiré a continuación.

## **INTRODUCCIÓN**

La activación del receptor gp130 por LIF, y CNTF previene la muerte celular de los fotorreceptores *in vivo*, como se describiera en la sección Introducción. Altas dosis de estas citoquinas, aunque aún protectoras, tienen el efecto no deseado de disminuir la función retinal, dado que inhiben la expresión de opsina (Wen et al., 2008). El diseño de terapias neuroprotectoras aplicando LIF y CNTF requiere de estudiar los mecanismos biológicos activados por distintas concentraciones de estas citoquinas. Aquí, nuestro objetivo fue utilizar un modelo de cultivo como herramienta para estudiar los mecanismos gatillados por las citoquinas de estrés en los fotorreceptores de retina.

Numerosos grupos de investigación han usado previamente miembros de la familia IL-6 de citoquinas, tales como IL-6, LIF, OSM, y CNTF para probar sus efectos *in vitro*. Un amplio rango de actividades fueron atribuidas a CNTF en una variedad de poblaciones neuronales y gliales, por ejemplo promoviendo la supervivencia *in vitro* de neuronas ganglionares ciliares en embriones de pollo (Adler et al., 1979; Lin et al., 1989), inhibiendo la proliferación de progenitores de neuronas simpáticas (Ernsberger et al., 1989), y promoviendo la diferenciación de progenitores gliales en astrocitos tipo II

(Hughes et al., 1988). En explantos de retina de rata, CNTF, LIF, y OSM modificaron la población de los distintos tipos celulares, e inhibieron la diferenciación de fotorreceptores bastones. En dicho estudio, explantos derivados de ratones carentes de receptor funcional para CNTF, aumentaron la expresión de opsina (Ezzeddine et al., 1997). Trabajo realizado por Neophytou y colaboradores (Neophytou et al., 1997) examinó el desarrollo de bastones en células disociadas en cultivo de retina neonatal de ratón, demostrando que el suero fetal en la composición del medio de cultivo, actuó indirectamente estimulando la proliferación de células gliales de Müller, lo que frenó la diferenciación de los bastones mediante la liberación de LIF. Este estudio propuso interacciones célula-célula inhibitorias para explicar el retraso en la expresión de opsina *in vivo* e *in vitro* que puede ocurrir durante el desarrollo de los fotorreceptores bastones luego de su salida del ciclo celular.

A pesar de todos los estudios rerealizados, faltan evidencias que demuestren una neuroprotección *in vitro* inducida por LIF o CNTF. Por esta razón, el desarrollo de un modelo en que LIF pueda proteger fotorreceptores del daño oxidativo, podría facilitar la identificación de mecanismos moleculares de protección sin la complejidad de las interacciones celulares y moleculares que ocurren en el modelo animal.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

Todos los materiales, reactivos, y animales usados para obtener cultivos puros de neuronas retinales han sido descritos en el capítulo II. En la **Ilustración 12** se resume el procedimiento general para estos experimentos.

### **Agregado de LIF**

El LIF recombinante humano (Dr. John Ash, OUHSC) a las concentraciones finales en el cultivo: 1, 3, 5, y 10 ng/ml fue agregado al día 0 en los cultivos, diluídos en una solución libre de calcio y magnesio. Controles sin LIF fueron usados para comparación.

### **Tratamiento con Paraquat**

El PQ (concentración final en el medio de incubación 48  $\mu\text{M}$ , preparado en solución libre de calcio y magnesio) fue agregado a cultivos neuronales de 3 días. Las neuronas fueron incubadas por 24 hs antes de ser fijadas para posteriores análisis.

### **Viabilidad celular y apoptosis**

La viabilidad celular fue determinada mediante la exclusión de yoduro de propidio (PI).

La apoptosis fue determinada por tres métodos distintos: tinción con DAPI, TUNEL (Terminal Deoxynucleotide Transferase dUTP Nick End Labeling) y marcación con Anexina V, como se describiera en el capítulo I. Los análisis inmunocitoquímicos fueron ejecutados usando magnificación 40X en microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800 usando el programa Meta View (v7,1,1,0). Para análisis cuantitativo 7 a 10 campos microscópicos fueron elegidos al azar.

### **Detección inmunocitoquímica de la expresión de opsina**

Para determinar la expresión de opsina en las neuronas en cultivo, se realizó una inmunomarcación usando el anticuerpo monoclonal Rho-1d4 (regalo del Dr. Robert Molday) y un anticuerpo secundario anti-ratón (conjugado con Alexa -488) como se describe en el capítulo I. El análisis inmunocitoquímico se realizó usando magnificación 40X en un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800 usando el software Meta View (v7,1,1,0). Para el análisis cuantitativo, 7 a 10 campos microscópicos fueron elegidos al azar.

### **Western blot**

Detección de STAT3 y pSTAT3: Para mostrar activación (fosforilación) de STAT3, lisados proteicos fueron obtenidos de neuronas retinales en cultivo (mayoritariamente fotorreceptores y neuronas amacrinias) tratadas o no con 5ng/ml LIF (concentración final en el medio de cultivo). Para cada condición, las células sembradas en tres cápsulas plásticas (6 cm diámetro) fueron raspadas y colectadas en 0.5 ml 1xPBS/cápsula, recolectadas, y centrifugadas (3,000 RPM, 5min), luego de 30 min, 2 días, y 4 días *in vitro*. El pellet de células resultante fue homogenizado usando buffer de lisis 1x Tritón, suplementado con 1mM de cocktail de inhibidor de proteasas (Calbiochem, San Diego, CA #539131), y 1mM ortovanadato de sodio. El contenido proteico fue determinado usando el kit para ensayo proteico BCA (Pierce, Rutherford, IL #23225). Para cada muestra, 6 µg de proteína fueron cargados por calle en 4-20% gel SDS-poliacrilamida (Invitrogen, Carlsbad, CA #EC60285), y las proteínas separadas por electroforesis fueron transferidas sobre membrana de nitrocelulosa. Luego de bloquear los sitios de unión inespecífica con una solución 5% albúmina de suero bovino (BSA), las proteínas fueron

detectadas usando un anticuerpo anti- pSTAT3 para STAT3 fosforilado (Cell Signaling Technology, Danvers, MA #9131L). Luego de realizar stripping, la membrana fue incubada con un anticuerpo anti-STAT3 para STAT3 total (Cell Signaling Technology, Danvers, MA # 9132). Un anticuerpo anti- beta actina fue usado como control de carga proteica (Abcam, Cambridge, MA # ab6276). La visualización de los blots fue realizada usando un sistema convencional de análisis de imágenes Image Station 4000R y software Kodak (IS4000 R; v.4.5.1)

### **Análisis estadístico**

Para comparaciones múltiples entre medias se realizó ANOVA simple seguido de la prueba de Newman Keuls, excepto para 3ng/ml LIF: el efecto de esta dosis se muestra en los gráficos pero se excluye del análisis estadístico, ya para esa condición n= 1).

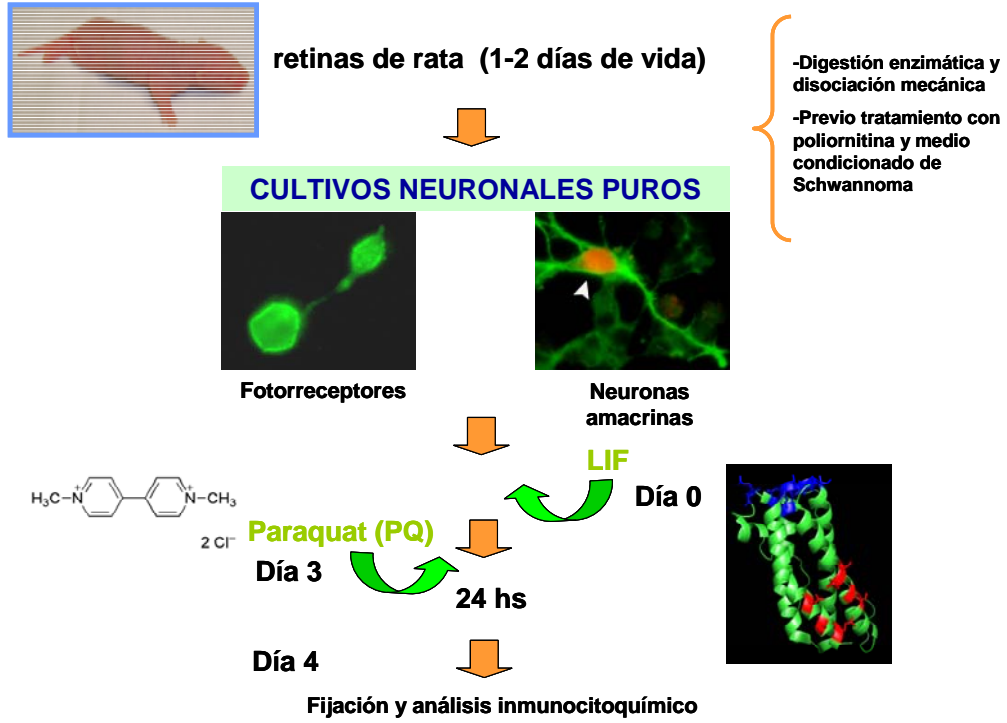


Ilustración 12: Esquema del protocolo resumido usado para nuestros experimentos

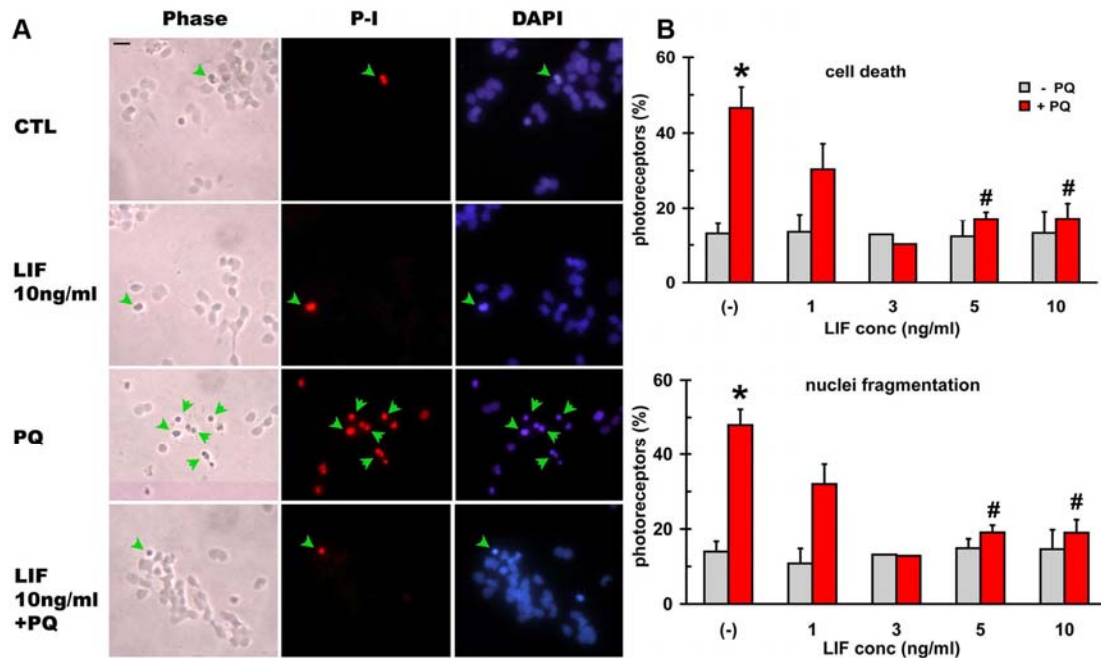


## RESULTADOS

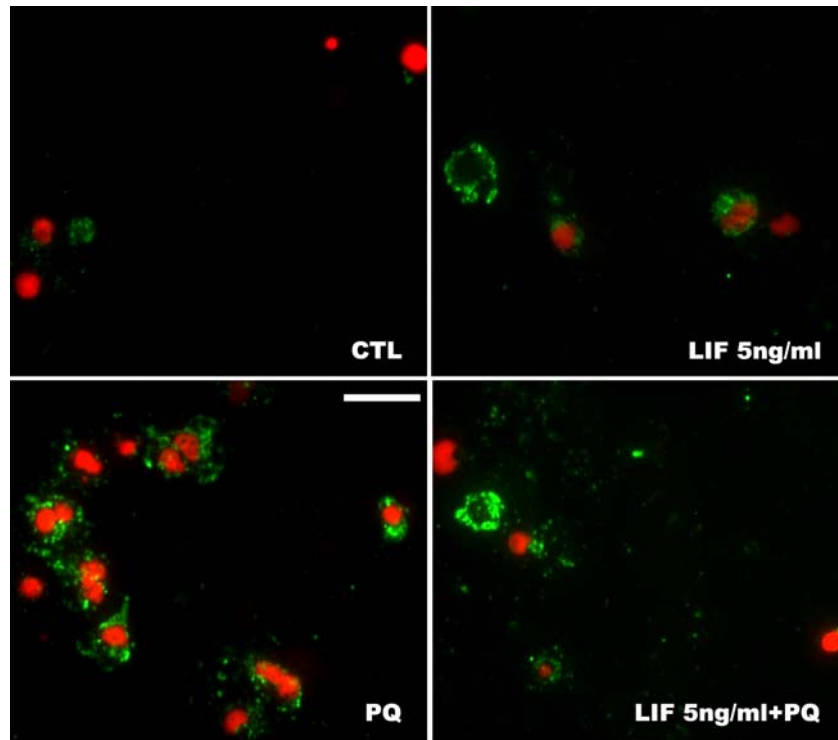
Nuestros resultados muestran que LIF puede proteger los fotorreceptores del daño inducido por PQ en cultivos neuronales puros de retina de rata, en ausencia de células gliales de Müller. La respuesta de los fotorreceptores es directa, y la protección no es la consecuencia indirecta de la estimulación de las células de Müller. Como se muestra en la **Figura 9B**, concentraciones crecientes de LIF incrementaron la supervivencia de los fotorreceptores sujetos al tratamiento con PQ. En comparación con cultivos control (-), LIF disminuyó significativamente la muerte celular de los fotorreceptores y la fragmentación nuclear, a concentraciones mayores a 1 ng/ml. La **Figura 9A** muestra fotorreceptores representativos en cultivos tratados o no con 10ng/ml LIF, y con o sin PQ, y el efecto protector de LIF. Los cultivos control (CTL), tratados con LIF, o LIF y PQ mostraron una disminución significativa en el número de fotorreceptores TUNEL positivos respecto a los cultivos tratados sólo con PQ (**Figura 11A, 11B**). Estos resultados fueron consistentes con los determinados para muerte celular, fragmentación nuclear, y para la tinción con Anexina V-PI (**Figura 10**).

Como fuera descrito previamente para CNTF y LIF *in vitro* (Ezzeddine et al., 1997), y para CNTF *in vivo* (Wen et al., 2008), nuestro modelo de cultivo mostró que en respuesta a LIF, la expresión de opsina en fotorreceptores disminuyó en respuesta a LIF, a cada concentración probada, como se muestra en la **Figura 12**, sugiriendo que el efecto sobre la maduración de los fotorreceptores en cultivos es independiente de la concentración de LIF, posiblemente por un mecanismo distinto al que induce el efecto protector. Los efectos protectores de LIF protegiendo fotorreceptores sujetos a estrés *in*

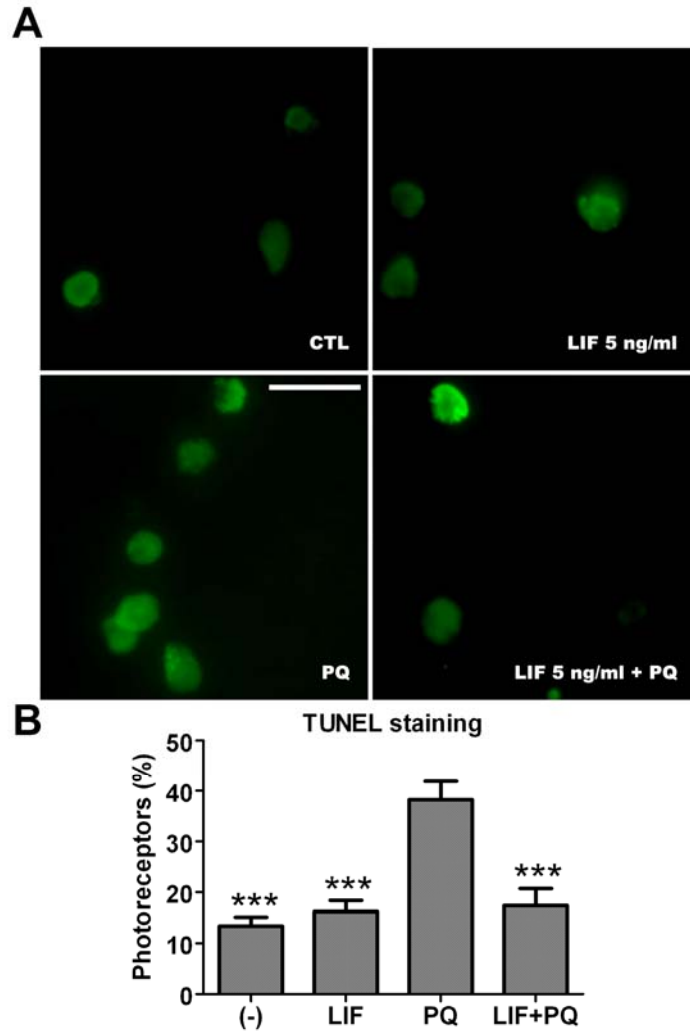
*vivo* han sido asociados a la activación de STAT3 (Chollangi et al., 2009; Joly et al., 2008b; Ueki et al., 2008) “corriente abajo” de la activación del receptor gp130 por su ligando (Ueki et al., 2009). Aquí, mostramos cualitativamente por la técnica western blot que tanto la expresión de STAT3 como su fosforilación son mínimas a los 30 min seguidos a la suplementación de los cultivos con 5ng/ml LIF, aumentan a los 2 días y retornan a niveles basales a los 4 días en el cultivo, comparado con cultivos control (CTL) (**Figura 13**). Estos datos sugieren que los cultivos neuronales de retina reproducen los eventos de señalización que ocurren en los modelos *in vivo*, en respuesta a citoquinas de estrés, y correlacionan la activación de la cascada de señalización gp130/STAT3 con los efectos de LIF en la supervivencia de los fotorreceptores expuestos a estrés oxidativo (**Figuras 9, 10, 11**), y con el bloqueo de la maduración de estos fotorreceptores (**Figura 12**).



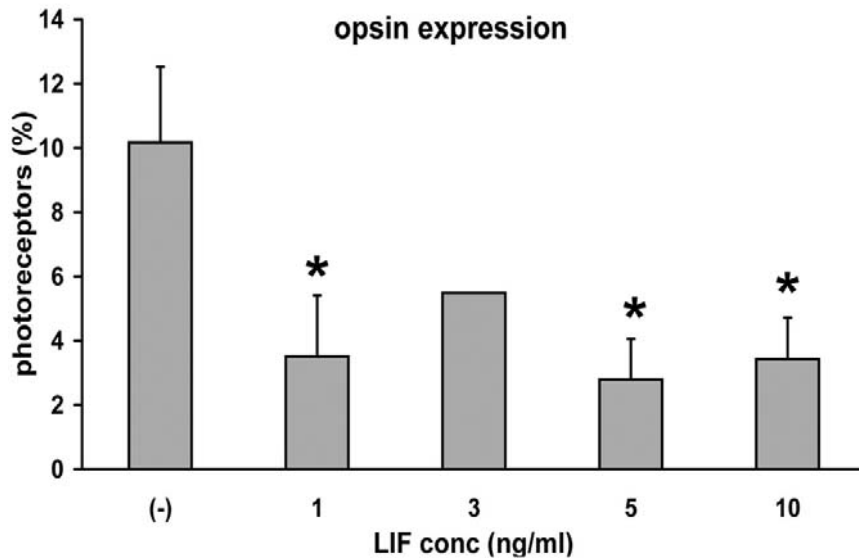
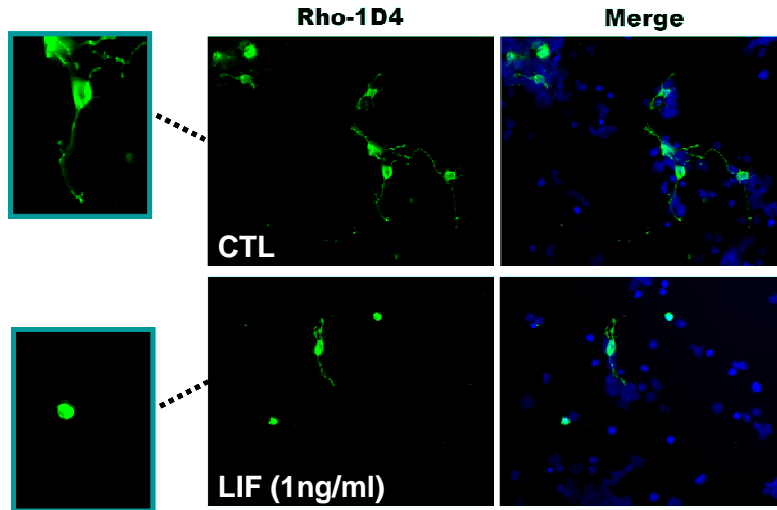
**Figura 9. Efecto de LIF en la supervivencia de fotorreceptores luego de la inducción de estrés oxidativo.** A) Micrografías de contraste de fase (izquierda) y de fluorescencia mostrando muerte celular con ioduro de propidio (PI) (rojo) e integridad nuclear con DAPI (azul). Flechas verdes: neuronas picnóticas o apoptóticas. LIF preservó la integridad nuclear de los fotorreceptores y disminuyó la muerte inducida por PQ. Escala: 10  $\mu$ m. B) Porcentaje de muerte celular y fragmentación nuclear en fotorreceptores de cultivos control (-) o luego del pretratamiento con diferentes concentraciones de LIF al día 0, seguido o no por tratamiento con PQ (48  $\mu$ M) al día 3 durante 24 hs. (n= al menos 3 para cada condición, excepto para 3ng/ml LIF; \* p<0.05 respecto al control (-), # p< 0.05 respecto al tratamiento sólo con PQ. Barras de error, SEM).



**Figura 10. Efecto de LIF sobre la marcación neuronal con Anexina V luego de tratamiento con PQ.** Micrografías de fluorescencia mostrando análisis de apoptosis con co-marcación usando ioduro de propidio (PI: rojo) y Anexina V (verde) en neuronas de cultivos de 4 días. Las células fueron tratadas sin (CTL), o tratadas con LIF (LIF 5ng/ml), o con PQ solamente (PQ) o tratadas con LIF y luego con PQ (LIF 5ng/ml+PQ). Los cultivos tratados con LIF y luego sujetos a estrés oxidativo con PQ tuvieron niveles menores de muerte celular que los cultivos tratados sólo con PQ. Escala: 20  $\mu$ m

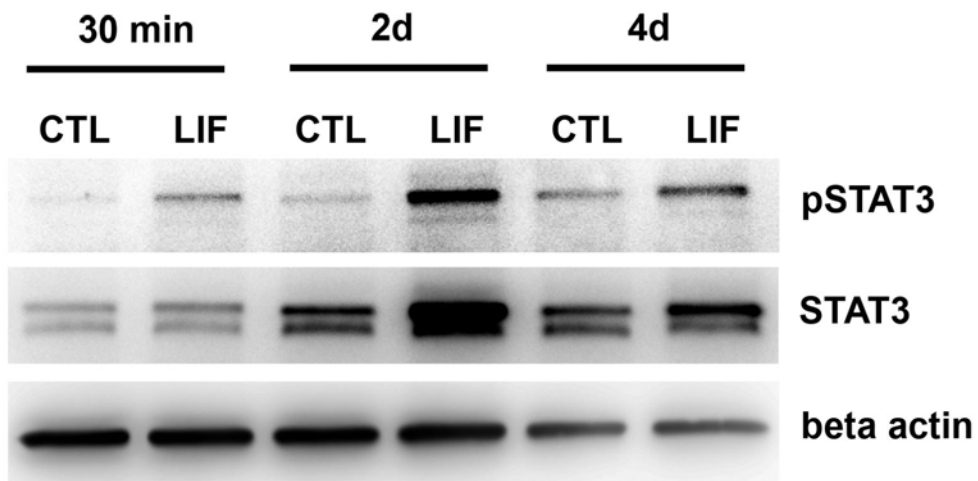


**Figura 11. Efecto protector de LIF para los fotorreceptores frente al estrés oxidativo evaluado con la técnica de TUNEL.** A) Micrografías de fluorescencia mostrando el análisis de apoptosis neuronal con el ensayo de TUNEL en cultivos de 4 días. Las células fueron no tratadas (CTL), tratadas con LIF, tratadas con PQ (PQ), o con LIF y luego PQ (LIF+PQ). Escala: 20 $\mu$ m. B) Cuantificación de fotorreceptores TUNEL positivos luego de los tratamientos descritos en (A). El tratamiento con LIF redujo significativamente el porcentaje de fotorreceptores apoptóticos luego del tratamiento con PQ (n=5, \*\*\*p <0.05 respecto a PQ. Barras de error, SEM



**Figura 12. Efecto de LIF en la expresión de opsina en fotorreceptores.** Micrografías de fluorescencia mostrando la expresión de opsina usando el anticuerpo monoclonal Rho-1D4 (verde) al día 4 en cultivo (20X de magnificación). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul) LIF disminuyó el porcentaje de fotorreceptores que expresaron opsina en los cultivos, en comparación a cultivos control (CTL o (-)). En cultivos tratados con LIF, la opsina se concentró en el soma de los fotorreceptores, mayoritariamente carente de

procesos (n=al menos 3 para cada condición, \* $p < 0.05$  respecto al control (-). Barras de error, SEM).



**Figura 13. Expresión y fosforilación de STAT3 en cultivos neuronales puros de retina.**

Western blot representativo mostrando que el tratamiento de cultivos neuronales con 5 ng/ml LIF aumentó la expresión y activación de (pSTAT3) a los 2 días *in vitro*, comparado a los cultivos control (CTL).



## DISCUSIÓN

En nuestro modelo de cultivo, LIF protegió los fotorreceptores del daño inducido con PQ, y redujo la expresión de opsina, corroborando su habilidad para inhibir la maduración de los fotorreceptores *in vivo*. Estos efectos fueron probablemente intrínsecos a los fotorreceptores y no la consecuencia de vías de señalización activadas en las células gliales de Müller, ya que este tipo de cultivo es exclusivamente neuronal. También, demostramos que las neuronas en cultivo expresan y activan la vía de señalización gp130/STAT3 en respuesta a LIF. Proponemos a este sistema de cultivo neuronal como un modelo adecuado para determinar mecanismos implicados en la neuroprotección contra el estrés oxidativo. Dado que LIF redujo la expresión de opsina, este sistema sería útil para determinar si la neuroprotección y la disminución en la expresión de genes de la fototransducción son regulados por mecanismos moleculares independientes.

