

DIRECTOR DE TESIS

Dra. Nora Patricia Rotstein

Profesora Asociada Química Biológica General
Investigadora Principal - CONICET
Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional del Sur

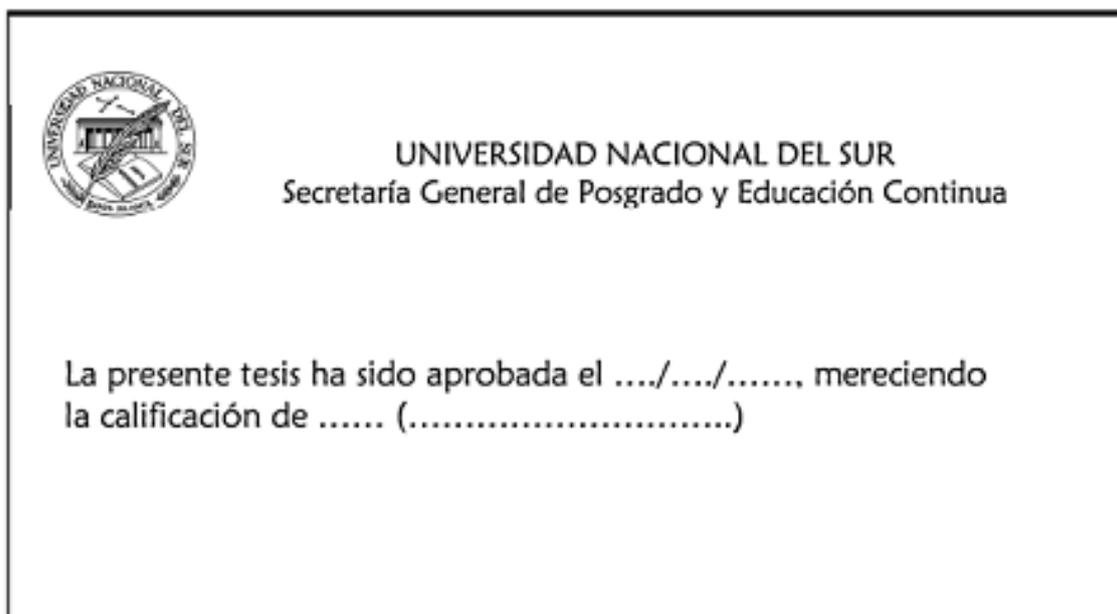
CO-DIRECTOR DE TESIS

Dr. Luis Enrique Politi

Profesor Titular Biología Celular
Investigador Principal - CONICET
Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia
Universidad Nacional del Sur

Prefacio

Esta tesis es presentada como parte de los requisitos para acceder al grado académico de Doctora en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur, y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otras Universidades. Aquí se presentan los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Laboratorio de Bioquímica de Lípidos en el Desarrollo Neuronal, del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca (INIBIBB), dependiente del CONICET y de la Universidad Nacional del Sur (UNS). Estos ensayos se realizaron durante el período comprendido entre abril de 2014 y 2019, bajo la dirección de la Dra. Nora Patricia Rotstein y la co-dirección del Dr. Luis Enrique Politi.



Febrero-2019

Lic. Marcela Sonia Vera

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

Universidad Nacional del Sur

Dedicatoria

A mis padres

Al Nico,

A mis compañeros del Labo

Sin ellos, nada de esto hubiese sido posible

Agradecimientos

A mis directores Nora y Quique, por todo lo que aprendí durante estos años, por el tiempo y empeño dedicado a mi formación. A mi directora Nora gracias por todo, por la predisposición paciencia y cariño con la que me enseñó.

Al Andrés y a La Lore, por la predisposición y cariño con la que me ayudaron en este trabajo.

Al Edgardo, por el inmenso cariño que reparte por la vida haciendo los días más divertidos, por la ayuda y los hidratos de carbono.

A Bea, por las innumerables veces que me dijo “Avísame en que te puedo ayudar” y siempre con mucho cariño.

A la Flor y a Martín, por su invaluable ayuda y predisposición en los experimentos de este trabajo, espero que la mesada nos vuelva a juntar. A las vecinas, todo en la vida es mejor con buenas vecinas, gracias por estar siempre para los anticuerpos y para las charlas.

A la catedra de Biología Celular y de Química Biológica por aceptarme con los brazos abiertos, con buenísima onda y mucho cariño.

Al INIBIBB por dejarme ser parte, y por el inmenso cariño que se siente por los pasillos y escaleras. Excelente lugar de trabajo, no podría haber aterrizado en un lugar mejor.

A la Universidad Nacional del Sur y al CONICET por hacer posible que lleve a cabo mi trabajo de Tesis y por la invaluable ayuda al crecimiento profesional que nos permiten estos organismos.

A las chicas de patín, por los hermosos momentos, mi cable a tierra para volver renovada al labo para seguir con los experimentos.

A mi hermosa y amada familia, por el apoyo incondicional, por la confianza y por el cariño. A mi ma y pa, por creer siempre en que podía lograrlo, por los innumerables consejos y por esos mates que todo el año espero. A mis hermanos gracias por ser, gracias por estar.

A mi gran compañero de vida, al Nico gracias por la paciencia y el amor con el que pasamos los días y por tu apoyo incondicional. Gracias por estar siempre, gracias totales.

Por último, un agradecimiento muy especial a los chicos del labo. Eso es algo que se podría llamar una bendición. A Viky S y Yane, las incondicionales personitas que me alegran todos los días, a las que espero ver cuando llego a trabajar. A Tami, por su gran cariño y por su apoyo incondicional, por hacer que todo sea más copado. A Viky A, a Harni y a Marcos por el cariño con el que trabajamos todos los días, por las charlas y los mates. A German por su ayuda y predisposición. A todos ellos, GRACIAS POR TANTO.

Resumen

Candidato: Marcela Sonia Vera

Director: Dra. Nora P. Rotstein

Co-director: Dr. Luis E. Politi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca-Argentina-CONICET

“Regulación de la migración celular en la retina por Ceramida-1-Fosfato”

Las enfermedades neurodegenerativas de la retina son la principal causa de disfunción visual en el mundo desarrollado. En ellas se produce la degeneración y muerte de las neuronas fotorreceptoras, originando una disminución o pérdida total de la visión, en los casos más severos. Las células gliales de Müller (CGM), el principal tipo de células gliales en la retina, y las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) desempeñan un papel clave tanto en la prevención como en el progreso de estas enfermedades. En condiciones fisiológicas las CGM y las células del EPR son las encargadas del mantenimiento estructural, fisiológico y funcional de la retina. Ante alteraciones fisiológicas o frente a daños de diferentes tipos, las CGM y las células del EPR modifican levemente sus funciones a fin de restablecer las condiciones normales o reparar los daños existentes. La proliferación y la migración se activan como parte de una respuesta inespecífica, pero cuando el daño persiste por mecanismos aún desconocidos estos procesos se descontrolan y exacerban, tornándose contraproducentes. A su vez, la localización de estas células en lugares inadecuados distorsiona severamente la estructura y función de la retina, contribuyendo al desarrollo de la disfunción visual, particularmente en las patologías retinoproliferativas. Dilucidar los mecanismos de regulación de la proliferación y la migración, como así también las moléculas que intervienen, es clave para lograr un tratamiento integral de estas enfermedades.

Los esfingolípidos bioactivos son moléculas señal que regulan una gran cantidad de procesos biológicos como la supervivencia, proliferación, migración e inflamación. Entre éstos, la ceramida-1-fosfato (C1P) es un esfingolípido que regula numerosas funciones biológicas en diferentes tipos de células. La C1P es generada por la acción de la ceramida quinasa (CerK), enzima encargada de sintetizar C1P a través de la fosforilación de la ceramida (Cer). La actividad de CerK es clave para la señalización celular mediada por C1P y está regulada por niveles bajos de Ca^{+2} , fosforilación y diversos estímulos. La C1P promueve la proliferación través de la activación de diferentes vías de señalización intracelular y la inflamación mediante la unión y activación de la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA₂), que interviene en la síntesis de prostaglandinas. Para promover la migración, se ha propuesto que la C1P activa un receptor extracelular específico (parcialmente identificado). Trabajos previos de nuestro laboratorio demuestran que la esfingosina-1-fosfato (S1P), un esfingolípido bioactivo muy relacionado a la C1P, promueve la migración de las CGM (Simón et al. 2015). Dada la estrecha interacción metabólica y funcional entre los esfingolípidos, es de gran interés establecer si la C1P, cuyas funciones son semejantes a las de S1P, interviene en la regulación de los procesos que contribuyen a las patologías retinoproliferativas.

El objetivo de esta Tesis es investigar si la C1P y la CerK participan en la migración y en la proliferación de las CGM y las células del EPR.

Mediante el ensayo de la herida y utilizando cultivos gliales puros de retina de rata y la línea celular humana de EPR, ARPE-19 investigamos los posibles efectos de C1P/CerK en la migración de estos dos tipos celulares. En estos ensayos de motilidad celular, consideramos la reducción del ancho de la herida como un indicador de la migración.

Al evaluar el efecto de C1P sobre la migración de las CGM, determinamos que la C1P aumentó la migración a través de la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de filopodios y lamelipodios. Mediante ensayos de incorporación del nucleótido Bromo-deoxiuridina (BrdU) establecimos que la migración no contribuyó al cierre de la herida. Luego investigamos las vías de señalización involucradas en el efecto de C1P. La inhibición de las vías PI3K/Akt y JNK con LY294002 y SP600125, respectivamente, disminuyó la migración glial, tanto en los controles como en los cultivos tratados con C1P. Mediante ensayos de Western blot comprobamos que el agregado de C1P aumentó los niveles de p-Akt, forma activa de la Akt, respecto a los controles, confirmando la activación de la vía de la PI3K. Al inhibir

la vía de ERK / MAPK con el inhibidor U0126 disminuyó la migración promovida por la C1P, pero no se alteró la migración en los controles. A continuación, evaluamos el papel de la cPLA₂, mediador de C1P en la inflamación, que es activada por su unión a C1P. El tratamiento con ATK, un inhibidor de cPLA₂, redujo notablemente la migración glial en cultivos tratados con C1P, mientras que en los cultivos controles la migración no fue alterada. Demostramos así que la C1P promueve la migración de las CGM mediante la activación de cPLA₂ y JNK, PI3K y ERK / MAPK. Además, el agregado conjunto de C1P y S1P, evidenció que estos esfingolípidos tuvieron juntos el mismo efecto promotor de la migración glial que cuando fueron suplementados por separado, evidenciando una interrelación entre ellos en la regulación de los mecanismos que activan río abajo.

Como la realización de la herida activó la migración celular, decidimos evaluar si la síntesis endógena de C1P estaba involucrada en dicha migración. Para ello, establecimos en primer término, mediante RT-PCR que las CGM expresaban CerK. Incubando los cultivos gliales con NVP231, un inhibidor de la CerK, demostramos que la síntesis endógena de C1P fue necesaria para la migración glial en los controles y para la estimulación de la migración por C1P. Para descartar que la inhibición de la motilidad reflejara una pérdida de viabilidad celular, evaluamos dicha viabilidad por ensayo de MTT. Determinamos que el tratamiento de los cultivos gliales con NVP231 no alteró la viabilidad celular.

En las células del EPR el tratamiento con C1P aumentó la migración, mediante la reorganización del citoesqueleto de actina y el desarrollo de extensos lamelipodios. Al evaluar el rol de la síntesis endógena en la migración del EPR, comprobamos que el tratamiento de los cultivos con NVP231 inhibió la formación de lamelipodios y bloqueó la migración de las células epiteliales. Determinamos, mediante el ensayo de MTT, que el tratamiento con NVP231 no alteró la viabilidad de las células del EPR. La C1P y la S1P promovieron la migración de las células del EPR, pero cuando los cultivos fueron tratados con NVP231 antes del agregado de estos esfingolípidos, el aumento de la migración que promovían fue bloqueado. Estos resultados demuestran que la síntesis endógena de C1P fue necesaria para la migración promovida por C1P y S1P, evidenciando que la síntesis de C1P es clave en la estimulación de la migración por estos dos esfingolípidos.

A continuación evaluamos el rol de C1P en la proliferación. Ensayos de incorporación del nucleótido BrdU en cultivos no confluentes demostraron que el agregado de C1P no

alteró la proliferación ni en los cultivos gliales ni en los epiteliales. La inhibición de la síntesis de C1P redujo la proliferación en las CGM, mientras que no alteró la tasa de proliferación de los cultivos epiteliales, lo que sugiere que la C1P sería un mediador necesario para la proliferación glial en el período activo de mitogénesis de estas células. En conclusión, en este trabajo evidenciamos por primera vez que la C1P agregada exógenamente como así también aquella sintetizada por CerK en el interior celular, potenciaron la migración de las CGM y de las células del EPR. Demostramos también que la síntesis de C1P fue necesaria para la proliferación glial. Considerando la importancia del proceso de migración y proliferación en los dos tipos celulares de la retina decisivos en la mayoría de las enfermedades retinianas, proponemos a C1P/CerK como clave en el desarrollo y avance de las retinopatías proliferativas.

Summary

Ph. D. candidate: Marcela Sonia Vera

Director: Dra. Nora P. Rotstein

Co-director: DrLuis E. Politi

Instituto de Investigaciones Bioquímicas de Bahía Blanca-Argentina-CONICET

“Regulation of cell migration in the retina by Ceramide-1-Phosphate”

Retinal neurodegenerative diseases are the main cause of visual dysfunction in the developed world. Their common feature is the degeneration and eventual death of photoreceptors, which leads to visual impairment and eventual blindness in the most severe cases. Müller Glial Cells (MGC) are the main type of retinal glia and along with the Retinal Pigmented Epithelium (RPE) these cell types are two key factors in both the prevention and progression of these diseases. Under physiological conditions, MGCs and the RPE are in charge of the structural, physiological and functional maintenance of the retina. When faced with physiological changes or different damages, they alter their regular functions in order to either reestablish a proper environment or repair the existing damages; however, if the damage persists, the long-term changes of their aforementioned functions can be counterproductive and contribute to the development of retinal neurodegenerative pathologies.

Proliferation and migration are activated as an unspecific response upon different damages in order to repair them but, due to unknown mechanisms, these processes finally provoke retina structural and functional loss, thus contributing to the progression of the visual dysfunction. The elucidation of the regulatory mechanisms involved in controlling migration and proliferation, including the molecules involved, is crucial for developing an integral treatment of these diseases.

Bioactive sphingolipids are signaling molecules that regulate a wide array of biological processes, such as survival, proliferation, migration and inflammation.

Among them, ceramide-1-phosphate (C1P) is a sphingolipid generated by ceramide kinase (CerK), the enzyme responsible of phosphorylating ceramide (Cer) molecules. CerK activity has a central role in C1P-mediated cellular signaling, and is regulated by low levels of Ca^{2+} , phosphorylation and many other stimuli. C1P promotes proliferation by activating several intracellular signaling pathways, as well as promoting inflammation by coupling with and activating the cytosolic phospholipase A2 (cPLA₂), which participates in prostaglandin synthesis. Both for proliferation and migration, it has been proposed that C1P activates a (partially identified) specific extracellular receptor. Previous work from our group has shown that sphingosine-1-phosphate (S1P), which is metabolically closely related to C1P, promotes MGC migration (Simón et al. 2015). Due to the close interconversions and functions of sphingolipids, uncovering the role of C1P in the processes involved in proliferative retinopathies is highly relevant.

The purpose of this thesis is to investigate whether C1P and CerK participate in the regulation of migration and proliferation of MGC and RPE.

By using the scratch wound assay in pure rat glial cultures and the RPE cell line ARPE-19, we assessed the effects of C1P/CerK in the migration of these two cell types. In these cellular motility assays we considered the reduction on the wound width as a positive indicator of cell migration.

When evaluating the effect of C1P on migration, we determined that C1P enhanced migration by reorganizing the actin cytoskeleton and the formation of filopodia and lamellipodia. By quantifying the uptake of Bromide-deoxyuridine (BrdU) by MGC we determined that proliferation did not contribute to the reduction in the scratch width. We also investigated the signaling pathways involved in this process. Inhibition of PI3K/Akt and JNK pathways with the selective inhibitors LY294002 and SP600125, respectively, showed a decrease in glial migration in both control and C1P-treated cultures. Western Blot assays showed that the addition of C1P increased the levels of p-Akt (the active form of Akt) when compared to controls, therefore confirming the activation of this pathway. Selective inhibition of the ERK/MAPK pathway with U0126 showed a decrease in C1P-induced migration, but did not alter it in control conditions. We also evaluated the role of cPLA₂, a mediator of C1P in inflammation, which is activated by C1P binding. Treatment with ATK, a selective inhibitor of cPLA₂, showed a substantial decrease in migration on C1P-treated cultures,

while there was no alteration of the migrating capabilities in control conditions. We therefore showed that C1P is a promotor of MGC migration by activating cPLA₂ as well as the JNK, PI3K and ERK/MAPK pathways. In addition, the combined addition of C1P and S1P showed that these sphingolipids had the same effect together than when they were added separately, suggesting either a direct relation between them or with the downstream mechanisms they trigger.

Since we determined a basal reduction in the scratch width in control conditions, we evaluated whether the endogenous synthesis of C1P was involved in this migration. Initially, we established by RT-PCR assays that CGM expressed CerK. By incubating glial cultures with NVP231, a selective inhibitor of CerK, we showed that endogenous C1P synthesis was necessary for glial migration under control conditions, and that when this synthesis was inhibited addition of C1P did not restore cell migration. In order to verify that NVP231 did not affect cell viability, we evaluated viability by the MTT assay. We determined that treatment of glial cultures with NVP231 did not alter cell viability.

On RPE cells, treatment with C1P increased cell migration by inducing actin cytoskeleton reorganization and extensive development of lamellipodia. When evaluating the role of the endogenous synthesis on RPE migration, we concluded that treating cultures with NVP231 inhibited lamellipodia formation and blocked RPE migration. We also determined that the viability of NVP231-treated RPE cells was not altered. Both C1P and S1P promoted RPE cell migration, but treating the cultures with NVP231 beforehand, abolished the migratory stimulus. These results show that endogenous C1P synthesis is essential for C1P and S1P-promoted migration, establishing that C1P synthesis is crucial to promote the migration of these two sphingolipids.

Furthermore, we evaluated the possible role of C1P on cell proliferation. BrdU uptake assays on non-confluent cultures showed that the addition of C1P did not alter the proliferating capabilities on either MGC or RPE cultures. The inhibition of C1P synthesis impaired proliferation of MGCs, but did not affect that of RPE cells, suggesting that C1P might be a necessary mediator for glial proliferation in the active mitogenic stage of these cells.

In this work we showed for the first time that both addition of C1P as well as the endogenous C1P produced by CerK promote migration of MGC and RPE cells. We also demonstrated that C1P synthesis is required for glial proliferation. Taking into consideration the relevance of migration and proliferation of both cell types in the development of most retinal diseases, we propose that C1P/CerK is instrumental in the development and progression of proliferative retinopathies.

Índice

| | |
|--|----|
| Prefacio | 2 |
| Dedicatoria | 3 |
| Agradecimientos | 4 |
| Resumen..... | 6 |
| Summary | 10 |
| Índice | 14 |
| Introducción | 17 |
| La retina: función y componentes celulares | 19 |
| Células Gliales de Müller | 22 |
| Células del Epitelio Pigmentario de la Retina..... | 24 |
| Gliosis reactiva y transición epitelio-mesénquima | 25 |
| Enfermedades de la Retina | 28 |
| Esfingolípidos Bio-activos..... | 29 |
| Ceramida-1-fosfato/Ceramida Quinasa: unidad funcional clave en la señalización celular ... | 34 |
| Ceramida-1-fosfato | 35 |
| Ceramida Quinasa | 38 |
| La C1P en la retina..... | 39 |
| Objetivos | 42 |
| Materiales y Métodos | 44 |
| Materiales | 45 |
| Cultivos Primarios de Células de Retina | 46 |
| Cultivos gliales puros..... | 46 |
| Cultivo de Células de Epitelio Pigmentario de la Retina de la Línea ARPE-19 | 47 |
| Ensayo de la herida | 47 |
| Tratamiento de cultivos gliales con Ceramida-1-Fosfato..... | 48 |
| Tratamiento de cultivos gliales con Esfingosina-1-fosfato..... | 50 |
| Inhibición de las vías de señalización celular | 50 |
| Inhibición de la actividad de la Fosfolipasa A2 citosólica..... | 51 |
| Inhibición de la síntesis de C1P | 51 |
| Determinaciones Citoquímicas | 52 |

| | |
|--|----|
| Western Blotting (WB) | 53 |
| Evaluación de la viabilidad celular: Ensayo de MTT | 54 |
| Detección y análisis de ARNm | 55 |
| Análisis de los niveles de C1P | 56 |
| Evaluación de la proliferación mediante la incorporación y detección del nucleótido BrdU. 57 | |
| Inhibición de la proliferación mediante Hidroxiurea | 58 |
| Análisis estadístico | 58 |
| Resultados | 59 |
| Caracterización de las Células Gliales de Müller en cultivos primarios | 60 |
| Caracterización del proceso de migración de las Células Gliales de Müller | 61 |
| La ceramida-1-fosfato estimuló la migración de las CGM | 62 |
| La proliferación de las CGM no participó en el cierre de la herida promovida por Ceramida-1-fosfato | 65 |
| Vías de señalización involucradas en la estimulación de la migración de las CGM por la ceramida-1-fosfato | 66 |
| La C1P activó la vía de PI3K/Akt para promover la migración de las CGM | 67 |
| La C1P actuó a través de la vía de la JNK para promover la migración glial | 69 |
| La C1P promovió la migración glial a través de la vía de la ERK/MAPK | 70 |
| La C1P no utilizó la vía de p38/MAPK para promover la migración glial | 72 |
| La Ceramida-1-fosfato activó a la Fosfolipasa A2 citosólica para promover la migración glial | 74 |
| La síntesis endógena de C1P fue esencial para la migración de las CGM | 76 |
| La adición de C1P no rescató el bloqueo en la migración de las CGM provocado por la inhibición de la síntesis de C1P | 79 |
| Los niveles de C1P no fueron alterados por el daño mecánico | 80 |
| El agregado conjunto de C1P y S1P no tuvo efecto aditivo sobre la migración glial | 81 |
| Caracterización de células del epitelio pigmentario de la retina de la Línea ARPE-19 | 83 |
| La C1P promovió la migración de las células del epitelio pigmentario de la retina | 85 |
| La síntesis endógena de C1P fue necesaria para la migración de las células del EPR | 87 |
| La adición de C1P no revirtió el efecto de la inhibición de la síntesis de C1P sobre la migración de las células del EPR | 89 |
| La adición de S1P no revirtió el efecto de la inhibición de la síntesis de C1P sobre la motilidad de las células del EPR | 91 |
| La C1P no alteró los niveles de proliferación de las CGM | 92 |
| La C1P no alteró la tasa de proliferación de las células del EPR | 94 |
| La inhibición de la síntesis de C1P disminuyó la proliferación en las CGM | 95 |

| | |
|--|-----|
| La inhibición de la síntesis de C1P no alteró la tasa de proliferación de las células del EPR .. | 96 |
| Discusión | 97 |
| Regulación por C1P/CerK en la migración de las CGM | 99 |
| Regulación por C1P/CerK en la migración de las células del EPR | 107 |
| Regulación de proliferación en las CGM y las células del EPR por C1P/CerK..... | 111 |
| ¿Cómo actúa C1P en la migración de las células de la retina? | 114 |
| Conclusiones | 117 |
| Bibliografía | 119 |

Introducción

En los últimos años se han hecho grandes y alentadores avances en la investigación de las enfermedades de la retina. El uso excesivo de dispositivos con pantallas, complicaciones derivadas de enfermedades sistémicas y cirugías oftalmológicas, sumados a la prolongación de la esperanza de vida, contribuyen a la disminución y pérdida total de la visión, incluso en los países más desarrollados. Datos de la Organización Mundial de la Salud, revelan que en octubre de 2018 la cifra estimada de personas con discapacidad visual fue de 253 millones: 36 millones con ceguera y 217 millones con discapacidad visual moderada a grave (Blindness and visual impairment; Tosi et al. 2014). El 15 % de estas disfunciones derivan de las llamadas enfermedades neurodegenerativas de la retina. La degeneración macular asociada a la edad, las retinopatías proliferativas, como la retinopatía diabética, y el glaucoma, son algunos ejemplos de estas enfermedades. En ellas, la visión comienza a disminuir por la disfunción y muerte neuronal, y en última instancia, conducen a la ceguera (Blindness and visual impairment).

Las Células Gliales de Müller (CGM) y las Células del Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR) son cruciales en el mantenimiento de la estructura y función de la retina. Mediante cambios en la liberación de factores tróficos, de-diferenciación, migración y proliferación, ambos tipos celulares conforman la primera línea de defensa de la retina frente a una gran cantidad de daños. Una sobreactivación de estos procesos en los dos tipos celulares anteriormente mencionados se vuelve contraproducente para el funcionamiento de la retina, contribuyendo al desarrollo y avance de las enfermedades retinianas y a la disfunción y pérdida de la visión. La búsqueda de nuevas y potenciales moléculas responsables de la regulación de los procesos comunes de las enfermedades neurodegenerativas de la retina, junto con el esclarecimiento de cómo se establecen y desarrollan dichas enfermedades, se ha convertido en una imperiosa cuestión para el tratamiento eficaz de estas disfunciones de la retina. En este trabajo de Tesis planteamos como hipótesis que el esfingolípidio Ceramida-1-fosfato (C1P) sería una molécula reguladora de la migración y proliferación de las CGM y células del EPR.

La retina: función y componentes celulares

De nuestros cinco sentidos, la vista es el más utilizado y el ojo es el órgano principal del sistema visual. El globo ocular está constituido por tres capas concéntricas. La primera y más externa es la córnea-esclerótica, la capa más resistente. La segunda es la úvea, compuesta por el iris, el cuerpo ciliar y la coroides (vascular); la Retina es la capa interna del globo ocular. Es un tejido neuro-sensorial que recibe los estímulos luminosos del exterior y los transmite al cerebro, encargándose así de la formación de imágenes, y por lo tanto de la visión (Fig. 1 A).

La retina es una delgada capa de origen neural ubicada en la zona posterior del ojo (Fig. 1 A). Durante el desarrollo embrionario, la retina es generada a partir de evaginaciones del tubo neural, denominadas vesículas ópticas, que luego se invaginan, formando la copa óptica. Esta estructura presenta dos láminas, una externa que genera el EPR, y una interna, que da origen a la retina. En ella, las células progenitoras de la retina originan a los 7 tipos celulares: 6 tipos de neuronas y un tipo glial. Los 6 tipos neuronales son los fotorreceptores (conos y bastones), las neuronas amacrinas, las células ganglionares, las células horizontales y las células bipolares, mientras que, las CGM corresponden al tipo glial. En la rata, la formación de la retina comienza en el décimo día del desarrollo embrionario y culmina el día 13 posnatal. Los primeros componentes celulares que se desarrollan en la retina son las células ganglionares, las células horizontales y los conos; posteriormente comienzan a desarrollarse las neuronas amacrinas y por último las células bipolares y las CGM. Las EPR son las últimas en desarrollarse y presentan un origen diferente a las generadas por las células progenitoras de la retina, conformando una monocapa de células que recubre la neuro-retina. La microglia y los astrocitos, son tipos de células gliales que también pertenecen a la retina, pero que tienen un origen diferente a los restantes componentes celulares de dicho tejido.

La retina está organizada en diferentes capas, compuestas por los cuerpos celulares, las interconexiones de las proyecciones celulares, y las membranas basales de las células de la retina (Fig. 1 B). Desde el exterior hacia el interior del globo ocular, el orden en el que se encuentran estas capas es el siguiente (Tosi et al. 2014):

D) El EPR: es la capa más externa, que está en contacto con la lámina basal de la coroides, formando la membrana de Brush.

- II) Espacio sub-retinal: compuesta por los segmentos externos de los fotorreceptores, envueltos por las proyecciones apicales de las células del EPR y proyecciones de las CGM.
- III) Membrana limitante externa: es la sección de uniones intercelulares entre fotorreceptores y CGM.
- IV) Capa nuclear externa: constituida por los cuerpos celulares y núcleos de los fotorreceptores.
- V) Capa plexiforme externa: integrada por las sinapsis de los fotorreceptores, las células bipolares y las células horizontales.
- VI) Capa nuclear interna: formada por cuerpos celulares de las células horizontales, bipolares, amacrinas y CGM.
- VII) Capa plexiforme interna: capa donde las células bipolares y amacrinas unen sus axones a los de las células ganglionares.
- VIII) Capa de células ganglionares: conformada por los cuerpos celulares de las células ganglionares y astrocitos dispersos.
- IX) Capa de axones de las células ganglionares: constituida por los axones de estas neuronas, que al salir de la retina forman el nervio óptico.
- X) Membrana limitante interna (membrana basal de la retina).

A lo largo de la retina, las células se organizan en unidades o mosaicos estructurales y funcionales, donde las CGM conforman el núcleo, alrededor del cual se encuentran los distintos tipos neuronales conectados entre sí, para cumplir sus distintas funciones (Fig. 2) (Reichenbach and Robinson 1995).

Durante el ciclo visual, los conos y bastones (fotorreceptores) convierten la información luminosa en señales químicas y eléctricas que son enviadas a las neuronas bipolares de la retina interna; esta primera transmisión es regulada por las neuronas horizontales, que contactan ambos tipos celulares. En la retina interna, las neuronas bipolares establecen contactos con las células ganglionares y con las interneuronas amacrinas. Estas últimas modulan las señales provenientes tanto de las neuronas bipolares, como de las células ganglionares. La información luego viaja desde la retina hacia el cerebro a través del nervio óptico, constituido por los axones de las células ganglionares (Jadhav et al. 2009).

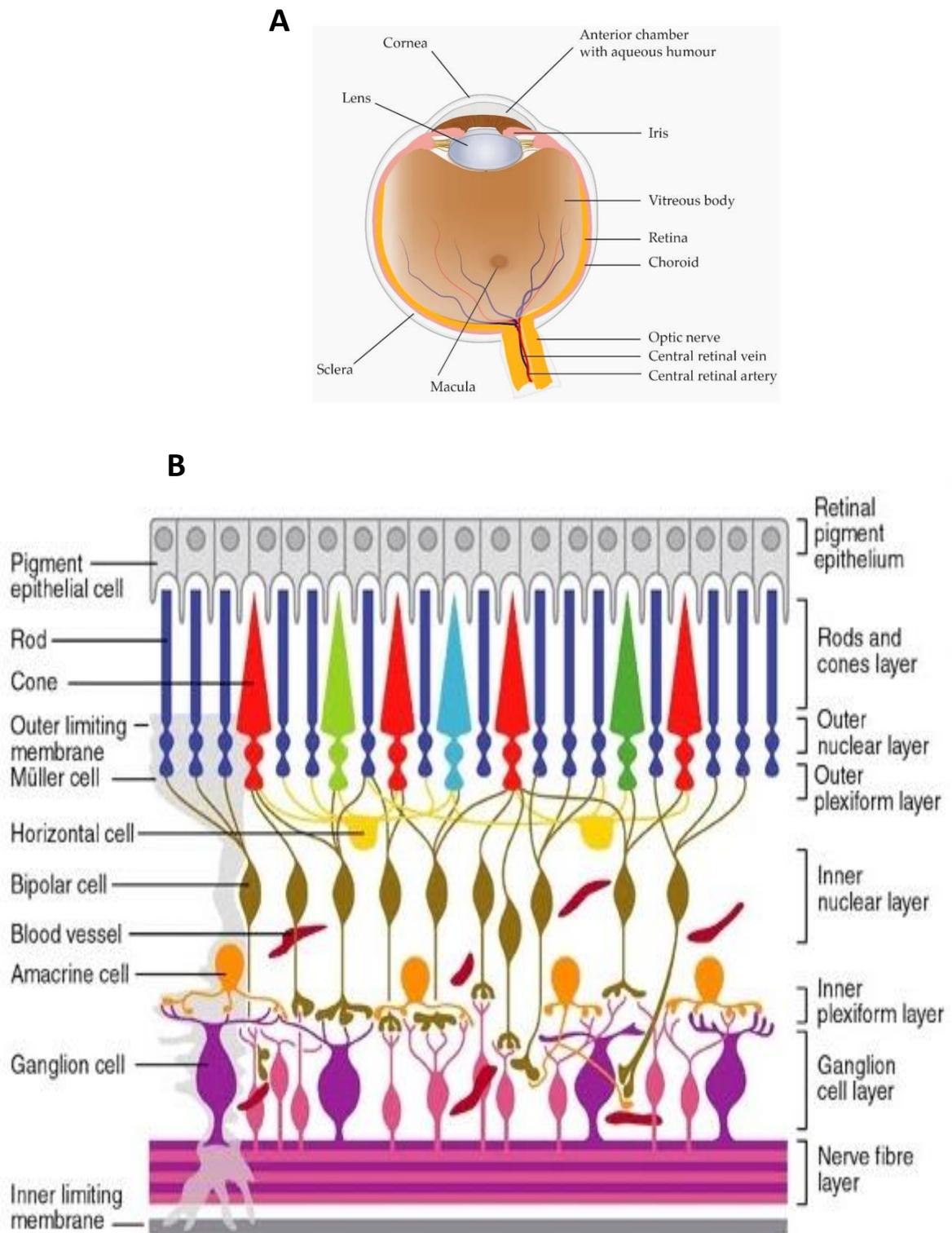


Figura 1: Organización del globo ocular y de los diferentes tipos celulares en la retina.
 (A) Estructura del globo ocular (B) componentes celulares de la retina y su distribución.