La tecnología Cre-lox representa una gran herramienta que podría ser empleada para estudiar neuroprotección de fotorreceptores sujetos a estrés. Ratones con expresión específica de la recombinasa cre en fotorreceptores bastones o conos (Le et al., 2004; Le et al., 2006a; Le et al., 2006b; Le, 2011) o en la totalidad de la neuroretina (Rowan and Cepko, 2004) han sido utilizados en el laboratorio del Dr. Ash para generar exitosamente ratones con delección del receptor gp130 específicamente en fotorreceptores o en la neuroretina entera (Ueki et al., 2009; Ueki et al., 2010). Ya que las citoquinas de la familia IL-6, incluyendo LIF y CNTF, son ligandos de gp130, y activan a STAT3, los cultivos neuronales puros de retinas de estos ratones KO específicos podrían contribuir la comprensión de los mecanismos que gobiernan la protección o el efecto en la maduración

de los fotorreceptores, activados por citoquinas endógenamente liberadas en respuesta al estrés.

## **Capítulo III**

**El preconditionamiento por luz cíclica previene la oxidación de ADN en los fotorreceptores y la degeneración retinal inducida por daño por luz.**

El presente capítulo describe los resultados obtenidos con modelos *in vivo*, bajo la dirección del Dr. John Ash en el Departamento de Oftalmología en la Universidad de Oklahoma Health Sciences Center (OUHSC). Esta experiencia representó un cambio metodológico que enriqueció el desarrollo de mi carrera, y que permitió investigar desde otra perspectiva cuáles son los mecanismos que protegen a los fotorreceptores sujetos a estrés.

## **INTRODUCCIÓN**

Como ya dijéramos, la exposición a la luz visible brillante conduce a la pérdida específica e irreversible de los fotorreceptores de retina (Noell et al., 1966). Durante el curso de los procesos degenerativos, ocurren cambios morfológicos en los fotorreceptores, que incluyen la vesiculización de los discos, “swelling” mitocondrial, incremento en la densidad citoplasmática (Moriya et al., 1986; Szczesny et al., 1995), picnosis nuclear y fragmentación del ADN y finalmente la muerte de los fotorreceptores (Gordon et al., 2002) principalmente por la vía apoptótica (Abler et al., 1996; Wenzel et al., 2005). El estrés oxidativo es un probable componente en la patogénesis de la degeneración retinal inducida por luz (Organisciak et al., 1999; Ranchon et al., 2003; Tanito et al., 2007) y generalmente es aceptado que los radicales libres formados durante el estrés oxidativo pueden atacar directamente biomoléculas críticas para la función celular normal, tales como lípidos y proteínas (Organisciak et al., 1992; Tanito et al., 2005; Tanito et al., 2006; Wiegand et al., 1983). Además, los ácidos nucleicos también son “blancos” para las modificaciones oxidativas (Halliwell, 1999). Un producto mayoritario de la modificación de bases de ADN, 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG), es

inducido por los radicales hidroxilo, singuletes de oxígeno, o la acción fotodinámica (Shibutani et al., 1991b) y es un marcador establecido de daño de ADN inducido por estrés (Halliwell, 1999; Toyokuni et al., 1999). La exposición a luz brillante intensa puede inducir incrementos de 8-OHdG en el tejido retinal (Organisciak et al., 1999), específicamente en la capa nuclear de los fotorreceptores (Tanito et al., 2002).

Durante el estrés generado por la exposición a intensa luz brillante, las células de la retina inician una respuesta protectora para rescatar los fotorreceptores mediante la secreción de una variedad de citoquinas, y/o factores neurotróficos, regulando positivamente el sistema de defensa antioxidante, y regulando la expresión de componentes del metabolismo energético en los fotorreceptores (Burgi et al., 2009; Chaum, 2003; Huang et al., 2004; LaVail et al., 1992a; Penn et al., 1987; Wen et al., 1995b). Esta respuesta protectora puede ser iniciada al preexponer la retina a dosis de luz subletales, lo que resulta en la inducción de protección contra la subsecuente exposición a daño con luz (Li et al., 2001; Li et al., 2003; Liu et al., 1998). Entre las varias citoquinas secretadas durante el acondicionamiento y/o el daño por luz, LIF aumenta significativamente (Burgi et al., 2009; Chollangi et al., 2009). LIF media su efecto protector contra el daño por luz a través de la activación del receptor tirosina kinasa gp130 con la consecuente activación de STAT3 en la retina (Ueki et al., 2008). La inhibición del receptor de LIF (LIFR) reduce dramáticamente la protección inducida por el acondicionamiento (Chollangi et al., 2009) apoyando el rol de la cascada de señalización intracelular gp130/STAT3 en la protección endógena inducida por el acondicionamiento. La ausencia de LIF aceleró la muerte de los fotorreceptores en un modelo animal de degeneración retinal hereditaria (Joly et al., 2008b), fortaleciendo la

idea de que el rol neuroprotector de gp130/STAT3 no es exclusivo para el daño por luz, y probablemente representa una vía de protección general, presente también en enfermedades genéticas de la retina.

Trabajos previos realizados en el laboratorio del Dr. Ash, a cargo de los Dres. Srinivas Chollangi y Jiangang Wang, claramente demostraron que el preconditionamiento por luz protege la función y morfología retinales del subsiguiente severo daño por luz (Chollangi et al., 2009), lo que ocurre en parte por la activación de gp130 (Ueki et al., 2009). Dada la implicancia del estrés oxidativo como factor desencadenante de la degeneración inducida por luz, hipotetizamos que el mecanismo protector por el cual la activación de gp130/STAT3 inducida por el preconditionamiento conduce a la neuroprotección es la disminución/eliminación de biomoléculas oxidadas. En este capítulo, ofrecemos evidencia de que la disminución en la oxidación de ADN en fotorreceptores es parte del mecanismo protector inducido por el preconditionamiento previo al daño por luz. Inesperadamente, la exposición severa a daño por luz no causó aumentos significativos en la acumulación de modificaciones nitrotirosinas, carbonilos, o 4-HNE, y el preconditionamiento no alteró los niveles de dichos grupos.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales y exposición lumínica:**

Todos los procedimientos fueron aprobados y realizados de acuerdo a las direcciones dadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de la OUHSC. Los ratones BALB/cJ (5-6 semanas de vida) fueron obtenidos de Jackson laboratories y mantenidos a una intensidad de luz cíclica de 60 luxes al nivel de la jaula (12 hs ON: 12 hs OFF) por dos semanas previas a la realización de los experimentos. Algunos animales fueron mantenidos en condiciones de luz cíclica con 600 lux para el acondicionamiento (12 hs ON: 12 hs OFF) durante 6 días. Al final del 6<sup>to</sup> ciclo, algunos animales fueron sometidos a daño con luz, consistente en luz fluorescente blanca difusa, mantenida a una intensidad de 4.000 luxes al nivel de la jaula durante 5 hs. Animales no expuestos a acondicionamiento o daño por luz sirvieron como controles. Los ratones fueron mantenidos en la oscuridad previa recolección de sus retinas para análisis por western blot, o de sus ojos para ser procesados con fines inmunohistoquímicos. Un grupo de ratones, tras la exposición, fue sujeto a un período de “recuperación” de 4 días bajo condiciones de iluminación normales en el bioterio (60 luxes: 12 hs ON: 12 hs OFF), para análisis electroretinográfico (ERG) y morfométrico de las retinas. El paradigma de exposición a acondicionamiento y daño por luz se esquematiza en la **Ilustración 13**.

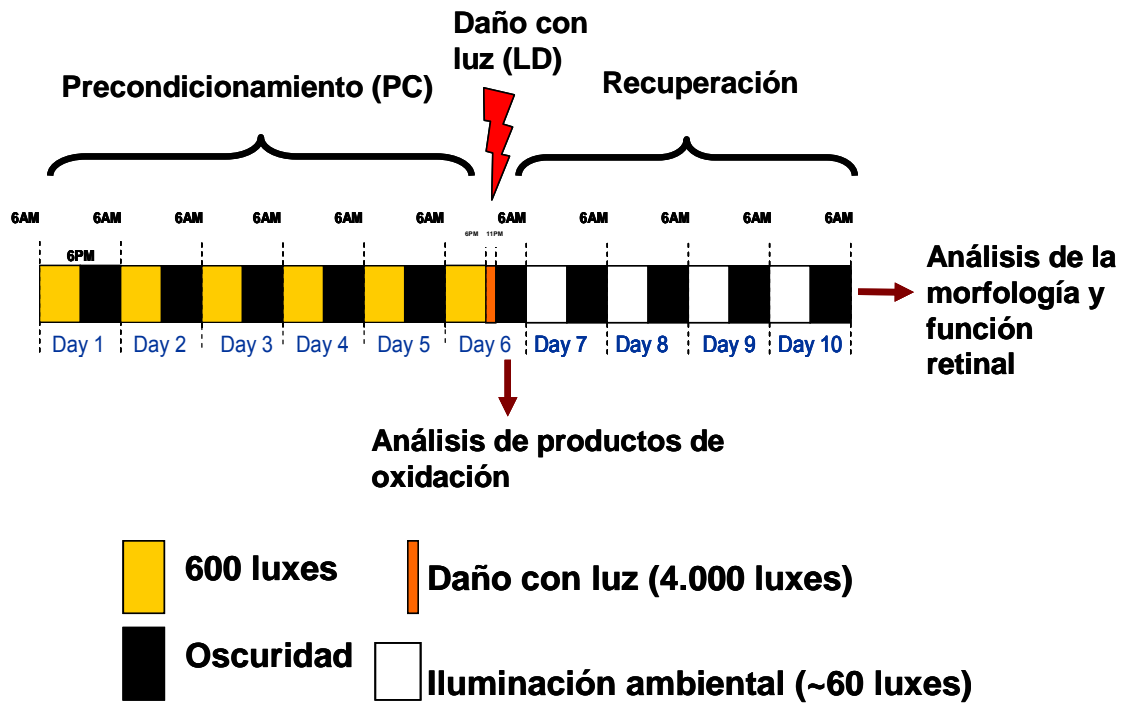


Ilustración 13. Representación esquemática de los paradigmas utilizados en este trabajo.



### **Electrorretinografía (ERG)**

La respuesta electroretinográfica escotópica de campo lleno, correspondiente a la onda- a, fue registrada usando un instrumento Espion E2 con domo Colordome Ganzfeld (Diagnosys, Littleton, MA) para medir la función de los fotorreceptores sobrevivientes. El análisis fue llevado a cabo de acuerdo a previos trabajos (Ueki et al., 2008).

Brevemente, luego de 8 hs de adaptación en la oscuridad, los ratones fueron profundamente anestesiados usando una sóla inyección intraperitoneal de xilazina (7 mg/kg) y ketamina (40 mg/kg). Los ratones fueron luego posicionados en una plataforma a 37°C durante todo el tiempo del experimento. Las pupilas fueron dilatadas con 10% fenilefrina. Los ERGs, para cada ojo, fueron registrados usando un electrodo de alambre de oro posicionado en el centro de la córnea. Un electrodo de referencia de platino fue fijado en la boca, y un electrodo aguja de platino fue usado como electrodo de tierra. La posición de los electrodos fue monitoreada usando una cámara infrarroja. Los ratones adaptados en la oscuridad fueron expuestos a una serie de flashes de luz de crecientes intensidades (0.002, 0.02, 0.2, 2, 20, 200, 400 y 600  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) (la intensidad lumínica de 1cd produce una iluminación de 1 lux a 1 metro de distancia desde la fuente de luz). La amplitud de la onda- a fue medida desde la base hasta el mínimo de la onda- a. Luego de realizar los registros electroretinográficos, los ojos fueron recolectados para análisis histológico.

### **Análisis morfométrico de la retina**

Los ratones fueron sacrificados con  $\text{CO}_2$  y los ojos marcados con tinta verde sobre la superficie dorsal para visualizar el hemisferio superior, y luego enucleados. Los ojos

fueron fijados en PERFIX (20% isopropanol, 2% ácido tricloroacético, 4% paraformaldehído, y 2% cloruro de zinc) durante 1 día, cambiados a 70% etanol a temperatura ambiente, y embebidos en parafina. Secciones sagitales a través del centro de cada ojo, incluyendo el disco óptico, fueron cortadas con un espesor de 5  $\mu\text{m}$ . Luego de la tinción con hematoxilina-eosina (H&E), las filas de núcleos de los fotorreceptores fueron contados por microscopía de luz en 12 regiones equidistantes comenzando desde la cabeza del nervio óptico hacia los hemisferios superior e inferior de la retina.

### **Western Blot**

**Detección de pSTAT3:** Para mostrar la activación de STAT3 durante el preconditionamiento por luz, extractos proteicos de retina fueron obtenidos de ratones expuestos al preconditionamiento durante 0, 2, 4, y 6 días, usando buffer de lisis (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2.0 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40), cocktail inhibidor de proteasas (Calbiochem, San Diego, CA #539131), y 1mM ortovanadato de sodio. El contenido proteico fue medido usando el kit de ensayo proteico BCA (Pierce, Rutherford, IL #23225). Para cada muestra, se sembraron 20  $\mu\text{g}$  de proteína por calle en geles 4-20% SDS-poliacrilamida (Invitrogen #EC60285), y una vez transferidas a membrana de nitrocelulosa, se trataron con el anticuerpo contra STAT3 fosforilado anti- pSTAT3 (Cell Signaling Technology #9145L), y el respectivo anticuerpo secundario conjugado a HRP.

**Ensayos para detección de proteínas oxidadas:** Inmediatamente luego del sacrificio del animal, las retinas fueron diseccionadas, colectadas en microtubos, y congeladas en nitrógeno líquido. Las retinas fueron lisadas en buffer conteniendo 10 mM TrisCl (pH 7.4), 100 mM NaCl, 1mM EDTA, 110mM n-octil- $\beta$ -D-glucopiranosida (Calbiochem), suplementado con cocktail inhibidor de proteasas (Calbiochem, 1mM).

Detección de proteínas carboniladas: El kit de detección de proteínas oxidadas Oxyblot (Chemicon, #S7150) fue usado con modificaciones. Brevemente, las muestras experimentales (50  $\mu$ g) y BSA carbonilado como control positivo, fueron sembradas en duplicado en gel 4-20% de poliacrilamida (Invitrogen). En un set de las muestras, los carbonilos fueron previamente reducidos con borohidrato de sodio (20 mM) para control de la especificidad de reactivos, previamente al paso de derivatización con 2,4-dinitrofenil hidrazina. A continuación, las proteínas fueron separadas por electroforesis, y transferidas a membrana de nitrocelulosa, y los sitios de unión inespecíficos bloqueados con una solución 5%o albúmina bovina sérica (BSA) en buffer TBST. La incubación con anticuerpo primario se realizó para inmunodetectar los grupos carbonilo.

Detección de proteínas nitradas: Las muestras experimentales (50  $\mu$ g) y control fueron cargadas por duplicado en gel 4-20% de poliacrilamida y transferidas a membrana de nitrocelulosa. Luego la membrana fue cortada en dos partes conteniendo un set de muestras cada mitad. Una mitad de la membrana fue incubada con una solución 0.1M de hidrosulfito de sodio (ditionito) (Sigma, St. Louis, MO), preparado en una solución de 50mM NaHCO<sub>3</sub> (pH 9.0) para reducir los grupos nitrotirosina a aminotirosina. Las bandas de proteínas nitradas fueron reducidas por el ditionito, indicando la especificidad del anticuerpo contra los grupos nitrotirosina (Upstate Biotechnology, Lake Placid, NY #05-233). Los controles positivos para proteínas nitradas fueron obtenidos tratando lisados retinales con 100  $\mu$ M peroxinitrito (Cayman, Denver, CO). Paralelamente, luego de la corrida electroforética, los geles fueron teñidos con Gelcode blue (Pierce, Rockford, IL) para evaluar la presencia de igual carga de proteínas para los ensayos usados en la detección de proteínas carboniladas y nitradas.

## **Immunohistoquímica**

Detección de pSTAT3: Luego de 0, 2, 4, y 6 días de acondicionamiento los ojos de ratones fueron enucleados. Para cada ojo, la córnea y lentes fueron removidos y la copa del ojo fijada en 2% paraformaldehído/1x PBS suplementado con 1mM ortovanadato de sodio por 20 min. Luego, la copa del ojo fue crioprotegida con solución de sacarosa (10, 15, y 30% en 1x PBS) y secciones transversales de la retina de 14  $\mu\text{m}$  fueron obtenidas usando un crióstato. Las secciones retinales fueron lavadas con 1% Tritón/ 1x PBS, bloqueadas con solución 5% BSA, e inmunomarcadas con anticuerpo anti-pSTAT3. La captura de imágenes fue realizada usando un sistema confocal de barrido por láser Olympus FluoView FV500 (Olympus, Center Valley, PA). La captura de imágenes y parámetros del microscopio fueron idénticos para todas las muestras. Un total de 3 ratones por grupo fueron analizados.

Detección de células TUNEL positivas: Los ojos fueron colectados a distintos tiempos luego del daño por luz para obtener secciones histológicas embebidas en parafina, cortadas a través del nervio óptico. Las secciones fueron deparafinizadas y digeridas con proteinasa K durante 2-3 min, y luego de varios lavados con 1x PBS, pretratadas con buffer 1x TdT durante 10 min, e incubadas con la mezcla de marcación, compuesta por 4  $\mu\text{M}$  biotin-16-dUTP (Roche Applied Science, Indianapolis, IN#11093070910), y 0.3 U/ $\mu\text{l}$  terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) (Invitrogen, Carlsbad, CA #10533-065) en buffer 1x TdT durante 1h a 37°C en cámara humidificada. La reacción enzimática fue detenida usando buffer de lavado stop (300mM NaCl, 30mM citrato de sodio). Para detectar células TUNEL positivas, las secciones fueron bloqueadas con 10 % suero

normal de caballo en 1xPBS, por 1h, e incubadas con Streptavidina conjugada con Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR), dos con DAPI. Los controles negativos fueron realizados omitiendo la enzima TdT en la mezcla de marcación, y los controles positivos con el pretratamiento de las muestras con RQ1 DNase (Promega, Madison, WI # M610A).

Detección de 8-OHdG: Los ojos fueron colectados 8 hs luego de finalizada la exposición a daño por luz y la inmunodetección de ADN oxidado fue realizada usando un anticuerpo monoclonal específico contra 8-hidroxideoxiguanosina (8-OHdG) (JaICA, Japan #MOG 020), previo tratamiento para desenmascarar antígenos con buffer 10mM citrato de sodio (pH 6.0). La cuantificación de fotorreceptores 8-OHdG positivos para cada muestra, fue hecha en 4 diferentes regions equidistantes, a lo largo de los hemisferios superior e inferior de la retina, y el número fue expresado como porcentaje relativo al número total de fotorreceptores contados.

### **Análisis estadístico**

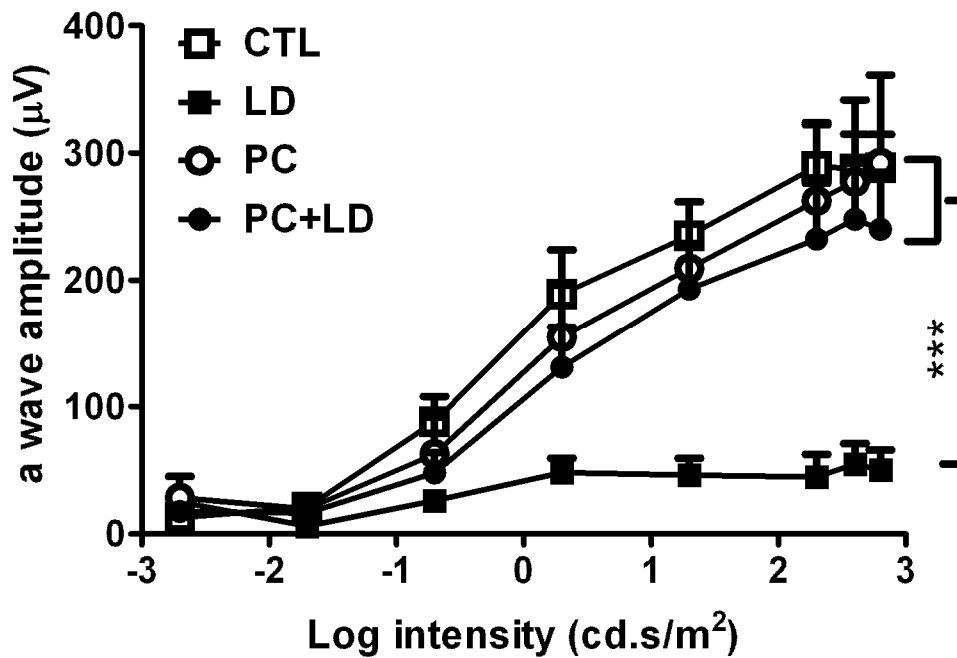
Para comparaciones múltiples de medias se realizó ANOVA simple, seguido de la prueba de Newman-Keuls, o ANOVA doble, seguido de la prueba de Bonferroni (n= 4 excepto indicado de otra manera).

## RESULTADOS

### **El preconditionamiento protege la función y morfología de los fotorreceptores en correlación con la activación de STAT3 retinal**

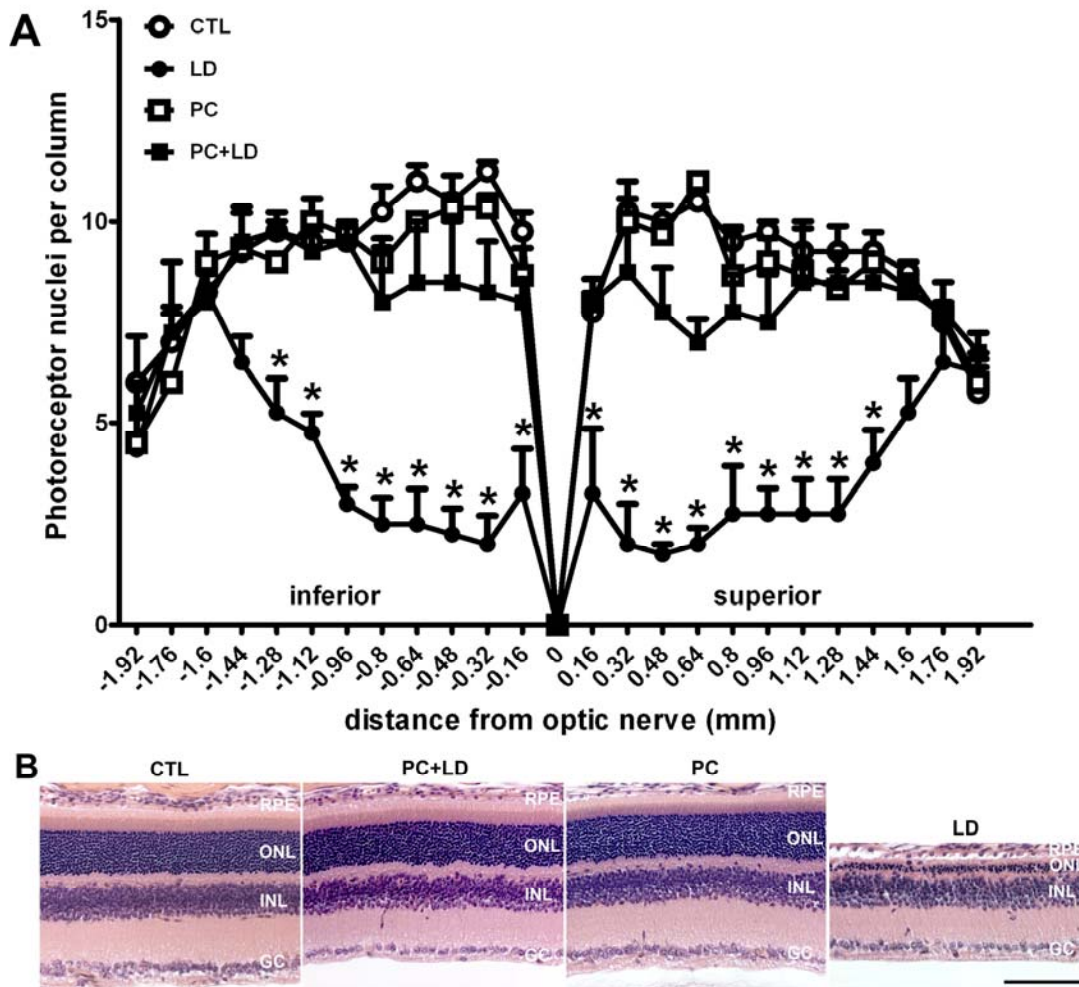
Estudios previos en el laboratorio del Dr. Ash demostraron que los los fotorreceptores de retina son protegidos por preconditionados previo a la exposición al daño por luz (Chollangi et al., 2009), al menos en parte, debido a la regulación positiva de citoquinas de estrés, tales como LIF, OSM, CLC, y CT-1, señalizando a través de la vía gp130/STAT3.

Para aumentar el nivel de detección de productos de oxidación causados por la exposición severa a luz brillante, usamos un paradigma consistente en un período de tiempo mayor que en estudios anteriores (5 hs, 4.000 luxes vs 4hs, 4.000 luxes). Nuestros resultados de ERG (**Figura 14**) y el análisis morfométrico (**Figura 15**) reprodujeron la muerte de los fotorreceptores, y la protección impartida por el preconditionamiento previo. El preconditionamiento causó una significativa activación de STAT3 en la retina, detectada por western blot a distintos tiempos (**Figura 16**), y por análisis inmunohistoquímico (**Figura 17**). De interés, la localización inmunohistoquímica de pSTAT3 en criosecciones retinales, fue detectada en la capa nuclear interna, en forma de “parches” e incluyó áreas de fotorreceptores, núcleos de RPE células y células gliales de Müller, un subconjunto de las cuales se demostró sintetiza LIF en respuesta a estrés genético e inducido por luz (Joly et al., 2008b), (**Figura 17**).



**Figura 14. Evaluación funcional del efecto protector inducido por el acondicionamiento en fotorreceptores de retina**

Amplitudes de ondas-a registradas por ERG de ratones Balb/cj sujetos a acondicionamiento (PC), acondicionamiento seguido de daño por luz (PC+LD), sujetos sólo a daño por luz (LD), o no expuestos a ningún tratamiento (CTL), 4 días después de la exposición al daño por luz. Comparado con ratones CTL, los ratones expuestos a daño por luz exhibieron pérdida casi completa de su función. Los ratones expuestos al acondicionamiento previo al daño por luz, preservaron casi completamente su función. (n= 4 para cada grupo), \*\*\* <0.05 comparado grupos CTL, PC, y PC+LD al grupo LD, analizado por ANOVA doble, seguido de prueba de Bonferroni. Barras de error, SEM.

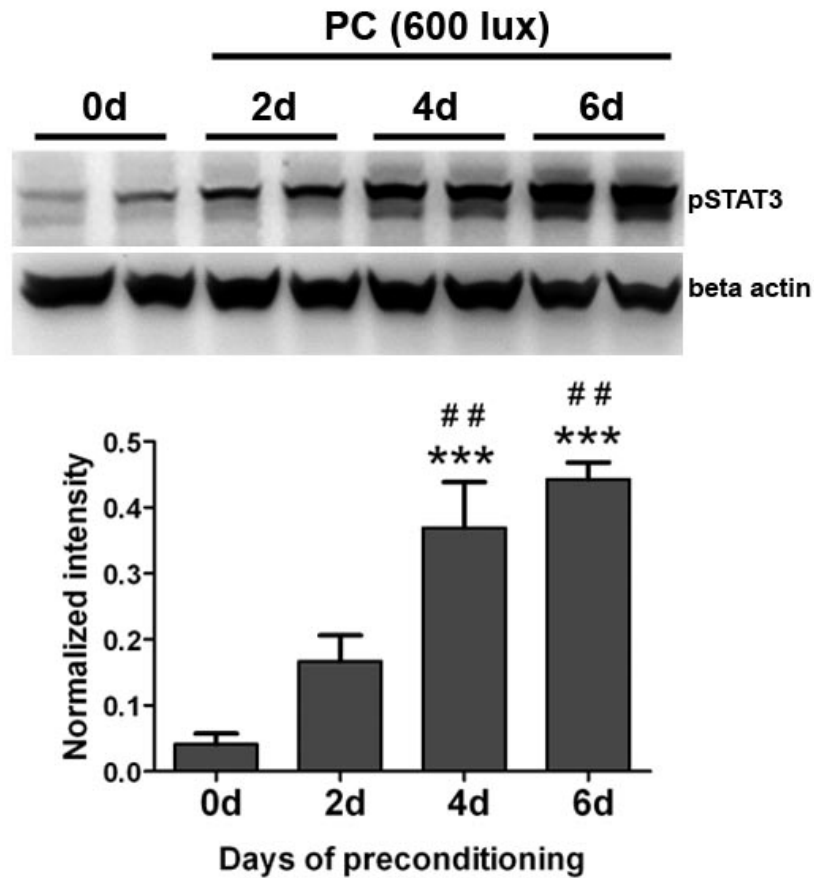


**Figura 15. Evaluación morfológica de la protección inducida por el preconditionamiento en fotorreceptores de retina.**

A) Cuantificación del número de capas de fotorreceptores para cada condición. Los fotorreceptores fueron contados a lo largo del meridiano vertical de los ojos, empezando por la cabeza del nervio óptico. Comparado con los ratones CTL, los ratones dañados por luz (LD) perdieron casi todos sus fotorreceptores. Por el contrario, los ratones que fueron expuestos al preconditionamiento, y luego al daño por luz (PC+LD), preservaron significativamente la morfología retinal, mientras que el preconditionamiento sólo (PC) no provocó alteraciones en el número de capas de fotorreceptores. (n= 4 para cada

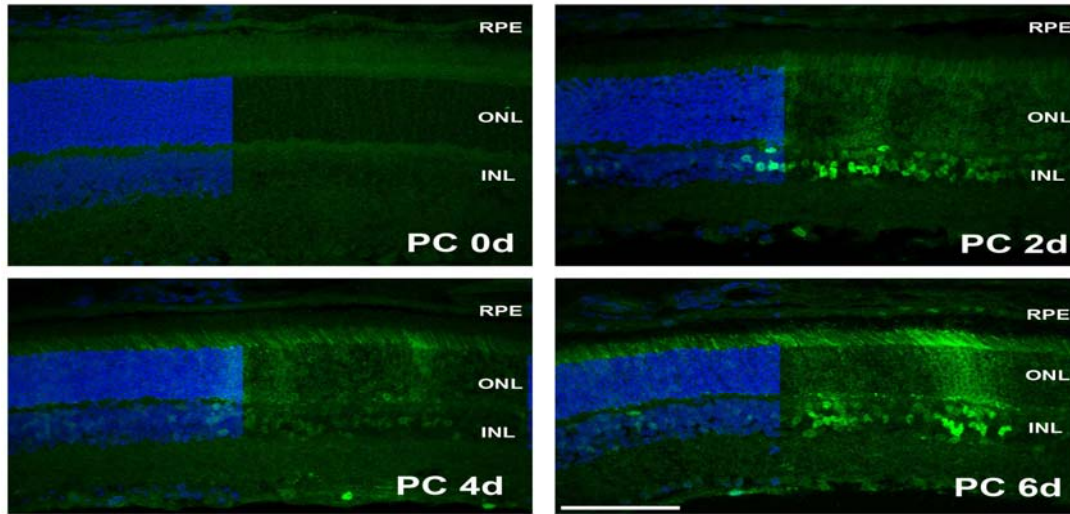


grupo), \* $p < 0.05$  comparando CTL, PC, y PC+LD al LD analizado por ANOVA doble, seguido de prueba de Bonferroni. Barras de error, SEM. B) Secciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina mostrando las filas de fotorreceptores restantes 4 días después de la exposición al daño por luz. Comparado con ratones CTL, retinas dañadas por luz (LD), perdieron la mayoría de sus fotorreceptores, mientras que el preconditionamiento protegió contra dicha pérdida (PC+LD). Escala: 100  $\mu\text{m}$ .



**Figura 16. Activación de STAT3 retinal durante el preconditionamiento.**

Análisis por western blot mostrando la fosforilación de STAT3 durante diferentes tiempos de exposición al tratamiento con preconditionamiento. Comparado con ratones normales (CTL o 0d), 2 a 6 días de preconditionamiento (PC) incrementaron significativamente la activación de STAT3 en la retina. (n= 4 para cada grupo), \*\*\* y ## p < 0.05 comparado a 0d y 2d, respectivamente analizado por ANOVA simple seguido de la prueba de Newman Keuls. Barras de error: SEM.



**Figura 17. Detección inmunohistoquímica de STAT3 retinal durante el preconditionamiento.**

Inmunomarcación con anti-pSTAT3 en criosecciones sagitales de retina de ratones expuestos a 2, 4, y 6 días de preconditionamiento (PC), o no expuestas o control (PC 0d).

Escala: 50  $\mu$ m.

## **La oxidación de ADN en fotorreceptores aumenta con el tiempo de exposición a la luz**

Para determinar la longitud del período de exposición a la luz que afecta la oxidación de ADN en fotorreceptores, expusimos ratones Balb/cj a 30min, 2hs, y 5hs de luz brillante of (4,000 luxes). Luego de un período de adaptación de 8hs en la oscuridad, los ojos fueron colectados para análisis inmunohistoquímico. Encontramos que una breve exposición de 30 min a 4.000 luxes fue suficiente para la oxidación de ADN, pero a las 2, y 5hs, la acumulación de este producto de oxidación fue mayor, como se indica por la medición del porcentaje de fotorreceptores 8-OHdG positivos en secciones retinales embebidas en parafina (**Figura 18**). A partir de estos datos preliminares, elegimos un período de exposición al daño por luz de 5hs, a una intensidad de 4.000 luxes para posteriores estudios del efecto del acondicionamiento en los productos de oxidación en los fotorreceptores.

## **El efecto protector del acondicionamiento reduce el porcentaje de fotorreceptores 8-OHdG positivos luego del daño por luz**

Los ojos colectados a las 8 hs de finalizada la exposición al daño por luz (5hs, 4.000 luxes) fueron procesados para análisis inmunohistológico de la oxidación de ADN en secciones embebidas en parafina con el anticuerpo específico contra 8-OHdG. El acondicionamiento por luz cíclica disminuyó la oxidación de ADN en los fotorreceptores, como se muestra en **Figura 18A**. La cuantificación de este efecto, como porcentaje de fotorreceptores 8-OHdG positivos luego del daño por luz, demostró en ambos hemisferios superior e inferior, un aumento en la oxidación de ADN que se correlacionó con un aumento en la muerte de los fotorreceptores (**Figura 19**). Los

fotorreceptores 8-OHdG positivos fueron encontrados principalmente en el centro de ambos hemisferios retinales, donde la muerte de los fotorreceptores, medida por análisis histológico 4 días después del daño por luz, fue más dramática (**Figura 15A**). El tratamiento de ratones con 6 ciclos (días) de acondicionamiento previno la acumulación de ADN oxidado tras la exposición a daño agudo por luz. Esto sugirió la activación de un mecanismo endógeno inducido por la repetida presentación de un estrés suave para la protección de los fotorreceptores frente al reto de la subsiguiente exposición a un estrés letal.

### **El acondicionamiento por luz cíclica brillante disminuye el porcentaje de fotorreceptores TUNEL positivos tras el daño por luz**

Mientras que la fragmentación de ADN es un evento apoptótico relativamente tardío, el comienzo de la formación de escaleras de ADN sucede dentro de las horas de comenzada la exposición al daño por luz, y depende de la longitud de onda y la intensidad de la fuente de luz utilizada (Li et al., 1996; Shahinfar et al., 1991). La tinción con TUNEL reveló la aparición de ADN fragmentado en la lámina nuclear externa, coincidente con la presencia de escaleras de ADN (Organisciak et al., 1999). Conocer el curso temporal relativo de los cambios apoptóticos en la fragmentación de ADN puede ayudar a dilucidar el mecanismo del daño por luz al indicar cuándo el daño a los fotorreceptores ha llegado al punto de iniciar la muerte celular. Para determinar cuándo comienzan a morir los fotorreceptores en nuestro modelo de daño por luz, los ojos de ratones control, no expuestos a la luz, (CTL) y ojos de ratones expuestos al daño por luz (LD), fueron colectados a diferentes tiempos tras el daño. Mediciones preliminares por análisis histológico de punto final mostraron que el máximo número de fotorreceptores

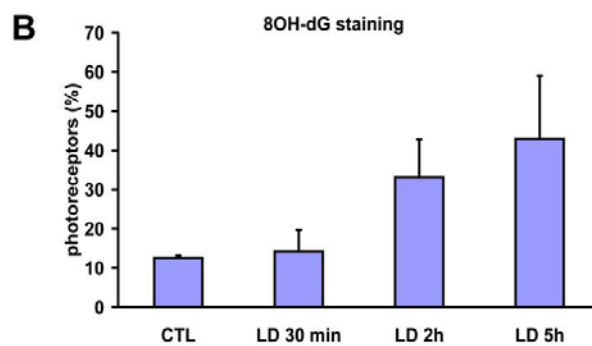
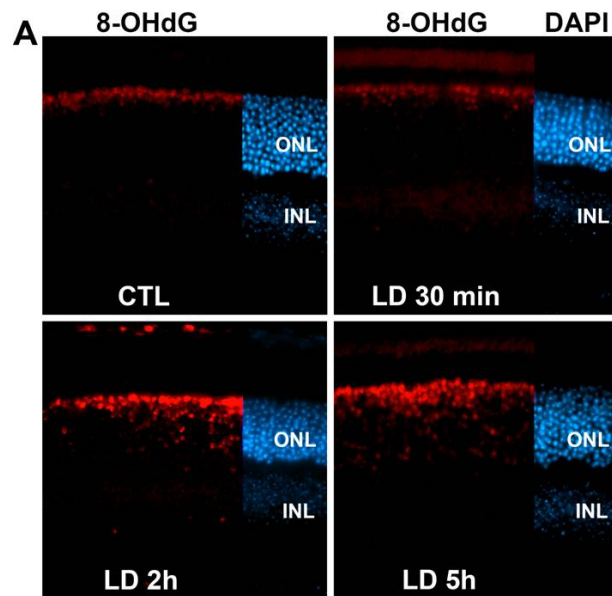
TUNEL positivos fue observado 8hs después de la exposición a la luz (**Figura 20A**).

Usamos un período de recuperación de 8hs en la oscuridad para la detección de productos de oxidación. El acondicionamiento por luz cíclica seguido por daño por luz (PC+LD) disminuyó significativamente el porcentaje de fotorreceptores TUNEL positivos medido en ambos hemisferios, superior e inferior, de la retina respecto a ratones expuestos a LD sin previo acondicionamiento (LD) (**Figura 20B, 20C**). El acondicionamiento por sí mismo (PC) no incrementó el porcentaje de fotorreceptores TUNEL positivos. Estos datos obtenidos a las pocas horas de la exposición al daño por luz, pueden ser correlacionados con la protección funcional (**Figura 14**) y morfológica (**Figura 15**) de las retinas a los 4 días de los mismos tratamientos, y sugieren la existencia de un mecanismo protector inducido por el acondicionamiento, que previene la oxidación del ADN.

### **El acondicionamiento por luz no disminuyó la oxidación de proteínas siguiendo la exposición al daño por luz**

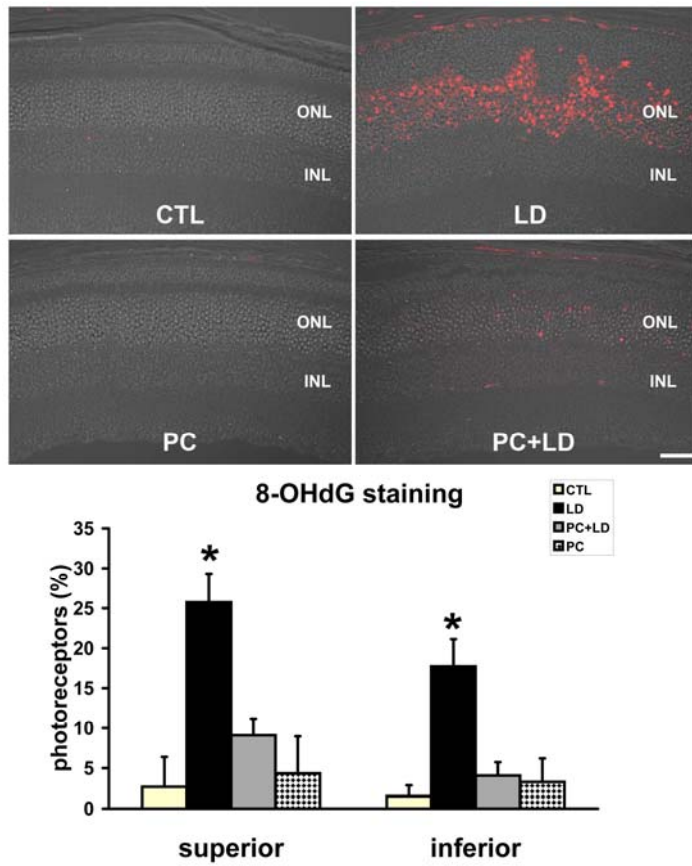
El pensamiento convencional acepta que parte del mecanismo del daño por luz, además de la oxidación de ADN, es la oxidación de proteínas retinales, como fue revisado en la introducción de este capítulo. Para evaluar si el mecanismo conducente a los efectos protectores del acondicionamiento implica la disminución o eliminación de productos de oxidación de proteínas, realizamos ensayos por western blot.

Inesperadamente en nuestro modelo, encontramos que el daño por luz no incrementó significativamente los contenidos de proteínas nitradas o carboniladas (**Figura 21**), ni la acumulación de proteínas modificadas por 4-HNE (no mostrado), y que el acondicionamiento no afectó dichos niveles.



**Figura 18. Inmunodetección de 8-OHdG en fotorreceptores tras distintos períodos de exposición al daño por luz.**

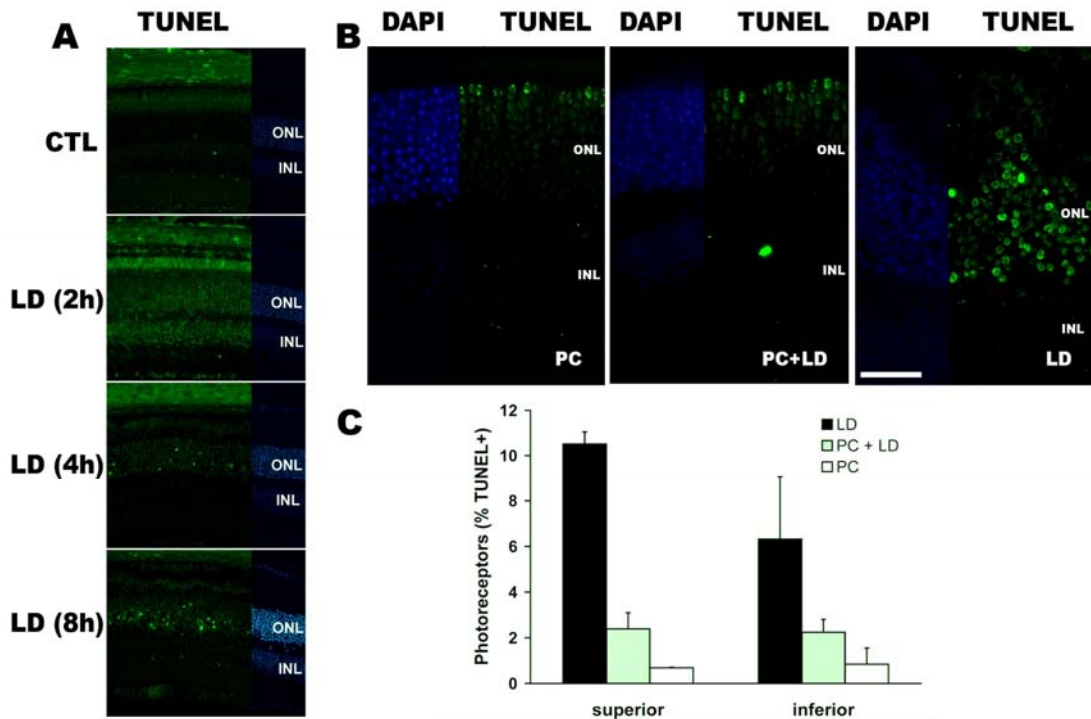
A) Una cantidad basal de oxidación de ADN fue detectada en secciones retinales embebidas en parafina de ratones control CTL y a los 30 min de daño por luz (fluorescencia roja). El tratamiento con daño por luz por 2hs (LD 2h), y 5hs (LD 5h) aumentó la oxidación de ADN en los fotorreceptores. B) Cuantificación del porcentaje de fotorreceptores 8-OHdG positivos (n= 2. Barras de error, SEM).



**Figura 19. Efecto del preconditionamiento en la oxidación de ADN en fotorreceptores luego del daño por luz.**

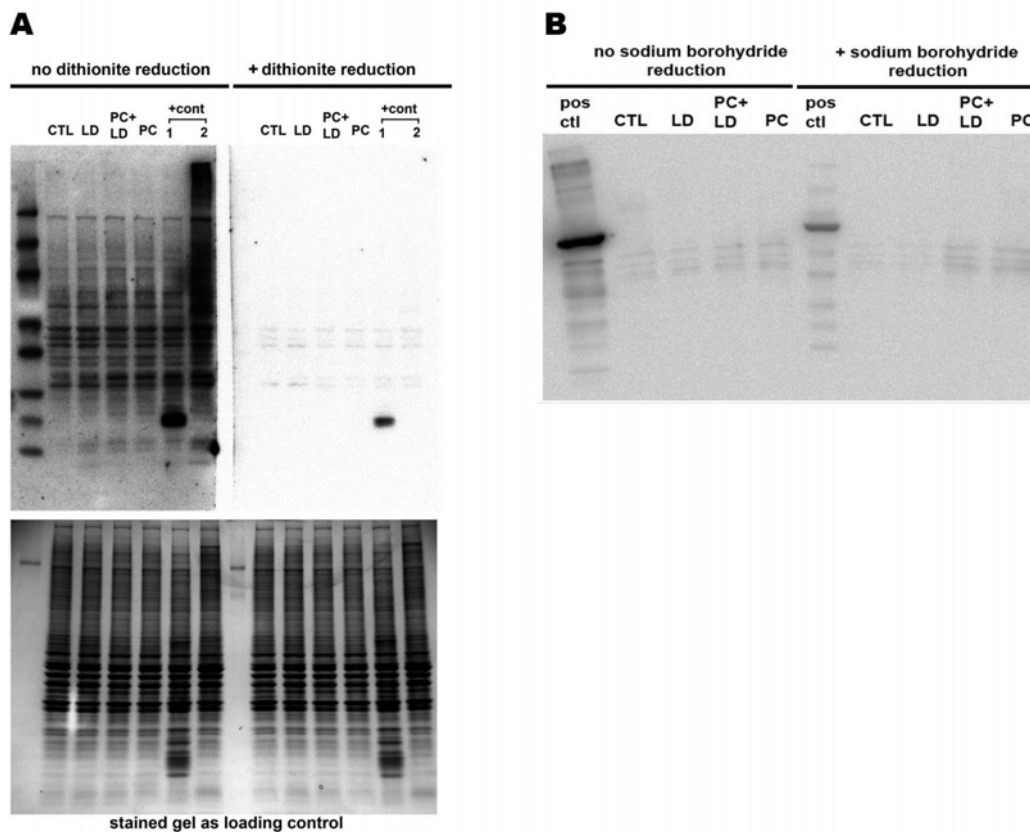
Inmunodetección de 8-OHdG para evaluar oxidación de ADN en fotorreceptores (merge con captura de Nomarski) en secciones sagitales de retina. Escala: 100  $\mu$ m. Comparado con el grupo dañado por luz (LD), las retinas preconditionadas y a continuación dañadas con luz (PC+LD) mostraron menos fotorreceptores 8-OHdG positivos (rojo). El gráfico de barras expresa el porcentaje de fotorreceptores 8-OHdG positivo hs luego de que los ratones fueron removidos del modelo de daño por luz. (n= 4 para cada grupo, \* p< 0.005 comparado al resto de los grupos realizando ANOVA simple seguido de la prueba de Newman-Keuls. Barras de error, SEM).





**Figura 20. El preconditionamiento por luz cíclica brillante disminuye el porcentaje de fotorreceptores TUNEL positivos tras el daño por luz.**

A) Tinción de TUNEL, realizada usando secciones histológicas de retinas de ratones embebidas en parafina, cortadas a través del nervio óptico, a las 2, 4 y 8 hs de finalizada la exposición al daño por luz (LD), y en ratones control (CTL). B) Tinción de TUNEL, realizada usando secciones histológicas de retinas preconditionadas (PC), preconditionadas y a continuación expuestas al daño por luz (PC+LD), y sólo dañadas por luz (LD), 8 hs luego del daño por luz. Fluorescencia verde: células TUNEL positivas, fluorescencia azul: núcleos teñidos con DAPI. C) Cuantificación del porcentaje de fotorreceptores TUNEL positivos para (B). ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna. Los fotorreceptores fueron contados a lo largo de los hemisferios superior e inferior de la retina. (n=2. Barras de error, SEM).



**Figura 21. Análisis del efecto del preconditionamiento en la oxidación de proteínas de retina.**

Blots representativos para los ensayos de detección de proteínas modificadas por grupos nitrotirosina (A) proteínas carboniladas (B) El daño por luz no causó incrementos significativos en los niveles de proteínas nitradas o carboniladas, y el preconditionamiento no tuvo efecto modificando dichos niveles.

## DISCUSIÓN

Nuestros datos sugieren que el daño por luz brillante induce la oxidación de ADN en los fotorreceptores de retina y que la previa exposición de los fotorreceptores a un modelo de acondicionamiento cíclico por luz brillante induce su eficiente protección. Este efecto neuroprotector inducido por el acondicionamiento involucró la disminución de los niveles de oxidación de ADN en los fotorreceptores. Como ha sido establecido, el daño inducido por luz causa la pérdida irreversible de los fotorreceptores de retina (Noell et al., 1966) que mueren principalmente por apoptosis (Abler et al., 1996; Wenzel et al., 2005). Nuestros resultados confirman que el acondicionamiento está implicado en rescatar los fotorreceptores de los procesos degenerativos que conducen al fenotipo patológico observado en la retina dañada por luz, y establecen que es necesario un período de 8hs de adaptación, luego de finalizada la exposición al daño por luz, para detectar la acumulación de oxidación de ADN en fotorreceptores, que a su vez se correlaciona con el inicio del proceso de su muerte por la vía apoptótica. El hecho de que la protección inducida por el acondicionamiento depende en gran parte de la regulación positiva de citoquinas de estrés, tales como LIF, que señalizan a través de la cascada gp130/STAT3 en fotorreceptores de retina (Chollangi et al., 2009; Ueki et al., 2009), apoya la prevención de oxidación de ADN como parte de la protección mediada por la activación de gp130/STAT3. En soporte a estos hallazgos, encontramos una fuerte activación de STAT3 retinal con días de acondicionamiento. Sorpresivamente, el aumento de productos de oxidación de proteínas retinales no fue significativamente detectado en este estudio. Por otro lado, la disminución de dicha oxidación no aparentó

estar implicada en los mecanismos de neuroprotección inducidos por el preconditionamiento. En nuestras manos, estos datos fueron marcadamente negativos. Una posible explicación de estos resultados es el uso de homogenados de proteína de retina para nuestros experimentos. No excluimos la posibilidad de oxidación de proteínas específicamente en las mitocondrias, la mayor fuente celular de ROS, como mecanismo de injuria por el daño por luz, ni un posible mecanismo inducido por preconditionamiento, protegiendo contra la oxidación de proteínas mitocondriales.

Nuestros proyectos futuros incluyen estudiar mecanismos candidatos de protección del ADN genómico y mitocondrial, tales como el sistema enzimático de reparación de ADN, y los niveles de enzimas antioxidantes, como tiorredoxinas, hemoxigenasa 1, SOD1 y SOD2 que podrían ser aumentados durante el período de preconditionamiento por luz. Además, el uso de ratones knock-out condicionales (KO) para específicamente deletar gp130, o STAT3 en la neurorretina sería una forma directa de evaluar el rol de la vía de señalización gp130/STAT3 en la oxidación de ADN en fotorreceptores y su prevención por parte del preconditionamiento.

## **Capítulo IV**

**El factor inhibidor de la leucemia (LIF) regula la síntesis de 11- *cis* retinaldehído por el epitelio pigmentado de la retina y su utilización por los fotorreceptores**

## INTRODUCCIÓN

El epitelio pigmentado de la retina (RPE) interacciona íntimamente con los fotorreceptores para el reciclado de pigmentos visuales y lípidos esenciales, y para el intercambio de nutrientes desde la sangre (Bok, 1993; Marmorstein, 2001; Strauss, 2005). Es por estas interacciones esenciales, que las disrupciones en la función o viabilidad del RPE resultan en degeneraciones retinales, que incluyen la enfermedad de Stargardt, la enfermedad de Best, y la degeneración de la mácula asociada a la edad (AMD) entre otras (Franco et al., 2009; Lopez and Aaberg, 1992; Zarbin, 1998). Una de las principales funciones del RPE es la regeneración del 11-*cis*-retinal (11-*cis*-RAL) mediante una cascada multienzimática conocida como el ciclo visual retinoide (Driessen et al., 2000; Farjo et al., 2009; Moiseyev et al., 2005; Radu et al., 2008). La enzima central en el ciclo visual es RPE65 (retinal pigment epithelium 65) expresada en el RPE, que es la isomerohidrolasa responsable de la regeneración del 11-*cis* retinoide fotosensible (Jin et al., 2005; Moiseyev et al., 2005). El control preciso de los niveles de actividad del ciclo visual en el RPE es crítico para la salud y supervivencia de los fotorreceptores (Samardzija et al., 2006; Samardzija et al., 2009; Wenzel et al., 2001a; Zhang et al., 2008). Se ha reportado que el ciclo visual es negativamente regulado por factores ambientales que también regulan la expresión de opsina en los fotorreceptores en respuesta al estrés inducido por luz o por desprendimiento de retina (Rattner et al., 2008). Dicha regulación negativa coordinada ha sido postulada como una respuesta de protección. De hecho, la inhibición de la actividad de RPE65 mediante compuestos retinoides y no retinoides es

una potencial intervención para las degeneraciones retinales hereditarias (Maiti et al., 2006; Mandal et al., 2011; Travis et al., 2007).