Células Gliales de Müller

Las **células gliales de Müller (CGM)** son el principal tipo de macroglía presente en la retina y están involucradas en la organización y mantenimiento de su arquitectura. Se extienden a lo ancho de toda la retina, contactando a los vasos sanguíneos, el cuerpo vítreo, el espacio sub-retinal y a las neuronas; esta disposición es clave para la funcionalidad de estas células (Fig. 2) (Bringmann et al. 2006; Vecino et al. 2016). Las CGM tienen una gran capacidad de percibir fluctuaciones en la homeostasis y reaccionar para preservarla (Subirada et al. 2018).

En condiciones fisiológicas, las CGM se encargan de mantener la homeostasis del medio extracelular (pH, iones y agua) y regular la vascularización y el flujo sanguíneo. Además, regulan el metabolismo de la glucosa, proveen a las neuronas de piruvato y lactato necesario para el metabolismo oxidativo, removiendo los desechos producidos (Poitry-Yamate et al. 1995; Tsacopoulos and Magistretti 1996). Por otro lado controlan la excitabilidad de las neuronas, mediante la liberación de neurotransmisores (Newman and Zahs 1998); a su vez, son las encargadas de reciclar neurotransmisores como el glutamato, necesarios para la foto-transducción, función llevada a cabo por la enzima glutamina sintetasa (GS) (Bringmann et al. 2013). Esta enzima sintetiza glutamina a partir de glutamato y amoníaco y es específica de las CGM, aunque puede encontrarse en el EPR en el desarrollo embrionario temprano o en situaciones patológicas (Fröhlich and Klessen 2000) Además, las CGM reciclan fotopigmentos necesarios para la foto-transducción, convirtiendo el todo-trans retinal en 11-cis retinol, mediante la proteína de unión al retinaldehído celular (CRALBP) (Das et al. 1992). Las CGM protegen a las neuronas de la retina frente al stress oxidativo (Bringmann et al. 2006; Abraham et al. 2009). Para ello sintetizan glutatión que luego proveen a las neuronas, las que lo utilizan como un captador de radicales libres y especies reactivas de oxígeno, como las generadas por el proceso de foto-transducción (Reichenbach and Bringmann 2013). La función neuro-protectora de las CGM comprende también la defensa frente a elevados niveles de potasio, captación del exceso de glutamato, fagocitosis de sustancias exógenas y producción y liberación de factores tróficos, factores de crecimiento y citoquinas que protegen a las neuronas de la apoptosis (Bringmann et al. 2006).

A diferencia de las neuronas, las CGM son muy resistentes a una gran variedad de situaciones patológicas, como isquemia, hipoxia e hipoglucemia. Esto se debe a que

su metabolismo energético depende principalmente de la glucólisis anaeróbica, y a su capacidad de metabolizar glutamato, piruvato, lactato o glutamina para obtener energía (Silver, Deas, and Erecińska 1997; Winkler et al. 2000), además de contar con efectivos mecanismos de detoxificación (Reichenbach et al. 1995).

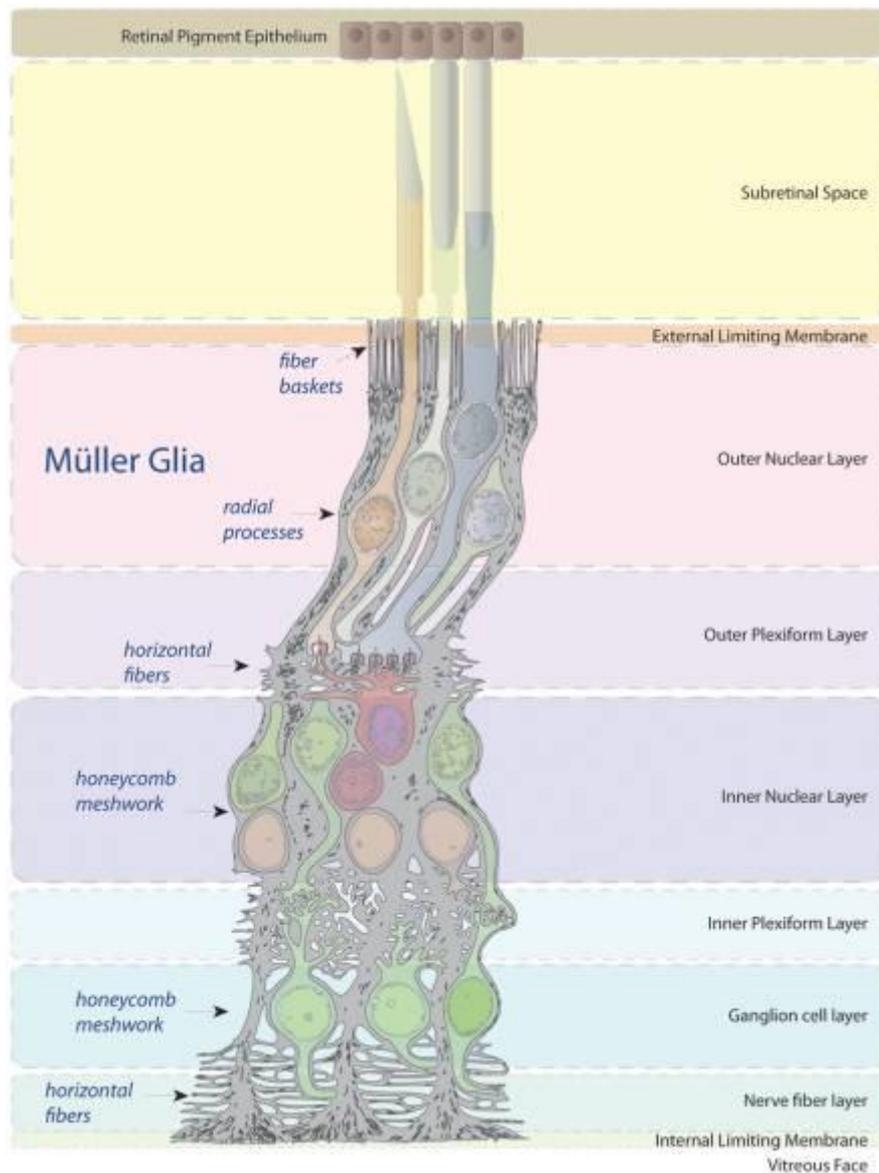


Figura 2: Células Gliales de Müller. Disposición de las células gliales de Müller a través de la retina, y contacto con los diferentes tipos neuronales (Klimczak et al. 2009).

Recientemente se ha propuesto un nuevo e importante rol para las CGM en procesos neurodegenerativos de la retina. Ante distintos daños a la retina, las CGM son capaces de de-diferenciarse y proliferar; Reh y colaboradores han postulado que bajo ciertas circunstancias las CGM reingresan al ciclo celular y se diferencian para generar nuevas neuronas, cumpliendo así un rol de células progenitoras de la retina (Reh and Fischer 2001; Goldman 2014).

Células del Epitelio Pigmentario de la Retina

El **Epitelio Pigmentario de la Retina (EPR)** consiste en una monocapa de células epiteliales altamente polarizadas ubicada entre la coroides y la neuro-retina. Estas células están en estrecho contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores por su región apical, mientras que por su extremo basal se conectan con la membrana de Bruch. La primera de las interacciones es vital para el proceso de foto-transducción, y la segunda para el mantenimiento de la homeostasis de la retina. Las regiones laterales de las células del EPR adyacentes están fuertemente unidas entre sí, mediante los complejos de adhesión celular, uniones estrechas y uniones adherentes. Estas uniones entre células del EPR son claves en la formación la barrera hemato-retiniana externa, que regula el intercambio de fluidos y otras moléculas entre la coroides y la retina (Fig. 3) (Strauss 1995).

Entre las principales funciones de las células del EPR se encuentran la absorción de la luz dispersada, y la protección contra el stress oxidativo generado por el proceso de foto-transducción (Strauss 2005). Como su disposición lo sugiere, las células del EPR transportan diferentes metabolitos y agua desde y hacia la sangre. A su vez, regulan la homeostasis iónica y el pH mediante el transporte de iones (Adorante and Miller 1990). Del mismo modo que las CGM, las células epiteliales reciclan foto-pigmentos mediante la acción de CRALBP y RPE65, enzima específica del EPR, isomerizando al todo trans-retinal a 11-cis retinal, que retorna a los fotorreceptores (Rando 1991). Otra de las funciones del EPR es la fagocitosis diaria de los extremos de los segmentos externos, para su mantenimiento y posterior reciclado de sus componentes (Steinberg 1985). El EPR tiene la capacidad de liberar una gran cantidad de factores neurotróficos y moléculas señalizadoras hacia la neuro-retina y hacia la

coroides. El factor neurotrófico derivado del epitelio (PEDF) es secretado hacia la neuro-retina y previene la apoptosis de fotorreceptores (Becerra et al. 2004). El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y el inhibidor tisular de metaloproteinasas de la matriz (TIMP) son liberados hacia la coroides para preservar el tejido endotelial (Witmer et al. 2003). La liberación constante de PEDF, TIMP y VEGF permite el mantenimiento de la integridad estructural de la retina. Por último, el EPR tiene funciones en la inmuno-modulación, debido a la capacidad de liberar diferentes moléculas inflamatorias frente a diferentes estímulos (Wenkel and Streilein 2000).

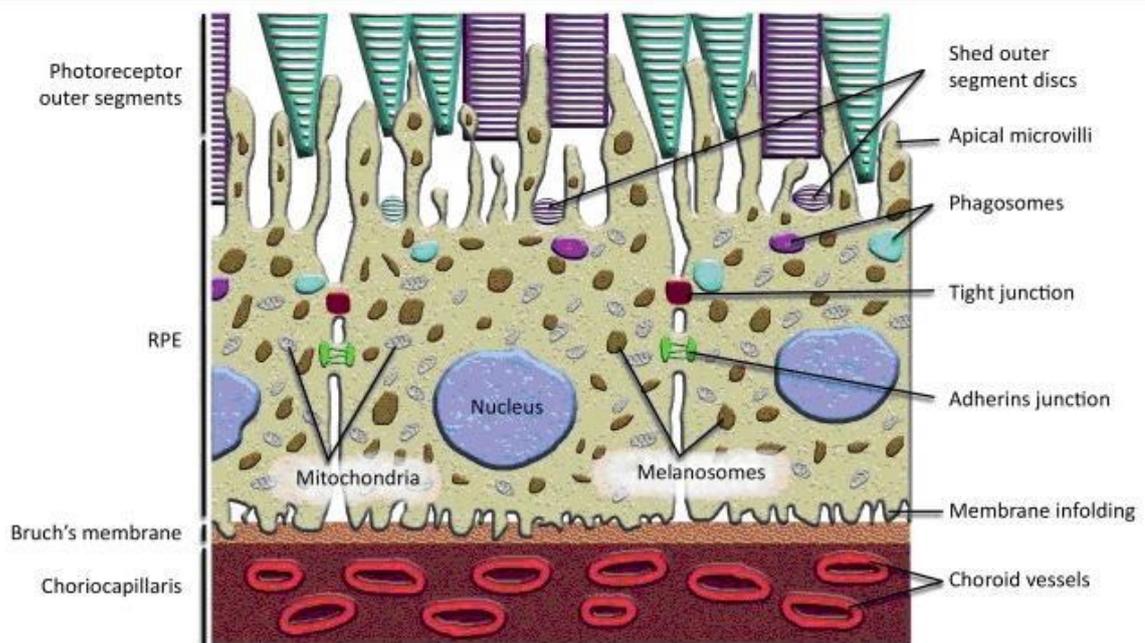


Figura 3: Células del Epitelio Pigmentario de la Retina. Localización de las células del EPR y su disposición con respecto a los fotorreceptores y la coroides. (Search begins for non-toxic enzymatic solution to macular degeneration: 2013 intern Anuj Kudva | SENS Research Foundation n.d.)

Gliosis reactiva y transición epitelio-mesénquima

Las funciones del EPR y de las CGM se ven afectadas en las distintas patologías. Frente a diferentes alteraciones como desbalances homeostáticos, daños mecánicos, inflamación y estrés oxidativo crónico, ambos tipos celulares modifican sus procesos fisiológicos para restaurar los cambios ocurridos en su medio. En una etapa tardía, cuando el daño persiste, un cese de las funciones de soporte metabólico,

funcional y estructural para los fotorreceptores y otras neuronas, contribuyen y ocasionan, eventualmente, la degeneración y muerte de estas.

Las CGM reaccionan frente a casi cualquier daño a la retina, adquiriendo un estado de activación denominado **Gliosis reactiva**. En un principio las CGM sufren cambios fisiológicos y biosintéticos, como la síntesis de factores neuro-protectores y VEGF, que protegen a las neuronas de los diferentes daños, en lo que se conoce como “gliosis conservativa” (Subirada et al. 2018). Pero una sobre-activación de este proceso debido a la exposición crónica al daño o a una respuesta excesiva a éste, acelera el avance a la neurodegeneración, originando una respuesta llamada “gliosis masiva”. Estos cambios impiden que las CGM lleven a cabo las funciones fisiológicas necesarias para el correcto funcionamiento de la retina, perdiéndose así la adecuada interacción glía-neurona, lo que exagera aún más a los procesos neurodegenerativos de la retina. Este proceso se caracteriza por la adquisición de la capacidad de proliferación, migración y en última instancia, de un fenotipo fibroblástico.

Un marcador temprano, universal e inespecífico de daño en la retina y de la respuesta gliótica es el aumento de la expresión de la proteína ácida fibrillar glial (GFAP), un filamento intermedio componente del citoesqueleto de las células gliales (Bringmann et al. 2006). Por otro lado, durante este proceso la GS, que recicla neurotransmisores, disminuye su expresión. Kir 4, transportador encargado del eflujo de K^+ hacia la sangre, también disminuye su expresión, provocando la formación de edemas (Bringmann and Reichenbach 2001; Subirada et al. 2018). Como consecuencia del cambio en la expresión de las proteínas responsables de las funciones de las CGM, se pierde el fenotipo glial, y se adquiere un fenotipo fibroblástico, caracterizado por el aumento en la expresión de α -actina de músculo liso (α -SMA), microfilamento propio de células fibroblásticas (Bringmann et al. 2009; Hui et al. 1988).

Las células del EPR, del mismo modo que las CGM, pueden responder frente a una gran cantidad de estímulos patogénicos diferentes. Bajo condiciones fisiológicas, las células del EPR son marcadamente pigmentadas y tienen reducida o nula capacidad de proliferar y migrar. Mientras que, en situaciones patológicas, frente a diferentes tipos de estímulos, las células del EPR adquieren un fenotipo fibroblástico, en un proceso llamado **Transición epitelio-mesénquima (TEM)**. En esta transición las células del EPR adquieren una alta capacidad de migración, proliferación, y, como las CGM, aumentan la expresión de α -SMA, características distintivas de células fibroblásticas

(Tamiya and Kaplan 2016). Sumado a estos cambios, RPE65 y CRALBP disminuyen su expresión y se pierde la polaridad baso-apical. Como consecuencia, se pierde el fenotipo epitelial requerido por estas células para llevar a cabo sus funciones vitales en la retina. La TEM es considerada como la acumulación de pequeños cambios que eventualmente culminan en la adquisición de un fenotipo mesenquimático (Grisanti and Guidry 1995). Las alteraciones en las uniones estrechas que unen a las células epiteliales entre sí son claves en esta TEM. Estas uniones secuestran factores de transcripción, que al ser liberados inician una cascada de señalización que culmina en la expresión de genes involucrados en la TEM. Tal es el caso del factor de transcripción β -catenina, que al ser liberado de las uniones estrechas, se transloca al núcleo y activa la transcripción de genes involucrados en la proliferación y TEM (Tamiya and Kaplan 2016b).

Tanto la migración como la proliferación son procesos que están involucrados en el desarrollo embrionario, organogénesis y reparación de tejidos. Pero frente a desgarros de la retina, inflamación o estrés oxidativo crónicos, las CGM y las células del EPR se de-diferencian, migran al sitio dañado y proliferan (Bringmann and Wiedemann 2009; Hu et al. 2017) . Posteriormente las CGM y las del EPR secretan VEGF, PDEF, glicoproteínas, colágeno, fibronectina, moléculas quimio-atrayentes y citoquinas proinflamatorias, que promueven la formación y mantenimiento de las membranas fibro-celulares. En la mayoría de las enfermedades las localizaciones ectópicas de ambos tipos celulares son el espacio sub-retinal y el humor vítreo, generando en última instancia, membranas sub-retinianas y epi-retinianas respectivamente (Hiscott et al. 2002). El fenotipo celular predominante en estas membranas es el de fibroblasto (caracterizado por la expresión de α -SMA); estas células producen miofibrillas y adquieren la capacidad de tracción. Así, estas membranas comienzan a traccionar, conduciendo al desprendimiento de la retina, contribuyendo en gran medida a la degeneración neuronal y disminución y pérdida de la visión (Romano et al. 2018). Las señales moleculares que desencadenan o regulan estos procesos aún no están completamente identificadas, y dicha identificación es clave para el tratamiento de múltiples retinopatías.

Enfermedades de la Retina

Entre las enfermedades neurodegenerativas de mayor prevalencia se encuentran la degeneración macular asociada a la edad (AMD, por sus siglas en inglés), las retinopatías proliferativas (como la retinopatía diabética), glaucoma, retinitis pigmentaria y retinoblastomas. Todas ellas, con excepción del glaucoma, tienen en común la degeneración y muerte de las neuronas fotorreceptoras.

Las **retinopatías proliferativas** surgen como una respuesta frente a desbalances homeostáticos y estrés oxidativo crónico o frente a daños físicos o infecciones. Estas enfermedades se caracterizan por presentar una respuesta exacerbada de los procesos de reparación de tejidos por parte de las CGM y EPR, que conducen a la formación de membranas intravítreas, sub-retinales y epi-retinales (Tosi et al. 2014). La aparición de estas membranas provoca en su gran mayoría desprendimiento de retina, la separación física de la neuro-retina del EPR. Esta separación altera la interacción neurona-epitelio necesaria para el mantenimiento de la funcionalidad de los fotorreceptores y la homeostasis en esa zona. Como consecuencia de esto, las neuronas comienzan a degenerar, hasta morir por apoptosis (Gupta et al. 2016). Las evidencias sugieren que estas patologías, consideradas inicialmente patologías microvasculares, son en realidad patologías neuro-vasculares, en la que todas las células de la retina, neuronales, gliales y epiteliales están afectadas, y donde la neurodegeneración precede a los cambios vasculares.

La **Retinopatía diabética (RD)** es una alteración neuro-vascular de la retina que progresa desde una leve disfunción visual hasta la pérdida total de la vista, en los casos más severos. La RD es consecuencia de la exposición crónica a altos niveles de glucosa, lo que promueve el estrés oxidativo y un ambiente extracelular pro-inflamatorio que altera la funcionalidad de las células encargadas de la homeostasis de la retina, las CGM y las células de EPR. Esta enfermedad progresiva puede encontrarse de dos formas. La retinopatía diabética no proliferativa (RDNP), es caracterizada por micro-aneurismas, dilatación de vasos sanguíneos, hemorragia interna y exudado lipídico. La retinopatía diabética proliferativa (RDP) se caracteriza por neo-angiogénesis anormal, hemorragias pre-retinales y desprendimiento de retina (Subirada et al.2018). Estos últimos eventos son promovidos por la liberación de factores angiogénicos por parte de las CGM y células del EPR, cambios que contribuyen a la degeneración y muerte de las neuronas.

La **degeneración macular asociada a la edad (AMD)** es causa de la pérdida parcial o total de la visión producida por la degeneración de fotorreceptores. Esta degeneración tiene lugar en la mácula (Fig. 1 A), una zona de la retina que contiene a la fovea, región altamente enriquecida en fotorreceptores conos, especializada en la visión de alta definición (lectura) y visión central. Los estadios tempranos de la AMD se caracterizan por alteraciones con forma de drusas entre la membrana basal del EPR y la membrana de Bruch, y alteraciones en las células del EPR (Marazita et al. 2016). Los estadios tardíos se caracterizan por atrofia celular y neo-angiogénesis anómala. Los casos más severos presentan formación de membranas epi-retinales (Chirco et al. 2017).

De aquí se deduce la importancia de las CGM y las células del EPR, tipos celulares claves tanto en el mantenimiento de la retina en condiciones fisiológicas como en la progresión de enfermedades neurodegenerativas en condiciones patológicas.

El control de los procesos de de-diferenciación, proliferación y migración de las CGM y células del EPR es clave para un tratamiento integral de las enfermedades neurodegenerativas de la retina. Por ello es cada vez mayor el interés y la investigación abocada a encontrar los mediadores y los mecanismos de regulación involucrados en estos procesos. Pese a los avances en cuanto a la regulación de la migración y la proliferación en las CGM y células de EPR, aún restan establecer en su totalidad señales y mecanismos que participan en su regulación. Su identificación es el objetivo central de esta Tesis.

Esfingolípidos Bio-activos

En la búsqueda de nuevos mediadores que regulen procesos claves en la retina, nuestro laboratorio se ha centrado en indagar en la participación de un grupo de moléculas señal cuyas funciones en la retina son aún poco conocidas, los esfingolípidos. Estos lípidos tienen como bloque estructural al aminoalcohol esfingosina, característica que le confiere nombre al grupo (Fig. 4, en azul en el esquema). Los Esfingolípidos fueron identificados en 1880, cuando el neuroquímico J. L. W. Thudichum reportó la existencia de un lípido cerebral al que llamó “esfingosina” (Sph), en referencia a la Esfinge, debido a su naturaleza química y función enigmáticas. Por casi un siglo las funciones de estas moléculas fueron las estructurales, como componentes ubicuos de las

membranas biológicas. Estudios pioneros a mediados de los 80 identificaron funciones bioactivas para la esfingosina en la activación de la proteína quinasa C (PKC) (Smith et al. 2000). A partir de entonces, numerosos grupos de investigación se enfocaron en el estudio de estos Esfingolípidos con actividad biológica o **Esfingolípidos Bioactivos**. La Sph también interviene en la muerte celular programada o apoptosis, el arresto del ciclo celular, senescencia y diferenciación celular (Hannun and Obeid 2008). Posteriormente se demostró que otro esfingolípido, la Ceramida (Cer) regula la apoptosis en células leucémicas (Obeid et al. 1993). Luego se demostró que la Cer también está involucrada en la senescencia, diferenciación, arresto del ciclo celular, re-arreglos del citoesqueleto, resistencia a la insulina y en la regulación de diferentes tipos de muerte celular (autofagia, necrosis, mitofagia, necroptosis) (Arana et al. 2010; Hannun and Obeid 2017; Obeid et al. 1993). La Ceramida-1-fosfato (C1P) y la esfingosina-1-fosfato (S1P) son esfingolípidos bioactivos derivados de la fosforilación de la Cer y la Sph, respectivamente, y tienen efectos opuestos a sus precursores no fosforilados. La S1P está involucrada en la regulación de la supervivencia, la proliferación, inflamación, la migración y quimiotaxis (Ratajczak et al. 2014; Spiegel and Milstien 2003). La C1P también interviene en la supervivencia, proliferación, migración, e inflamación como desarrollaremos en detalle más adelante (Gómez-Muñoz 2018).

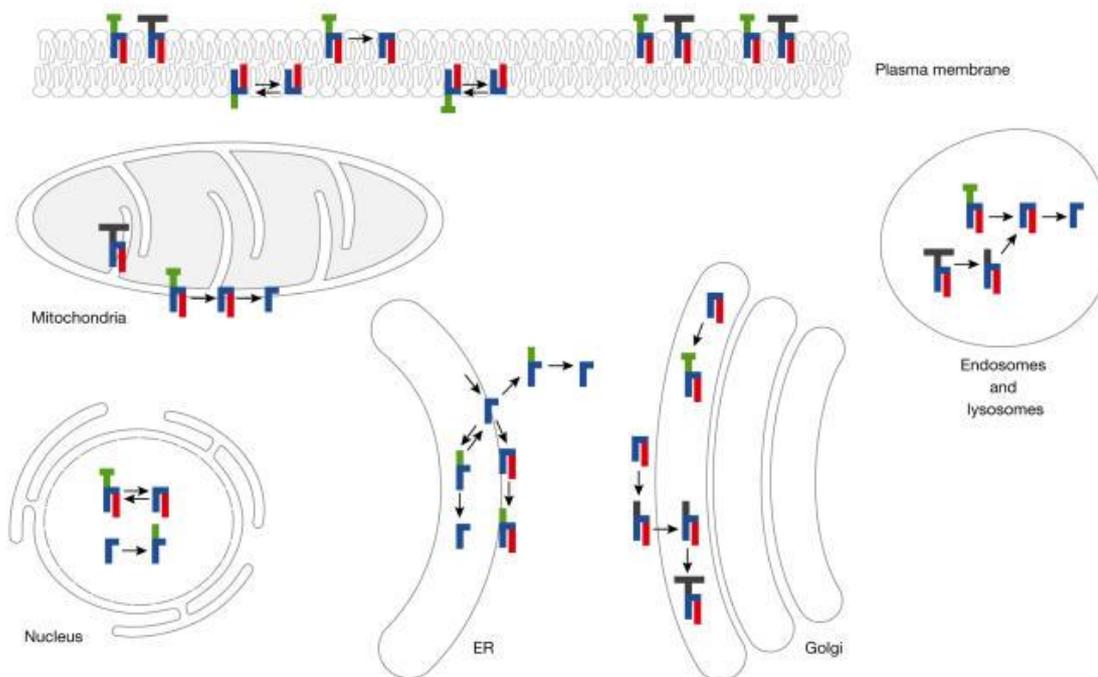
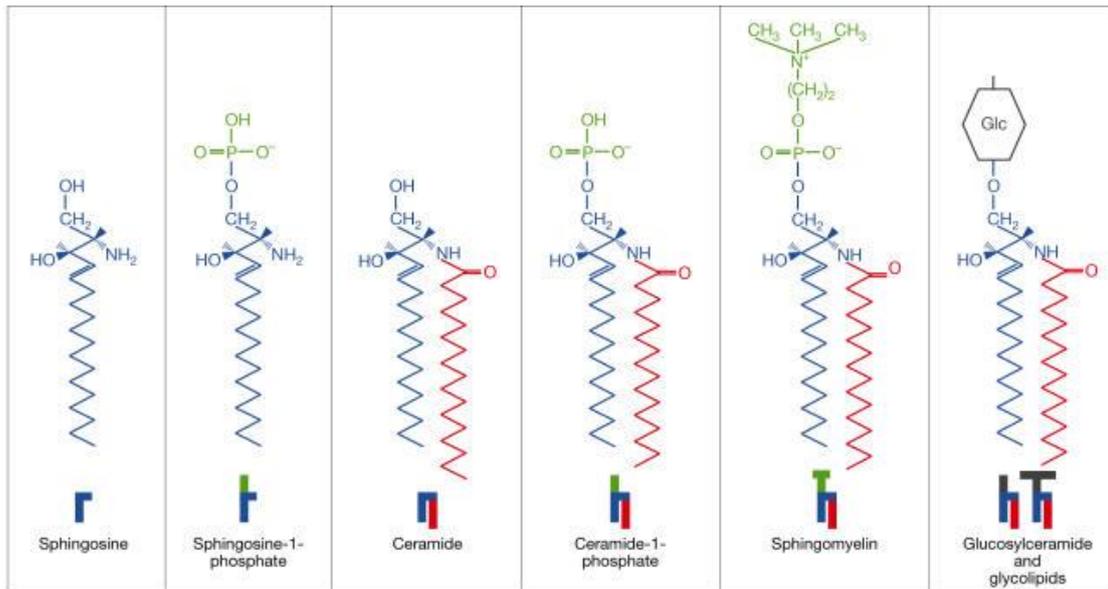


Figura 4: Estructura de los esfingolípidos y su distribución sub celular.

La glucosilceramida, la di-hidroceramida y la liso-esfingomiélinea son también esfingolípidos bioactivos, que no han sido investigados con la profundidad de la Cer, Sph, S1P y C1P, pero ya se ha reportado que están involucrados en diferentes procesos biológicos (Hannun and Obeid 2008).

Como vimos, los esfingolípidos bioactivos actúan como moléculas señal involucrados en diferentes procesos biológicos. Como toda molécula señal, tienen vida media corta. Su rápida síntesis se logra debido a que tanto los esfingolípidos como los glicerolípidos de membrana constituyen reservorios de estos metabolitos bioactivos, (Hannun and Obeid 2008; Ratajczak et al. 2014). A diferencia de las moléculas señalizadoras de naturaleza proteica, cuentan con la gran ventaja de que no son degradados por proteasas cuando son liberadas al medio extracelular.

Hoy en día un vasto número de trabajos respalda el rol de los esfingolípidos como importantes moléculas de señalización que regulan el crecimiento celular, supervivencia, inmunidad, integridad epitelial y vascular y son particularmente relevantes en la inflamación, enfermedades neurodegenerativas y cáncer (Hait and Maiti 2017; Hannun and Obeid 2017). La señalización mediada por los esfingolípidos bioactivos está íntimamente relacionada a los niveles relativos de los mismos. Esto quiere decir que un cambio en los niveles de estos esfingolípidos genera una respuesta sobre un proceso biológico determinado. Por lo tanto, el complejo metabolismo de estos esfingolípidos es clave en la señalización de los procesos que regulan, lo que sugiere que la regulación de las enzimas del metabolismo de los esfingolípidos es crucial para la señalización celular (Zhou and Blom 2015).

La ruta metabólica de los esfingolípidos comienza con la condensación de la serina y la palmitoil-CoA, catalizada por la enzima serina-palmitoiltransferasa, para dar lugar a la dihidro-esfingosina. Ésta se convierte en dihidroceramida mediante la acción de la ceramida sintasa, y posteriormente, la dihidroceramida desaturasa genera ceramida. Este proceso se conoce como “síntesis de novo” de la Cer, metabolito central en la síntesis de esfingolípidos. La Cer también se puede formar a partir de la hidrólisis de la esfingomielina o glicosfingolípidos de las membranas plasmáticas mediante la acción de las esfingomielinasas (SM) o glicosilceramidasa, respectivamente. La Cer puede ser degradada mediante ceramidasa, para dar lugar a la Sph, que al ser fosforilada por la esfingosina quinasa (SphK) origina a la S1P. Además, la Cer puede ser directamente fosforilada por la Cer quinasa (CerK) para dar lugar a la C1P (Hait and Maiti 2017; Hannun and Obeid 2017; Zheng et al. 2006).

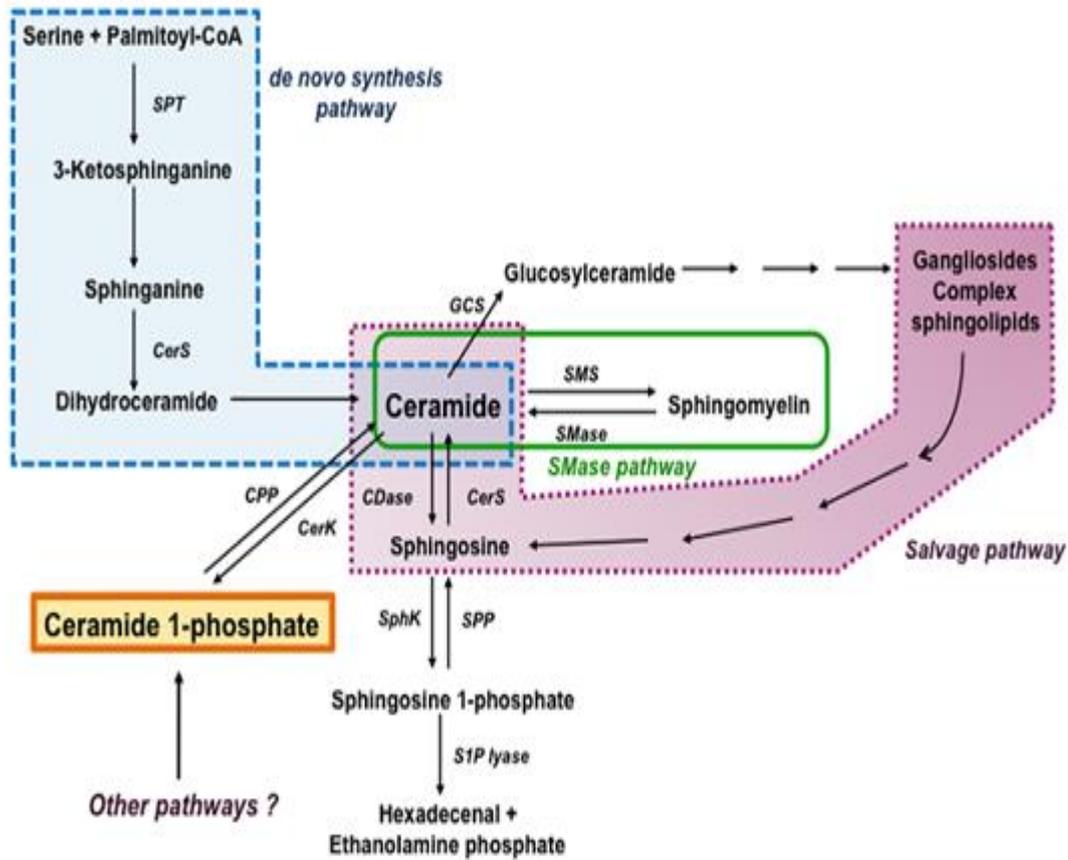


Fig. 5: Vías metabólicas de los Esfingolípidos. (Gómez Muñoz et al. 2016)

Los mecanismos de acción de los esfingolípidos para la señalización celular son muy diversos. Pueden actuar como señal intracelular y regular la actividad enzimática, como la C1P que regula a la fosfolipasa A 2 citosólica (cPLA₂) encargada de la liberación del ácido araquidónico, para la posterior síntesis de prostaglandinas. Por otro lado, pueden generar poros en la membrana, como lo hace la Cer, para inducir apoptosis (Colombini 2017). También actúan como ligando de receptores acoplados a proteína G, como la S1P, para estimular la proliferación y la migración celular (Hannun and Obeid 2017).