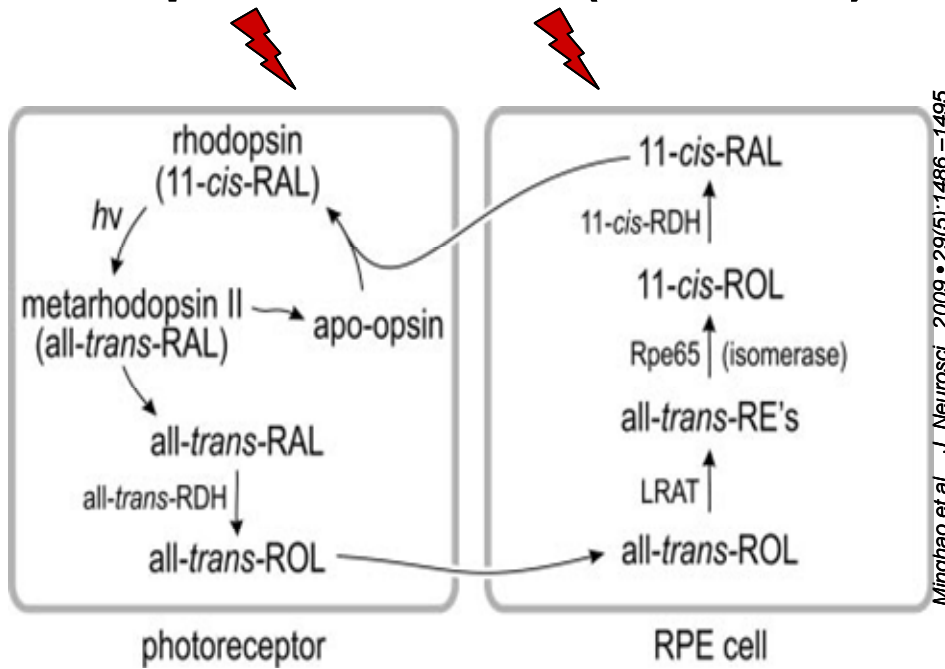
Varios grupos de investigación han demostrado que LIF y CNTF son endógenamente inducidos en respuesta a los estreses gatillados por luz o mutaciones genéticas (Burgi et al., 2009; Chollangi et al., 2009; Gao and Hollyfield, 1995; Gao and Hollyfield, 1996; Joly et al., 2008; Liu et al., 1998b; Wen et al., 1995; Yu et al., 2004). Estas citoquinas sobreexpresadas protegen la retina de la degeneración a través de la activación del receptor gp130 y la consecuente activación de STAT3 en la retina (Ueki et al., 2009; Ueki et al., 2010). Otros estudios mostraron además, que niveles elevados de CNTF producían una disminución de RNAm y de la expresión proteica de genes de la fototransducción (Wen et al., 2006; Wen et al., 2008), reduciendo de esa manera la utilización de 11-*cis*-RAL en las células fotorreceptoras. Para mantener el balance entre la producción y utilización de retinoides, predijimos que LIF podría también reducir la producción de 11-*cis*-RAL en el RPE.

En este estudio, investigamos si la activación de STAT3 por LIF altera la actividad del ciclo visual en el RPE (**Ilustración 14**). Encontramos que los niveles de ARNm, proteína, y actividad isomerohidrolasa de RPE65, los contenidos de rodopsina fotoblanqueable y regeneración de respuesta de ERG de la onda-a tras la presentación de fotoblanqueo están reducidos en respuesta a la activación de STAT3. Usamos ratones KO condicionales para delectar gp130 y STAT3, y así demostrar que la reducción de RPE65 requirió una cascada gp130/STAT3 funcional en el RPE. Nuestros resultados apoyan el concepto de que respuestas endógenas al estrés en la retina pueden modular directamente modular el ciclo visual en las células del RPE y controlar la tasa de

producción de 11-*cis* RAL. Los efectos neuroprotectores directos de LIF y CNTF acoplados con la habilidad de regular negativamente la actividad de RPE65 a través del agonismo de gp130 podrían proveer una potente estrategia terapéutica para las enfermedades retinales que resultan de la acumulación de compuestos tóxicos derivados de retinoides.



## Citoquinas de estrés (LIF, CNTF)



**Regulación negativa de la fototransducción**  
(Wen et al., 2006 y 2008)

**¿Regulación negativa paralela del ciclo visual?**

Ilustración 14. Representación esquemática de la hipótesis en este estudio.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Todos los procedimientos fueron aprobados y realizados de acuerdo a las direcciones dadas por el Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) de la OUHSC. Los ratones BALB/cJ (5-6 semanas de vida) fueron mantenidos en el bioterio por dos semanas previas a la conducción de los experimentos. Los ratones *STAT3<sup>fllox/fllox</sup>* (Akira, 2000; Takeda et al., 1998) y ratones *gp130<sup>fllox/fllox</sup>* (Betz et al., 1998) fueron apareados con ratones *RPE-cre* (Le et al., 2008) para generar ratones knock out condicionales (KO) con delección de STAT3 específica en RPE (*RPE-cre<sup>+</sup>; STAT3<sup>fllox/fllox</sup>*, referidos aquí como STAT3-RPE-cre KO) y delección de gp130 específica en RPE (*RPE-cre<sup>+</sup>; gp130<sup>fllox/fllox</sup>*, referidos aquí como gp130-RPE-cre KO), respectivamente. En otra estrategia de apareamiento, ratones *gp130<sup>fllox/fllox</sup>* fueron apareados con ratones *Chx10-cre<sup>+</sup>* (Rowan and Cepko, 2004), comprados a Jackson Laboratory [(Chx10-EGFP/cre<sup>-</sup>, -ALPP)2C1c/J; #005105], para generar ratones con delección de gp130 específica en retina (*Chx10-cre<sup>+</sup>; gp130<sup>fllox/fllox</sup>*, referidos aquí como gp130-Ret-cre KO). Ratones doble KO con delección de gp130 en la retina y RPE fueron obtenidos apareando ratones gp130-Ret-cre KO con ratones gp130-RPE-cre KO (*Chx10-cre<sup>+</sup>; gp130<sup>fllox/fllox</sup> /RPE-cre<sup>+</sup>; gp130<sup>fllox/fllox</sup>*, referidos aquí como gp130-Ret&RPE-cre DKO). La generación de ratones transgénicos usados en este estudio se presenta de forma esquemática en la **Ilustración 15** e **Ilustración 16**. Para facilitar la nomenclatura de los animales transgénicos, nos referiremos a los animales control con ambos alelos para gp130 o STAT3 flanqueados por sitios lox -P como wild type (WT) para cada línea transgénica. Todos los animales en este estudio fueron albinos y homocigotas para la variante L450 de RPE65 (Wenzel et al., 2001b). Para todos los

experimentos usamos ratones albinos, de 6-8 semanas de vida, a no ser que se especifique de otra manera. Para corroborar el genotipo, el ADN fue extraído de muestras de colas de ratones para análisis por PCR. Las secuencias de primers usados se muestran en la **Tabla 1**.

### **Primers sequence (5' → 3')**

**RPE65 for:** CAC TGT GGT CTC TGC TAT CTT C

**RPE65 rev:** GGT GCA GTT CCA CTT CAG TT

**Rd1 for:** CAT CCC ACC TGA GCT CAC AGA AAG

**Rd1 rev:** GCC TAC AAC AGA GGA GCT TCT AGC

**STAT3 a:** CCT GAA GAC CAA GTT CAT CTG TGT GAC

**STAT3 b:** CAC ACA AGC CAT CAA ACT CTG GTC TCC

**Gp130 for:** ACG TCA CAG AGC TGA GTG ATG CAC

**Gp130 rev:** GGC TTT TCC TCT GGT TCT TG

**VMD2cre for:** CGG CCT TGA ATT GAT CAT ATG CGG

**VMD2cre rev:** TCA AAC TCG AAG TCG GCC ATA TCC

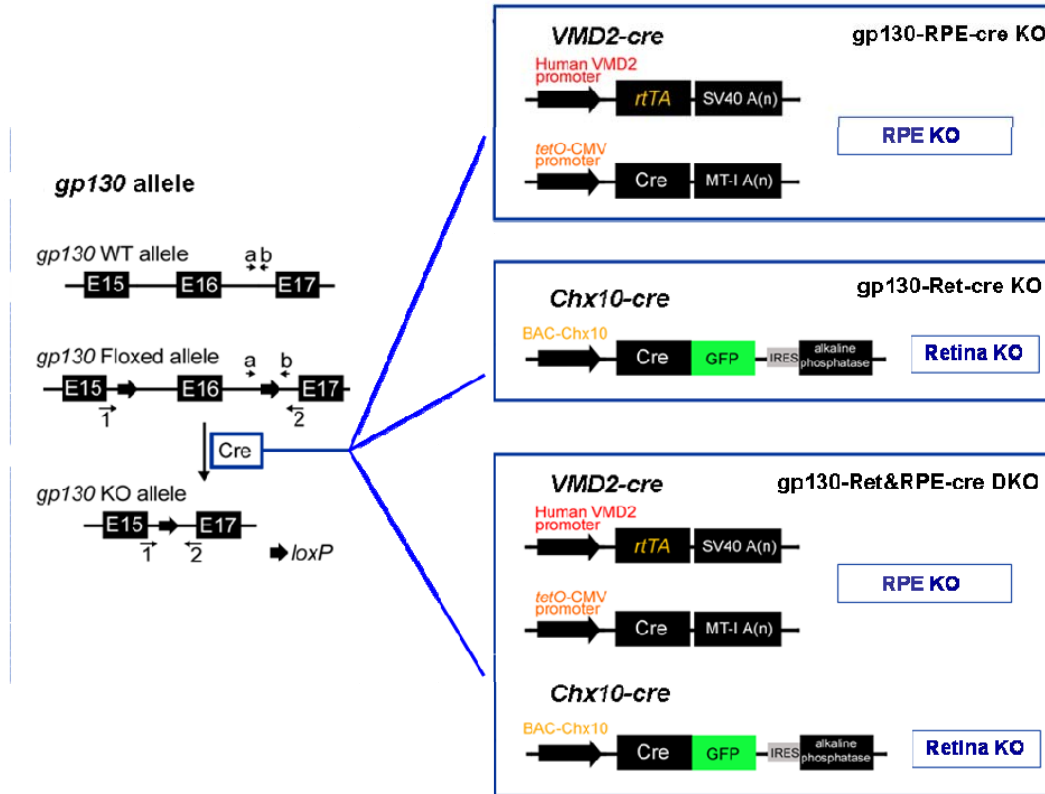
**Chx10cre for:** GGG CAC CTG GGA CCA ACT TCA CGA

**Chx10cre rev:** CGG CGG CGG TCA CGA ACT CC

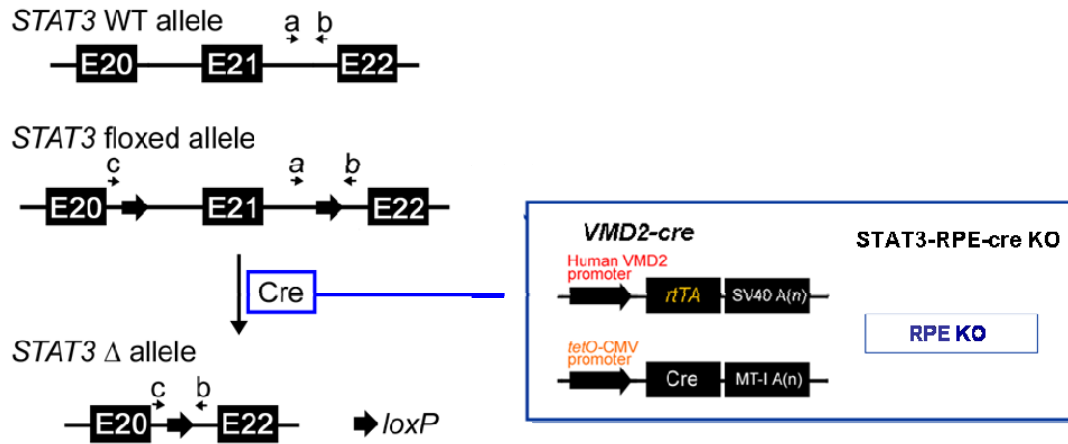
**Cre for:** AGG TGT AGA GAA GGC ACT TAG C

**Cre rev:** CTA ATC GCC ATC TTC CAG CAG G

**Tabla 1. Secuencias de sets de primers usados para análisis de genotipo por PCR.**



**Ilustración 15. Generación de ratones KO condicionales gp130-RPE-cre KO, gp130-Ret-cre KO, y gp130-Ret&RPE-cre KO.** Estos ratones se obtuvieron al aparear ratones con ambos alelos del gen gp130 flanqueados por sitios-P (gp130-floxed) con los ratones transgénicos que expresan la recombinasa cre específicamente en retina (promotor Bac chx10) o específicamente en células de RPE (promotor VMD2 humano).



**Ilustración 16. Generación de ratones KO condicionales STAT3-RPE-cre KO.** Estos ratones se obtuvieron al aparear ratones con ambos alelos del gen STAT3 flanqueados con sitios-P, con ratones transgénicos que expresan la recombinasa cre específicamente en células del RPE (promotor VMD2 humano).

## **Inyecciones intravítreas**

El LIF recombinante humano fue producido en el laboratorio del Dr. John Ash e inyectado en forma intravítrea en ratones anestesiados como ya ha sido descrito (Ueki et al., 2008a). Brevemente, una única dosis de 0.25, 0.5, o 3.0  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  of LIF (1  $\mu\text{L}$  de volumen total) fue inyectada a través del limbo temporal de un ojo, mientras que el mismo volumen de PBS (vehículo) fue inyectado en el otro ojo como control. Los ojos que mostraron algún tipo de daño, sangrado, o inflamación fueron excluidos del análisis.

## **Extracción de ARN y PCR cuantitativo en tiempo real PCR (RTq-PCR)**

El ARN total fue recolectado de 2 copas ópticas conteniendo retina, RPE, coroides y esclera, y fue extraído usando Tri reagent (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) 2 días después de realizar inyecciones intravítreas con 3.0 de  $\mu\text{g}$  of LIF en el ojo derecho y PBS en el ojo izquierdo. El ARN fue usado para la síntesis de ADNc (iScript cADN synthesis kit, Bio-Rad, Hercules, CA). Los niveles de ARNm de los genes del ciclo visual seleccionados fueron medidos usando RT-PCRq. Los primers para la amplificación de RPE65, LRAT, RDH5, IRBP, y RPL19 (gen *house keeping*) fueron diseñados usando el software PrimerQuest (Integrated DNA Technologies) cruzando los límites intrón-exón para amplificar los correspondientes ARNm, sin amplificar ADN genómico, potencialmente contaminante (**Tabla 2**). El RT-PCRq fue llevado a cabo usando una mezcla de reacción de PCR con sonda fluorescente SYBR green (Bio-Rad, Hercules, CA) y el sistema de detección MyiQ Single-Color Real-Time PCR (Bio-Rad, Hercules, CA) siguiendo instrucciones de los fabricantes

### **Primers sequence (5' → 3')**

**RPE65 for:** TGG ATC TCT GTT GCT GGA AAG GGT

**RPE65 rev:** TCT GCC TGT GTC GAC CTT GTC A AT

**LRAT for:** AGC CTA CTG TGG AAC AAC TGC GAA

**LRAT rev:** TGA TGC CAG GCC TGT GTA GAC AAT

**RDH5 for:** TCT GGC ACT GCA ACT TGA CCA GAA

**RDH5 rev:** TTC TCC AAC ACG TGT CTT CAC CCA

**RGR for:** GGT TTC CAG GGA TTT GCA ACA GCA

**RGR rev:** ACA TCC ACA CAA ACA GCA CCA GAG

**IRBP for:** AGA GCC GAT ATG CAA GGG TGA CTT

**IRBP rev:** TCG GTC TTT GGC ATC CTC TGG AAT

**RPL19 for:** TCA CAG CCT GTA CCT GAA GG

**RPL19 rev:** TCG TGC TTC CTT GGT CTT AG

**Tabla 2. Secuencias de sets de primers usados para RT-PCRq.**

## Western blot

Las copas ópticas (RPE+ coroides+ esclera) y retinas fueron colectadas a los tiempos indicados luego de las inyecciones intravítreas de LIF (y PBS) y homogeneizadas en buffer de lisis [50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2.0 mM EDTA, 1% (v/v) NP-40, 1 mM ortovanadato de sodio, y cocktail inhibidor de proteasas (Calbiochem, San Diego, CA #539131)]. El contenido proteico fue medido usando el ensayo BCA (Pierce, Rutherford, IL #23225) con albúmina de suero bovino como estándar. Iguales cantidades de proteínas (20 µg, 10µg o 1µg para retinas, y 7.5µg para copas ópticas) fueron separadas por electroforesis en geles 4-20% SDS- poliacrilamida (Invitrogen, Carlsbad, CA #EC60285) y transferidas a membranas de nitrocelulosa. Las proteínas fueron detectadas usando los siguiente anticuerpos primarios: anti-rodopsina (RET-P1, Abcam, Cambridge, MA #ab3267); anti-PDE6 alfa (ABR, Golden, CO #PA1-720); anti-transducina alfa (Abcam, Cambridge, MA #ab74059); anti-RPE65 y anti-LRAT (Dr. Jian-Xing Ma), anti-pSTAT3 contra STAT3 fosforilado (Cell Signaling Technology, Danvers, MA #9145L), anti-ezrina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO #E8897), anti-MCT1 (Millipore, Temecula, CA #AB3540P), y anti-beta actina (Abcam, Cambridge, MA #ab6276) como control de carga. Para la detección quimioluminiscente, los blots fueron incubados con anticuerpos secundarios conjugados con HRP (Amersham Bioscience, Piscataway, NJ). La captura de imágenes de los blots y el análisis de la las intensidades de las bandas de proteínas fueron realizados con un sistema convencional de análisis Image Station 4000R y software Kodak (IS4000 R; v.4.5.1). Un total de al menos 3



ratones por grupo fueron analizados, y los resultados obtenidos de los ojos derechos (inyectados con LIF) e izquierdos (inyectados con PBS) fueron comparados.

### **Immunohistoquímica (IHC)**

La activación de STAT3 en ojos de ratones Balb/cj, y en ojos de ratones KO condicionales y sus controles (WT) fue evaluada por IHC a diferentes tiempos luego de inyectarlos en forma intravítrea con LIF. Para teñir las secciones retinales, cada ojo fue enucleado, y la córnea y lente removidos. La copa óptica resultante fue fijada por 20 min en 2% paraformaldehído/1x PBS suplementado con 1 mM ortovanadato de sodio. Las copas ópticas fueron criopreservadas por incubaciones secuenciales con soluciones al 10%, 15%, y 30% sacarosa preparadas en 1xPBS, y congeladas en medio OCT. Las secciones retinales (14 µm) fueron obtenidas usando un crióstato, lavadas con solución 1% Tritón en 1xPBS, bloqueadas con 5% suero bovino normal, e inmunomarcadas con anticuerpo anti-pSTAT3. La captura de imágenes fue realizada usando un sistema confocal de barrido por láser Olympus FluoView FV500 (Olympus, Center Valley, PA, v.5.0). Las condiciones de captura de imágenes fueron idénticas para todas las muestras. Para los experimentos evaluando la eficiencia de delección de STAT3 y gp130, un total de 4 ratones por grupo fueron analizados y los datos provenientes de los ojos derechos (inyectados con LIF) fueron comparados entre ratones KO y sus controles WT.

Para medir la actividad fagocítica del RPE, ratones gp130-Ret-cre KO fueron inyectados con 3.0 µg LIF en un ojo y PBS en el otro ojo como control, y 5 días más tarde, los ojos fueron colectados a diferentes horas del día: 7:30 am (30 min después de que las luces se encienden en el bioterio), 9:00 am y 3:00 pm. Los fagosomas fueron marcados con anticuerpo anti-opsina (anti-RET-P1), y contados en secciones histológicas embebidas en

parafina (5  $\mu\text{m}$ ). La captura de imágenes fue realizada con el sistema confocal descrito anteriormente en esta sección. Para el recuento de fagosomas en el RPE usamos un microscopio de epifluorescencia Nikon Eclipse E800 y el software Meta View (v7,1,1,0). Un total de 4 ojos por grupo fueron analizados y los datos provenientes de los ojos derechos (inyectados con LIF) fueron comparados con los provenientes de los ojos izquierdos (inyectados con PBS). Para cada ojo, los fagosomas fueron contados en 4 regiones equidistantes a lo largo de los hemisferios superior e inferior de la retina, a fin de evaluar la fagocitosis en el centro, centro-periferia, y periferia de cada hemisferio. Los valores contados en cada región fueron sumados para dar un recuento global por ojo (cada región: 143  $\mu\text{m}$ ; suma de 8 regiones totales/ojo: 1,144  $\mu\text{m}$ ). Los recuentos de 4 réplicas para cada grupo fueron promediados.

#### **Actividad isomerohidrolasa de la proteína RPE65**

La actividad enzimática de RPE65 fue ensayada como se describió anteriormente (Moiseyev et al., 2003) con leves modificaciones. Los homogenados de copas ópticas fueron preparados utilizando ratones Balb/cj no inyectados o a los 7 días posteriores a inyecciones intravítreas con 3.0  $\mu\text{g}$  de LIF o PBS. Los homogenados fueron incubados con 0.2  $\mu\text{M}$  todo-trans ( $^3\text{H}$ )-retinol en presencia de 25  $\mu\text{M}$  CRALBP en buffer 10 mM BTP (0.1 M NaCl, 1% BSA, (pH 8.0)). Esta reacción, a concentraciones de saturación de sustrato, resultó en la formación de retinil ésteres y 11-cis retinol. Luego de un período de incubación de 2 hs a 37°C en la oscuridad, los retinoides generados fueron extraídos con metanol y hexano, y analizados por cromatografía HPLC de fase normal.

## **Medición de la regeneración de la rodopsina**

Para medir el efecto de LIF en la tasa de regeneración de la rodopsina, inyectamos 3.0  $\mu\text{g}$  LIF intravítreo en el ojo derecho y PBS en el ojo izquierdo de ratones gp130-Ret-cre KO. Luego de 4 días, los ratones fueron adaptados en la oscuridad durante 16 hs (*overnight*), y luego sometidos a un período de fotoblanqueo/blanqueo por luz (*photobleach*), consistente en luz fluorescente blanca, difusa y fría suministrada desde la parte superior de una jaula (400 luxes durante 5 min). Inmediatamente luego del blanqueo (tiempo= 0 min) un grupo de ratones fue sacrificado y sus ojos removidos y congelados en nitrógeno líquido. Los restantes ratones fotoblanqueados fueron devueltos a la oscuridad y sus ojos fueron colectados bajo luz roja tenue a los 10, 20, 30 y 60 min luego del blanqueo. Un grupo adicional de ratones no fue expuesto al blanqueo por luz y sirvió como controles adaptados en la oscuridad.

Las mediciones de rodopsina se realizaron de acuerdo a protocolos establecidos en la literatura (Ranchon et al., 2003b; Tanito et al., 2009) con leves modificaciones. En breve, cada ojo fue homogeneizado bajo luz roja tenue, en buffer de lisis (10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2% (w/v) octilglucósido, y 50 mM hidroxilamina). Los homogenados fueron centrifugados a 16,000g y la fracción soluble de los lisados fue escaneada en el espectro 270-800 nm utilizando un espectrofotómetro (Ultrospec 3000 UV/Vis Spectrophotometer, GE Healthcare, Piscataway, NJ). Las muestras fueron blanqueadas bajo luz ambiental durante 10 min y escaneadas nuevamente. Las diferencias en la absorción espectral a 500 nm entre muestras pre- y post-blanqueadas fue usado para determinar el contenido de rodopsina, teniendo en cuenta el coeficiente de extinción molar 42,000  $\text{M}^{-1}$  (Irreverre et al., 1969). Los valores fueron normalizados al

volumen total de lisado y los datos se expresaron como contenido de rodopsina/ojo. Para determinar la tasa de regeneración de la rodopsina, el contenido de rodopsina fue graficado versus el tiempo de adaptación en la oscuridad. La curva sigmoideal fue ajustada a la ecuación de Hill por una regresión no lineal. La ecuación nos permitió determinar el contenido total de rodopsina/ojo ( $B_{\max}$ ) y el tiempo requerido para regenerar el 50% de la rodopsina total ( $K_{0.5}$  [rodopsina]) luego del blanqueo por luz.

### **Electrorretinografía (ERG).**

Luego de su completa adaptación en la oscuridad, los ratones fueron anestesiados con inyección intraperitoneal de xylazina (7 mg/kg) y ketamina (40 mg/kg), y sus pupilas dilatadas tópicamente con 1% sulfato de atropina y 10 % fenilefrina. Los ratones anestesiados fueron mantenidos sobre una plataforma a 37°C durante todo el experimento. Los electrodos se posicionaron en el animal como se describió previamente en esta tesis. Las respuestas de ERG de campo lleno fueron registradas en ambos ojos de cada animal, usando un sistema de ERG Espion E2 con domo Colordome Ganzfeld (Diagnosys, Littleton, MA, v.4.0.51).

Para registrar los ERGs escotópicos de campo lleno , se expuso a los ratones a una serie de flashes de intensidades crecientes (0.002, 0.2, 2, 20, 200, y 400  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ ) luego de la completa adaptación a la oscuridad (Ueki et al., 2009). La amplitud de la onda-a fue medida desde la línea de base hasta el mínimo, la onda-b desde el mínimo de la onda-a hasta el pico de la onda-b. La respuesta de la onda-c, derivada del RPE, fue provocada con un flash de 400  $\text{cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  de intensidad y registrada dentro de un período de 15 s luego de la presentación del flash.