En la determinación de la supervivencia celular es particularmente evidente la interrelación entre los diferentes esfingolípidos, su síntesis, y la señalización celular. Frente a diferentes daños S1P, C1P, Cer y Sph aumentan o disminuyen sus niveles, según cuál sea el estímulo que enfrenta la célula, para sobrevivir o entrar en apoptosis.

Mientras que la Cer y la Sph activan señales de muerte celular programada, C1P y S1P activan señales de supervivencia celular. Por lo tanto, los niveles relativos de estos metabolitos están involucrados en la determinación del destino celular. Los efectos opuestos de especies de esfingolípidos que pueden interconvertirse entre sí, reflejan el estricto control del denominado “reóstato esfingolipídico” en la supervivencia celular y la importancia de desbalances de este reóstato en el desarrollo de diferentes patologías (Cuvillier et al. 1996; Jęško et al. 2018).

Ceramida-1-fosfato/Ceramida Quinasa: unidad funcional clave en la señalización celular

La C1P es un esfingolípido bioactivo que concita un interés creciente. Fue identificada por primera vez en monocitos de leucemia humana en un estudio sobre los productos metabólicos de esfingomielina (Dressler and Kolesnick 1990). Este trabajo se basó en una publicación previa que identificó a la Ceramida Quinasa (CerK), una quinasa lipídica, cuyo producto no había sido reportado en sistemas biológicos (Bajjalieh et al. 1989). A partir de estos trabajos, se han hecho grandes avances en relación a este esfingolípido y la enzima que lo produce. La síntesis de C1P es catalizada por la CerK, que fosforila a la Cer (Simanshu et al. 2013). Este es el único mecanismo de síntesis de C1P conocido en mamíferos, aunque la presencia de un pequeño pool de C1P en organismos o células doble mutante negativo CerK-/- CerK sugiere la existencia de algún otro mecanismo todavía no esclarecido (Mietla et al. 2013). Al ser una molécula señal, la vida media de C1P es relativamente corta. Hasta la fecha no se conocen fosfatasas específicas de C1P que catalicen su de-fosforilación. Los niveles bajos de C1P presentes en los sistemas biológicos se atribuyen a una rápida de-fosforilación mediada por fosfatasas de lípidos fosfato de acción inespecífica (Bornancin 2010; Brindley 2004). La síntesis de C1P se realiza en el aparato de Golgi, lugar de localización de la CerK. Esta síntesis se lleva a cabo a partir de la Cer provista por las tres vías arriba descritas, a partir de esfingolípidos más complejos, como esfingomielina o glucosilceramida, por síntesis de novo, o a través de la denominada vía de salvataje (a partir de S1P). La Cer generada en lugares diferentes del aparato de Golgi, es llevada hasta esta organela por su transportador, la proteína transportadora de

Cer (CERT). Una vez sintetizada, la C1P es transportada a sus sitios de acción por la proteína transportadora de C1P (CPTP), recientemente reportada (Simanshu et al. 2013; Zhou and Blom 2015).

Ceramida-1-fosfato

La C1P sintetizada por CerK está involucrada en numerosos procesos biológicos. A pesar de su breve historia como molécula señal, reconocida como tal hace poco más de dos décadas, existe ya una amplia información sobre sus funciones. El primer rol establecido para la C1P como molécula señal fue el de estimular la síntesis de ADN; el agregado exógeno de C1P sintética promovió la síntesis de ADN en fibroblastos de rata (Gomez-Muñoz et al. 1995) Este hallazgo suscitó un gran interés en este esfingolípido. Se estableció luego, que el agregado exógeno de C1P natural, con un ácido graso de cadena larga, promueve la síntesis de ADN y aumenta los niveles de antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) en fibroblastos T17, lo que evidencia que la C1P estimula la proliferación (Gomez-Muñoz et al. 1997). Rápidamente se reportaron efectos semejantes de C1P en la proliferación de macrófagos (Gangoiti et al. 2008) y mioblastos (Gangoiti et al. 2012) y en una cantidad enorme de tipos celulares (detallados en Gómez-Muñoz 2018). Esto llevó a proponer un rol para C1P como reguladora de la proliferación en distintos tipos celulares. La C1P estimula la proliferación de macrófagos mediante la activación de las vías de señalización de fosfatidilinositol 3 quinasa y proteína quinasa B, más conocida como Akt (PI3K/AKT), la vía de la quinasa regulada por señales extracelulares/quinasa activadas por mitógenos (ERK/MAPK), la quinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la fosfolipasa C α (PKC α). Además la C1P aumenta los niveles de la ciclina D1 y c-Myc, dos blancos moleculares de GSK-3 beta (la glucógeno sintasa-quinasa), reguladores claves de la proliferación celular (Gangoiti et al. 2008, 2010; Gómez-Muñoz 2018).

Al mismo tiempo que se esclarecía el rol de C1P en la proliferación, se establecía el rol de C1P en la apoptosis. La C1P actúa también como un esfingolípido anti-apoptótico. En 2004, el laboratorio de Gómez Muñoz demostró que la C1P promueve la supervivencia de macrófagos frente a la ausencia de factores tróficos. Este efecto es mediado por la inhibición de caspasas y el bloqueo de la síntesis de Cer, mediante la inhibición de la esfingomielinasa ácida (Gómez-Muñoz et al. 2004a) y la

inhibición de las palmitoiltransferasas (Granado et al. 2009). La activación de PI3K, de NF- κ B y aumentos en los niveles de la proteína anti apoptótica de células de linfoma B extra larga B (Bcl-xL) también intervienen en la supervivencia e inhibición de la apoptosis mediada por C1P (Gómez-Muñoz et al. 2005). Sumado a ello, la C1P inhibe la estimulación de las proteínas pro-apoptóticas Bax, y caspasa 3 y 9 y la consecuente fragmentación del ADN (Gómez-Muñoz et al. 2004; Gómez-Muñoz 2018).

En 2009 el grupo de Gómez Muñoz reportó que C1P agregada exógenamente promueve la migración de macrófagos RAW 264.7, demostrando un nuevo rol para la C1P, la estimulación de la migración celular (Granado et al. 2009). Sugirieron que este efecto se debería a la activación de un receptor específico para C1P. La hipótesis de la existencia de este receptor se basa en que la C1P agregada exógenamente promueve la migración, mientras que la C1P sintetizada en el interior celular no tiene este efecto. La activación por la C1P de receptores acoplados a proteína G (GPCR), conocidos por su rol en la migración celular, fue evaluada mediante la utilización de la toxina pertusis (Ptx), un potente y específico inhibidor de los GPCR. El tratamiento de los cultivos de RAW 264.7 con Ptx bloquea los efectos de C1P en la migración (Granado, et al. 2009). Este grupo de trabajo también demostró que el receptor para C1P es diferente a los receptores específicos para S1P (Arana et al. 2013), pero aún no ha sido identificado. El papel de la C1P en la migración ha sido demostrado en otras células del sistema inmune y diferentes tipos de células tumorales. La C1P también promueve la migración de células endoteliales en un contexto de reparación de tejidos (Hankins et al. 2013). Un aumento en la síntesis de C1P y su liberación al medio extracelular estimulan la quimiotaxis de células multipotentes del estroma y progenitores endoteliales, promoviendo la reparación del tejido (Kim et al. 2013). La C1P estimula también la migración de las células cancerígenas (Gómez-Muñoz 2018; I. G. Rivera et al. 2016).

Las vías de señalización a través de las cuales C1P promueve la migración son PI3K/Akt, ERK/MAPK (Arana et al. 2013), mTOR, NF-KB (I. G. Rivera et al. 2016). Además, C1P estimula el aumento en los niveles de las metaloproteinasas 2 y 9 (MMP2 y MMP9), proteínas encargadas de la degradación de la matriz extracelular y la membrana basal, lo que contribuye a la migración celular (C. Kim et al. 2013a; Ordoñez et al. 2016).

Sumado al rol en la migración, C1P es un potente quimioatrayente, como se ha demostrado en células de adenocarcinoma ductal pancreático humano (Rivera et al. 2016), células multipotentes del estroma y células progenitoras del endotelio (Kim et al. 2013a). Además promueve la síntesis y liberación de la proteína quimioatrayente de macrófagos (MCP-1) (Arana et al. 2013). Un trabajo reciente demuestra que las células de adenocarcinoma ductal pancreático liberan al exterior vesículas cargadas con C1P, que promueven la quimiotaxis y migración de células madres de cáncer pancreático (Kuc et al. 2018). Estos datos sugieren que C1P actúa en la motilidad celular de manera integral.

La función de la C1P en la estimulación de la proliferación, supervivencia y migración, procesos que contribuyen al desarrollo de cáncer y metástasis, la coloca como una molécula que promueve la transición de las células normales hacia la malignidad celular (Ratajczak et al. 2014).

La C1P también actúa en procesos de inflamación, con un rol dual, ya que en algunos tipos celulares y condiciones específicas puede ser pro-inflamatoria, mientras que en otros actúa de manera anti-inflamatoria (Presa et al. 2016). Pettus y colaboradores demostraron que C1P activa a la fosfolipasa A 2 citosólica (cPLA₂) (Pettus et al. 2004). Esta enzima escinde a los glicerofosfolípidos en la posición 2 y libera ácido araquidónico, precursor de la gran mayoría de las prostaglandinas. La interacción de C1P con sitios específicos de la cPLA₂ es necesaria para la translocación y activación de esta enzima para la producción de prostaglandinas E₂ en respuesta a varios estímulos inflamatorios. Esto remarca la importancia de la interacción C1P/cPLA₂ para la activación de cPLA₂ durante la respuesta inflamatoria (Lamour et al. 2009). Por otro lado, la C1P agregada exógenamente atenúa la inflamación de pulmón inducida por el lipopolisacárido (LPS) (Baudiß et al. 2016). De modo similar, la C1P bloquea la activación del factor NF-κB inducida por LPS, inhibiendo la transcripción de las citoquinas pro-inflamatorias interleuquina 6 (IL-6), IL-8 e IL-1 (Hankins et al. 2011).

Trabajos recientes reportan un nuevo rol para la C1P en la regulación de la angiogénesis. Kim y colaboradores han demostrado que C1P induce la formación de vasos incipientes por parte de las células HUVEC se en un ensayo de matrigel *in vitro* (C. Kim et al. 2013a).

La C1P actúa principalmente como segundo mensajero intracelular, y es liberada al medio extracelular solo bajo ciertas circunstancias o cuando las células han sufrido algún daño (Kim et al. 2012). La C1P utiliza diferentes mecanismos de acción dependiendo del proceso biológico en el que está involucrada. Así, mientras que para inducir la proliferación y los efectos inflamatorios actúa como un mensajero intracelular (Gomez-Muñoz et al. 1997; Pettus et al. 2004), para estimular la migración, actúa como una señal extracelular que activa a un receptor específico a través del cual señala al interior celular (Granado et al. 2009). Mucho queda por entender sobre los mecanismos de acción por los cuales actúa la C1P.

Ceramida Quinasa

En 1989 Bajjalieh y colaboradores reportaron el hallazgo de una enzima desconocida con actividad de quinasa lipídica, que era activada por pequeñas concentraciones de calcio y que precipitaba junto a vesículas sinápticas de rata. En el mismo trabajo propusieron llamarla Ceramida Quinasa (CerK), nombre con el que se la conoce hoy en día (Bajjalieh et al. 1989).

En el 2002 esta enzima fue clonada por primera vez (Sugiura et al. 2002). A partir de entonces, la generación de mutantes de CerK y desarrollo de técnicas de medición de esfingolípidos más precisas, han impulsado grandes avances en el campo de la actividad de CerK, y su producto C1P. La CerK pertenece a la familia de las diacil glicerol quinasas (DAGKs), ya que contiene un dominio catalítico presente en estas enzimas, pero a diferencia de ellas, CerK presenta una alta afinidad hacia Cer. Además, cuenta con un dominio plectrina necesario para la localización sub-celular y la actividad enzimática (Rovina et al. 2009). Esta actividad enzimática también es regulada por unión a calcio, a través de su dominio de unión a calcio/calmodulina. Finalmente, la CerK requiere de la fosforilación de al menos 2 sitios para su completa activación (Sugiura et al. 2002). Una vez activada, la CerK utiliza a la ceramida provista por el transportador de ceramida, CERT, sintetizada por las vías de síntesis ya descritas anteriormente (Fig. 4).

Para indagar en sus funciones, es de gran utilidad el inhibidor específico y reversible para la actividad de la CerK, el NVP231 (el *N*-[2-(benzoylamino)-6-benzothiazolyl]-tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decane-1-carboxamide amida). Este inhibidor es un análogo del ácido araquidónico y derivado de diaminobenzotiasol, que se une competitivamente al sitio activo de la CerK, inhibiendo su unión a Cer y así su actividad (Graf et al. 2008).

La CerK se localiza principalmente en el aparato de Golgi, en la membrana plasmática y en vesículas citoplasmáticas. A pesar de estas distintas localizaciones, la Cer debe ser transportada al aparato de Golgi para ser fosforilada por CerK. Un estudio reciente reveló que CerK puede ser liberada al medio extracelular, proceso inducido por C1P, pero aún se desconoce el mecanismo de acción involucrado (Kuc et al. 2018; Van Overloop and Van Veldhoven 2007)

La CerK se expresa ubicuamente, presentándose en mayores niveles en timo, leucocitos de sangre periférica, sistema nervioso, músculos esqueléticos, piel, intestino delgado, hígado y células hematopoyéticas (células T y B). Los procesos regulados por C1P y CerK están involucrados en el establecimiento y desarrollo de enfermedades de diferentes etiologías. Por tanto, CerK y su producto C1P tienen un creciente interés como blanco terapéutico, debido a su papel en la inflamación, proliferación y migración, procesos claves en enfermedades de diferentes etiologías, como cáncer, enfermedades inflamatorias o neurodegenerativas (Hait and Maiti 2017; Hannun and Obeid 2017; Jęśko et al. 2018)

La C1P en la retina

La bibliografía referida al papel de C1P en la retina es verdaderamente escasa, lo que plantea la existencia de un amplio campo de investigación. En *Drosophila melanogaster*, los fotorreceptores mutantes deficientes de CerK degeneran solo en presencia de luz, producto de fallas en la foto-transducción. Esto denota que la CerK cumple un rol importante en la transmisión de la señal lumínica. El nexos entre ambos procesos es NORPA, una proteína homóloga a la fosfolipasa C (PLC), proteína de señalización celular) de mamíferos, clave en la foto-transducción. La inactivación de la

CerK provoca una disminución en la expresión de NORPA, y por lo tanto en su actividad. Además los aumentos de Cer debidos a la ausencia de actividad de CerK alteran la distribución de dominios de fosfatidilinositol 4,5 bifosfato (PIP2) como así también la distribución de NORPA, lo que en conjunto disminuye aún más la actividad de esta enzima (Dasgupta et al. 2009)

Por otro lado, la C1P está involucrada en la regulación de la diacilglicerol lipasa (DAGPL) y de las fosfatasas lipídicas, enzimas del metabolismo lipídico en los segmentos externos de los fotorreceptores de rata. En concordancia con los resultados en *Drosophila*, el efecto sobre las fosfatasas es mayor en los segmentos externos obtenidos en presencia de luz (Pasquaré and Giusto 2008; Pasquaré, Salvador, and Giusto 2008).

Las células del EPR expresan CerK y otras enzimas involucradas en el metabolismo de la Cer. La presencia de dicha enzima en el epitelio las protege de la apoptosis inducida por los aumentos de Cer, reportado en diferentes patologías neurodegenerativas de la retina (Zhu et al. 2010).

Nuestro laboratorio ha sido el primero en demostrar que la C1P regula procesos centrales en el desarrollo de los fotorreceptores. El agregado exógeno de C1P a tiempos tempranos a cultivos neuronales puros de retina de rata, promueve la proliferación y el aumento de manera dosis dependiente (1-10 μ M), en el número de progenitores de fotorreceptores. En estadios de cultivo más avanzados, la C1P aumenta la expresión y la redistribución de las proteínas opsina y perifera hacia los procesos apicales de los fotorreceptores, una característica de los fotorreceptores diferenciados. En este mismo estadio el agregado de C1P promueve la supervivencia a través de la prevención de la apoptosis inducida por falta de factores tróficos (Miranda et al. 2011). Esto establece un rol clave para la C1P en la promoción de la proliferación de los progenitores neuronales en la retina y en la posterior inducción de su diferenciación y supervivencia.

En un modelo de uveítis inducida por LPS, se observó un aumento de los niveles de esfingolípidos, dentro de los cuales se encuentran principalmente diferentes especies de C1P (C12 C1P, C16 C1P, and C24 C1P), algunos tipos de ceramida y esfingomielin. Debido a que determinaron el incremento en los niveles de NF- κ B en correlación con el aumento de C1P en la retina, los investigadores plantean que la C1P sintetizada endógenamente sería incapaz de revertir la inflamación inducida por LPS

(Wang et al. 2018). Esto plantea más interrogantes sobre los efectos pro y anti inflamatorios ejercidos por C1P en la retina.

El interés en la CerK en la retina aumentó con el hallazgo de que una de las variantes de la retinitis pigmentaria, retinitis pigmentosa 26 (RP26), está asociada a la mutación de un gen que da lugar a una proteína conocida como “quinasa semejante a la ceramida quinasa” (CerKL), por su homología al gen de la CerK. A pesar de su gran homología y de haber sido considerada como una CerK de la retina, los estudios de Bornacin demuestran que las retinas de ratones mutantes dobles negativos CerKL-/CerKL- presentan los mismos valores de Cer y C1P que las retinas de los ratones salvajes para este gen (Mietla, Wijesinghe, Hoferlin, Shultz, Natarajan, Fowler, and Chalfant 2013). CerKL no tiene la capacidad de fosforilar a la Cer, quedando su función por esclarecer (Graf, Niwa, et al. 2008). Este trabajo estableció también que los niveles de C1P en retina de ratones están en el rango picomolar, y que la especie predominante de C1P en la retina es la C16C1P.

Estos hallazgos sugieren que la C1P podría tener un rol clave en el control de diversos procesos celulares en la retina. Es mucho lo que queda por hacer para la comprensión de las acciones de C1P y las vías de señalización que regula en los distintos tipos celulares de la retina.

Objetivos

Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que la S1P estimula la migración de las CGM (Simón, et al. 2015) y que la C1P y la S1P promueve la proliferación de progenitores de fotorreceptores en cultivos primarios puros de CGM y de neuronas, respectivamente. Pero ¿En qué radica la importancia de los procesos de migración y proliferación en células de la retina? Como describimos anteriormente, en las enfermedades neurodegenerativas y proliferativas de la retina, la muerte de los fotorreceptores es precedida por alteraciones funcionales en las CGM y células del EPR, células responsables del mantenimiento de la homeostasis y la funcionalidad de este tejido. La adquisición de la capacidad de migrar y proliferar por parte de estas células indica una mala prognosis para las enfermedades neurodegenerativas de la retina. En principio, tanto la proliferación como la migración son benéficas en el contexto de la reparación de tejidos y formación de la cicatriz, pero en patologías neurodegenerativas y proliferativas, ambos procesos se presentan de manera exacerbada y en lugares incorrectos. Identificar a las moléculas capaces de regular la migración y la proliferación en CGM y células del EPR es crucial para la comprensión integral de los procesos que conducen a las disfunciones visuales y contribuiría al avance en el tratamiento efectivo de estas enfermedades neurodegenerativas de la retina.

En base a lo expuesto, la *hipótesis* de trabajo de esta Tesis es que la C1P sería un potencial regulador de la migración y la proliferación celulares en las CGM y las células del EPR.

Por lo tanto, el *objetivo* de este trabajo de Tesis *es indagar sobre el papel que tiene la C1P sobre la migración y la proliferación de estos dos tipos celulares de la retina.*

Materiales y Métodos

Materiales

Las cápsulas plásticas para cultivo celular de 35 mm y las pipetas plásticas de cultivo graduadas de 10 y 2 ml fueron compradas en Greiner Bio-One (GBO). El suero fetal bovino (SFB) fue adquirido de Laboratorios Natocor. El medio de cultivo Dulbecco modified Eagle`s (DMEM), el buffer Hank`s Balanced Salt Solution (HBSS), la enzima colagenasa tipo II, el glucógeno, la gentamicina y los random primers pertenecen a la firma GIBCO y se compraron en Invitrogen Argentina. También en Invitrogen se adquirieron la sonda faloidina de Molecular Probes y la NBD C6-Cer de Thermo Fisher Scientific. En la empresa Sigma-Aldrich, Argentina se adquirieron la Ceramida-1-fosfato (D-eritro-Ceramida C8 1-fosfato, C1P), NVP231, SB203580, U0126, la tripsina, el inhibidor de tripsina, la sonda 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI), el paraformaldehído (PF) y el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium o MTT. El LY294002 se obtuvo de la empresa de Enzo Life Sciences (Nueva York, EE. UU.). El ATK fue comprado en Cayman Chemical (Michigan, EE. UU.) y la esfingosina-1-fosfato (S1P) fue de Calbiochem (EE. UU.). Los anticuerpos primarios monoclonales, anti-Vimentina (clon 40E-C) y anti-Bromo-deoxi-uridina (BrdU, clon G3G4) fueron comprados en Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB perteneciente a la Universidad de Iowa, Departamento de Biological Sciences, Iowa City, IA 52242). En la empresa ABCAM se adquirieron los siguientes anticuerpos: anti-CRALBP y anti-glutamina sintasa. Los anticuerpos monoclonales anti-GFAP, anti-AKT y p-Akt fueron adquiridos en Cell-signaling. Los anticuerpos secundarios conjugados con Cy2 y Cy3 especie anti-ratón y anti-conejo fueron comprados en Jackson Inmuno Research (West Grove, PA). Los anticuerpos secundarios para western blotting anti-ratón y anti-conejo conjugados a la peroxidasa de rábano picante fueron obtenidos de Santa Cruz. Las membranas de PVDF “Inmobilon-P” fueron obtenidas de Millipor Corporation, MA, EE. UU.), (Buenos Aires, Argentina) y el anticuerpo primario anti-RPE65 fue obtenido en Novus Bio (UnitedStates). Las placas para cromatografía en capa fina (sílica gel 60 50 glass plates 10x20 cm) fueron obtenidas en Merck, Alemania.

Para realizar la extracción de ARNm se utilizó el reactivo Quickzol de Kalium technologies (Embiotec), la enzima transcriptasa reversa para la obtención del ADN copia (cDNA) M-MLV se adquirió en Promega al igual que el inhibidor de ribonucleasas. Los nucleótidos utilizados son de la empresa Thermo Fisher Scientific y

los primers utilizados para la reacción de q-RT-PCR fueron adquiridos en la empresa Sigma-Aldrich. Las secuencias de estos primers utilizados en este trabajo son para CerK Fw: GCACGGGGTAATTGGGAAGA, Rv: TTTGTGCCCACCGTTGAGTA y los de Tbp (gen control) Fw: TGGGATTGTACCACAGCTCCA y rv: CTCATGATGACTGCAGCAAACC. Todos los solventes utilizados fueron de grado HPLC y el resto de los reactivos fue de grado analítico.

Cultivos Primarios de Células de Retina

Todos los cultivos utilizados durante esta Tesis fueron realizados a partir de ratas Albino Wistar de día posnatal (PN) 3-4. Los animales se criaron en el Bioterio del INIBIBB, y fueron manipulados de acuerdo a los lineamientos publicados en la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio” del National Institute of Health (NIH) y aprobados por el Comité Institucional de Cuidado de Animales de Experimentación (CICUAE) de la Universidad Nacional del Sur.

Cultivos gliales puros

Los cultivos puros de células gliales de Müller (CGM) se obtuvieron siguiendo protocolos previamente establecidos (Hicks and Courtois, 1990). Brevemente, se enuclearon ratas PN 3-4 y los ojos se dejaron durante toda la noche en medio de cultivo DMEM, protegidos de la luz. Al día siguiente se realizó una disección enzimática con tripsina (1mg/mL) durante 3,50 min. y colagenasa tipo II (1 mg/mL) por 7,50 min. y posteriormente se extrajeron las retinas mediante disección mecánica y se cortaron en fragmentos de aproximadamente 1 mm². Estos fragmentos fueron sembrados en medio de cultivo DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Luego de 72 hs se removieron los pequeños trozos de tejido adheridos a la cápsula mediante dos lavados moderados con buffer Hanks. El medio de cultivo fue reemplazado cada 3-4 días, previo lavado suave con el buffer Hanks. A los 8 días in vitro (d.i.v.) (60% de confluencia) las células se repicaron por disociación con tripsina 0.25% EDTA 5mM /Hanks 1X (0.3 ml) y se combinaron las células de todas las placas de cultivo primario

para obtener un pool único de células, del cual se sembraron aproximadamente 60000 células por placa de 35 mm. Se obtuvieron así cultivos enriquecidos en CGM (contenido de CGM superior al 98%), que alcanzaron confluencia al cabo de 15- 18 d.i.v.

Cultivo de Células de Epitelio Pigmentario de la Retina de la Línea ARPE-19

La línea celular ARPE-19 se utilizó como modelo de epitelio pigmentario de retina (EPR). Las células de esta línea celular humana originada espontáneamente se repicaron de rutina por disociación en tripsina 0.25% EDTA 5mM /Hanks 1X, seguido del resembrado a una dilución 1:3 en placas de 35 mm para los experimentos o frascos de T75 de diámetro para el mantenimiento de la línea. Las células fueron mantenidas en el medio de cultivo DMEM 10% SFB, el cual se renovó semanalmente.

Ensayo de la herida

Para evaluar la migración celular se realizó el ensayo de la herida, donde consideramos al cierre de dicha herida como un indicador de la motilidad celular. Este ensayo requiere que los cultivos de CGM y epiteliales lleguen al 100% de confluencia. Esta técnica consiste en la realización de varias rayas o “heridas” sobre una monocapa confluyente de células, con la punta de un tip de 200 μ l. Después de realizar las heridas se cambió completamente el medio, con el fin de eliminar los detritos celulares que se podrían haber generado. Posteriormente, los cultivos fueron sometidos a los diferentes tratamientos con las drogas e inhibidores. La migración celular se midió como la variación en el ancho de una misma herida entre el tiempo 0 (t0) y las 24 hs (t24). Para localizar la misma área en diferentes tiempos, se realizaron líneas en el lado exterior de la base de las placas con marcador permanente. Las heridas sobre la monocapa de células fueron realizadas perpendicularmente a las líneas de la base. De esta manera localizando la intersección entre línea de la base y la herida, fotografiamos la misma área a t0 y t24 (Fig. 6). Las áreas de las fotografías fueron medidas mediante el software

ImageJ (de Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD; disponible de manera libre en <http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). Utilizando la herramienta “Polygon selections” seleccionamos el área de la herida y con las opciones Analyze>Measure medimos las áreas en pixeles. Para evaluar la migración celular de cada condición, se utilizó la siguiente fórmula, que relaciona los valores de las áreas a t0 y t24:

$$\text{Porcentaje de Migración} = ((t0-t24) \times 100) / t0$$

El valor obtenido mediante esta fórmula representa el porcentaje del área libre de células a t0 que fue ocupado por las células a 24 hs. En cada experimento, los porcentajes de migración obtenidos para todas y cada una de las condiciones fueron posteriormente relacionados al porcentaje de migración de la condición control de cada experimento. Los valores así obtenidos, se representan en las ordenadas de los gráficos como migración relativa.

Tratamiento de cultivos gliales con Ceramida-1-Fosfato

La C1P fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) obteniéndose una solución stock 10mM (Wijesinghe et al. 2007). Alícuotas de esta solución fueron agregadas directamente al cultivo celular, manteniendo la concentración de DMSO por debajo del 0,1% del volumen del medio de cultivo. El mismo volumen de la solución utilizada como vehículo se agregó a los controles. Las concentraciones de C1P evaluadas en este trabajo fueron desde 5 a 30 μ M (concentraciones finales en cultivo).

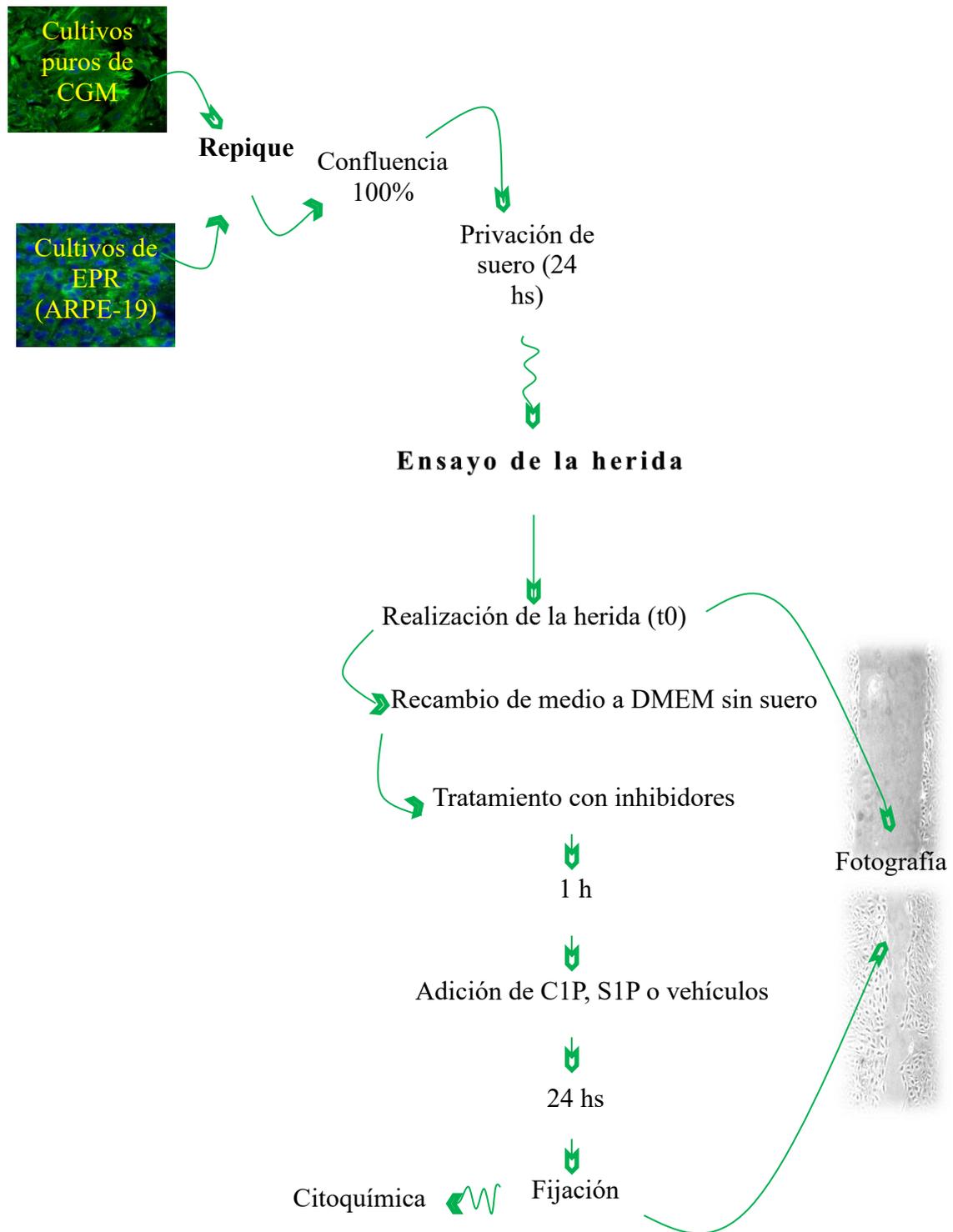


Figura 6: Esquema de trabajo del Ensayo de la Herida. Este esquema experimental es utilizado para los cultivos de CGM y los de células del EPR en un 100% de confluencia.

Tratamiento de cultivos gliales con Esfingosina-1-fosfato

La esfingosina-1-fosfato (S1P) se disolvió como se describe en el trabajo de Simón y col. (2015). Brevemente, a partir de una solución madre de S1P (0,5 mg / ml) preparada en metanol: agua (95: 5) se tomaron alícuotas con la masa deseada de S1P. Estas alícuotas se evaporaron bajo una corriente de nitrógeno seco, se resuspendieron en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) en DMEM (4 mg / ml). Posteriormente se sonicaron a 40-50 °C durante 30 min. con homogenización por vórtex ocasionales para permitir la solubilización. En este trabajo se utilizó una concentración de S1P 5 μ M (concentración final en cultivo) (Simón et al; 2015). El mismo volumen de la solución utilizada como vehículo se agregó a los controles.

El agregado de ambos esfingolípidos fue posterior a la privación de suero durante 24 hs, a fin de eliminar los posibles efectos que este podría llegar a tener.

Inhibición de las vías de señalización celular

Para eliminar los efectos de las múltiples moléculas presentes en el suero, en todos los experimentos se realizó una incubación durante 24 hs en medio DMEM sin suero antes de evaluar los efectos de drogas o inhibidores. Todos los inhibidores utilizados en este trabajo fueron disueltos en DMSO, manteniendo la concentración de DMSO por debajo del 0,1% del volumen del medio de cultivo. Las concentraciones finales en el cultivo de todos los inhibidores y los esfingolípidos utilizados en esta Tesis se detallan en la tabla 1. Para evaluar las vías intracelulares implicadas en el efecto de la C1P sobre la migración de las CGM, una vez realizadas las heridas, los cultivos se pre-trataron con U0126 10 μ M, LY294002 25 μ M, SB203580 5 μ M y SP600125 25 μ M, inhibidores de las vías de Proteína quinasa regulada por señales extracelulares/Quinasa activada por mitógenos (ERK/MAPK), fosfatidilinositol-3-kinasa/proteína quinasa B, más conocida como Akt (PI3K/Akt), P38/MAPK y quinasa c-Jun N-terminal (JNK), respectivamente. Después de 1 h de pretratamiento con estos inhibidores, los cultivos se suplementaron con C1P o con su vehículo y se incubaron durante 24 hs.

Inhibición de la actividad de la Fosfolipasa A2 citosólica

Para evaluar si la C1P inducía la activación de la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA₂) para promover la migración glial, los cultivos fueron tratados con un inhibidor específico de esta fosfolipasa, ATK 5 μ M o con su vehículo durante 1 h, inmediatamente después de realizada la herida. Luego los cultivos fueron suplementados con C1P o DMSO e incubados por 24 hs. La migración celular fue evaluada como se describió anteriormente.

Inhibición de la síntesis de C1P

Para evaluar el rol de la CerK y la síntesis de C1P en la migración de las CGM y células del EPR, se inhibió la síntesis de C1P mediante la utilización de NVP231, un inhibidor específico de CerK. Para ello cultivos confluentes de células gliales y epiteliales se privaron de suero durante 24 hs. Inmediatamente después de hacer la herida, los cultivos fueron tratados con NVP231 1 μ M o DMSO durante 1 h. Para evaluar la interrelación de la síntesis endógena de C1P y el agregado exógeno de C1P en la migración, los cultivos fueron tratados 1 h con NVP231 1 μ M y luego fueron suplementados con C1P 10 μ M durante 24 hs. Se procedió de la misma manera para evaluar la interrelación entre la síntesis endógena de C1P y el agregado de S1P.

Tabla 1: Inhibidores. *concentración final en cultivo

| Inhibidor | Blanco de acción | Concentración* |
|-----------|---------------------------|----------------|
| LY294002 | Vía de la PI3/Akt | 25 μ M |
| U0126 | Vía de ERK/MAPK | 10 μ M |
| SP600125 | Vía de JNK | 50 μ M |
| SB203580 | Vía de P38/MAPK | 5 μ M |
| ATK | Fosfolipasa A2 Citosólica | 5 μ M |
| NVP231 | Ceramida Quinasa | 15 μ M |

Determinaciones Citoquímicas

Los cultivos fueron fijados con paraformaldehído (PF) al 4% en PBS 1X, a temperatura ambiente durante 1 h. Las células fueron permeabilizadas, con Tritón X-100 0,1%/PBS durante 10 min. Estos pasos precedieron a la tinción con sondas específicas y a la inmuno-marcación.

- *Inmuno-citoquímica: identificación de las CGM y células del EPR:*

Para las técnicas de inmuno-marcación, a fin de reducir la unión inespecífica de los anticuerpos, las células fueron tratadas durante 30 min. con buffer Tris-NaCl, Tween-20 (TNT) 0,1% y leche descremada 2%. A continuación, las células fueron incubadas durante 24 hs a 4 °C con anticuerpos específicos dirigidos a GFAP, vimentina y glutamina sintasa, marcadores específicos de las CGM para la identificación de estas células, y con anti-RPE65 y anti-CRALBP, marcadores selectivos de células epiteliales, para la identificación de células del EPR. Como anticuerpos secundarios se utilizaron anticuerpos anti-conejo y anti-ratón, conjugados con fluoróforos verdes o rojos (Cy2 y Cy3 respectivamente), incubando a los cultivos con éstos durante 1 h a temperatura ambiente. En todos los casos se realizaron controles omitiendo el agregado de anticuerpos primarios, para evaluar la unión inespecífica del anticuerpo secundario. Finalmente, los cultivos fueron analizados por microscopía fluorescencia utilizando un microscopio Nikon Eclipse E600.

- *Tinción de núcleos:*

Para visualizarlos núcleos se utilizó la sonda fluorescente, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), que se une específicamente al ADN. Para ello, luego de la fijación y permeabilización las células fueron incubadas durante 15 min. con una solución de DAPI 1 µg/ml a temperatura ambiente. Para finalizar se lavó tres veces con PBS durante 5 min. La tinción nuclear se realizó posteriormente a la tinción con sondas e inmunomarcación.

- Tinción de las fibras de actina:

Para visualizar el citoesqueleto de actina, se utilizó la sonda faloidina que se une específicamente a las fibras de actina. Para ello, las células se incubaron durante 30 min. con una dilución 1/50 en PBS de una solución madre de 200U/1ml de metanol. Finalizada esta incubación, se lavaron las células tres veces con PBS durante 5 min., para eliminar la sonda que no se hubiera adherido a las fibras de actina, y minimizar la tinción inespecífica y el fondo.

Western Blotting (WB)

Para evaluar si la C1P afecta los niveles de p-Akt, la forma activa de Akt que denota activación de la vía, se realizó la técnica de WB. Esta técnica fue dividida en diferentes etapas:

- Extracción de proteínas:

En primer lugar se extrajeron las proteínas, para lo cual las células fueron lavadas 2 veces rápidamente con PBS 1X /Na₃VO₄ 1 mM /NaF 10 mM y colectadas en buffer de lisis (KCl 13mM, Tris HCl 150 mM pH: 7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tween-20 1% y NP-40 1%), conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas y fosfatasas. A continuación, los extractos de células fueron lisados en hielo durante 30 minutos, mediante agitación con vórtex cada 10 min. Para finalizar, las proteínas totales fueron cuantificadas con el método de Bradford (Bradford 1976).

- Separación electroforética de las proteínas:

Una vez cuantificadas, las muestras proteicas se desnaturalizaron con buffer muestra Laemmli 6X (Tris-HCl 250 mM pH 6.8, SDS 8%, glicerol 40%, 2-mercaptoetanol 20% y 0.02% azul bromofenol), calentando durante 5 min. a 95° C. Las proteínas (50ug por calle) se resolvieron por electroforesis en geles de poliacrilamida/bis-acrilamida al 10%. La corrida electroforética se realizó a 80-120mv durante aproximadamente 1 h, utilizando el buffer de corrida (Tris 25 mM pH 8,8; glicina 192 mM).

- *Transferencia de las proteínas a membranas de PVDF:*

Una vez separadas electroforéticamente, las proteínas de las muestras se transfirieron desde el gel a una membrana de PVDF, previamente activada en metanol. La transferencia se realizó en buffer de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3; glicina 192 Mm, metanol 20 %), utilizando una cámara de transferencia (BioHRad, modelo Mini Trans H Blot, Bio H Rad Life Science Group, California) durante 2 hs a amperaje constante de 350 mA y voltaje variable.

- *Inmunomarcación y revelado:*

Para finalizar, las membranas se incubaron en buffer PBS1X; Tween-20 0,1% y BSA 5% durante 2 hs a temperatura ambiente, para bloquear o eliminar las uniones inespecíficas. Luego, estas membranas se incubaron con los anticuerpos primarios anti-Akt total, p-Akt o GAPDH diluidos 1/1000 en buffer PBS 1X; Tween-20 0,1% y BSA 3%, durante toda la noche con agitación leve a 4°C. A continuación, las membranas se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-ratón para p-Akt, y GAPDH o anti-conejo para Akt total (ambos acoplados a peroxidasa), durante 1 h a temperatura ambiente. El revelado de las bandas inmuno-reactivas se realizó por el método de quimioluminiscencia, utilizando ECL, para lo que se usaron placas fotográficas especiales para luminiscencia. La identificación de las bandas proteicas de interés se determinó utilizando como referencia a estándares proteicos de peso molecular conocido en el rango de 220-14 kDa. Se utilizó el programa Image J para cuantificar las bandas inmuno-reactivas, de las imágenes obtenidas a partir de las placas radiográficas.

Evaluación de la viabilidad celular: Ensayo de MTT

Para determinar el efecto del tratamiento de NVP231 sobre la viabilidad de las CGM y las células del EPR, se realizó el ensayo de la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium o MTT. Este compuesto de color amarillo es transformado en formazán, que forma cristales intracelulares de color violeta, por la enzima mitocondrial succinato-formazán deshidrogenasa, cuya actividad depende de la funcionalidad mitocondrial. En este ensayo, la funcionalidad mitocondrial (proporcional a la formación de formazán) se utiliza como indicador de viabilidad celular.

Después del tratamiento con NVP231 durante 24 hs, se añadió una solución de MTT (5 mg / PBS 1X) a cada placa, para lograr una concentración final de 0,5 mg/ml en el medio de cultivo. Las células se incubaron a 36,5 °C durante 1,5 hs, se lisaron con tampón de solubilización (Triton x-100 al 1% y HCl 0,01 N en isopropanol) y se realizaron mediciones espectrofotométricas a 570 nm. La absorbancia de fondo (debido al rojo fenol del DMEM) se midió a 670 nm y se restó a todas las placas. La viabilidad se calculó como un porcentaje de la absorbancia promedio en condiciones no tratadas (control), a la que se asignó un valor arbitrario de 100%.

Detección y análisis de ARNm

- *Aislamiento de ARNm*

Para estudiar la expresión de CerK el primer paso fue extraer el ARNm de muestras de cultivos de CGM con el reactivo de extracción Quick-zol en hielo siguiendo las indicaciones del fabricante. Todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua ultrapura autoclavada y solventes de calidad HPLC. La integridad del ARNm fue verificada en gel de agarosa al 0.8% y su concentración fue medida por absorbancia a 260 nm.

- *Reacción de transcripción reversa (RT)*

Para realizar la reacción de transcripción reversa (RT) del ARNm previamente extraído, se partió de 1 µg de ARNm para obtener una concentración de 40 ng/ul de ADNc. Para la reacción se utilizaron *random primers*, dNTPs, inhibidor a ARNasa (RNAsin) y la enzima *Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase* (M-MLV RT) siguiendo las instrucciones del fabricante. Para evaluar la expresión de CerK por parte de las CGM se amplificaron mediante PCR convencional fragmentos del gen correspondiente a CerK con los primers fw: GCACGGGGTAATTGGGAAGA y rv: TTTGTGCCACCGTTGAGTA. Luego se separaron los fragmentos obtenidos en electroforesis en gel de agarosa al 0,8% y se tiñeron con bromuro de etidio, donde se usaron extractos de ARN de cerebro de rata de 10 días como controles positivos.

Análisis de los niveles de C1P

- *Incubación con el precursor metabólico NBD-ceramida:*

La C1P es sintetizada por fosforilación de la Cer frente a diferentes daños como la inflamación o exposición a rayos gamma (Kim et al. 2012). Para evaluar esta síntesis utilizamos un análogo fluorescente de la ceramida, la NBD-ceramida, altamente metabolizable, que puede ser utilizado por las células como sustrato para generar otras moléculas (Don and Rosen 2008). Para analizar si el daño mecánico producido por la herida era capaz de promover la síntesis de C1P medimos los niveles de C1P en cultivos controles y aquellos a los cuales se les realizó la herida.

Para evaluar el efecto del daño mecánico sobre la síntesis de C1P, luego de privarlos de suero a por 24 hs, los cultivos gliales puros fueron incubados con NBD C6-Cer 1 μ M en medio DMEN sin suero durante 2 hs a 36,5°C, para permitir que la NBD-Cer ingrese a las células. Posteriormente se realizó la herida, se recambio el medio sin reposición de NBD-Cer y se incubó durante 2 hs. Al finalizar este tiempo de incubación se extrajeron los lípidos.

- *Extracción de los lípidos:*

La extracción de los lípidos a partir de los cultivos de CGM se realizó según el método propuesto por Bligh&Dyer (1959). Se realizó una partición en cloroformo: metanol: agua (2: 2: 1.8, v/v), seguida de agitación usando vórtex y centrifugación durante 20 min. a 2000 rpm. Luego de la centrifugación se obtuvieron 2 fases: una fase superior acuosa y una fase orgánica inferior, quedando las proteínas desnaturalizadas en la interfase. La fase superior y las proteínas se descartaron, recuperándose la fase inferior clorofórmica. Ésta se llevó a sequedad bajo atmósfera de N₂ y los lípidos concentrados se resuspendieron en una mezcla de cloroformo: metanol (2: 1 v/v) y transferidos a viales de 2 mL. Nuevamente se llevó a sequedad y los lípidos se resuspendieron en 200 μ L de cloroformo: metanol (2:1 en vol.) y de allí se tomaron alícuotas para la siembra en placas para TLC.

- *Cromatografía de capa fina*

La fase clorofórmica obtenida de cada condición fue concentrada por evaporación bajo N₂ y los lípidos allí contenidos fueron resuspendidos en cloroformo: metanol (2:1 en vol.) y sembrados en una placa de HPTLC (Merck). Se desarrolló la cromatografía utilizando como fase móvil una mezcla de butanol: ácido acético: agua (3:3:1 en vol.). Las placas con los lípidos fluorescentes fueron fotografiadas bajo luz ultravioleta y el porcentaje de contribución de cada banda fue cuantificado por densitometría usando el software ImageJ.

Evaluación de la proliferación mediante la incorporación y detección del nucleótido BrdU

La evaluación de la proliferación en CGM y ARPE-19 se realizó en los cultivos confluentes en los que se hizo el ensayo de la herida y en cultivos no confluentes. Para evaluar la proliferación de las CGM y las células del EPR en estos últimos, se utilizaron cultivos donde la confluencia fue de 60% para las CGM y de 20% para las células epiteliales. Estos niveles de confluencia se obtuvieron 2 días después del repique en CGM y a 2 hs de realizado el repique en células del EPR. Esta etapa del desarrollo de los cultivos fue elegida debido a que en los cultivos confluentes utilizados para los ensayos de migración la proliferación es limitada por la interacción célula-célula, mientras que en las etapas iniciales no existen dichas restricciones y presentan mayor proliferación. Luego de 24 hs de privación de suero, los cultivos fueron sometidos a un pulso de Bromo-deoxi-Uridina (BrdU), análogo de la Timidina, que se incorpora al ADN en la fase S del ciclo celular, sirviendo como marcador de células en proliferación.

Las células fueron incubadas con BrdU 30 μM (concentración final en el cultivo) durante 24 hs previas a la fijación. Luego de la fijación con PF 4% las células fueron tratadas con HCl 2N durante 30 min. para desnaturalizar el ADN y, a continuación, se neutralizó con borato de sodio 0,1 M. La incorporación de BrdU se determinó por inmunocitoquímica utilizando anticuerpos monoclonales y realizando los controles correspondientes.

Inhibición de la proliferación mediante Hidroxiurea

Para evaluar la contribución de la proliferación en el cierre de la herida, utilizamos el inhibidor de la proliferación Hidroxiurea (HU). Para ello, la solución de HU fue preparada inmediatamente antes de su uso, en agua con calidad de cultivo. De esta solución, se tomaron alícuotas para obtener una concentración final de HU 100 μM . El tratamiento con HU se realizó una hora antes del agregado de C1P, no fue removida ni suplementada a los cultivos a lo largo de los ensayos de migración.

Análisis estadístico

Los resultados muestran el porcentaje de al menos 3 experimentos independientes (\pm desvío estándar), a menos que se indique lo contrario. En cada experimento cada condición fue realizada por triplicado. Para los análisis de la evaluación de la proliferación por inmunocitoquímica se analizaron un total de 15 campos (elegidos al azar) por réplica. En los ensayos de migración, se analizaron al menos 15 fotografías por replica. La significancia estadística se evaluó mediante la prueba t de Student o ANOVA según se especifique, considerando significativo un valor $p < 0,05$. Para realizar los gráficos y el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5. Las imágenes mostradas de cultivo celular son representativas de cada resultado.

Resultados

Caracterización de las Células Gliales de Müller en cultivos primarios

Para iniciar este trabajo, caracterizamos las Células Gliales de Müller (CGM) en los cultivos primarios utilizados en los experimentos. Estos cultivos obtenidos a partir de rata de 3 días posnatal (PN.) están enriquecidos en CGM de retina. Los cultivos llegaron a confluencia a los 15 días *in vitro* (d.i.v.), conformando una monocapa donde se observaron CGM de gran tamaño, aproximadamente 50 μm de largo, con el cuerpo celular irregular y ahusado y un gran núcleo (Fig. 7 A). La caracterización de estas células se realizó por inmuno-citoquímica, evaluando la expresión de marcadores específicos, como la vimentina, la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) y la glutamina sintetasa. La vimentina y la GFAP son filamentos intermedios específicos del citoesqueleto de las células gliales. La glutamina sintetasa (GS) es una enzima utilizada por las CGM para reciclar el neurotransmisor glutamato, una de sus funciones características. Marcamos los cultivos primarios con anticuerpos específicos anti-vimentina, anti-GFAP y anti-GS. La inmuno-marcación demostró que las células de los cultivos expresaban los marcadores gliales GS, vimentina y GFAP (Fig. 7 B, C y D respectivamente), corroborando así que las células utilizadas en este trabajo son efectivamente CGM.

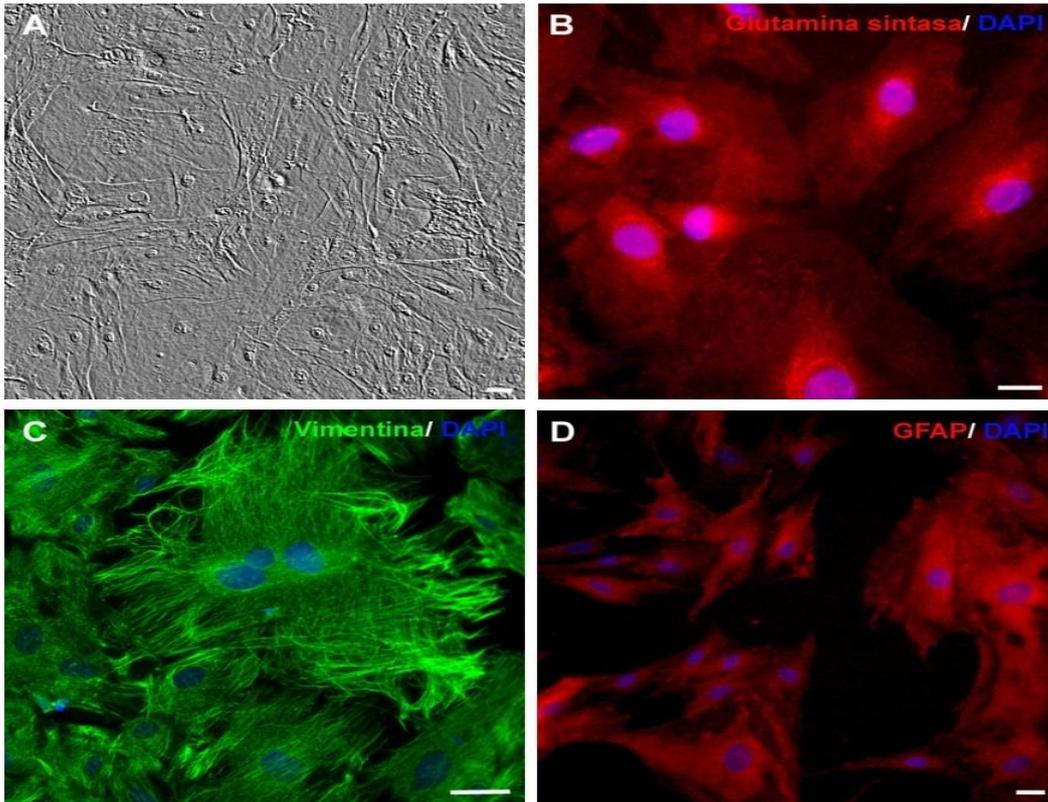


Figura 7: Caracterización de células gliales de Müller. Fotomicrografías de fase (A) y confocal (B - D) de cultivos primarios de CGM confluentes de 15 d.i.v. obtenidos a partir de ratas PN 3. Las células de estos cultivos expresan GS (rojo en B), vimentina (verde en C) y proteína ácida fibrilar glial (GFAP- rojo en D). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul en B-D). La barra de escala representa 20 μ m.

Caracterización del proceso de migración de las Células Gliales de Müller

La reparación de tejidos es un mecanismo por el cual diferentes tipos celulares se activan para reparar el sitio dañado mediante la formación de una cicatriz. En la retina las células encargadas de esta reparación son las CGM y las células del EPR, mediante la adquisición de la capacidad de migrar y proliferar (Bringmann and Wiedemann 2012; Tackenberg et al. 2009). El proceso de migración se inicia para permitir que las células lleguen a la zona dañada para poder repararla. Pero estas células pueden migrar de manera exacerbada o a lugares inadecuados, provocando alteraciones en la estructura de la retina. Los mecanismos y factores que regulan esta migración no están claramente establecidos.

Para investigarlos, en primer lugar, evaluamos el proceso de migración en las CGM. Cultivos de CGM de 15-18 d.i.v., confluentes, fueron incubados sin suero durante 24 hs. Posteriormente, se provocó un estímulo mecánico mediante la realización de una herida con la punta de un pipeta de 200 μ l, lo que produjo la ruptura tanto de las uniones intercelulares como de la unión al sustrato. Al comparar las fotomicrografías de fase de la herida en un cultivo control (DMSO) a tiempo inicial o tiempo 0 (Fig. 8 izquierda) y otra después de 24 hs (derecha), notamos que el área libre de células se redujo levemente. Además, después de 24 horas se observó la extensión de filopodios sobre la herida (Fig. 8 B, flechas), lo que permitió el desplazamiento celular y que células de lados opuestos de la herida llegaran a hacer contacto entre sí. Esto indica que en condiciones controles las CGM activaron mecanismos intrínsecos de motilidad celular frente al estímulo mecánico para reparar la herida.

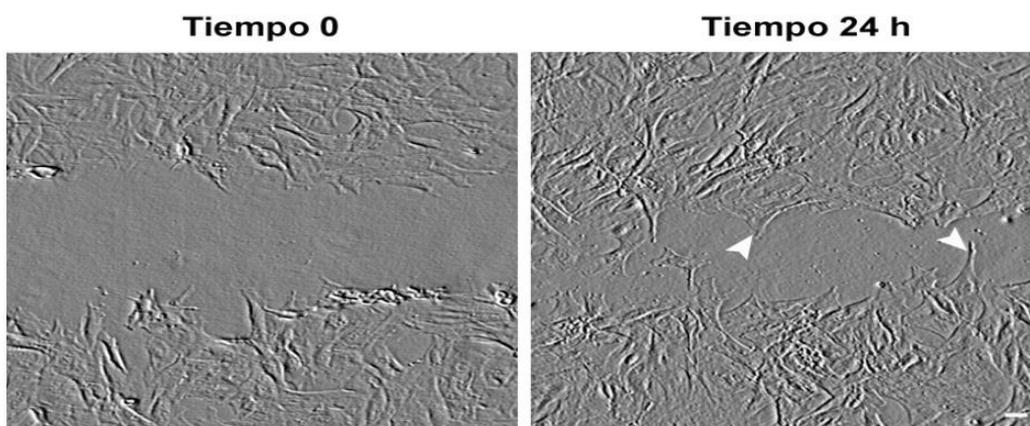


Figura 8: Migración de las CGM inducidas por el daño mecánico. Fotomicrografías de fase de las CGM a tiempo 0 (izquierda) y después de 24 hs (derecha) de la realización de la herida. Notar la mayor cantidad de filopodios (flechas) extendiéndose sobre la herida a las 24 hs que a tiempo 0. La barra de escala representa 20 μ m.

La ceramida-1-fosfato estimuló la migración de las CGM

Una vez caracterizado el modelo de migración para las CGM, evaluamos si la C1P tenía un rol en este proceso. Para ello cultivos confluentes de células gliales fueron privadas de suero durante 24 hs, y luego de realizar la herida fueron suplementados con diferentes concentraciones de C1P en el rango de 5 μ M a 30 μ M o con DMSO. Este

rango de concentraciones fue elegido debido a que promueve la migración de diferentes tipos celulares (Granado et al., 2009; Arana et al., 2013; Kim et al. 2013; Rivera et al. 2015; Presa et al., 2016 y Gomez-Muñoz et al., 2016). El tratamiento de los cultivos con C1P aumentó la motilidad glial comparada con la observada en los controles. Además, promovió la formación de filopodios y lamelipodios, que se extendieron sobre el área de la herida (Fig. 9 A, cabezas de flecha). Al comparar las dos condiciones experimentales determinamos que el ancho de la herida (área libre de células) se redujo en los cultivos tratados con C1P 10 μ M. Esta disminución en el ancho de la herida indica que las CGM se desplazaron avanzando sobre el área libre de células, reduciéndola. También observamos mayor cantidad de células sobre la herida en los cultivos tratados con C1P que en aquellos tratados con el vehículo (Fig. 9 A). Las diferentes concentraciones de C1P evaluadas produjeron un aumento en la migración de las CGM. Sin embargo, solo a partir de 10 μ M las diferencias en la migración entre controles y tratados con C1P fueron significativas (Fig. 9 B). Por tanto, en base a estos resultados decidimos realizar los experimentos siguientes con una concentración de C1P 10 μ M. Para evaluar la motilidad de las CGM en los cultivos controles y aquellos tratados con C1P 10 μ M, cuantificamos el área libre de células a 0 y 24 hs después de realizada la herida en cada condición. Determinamos que mientras las CGM solo cubrieron el $12,43 \pm 1,8$ % de la herida en los cultivos controles, en cultivos tratados con C1P las CGM avanzaron hasta cubrir más del $22,27 \pm 2,2$ % de la herida (Fig. 10).

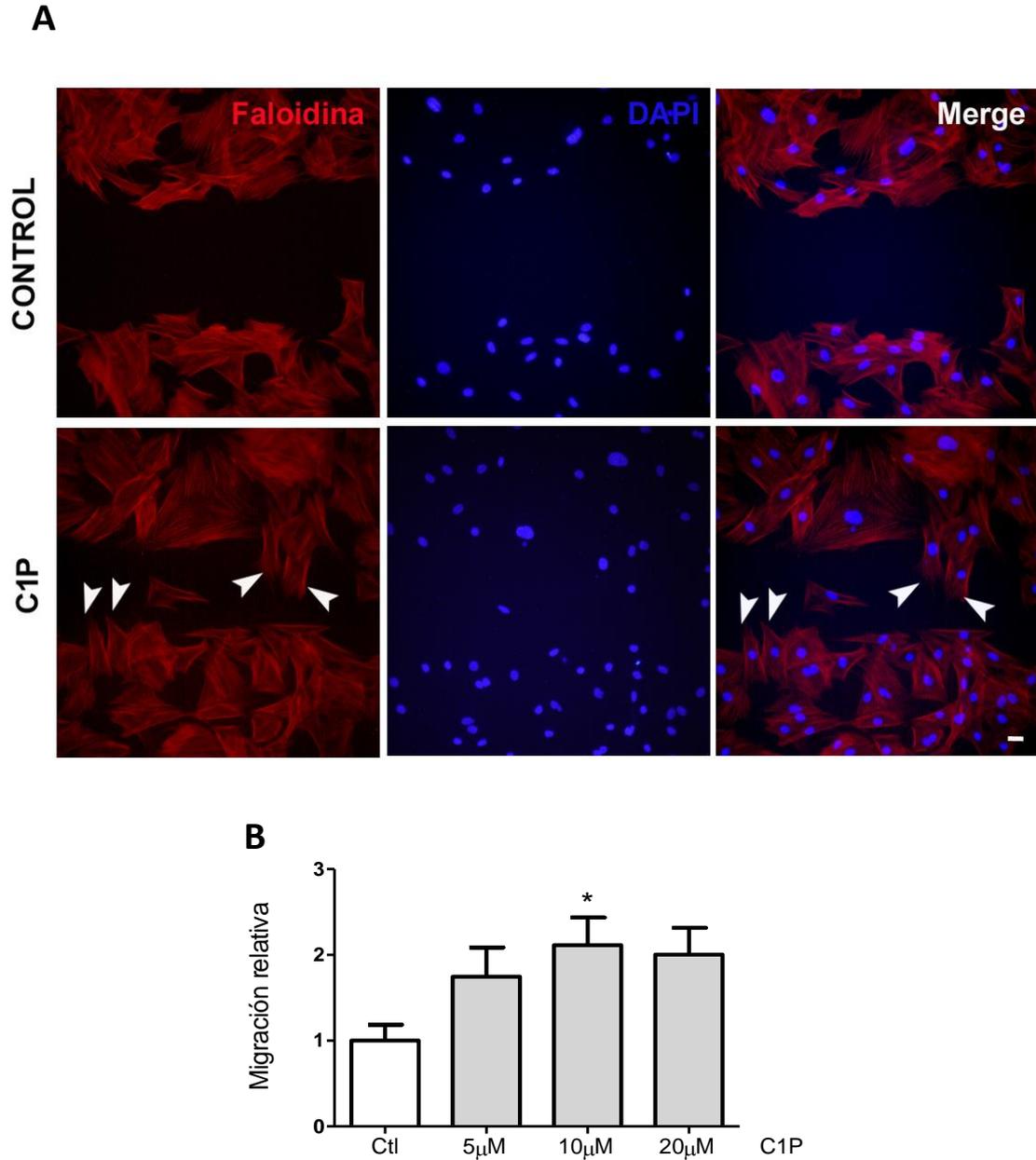


Figura 9: C1P promueve la migración de las CGM. A los 15 d.i.v los cultivos fueron privados de suero durante 24 hs., y luego de realizar la herida, se recambió el medio. Posteriormente los cultivos se suplementaron con diferentes concentraciones de C1P o su vehículo (DMSO) y se cultivaron durante 24 hs. (A) Fotomicrografía de CGM con el citoesqueleto de actina marcado con faloidina (izquierda, roja), núcleos marcados con DAPI (centro, azul) y la superposición (derecha), en controles (fila superior) y cultivos suplementados con 10 μ M C1P (fila inferior). La adición de C1P estimuló la extensión de lamelipodios (puntas de flecha), la localización de células sobre la herida y por consiguiente, la migración glial. La barra de escala representa 20 μ m. Las barras en (B) representan el porcentaje de migración relativa provocada por diferentes concentraciones de C1P en relación al control (migración relativa; medias \pm SD; n=3). *p < 0.05 diferencias significativas en relación al control.

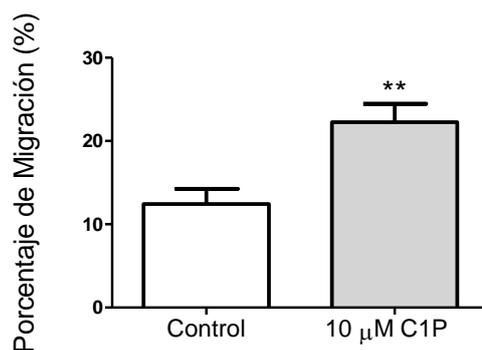


Figura 10: Porcentaje de migración de las CGM inducida por C1P 10 μ M. Las barras indican el promedio del porcentaje de migración de C1P y de su respectivo control de tres experimentos (medias \pm SD); ** $p < 0.01$; diferencia significativa con respecto al control.

La proliferación de las CGM no participó en el cierre de la herida promovida por Ceramida-1-fosfato

Además de incrementar la migración, algunos tipos celulares aumentan su tasa de proliferación para así lograr reparar los tejidos frente a diferentes tipos de daño. Se ha reportado que la C1P estimula la proliferación en varios tipos celulares (Presa et al. 2016). Para evaluar una posible contribución de la proliferación en el cierre de la herida, estudiamos este proceso mediante la incorporación del nucleótido bromo-deoxiuridina (BrdU) en cultivos gliales tratados con DMSO y con C1P 10 μ M (Fig. 11, paneles superior e inferior, respectivamente). La incorporación de BrdU y por lo tanto la tasa de proliferación, en ambas condiciones fue baja. El agregado de C1P no estimuló la proliferación, ya que la cantidad de núcleos BrdU-positivos se mantuvo similar en las condiciones control y tratados con C1P. Por otro lado, las células de los márgenes de la herida no incorporaron el nucleótido BrdU en ninguna de las condiciones mencionadas y tampoco se observaron células BrdU-positivas sobre la herida. Estos datos nos sugieren que el cierre de la herida en la monocapa de CGM se debió principalmente a la migración y no a la proliferación de estas células.