Para determinar el efecto de LIF en la adaptación a la oscuridad de los fotorreceptores bastones, comparamos la regeneración de las respuestas electroretinográficas de los bastones a continuación del blanqueo por luz (Mata et al., 2001; Weng et al., 1999) entre ojos de ratones inyectados con LIF (3  $\mu\text{g}$ ) y PBS. Las respuestas de ERG escotópicas fueron provocadas en ambos ojos luego de la adaptación en la oscuridad, usando un flash de prueba de  $200 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$ . Los ratones fueron luego expuestos, en el domo Ganzfeld, a un campo estable de luz blanca (200 luxes por 5 min). Una vez finalizado este blanqueo, la iluminación de fondo fue apagada y el mismo flash de prueba de  $200 \text{ cd}\cdot\text{s}/\text{m}^2$  fue presentado al tiempo= 0 min y a subsiguientes intervalos de 10 min bajo condiciones de completa oscuridad. Para cada ojo, la respuesta de la onda-a fue normalizada a la respuesta inicial en el estado de completa adaptación en la oscuridad (amplitud  $R_{m_{p3}}$  normalizada).

### **Análisis histológico**

Luego de realizar los registros de ERG, los ratones fueron sacrificados con  $\text{CO}_2$ , los ojos enucleados y marcados con tinta verde en la superficie dorsal para marcar el hemisferio superior. Los ojos fueron fijados como ya se describió. Los ojos embebidos en parafina y seccionados sagitalmente a través del centro del ojo, incluyendo el nervio óptico (5  $\mu\text{m}$  de espesor). La tinción hematoxilina- eosina (H&E) fue realizada para examinar su morfología.

### **Análisis estadístico**

Los análisis estadísticos fueron realizados usando el software Graph pad Prism 5.0. La data cuantitativa se expresa como el promedio  $\pm$  SEM para cada grupo. Para establecer comparaciones entre dos grupos, se realizaron la prueba T con dos colas para muestras

apareadas y la prueba T con dos colas para muestras no apareadas. Para comparaciones múltiples de medias, se realizó ANOVA simple seguido de la prueba de Newman-Keuls.

## RESULTADOS

### **LIF activa STAT3 e induce la disminución de los niveles de compuestos del ciclo visual en el RPE.**

Trabajos previos del laboratorio del Dr. Ash demostraron que LIF protege a los fotorreceptores del estrés a través de la activación de la vía gp130/STAT3 en los mismos fotorreceptores (Ueki et al., 2008b; Ueki et al., 2009). En dichos estudios se observó que además, LIF causa una rápida y sostenida fosforilación de STAT3 en las células del RPE (Ueki et al., 2008b), lo que sugirió que LIF podría tener una función en dichas células. En fotorreceptores, diferentes estudios encontraron que altas concentraciones de citoquinas de la familia IL-6, como CNTF (Wen et al., 2006; Wen et al., 2008) y LIF, suprimen la expresión de la maquinaria de fototransducción en los fotorreceptores bastones, lo que reduce dramáticamente la necesidad de 11-*cis*-RAL en la retina. Aquí, hipotetizamos que la señalización inducida por LIF en las células del RPE activa un mecanismo paralelo para disminuir la producción de 11-*cis* RAL en células del RPE para mantener el balance en la producción y utilización de este retinoide. Para probar esta hipótesis, inyectamos LIF intravitrealmente en el ojo derecho y PBS en el ojo izquierdo de ratones Balb/cj y colectamos los ojos a distintos tiempos para análisis de RNA, proteína, y análisis inmunohistoquímicos. STAT3 fue notablemente activado (pSTAT3; verde) en los núcleos del RPE, y dicha activación persistió hasta por 9 días luego de la inyección con 3.0 µg LIF (**Figura 22A**). Los análisis de proteína realizados en muestras de lisados de fracción del RPE (RPE+coroides+esclera) por western-blot mostraron que LIF redujo significativamente el contenido de la proteína RPE65 respecto a los ojos inyectados con

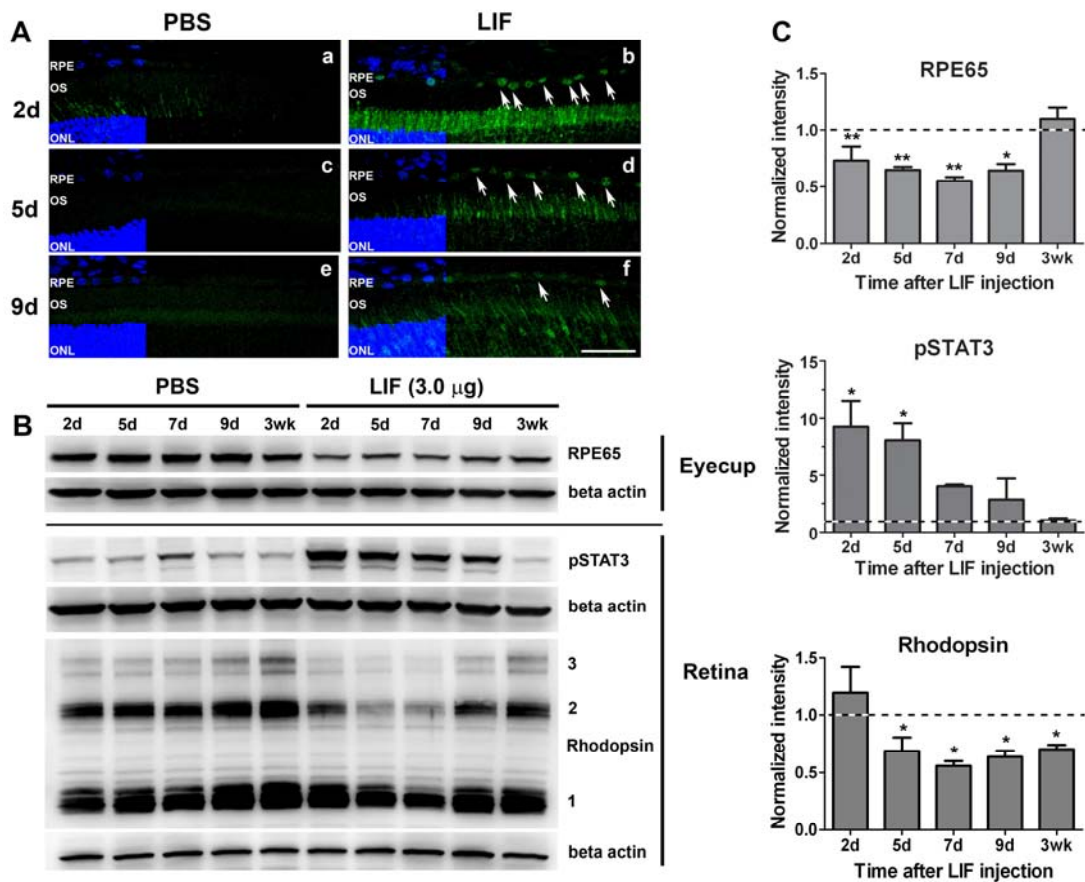
PBS (**Figura 22B, 22C**). Este efecto persistió por más de 9 días, pero los niveles de RPE65 se recuperaron a las 3 semanas posteriores a la inyección. Consistente con reportes previos del laboratorio del Dr. Ash (Ueki et al., 2008; Ueki et al.; 2009; Chollangi et al. 2009), LIF activó STAT3 en las neuroretinas contralaterales. El tratamiento con LIF también resultó en la reducción de los contenidos de rodopsina (**Figura 22B, 22C**). Las inyecciones intravítreas de concentraciones menores de LIF (0.25 µg) disminuyeron los niveles de la proteína RPE65 en la fracción del RPE sin reducir significativamente los contenidos de rodopsina en la neuroretina (**Figura 23**), sugiriendo que las células del RPE son más sensibles que los fotorreceptores para disminuir la expresión de componentes del ciclo visual.

Medimos la expresión de RPE65, lecitin-retinol aciltransferasa (LRAT), retinol dehidrogenasa 5 (RDH5), protein retinal acoplada a receptor G (RGR), y proteína interfotorreceptora unidora de retinoide (IRBP) por la técnica RT-PCRq. Nuestros resultados mostraron que luego de 2 días de la inyección con LIF, RPE65 disminuyó más de 2 veces y este efecto fue estadísticamente significativo en comparación al control (**Figura 24A**). El análisis por western blot reveló que LRAT, transportador de monocarboxilato-1 (MCT-1), y ezrina fueron significativamente reducidos por el tratamiento con LIF (**Figura 24B, 24C**). Estos resultados sugieren que la regulación negativa de RPE65 fue un efecto específico gatillado por LIF en el RPE, que afectó los niveles de ARNm y proteína.



### **LIF reduce la actividad isomerohidrolasa de RPE65.**

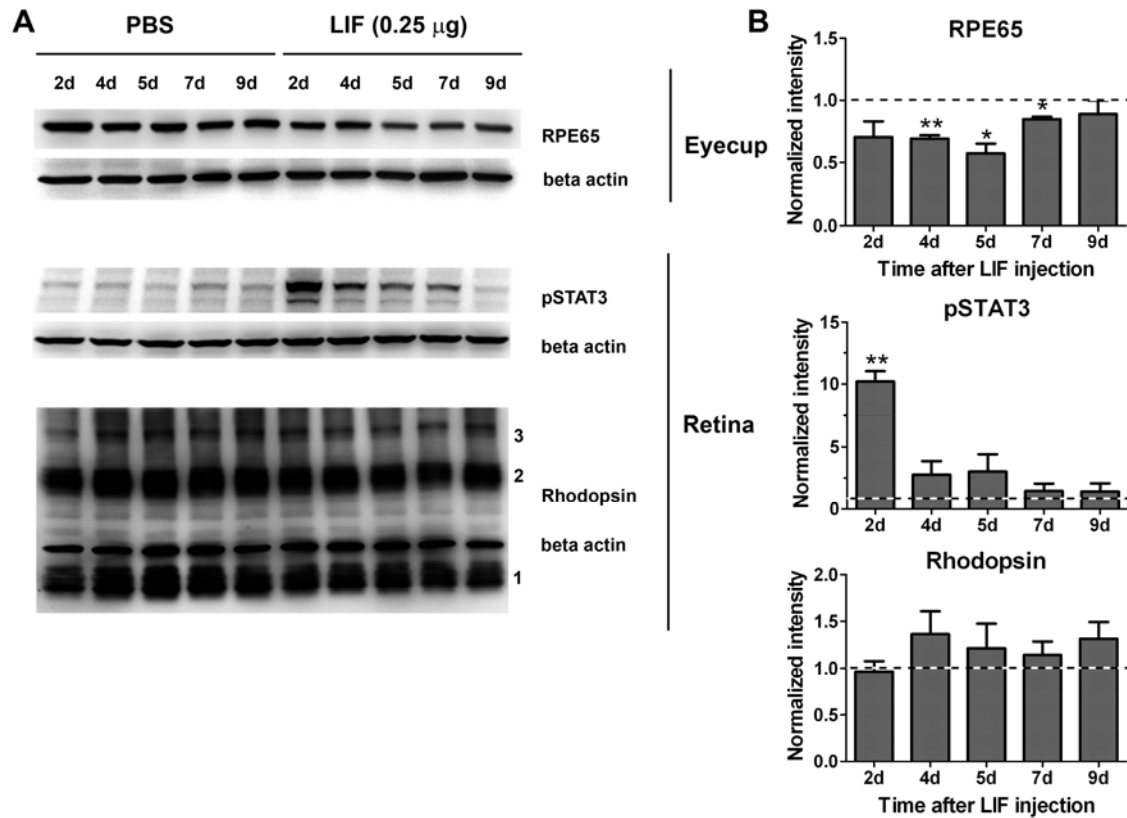
La reducción en los contenidos de proteína RPE65 sugirió que LIF podría reducir su actividad isomerohidrolasa. Para evaluar la actividad funcional de RPE65, determinamos la generación de 11-cis ( $^3\text{H}$ )-retinol a partir de todo-trans ( $^3\text{H}$ )-retinol en copas ópticas de ratones Balb/cj colectadas 7 días luego de la inyección con 3.0  $\mu\text{g}$  de LIF y PBS. Consistente con la regulación negativa del ARNm y proteína RPE65, las inyecciones intravítreas con LIF redujeron la actividad isomerohidrolasa de la proteína RPE65, en comparación con los ojos no inyectados, o inyectados con PBS (**Figura 25**).



**Figura 22. LIF activa STAT3 y reduce la expresión de las proteínas RPE65 en el RPE y rodopsina en la retina.**

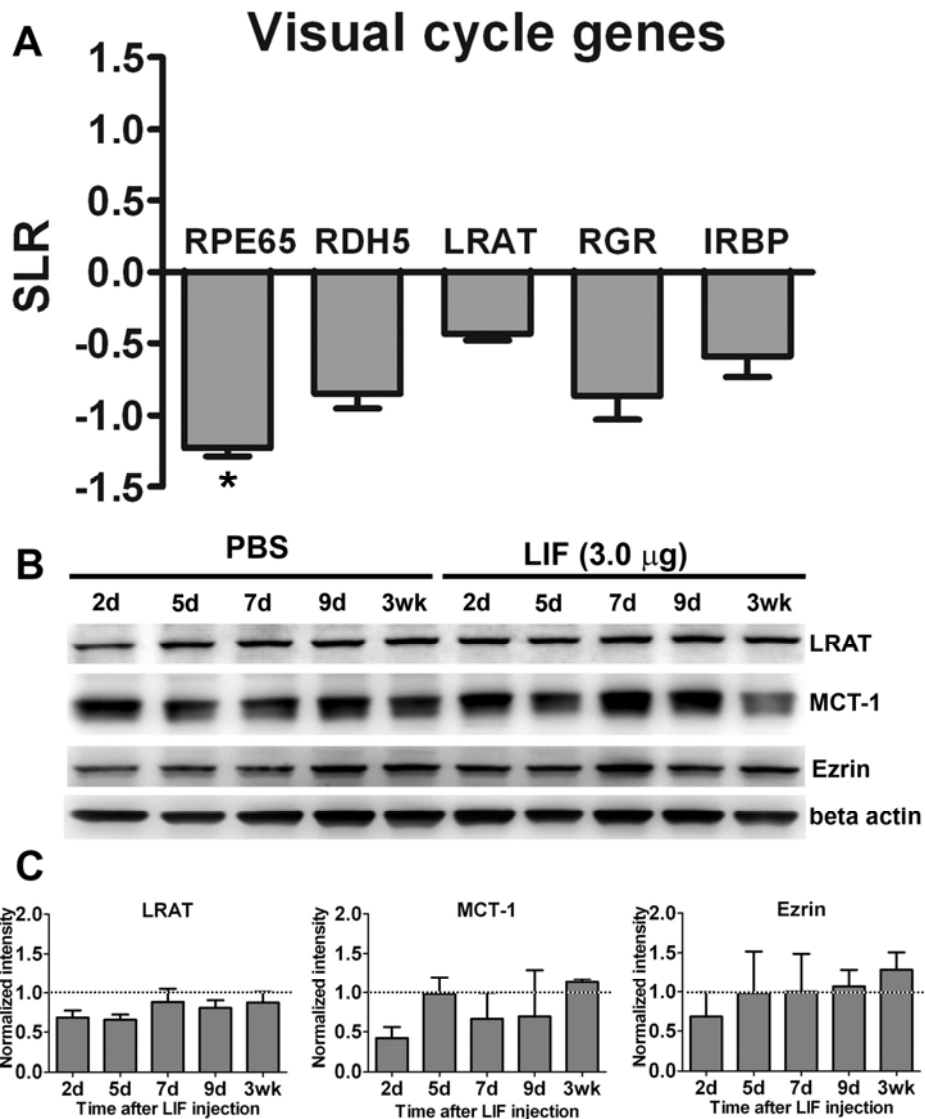
A) La detección inmunohistoquímica de STAT3 fosforilado (pSTAT3; verde) en criosecciones de retinas Balb/cj reveló la activación de STAT3 en núcleos de células del RPE luego de una única inyección con 3.0  $\mu$ g LIF (flechas blancas a los 2 días (b), 5 días (d), o 9 días (f) luego de la inyección). Las inyecciones con PBS no indujeron activación detectable de STAT3 (a, c, e). Los núcleos fueron marcados con DAPI (azul). ONL, capa nuclear externa; OS, segmentos externos; RPE, epitelio pigmentado de la retina. Escala: 50  $\mu$ m. B). Blots representativos de fracciones de la copa óptica (RPE) y retinas, mostrando disminución en el contenido de la proteína RPE65 en la fracción de la copa

óptica (RPE) luego de la inyección intravítrea de 3.0  $\mu$ g LIF comparado con los ojos tratados con PBS. En las retinas de los mismos ratones, el tratamiento con LIF indujo un aumento en la activación de STAT3 y causó la disminución del contenido de rodopsina en forma dependiente del tiempo. C) Análisis densitométrico de la proteína RPE65, activación de STAT3, y contenido de rodopsina a cada tiempo estudiado luego de las inyecciones con LIF. Las normalizaciones fueron relativas a los respectivos controles inyectados con PBS. (n= 3 para cada grupo, \* y \*\*  $p < 0.05$  respecto a 3 semanas en gráfico de RPE65, \*  $p < 0.05$  respecto a 3 semanas en gráfico de pSTAT3, y \*  $p < 0.05$  respecto a 2 días (2d) en gráfico de rodopsina, analizado por ANOVA simple seguido por la prueba de Newman-Keuls post hoc test. Barras de error, SEM).



**Figura 23. Bajas dosis de LIF disminuyen los niveles de la proteína RPE65.**

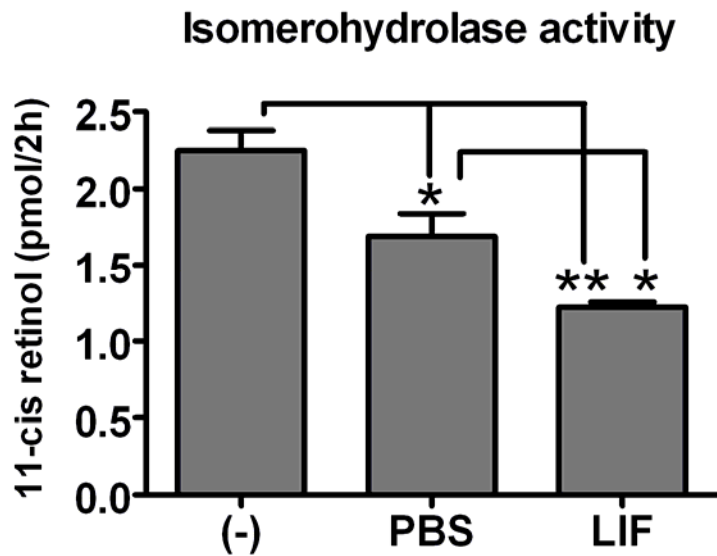
Blots representativos de las fracciones de la copa óptica (RPE) y de la retina, mostrando contenidos de RPE65 disminuídos en la fracción del RPE de ratones Balb/cj a diferentes tiempos luego de la inyección con 0.25 $\mu$ g de LIF (A). En las fracciones de la retina para los mismos ratones, el tratamiento con LIF causó la activación de STAT3 dependiente del tiempo y no provocó cambios significativos en los contenidos de la proteína rodopsina (B).  $\beta$ -actina fue usada como control de carga de proteínas. Las normalizaciones fueron hechas respecto a los respectivos controles inyectados con PBS. (n= 3 para cada grupo; \* y \*\* p < 0.05 comparando ojos tratados con LIF con ojos tratados con PBS, con el t-test de Student apareado. Barras de error, SEM).



**Figura 24. La regulación negativa inducida por LIF es específica para RPE65.**

A) El análisis cuantitativo de transcritos del ciclo visual, por PCR de tiempo real, reveló que dos días luego de las inyecciones con 3.0  $\mu$ g de LIF disminuyó significativamente la expresión de RPE65 en comparación a lo observado en los ojos inyectados con PBS. La expresión génica fue normalizada a RPL19, usado como gen housekeeping, y comparada a PBS; SLR, Signal Log Ratio (1 unidad SLR= 2 múltiplos de cambio (múltiplo de

cambio= fold change); (n= 3 para cada grupo, \* p < 0.05 por t-test de Student apareado. Barras de error, SEM). B) Blots representativos de copas ópticas (RPE) muestran los contenidos de LRAT, MCT-1, y ezrina a distintos tiempos luego de inyectar ratones Balb/cj con LIF y PBS. C) Análisis densitométricos de tres experimentos independientes mostrando contenidos proteicos de LRAT, MCT-1, y ezrina.  $\beta$ -actina fue usada como control de carga. Las normalizaciones fueron hechas respecto a los controles inyectados con PBS (n= 3 para cada grupo. Barras de error, SEM).



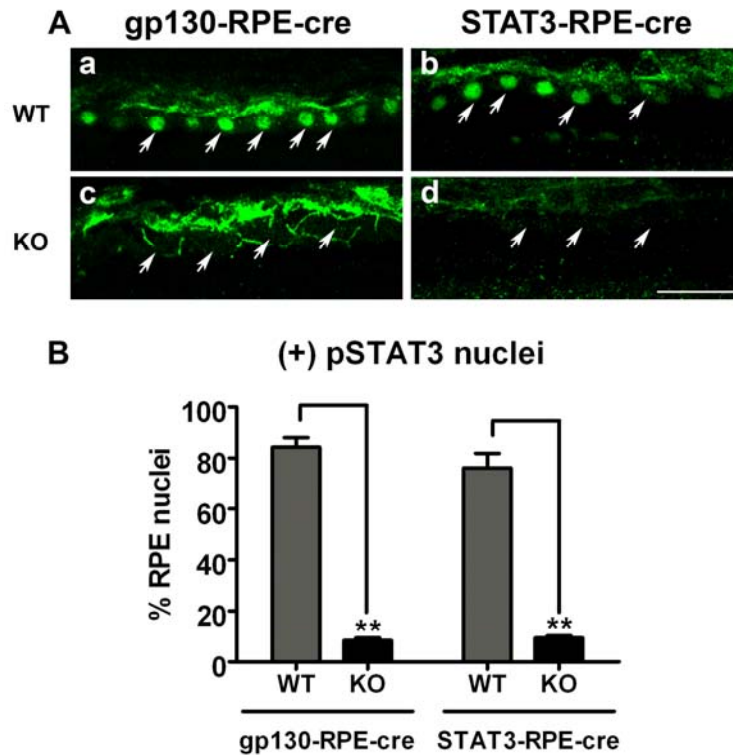
**Figura 25. LIF disminuye la actividad isomerohidrolasa de RPE65.**

La actividad enzimática de RPE65 fue medida en copas ópticas (RPE) de ratones Balb/cj, 7 días después de la inyección de 3.0 µg LIF o PBS. La actividad isomerohidrolasa fue analizada por la producción de 11-*cis* retinol luego de incubar los homogenados de las copas ópticas con el sustrato todo-trans (<sup>3</sup>H)-retinol, durante 2hs. Comparado a ratones no inyectados (-) o a inyectados con PBS, LIF disminuyó la actividad isomerohidrolasa de RPE65. (n= 4 para cada grupo, \* y \*\* p< 0.05 por ANOVA seguido del test post hoc de Newman-Keuls. Barras de error, SEM).

**La regulación negativa de RPE65 es dependiente de la cascada de señalización gp130/STAT3 en el RPE.**

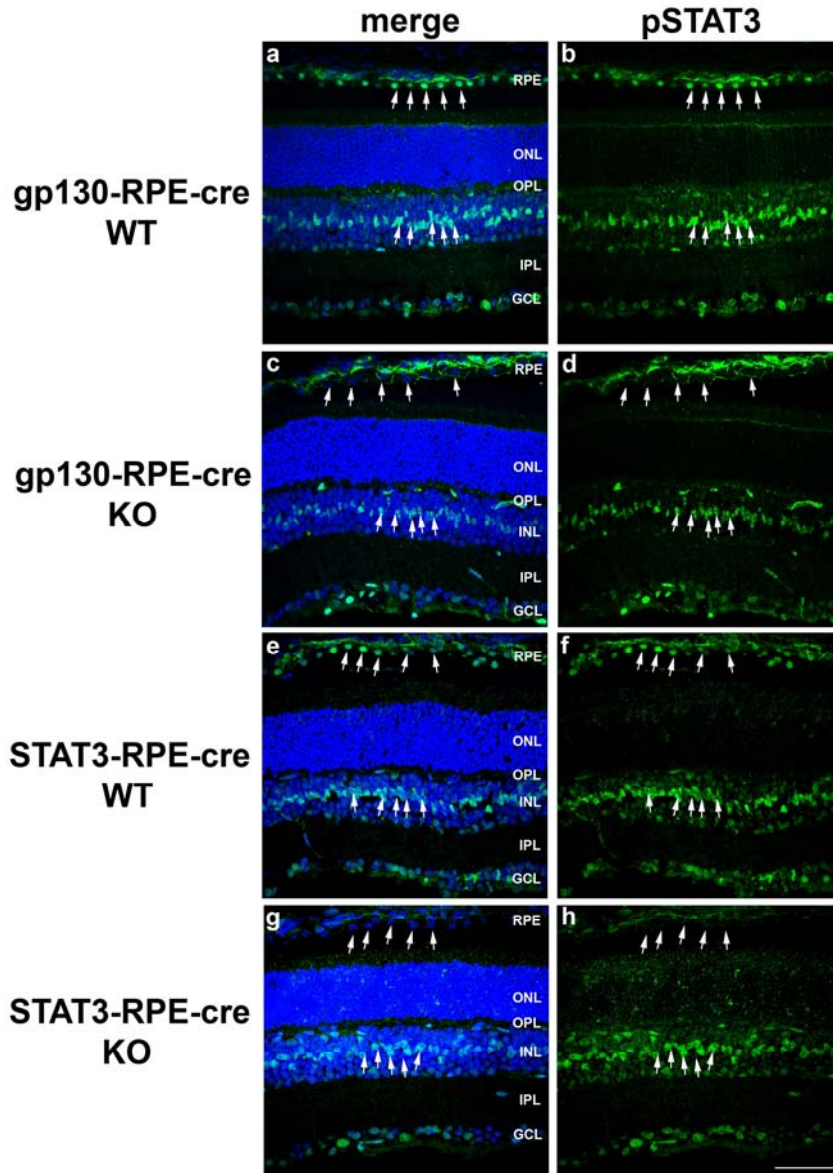
Con el fin de determinar si la regulación negativa de RPE65 fue un efecto directo de LIF activando la vía gp130/STAT3 intrínseca a las células del RPE, o si fue un efecto indirecto de su señalización en los fotorreceptores, usamos ratones knock out condicionales con delección específica de STAT3 (STAT3-RPE-cre KO) o gp130 (gp130-RPE-cre KO) en células del RPE. Para evaluar la eficiencia de delección de STAT3 gp130 en RPE, contamos células positivas para pSTAT3 30 min después de inyectar LIF (**Figura 26A**). El análisis inmunohistoquímico demostró una reducción notable en la activación de STAT3 inducida por LIF en ambas líneas STAT3-RPE-cre KO y gp130-RPE-cre KO, comparado con los controles WT (**Figura 26B**). La delección fue específica en las células del RPE, dado que LIF activó STAT3 en las retinas de todos los ratones, pero no el RPE de estos ratones KO condicionales. (**Figura 27**). La pérdida de gp130 (**Figura 28**) o de STAT3 (no mostrado) no causó degeneración retinal o cambios manifiestos en la función o estructura del RPE.