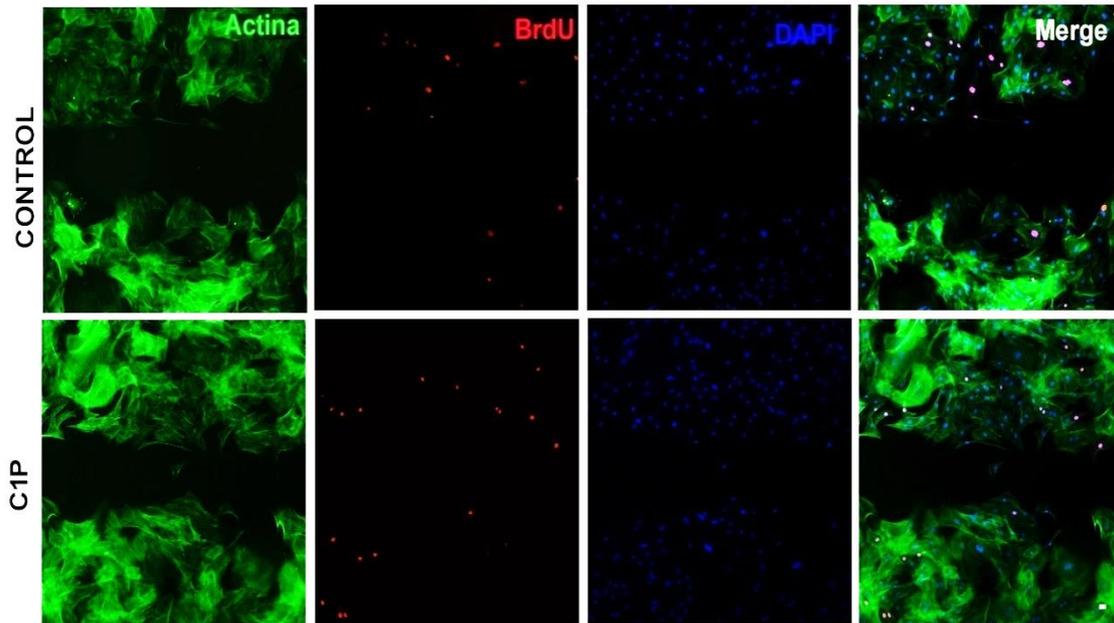


Figura 11: Efecto de la C1P en la proliferación de las CGM luego del daño mecánico. Fotomicrografías de CGM en cultivos controles (panel superior) y tratados con C1P 10 μ M (panel inferior) durante 24 hs. El citoesqueleto de actina se visualizó con un anticuerpo anti-actina (verde), los núcleos en división con anticuerpos anti-BrdU (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). La superposición de estas citoquímicas se observa en la última columna (merge). La incorporación de BrdU fue baja y similar en ambas condiciones. Además, no se observaron células con núcleos BrdU positivos en los márgenes de la herida ni en el área central de ésta. La barra de escala representa 20 μ m.

Vías de señalización involucradas en la estimulación de la migración de las CGM por la ceramida-1-fosfato

El agregado de C1P aumentó la migración glial y redujo el ancho de la herida. Para que la migración ocurra, se activan múltiples vías de señalización que culminan en la reorganización del citoesqueleto de actina y la formación de filopodios y lamelipodios (Mayor and Etienne-Manneville 2016; Rivera et al. 2016). Evaluamos las vías de señalización involucradas canónicamente en la migración, como aquellas que han sido reportadas por ser intermediarias de los efectos de C1P en la migración de diferentes tipos celulares. Para analizar estas vías, cultivos confluentes de CGM fueron incubados durante 1 h con U0126 10 μ M, LY294002 25 μ M, SB203580 5 μ M y SP600125 50 μ M, inhibidores específicos de las vías de la Proteína quinasa regulada por

señales extracelulares/quinasa activada por mitógenos (ERK/MAPK), la fosfatidilinositol 3 quinasa/proteína quinasa B (PI3K/Akt), la p38 MAP quinasa (P38/MAPK) y la quinasa c-Jun N-terminal (JNK), respectivamente. Las concentraciones utilizadas de U0126, LY294002, SB203580 fueron elegidas a partir de trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Simón et al. 2015). Por su parte la concentración de SP600125 fue elegida a partir de la búsqueda bibliográfica.

La C1P activó la vía de PI3K/Akt para promover la migración de las CGM

El tratamiento de los cultivos con LY294002 25 μ M, inhibidor de PI3K/Akt, redujo la migración tanto en los controles como en los cultivos tratados con C1P 10 μ M (Fig. 12). Al comparar las fotomicrografías de las diferentes condiciones (Fig. 12 A), observamos que el tratamiento de los cultivos con LY294002 25 μ M no permitió que las CGM en los cultivos controles redujeran el área de la herida, mediante la migración activada por el daño mecánico. De la misma manera, el efecto promotor de la migración de C1P 10 μ M se redujo por el pre-tratamiento de los cultivos con LY294002. El ancho de la herida en los cultivos pre-tratados con LY294002 y luego con C1P, fue mayor que en los cultivos tratados con C1P (Fig. 12 A). La cuantificación de la migración relativa, esto es, las veces de cambio del porcentaje de migración con respecto a sus respectivos controles, evidenció que el tratamiento con LY294002 redujo la migración activada por el daño mecánico en los controles, y previno casi totalmente el aumento en la migración promovida por C1P. Estos resultados sugieren que la activación de la vía de PI3K/Akt sería clave tanto para la migración activada por el daño mecánico, como para el aumento de la migración inducida por C1P. Para corroborarlo, decidimos evaluar mediante WB los niveles de la proteína p-Akt, la forma activa de Akt. Este análisis demostró la presencia de p-Akt en los cultivos controles, lo cual es consistente con el requerimiento de la activación de la PI3K para la migración glial activada por el daño mecánico. El tratamiento de los cultivos con C1P aumentó significativamente los niveles de p-Akt, corroborando así que la vía de PI3K es necesaria tanto para la migración glial activada por el daño mecánico, como para el aumento de la migración promovido por C1P (Fig. 12 C).

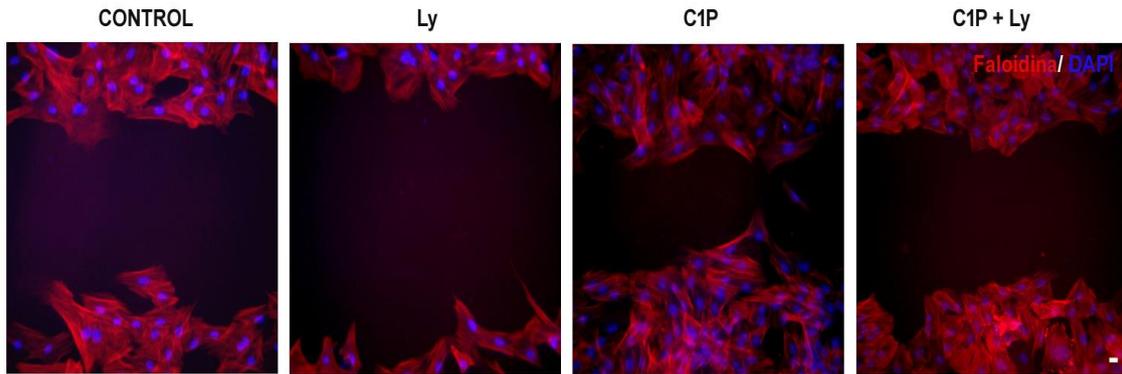
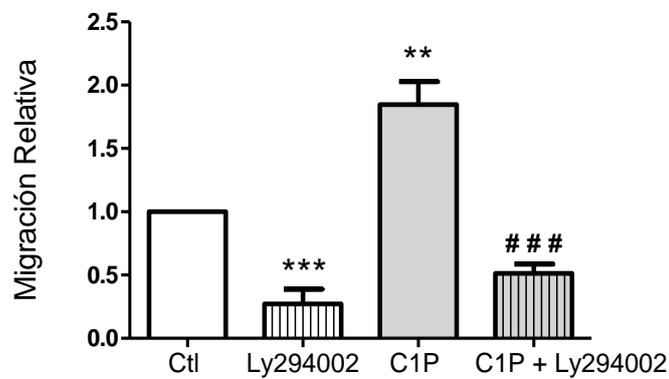
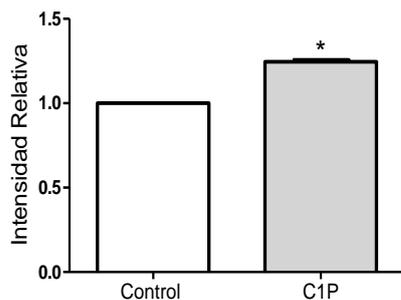
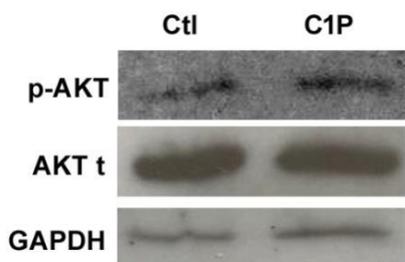
A**B****C**

Figura 12: C1P promueve la migración de las CGM a través de la activación de la vía de PI3K/Akt: (A) Fotomicrografías de cultivos de 15 d.i.v de CGM confluentes, controles (DMSO) y tratados con LY290004, C1P y C1P + LY294002, donde las CGM tienen el citoesqueleto marcado con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). El tratamiento de los cultivos con LY294002 inhibió la migración inducida por el daño mecánico y el aumento de la migración inducida por la C1P. La escala representa 20 μ m. En (B) las barras indican el porcentaje de migración de cada condición relativa al control (n: 3; medias \pm SD); ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ diferencia significativa con respecto al control. ### $p < 0.001$ con respecto a C1P. (C) El WB muestra los niveles de fosforilación de Akt en cultivos controles y tratados con C1P 10 μ M. En (D) las barras indican la intensidad relativa de las bandas con respecto al control. * Diferencias significativas con respecto al control (* $p < 0.05$).

La C1P actuó a través de la vía de la JNK para promover la migración glial

Una de las vías involucradas en la migración celular es la regulada por la JNK. Evaluamos si esta vía estaba involucrada en la migración de las CGM y en el aumento de la migración por parte de C1P. Cultivos confluentes de CGM de 15 d.i.v. fueron privados de suero durante 24 hs, y luego de realizar la herida, fueron tratados durante 1 h con un inhibidor específico de la vía de JNK, SP600125 50 μ M. A continuación, se agregó DMSO o C1P y se incubó durante 24 hs. El pre-tratamiento con SP600125 redujo ligeramente la migración de las CGM inducida por el daño mecánico. En los cultivos con SP600125 el ancho de la herida se redujo menos que en los controles luego de 24 hs (Fig. 13 A). El tratamiento de los cultivos con SP600125 antes de agregar C1P 10 μ M redujo marcadamente la migración promovida por este esfingolípido; es de notar que el ancho de la herida de los cultivos tratados con C1P, es mucho menor que los cultivos tratados con C1P + SP600125 (Fig. 13 A). El análisis cuantitativo demostró que el tratamiento con SP600125 disminuyó leve pero significativamente la migración de las CGM inducida por el daño mecánico, y redujo significativamente el aumento en la migración promovido por la C1P, que se mantuvo al nivel de los controles (Fig. 13 B). Estos resultados sugieren que la C1P requiere de la activación de la vía de JNK para promover la migración glial.

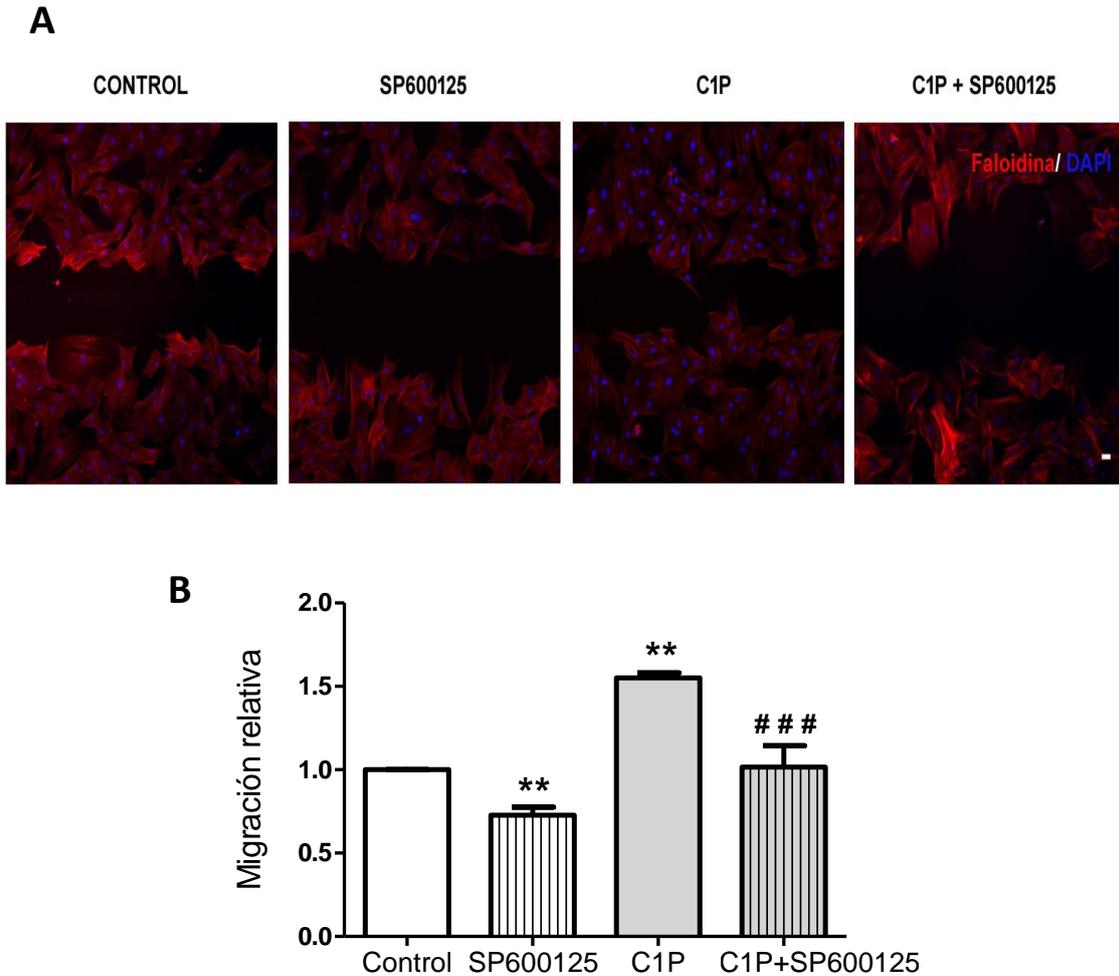


Figura 13: C1P promovió la migración de las CGM a través de la activación de la vía de JNK. (A) Fotomicrografías de cultivos de 15 d.i.v de CGM confluentes tratados con DMSO, SP600125, C1P y C1P + SP600125, donde se observa el citoesqueleto de las CGM marcado con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). El tratamiento de los cultivos con SP600125 inhibió levemente la migración, e inhibió el aumento de la migración promovido por la C1P. La barra de escala representa 20 μ m. En (B) las barras indican el porcentaje de migración de cada condición relativa al control, de tres experimentos (medias \pm SD); ** $p < 0.01$; diferencia significativa con respecto al control. ### $p < 0.001$ con respecto a C1P.

La C1P promovió la migración glial a través de la vía de la ERK/MAPK

Para evaluar el posible rol de la vía ERK/MAPK en los efectos de C1P sobre la migración glial utilizamos U0126, un inhibidor específico para las MAP quinasa, MEK1 y 2, que fosforilan a ERK 1 y 2. El tratamiento de los cultivos de CGM con U0126 10 μ M reveló que la vía de ERK/MAPK no intervino en la migración inducida

por el daño mecánico observada en los controles (Fig. 14 A). Por el contrario, el pre-tratamiento con U0126 de los cultivos durante 1 h, inhibió la estimulación de la migración glial inducida por la C1P, que sí se observó en ausencia de este inhibidor (Fig. 14 A). Un análisis cuantitativo demostró que en cultivos pre-tratados con U0126 la migración glial fue similar que en los controles. Sin embargo, el tratamiento con U0126 antes del agregado de C1P, inhibió el aumento de la migración promovida por este esfingolípido (Fig.14 B). Esto sugiere que la C1P estimula la vía de ERK/MAPK para promover la migración de las CGM, pero a diferencia de las vías de PI3K/Akt y la de JNK, la vía de ERK/MAPK no interviene en la migración de las CGM inducida por el daño mecánico, en condiciones controles.

A

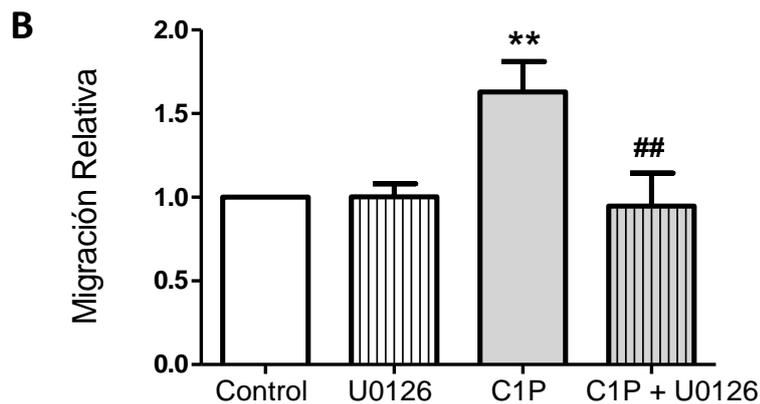
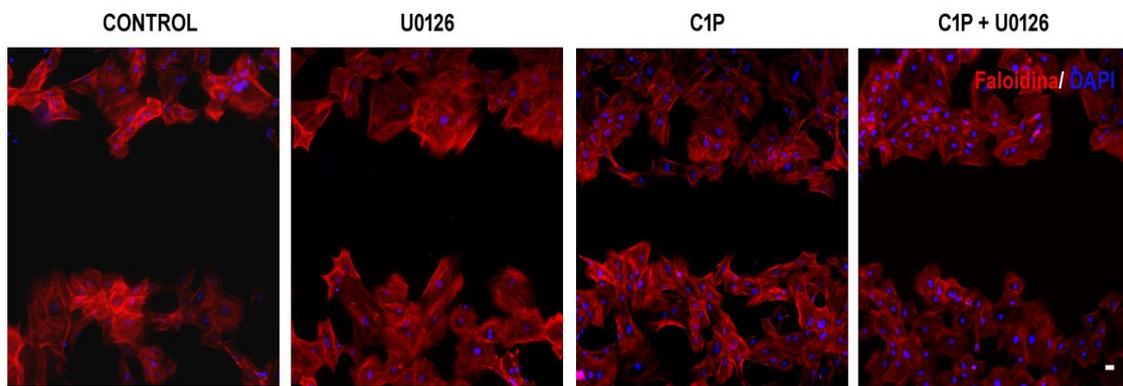


Figura 14: La C1P promueve la migración de las CGM a través de la activación de la vía de ERK/MAPK: (A) Fotomicrografías de CGM con el citoesqueleto de marcado con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). Las variaciones en el ancho de la herida sugieren que el tratamiento de los cultivos con U0126 no alteró la migración de las CGM inducida por el daño mecánico en controles, pero inhibió el aumento de la migración promovida por la C1P. La barra de escala representa 20 μ m. En (B) las barras representan el promedio del porcentaje de migración de cada condición relativa al control (medias \pm SD; n=3); **p<0.01; diferencia significativa con respecto al control. ## p<0.01 con respecto a C1P.

La C1P no utilizó la vía de p38/MAPK para promover la migración glial

Para continuar con el estudio de las posibles vías de señalización involucradas en el efecto promotor de C1P en la migración glial, analizamos el papel de la vía de p38/MAPK. Para ello los cultivos confluentes de células gliales fueron pre-tratados con SB203580 5 μ M, un inhibidor específico para esta vía, inmediatamente después de realizada la herida. El tratamiento de los cultivos con el inhibidor de P38/MAPK no alteró la migración glial en los cultivos controles, inducida por el daño mecánico (Fig. 15 A). La C1P estimuló la migración de las CGM, y este efecto no fue alterado por el tratamiento de los cultivos con SB203580 5 μ M 1 h antes del agregado de la C1P (Fig. 15 A). El ancho de la herida de los cultivos controles y aquellos tratados con SB203580 no mostraron diferencias significativas entre si. De igual modo, el ancho de las heridas de cultivos tratados con C1P y aquellos tratados con SB203580 + C1P no mostraron diferencias entre sí. (Fig. 15 A). Esto sugiere que la vía de p38/MAPK no intervino ni en la migración activada por el daño mecánico, ni en la promoción de la migración por parte de C1P. El análisis cuantitativo, demostró que el pre-tratamiento con SB203580 5 μ M no afectó la migración glial en los cultivos controles ni redujo el estímulo de C1P sobre dicha migración (Fig.15 B). Esto nos permitió concluir que la vía de P38/MAPK no participa en la migración glial promovida por C1P ni en aquella activada por el daño mecánico.

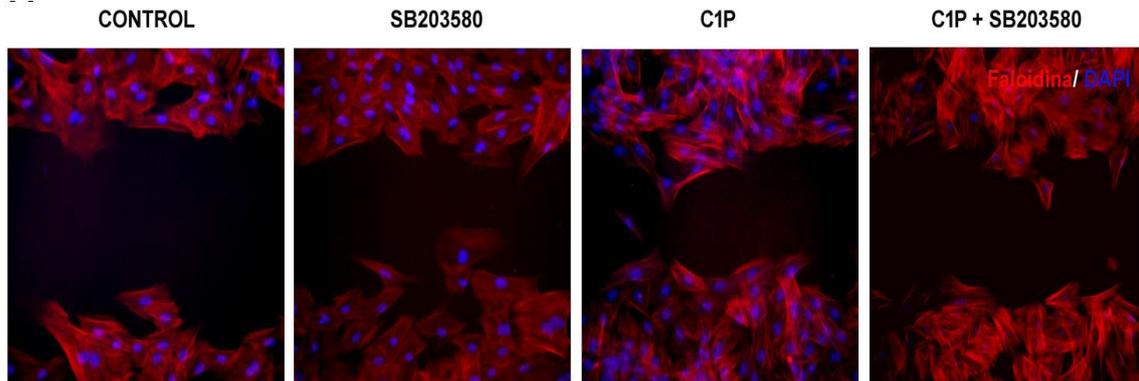
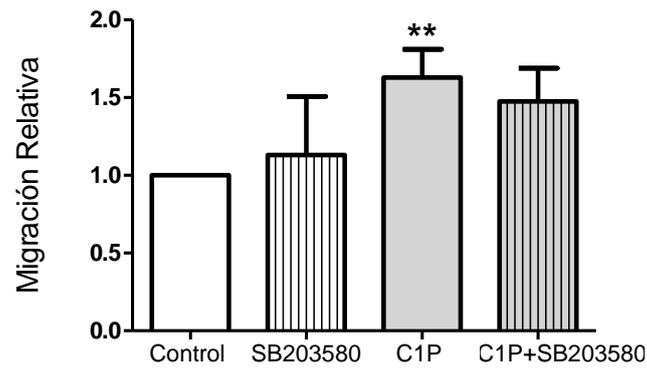
A**B**

Figura 15: La C1P no activa la vía de p38/MAPK para promover la migración de las CGM. (A) Fotomicrografías de cultivos de 15 d.i.v de CGM confluentes, con su citoesqueleto visualizado con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). Una vez realizada la herida, los cultivos fueron tratados durante 1 h con SB203580, y luego con C1P o DMSO. La ausencia de variaciones en el ancho de la herida sugiere que el tratamiento de los cultivos con SB203580 no alteró la migración de las CGM inducida por el daño mecánico (en controles), ni la promovida por la C1P. La barra de escala representa 20 μm . En (B) las barras representan el promedio del porcentaje de migración de cada condición relativa al control (medias \pm SD; n=3); **p<0.01; diferencia significativa con respecto al control.

La Ceramida-1-fosfato activó a la Fosfolipasa A2 citosólica para promover la migración glial

La Fosfolipasa A2 citosólica (cPLA₂) actúa como uno de los mediadores de las funciones de C1P en diferentes procesos como inflamación y proliferación. Debido a esto, nos preguntamos si la cPLA₂ participaría en la migración de las CGM inducida por C1P. Utilizando ATK, un inhibidor específico para la cPLA₂, bloqueamos la actividad de esta enzima, para así evaluar su papel en la inducción de la migración por parte de C1P. Una vez realizada la herida, los cultivos fueron tratados con ATK 5μM durante 1 h, tras lo cual se adicionó C1P o su vehículo a las diferentes condiciones. Los resultados así obtenidos nos sugieren que la cPLA₂ no intervino en la migración de las CGM estimulada por el daño mecánico. En cultivos de CGM en presencia de ATK, el ancho de la herida fue similar al de los controles, sugiriendo que ATK no inhibió la migración glial (Fig. 16 A). En contraste, el pre-tratamiento con ATK 5μM durante 1 h antes del agregado de C1P bloqueó el efecto de C1P sobre la migración de las CGM (Fig. 16 A). El ancho de la herida de los cultivos tratados con ATK y C1P fue mayor que en los tratados solamente con C1P, lo que sugeriría que la cPLA₂ sería activada por la C1P para estimular la migración glial. El análisis cuantitativo demostró que la inhibición de la actividad de la cPLA₂ no alteró la migración glial activada por el daño mecánico. Por el contrario, el tratamiento con el inhibidor de la cPLA₂ inhibió el aumento de la migración de las CGM promovido por C1P, que fue prácticamente igual a la observada en las CGM perteneciente a los controles (Fig. 16 B).

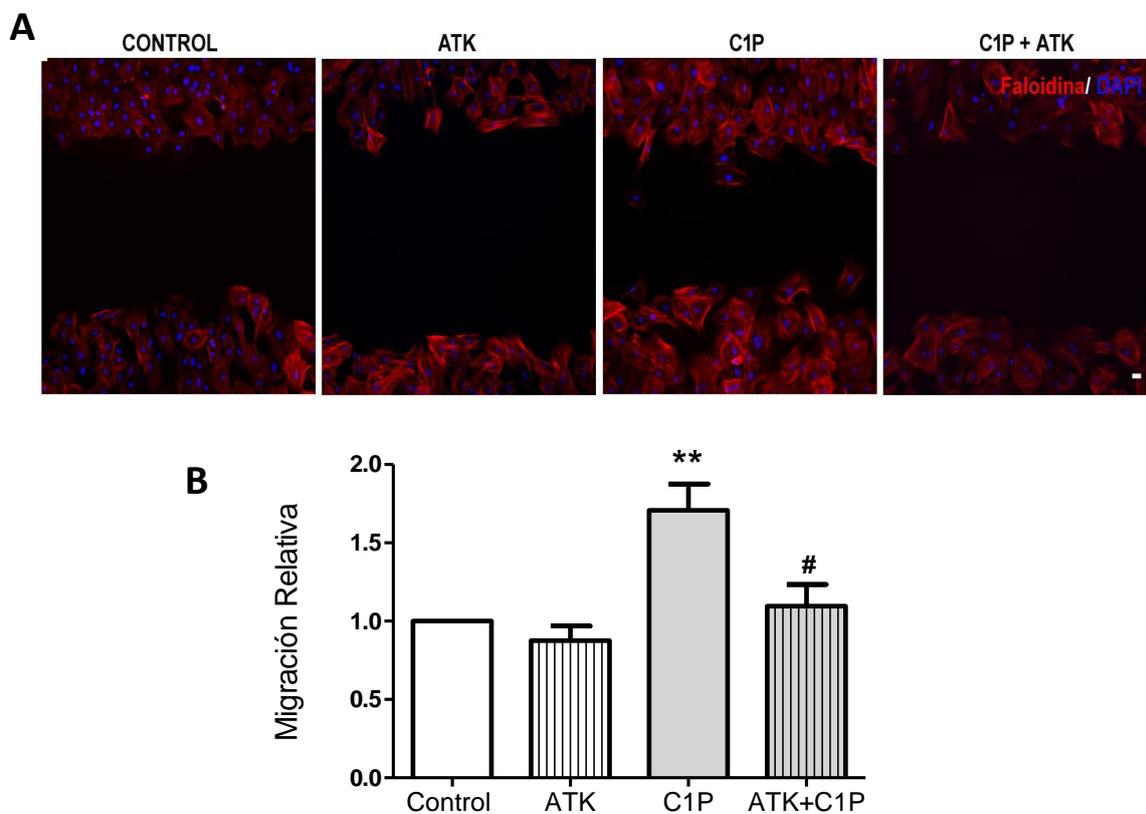


Figura 16: La C1P promueve la migración de las CGM a través de la activación de $cPLA_2$. (A) Fotomicrografías de cultivos de 15 d.i.v de CGM confluentes tratados con ATK inmediatamente después de realizarse las heridas, y luego de 1 h tratados con C1P. Se observan las CGM, cuyo citoesqueleto de actina se visualizó con faloidina (rojo) y sus núcleos con DAPI (azul). Las variaciones en el ancho de la herida sugieren que el tratamiento con ATK no alteró la migración de las CGM inducida por el daño mecánico (en controles), pero inhibió el aumento de la migración promovida por la C1P. La barra de escala representa 20 μ m. En (B) las barras representan el promedio del porcentaje de migración de cada condición relativa al control (medias \pm SD; n=3); ** $p < 0.01$; diferencia significativa con respecto al control. # $p < 0.05$ con respecto a C1P.

La síntesis endógena de C1P fue esencial para la migración de las CGM

Como observamos en los experimentos anteriores, el daño mecánico activó levemente la migración glial, a través de las vías de PI3K/Akt y en menor medida de JNK. Ante este hecho, nos preguntamos si la síntesis basal de la C1P podría estar involucrada en la migración glial. La enzima que genera la C1P es la Ceramida Quinasa (CerK), que en mamíferos es la única enzima que se conoce con esta función. Evaluamos entonces el posible rol de la síntesis endógena de la C1P en la migración de las CGM a través de la utilización del NVP231, un inhibidor específico de CerK.

En primer lugar, investigamos la expresión de CerK en las CGM, mediante retro-transcripción y separación de los fragmentos de cDNA en gel de agarosa. El ARN fue extraído de cultivos gliales de 15 d.i.v privados de suero durante 24 hs, para evaluar la expresión de CerK en las mismas condiciones en las cuales se realizaron los experimentos. Con este ensayo demostramos que las CGM expresaron la CerK de manera constitutiva (Fig. 17 A).

A continuación, inhibimos la síntesis endógena de C1P mediante la utilización de NVP231 y así evaluamos los efectos de la ausencia de C1P en la migración de las CGM frente al daño mecánico. Para ello, cultivos confluentes fueron privados de suero durante 24 hs., tras lo cual se realizó la herida e inmediatamente después los cultivos fueron tratados con NVP231 1 μ M. Este inhibidor es reversible, por tanto, no se removió el medio que lo contenía ni fue agregado nuevamente. Los resultados obtenidos sugieren que la inhibición de la síntesis de C1P con NVP231 1 μ M bloqueó completamente la migración activada por el daño mecánico. Es de notar que el ancho de la herida en cultivos con NVP231 fue notablemente mayor que en los controles después de 24 hs (Fig. 17 A). Esto sugiere que la inhibición de la síntesis de C1P bloqueó la migración glial que ocurría en ausencia de C1P exógena (Fig. 8). El análisis cuantitativo evidenció que el tratamiento de los cultivos gliales con NVP231 1 μ M inhibió aproximadamente el 85 % de la migración glial inducida por el daño mecánico (Fig. 17 C).

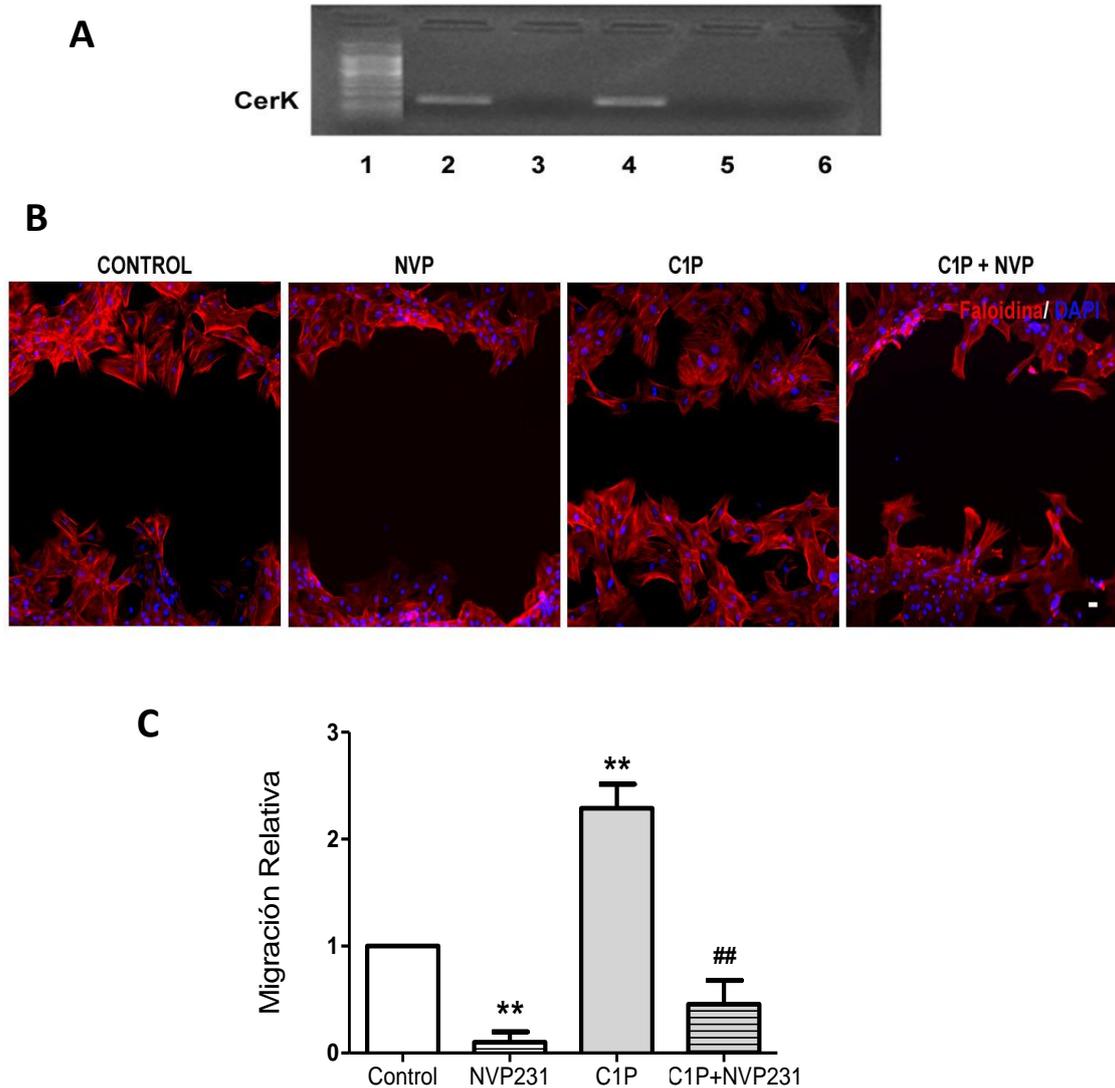


Figura 17: La síntesis endógena de C1P fue esencial para la migración de las CGM. (A) electroforesis en gel de agarosa del cDNA de CerK obtenido mediante RT-PCR a partir de cultivos de CGM. Las columnas indican: 1; marcador de peso molecular. 2: cDNA de CGM. 3; ARN de CGM (control negativo). 4; cDNA de cerebro de rata (control positivo). 5; ARN de cerebro de rata. 6, primers de CerK. Bandas específicas de CerK de 200 pb fueron observadas en las calles 2 y 4. (B) Fotomicrografías de cultivos de 15 d.i.v de CGM, cuyo citoesqueleto se visualizó con faloidina (rojo) y sus núcleos con DAPI (azul). Después de realizada la herida, los cultivos fueron tratados con NVP231 1 μ M por 1h, tras lo cual se agregó C1P. Las variaciones en el ancho de las heridas sugieren que el tratamiento de los cultivos con NVP231 redujo la migración de las CGM inducida por el daño mecánico y este efecto no pudo ser revertido por el agregado de C1P. La barra de escala representa 20 μ m. En (C) las barras representan el promedio de tres experimentos de los porcentajes de migración de cada condición relativos al control (medias \pm SD; n=3);**p<0.01; diferencia significativa con respecto al control, ## p<0.01; diferencia significativa con respecto C1P.

Frente al daño mecánico, las CGM reordenan su citoesqueleto de actina para formar filopodios y así avanzar sobre la herida. Este reordenamiento de las fibras de actina, así como la formación de filopodios fue visible en las CGM en los cultivos controles (Fig. 18 A, flechas). En contraste, cuando los cultivos fueron suplementados con NVP231 la inhibición de la síntesis endógena de C1P produjo una marcada retracción de los lamelipodios y filopodios, y de la reorganización del citoesqueleto, observándose una notable retracción y la acumulación de actina en los bordes celulares (Fig. 18 A, puntas de flechas). Estos datos sugieren que frente al estímulo mecánico las CGM sintetizaron C1P para promover la reorganización del citoesqueleto de actina para migrar, proceso que fue bloqueado completamente cuando los cultivos fueron tratados con NVP231.

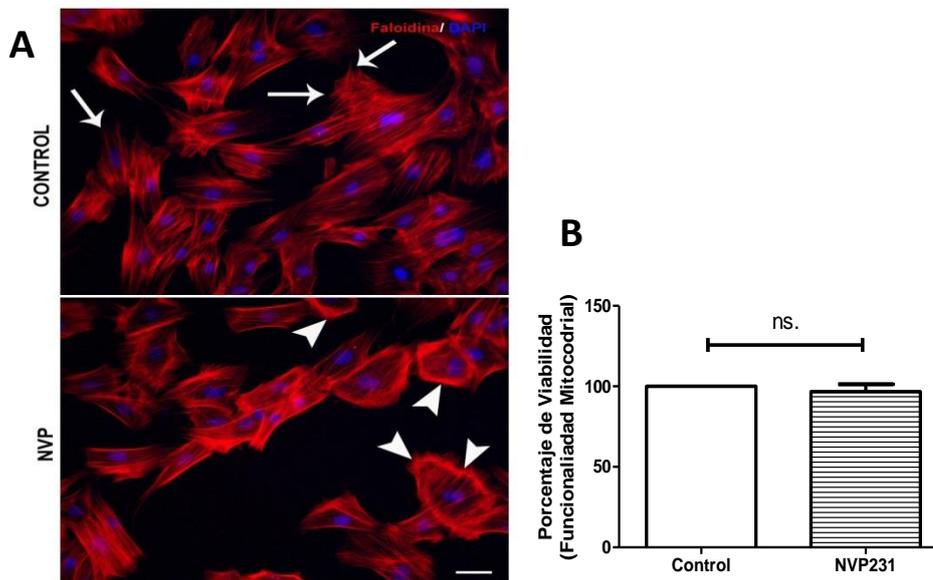


Figura 18: La inhibición de la síntesis de C1P no altera la viabilidad de las CGM. (A) Fotomicrografías de cultivos de 15 d.i.v de CGM confluentes, cuyo citoesqueleto se visualizó con faloidina (rojo) y sus núcleos con DAPI (azul). Se observan fibras de stress y filopodios en las CGM en condiciones control (flechas), mientras que en presencia de NVP231 las CGM se retraen, y se observa la ausencia de filopodios y la acumulación de filamentos de actina en los bordes celulares (cabezas de flechas). (B) El análisis de la funcionalidad mitocondrial como indicador de la viabilidad celular, por el ensayo de MTT, denota que el tratamiento del NVP231 no alteró la viabilidad de las CGM. Las barras representan el promedio del porcentaje de viabilidad relativa al control. ns= no significativo (medias \pm SD; n=3).

La pronunciada retracción celular es un cambio morfológico característico también del daño en las células que antecede a la muerte de las células. Para evaluar si la inhibición de la síntesis de C1P activaba la muerte celular analizamos la viabilidad

celular en cultivos tratados con NVP231. Mediante el ensayo de MTT, que utiliza la actividad mitocondrial como indicador de la viabilidad celular, demostramos que los cultivos controles y los tratados con NVP231 no mostraron diferencias significativas entre sí. Esto indica que el tratamiento con NVP231 no alteró la supervivencia de las CGM (Fig. 17 B). Este resultado nos sugiere que el reordenamiento del citoesqueleto de actina no estaría provocando la muerte celular, al menos durante las 24 hs. en que las células estuvieron en contacto con el NVP231.

La adición de C1P no rescató el bloqueo en la migración de las CGM provocado por la inhibición de la síntesis de C1P

Los resultados descriptos demostraron que el agregado exógeno de C1P estimuló la migración de las CGM y que la síntesis endógena de C1P fue necesaria para que las células gliales migren, ya sea como mediador intracelular o como molécula señal que es liberada al exterior celular y actúa mediante receptor. Pero entonces ¿Cómo actúa la C1P para promover la motilidad en las células? Dilucidar si la C1P endógena es clave en la migración de las CGM o si la C1P exógena puede por sí misma estimular la migración glial, nos llevó a diseñar el siguiente experimento. Cultivos confluentes fueron tratados durante 1 h con NVP231 1 μ M inmediatamente después de realizar la herida, y luego fueron suplementados con C1P o DMSO, para ser fijados luego de 24 hs. La inhibición de la síntesis endógena de C1P bloqueó el aumento de la migración glial promovido por el agregado de C1P. En este experimento, el agregado de C1P 10 μ M disminuyó el ancho de la herida marcadamente en comparación con cultivos controles. Por su parte, la inhibición de la síntesis de C1P redujo la migración celular activada por el daño mecánico, y el agregado de C1P 10 μ M fue incapaz de restaurar esta motilidad celular (Fig. 17 B). El análisis cuantitativo evidenció que el tratamiento con NVP231 1 μ M redujo la migración celular y que el agregado de C1P 10 μ M no pudo restaurar la motilidad celular, sino que ésta se mantuvo significativamente por debajo de la observada en las CGM en condiciones controles (Fig. 17 B). Estos resultados sugieren que la síntesis intracelular de C1P es esencial para la migración glial y que el agregado exógeno de C1P podría estimular dicha síntesis para así promover la migración de las CGM.

Los niveles de C1P no fueron alterados por el daño mecánico

Frente a distintos tipos de daños, como irradiación con rayos gamma (Kim et al. 2012), los niveles de C1P aumentan en diferentes tejidos. En base a esto, decidimos evaluar si las CGM alteraban los niveles de C1P frente al daño mecánico inducido por la herida. Para ello los cultivos gliales fueron incubados durante 2 hs con un análogo de la ceramida (Cer), la NBD-Cer 1 μ M, una Cer fluorescente altamente metabolizable, tras lo cual se realizó la herida y se incubó por dos hs más. Esta incubación nos permitió medir la síntesis de C1P, ya que las células usan esta NBD-Cer como sustrato para generar diferentes metabolitos, entre los que se encuentra la C1P. Una vez finalizada la incubación, se extrajeron los lípidos y se separaron por cromatografía en capa fina. Este estudio demostró que el daño mecánico no modificó los niveles de C1P comparados con los observados en los cultivos controles, al menos en las condiciones bajo las cuales se realizaron los experimentos (Fig. 19 A). Un análisis cuantitativo de las intensidades de banda de los diferentes esfingolípidos reveló que los niveles de NBD-C1P sintetizados por las células gliales antes y después del daño mecánico no presentaron diferencias significativas entre sí (Fig. 19 B). Tampoco se detectaron diferencias en los niveles de NBD-esfingomielina (NBD-SM) ni en los de NBD-glucosilceramida (NBD-GlcCer), que fueron sintetizadas también por las CGM en cultivos con y sin herida. Estos resultados sugieren que al menos bajo las condiciones experimentales dadas, no hubo un aumento significativo en los niveles de C1P sintetizados por las CGM frente al daño mecánico, aunque no nos permite descartar aumentos locales de C1P en las células situadas junto a la herida.

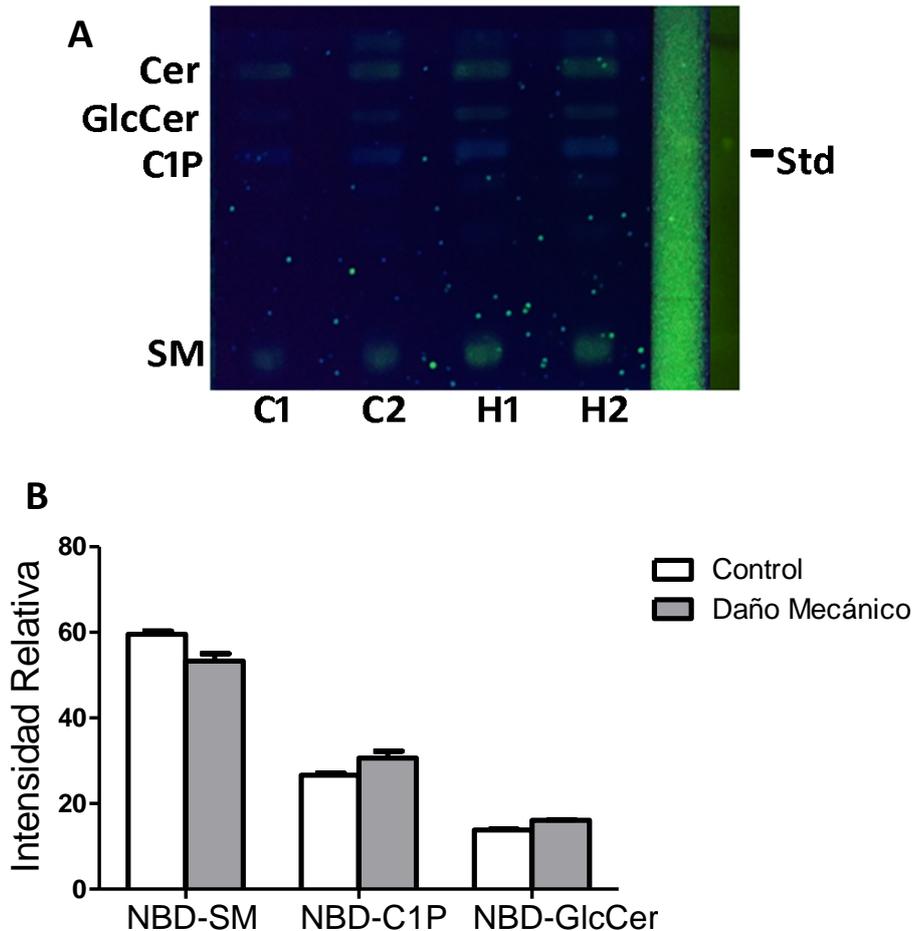


Figura 19: Los niveles de C1P no fueron alterados por el daño mecánico provocado por la herida. (A) Separación de los metabolitos de NBD-ceramida (NBD-Cer) mediante cromatografía en capa fina. Cultivos gliales de 15 d.i.v fueron incubados durante 2 hs con NBD-Cer. Posteriormente se realizó la herida (estimulación por daño mecánico) a una parte de los cultivos, mientras que a la otra (control) no se le realizó, y se los incubó por dos hs más. Los lípidos de la fase orgánica de las distintas muestras, se separaron por cromatografía en capa fina. SM, esfingomielina; GlcCer, glucosil ceramida, Std, estándar. En (B) las barras representan las intensidades relativas de las bandas correspondientes a los diferentes metabolitos de NBD-Cer (medias \pm SD; n=3).

El agregado conjunto de C1P y S1P no tuvo efecto aditivo sobre la migración glial

Como mencionamos en la introducción, los esfingolípidos bioactivos están involucrados en diversas funciones biológicas y su acción está íntimamente relacionada con sus tasas de síntesis y degradación, en el marco de un metabolismo complejo y altamente interconectado. La S1P, otro esfingolípidio bioactivo, además de estar

relacionada metabólicamente con C1P, estimula la migración de las CGM (Simón et al, 2015). Para profundizar en la comprensión de los mecanismos de acción de la C1P y determinar si ambos esfingolípidos tienen un efecto sinérgico o aditivo en la migración de CGM, evaluamos su interacción con la S1P. Para ello, luego de 24 hs en ausencia de suero e inmediatamente después de realizar la herida, los cultivos fueron tratados con C1P 10 μ M, S1P 5 μ M, C1P 10 μ + S1P 5 μ M o sus vehículos. El análisis del efecto de estos tratamientos demuestra que tanto la C1P como la S1P promovieron la migración de las CGM cuando se agregaron individualmente, reduciendo el área de la herida, pero su agregado conjunto no tuvo un efecto aditivo. Es decir, los tratamientos con C1P, S1P o la adición conjunta de ambos, redujeron el área de la herida en comparación al control, pero entre ellos no hubo variación en cuanto al ancho de las heridas (Fig. 20 A).

El análisis cuantitativo de la variación en el área de las heridas demostró que la magnitud de la migración promovida por S1P y C1P agregadas individualmente, no mostró diferencias significativas con la migración promovida por los dos esfingolípidos agregados juntos (Fig 20 B). Este análisis también demuestra que la C1P y la S1P estimularon la migración en la misma magnitud. Estos resultados sugieren que las vías por las cuales ambos esfingolípidos actúan son las mismas o están interrelacionadas, con un efector común río abajo.

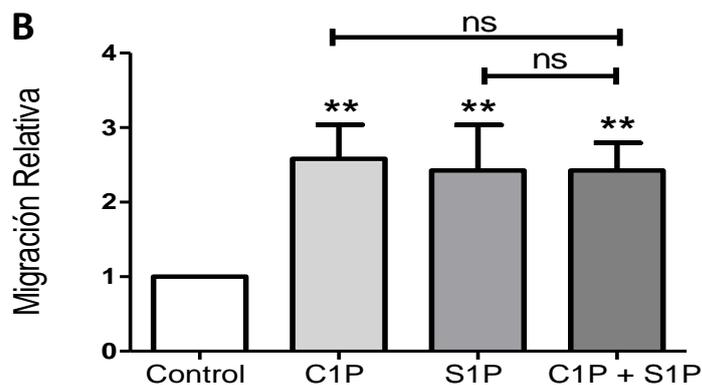
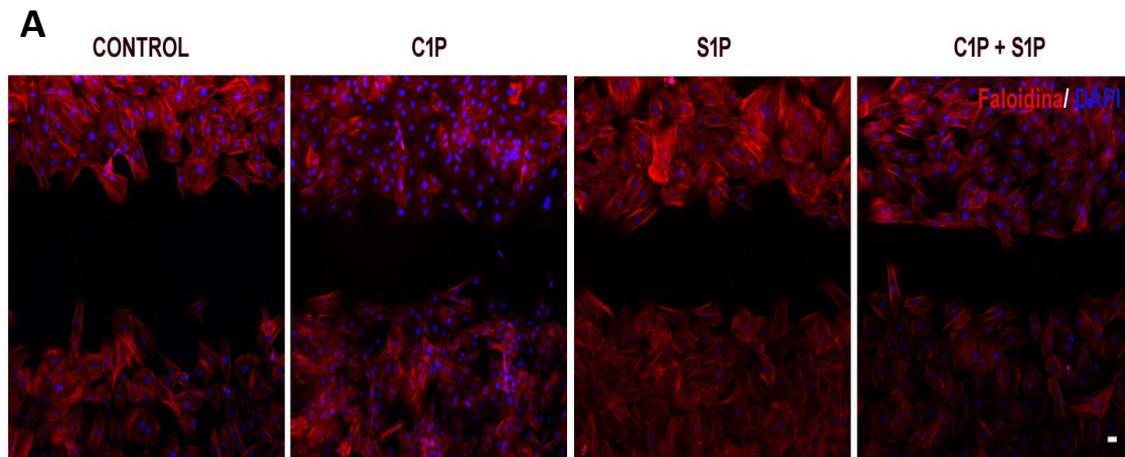


Figura 20: La adición combinada de C1P y S1P no tuvo un efecto aditivo sobre la migración glial. (A) Fotomicrografías de cultivos de 15 d.i.v de CGM confluentes tratados con C1P, S1P, C1P + S1P o con sus vehículos inmediatamente después de realizarse las heridas. Luego de 24 horas los cultivos fueron fijados y fotografiados. El citoesqueleto de actina de las CGM se marcó con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). Es de notar que si bien el agregado individual de C1P o S1P redujo el tamaño de la herida, esta variación fue la misma ante la adición conjunta de C1P + S1P. La barra de escala representa 20 μm (B). En (B) las barras representan el promedio del porcentaje de migración de cada condición relativa al control (medias \pm SD; $n=3$); ** $p<0.01$; diferencia significativa con respecto al control. ns; no significativo.

Caracterización de células del epitelio pigmentario de la retina de la Línea ARPE-19

Nuestros resultados evidencian que tanto la C1P agregada exógenamente como la sintetizada en forma endógena promovieron la migración de las CGM. Dado que las

células pueden liberar C1P a su entorno, con acciones autócrinas y parácrinas (Kim et al. 2012), nos preguntamos si la C1P podría ser un regulador general de la migración en la retina, impactando sobre otros tipos celulares y promoviendo su migración. Al igual que las CGM, las células del epitelio pigmentado de la retina (EPR) son claves en el establecimiento y desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas de este tejido. En particular, alteraciones en su capacidad de migrar y proliferar contribuyen a las disfunciones observadas en las patologías retinoproliferativas. Para indagar si C1P regula la migración de estas células, utilizamos una línea de células epiteliales de la retina humana, ARPE-19.

En primer lugar, caracterizamos a estas células epiteliales de la retina mediante inmuno-marcación. La proteína de unión al retinaldehído celular (CRALBP) y la proteína de 65ka específica del EPR, RPE65, están involucradas en la regeneración de 11-cis retinol, función específica de las células del EPR. Mediante la detección con anticuerpos anti-CRALBP y anti-RPE65 demostramos que las células de la línea ARPE-19 expresan CRALBP y RPE65 (Fig. 21). Corroboramos así, que las células utilizadas en esta parte del trabajo expresan marcadores característicos de células del epitelio pigmentario de la retina.

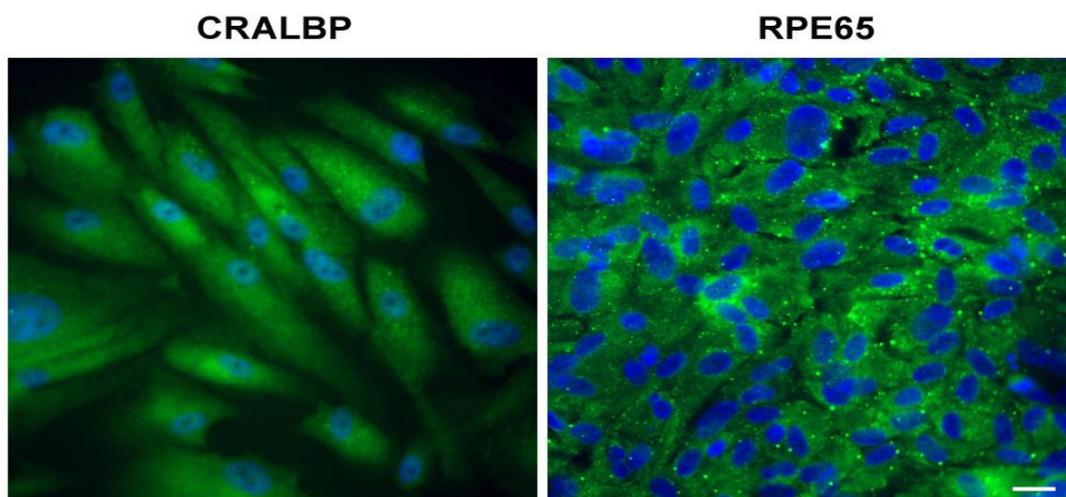


Figura 21: *Caracterización de células de la línea de epitelio pigmentario de la retina ARPE-19. Fotomicrografías de fluorescencia de cultivos confluentes de la línea celular humana ARPE-19 marcadas con CRALBP (verde) y RPE65 (verde). Los núcleos fueron teñidos con DAPI (azul). La barra de escala representa 20 μ m.*

La C1P promovió la migración de las células del epitelio pigmentario de la retina

A continuación, evaluamos el efecto del agregado de C1P sobre la migración de estas células. Para ello, cultivos confluentes de células de ARPE-19 (5 días posteriores al repique) fueron privados de suero durante 24 hs. Posteriormente se realizó la herida e inmediatamente se trató a los cultivos con C1P 10 μ M o su vehículo (DMSO). El tratamiento de los cultivos epiteliales con C1P redujo considerablemente el área de la herida con respecto al control, debido a que promovió el movimiento celular hacia el área libre de células, reduciéndola (Fig. 22).

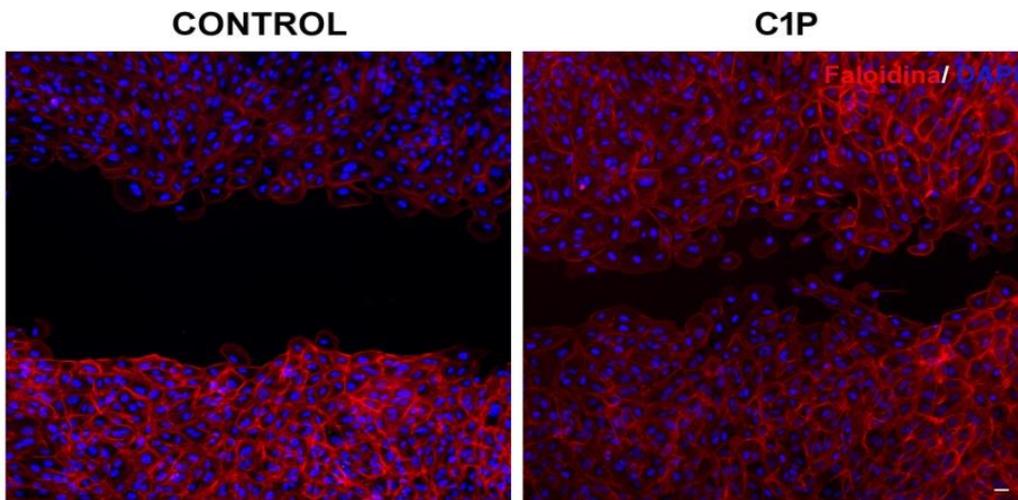


Figura 22: *La C1P promueve la migración de las células del EPR. Fotomicrografías de cultivos confluentes de la línea ARPE-19 tratados con C1P o su vehículo inmediatamente después de realizarse las heridas y fijados después de 24 hs. Las células muestran el citoesqueleto de actina marcado con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). La barra de escala representa 20 μ m.*

La línea celular ARPE19 tiene una alta tasa de proliferación, que permite que las células lleguen a confluencia a los 3 a 5 días después del repique. Por tanto, para ver si el cierre de la herida fue promovido por la migración, proliferación o por la combinación de ambos procesos, realizamos experimentos donde se inhibió la proliferación utilizando hidroxurea (HU), un inhibidor de la división celular. Para ello, cultivos confluentes de la línea ARPE19 fueron privados de suero durante 24 hs, tras lo cual se los trató durante 1 h con HU 100 μ M. Una vez transcurrido este tiempo, se

realizó la herida e inmediatamente se trató a los cultivos con C1P o su vehículo. En forma simultánea se evaluó el efecto de C1P sobre la migración en cultivos que no fueron previamente tratados con HU.

El análisis cuantitativo demostró que el pre-tratamiento de los cultivos epiteliales con HU no alteró la magnitud de la migración activada por el daño mecánico que se observa en los controles, ya que su migración fue la misma en presencia o ausencia de HU (Fig. 23). Por otro lado, el pre-tratamiento con HU disminuyó en forma significativa, pero escasamente el efecto promotor de la migración de las células epiteliales inducido por la C1P (Fig. 23 B). Estos resultados sugieren que la migración de las células epiteliales fue el principal factor que contribuyó al cierre de la herida observado en ausencia de C1P, mientras que una mayor proliferación contribuyó levemente al aumento del cierre de la herida promovido por C1P.

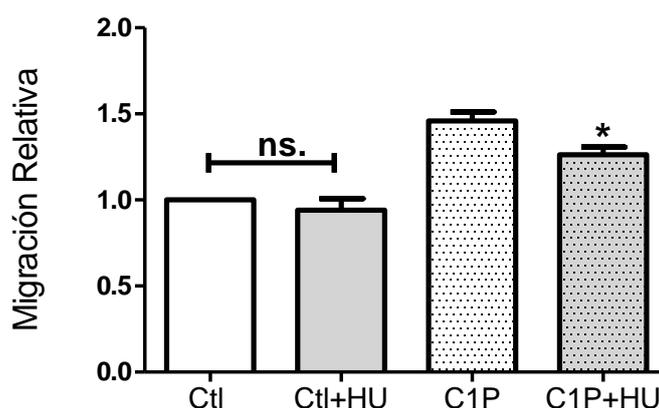


Figura 23: Evaluación de la contribución de la proliferación en el cierre de la herida en ARPE-19. Las barras representan el promedio del porcentaje de migración de cada condición relativa al control (medias \pm SD; n=3); ns.= no significativo. * $p < 0.05$ con respecto a C1P. Aquí podemos observar una pequeña contribución de la migración en el cierre de la herida promovida por C1P en cultivos de células ARPE-19.

El análisis cuantitativo de las áreas de las heridas de cultivos pre-incubados con hidroxurea demostró que el agregado de C1P 10 μ M aumentó significativamente la migración de las células del EPR con respecto a los controles (Fig. 24). Los porcentajes de migración en los cultivos tratados con C1P fueron de 56 ± 4 % mientras que los porcentajes de los cultivos controles fueron de $39,6 \pm 3$ %, evidenciando un aumento de la migración promovido por C1P.

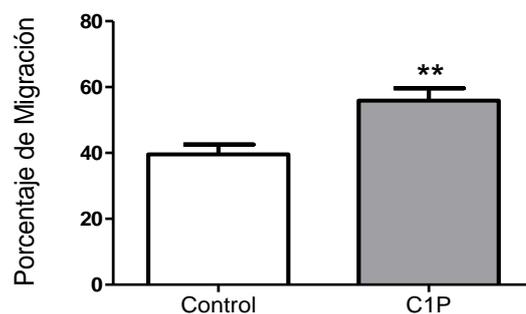


Figura 24: Aumento del porcentaje de migración de las células del EPR estimulada por C1P 10 μ M. Las barras indican el promedio de tres experimentos de los porcentajes de migración de C1P y de su respectivo control (medias \pm SD);** p <0.01; diferencia significativa con respecto al control.

La síntesis endógena de C1P fue necesaria para la migración de las células del EPR

A continuación, evaluamos si la síntesis endógena de C1P promovía la migración de las células epiteliales frente al daño mecánico. Para ello, los cultivos fueron privados de suero durante 24 hs, tras lo cual se realizó la herida e inmediatamente después fueron tratados con NVP231 1 μ M. La inhibición de la síntesis de C1P con NVP231 disminuyó la migración activada por el daño mecánico presente en los controles. Es de notar que el ancho de la herida en cultivos con NVP231 fue mayor que en los controles (Fig. 25 A). Mientras que en los cultivos controles las células del EPR extendieron sus lamelipodios sobre la herida (Fig. 25 A, flechas), la formación de lamelipodios fue totalmente inhibida en presencia de NVP231. Estos resultados indican que la inhibición de la síntesis de C1P disminuyó la migración de las células del EPR, y por tanto sugieren que dicha síntesis es necesaria para la motilidad celular. El análisis cuantitativo demostró que el tratamiento de los cultivos epiteliales con NVP231 1 μ M redujo a la mitad la migración inducida por el daño mecánico (Fig 25 B). A fin de descartar una menor motilidad celular debida a una reducción en la viabilidad, evaluamos dicho parámetro. Mediante el ensayo de MTT demostramos que el tratamiento con NVP231 no alteró la viabilidad de las células del EPR (Fig.25 C).