**Figura 26. Eficiencia de delección de gp130 y STAT3 en los modelos de ratón gp130-RPE-cre KO ySTAT3-RPE-cre KO.**

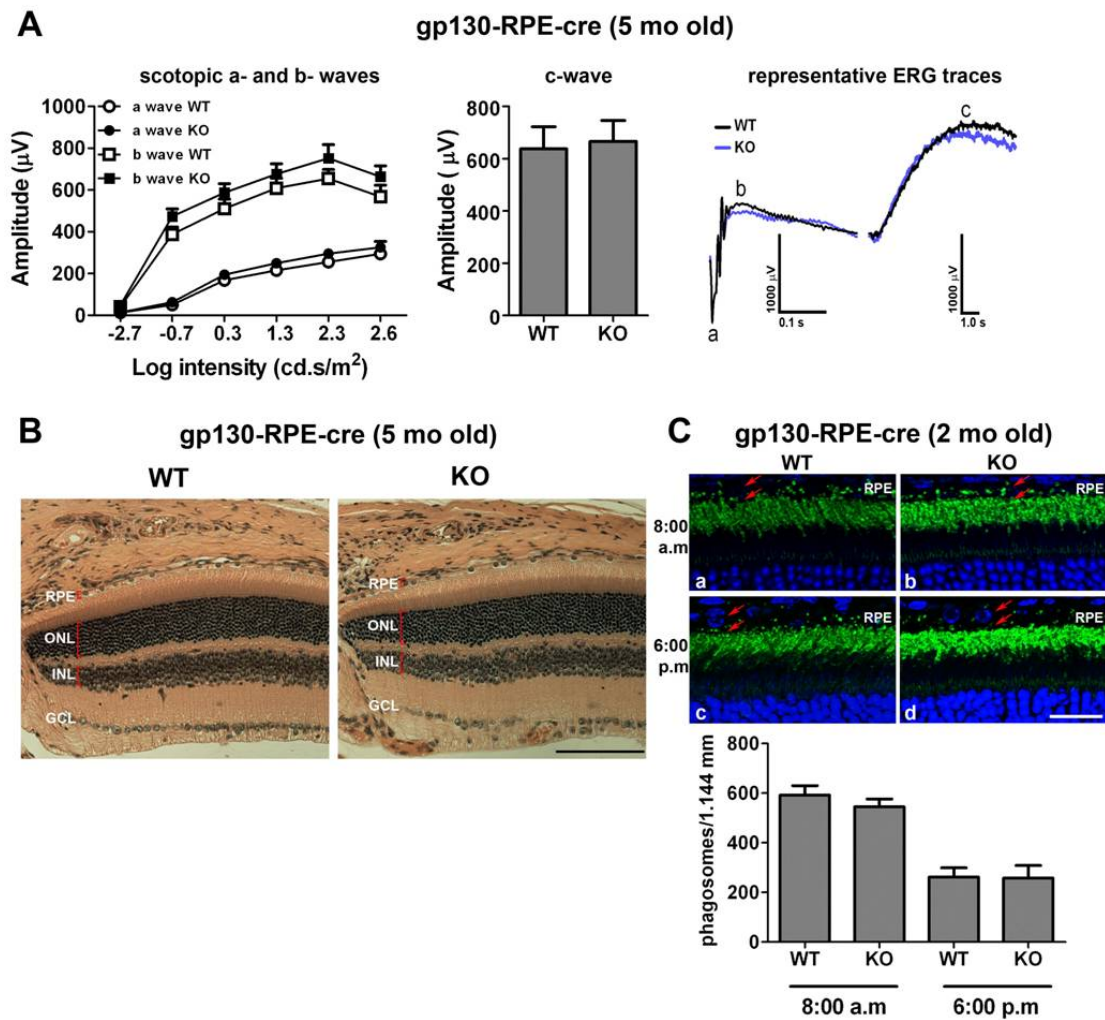
A) Detección inmunohistoquímica de STAT3 activado (pSTAT3; verde) en criosecciones de ratones de la línea gp130-RPE-cre (gp130-RPE-cre WT vs gp130-RPE-cre KO, ver (a) y (c)), y en criosecciones de ratones de la línea STAT3-RPE-cre (STAT3-RPE-cre WT vs STAT3-RPE-cre KO, ver (b) y (d)), 30 min luego de la inyección con 0.5µg LIF. Escala: 100 µm. B) La cuantificación de núcleos pSTAT3 positivos en ratones de las líneas gp130-RPE-cre y STAT3-RPE-cre, se expresa como porcentaje de núcleos de RPE a los 30 min de la inyección con LIF. Comparado a sus respectivos controles WT, los ratones gp130-RPE-cre KO and STAT3-RPE-cre KO presentaron una disminución significativa en la marcación de pSTAT3 específicamente en las células del RPE (n= 4 para cada grupo, \*\* p < 0.05 usando la prueba T con dos colas para muestras no apareadas. Barras de error, SEM).



**Figura 27. Especificidad de delección de gp130 en los ratones KO condicionales gp130- RPE-cre KO y de la delección de STAT3 en los ratones KO condicionales STAT3-RPE-cre KO.**

La especificidad de delección de gp130 y STAT3 en ambos modelos de ratones KO condicionales fue demostrada por IHC en criosecciones retinales, como fue descrito para la figura 26 (pSTAT3, verde). Luego de 30 min, la inyección de 0.5µg LIF provocó una marcada activación de STAT3 en las células del RPE y en células de la retina

(principalmente células gliales de Müller) en ojos de ratones gp130-RPE-cre WT (b) y en ojos de ratones STAT3-RPE-cre WT (f). En comparación, en los ojos de los ratones gp130-RPE-cre KO (d) y de STAT3-RPE-cre KO (h), pSTAT3 estuvo ausente en las células del RPE, mientras que fue mantenida en la retina. En la columna izquierda se muestra el merge de imágenes capturadas para pSTAT3 y DAPI para cada grupo (a, c, e, g); RPE, epitelio pigmentado de la retina; ONL, capa nuclear externa; OPL, capa plexiforme externa; INL, capa nuclear interna; IPL, capa plexiforme interna; GCL, capa de las células ganglionares. Escala, 200  $\mu$ m.



**Figura 28. Los ratones gp130-RPE-cre KO exhiben respuestas de ERG, morfología retinal, y función fagocítica del RPE normales.**

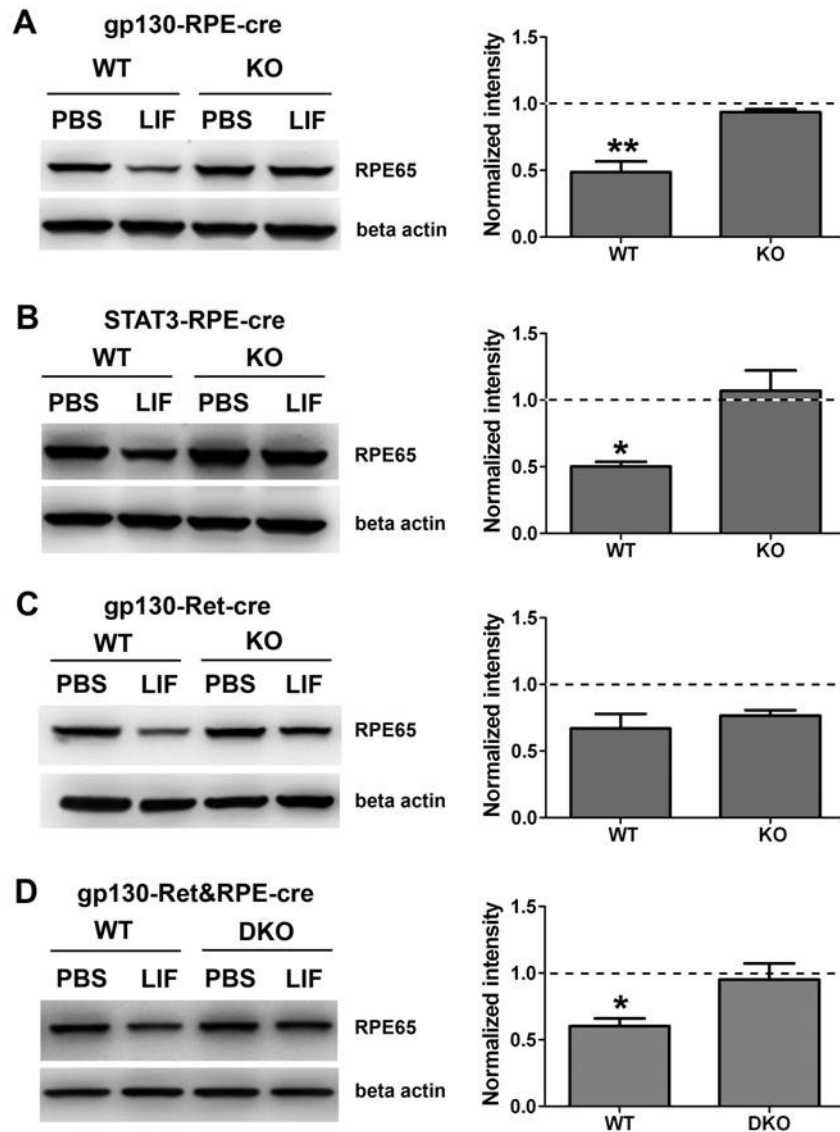
A) Las ondas -a y -b escotópicas en respuesta a flashes de intensidades incrementales (gráfico de líneas), y la onda c en respuesta a un único flash (gráfico de barras) en ratones gp130-RPE-cre-KO, fueron indistinguibles de aquellas medidas en sus controles WT por ERG. Las trazas de ERG representativas se muestran para ratones WT y KO. (n= al menos 5 para cada grupo. Barras de error, SEM). B) Imágenes de tinción hematoxilina-eosina representativas de la región superior de la retina, cerca de la cabeza del nervio

óptico muestran morfología retinal normal en ratón gp130-cre-KO a los 5 meses de vida, en comparación al ratón control WT. Escala: 100  $\mu$ m. C) Detección inmunohistoquímica de fagosomas marcados con anti-opsina en las células del RPE (rodopsina, verde) en secciones retinales de ratones gp130-RPE-cre KO (2 meses de vida). Los ojos fueron colectados a los tiempos indicados (8:00 a.m (a, b) and 6:00 p.m (c, d)). Las flechas rojas señalan los márgenes apical y basal del RPE. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Escala: 20  $\mu$ m. El gráfico de barras en C muestra la cuantificación de la actividad fagocítica del RPE a las 8:00 a.m y a las 6:00 p.m, expresada como número de fagosomas contados en el RPE. Comparado a los ratones WT, los ratones gp130-RPE-cre KO no tuvieron cambios significativos en el número de fagosomas en las células del RPE a los tiempos estudiados. (n= 4 para cada grupo. Barras de error, SEM).

Luego de establecer la delección eficiente y específica de la vía de señalización gp130/STAT3 en el RPE, determinamos si LIF aún podía reducir los niveles de RPE65 en el RPE. El análisis por western blot mostró que la inyección con LIF no disminuyó los niveles de RPE65 en las copas ópticas de ratones gp130-RPE-cre y STAT3-RPE-cre KO pero logró la reducción de RPE65 en los ratones control WT (**Figura 29A, 29B**). Estos resultados indicaron que la vía gp130/STAT3 intrínseca a las células del RPE medió la regulación negativa del ciclo visual. En contraste, LIF disminuyó los contenidos de proteína RPE65 en copas ópticas de ratones carentes de gp130 sólo en la retina (gp130-Ret-cre KO) (**Figura 29C**). Para confirmar que gp130 en el RPE es necesario para la reducción de RPE65 mediada por LIF, generamos ratones doble KO (DKO), carentes de gp130 en la retina y en el RPE. En estos ratones DKO, la inyección de LIF no redujo los niveles de RPE65 (**Figura 29D**). Estos resultados demuestran que la señalización inducida por LIF, intrínseca a las células del RPE es necesaria para inducir la reducción de RPE65.

En ojos inyectados con dosis altas de LIF (3µg), observamos una disminución coordinada de los niveles de RPE65 y rodopsina (**Figura 22B**). Demostramos que la regulación negativa de RPE65 inducida por LIF requiere una cascada gp130/STAT3 intrínseca al RPE (**Figura 29**). Para determinar si la reducción de rodopsina inducida por LIF fue dependiente de la señalización de la vía gp130/STAT3 activada en el RPE, inyectamos LIF en ojos de ratones con delección específica de gp130 o STAT3 en el RPE y medimos los niveles de la rodopsina por western blot. Encontramos que la delección de gp130 o STAT3 in el RPE no redujo la activación de STAT3 en la retina retina ni

provocó la reducción de la rodopsina inducida por LIF (**Figura 30A, 30B**). Luego, examinamos el efecto de la delección de gp130 en la retina en los niveles proteicos de rodopsina. La delección específica de gp130 en la retina redujo dramáticamente la activación de STAT3 en la neurorretina (**Figura 30C**) pero no afectó la habilidad de LIF para activar STAT3 en el RPE (**Figura 31A**). Como se muestra en la **Figura 30C**, la delección de gp130 en la retina resultó en la pérdida de la habilidad de LIF para regular negativamente los niveles de proteína rodopsina. No sorpresivamente, resultados similares fueron obtenidos de los ratones gp130-Ret&RPE-cre KO (**Figura 30D**). Además de rodopsina, LIF indujo la regulación negativa de otras proteínas de la fototransducción, transducina-  $\alpha$  y PDE6- $\alpha$ , en las retinas WT pero no en las retinas gp130-Ret&RPE-cre DKO retinas (**Figura 31B**). En su conjunto, nuestros datos demuestran que la regulación negativa de RPE65 inducida por LIF en el RPE, y la regulación negativa de rodopsina en la retina son independientes e intrínsecos del RPE y de la retina, respectivamente.

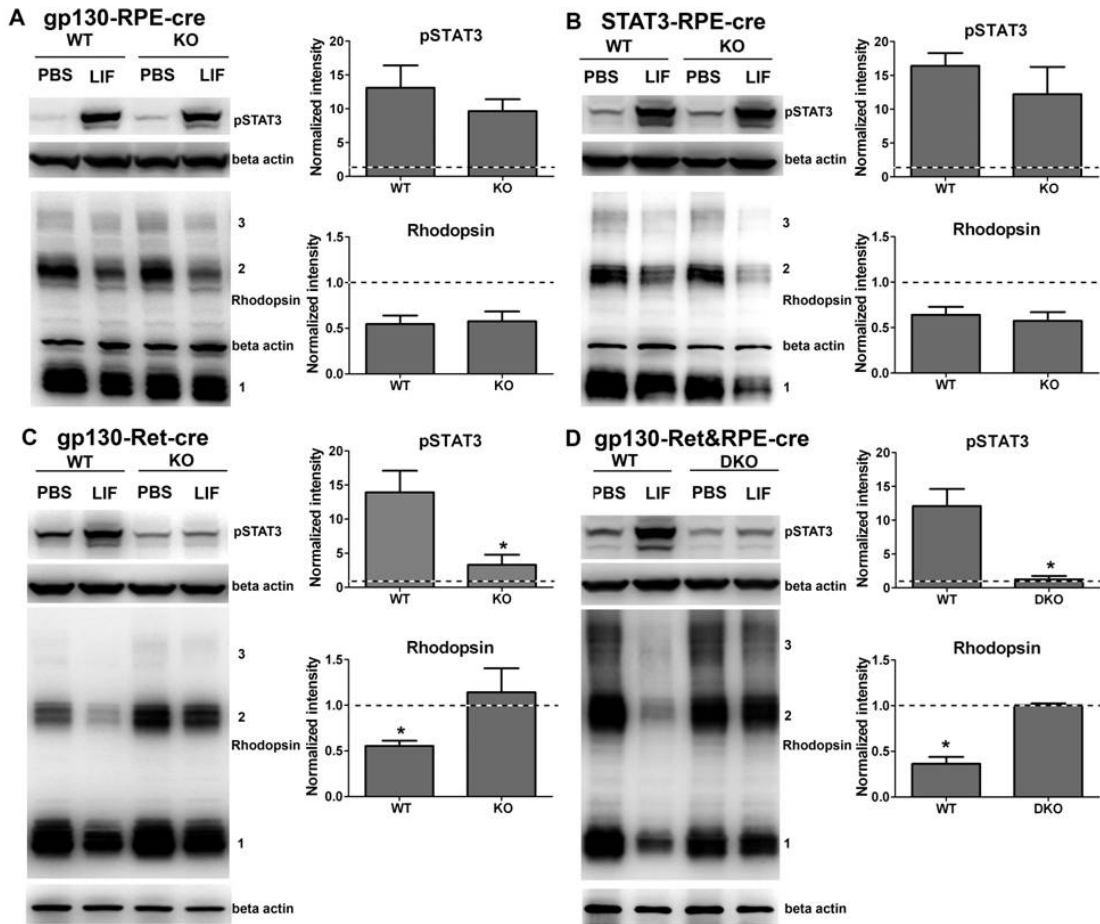


**Figura 29. La reducción de los niveles de la proteína RPE65 es dependiente de la vía de señalización gp130/STAT3 en células del RPE.**

Blots representativos (columna izquierda) y análisis densitométrico en múltiples blots (columna derecha) de los contenidos de la proteína RPE65 en copas ópticas, 5 días después de inyectar intravitrealmente 3.0  $\mu\text{g}$  LIF. Los valores mostrados corresponden a las señales normalizadas de los ojos inyectados con LIF relativas a las señales normalizadas de los ojos inyectados con PBS (cada muestra fue internamente

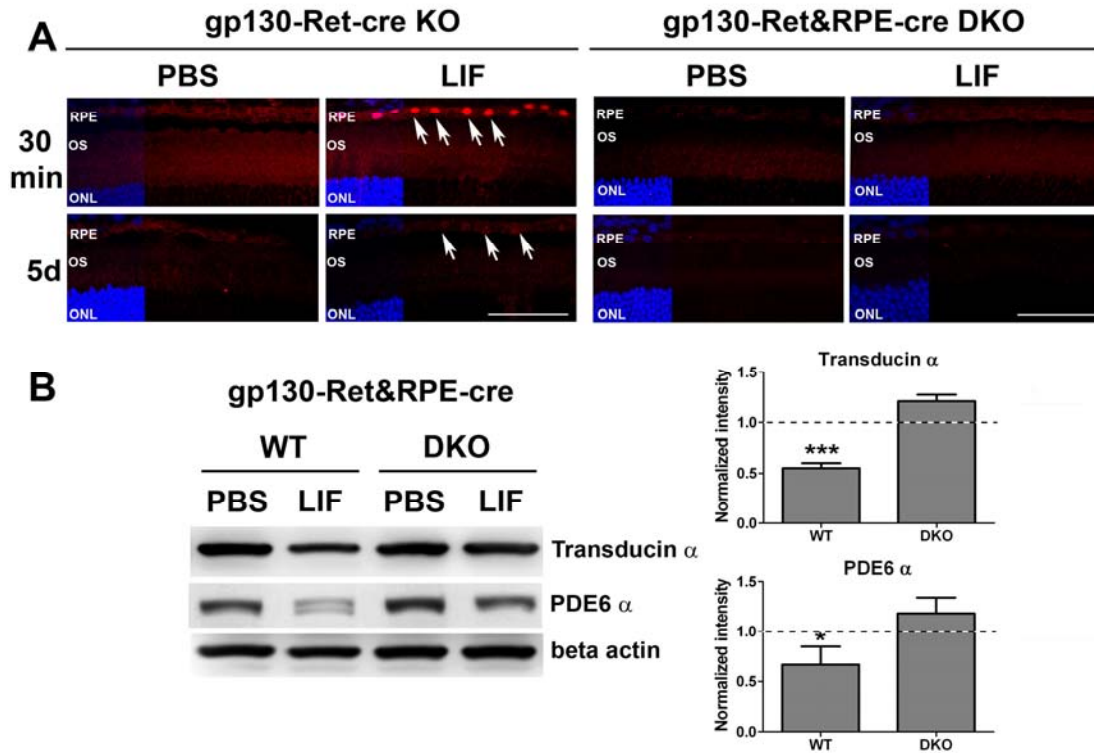


normalizada internal a la señal de  $\beta$ -actina). Por lo tanto, los controles PBS son fijados con el valor 1 (línea punteada). La reducción de proteína RPE65 inducida por el tratamiento con LIF observada en los ratones WT fue suprimida en las copas ópticas de ratones gp130-RPE-cre KO (A), STAT3-RPE-cre KO (B), y en los gp130-Ret&RPE-cre DKO (D). En las copas ópticas de ratones gp130-Ret-cre KO eyecups, LIF redujo los niveles de RPE65 efectivamente en la misma medida en KO and WT (C).  $\beta$ -actina fue usada como control de carga (n= al menos 3 para cada grupo, \*  $p < 0.05$ , usando la prueba T con dos colas para muestras no apareadas, comparando WT y KO. Barras de error, SEM).



**Figura 30. La activación de STAT3 y la regulación negativa de rodopsina mediadas por LIF en la retina dependen de la expresión de la vía gp130/STAT3 en la neurorretina.** Blots representativos y análisis de múltiples blots para la determinación de los contenidos de rodopsina y pSTAT3 en homogenados de retina, 5 días luego de la inyección intravítrea de 3.0  $\mu$ g LIF. En las retinas gp130-RPE-cre KO (A) y STAT3-RPE-cre KO (B), LIF indujo la activación de STAT3 y redujo los niveles de la proteína rodopsina a niveles comparables a los de ratones WT. La delección retinal de gp130 en los ratones gp130-Ret-cre KO (C), y en ambos retina y RPE, en los ratones gp130-Ret&RPE-cre DKO (D) suprimió la activación de STAT3 retinal y la reducción de los niveles de la proteína rodopsina.  $\beta$ -actina fue usada como control de carga. Las

normalizaciones se hicieron respecto a los controles PBS y fueron usadas para comparaciones entre grupos WT y KO. (n= al menos 3 para cada uno, \*  $p < 0.05$ , usando la prueba T con dos colas para muestras no apareadas. Barras de error, SEM).



**Figura 31. En ausencia de gp130 en la retina y en el RPE, LIF no activa STAT3, ni afecta los niveles de expresión de proteínas de la fototransducción.**

A) Detección inmunohistoquímica de la activación de STAT3 (pSTAT3; rojo) en criosecciones retinales de ratones gp130- Ret-cre KO y gp130-Ret&RPE-cre DKO a los 30 min, y a los 5 días de las inyecciones intravitreas con LIF y PBS. Mientras en las retinas con delección de STAT3 en la retina, STAT3 es altamente activado en las células del RPE, la doble delección de gp130 en retina y RPE no muestra señal detectable de pSTAT3 inducida por LIF. Escala, 200  $\mu$ m. B) Blots representativos y análisis densitométricos de los contenidos de las proteínas transducina-  $\alpha$  y PDE6- $\alpha$ , en homogenados de retinas ,5 días luego de las inyecciones intravítreas con 3.0  $\mu$ g LIF. La disminución inducida por LIF en los niveles de estas proteínas en los animales WT fue suprimida por la doble delección de gp130 en la retina y el RPE.  $\beta$ - actina se usó como

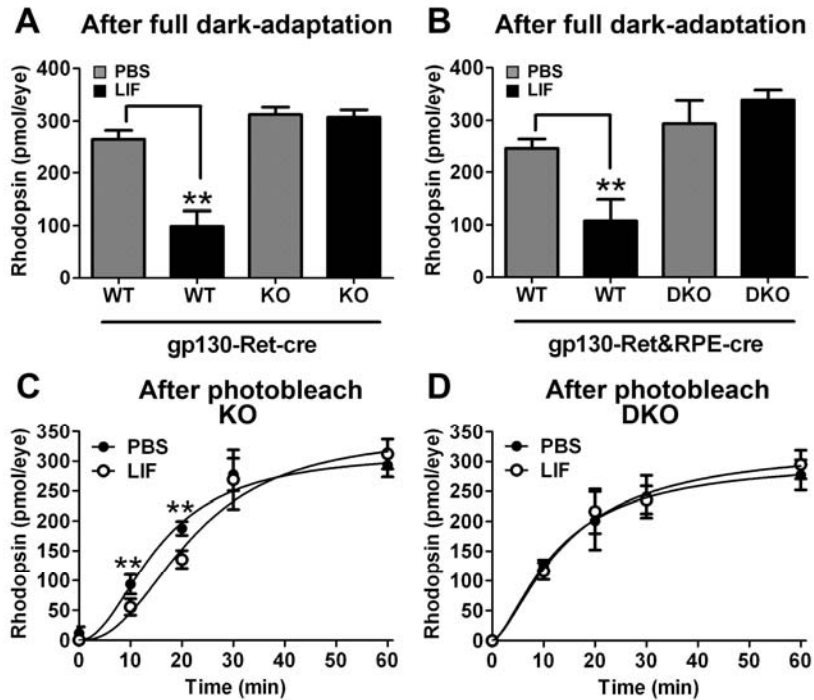
control de carga. Las normalizaciones fueron hechas respecto a los controles PBS y usadas para comparaciones entre grupos WT y KO. (n= 3 para cada grupo, \* y \*\*\* p < 0.05 usando la prueba T con dos colas para muestras no apareadas. Barras de error, SEM).

### **LIF retrasa la regeneración de la rodopsina después del fotoblanqueo.**

Ante el hallazgo de que LIF pudo reducir los niveles de proteína RPE65 y la actividad isomerohidrolasa en el RPE, quisimos determinar si este cambio en la actividad enzimática de RPE65 alteraba el sostén del RPE a la función de los fotorreceptores. Por esto, determinamos si podíamos medir una reducción en la regeneración de 11- *cis* RAL por el RPE, y si esto resultaría en un retraso en la regeneración de la rodopsina luego de un blanqueo por luz. Para investigar esto, medimos el contenido de rodopsina espectrofotométricamente a varios tiempos luego del blanqueo, y comparamos la regeneración de rodopsina entre ojos inyectados con LIF y PBS. En el estado completamente adaptado en la oscuridad, los ratones control WT redujeron significativamente el contenido de rodopsina, a los 5 días de la inyección con LIF (**Figura 32A, 32B**). En contraste, la delección de gp130 en la retina (**Figura 32A**) o en la retina y el RPE (**Figura 32B**) suprimió el efecto sobre la disminución del contenido de rodopsina inducido por LIF. Esto concuerda con los resultados de los western blots presentados en la **Figura 22** y en la **Figura 30**. Como esperábamos, la rodopsina total luego de la adaptación completa en la oscuridad no se redujo en los ratones gp130-Ret-cre KO, ya que éstos carecen de receptores para LIF. De todas formas, las células del RPE pudieron responder a LIF y tuvieron niveles de RPE65 reducidos (**ver Figura 29**). Hipotetizamos que en estos ratones, si la reducción de RPE65 era biológicamente significativa, LIF retardaría la regeneración de la rodopsina. En efecto, el tiempo para regenerar el 50% de la rodopsina ( $K_{0.5}$  [rodopsina]) fue retardado por más de 6 min en los ojos gp130-Ret-cre KO inyectados con LIF comparado a sus pares inyectados con PBS

( $K_{0.5}$  [rodopsina] =  $22.12 \pm 3.502$  min vs  $15.56 \pm 2.091$  min; LIF vs PBS, respectivamente) (**Figura 32C**). En contraste, en los ratones en que gp130 fue deletado en la retina y en el RPE (gp130-Ret&RPE-cre DKO), no hubo diferencias en la regeneración de la rodopsina ( $K_{0.5}$  [rodopsina] =  $14.25 \pm 4.476$  min vs  $12.65 \pm 4.476$  min; LIF vs PBS, respectivamente) (**Figura 32D**). LIF no cambió significativamente el contenido total de rodopsin/ojo ( $B_{max}$ ) en los ojos gp130-Ret-cre KO ( $B_{max} = 345.8 \pm 40.78$  pmol/ojo vs  $B_{max} = 315.0 \pm 28.4$  pmol/ojo; LIF vs PBS, respectivamente), ni en los ojos gp130-Ret&RPE-cre KO ( $B_{max} = 325.1 \pm 63.13$  pmol/ojo vs  $B_{max} = 302.6 \pm 69.32$  pmol/ojo; LIF vs PBS, respectivamente). Por lo tanto, el efecto de LIF en la regeneración de rodopsina requiere de receptor gp130 funcional en el RPE.