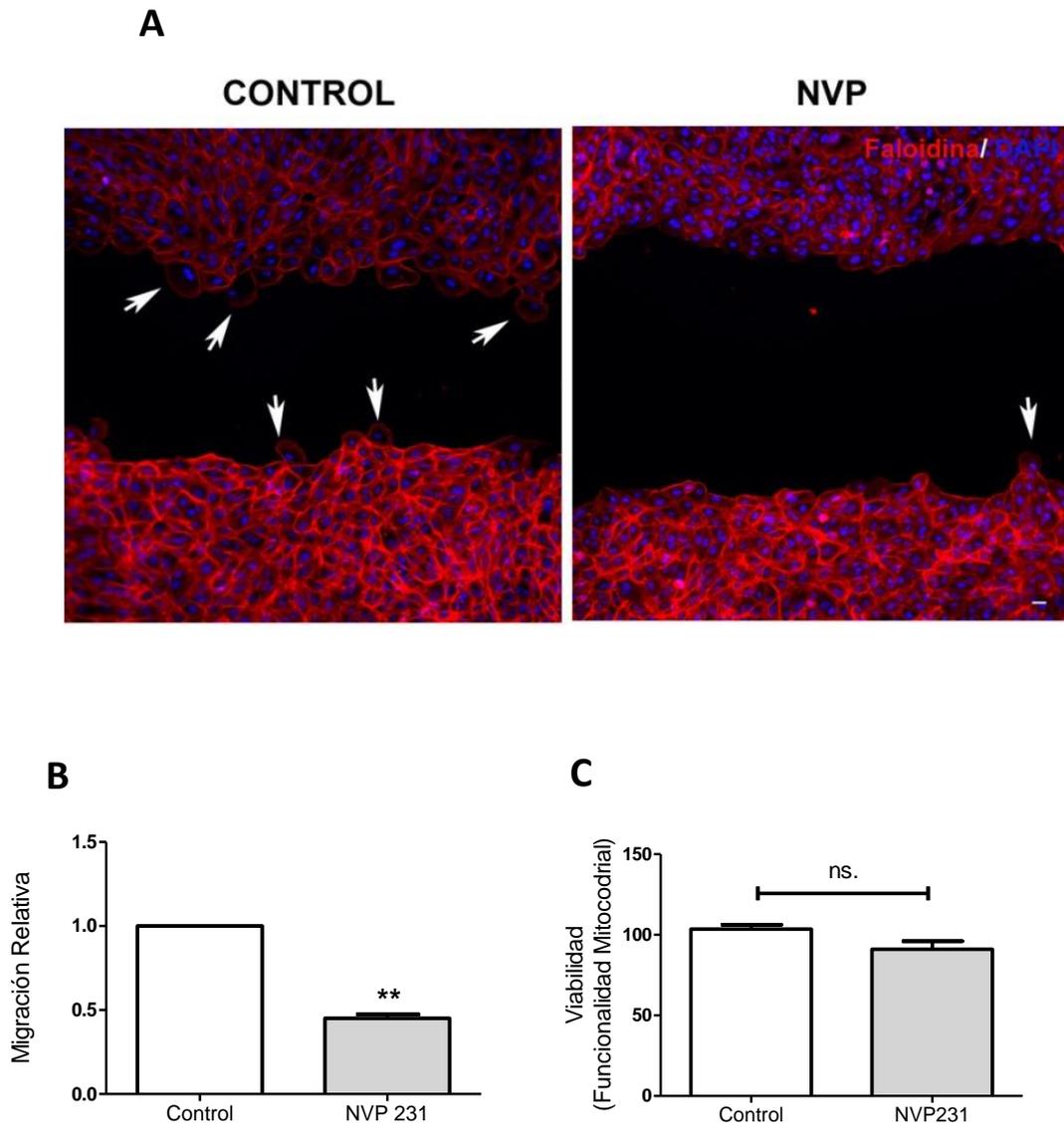


Figura 26: La síntesis de CIP fue necesaria para la migración de las células del EPR. (A) Fotomicrografías de cultivos confluentes de la línea ARPE-19 tratados con NVP231 y su vehículo, agregados inmediatamente después de realizada la herida, e incubados durante 24 hs. Las células ARPE-19 fueron marcadas con faloidina (rojo) para visualizar el citoesqueleto de actina y sus núcleos con DAPI (azul). La barra de escala representa 20 μm (B). En (B) las barras representan el promedio del porcentaje de migración de cada condición relativa al control. (C) Las barras representan el promedio del porcentaje de viabilidad relativa al control, determinado por el ensayo de MTT. El análisis de la funcionalidad mitocondrial como indicador de la viabilidad celular denotó que el tratamiento del NVP231 no alteró la viabilidad de las células del EPR. En los análisis cuantitativos (B y C) se grafican (medias \pm SD; $n=3$), ** $p<0.01$; diferencia significativa con respecto al control. ns.= no significativo

La adición de C1P no revirtió el efecto de la inhibición de la síntesis de C1P sobre la migración de las células del EPR

La migración de las células epiteliales se redujo cuando la síntesis endógena de C1P fue inhibida. Esto sugiere que la síntesis endógena de C1P fue necesaria para la migración de las células del EPR, ya sea como mediador intracelular o como molécula señal que es liberada al exterior celular y actúa mediante un receptor de membrana. Evaluamos si el agregado exógeno de C1P podría revertir los efectos de la inhibición de la síntesis de C1P en la migración de las células epiteliales. Para ello, luego de realizar la herida, los cultivos fueron tratados durante 1 h con NVP231 1 μ M, tras lo cual se agregó C1P 10 μ M. La inhibición de la síntesis de C1P redujo notablemente la migración celular. El ancho de las heridas de cultivos tratados con C1P 10 μ M fue mucho menor que en los tratados con NVP231 antes de adicionar la C1P. Esto evidenció que el agregado de C1P 10 μ M promovió la migración epitelial, pero en cultivos pre-tratados con NVP231, la adición de C1P 10 μ M no restauró la motilidad celular (Fig.26 A).

El análisis cuantitativo evidenció que el tratamiento con NVP231 1 μ M redujo a la mitad la migración celular y que el agregado de C1P 10 μ M no restauró la motilidad celular inducida por el daño mecánico (Fig.26 B). Este resultado sugiere que la actividad de CerK y la síntesis endógena de C1P fueron necesarias para la activación de la migración de las células del EPR, y que la estimulación inducida por el agregado exógeno de C1P también requeriría de dicha síntesis.

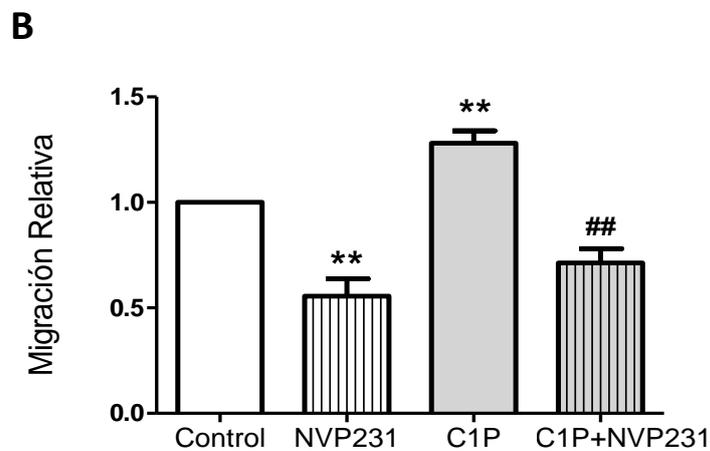
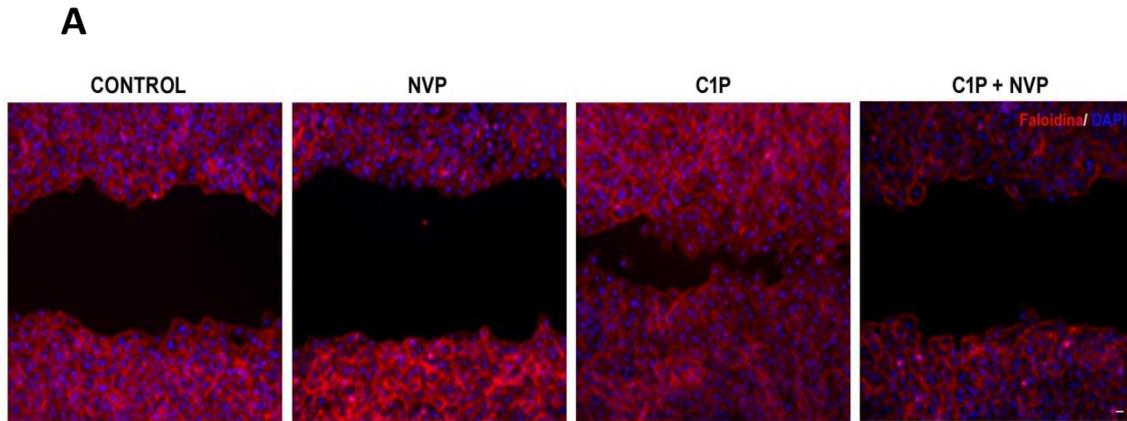


Figura 26: El agregado de C1P no restauró la motilidad celular reducida por la inhibición de la síntesis de C1P. (A) Fotomicrografías de cultivos de células del EPR confluentes con el citoesqueleto marcado con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). La barra de escala representa 20 μm . Después de realizada la herida, los cultivos fueron tratados con NVP231 1 μM por 1 h, tras lo cual se agregó C1P. La variación en el ancho de la herida (luego de 24hs) sugiere que el tratamiento de los cultivos con NVP231 redujo la migración de las células del EPR inducida por el daño mecánico, y que este efecto no fue restaurado por el agregado de C1P. (B) las barras representan el promedio de tres experimentos del porcentaje de migración de cada condición relativa al control (medias \pm SD; n=3); **p<0.01; diferencia significativa con respecto al control, ## p<0.01; diferencia significativa con respecto C1P.

La adición de S1P no revirtió el efecto de la inhibición de la síntesis de C1P sobre la motilidad de las células del EPR

Como mencionamos previamente, la S1P promueve la motilidad de las CGM, y datos recientes de nuestro laboratorio demuestran que S1P también promueve la migración de las células del EPR (Simón et al. 2018). Sabiendo que el agregado de S1P 5 μ M promueve la migración celular, es de gran interés evaluar si la S1P podría promover la migración de las células epiteliales pese a estar inhibida la síntesis de C1P, o si su mecanismo de acción estaría vinculado a esta síntesis. Para ello, luego de realizada la herida, los cultivos epiteliales fueron tratados con NVP231 1 μ M por 1 h antes de agregar la S1P. El tratamiento de los cultivos con S1P estimuló la migración epitelial en ausencia de NVP231 1 μ M. Al comparar el ancho de las heridas, se observó que la S1P promovió la migración celular disminuyendo el ancho de la misma (Fig. 27 A). Por el contrario, cuando los cultivos fueron tratados previamente con NVP231 1 μ M, el agregado de S1P no restauró la motilidad celular. Es de notar, que tanto en los cultivos tratados con NVP231 como aquellos tratados con NVP231 y S1P la migración se redujo en aproximadamente 60 %. Estos datos sugieren que la síntesis endógena de C1P fue clave en el proceso de migración de células del EPR, y que el estímulo de la migración epitelial generado por el agregado exógeno tanto de C1P como de S1P dependieron de esta síntesis.

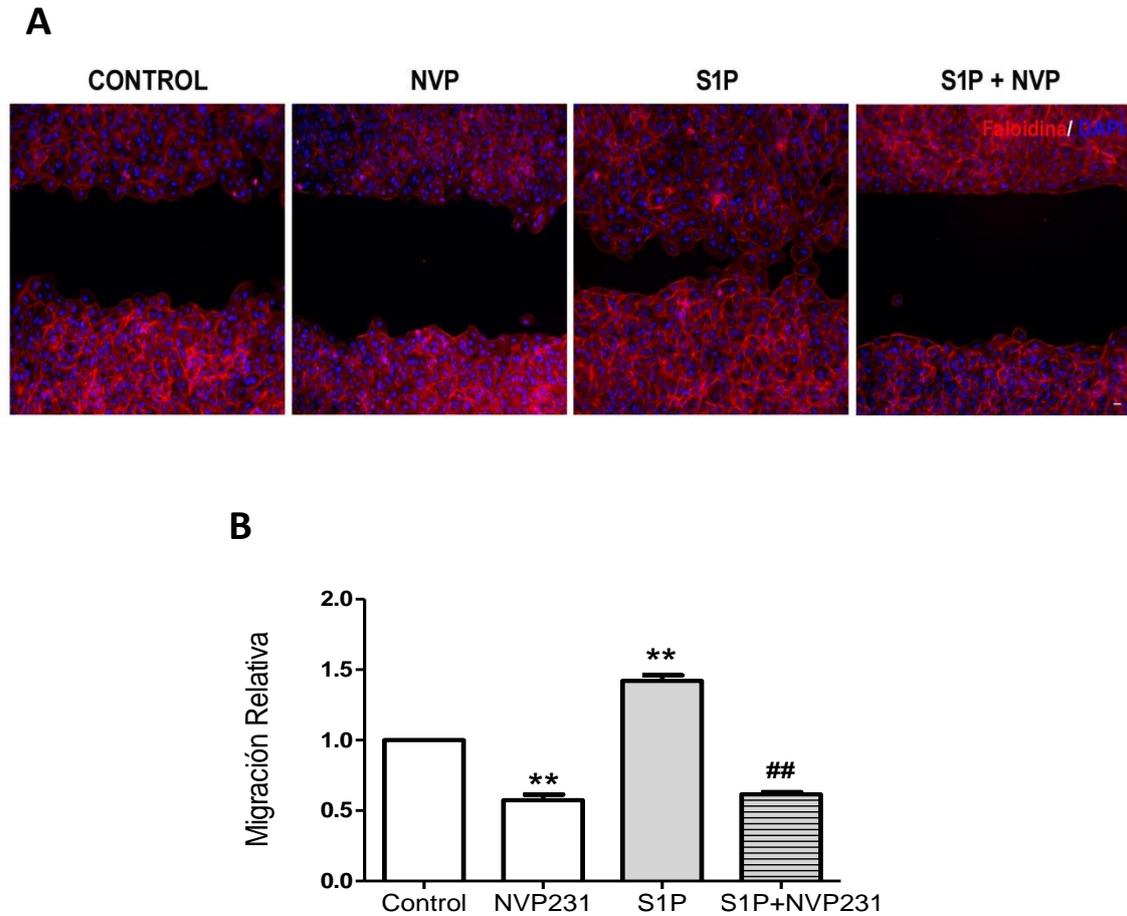


Figura 27: El agregado de S1P no restauró la motilidad celular reducida por la inhibición de la síntesis de C1P. (A) Fotomicrografías de cultivos de células del EPR confluentes, con el citoesqueleto marcado con faloidina (rojo) y los núcleos con DAPI (azul). La barra de escala representa 20 μm . Después de realizada la herida, los cultivos fueron tratados con NVP231 1 μM por 1 h, y luego con S1P por 24 hs. La variación en el ancho de la herida sugiere que el tratamiento de los cultivos con NVP231 redujo la migración de las células del EPR, y que el agregado de S1P no revirtió este efecto. (B) las barras representan el promedio de tres experimentos del porcentaje de migración de cada condición relativa al control (medias \pm SD; n=3); ** $p < 0.01$; diferencia significativa con respecto al control, ## $p < 0.01$; diferencia significativa con respecto S1P.

La C1P no alteró los niveles de proliferación de las CGM

Numerosos tejidos del sistema nerviosos activan el llamado mecanismo de reparación de tejidos frente a una gran diversidad de daños. Para concretar esta reparación, las células diferenciadas adquieren la capacidad de migrar y proliferar luego de de-diferenciarse. En este trabajo hemos analizado cómo la C1P regula el proceso de

migración. Es de interés establecer si la proliferación, otro proceso clave en la reparación de tejidos, es estimulada por la C1P. Aunque en la retina adulta la proliferación no es frecuente, numerosos trabajos reportan que existe una exacerbada proliferación en este tejido en diferentes patologías proliferativas. Para tener una visión integral de los efectos de C1P en la retina, en esta sección de la Tesis evaluamos el papel de C1P en la proliferación de las CGM y las células del EPR.

En primer lugar, investigamos el efecto de C1P en la proliferación de las CGM. Los ensayos de migración fueron realizados en cultivos confluentes con baja tasa de proliferación, y como ya indicáramos, la proliferación de las CGM en estas condiciones fue baja, y no observamos un aumento por efecto de la C1P. Dado que la C1P promueve la proliferación en distintos tipos celulares (Gómez-Muñoz 2018), decidimos evaluar la proliferación en cultivos poco confluentes, donde la proliferación es elevada. Por tanto, cuando el cultivo alcanzó el 50% de confluencia analizamos la incorporación del nucleótido BrdU por parte de las CGM. Para ello los cultivos gliales fueron privados de suero por 24 hs, tras lo cual se adicionó C1P 10 μ M y el nucleótido BrdU, y se analizó su incorporación después de 24 hs. En cultivos controles, la proliferación fue de $24,2 \pm 3$ % mientras que en los cultivo tratados con C1P la proliferación fue de $27,7 \pm 1,5$ % aproximadamente, un cambio no significativo. Estos resultados demuestran que el agregado de C1P 10 μ M no alteró la proliferación intrínseca de los cultivos, al menos en las condiciones evaluadas (Fig. 28).

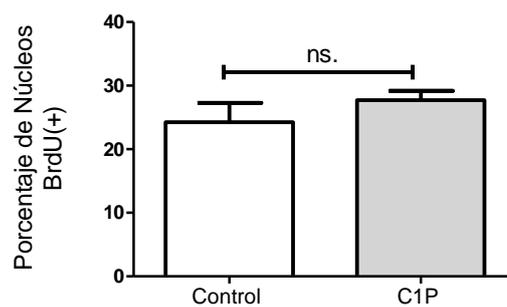


Figura 28: La C1P no alteró la tasa de proliferación de las CGM. Evaluación de la incorporación de BrdU en las CGM en cultivos controles y tratadas con C1P. Las barras representan el promedio de los porcentajes de proliferación (núcleos BrdU+/núcleos totales) de tres experimentos (media \pm SD; n=3); ns., no significativo.

La C1P no alteró la tasa de proliferación de las células del EPR

De modo similar evaluamos si la C1P estaba involucrada en la proliferación de las células del EPR. Debido a la alta tasa de proliferación que tienen las células de la línea ARPE-19, los cultivos se incubaron en ausencia de suero por 24 hs, sólo dos hs después del repique. Aquí, las células presentaban el 20% de confluencia y la tasa de proliferación suele ser relativamente más alta que en cultivos confluentes. Posteriormente los cultivos fueron tratados con C1P 10 μ M o su vehículo, al mismo tiempo que se adicionó a ambas condiciones el nucleótido BrdU, con el que se incubaron durante 24 hs. El análisis de la incorporación de BrdU por parte de las células del EPR, demostró que en cultivos controles la proliferación fue del 68 \pm 4% y en los cultivos tratados con C1P 10 μ M la proliferación fue de 65 \pm 3% (Fig. 29). Esto implica que la C1P no alteró los niveles de proliferación presente en los controles, al menos en las condiciones estudiadas.

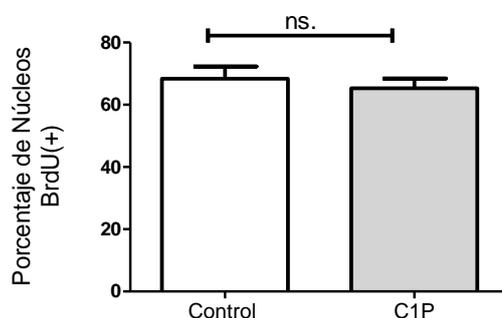


Figura 29: *La C1P no alteró la tasa de proliferación de las células del EPR.* Evaluación de la incorporación de BrdU por parte de las células del epitelio pigmentario de retina tratadas con C1P o su vehículo. Las barras representan el promedio de los porcentajes de proliferación (núcleos BrdU+/núcleos totales) de tres experimentos (media \pm SD; n=3.); ns., no significativo.

La inhibición de la síntesis de C1P disminuyó la proliferación en las CGM

Ante la elevada proliferación observada en condiciones controles, tanto en CGM como en cultivos de ARPE-19, nos preguntamos si la proliferación basal era regulada por la síntesis endógena de C1P. Para ello evaluamos si la inhibición de la C1P sintetizada intracelularmente disminuía la proliferación de las CGM. Los cultivos gliales con 50% de confluencia, fueron privados de suero durante 24 hs, tras lo cual se los trató con NVP231 1 μ M o DMSO. Al mismo tiempo se incorporó al medio el nucleótido BrdU y se incubó durante 24 hs. El tratamiento con NVP231 1 μ M redujo la proliferación de las CGM. En los cultivos controles, la proliferación de las CGM fue de $24,5 \pm 1,5\%$ mientras que en aquellos cultivos tratados con NVP231 1 μ M la proliferación fue del $10,2 \pm 3,13 \%$, una reducción de más del 50%. (Fig. 30). Estos datos sugieren que la síntesis endógena de C1P fue necesaria para la proliferación de las CGM, pero el agregado exógeno de C1P no tendría este efecto.

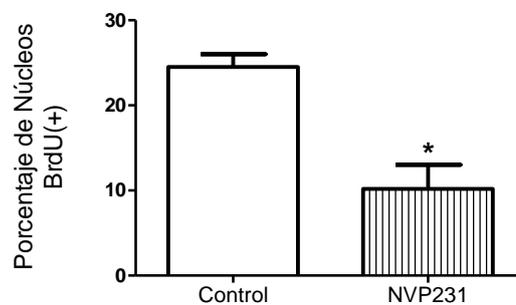


Figura 30: *La síntesis de C1P fue necesaria para la proliferación de las células gliales de la retina. Evaluación de la incorporación de BrdU por las CGM, tratadas con NVP231 o su vehículo. Las barras representan el promedio de los porcentajes de proliferación (núcleos BrdU+/núcleos totales) de tres experimentos (media \pm SD; n=3.); * $p < 0.05$ con respecto al control.*

La inhibición de la síntesis de C1P no alteró la tasa de proliferación de las células del EPR

Por último, evaluamos el rol de la síntesis endógena de C1P en la proliferación de las células del EPR. Para ello, los cultivos fueron privados de suero cuando alcanzaron el 20% de confluencia. Posteriormente se trató a los cultivos con NVP231 1 μ M o con su vehículo. Al mismo tiempo se agregó el nucleótido BrdU y se incubó durante 24 hs. La evaluación de la incorporación de BrdU por parte de las células demuestra que la proliferación en los controles fue de $76,37 \pm 5$ % mientras que en los cultivos tratados con NVP231 1 μ M la proliferación fue del 65 ± 12 %. Aunque notamos una disminución entre las condiciones evaluadas, la diferencia en la proliferación entre cultivos con y sin NVP231 no fue estadísticamente significativa (Fig. 31). En consecuencia, la inhibición de la síntesis de C1P no alteró los niveles de proliferación en estos cultivos.

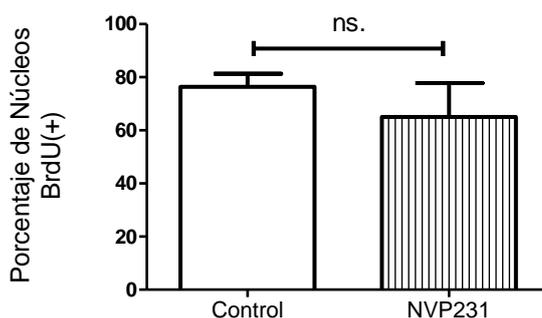


Figura 31: *La síntesis de C1P no alteró la tasa de proliferación de las células del EPR. Evaluación de la incorporación de BrdU por las células de epitelio pigmentario de la retina, tratadas con NVP231 o su vehículo. Las barras representan el promedio de los porcentajes de proliferación (núcleos BrdU+/núcleos totales) de tres experimentos (media \pm SD; n=3.); ns., no significativo.*

Discusión

Las CGM y las células del EPR son componentes claves en el progreso de las enfermedades neurodegenerativas de la retina. Ya sea frente a alteraciones fisiológicas como a daños de diferentes tipos, las CGM y el EPR comienzan alterando levemente sus funciones a fin de restablecer las condiciones normales o reparar los daños existentes. Cruzando una delgada línea, cuando el daño persiste los procesos así iniciados se vuelven contraproducentes y contribuyen al desarrollo de estas enfermedades. La pérdida de las funciones fisiológicas de las CGM y del EPR es una de las principales causas del establecimiento y desarrollo de las enfermedades neurodegenerativas de la retina. Si a esta pérdida de funciones sumamos una descontrolada migración y una excesiva proliferación se originan los casos más severos de estas patologías.

Debido a la relevancia de la proliferación y la migración de las CGM y del EPR en las patologías proliferativas de la retina, el estudio de las moléculas encargadas de regular la de-diferenciación, la migración y la proliferación de estas células se ha vuelto un tópico de gran importancia. En este trabajo de Tesis investigamos el posible rol de la C1P en la regulación de estos procesos. Nuestros hallazgos demuestran que la C1P es esencial para la motilidad de las CGM y las células del EPR. La adición de C1P aumentó la migración de las células gliales, y la inhibición de la síntesis de C1P la bloqueó. A su vez, la C1P exógena no pudo restaurar la motilidad de las CGM cuando se inhibió su síntesis endógena. Establecimos también que C1P requirió la activación de las vías PI3K, ERK / MAPK y JNK y de la cPLA₂ para promover la migración de las CGM. Estos resultados también demuestran que la C1P aumentó la migración de las células del EPR, que la inhibición de la síntesis de C1P disminuyó la motilidad epitelial y que esta síntesis fue esencial para que la C1P exógena promoviera la migración en estas células (Fig. 32).

Por otro lado, demostramos que la C1P exógena no promovió la proliferación en las CGM, mientras que su síntesis endógena fue necesaria para la proliferación de dichas células. Por su parte, ni la C1P exógena ni su síntesis endógena alteraron la proliferación de las células del EPR.

Regulación por C1P/CerK en la migración de las CGM

Las CGM migran ante distintos daños a la retina. En modelos de daño inducido por fotocoagulación con láser (Tackenberg 2009) y en el desprendimiento de retina (Asaria and Gregor 2002), las CGM se de-diferencian y su núcleo adquiere la capacidad de migrar hacia la zona dañada, donde proliferan (Lewis et al. 2010; Tackenberg et al. 2009b). Además, la hiperglucemia (Subirada et al. 2018), las inyecciones sub-retinianas del factor del crecimiento de fibroblastos b (bFGF) (Kimura et al. 1999), la hipoxia, la ruptura de la barrera hemato-retiniana y la inflamación crónica (Tosi et al. 2014) también se encuentran entre los daños que provocan una exacerbada proliferación y migración de las CGM.

Se han identificado diversos factores moleculares como responsables de esta migración. Ensayos utilizando la línea de células gliales de Müller MIOM1 demuestran que el factor de crecimiento fibroblástico 2 (FGF-2) (Romo et al. 2011), la α 2 macroglobulina (α -2M) mediante su receptor LRP1 (Barcelona et al. 2013), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Z.-X. Hu et al. 2014), el factor de crecimiento transformante- β (TGF- β) (Luo et al. 2016) y el factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1) mediante la activación de su receptor IGF-1R (Lorenz et al. 2015), promueven la migración de las CGM. El IGF-1, también promueve la migración de las CGM de la línea de células gliales rMC-1 (Pena et al. 2018).

La mayoría de estos reportes se centran en el análisis de moléculas proteicas, las cuales son degradadas en el medio extracelular. Por otra parte, la mayoría de esta información proviene de evaluaciones realizadas utilizando como sistema experimental líneas celulares con características gliales. Indagar en la participación en la migración de moléculas de otra naturaleza y la utilización de cultivos primarios de CGM resulta de gran interés para contribuir al entendimiento integral de la regulación de este proceso en las enfermedades neurodegenerativas y particularmente, en las patologías proliferativas de la retina.

Los esfingolípidos bioactivos C1P, S1P, Cer y Sph están involucrados en una gran cantidad de procesos biológicos como supervivencia, proliferación, angiogénesis, migración, e inflamación (Zhou and Blom 2015). Estos esfingolípidos cumplen un rol crucial en el control de la supervivencia y la apoptosis, ya que mediante la alteración en sus niveles relativos, determinan el destino celular, hipótesis conocida como “reóstato

esfingolípido” (Cuvillier et al. 1996; Hait and Maiti 2017). Además de la supervivencia, ha sido ampliamente reportado el papel de los esfingolípidos en los procesos inflamatorios (Pettus et al. 2004).

Nuestro grupo ha demostrado que la esfingosina-1-fosfato (S1P) induce la migración en CGM obtenidas a partir de retinas de rata, mediante la activación de su receptor S1PR3 (Simón et al. 2015). Este hallazgo destacó la relevancia de los esfingolípidos en el control de procesos que contribuyen a las retinopatías proliferativas y despertó el interés de indagar en el rol de otros esfingolípidos en dichos procesos. La C1P es conocida por promover el crecimiento, la proliferación, la migración y la inflamación de diferentes tipos celulares. Sin embargo, el conocimiento sobre sus funciones en la retina es muy escaso. En este trabajo, abordamos el estudio del rol de la C1P en la migración de las CGM y las células del EPR, evento que conduce al progreso de las enfermedades proliferativas de la retina. Avanzar en el conocimiento de la migración de ambos tipos celulares contribuiría a establecer los límites pasados los cuales las CGM y las células del EPR dejan de proporcionar protección y estabilidad para contribuir al desarrollo de estas enfermedades.

La C1P estimula la migración de muchos tipos celulares como macrófagos, mioblastos, preadipocitos, células progenitoras de endotelio y numerosos tipos de células cancerígenas (Arana et al., 2013; Presa et al., 2016; Gómez-Muñoz et al., 2016; 2018; Kim et al. 2013 y Rivera et al. 2015). En la retina, la C1P estimula el desarrollo y la supervivencia de fotorreceptores (Miranda et al. 2011) mientras que Wang y colaboradores sugieren que C1P está involucrada en la inflamación observada en la uveítis (Wang et al. 2018).

Para indagar en la participación de la C1P en procesos patológicos de la retina, evaluamos su efecto sobre la migración de las CGM. Para que una célula migre, las fibras de actina del citoesqueleto se organizan en estructuras llamadas filopodios (gruesas fibras dispuestas paralelamente entre sí) y lamelipodios (red en forma de lamela), prolongaciones de la membrana plasmática que protruyen del cuerpo celular hacia el lugar donde la célula debe migrar. Es decir, todos los mecanismos involucrados en la migración celular, culminan regulando directa o indirectamente la reorganización del citoesqueleto de actina (Mayor and Etienne-Manneville 2016). Nuestros resultados demuestran que el agregado exógeno de C1P aumentó la migración de las CGM. Mediante el ensayo de la herida, determinamos que los cultivos tratados con C1P

tuvieron un mayor porcentaje de cierre de la herida que los cultivos controles. El agregado de C1P promovió la reorganización de las fibras de actina en extensos filopodios y lamelipodios que avanzaron sobre la herida, e incluso se posicionaron sobre ella.

Debido a que la C1P promueve la proliferación, y que el estímulo por el daño mecánico podría activar este proceso, decidimos evaluar la proliferación durante los ensayos de migración de las GCM. La evaluación de la división celular mediante incorporación del nucleótido BrdU, demostró que la proliferación fue similar en los cultivos controles y en aquellos tratados con C1P. Además, no se encontraron núcleos BrdU positivos ni en los márgenes ni en el área libre de células de la herida de cultivos controles y tratados con C1P. Esto nos permite concluir que el cierre de la herida promovido por la C1P se originó en la migración de las CGM y no por la proliferación.

Las concentraciones de C1P de 5 a 30 μM evaluadas en nuestros experimentos aumentaron la migración de las CGM. Elegimos la concentración 10 μM debido que aumentó significativamente la migración con respecto a los controles. La elección de esta concentración está respaldada por tres argumentos diferentes: las concentraciones de C1P que promueven la migración en otros tipos celulares, la existencia de un receptor específico para C1P y los valores fisiológicos y patológicos de C1P en plasma. El primer hallazgo que estableció al estímulo de C1P en la motilidad celular demostró que la C1P 30 μM aumenta la migración en macrófagos de la línea RAW 264. En este trabajo se utilizaron vesículas obtenidas por sonicación de C1P en agua, lo que sugiere que la concentración efectiva a la que se expusieron las células podría ser inferior a 30 μM (Granado et al. 2009). Si bien se evidenció que C1P 100nM aumenta la migración de células endoteliales del cordón umbilical humano HUVECs (Kim et al. 2013), se ha demostrado que concentraciones de C1P entre 1 y 10 μM promueven la migración de células endoteliales de cultivo primario (Hankins et al. 2013; C. H. Kim et al. 2012), células de rhabdomyosarcoma (Schneider et al. 2013) y células de adenocarcinoma pancreático (Rivera et al. 2016). La concentración de C1P 10 μM está en concordancia con la existencia de un receptor específico para C1P, de baja afinidad asociado a la función promotora de la migración por parte de C1P. Si bien no ha sido aún aislado ni identificado, este receptor tiene una constante de disociación de 7,8 μM (Granado et al. 2009; Levi et al. 2010) y pertenece a la familia de receptores acoplados a

proteína G (GPCR), ya que la inhibición de estos receptores con la toxina Pertusis Ptx bloquea los efectos de la C1P en la migración (Granado et al. 2009).

Los valores de C1P en plasma de personas sanas en condiciones fisiológicas son de aproximadamente $0.5\mu\text{M}$ (Hammad et al. 2010). En plasma de ratones los niveles de C1P rondan los $0.02\mu\text{M}$, valores que pueden aumentar hasta $20\mu\text{M}$ (Mietla et al. 2013). En condiciones patológicas las concentraciones de C1P aumentan, como en la uveítis inducida por LPS (Wang et al. 2018), la irradiación con rayos γ al tejido hematopoyético (Kim et al. 2012) e hipoxia en miocardio (Kim et al. 2013). Estos hallazgos sugieren que podemos encontrar concentraciones relativamente altas de C1P en el entorno celular bajo diferentes condiciones, lo que da sustento fisiológico a la concentración utilizada en nuestros experimentos.

Basados en estos antecedentes que demuestran la liberación de C1P por parte de células levemente dañadas, nos preguntamos si los niveles de C1P aumentaban en las CGM frente al estímulo mecánico producido por la herida. Para ello, incubamos cultivos confluentes de CGM durante 2 hs con NBD-Cer, un precursor de C1P marcado fluorescentemente, para permitir su captación, y durante 2 hs más después de realizada la herida. El análisis posterior de los lípidos por TLC demostró que los niveles de NBD-Cer fueron los mismos en cultivos controles y en aquellos donde se realizó la herida, lo que sugeriría que la lesión provocada por la herida no aumentó la síntesis de C1P en las CGM. Sin embargo, no podemos descartar un aumento local en la síntesis de C1P, ya que el estímulo mecánico sobre la monocapa solo afecta a las células en los márgenes de la herida, que son pocas en relación a las células totales de las placas. Esto podría estar impidiendo visualizar un posible aumento en los niveles de C1P sintetizada por las células afectadas por el daño mecánico, que podría ser suficiente para activar la migración en dichas células.