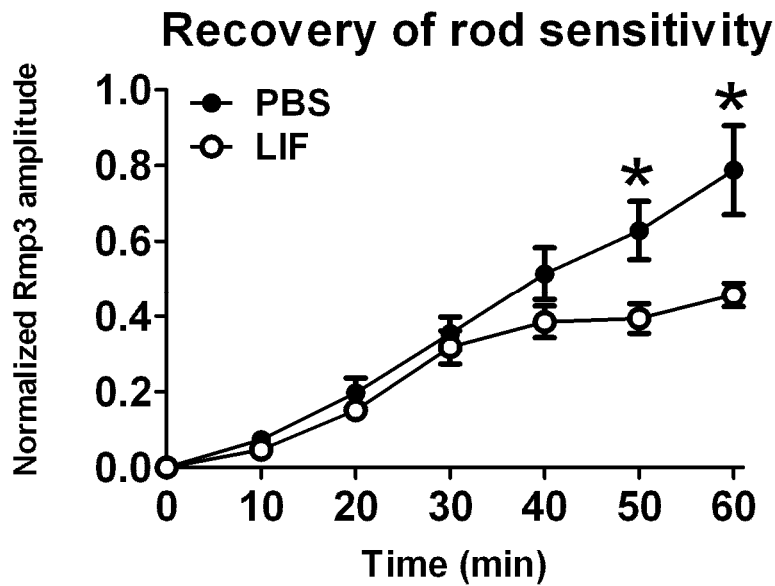
Para determinar si la reducción de los niveles de RPE65 podían alterar la función retinal, medimos la regeneración de la sensibilidad de los fotorreceptores bastones a continuación de un blanqueo por luz en ratones inyectados con LIF y PBS mediante ERG. Encontramos que una única inyección de LIF produjo a los 5 días un retraso significativo en la regeneración de la sensibilidad de los bastones (**Figura 33**). Este retraso fue sólo observado a los tiempos de adaptación más prolongados luego del blanqueo, en parte porque las amplitudes de las ondas-a son pequeñas antes de los 30 min de la regeneración. Luego de los 30 min, los ojos inyectados con PBS continuaron la regeneración de la sensibilidad de sus bastones, pero los ojos inyectados con LIF tuvieron un retraso.



**Figura 32. LIF retrasó la regeneración de la rodopsina blanqueable a través de un mecanismo intrínseco al RPE.**

Determinación espectrofotométrica de la rodopsina blanqueable en ojos completamente adaptados en la oscuridad de ratones gp130-Ret-cre WT y gp130-Ret-cre KO (A) y ojos gp130-Ret&RPE-cre WT y gp130-Ret&RPE-cre DKO (B) 5 días luego de las inyecciones intravítreas de 3.0  $\mu$ g LIF y PBS injections. Los niveles totales de rodopsina fueron reducidos por LIF en ratones WT pero no en ratones en los que gp130 fue deletado en la retina (n= al menos 3 para cada grupo, \*\* p < 0.05, con la prueba de T con dos colas para muestras apareadas. Barras de error, SEM). LIF redujo significativamente la regeneración de rodopsina en ratones carentes de gp130, específicamente en la retina (C). La regeneración de rodopsina no cambió en ratones carentes de gp130 en retina y en RPE (D). (n= al menos 3 para cada grupo, \*\* p < 0.05 con la prueba de T con dos colas para muestras apareadas. Barras de error, SEM).



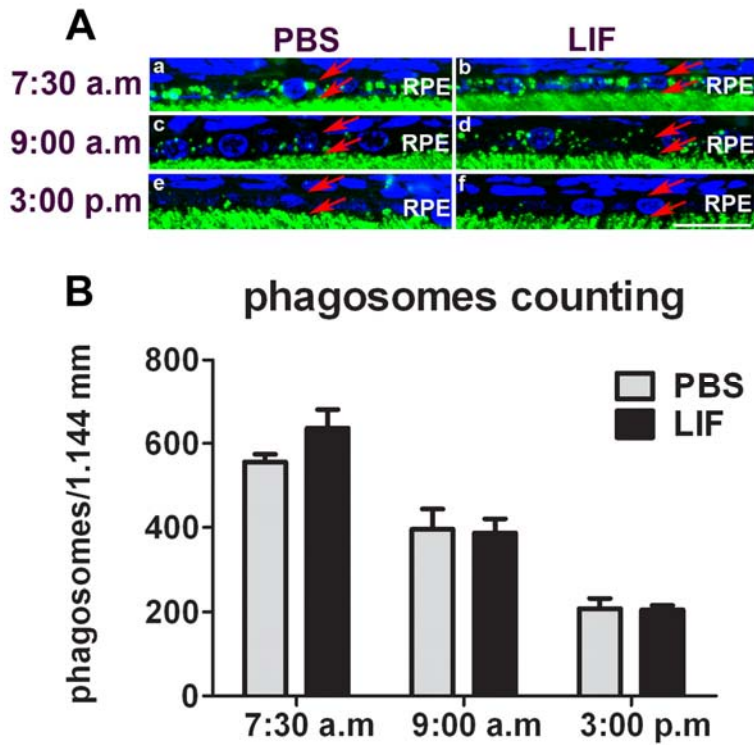


**Figura 33. La regeneración de la sensibilidad de los bastones luego de un blanqueo por luz está retrasada en los ojos tratados con LIF.**

Registros electroretinográficos de la regeneración de la sensibilidad de los bastones, a continuación del blanqueo por luz, medidos 5 días después de las inyecciones intravítreas con 3.0 $\mu$ g LIF y PBS. En ratones gp130-Ret-cre KO, LIF provocó un retraso en la regeneración de la sensibilidad de los fotorreceptores bastones respecto al tratamiento con PBS (n= 10 para cada grupo; \*p < 0.05 con la prueba T con dos colas para muestras apareadas. Barras de error, SEM).

### **LIF no altera la función fagocítica del RPE.**

Dado que LIF podía reducir el ciclo visual, pensamos que LIF podía reducir otras funciones del RPE. Las células del RPE son responsables de la fagocitosis y digestión diarias del 10 % de de los segmentos externos de los fotorreceptores (Bosch et al., 1993;LaVail, 1976;LaVail, 1980;Nandrot et al., 2007). Esta es una actividad esencial de las células del RPE, ya que su alteración resulta en la acumulación de una capa de restos entre los fotorreceptores y el RPE, y conduce a la degeneración retinal (Bok and Hall, 1971;Chaitin and Hall, 1983;Strick et al., 2009). Razonamos que como LIF puede reducir el contenido de rodopsina en los fotorreceptores, tal efecto confundiría la interpretación de los ensayos fagocíticos, ya que en los animales WT el nivel de sustrato disponible para la fagocitosis estaría sensiblemente disminuído. Por lo tanto, usamos ratones gp130-Ret-cre KO, en los que la subunidad gp130 está específicamente delecionada en la retina, mientras que es mantenida en las células del RPE. Colectamos ojos a los 5 días luego de realizar las inyecciones con LIF y PBS, a diferentes momentos del día y procesamos los ojos para inmunohistoquímica. Como esperábamos, a las 7:30 a.m, observamos un “estallido” (*burst*) de fagocitosis que decreció a lo largo del día. Este es un sello de la regulación circadiana de la fagocitosis en el RPE. Esta actividad fue idéntica en ojos inyectados con LIF y con PBS (**Figura 34**). Los resultados demuestran que la estimulación con LIF específicamente disminuyó la actividad del ciclo visual en el RPE, sin alterar otras de las funciones principales del RPE, tales como la fagocitosis.



**Figura 34. LIF no altera la función fagocítica en el RPE.**

A) Detección inmunohistoquímica de fagosomas en las células del RPE marcados para rodopsina (rodopsina; verde) en secciones retinales de ratones gp130-Ret KO. Los ojos fueron colectados 5 días después de las inyecciones con 3µg LIF (b, d, f) o PBS (a, c, e), a los tiempos indicados: 7:30 a.m (a, b); 9:00 a.m (c, d); 3:00 p.m (e, f). Las flechas rojas indican los márgenes apical y basal del RPE. Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). Escala: 20 µm. B) Cuantificación de la actividad fagocítica del RPE en las condiciones descritas en (A), expresada como número de fagosomas contados en el RPE (1.143 µm). Comparado con PBS, LIF no cambió significativamente el número de fagosomas en el RPE a ningunos de los tiempos colectados (n= 4, comparando ojos inyectados con LIF vs PBS. Barras de error, SEM).

## DISCUSIÓN

En este capítulo, demostramos un nuevo rol para la vía de señalización gp130/STAT3 en la coordinación de la actividad del ciclo visual en la retina y en las células del RPE. Nuestros resultados demuestran que una única inyección de LIF puede disminuir la actividad isomerohidrolasa en las células de RPE *in vivo* de forma coordinada con la reducción de la expresión de rodopsina en los fotorreceptores. La reducción en esta actividad en el RPE se mantuvo por 9 días, y fue suficiente para reducir la regeneración del blanqueo por luz, y para extender el tiempo de adaptación en la oscuridad. Los datos también demuestran, que estos efectos requieren de gp130 y STAT3 en las células del RPE, y que implican la reducción de la expresión del ARNm y de la proteína RPE65. La importancia de este estudio es que hemos identificado un factor paracrino que puede estimular a las células del RPE y a los fotorreceptores de forma independiente para reducir la producción de 11-*cis* RAL. Como discutiremos, esto tiene relevancia en las degeneraciones de la retina.

Las acumulaciones excesivas de productos secundarios del ciclo visual, tales como A2E, fotoisómeros de A2E, y dímeros conjugados de todo *-trans* RAL, son consideradas causas primarias de la atrofia del RPE observada en la enfermedad de Stargardt, una forma juvenil de degeneración (Radu et al., 2011; Sparrow et al., 2003), en la distrofia cono-bastón, y en formas de retinitis pigmentosa atípica. RPE65 es la única isomerohidrolasa en el RPE, y cataliza el paso limitante en el ciclo visual (Gollapalli and Rando, 2004). En este contexto, la limitación de la actividad de la isomerohidrolasa RPE65 es crítica para prevenir la degeneración. El retardo en el reciclado de retinoides

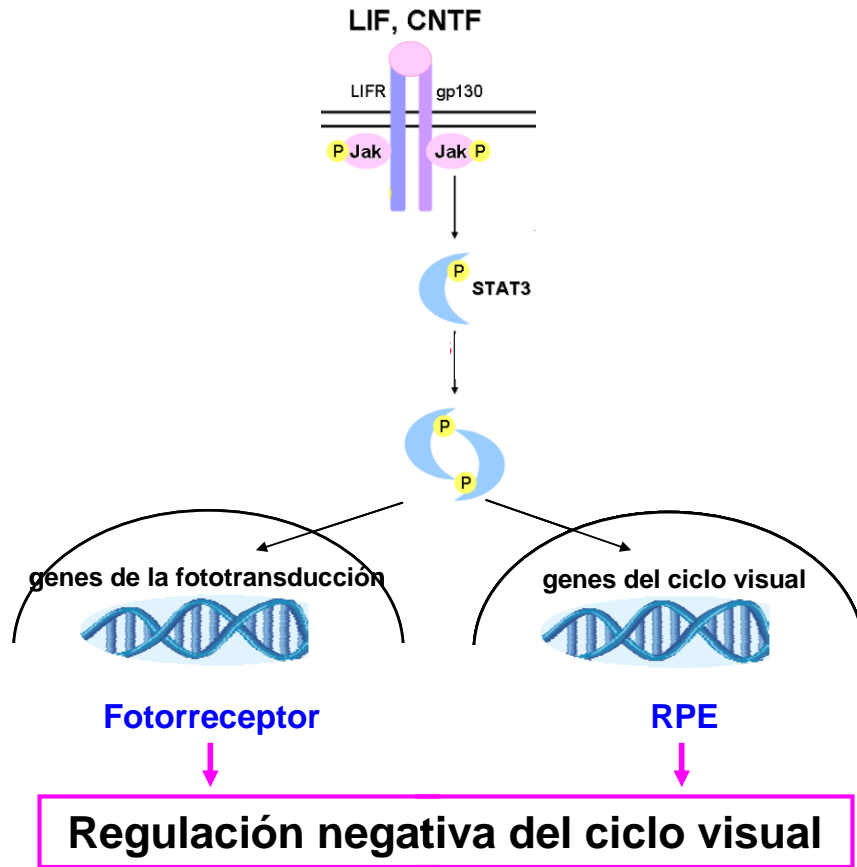
dependiente de la luz ha sido pensado como una estrategia de protección (Radu et al., 2008;Wenzel et al., 2001a;Wenzel et al., 2003). De hecho, el uso de compuestos que reducen la renovación del cromóforo 11-*cis*-RAL, ha sido propuesto como potencial tratamiento para formas específicas de degeneración retinal (Maiti et al., 2006;Mandal et al., 2011;Travis et al., 2007). Nuestro estudio sugiere que los agonistas de la vía LIF/gp130/STAT3 que reduzcan la expresión de RPE65 podrían también tener actividad terapéutica. Es importante destacar que la regulación negativa de transcritos que codifican para proteínas del ciclo visual es una respuesta endógena genérica orquestada por el RPE observada en modelos de daño por luz y desprendimiento de retina (Rattner et al., 2008). Nuestro estudio sugiere que la regulación negativa del ciclo visual en el RPE y en la retina es coordinada por un mismo factor. Este es el primer reporte que identifica un factor específico que pueda controlar esta actividad.

La activación de gp130 intrínseca de los fotorreceptores es requerida para prevenir la muerte neuronal en situaciones de estrés inducido por daño agudo por luz o estrés genético (Ueki et al., 2009;Ueki et al., 2010), sugiriendo que gp130 es esencial para la prevención o retardo de la muerte celular en enfermedades neurodegenerativas o en daños crónicos. De hecho, cuando los ligandos del receptor gp130, tales como LIF y CNTF son provistos exógenamente, pueden proteger contra el daño inducido por luz en los fotorreceptores (LaVail et al., 1992;Ueki et al., 2008b). Previamente (Ueki et al., 2008b), observamos una fuerte activación de STAT3 en el RPE, luego del estímulo de inyecciones intravítreas con LIF, que nos impulsó a estudiar qué funciones del RPE son moduladas por STAT3. En el RPE adulto se han encontrado miembros de la familia de factores de transcripción STAT, específicamente de STAT1, STAT2, STAT5b, STAT6, y

STAT3 (Zhang et al., 2003). Particularmente, la fosforilación de STAT3 (pSTAT3) se localizó en los núcleos del RPE, y junto a STAT5a, fue sugerida como el modulador más importante de la actividad del RPE. La activación de STAT3 también fue reportada en células del RPE, coincidentemente con la formación de cicatrices en las membranas coroidales neovasculares de pacientes con AMD (Fasler-Kan et al., 2005), indicando un posible rol de STAT3 en las respuestas moleculares del RPE cells durante situaciones de estrés o enfermedades. Recientemente, se determinó la expresión de CNTF, CT1, OSM, LIF, y la localización de sus receptores en cultivos primarios de RPE fetal (Li et al., 2011). En dicho trabajo, el tratamiento con CNTF y OSM indujo la fosforilación de STAT3 e incrementó la supervivencia celular, apoyando un rol de la vía gp130/STAT3 en la modulación de la secreción polarizada de factores neurotróficos y citoquinas desde la superficie apical del RPE para contribuir a la protección de los fotorreceptores.

Estudios previos implicaron a miembros de la familia de citoquinas IL-6, por ejemplo CNTF (Rhee et al., 2007; Wen et al., 2006; Wen et al., 2008; Rhee et al., 2007; Wen et al., 2008), como reguladores negativos de la expresión de componentes en la cascada de la fototransducción en los fotorreceptores. Aquí, proveemos evidencia de que LIF activa la vía gp130/STAT3 en el RPE para regular negativamente la actividad del ciclo visual, a través de la reducción de los niveles de expresión de ARN (**Figura 24A**), proteína (**Figura 22B, 22C**), y actividad enzimática de RPE65 (**Figura 25**). Este efecto fue específico para dicha proteína, dado que las expresiones de otras proteínas del RPE, LRAT, MCT-1, y ezrina no difirieron significativamente entre ojos inyectados con LIF y sus controles con PBS (**Figura 24B, 24C**), y otra función principal del RPE, la fagocitosis de los segmentos externos, no fue influenciada por LIF (**Figura 34**).

En resumen, ofrecemos evidencias de un rol novedoso de la vía gp130/STAT3 en las células del RPE *in vivo* (**Ilustración 17**). En respuesta a citoquinas como LIF, que son estimuladas por las células gliales de Müller en situaciones de estrés retinal (Joly et al., 2008), el RPE puede regular de forma negativa la actividad del ciclo visual, induciendo la disminución de la expresión y actividad del componente clave RPE65. Nuestros hallazgos describen un fenómeno célula-autónomo regulado por una única cascada, que cuando es expresada en fotorreceptores de retina puede regular negativamente fototransducción y proveer protección a los fotorreceptores sujetos a estreses gatillados por luz o por mutaciones genéticas. Una comprensión integral del mecanismo detrás de estos efectos es de relevancia para la aplicación de citoquinas, tales como LIF y CNTF en estudios clínicos para el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas de la retina.



**Ilustración 17. Una única vía de señalización, gp130/STAT3, activada por el mismo ligando, LIF, es responsable de la regulación negativa coordinada e independiente del ciclo visual en el RPE y en la retina, respectivamente.**



## **CONCLUSIONES GENERALES DE ESTA TESIS**

**Capítulo I:** Estos resultados muestran por primera vez una neuroprotección directa de los fotorreceptores por xantófilas, y sugieren que ZEA y LUT junto al DHA podrían ser importantes factores ambientales que contribuyen a la promoción de la supervivencia y diferenciación de los fotorreceptores.

**Capítulo II:** LIF puede proteger los fotorreceptores del daño inducido por PQ en cultivos neuronales primarios de retina y nos permiten proponer este sistema de cultivo como modelo adecuado para estudios posteriores que ayudarían a dilucidar mecanismos implicados en la neuroprotección activada por LIF contra el estrés oxidativo.

**Capítulo III:** Nuestros datos sugieren que el daño por luz induce la oxidación de ADN en fotorreceptores. El tratamiento previo de preconditionamiento redujo la oxidación de ADN como parte de la respuesta endógena de neuroprotección inducida por este modelo, probablemente mediado por la inducción endógena de LIF con la consecuente activación de la vía gp130/STAT3. La reducción en los niveles de oxidación de proteínas no aparenta estar implicada en los mecanismos neuroprotectores inducidos por el modelo de preconditionamiento en las condiciones estudiadas.

**Capítulo IV:** Nuestros resultados demostraron que las respuestas al estrés en la retina, tales como la regulación positiva de la expresión de LIF, pueden de manera coordinada modular la actividad del ciclo visual en el RPE, y en la retina para controlar la tasa de producción de 11-cis retinal (11-cis RAL). El efecto neuroprotector de LIF acoplado a su habilidad para disminuir la actividad de RPE65 sugieren que el agonismo de gp130 podría proveer una potente estrategia terapéutica para enfermedades retinales que resultan de la acumulación tóxica de derivados de retinoides.

## **PUBLICACIONES ORIGINADAS DURANTE ESTA TESIS**

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

**Ana J. Chucair-Elliott**, Jiangang Wang, Michael H. Elliott, Gennadiy P. Moiseyev, Ma, JX, Luis E. Politi, Nora P. Rotstein, Shizuo Akira, Satoshi Uematsu, and John D. Ash. Leukemia Inhibitory Factor (LIF) Downregulates the Synthesis of 11-*cis* Retinaldehyde by RPE and its Utilization in Photoreceptors. Sometido a revisión por JBC el 02/12/2011 (Paper submitted to JBC: ID JBC/2011/330084).

### **Trabajos en preparación para publicación:**

Yumi Ueki, Jiangang Wang, **Ana Chucair-Elliott** and John D. Ash. Activation of STAT3 mediates stress-induced endogenous neuroprotection

**Ana J. Chucair-Elliott**, Jiangang Wang, MD, and John D. Ash, PhD. Preconditioning Induced Photoreceptor Cell Protection in the Retina (review article)

## Reference List

- Adler R (1982) Regulation of neurite growth in purified retina neuronal cultures: effects of PNPf, a substratum-bound, neurite-promoting factor. *J Neurosci Res* 8:165-177.
- Adler R, Curcio C, Hicks D, Price D, Wong F (1999) Cell death in age-related macular degeneration. *Mol Vis* 5:31.
- Akira S (2000) Roles of STAT3 defined by tissue-specific gene targeting. *Oncogene* 19:2607-2611.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM (1995) Mitochondrial decay in aging. *Biochim Biophys Acta* 1271:165-170.
- Arshavsky VY, Lamb TD, Pugh EN, Jr. (2002) G proteins and phototransduction. *Annu Rev Physiol* 64:153-187.
- Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, Murray IJ (1999a) Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 83:867-877.
- Beatty S, Boulton M, Henson D, Koh HH, Murray IJ (1999b) Macular pigment and age related macular degeneration. *Br J Ophthalmol* 83:867-877.
- Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M (2000) The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 45:115-134.
- Bernstein PS, Delori FC, Richer S, van Kuijk FJ, Wenzel AJ (2010) The value of measurement of macular carotenoid pigment optical densities and distributions in age-related macular degeneration and other retinal disorders. *Vision Res* 50:716-728.
- Betz UA, Bloch W, van den Broek M, Yoshida K, Taga T, Kishimoto T, Addicks K, Rajewsky K, Muller W (1998) Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J Exp Med* 188:1955-1965.
- Bhosale P, Bernstein PS (2005) Synergistic effects of zeaxanthin and its binding protein in the prevention of lipid membrane oxidation. *Biochim Biophys Acta* 1740:116-121.
- Bhosale P, Larson AJ, Frederick JM, Southwick K, Thulin CD, Bernstein PS (2004) Identification and characterization of a Pi isoform of glutathione S-transferase (GSTP1) as a zeaxanthin-binding protein in the macula of the human eye. *J Biol Chem* 279:49447-49454.
- Bhosale P, Li B, Sharifzadeh M, Gellermann W, Frederick JM, Tsuchida K, Bernstein PS (2009) Purification and partial characterization of a lutein-binding protein from human retina. *Biochemistry* 48:4798-4807.

- Bird AC, Bressler NM, Bressler SB, Chisholm IH, Coscas G, Davis MD, de Jong PT, Klaver CC, Klein BE, Klein R, . (1995) An international classification and grading system for age-related maculopathy and age-related macular degeneration. The International ARM Epidemiological Study Group. *Surv Ophthalmol* 39:367-374.
- Bok D (1993) The retinal pigment epithelium: a versatile partner in vision. *J Cell Sci Suppl* 17:189-195.
- Bok D, Hall MO (1971) The role of the pigment epithelium in the etiology of inherited retinal dystrophy in the rat. *J Cell Biol* 49:664-682.
- Bone RA, Landrum JT, Friedes LM, Gomez CM, Kilburn MD, Menendez E, Vidal I, Wang W (1997) Distribution of lutein and zeaxanthin stereoisomers in the human retina. *Exp Eye Res* 64:211-218.
- Bone RA, Landrum JT, Mayne ST, Gomez CM, Tibor SE, Twaroska EE (2001) Macular pigment in donor eyes with and without AMD: a case-control study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:235-240.
- Bosch E, Horwitz J, Bok D (1993) Phagocytosis of outer segments by retinal pigment epithelium: phagosome-lysosome interaction. *J Histochem Cytochem* 41:253-263.
- Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S (2005) Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2:484-494.
- Bredt DS, Snyder SH (1994) Transient nitric oxide synthase neurons in embryonic cerebral cortical plate, sensory ganglia, and olfactory epithelium. *Neuron* 13:301-313.
- Burgi S, Samardzija M, Grimm C (2009) Endogenous leukemia inhibitory factor protects photoreceptor cells against light-induced degeneration. *Mol Vis* 15:1631-1637.
- Burns ME, Arshavsky VY (2005) Beyond counting photons: trials and trends in vertebrate visual transduction. *Neuron* 48:387-401.
- Burton GW, Ingold KU (1984) beta-Carotene: an unusual type of lipid antioxidant. *Science* 224:569-573.
- Cantrell A, McGarvey DJ, Truscott TG, Rancan F, Bohm F (2003) Singlet oxygen quenching by dietary carotenoids in a model membrane environment. *Arch Biochem Biophys* 412:47-54.
- Carmody RJ, McGowan AJ, Cotter TG (1999) Reactive oxygen species as mediators of photoreceptor apoptosis in vitro. *Exp Cell Res* 248:520-530.
- Castello PR, Drechsel DA, Patel M (2007) Mitochondria are a major source of paraquat-induced reactive oxygen species production in the brain. *J Biol Chem* 282:14186-14193.

- Chaitin MH, Hall MO (1983) Defective ingestion of rod outer segments by cultured dystrophic rat pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24:812-820.
- Chen CC, Heller J (1977) Uptake of retinol and retinoic acid from serum retinol-binding protein by retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 252:5216-5221.
- Chew BP, Brown CM, Park JS, Mixter PF (2003) Dietary lutein inhibits mouse mammary tumor growth by regulating angiogenesis and apoptosis. *Anticancer Res* 23:3333-3339.
- Chew EY, Lindblad AS, Clemons T (2009) Summary results and recommendations from the age-related eye disease study. *Arch Ophthalmol* 127:1678-1679.
- Chollangi S, Wang J, Martin A, Quinn J, Ash JD (2009) Preconditioning-induced protection from oxidative injury is mediated by leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and its ligands in the retina. *Neurobiol Dis* 34:535-544.
- Cingolani C, Rogers B, Lu L, Kachi S, Shen J, Campochiaro PA (2006) Retinal degeneration from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 40:660-669.
- Conn PF, Schalch W, Truscott TG (1991) The singlet oxygen and carotenoid interaction. *J Photochem Photobiol B* 11:41-47.
- Cookson MR, Ince PG, Shaw PJ (1998) Peroxynitrite and hydrogen peroxide induced cell death in the NSC34 neuroblastoma x spinal cord cell line: role of poly (ADP-ribose) polymerase. *J Neurochem* 70:501-508.
- Curcio CA, Medeiros NE, Millican CL (1996) Photoreceptor loss in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 37:1236-1249.
- Darnell JE, Jr. (1997) STATs and gene regulation. *Science* 277:1630-1635.
- Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59-63.
- Delcourt C, Carriere I, Delage M, Barberger-Gateau P, Schalch W (2006) Plasma lutein and zeaxanthin and other carotenoids as modifiable risk factors for age-related maculopathy and cataract: the POLA Study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:2329-2335.
- Delmelle M (1978) Retinal sensitized photodynamic damage to liposomes. *Photochem Photobiol* 28:357-360.
- Demmig-Adams B, Adams WW, III (2002) Antioxidants in photosynthesis and human nutrition. *Science* 298:2149-2153.
- Di Monte DA (2003) The environment and Parkinson's disease: is the nigrostriatal system preferentially targeted by neurotoxins? *Lancet Neurol* 2:531-538.

Dowling JE, Wald G (1960) THE BIOLOGICAL FUNCTION OF VITAMIN A ACID. Proc Natl Acad Sci U S A 46:587-608.

Driessen CA, Winkens HJ, Hoffmann K, Kuhlmann LD, Janssen BP, van Vugt AH, Van Hooser JP, Wieringa BE, Deutman AF, Palczewski K, Ruether K, Janssen JJ (2000) Disruption of the 11-cis-retinol dehydrogenase gene leads to accumulation of cis-retinols and cis-retinyl esters. Mol Cell Biol 20:4275-4287.

Eckmiller MS (2004) Defective cone photoreceptor cytoskeleton, alignment, feedback, and energetics can lead to energy depletion in macular degeneration. Prog Retin Eye Res 23:495-522.

Edge R, McGarvey DJ, Truscott TG (1997) The carotenoids as anti-oxidants--a review. J Photochem Photobiol B 41:189-200.

Fain GL, Hardie R, Laughlin SB (2010) Phototransduction and the evolution of photoreceptors. Curr Biol 20:R114-R124.

Farjo KM, Moiseyev G, Takahashi Y, Crouch RK, Ma JX (2009) The 11-cis-retinol dehydrogenase activity of RDH10 and its interaction with visual cycle proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:5089-5097.

Farrington JA, Ebert M, Land EJ, Fletcher K (1973) Bipyridylum quaternary salts and related compounds. V. Pulse radiolysis studies of the reaction of paraquat radical with oxygen. Implications for the mode of action of bipyridyl herbicides. Biochim Biophys Acta 314:372-381.

Fasler-Kan E, Wunderlich K, Hildebrand P, Flammer J, Meyer P (2005) Activated STAT 3 in choroidal neovascular membranes of patients with age-related macular degeneration. Ophthalmologica 219:214-221.

Franco LM, Zulliger R, Wolf-Schnurrbusch UE, Katagiri Y, Kaplan HJ, Wolf S, Enzmann V (2009) Decreased visual function after patchy loss of retinal pigment epithelium induced by low-dose sodium iodate. Invest Ophthalmol Vis Sci 50:4004-4010.

Fu Y, Yau KW (2007) Phototransduction in mouse rods and cones. Pflugers Arch 454:805-819.

Gao H, Hollyfield JG (1995) Basic fibroblast growth factor in retinal development: differential levels of bFGF expression and content in normal and retinal degeneration (rd) mutant mice. Dev Biol 169:168-184.

Gao H, Hollyfield JG (1996) Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. Exp Eye Res 62:181-189.

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

- German OL, Insua MF, Gentili C, Rotstein NP, Politi LE (2006a) Docosahexaenoic acid prevents apoptosis of retina photoreceptors by activating the ERK/MAPK pathway. *J Neurochem* 98:1507-1520.
- German OL, Miranda GE, Abrahan CE, Rotstein NP (2006b) Ceramide is a mediator of apoptosis in retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:1658-1668.
- Gollapalli DR, Rando RR (2004) The specific binding of retinoic acid to RPE65 and approaches to the treatment of macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10030-10035.
- Gordon WC, Casey DM, Lukiw WJ, Bazan NG (2002) DNA damage and repair in light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:3511-3521.
- Gorn RA, Kuwabara T (1967) Retinal damage by visible light. A physiologic study. *Arch Ophthalmol* 77:115-118.
- Goureau O, Jeanny JC, Becquet F, Hartmann MP, Courtois Y (1993) Protection against light-induced retinal degeneration by an inhibitor of NO synthase. *Neuroreport* 5:233-236.
- Grant H, Lantos PL, Parkinson C (1980) Cerebral damage in paraquat poisoning. *Histopathology* 4:185-195.
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629.
- Grune T, Davies KJ (2003) The proteasomal system and HNE-modified proteins. *Mol Aspects Med* 24:195-204.
- Haddad IY, Pataki G, Hu P, Galliani C, Beckman JS, Matalon S (1994) Quantitation of nitrotyrosine levels in lung sections of patients and animals with acute lung injury. *J Clin Invest* 94:2407-2413.
- Halliwell B (1999) Oxygen and nitrogen are pro-carcinogens. Damage to DNA by reactive oxygen, chlorine and nitrogen species: measurement, mechanism and the effects of nutrition. *Mutat Res* 443:37-52.
- Handelman GJ, Dratz EA, Reay CC, van Kuijk JG (1988) Carotenoids in the human macula and whole retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 29:850-855.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
- Hughes JT (1988) Brain damage due to paraquat poisoning: a fatal case with neuropathological examination of the brain. *Neurotoxicology* 9:243-248.

- Hughes SM, Lillien LE, Raff MC, Rohrer H, Sendtner M (1988) Ciliary neurotrophic factor induces type-2 astrocyte differentiation in culture. *Nature* 335:70-73.
- Irreverre F, Stone AL, Shichi H, Lewis MS (1969) Biochemistry of visual pigments. I. Purification and properties of bovine rhodopsin. *J Biol Chem* 244:529-536.
- Jin M, Li S, Moghrabi WN, Sun H, Travis GH (2005) Rpe65 is the retinoid isomerase in bovine retinal pigment epithelium. *Cell* 122:449-459.
- Joly S, Lange C, Thiersch M, Samardzija M, Grimm C (2008) Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors in vivo. *J Neurosci* 28:13765-13774.
- Jordan J, Galindo MF, Prehn JH, Weichselbaum RR, Beckett M, Ghadge GD, Roos RP, Leiden JM, Miller RJ (1997) p53 expression induces apoptosis in hippocampal pyramidal neuron cultures. *J Neurosci* 17:1397-1405.
- Kefalov V, Fu Y, Marsh-Armstrong N, Yau KW (2003) Role of visual pigment properties in rod and cone phototransduction. *Nature* 425:526-531.
- Kim SR, Nakanishi K, Itagaki Y, Sparrow JR (2006) Photooxidation of A2-PE, a photoreceptor outer segment fluorophore, and protection by lutein and zeaxanthin. *Exp Eye Res* 82:828-839.
- King GL, Suzuma K (2000) Pigment-epithelium-derived factor--a key coordinator of retinal neuronal and vascular functions. *N Engl J Med* 342:349-351.
- Kirschfeld K (1982) Carotenoid pigments: their possible role in protecting against photooxidation in eyes and photoreceptor cells. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 216:71-85.
- Kita M, Marmor MF (1992) Effects on retinal adhesive force in vivo of metabolically active agents in the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 33:1883-1887.
- Krinsky NI (1989) Antioxidant functions of carotenoids. *Free Radic Biol Med* 7:617-635.
- Krinsky NI (2002) Possible biologic mechanisms for a protective role of xanthophylls. *J Nutr* 132:540S-542S.
- Krinsky NI, Landrum JT, Bone RA (2003) Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. *Annu Rev Nutr* 23:171-201.
- Kubota R, Boman NL, David R, Mallikaarjun S, Patil S, Birch D (2011) SAFETY AND EFFECT ON ROD FUNCTION OF ACU-4429, A NOVEL SMALL-MOLECULE VISUAL CYCLE MODULATOR. *Retina*.
- Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, Chader GJ, Darrow RM, Organisciak DT (1995) Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1177-1181.



- Lamb TD, Pugh EN, Jr. (2004) Dark adaptation and the retinoid cycle of vision. *Prog Retin Eye Res* 23:307-380.
- Lamb TD, Pugh EN, Jr. (2006) Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:5137-5152.
- Landrum JT, Bone RA (2001) Lutein, zeaxanthin, and the macular pigment. *Arch Biochem Biophys* 385:28-40.
- LaVail MM (1976) Rod outer segment disc shedding in relation to cyclic lighting. *Exp Eye Res* 23:277-280.
- LaVail MM (1980) Circadian nature of rod outer segment disc shedding in the rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 19:407-411.
- LaVail MM, Gorrin GM, Repaci MA (1987) Strain differences in sensitivity to light-induced photoreceptor degeneration in albino mice. *Curr Eye Res* 6:825-834.
- LaVail MM, Unoki K, Yasumura D, Matthes MT, Yancopoulos GD, Steinberg RH (1992) Multiple growth factors, cytokines, and neurotrophins rescue photoreceptors from the damaging effects of constant light. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:11249-11253.
- Leaver SG, Cui Q, Plant GW, Arulpragasam A, Hisheh S, Verhaagen J, Harvey AR (2006) AAV-mediated expression of CNTF promotes long-term survival and regeneration of adult rat retinal ganglion cells. *Gene Ther* 13:1328-1341.
- Levine RL (1983) Oxidative modification of glutamine synthetase. I. Inactivation is due to loss of one histidine residue. *J Biol Chem* 258:11823-11827.
- Li B, Vachali P, Bernstein PS (2010) Human ocular carotenoid-binding proteins. *Photochem Photobiol Sci* 9:1418-1425.
- Li F, Cao W, Anderson RE (2001) Protection of photoreceptor cells in adult rats from light-induced degeneration by adaptation to bright cyclic light. *Exp Eye Res* 73:569-577.
- Li R, Wen R, Banzon T, Maminishkis A, Miller SS (2011) CNTF Mediates Neurotrophic Factor Secretion and Fluid Absorption in Human Retinal Pigment Epithelium. *PLoS One* 6:e23148.
- Li S, Chang CJ, Abler AS, Fu J, Tso MO, Lam TT (1996) A comparison of continuous versus intermittent light exposure on apoptosis. *Curr Eye Res* 15:914-922.
- Lim BP, Nagao A, Terao J, Tanaka K, Suzuki T, Takama K (1992) Antioxidant activity of xanthophylls on peroxy radical-mediated phospholipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 1126:178-184.
- Liu C, Peng M, Laties AM, Wen R (1998a) Preconditioning with bright light evokes a protective response against light damage in the rat retina. *J Neurosci* 18:1337-1344.

- Liu C, Peng M, Laties AM, Wen R (1998b) Preconditioning with bright light evokes a protective response against light damage in the rat retina. *J Neurosci* 18:1337-1344.
- Loane E, Nolan JM, O'Donovan O, Bhosale P, Bernstein PS, Beatty S (2008) Transport and retinal capture of lutein and zeaxanthin with reference to age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 53:68-81.
- Lopez PF, Aaberg TM (1992) Phenotypic similarities between Stargardt's flavimaculatus and pattern dystrophies. *Aust N Z J Ophthalmol* 20:163-171.
- Lu L, Hackett SF, Mincey A, Lai H, Campochiaro PA (2006) Effects of different types of oxidative stress in RPE cells. *J Cell Physiol* 206:119-125.
- Luo DG, Xue T, Yau KW (2008) How vision begins: an odyssey. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9855-9862.
- Maiti P, Kong J, Kim SR, Sparrow JR, Allikmets R, Rando RR (2006) Small molecule RPE65 antagonists limit the visual cycle and prevent lipofuscin formation. *Biochemistry* 45:852-860.
- Mandal MN, Moiseyev GP, Elliott MH, Kasus-Jacobi A, Li X, Chen H, Zheng L, Nikolaeva O, Floyd RA, Ma JX, Anderson RE (2011) PBN ( $\alpha$ -phenyl-N-tert-butyl nitron) Prevents Light-induced Degeneration of the Retina by Inhibiting RPE65 Isomerohydrolase Activity. *J Biol Chem*.
- Mangels AR, Holden JM, Beecher GR, Forman MR, Lanza E (1993) Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. *J Am Diet Assoc* 93:284-296.
- Marmorstein AD (2001) The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic* 2:867-872.
- Mata NL, Tzekov RT, Liu X, Weng J, Birch DG, Travis GH (2001) Delayed dark-adaptation and lipofuscin accumulation in *abcr*<sup>+/-</sup> mice: implications for involvement of ABCR in age-related macular degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1685-1690.
- Miyagi M, Sakaguchi H, Darrow RM, Yan L, West KA, Aulak KS, Stuehr DJ, Hollyfield JG, Organisciak DT, Crabb JW (2002) Evidence that light modulates protein nitration in rat retina. *Mol Cell Proteomics* 1:293-303.
- Moiseyev G, Chen Y, Takahashi Y, Wu BX, Ma JX (2005) RPE65 is the isomerohydrolase in the retinoid visual cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12413-12418.
- Moiseyev G, Crouch RK, Goletz P, Oatis J, Jr., Redmond TM, Ma JX (2003) Retinyl esters are the substrate for isomerohydrolase. *Biochemistry* 42:2229-2238.
- Mortensen A, Skibsted LH, Truscott TG (2001) The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch Biochem Biophys* 385:13-19.

Mustafi D, Engel AH, Palczewski K (2009) Structure of cone photoreceptors. *Prog Retin Eye Res* 28:289-302.

Nandrot EF, Anand M, Almeida D, Atabai K, Sheppard D, Finnemann SC (2007) Essential role for MFG-E8 as ligand for  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin in diurnal retinal phagocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:12005-12010.

Noell WK, Delmelle MC, Albrecht R (1971) Vitamin A deficiency effect on retina: dependence on light. *Science* 172:72-75.

Noell WK, Walker VS, Kang BS, Berman S (1966) Retinal damage by light in rats. *Invest Ophthalmol* 5:450-473.

Ohira A, Tanito M, Kaidzu S, Kondo T (2003) Glutathione peroxidase induced in rat retinas to counteract photic injury. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:1230-1236.

Organisciak DT, Darrow RA, Barsalou L, Darrow RM, Lininger LA (1999) Light-induced damage in the retina: differential effects of dimethylthiourea on photoreceptor survival, apoptosis and DNA oxidation. *Photochem Photobiol* 70:261-268.

Organisciak DT, Wang HM, Li ZY, Tso MO (1985) The protective effect of ascorbate in retinal light damage of rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 26:1580-1588.

Penn JS, Naash MI, Anderson RE (1987) Effect of light history on retinal antioxidants and light damage susceptibility in the rat. *Exp Eye Res* 44:779-788.

Penn JS, Williams TP (1986) Photostasis: regulation of daily photon-catch by rat retinas in response to various cyclic illuminances. *Exp Eye Res* 43:915-928.

Pluskota-Karwatka D (2008) Modifications of nucleosides by endogenous mutagens-DNA adducts arising from cellular processes. *Bioorg Chem* 36:198-213.

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

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

Radu RA, Hu J, Peng J, Bok D, Mata NL, Travis GH (2008) Retinal pigment epithelium-retinal G protein receptor-opsin mediates light-dependent translocation of all-trans-retinyl esters for synthesis of visual chromophore in retinal pigment epithelial cells. *J Biol Chem* 283:19730-19738.

Radu RA, Hu J, Yuan Q, Welch DL, Makshanoff J, Lloyd M, McMullen S, Travis GH, Bok D (2011) Complement system dysregulation and inflammation in the retinal pigment epithelium of a mouse model for Stargardt macular degeneration. *J Biol Chem* 286:18593-18601.

Ranchon I, LaVail MM, Kotake Y, Anderson RE (2003a) Free radical trap phenyl-N-tert-butyl-nitronone protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration. *J Neurosci* 23:6050-6057.

Ranchon I, LaVail MM, Kotake Y, Anderson RE (2003b) Free radical trap phenyl-N-tert-butyl-nitronone protects against light damage but does not rescue P23H and S334ter rhodopsin transgenic rats from inherited retinal degeneration. *J Neurosci* 23:6050-6057.

Randlett O, Norden C, Harris WA (2010) The vertebrate retina: A model for neuronal polarization in vivo. *Dev Neurobiol*.

Rattner A, Toulabi L, Williams J, Yu H, Nathans J (2008) The genomic response of the retinal pigment epithelium to light damage and retinal detachment. *J Neurosci* 28:9880-9889.

Rhee KD, Ruiz A, Duncan JL, Hauswirth WW, LaVail MM, Bok D, Yang XJ (2007) Molecular and cellular alterations induced by sustained expression of ciliary neurotrophic factor in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:1389-1400.

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

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

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

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

Rowan S, Cepko CL (2004) Genetic analysis of the homeodomain transcription factor Chx10 in the retina using a novel multifunctional BAC transgenic mouse reporter. *Dev Biol* 271:388-402.

Samardzija M, Tanimoto N, Kostic C, Beck S, Oberhauser V, Joly S, Thiersch M, Fahl E, Arsenijevic Y, von LJ, Wenzel A, Seeliger MW, Grimm C (2009) In conditions of limited chromophore supply rods entrap 11-cis-retinal leading to loss of cone function and cell death. *Hum Mol Genet* 18:1266-1275.

Samardzija M, Wenzel A, Naash M, Reme CE, Grimm C (2006) Rpe65 as a modifier gene for inherited retinal degeneration. *Eur J Neurosci* 23:1028-1034.

Serhan CN, Savill J (2005) Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol* 6:1191-1197.

Shahinfar S, Edward DP, Tso MO (1991) A pathologic study of photoreceptor cell death in retinal photic injury. *Curr Eye Res* 10:47-59.

Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP (1991a) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349:431-434.

Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP (1991b) Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature* 349:431-434.

Snodderly DM (1995) Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr* 62:1448S-1461S.

Sparrow JR, Fishkin N, Zhou J, Cai B, Jang YP, Krane S, Itagaki Y, Nakanishi K (2003) A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res* 43:2983-2990.

Stadtman ER, Berlett BS (1991) Fenton chemistry. Amino acid oxidation. *J Biol Chem* 266:17201-17211.

Stahl W, Ale-Agha N, Polidori MC (2002) Non-antioxidant properties of carotenoids. *Biol Chem* 383:553-558.

Stahl W, Nicolai S, Briviba K, Hanusch M, Broszeit G, Peters M, Martin HD, Sies H (1997) Biological activities of natural and synthetic carotenoids: induction of gap junctional communication and singlet oxygen quenching. *Carcinogenesis* 18:89-92.

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

Strick DJ, Feng W, Vollrath D (2009) MERTK drives myosin II redistribution during retinal pigment epithelial phagocytosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:2427-2435.

Subczynski WK, Wisniewska A, Widomska J (2010) Location of macular xanthophylls in the most vulnerable regions of photoreceptor outer-segment membranes. *Arch Biochem Biophys* 504:61-66.

Sumantran VN, Zhang R, Lee DS, Wicha MS (2000) Differential regulation of apoptosis in normal versus transformed mammary epithelium by lutein and retinoic acid. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9:257-263.

Sung CH, Chuang JZ (2010) The cell biology of vision. *J Cell Biol* 190:953-963.

Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S (1998) Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* 161:4652-4660.

Tanito M, Brush RS, Elliott MH, Wicker LD, Henry KR, Anderson RE (2009) High levels of retinal membrane docosahexaenoic acid increase susceptibility to stress-induced degeneration. *J Lipid Res* 50:807-819.

Tanito M, Elliott MH, Kotake Y, Anderson RE (2005) Protein modifications by 4-hydroxynonenal and 4-hydroxyhexenal in light-exposed rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:3859-3868.

Tanito M, Masutani H, Nakamura H, Oka S, Ohira A, Yodoi J (2002a) Attenuation of retinal photooxidative damage in thioredoxin transgenic mice. *Neurosci Lett* 326:142-146.

Tanito M, Nishiyama A, Tanaka T, Masutani H, Nakamura H, Yodoi J, Ohira A (2002b) Change of redox status and modulation by thiol replenishment in retinal photooxidative damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2392-2400.

Tezel G, Yang X, Cai J (2005) Proteomic identification of oxidatively modified retinal proteins in a chronic pressure-induced rat model of glaucoma. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:3177-3187.

Toyokuni S, Iwasa Y, Kondo S, Tanaka T, Ochi H, Hiai H (1999) Intranuclear distribution of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine. An immunocytochemical study. *J Histochem Cytochem* 47:833-836.

Toyokuni S, Tanaka T, Hattori Y, Nishiyama Y, Yoshida A, Uchida K, Hiai H, Ochi H, Osawa T (1997) Quantitative immunohistochemical determination of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine by a monoclonal antibody N45.1: its application to ferric nitrilotriacetate-induced renal carcinogenesis model. *Lab Invest* 76:365-374.

Toyokuni S, Uchida K, Okamoto K, Hattori-Nakakuki Y, Hiai H, Stadtman ER (1994) Formation of 4-hydroxy-2-nonenal-modified proteins in the renal proximal tubules of rats treated with a renal carcinogen, ferric nitrilotriacetate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:2616-2620.

Travis GH, Golczak M, Moise AR, Palczewski K (2007) Diseases caused by defects in the visual cycle: retinoids as potential therapeutic agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47:469-512.

Trevithick-Sutton CC, Foote CS, Collins M, Trevithick JR (2006) The retinal carotenoids zeaxanthin and lutein scavenge superoxide and hydroxyl radicals: a chemiluminescence and ESR study. *Mol Vis* 12:1127-1135.

Uchida K, Stadtman ER (1992) Modification of histidine residues in proteins by reaction with 4-hydroxynonenal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:4544-4548.

Ueki Y, Chollangi S, Le YZ, Ash JD (2010) gp130 Activation in Muller Cells is Not Essential for Photoreceptor Protection from Light Damage. *Adv Exp Med Biol* 664:655-661.

Ueki Y, Le YZ, Chollangi S, Muller W, Ash JD (2009) Preconditioning-induced protection of photoreceptors requires activation of the signal-transducing receptor gp130 in photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Ueki Y, Wang J, Chollangi S, Ash JD (2008a) STAT3 activation in photoreceptors by leukemia inhibitory factor is associated with protection from light damage. *J Neurochem* 105:784-796.

Ueki Y, Wang J, Chollangi S, Ash JD (2008b) STAT3 activation in photoreceptors by leukemia inhibitory factor is associated with protection from light damage. *J Neurochem* 105:784-796.

Unoki K, LaVail MM (1994) Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:907-915.

Wang JS, Kefalov VJ (2011) The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res* 30:115-128.

Weleber RG (2005) Inherited and orphan retinal diseases: phenotypes, genotypes, and probable treatment groups. *Retina* 25:S4-S7.

Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH (1995) Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J Neurosci* 15:7377-7385.

Wen R, Song Y, Kjellstrom S, Tanikawa A, Liu Y, Li Y, Zhao L, Bush RA, Laties AM, Sieving PA (2006) Regulation of rod phototransduction machinery by ciliary neurotrophic factor. *J Neurosci* 26:13523-13530.

Wen R, Song Y, Liu Y, Li Y, Zhao L, Laties AM (2008) CNTF negatively regulates the phototransduction machinery in rod photoreceptors: implication for light-induced photostasis plasticity. *Adv Exp Med Biol* 613:407-413.

Weng J, Mata NL, Azarian SM, Tzekov RT, Birch DG, Travis GH (1999) Insights into the function of Rim protein in photoreceptors and etiology of Stargardt's disease from the phenotype in abcr knockout mice. *Cell* 98:13-23.

Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Reme CE (2003) The genetic modifier Rpe65Leu(450): effect on light damage susceptibility in c-Fos-deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:2798-2802.

Wenzel A, Reme CE, Williams TP, Hafezi F, Grimm C (2001a) The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. *J Neurosci* 21:53-58.

Wenzel A, Reme CE, Williams TP, Hafezi F, Grimm C (2001b) The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. *J Neurosci* 21:53-58.

Wisniewska A, Subczynski WK (2006a) Accumulation of macular xanthophylls in unsaturated membrane domains. *Free Radic Biol Med* 40:1820-1826.

Wisniewska A, Subczynski WK (2006b) Distribution of macular xanthophylls between domains in a model of photoreceptor outer segment membranes. *Free Radic Biol Med* 41:1257-1265.

Wisniewska A, Subczynski WK (2006c) Distribution of macular xanthophylls between domains in a model of photoreceptor outer segment membranes. *Free Radic Biol Med* 41:1257-1265.

Woodall AA, Britton G, Jackson MJ (1997) Carotenoids and protection of phospholipids in solution or in liposomes against oxidation by peroxy radicals: relationship between carotenoid structure and protective ability. *Biochim Biophys Acta* 1336:575-586.

Wooten BR, Hammond BR (2002) Macular pigment: influences on visual acuity and visibility. *Prog Retin Eye Res* 21:225-240.

Wu J, Seregard S, Algvere PV (2006) Photochemical damage of the retina. *Surv Ophthalmol* 51:461-481.

Yau KW (1994) Phototransduction mechanism in retinal rods and cones. The Friedenwald Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:9-32.

Yau KW, Hardie RC (2009) Phototransduction motifs and variations. *Cell* 139:246-264.

Young RW (1971) Shedding of discs from rod outer segments in the rhesus monkey. *J Ultrastruct Res* 34:190-203.

Yu DY, Cringle S, Valter K, Walsh N, Lee D, Stone J (2004) Photoreceptor death, trophic factor expression, retinal oxygen status, and photoreceptor function in the P23H rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:2013-2019.

Zarbin MA (1998) Age-related macular degeneration: review of pathogenesis. *Eur J Ophthalmol* 8:199-206.

Zhang H, Fan J, Li S, Karan S, Rohrer B, Palczewski K, Frederick JM, Crouch RK, Baehr W (2008) Trafficking of membrane-associated proteins to cone photoreceptor outer segments requires the chromophore 11-cis-retinal. *J Neurosci* 28:4008-4014.

Zhang LX, Cooney RV, Bertram JS (1992) Carotenoids up-regulate connexin43 gene expression independent of their provitamin A or antioxidant properties. *Cancer Res* 52:5707-5712.



Zhang SS, Wei JY, Li C, Barnstable CJ, Fu XY (2003) Expression and activation of STAT proteins during mouse retina development. *Exp Eye Res* 76:421-431.