A fin de profundizar sobre el efecto de C1P en la migración de las CGM, nos propusimos explorar las posibles vías involucradas en la estimulación de la migración de las CGM por parte de C1P. Nuestros resultados indican que la C1P estimuló la migración de las CGM a través de la activación de la vía de PI3K/Akt. El agregado de C1P $10\mu\text{M}$ promovió la migración de las CGM, efecto que fue reducido marcadamente cuando los cultivos fueron tratados con LY294002, un inhibidor específico de la vía de PI3K/Akt, antes del agregado de C1P. Es de notar que PI3K/Akt está involucrada en la migración de las CGM por sí misma, ya que al tratar los controles con LY294002, la

migración activada por el daño mecánico disminuyó. Los ensayos de WB concuerdan con estos resultados. La evaluación de los niveles de p-Akt, que denota la activación de la vía, demostró que los cultivos a los que se realizó la herida presentaron niveles bajos de p-Akt, lo que concuerda con la activación basal de la vía observada en los controles, mientras que los cultivos que después de realizada la herida fueron suplementados con C1P, aumentaron los niveles de p-Akt. Esto sugiere que, si bien la vía de PI3K/Akt está activada en los controles y es esencial para la migración basal glial, el agregado de C1P promueve aún más la activación de la vía incrementando la migración en estas células.

Otra de las vías evaluadas en este trabajo fue la de ERK/MAPK. Ensayos donde los cultivos fueron tratados con U0126, inhibidor específico de esta vía, demostraron que la C1P no ejerció su efecto promotor de la migración cuando la vía de ERK/MAPK estaba inhibida. Esto sugiere que C1P estimuló esta vía para promover la migración glial. A diferencia de la PI3K/Akt, la vía de ERK/MAPK no participó en la motilidad de las CGM activada por el daño mecánico, ya que la migración en los cultivos controles tratados con U0126 no fue diferente a aquella observada en los cultivos no tratados con este inhibidor.

Evaluamos también la vía de P38/MAPK, cuya estimulación por la C1P ha sido demostrada en macrófagos y preadipocitos (L. Arana et al. 2013). La inhibición de la vía de P38/MAPK con su inhibidor específico SB203580 no disminuyó la migración glial en ninguna condición, lo que permitió establecer que esta vía no fue activada por la C1P para promover la migración glial, ni por las CGM para la migración inducida por el daño mecánico.

Estos resultados en su conjunto sugieren que la C1P activa las vías de PI3K/Akt, ERK/MAPK y JNK (que discutiremos más adelante) para promover la migración de las CGM. Nuestros resultados concuerdan en su gran mayoría con las vías que han sido establecidas como involucradas en el efecto promotor de C1P en la migración en otros sistemas. Nuestro laboratorio demostró que el esfingolípido S1P estimula la migración de las CGM, mediante la activación de las vías de PI3K/Akt, ERK/MAPK, previa activación de sus receptores S1PRs (Simon et al. 2015). De modo similar, la C1P estimula la migración mediante la activación de las vías de ERK/MAPK en células multipotentes del estroma y en células endoteliales; y las vías de ERK/MAPK, p38 MAPK y PI3K en células hematopoyéticas, macrófagos y células de adenocarcinoma pancreático entre otros (Kim et al., 2013; Arana et al., 2013; Rivera et al., 2016; Gómez-Muñoz 2018). Si bien una de las vías involucrada en la migración de una amplia

variedad de tipos celulares es P38/MAPK (Arana et al. 2013), nuestros resultados indican que esta vía no participa en la regulación de la migración glial promovida por la C1P, ni en la migración activada por el daño mecánico.

Diversos trabajos demuestran que la C1P estimula a la JNK y que además está involucrada en la migración de diferentes tipos celulares. La JNK es activada por múltiples causas como el stress oxidativo y la radiación, como así también por factores de crecimiento y otras señales extracelulares, a fin de regular procesos fisiológicos como aquellos involucrados en la inflamación y enfermedades neurodegenerativas (Gkouveris and Nikitakis 2017). Además de las vías de PI3K/Akt y ERK/MAPK, la vía de JNK ha sido reportada como clave en el proceso de migración. Debido a ello decidimos evaluar su rol en el efecto de C1P sobre la migración glial. De manera similar a los ensayos anteriores, mediante la inhibición de la vía de JNK con el inhibidor específico SP600125 pudimos evaluar su participación en la señalización por C1P. Estos resultados demostraron que la C1P activó la vía de JNK para estimular la migración glial, ya que el inhibidor de esta vía disminuyó notablemente la migración inducida por C1P. Del mismo modo que PI3K/Akt, la vía de JNK es necesaria para la migración inducida por el daño mecánico, ya que la migración presente en los controles, inducida por este daño, se redujo cuando los cultivos fueron tratados con SP600125.

Nuestros resultados concuerdan con los hallazgos en otros tipos celulares. A diferencia de las vías de ERK/MAPK y la de PI3K/Akt, la vía de JNK por sí misma o como un efector de C1P, parece ser dependiente del tipo celular. C1P promueve la fosforilación de JNK para mediar sus efectos antiapoptóticos y proliferativos en macrófagos; sin embargo, la inhibición de la vía de JNK no previene la estimulación de la migración por parte de C1P (Granado et al. 2009; Arana et al. 2013). Por otro lado, C1P estimula la migración de células tumorales del epitelio de vejiga de rata y la línea celular de preadipocitos 3T3 mediante la activación de JNK (Huang et al. 2003).

En la búsqueda de los intermediarios de los efectos de la C1P en la migración glial, centramos nuestro estudio en la fosfolipasa A2 citosólica (cPLA₂). El principal mediador de C1P en la inflamación es la cPLA₂ y existen investigaciones que la asocian con la migración celular. Por lo tanto, decidimos investigar si la cPLA₂ tenía un rol en la migración glial promovida por C1P. La cPLA₂ es una fosfolipasa del grupo IV, caracterizada por su localización en el citoplasma y por la especificidad de escisión y liberación de ácido araquidónico, situado en la posición 2 de los esfingolípidos de

membrana. Cataliza el paso inicial en la síntesis de eicosanoides y por lo tanto es una enzima clave en procesos pro-inflamatorios (Leslie 2015). Para activar a la cPLA₂, la C1P se une a ella, promoviendo su translocación desde el citosol al trans-Golgi (Subramanian et al. 2005). Además, la C1P promueve la permanencia de cPLA₂ en estas membranas potenciando su actividad, al poner en contacto a cPLA₂ con sus sustratos, los esfingolípidos de membrana. Nuestros resultados indican que la inhibición de cPLA₂ no tuvo efectos sobre la migración de los controles. Por el contrario, la inhibición de cPLA₂ disminuyó marcadamente la migración inducida por C1P. Esto implica que la C1P podría activar a la cPLA₂ para promover la migración en las CGM y que la activación de esta enzima sería clave para el efecto de C1P sobre la migración glial. La activación de cPLA₂ por C1P para promover la migración concuerda con hallazgos en otros sistemas. La C1P sintetizada por ceramida quinasa (CerK) promueve la migración de fibroblastos a través de la regulación de la actividad de cPLA₂ y la síntesis de eicosanoides (Wijesinghe et al. 2014), y la ablación genética de CerK disminuye la liberación de ácido araquidónico y afecta a la migración de fibroblastos, la cual es restaurada por la adición de eicosanoides (Wijesinghe et al. 2014). Reportes recientes indican que la sobreexpresión de cPLA₂ α promueve la migración e invasión de células de hepatocarcinoma (Fu et al. 2017).

La C1P es sintetizada por la CerK mediante la fosforilación de la Cer. Una vez generada, la C1P puede actuar como segundo mensajero dentro de la célula. Aunque no es totalmente permeable, también puede atravesar la membrana plasmática hacia el medio extracelular y activar a su receptor específico (Simanshu et al. 2013). En macrófagos la C1P exógena promueve la migración, activando su receptor, mientras que la C1P endógena sintetizada por CerK, no lo hace (Granado et al. 2009). Debido a que observamos que el daño mecánico activa la migración glial, que conlleva una migración basal en los controles, nos preguntamos si la síntesis endógena de C1P podría estar participando en esta migración. Para analizar la posible participación de la síntesis de C1P en la migración, evaluamos la expresión de esta enzima en nuestros cultivos. El análisis de RT-PCR reveló que las CGM expresan CerK. Así, este trabajo de tesis constituye la primera evidencia que la expresión de CerK está presente en CGM de mamífero.

Si bien estudios que reportan niveles bajos de C1P en plasma de ratones CerK^{-/-}/CerK⁻ (Mietla et al. 2013), sugieren la existencia de otro mecanismo de síntesis de C1P, hasta ahora la CerK es la única vía conocida de síntesis de C1P. Nuestros resultados demuestran que en las CGM el tratamiento con NVP231, un potente inhibidor de CerK, bloqueó casi en su totalidad la motilidad glial inducida por el daño mecánico. En algunas ocasiones el ancho de la herida se mantuvo igual en relación al tiempo 0 e incluso mayor que en los controles, donde el daño mecánico activó una leve migración basal que redujo el área de la herida. El agregado de NVP231 provocó la retracción del citoesqueleto de actina, observándose una acumulación de actina en los bordes celulares. Esto sugiere que la C1P sintetizada endógenamente por CerK es esencial para la generación de filopodios y lamelipodios y así, para la migración de las CGM. El agregado de C1P promovió la migración de las CGM; sin embargo la inhibición de la síntesis endógena de C1P bloqueó completamente el efecto de C1P sobre la migración glial, ya que la migración no se recuperó por el agregado de C1P a cultivos tratados con NVP231. Esto sugiere que la C1P exógena promueve la migración glial a través de la síntesis endógena de C1P, y que esta síntesis es necesaria para sus efectos en la estimulación de la migración glial. Nuestros resultados sobre la síntesis de C1P en la migración glial concuerdan con los presentes en la bibliografía. La C1P sintetizada por CerK es esencial para la migración de fibroblastos observada en un modelo doble mutante negativo CerK^{-/-}/CerK⁻ de una línea celular de fibroblastos (Wijesinghe et al. 2014). Además, el silenciamiento del gen de CerK o la inhibición de su actividad por NVP231 reduce la migración espontánea de células de cáncer pancreático. En correlación, la sobreexpresión de CerK potencia la migración de estas células (Rivera, y col 2016). Estos antecedentes y nuestros resultados sugieren un rol clave de la síntesis de C1P y por consiguiente de la CerK en la migración de diferentes tipos celulares.

De manera similar a C1P, S1P induce la migración de las CGM. La S1P es un esfingolípido que promueve la proliferación y migración en diversos tipos celulares, incluidas las CGM de la retina (Simón et al. 2015; Spiegel and Milstien 2003). A su vez, este efecto de S1P sobre la migración disminuye cuando la actividad de la esfingosina quinasa (enzima responsable de la síntesis de S1P) es inhibida (Simón et al. 2015; Yu et al. 2009). La S1P y la C1P comparten vías de señalización para promover la motilidad celular; S1P promueve la migración de las CGM por activación de las vías PI3K, ERK/MAPK (Simón et al. 2015) y la vía de JNK (Takabe et al. 2008). Nuestro

resultados demuestran que C1P activa las vías de PI3K, ERK1/MAPK, JNK y cPLA₂, la cual no es activada por S1P (Pettus et al. 2005). Debido a que se ha demostrado que tanto C1P como S1P promueven la migración de las CGM en forma independiente, y que ambos esfingolípidos podrían ser liberados por las CGM o células del microambiente en la retina, decidimos evaluar si estos dos esfingolípidos podrían actuar sinérgicamente en la migración glial. Nuestros resultados indican que la adición combinada de C1P y S1P estimuló la migración en las mismas proporciones que cuando se agregaron estos esfingolípidos por separado. Esto implica que C1P y S1P no tienen un efecto aditivo en la migración. Estos resultados sugieren además que C1P y S1P interactúan entre sí para promover la migración de las CGM. Una explicación podría ser la intercomunicación en la regulación cruzada de la síntesis y de los blancos de acción de ambos esfingolípidos, como sucede en la inflamación. Frente a diversos estímulos inflamatorios C1P y S1P activan la cPLA₂ y la COX, respectivamente, promoviendo la producción de prostaglandinas (Pettus et al. 2005). Otro ejemplo de interconexión de estos esfingolípidos es la quimiotaxis de células madres/progenitoras hematopoyéticas (HSPC) luego de la irradiación de la médula ósea para el trasplante hematopoyético. Luego de ser irradiadas S1P, C1P y el factor derivado del estroma SDF-1, un péptido quimiotáctico, crean un gradiente quimioatractivo para las HSPC que están en circulación como parte del proceso de reparación de tejidos (Kim et al. 2012). Nuestros resultados de la interrelación entre C1P y S1P para promover la migración glial están en concordancia con los datos que evidencian la interrelación en el metabolismo de S1P y C1P necesario para la activación de diferentes procesos biológicos.

Estos resultados en su conjunto sugieren que la C1P y la enzima que la sintetiza, la CerK, son claves para la migración de las CGM. Debido a la relevancia del proceso de migración de células gliales de la retina en el desarrollo de las enfermedades proliferativas de la retina, proponemos que el eje C1P/CerK contribuiría en forma crucial al desarrollo de estas enfermedades.

Regulación por C1P/CerK en la migración de las células del EPR

Las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) tienen también gran relevancia en las retinopatías proliferativas. Del mismo modo que las CGM, las células epiteliales exacerbaban la proliferación y la migración contribuyendo al progreso y

desarrollo de las disfunciones visuales. La hiperglucemia y el consecuente stress oxidativo, (Farnoodian et al. 2016), la fotocoagulación realizada como método de reparación en distintas patologías de la retina (Madrakhimov et al. 2018) y las alteraciones desencadenantes de la AMD (Ho et al. 2011) activan la migración de células del EPR. Se han identificado diversas señales extracelulares que promueven la motilidad celular del EPR. En diferentes tipos de células epiteliales, la translocación de β -catenina al núcleo es una señal que activa la migración; β -catenina es clave en la migración y proliferación de células del EPR obtenidas de ojos porcinos, como así también en la formación de membranas contráctiles (Umazume et al. 2014). El TGF- β (Moon et al. 2017), la trombina (Aguilar-Solis et al. 2017), la gremlina (Liu et al. 2017), el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF) (Farnoodian et al. 2016), el factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF) y distintos factores de crecimiento del endotelio vascular (Hinton et al. 1998; Li et al. 2007) promueven la proliferación de las células del EPR. Estos hallazgos se centran en moléculas de naturaleza proteica que promueven la migración en las células epiteliales de la retina. Para una mejor comprensión de la regulación de la migración en las células del EPR es necesario evaluar la posibilidad de la existencia de moléculas de distinta naturaleza. Nuestros resultados evidencian que la C1P promueve la migración de las CGM, dado que la C1P puede liberarse al entorno celular ante distintos daños y podría impactar en otros tipos celulares, como las células del EPR. Para profundizar en el conocimiento acerca del rol de este esfingolípido en la retina decidimos evaluar el papel de la C1P en la migración en las células del EPR. Nuestros resultados demuestran que el agregado de C1P a los cultivos de una línea humana de células epiteliales de la retina, ARPE-19, promovió el aumento de la migración en estas células. El agregado de C1P disminuyó el ancho de la herida considerablemente. A diferencia de las CGM, la C1P además de promover la migración de las células epiteliales, promovió un leve, pero significativo aumento en la proliferación en cultivos confluentes, como los utilizados para el ensayo de migración. Ensayos de migración en presencia y ausencia de hidroxiquina (HU), un inhibidor de la proliferación, demostraron que el ancho de la herida en cultivos epiteliales con C1P fue menor que en aquellos tratados con C1P y HU. Estos datos sugieren que en las células del EPR el cierre de la herida promovido por la C1P se debió a la migración y en menor medida a la proliferación. En contraste, en los cultivos controles de células del EPR no se observaron diferencias entre los cultivos tratados o no con HU. Esto sugiere que el daño mecánico no activó significativamente la proliferación en los controles. El

agregado de la C1P promovió la organización de los filamentos de actina en extensos lamelipodios que se extendieron y avanzaron sobre la herida. En la mayoría de los experimentos la incubación durante 24 hs con C1P produjo el cierre casi total de la herida. Estos datos concuerdan con el efecto de la C1P en la migración de distintos tipos celulares como células del sistema inmune, células de diferentes tipos de cáncer y células madre de distintos tejidos (Granado et al. 2009; C. H. Kim et al. 2012; Presa et al. 2016) . Estos resultados identifican por primera vez el papel de C1P en la migración de las células del EPR.

Las células del EPR expresan CerK entre otras enzimas del metabolismo lipídico (Zhu et al. 2011). Debido a que el daño mecánico de la herida activó una leve migración en los cultivos epiteliales controles, decidimos evaluar si esta migración podría deberse a la síntesis endógena de C1P. El tratamiento de los cultivos celulares de ARPE-19 con NVP231 redujo la migración al 50% de la observada en los controles. En estos ensayos, los cultivos controles presentaron un menor ancho de la herida que aquellos cultivos tratados con NVP231. Estos resultados se correlacionan con los determinados en las CGM y con los hallazgos de otros grupos, que evidencian la relevancia de la actividad de la CerK para estimular la migración. Como describimos previamente, la actividad de CerK es esencial para la migración de fibroblastos (Wijesinghe et al. 2014) y para las células de cancer pancreático (Rivera, y col 2016). Por tanto, estos resultados demuestran que la síntesis endógena de C1P por CerK fue esencial para la motilidad de las células del EPR.

El agregado exógeno de la C1P aumentó la migración de las células del EPR y la síntesis de C1P fue necesaria para la migración activada por el daño mecánico en los controles. Por lo tanto, decidimos evaluar una posible interrelación entre la C1P exógena y la C1P endógena en la migración de las células del EPR. El tratamiento de los cultivos con NVP231 antes del agregado de C1P, redujo considerablemente la estimulación de la migración por parte de C1P. Los cultivos tratados con C1P redujeron el ancho de la herida mucho más en ausencia de NVP231 que en presencia de este inhibidor. Esto resultados sugieren que la síntesis endógena de C1P fue necesaria para que la C1P agregada exógenamente promoviera la migración de las células epiteliales de la retina, lo que nos lleva a proponer que la C1P exógena podría estimular la síntesis endógena de dicho esfingolípido.

La S1P es un esfingolípido metabólica y funcionalmente relacionado a la C1P. Promueve la migración celular en diferentes tipos celulares, y trabajos de nuestro laboratorio demuestran que estimula dicha migración en las CGM (Simón et al. 2015) y en las células del EPR (Simón et al. 2018). Decidimos evaluar si la síntesis de C1P estaba relacionada con la promoción de la migración por parte de S1P, a fin de ampliar las posibles funciones de la síntesis de C1P en la migración de las células de la retina. El tratamiento de los cultivo con NVP231 antes del agregado de S1P demostró que la inhibición de la migración no pudo ser rescatada por la S1P, es decir que la síntesis de C1P fue necesaria para que la S1P promoviera la migración epitelial. Esto plantea grandes interrogantes, ya que la S1P activa a sus receptores para inducir la migración, entonces ¿Están relacionadas las vías por las cuales S1P y C1P inducen migración en las células de la retina?. Como desarrollamos previamente, el agregado conjunto de la C1P y la S1P a cultivos gliales promovió la migración en la misma magnitud que cuando ambas fueron agregadas por separado. Esto sugiere que ambos esfingolípidos comparten vías o blancos claves para promover la migración glial. Considerando que la adición conjunta de C1P y S1P tienen el mismo efecto juntas que separadas y que la síntesis de C1P fue necesaria para que la C1P y la S1P promovieran la migración, sugerimos que un posible intermediario común en la estimulación de la migración por parte de la C1P y la S1P podría ser la CerK. La S1P podría estimular a la CerK y por consiguiente estimular la síntesis endógena de C1P, que así promovería la migración.

Regulación de proliferación en las CGM y las células del EPR por C1P/CerK

Del mismo modo que la migración, la proliferación de las CGM y de las células del EPR esta exacerbada en las enfermedades proliferativas de la retina. La primera evidencia del rol de C1P como promotor de la proliferación fue identificado en macrófagos derivados de médula ósea (Gomez Muñoz et al. 1995), y posteriormente se observó el mismo efecto en células del músculo liso de la vasculatura aórtica (Kim et al 2011). La C1P también promueve la proliferación de un gran número de células cancerígenas como mioblastos C2C12, células de adenocarcinoma de pulmón humano A549, células epiteliales de cáncer de bronquio y pulmón, NCI-H358, de cáncer de mama MCF-7 (Gomez Muñoz et al. 2018). Las vías activadas por C1P para estimular la proliferación son la proteína quinasa activada por mitógeno MEK, y ERK /MAPK, PI3K/Akt, GSK-3beta, y los últimos efectores de estas vías, la ciclina D1, c-Myc, c-Jun y el factor de transcripción nuclear NF-κB. Otros intermediarios de C1P en la proliferación de diferentes tipos celulares son cPLA₂ y CerK, pero estos mediadores requieren de mayores estudios (Gomez Muñoz 2018). Trabajos realizados en nuestro laboratorio han permitido determinar que el agregado exógeno de 5-10 μM de C1P promueve la proliferación de las células progenitoras de fotorreceptores obtenidas de cultivo primario de retinas de rata (Miranda et al. 2011). Para evaluar el efecto de C1P en la proliferación, tratamos a los cultivos con el nucleótido BrdU a las 24 hs luego del repique en caso de las CGM y a las 2 hs después del repique de los cultivos de ARPE-19. En los estadios elegidos, los cultivos presentan mayor tasa de proliferación que en los cultivos confluentes utilizado para los ensayos de migración. La incubación con BrdU en presencia y ausencia de C1P indicaron que la C1P no promovió la proliferación de las CGM, al menos en las condiciones evaluadas. De modo similar, la incubación de los cultivos epiteliales con BrdU demostró que el agregado de la C1P no alteró los niveles de proliferación en las células del EPR. A pesar que la C1P promueve la proliferación en diferentes tipos celulares, otros trabajos reportan lo contrario. La C1P no altera la proliferación en cultivos primarios de células endoteliales de la microvasculatura de la retina (HREC) y de células endoteliales de arteria coronaria (HCAEC) (Hankins et al. 2013) ni en las células de adenocarcinoma ductal pancreático (Kuc et al. 2018). Nuestros resultados concuerdan con estos últimos hallazgos donde la

C1P no promovió la migración celular. Es de notar que la C1P puede activar la proliferación de diferentes tipos celulares como así también no intervenir en ella, dependiendo del estadio en el que las células son evaluadas. Tanto en las CGM como en las células epiteliales, evaluamos la proliferación en un estadio temprano del cultivo en el que dicha proliferación era muy elevada, por lo cual las vías por las cuales C1P promueve la proliferación ya estaban previamente activadas en ambos tipos celulares, y la C1P no aumentó dicha activación.

Como se evidenció con este resultado, la C1P no estimuló la proliferación en las células epiteliales en estadios poco confluentes. Pero entonces ¿A qué se debe el pequeño porcentaje de proliferación observado en los cultivos epiteliales confluentes en los ensayos de migración donde se evaluó el papel de C1P en la motilidad epitelial? Una posible explicación es que en los ensayos de proliferación los cultivos estaban en una fase exponencial de crecimiento con una alta tasa de proliferación, con todas las vías implicadas en la proliferación activas, y por tanto la C1P ya no podía activarlas. En contraste, en los ensayos de migración, la proliferación estaba disminuida por el contacto célula-célula. Aquí, el agregado de C1P podría activar las vías de señalización que no estaban activas previamente para así poder promover la proliferación.

Como vimos, la proliferación en los cultivos gliales y epiteliales fue elevada en estadios iniciales de dichos cultivos, y el agregado de C1P exógena no la modificó. Con el objetivo de entender en forma integral del rol de C1P en la proliferación decidimos evaluar el rol de la síntesis endógena de C1P en la proliferación de las CGM y en las células del EPR. La disminución en la incorporación de BrdU en cultivos gliales donde la síntesis de C1P estaba inhibida con NVP231, demostró que la actividad de la CerK fue necesaria para la proliferación de las CGM. El tratamiento de los cultivos gliales con NVP231 redujo considerablemente la incorporación de BrdU, evidenciando que la síntesis de C1P fue necesaria para la proliferación de las células gliales. Estos resultados concuerdan con las evidencias que demuestran que la actividad de CerK es necesaria para la proliferación de células de adenocarcinoma de pulmón humano A549 (Mitra et al. 2007), células de cáncer de mama MCF-7 y pulmón NCI-H358 (Pastukhov et al. 2014), y células de neuroblastoma humano (Bini et al. 2012).

En contraposición a esto, la inhibición de la síntesis de C1P en los cultivos epiteliales no evidenció cambios en la incorporación de BrdU y por lo tanto en la proliferación. Por tratarse de una línea celular, la proliferación es muy activa y esta

regulada por diversos factores (Dang et al. 2015; Jun et al. 2007; Steindl-Kuscher et al. 2011), por lo que aún si la CerK participara en su estimulación, y su actividad estuviera inhibida, existirían otras vías y factores que promoverían la proliferación aún en ausencia de síntesis de C1P.

Estos resultados muestran que la actividad de CerK es necesaria para la proliferación de las CGM, mientras las células del EPR no dependen de la síntesis de C1P para la proliferación. Esto nos sugiere que la C1P/CerK es clave para la proliferación de las CGM.

Debido a la importancia de la inhibición de la síntesis de C1P en la migración y la proliferación, debemos tener en consideración los efectos de la inhibición de esta vía en la viabilidad celular. La marcada retracción de lamelipodios y acumulación de actina en los bordes celulares principalmente en las CGM y en menor medida en las células del EPR al tratar los cultivos con NVP231 es característica de las células que han sufrido algún daño. Esta observación sumada al hecho de que la inhibición de la síntesis de C1P podría estar asociada a aumentos en los niveles de ceramida y así, a la inducción de apoptosis, nos llevó a preguntarnos sobre el efecto del NVP231 sobre la viabilidad celular. La inhibición de la actividad de CerK implica no solo la disminución en los niveles de C1P sino también, la acumulación y aumento en los niveles de Cer. La relación entre los niveles de Cer y C1P es clave para la supervivencia celular, ya que tienen efectos opuestos. La Cer promueve la muerte por apoptosis activando diferentes efectores y generando poros en la membrana mitocondrial (Colombini 2017). En contraste, la C1P promueve la supervivencia, inhibiendo las enzimas involucradas en la síntesis de Cer y activando vías de señalización de supervivencia celular, como PI3K/Akt. El análisis de los niveles de Cer luego del tratamiento con NVP231 muestra resultados dispares. En un modelo de sobreexpresión de CerK en la línea celular de fibroblastos COS-1, los niveles de ceramida no se alteran frente a la inhibición de la actividad de CerK, mientras que los niveles de glucosil-ceramida aumentan de manera inversamente proporcional a la disminución de C1P (Graf et al. 2008). Estos autores plantean un “switch anabólico de ceramida”, en el que participan la glucosilceramida sintetasa y esfingomielina sintetasa que re-direccionan a la ceramida, para mantener estables sus niveles (Rovina et al. 2010). Otros trabajos reportan que la inhibición de la CerK induce muerte celular por apoptosis. El tratamiento con NVP231 aumenta los

niveles de ceramida y reduce la viabilidad celular en una línea celular de cáncer de mama (Pastukhov et al. 2014b); además la CerK está involucrada en el progreso y recurrencia de este tipo de cancer (Payne et al. 2014). Debido a ello, decidimos evaluar los efectos de la inhibición de la síntesis de C1P en la viabilidad de las células no neuronales de la retina. Cuando evaluamos la viabilidad en las CGM y del EPR luego tratamiento con NVP231 durante 24 hs, comprobamos que la inhibición de la síntesis de C1P no tuvo efectos sobre la viabilidad de las células gliales y epiteliales de la retina. Esto nos sugiere que la retracción de los lamelipodios en las CGM y las células del EPR no se originó en una disminución en la supervivencia, sino que la ausencia de C1P redujo enormemente la migración celular. Sería de vital importancia evaluar el efecto de este inhibidor en la viabilidad de los distintos tipos neuronales de la retina, para poder descartar potenciales efectos deletéreos del mismo en su eventual aplicación con fines terapéuticos.

¿Cómo actúa C1P en la migración de las células de la retina?

Los mecanismos de acción planteados para C1P son varios. La C1P tiene la capacidad de alterar múltiples aspectos de las membranas biológicas dependientes de pH y Ca, generando efectos en los procesos celulares donde la señalización es mediada por proteínas de membranas (Kooijman et al. 2008). La C1P puede actuar como segundo mensajero intracelular regulando diferentes enzimas relacionadas al metabolismo lipídico como cPLA₂ (Pettus et al. 2004), y la esfingomielinasa (Gomez Muñoz 2004). Y por último, la C1P puede ser liberada al exterior celular y actuar como ligando que se une a su receptor para promover sus funciones celulares (Fig. 32). Este último mecanismo de acción es el que se desprendería de los resultados mostrados en este trabajo de Tesis. La liberación de vesículas (Shinghal et al. 1993), la fagocitosis (Hinkovska-Galcheva et al. 1998) y la de-granulación de mastocitos (Hinkovska-Galcheva et al. 1998) son promovidos por la síntesis de C1P. Los efectos pro-inflamatorios de C1P están modulados por la activación mediante unión de la C1P a la cPLA₂ del mismo modo que los efectos anti-apoptóticos son dependientes de la inhibición por contacto de la C1P y la esfingomielinasa. Todos estos mecanismos son promovidos por C1P de manera independiente de receptor extracelular. Los efectos de

C1P en la migración de macrófagos están asociados a la activación de un CPGR específico para este esfingolípido (Granado et al. 2009). Esta hipótesis es cada vez más aceptada, ya que se ha demostrado que la C1P es liberada al medio extracelular para promover la migración en numerosos modelos biológicos (C. H. Kim et al. 2012; Kuc et al. 2018), mientras que cada vez mas publicaciones apoyan la existencia de un receptor específico para C1P (Granado et al. 2009). Con respecto a esto un reciente trabajo establece que las células de carcinoma ductal pancreático (PDAC) liberan al medio extracelular vesículas cargadas con C1P que promueven la migración de células madres de PDAC (PCSC), pero las vías y los mecanismos por los cuales actúa no fueron aun descritos (Kuc et al. 2018). Esto sugiere que la C1P podría liberarse al medio extracelular para promover la migración de las CGM y el EPR (Fig. 32). La interrelación entre C1P exógena y esfingolípidos relacionados como S1P y la síntesis endógena de C1P, requiere de mayor investigación, para lo cual sería crucial la caracterización completa del receptor de C1P, como así también los mecanismos de acción por los cuales este receptor actúa.

Como desarrollamos al comienzo de este trabajo la migración y la proliferación de las CGM y las células del EPR están exacerbadas en las retinopatías proliferativas como en retinopatía diabética y vítreo-retinopatía, contribuyendo al desprendimiento de retina y alteraciones características de estas enfermedades, con la consecuente disminución y pérdida de la visión (Subirada et al., 2018; Tosi et al. 2014). A lo largo de este trabajo, demostramos que la C1P promuevió la migración de las CGM y las células del EPR, al mismo tiempo que no alteró la proliferación en estos tipos celulares. Por otro lado, demostramos que la síntesis endógena de C1P fue crucial para la migración y proliferación de las CGM y para la migración de las células del EPR, sin alterar la viabilidad de estas células.

La proliferación y la migración de las CGM y las células del EPR juegan un rol protagónico en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas de la retina. Los hallazgos presentados en este trabajo de Tesis nos permiten hipotetizar que el eje C1P/CerK tendría un rol clave en la regulación de ambos procesos celulares y, por lo tanto, podría ser un potencial blanco terapéutico en el tratamiento de estas patologías.

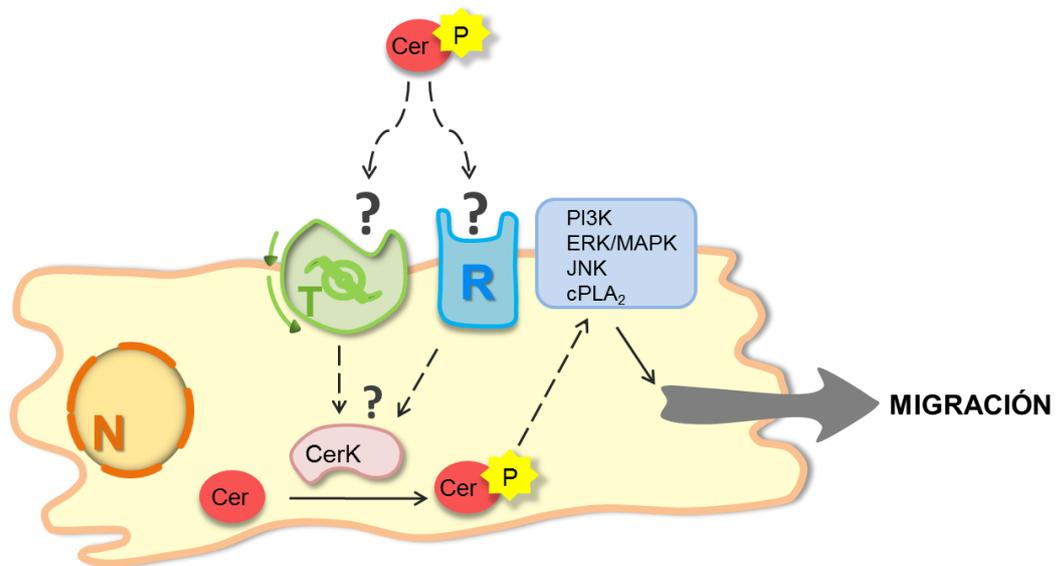


Figura 32: La síntesis de C1P fue esencial en la migración de las células de la retina. La C1P exógena podría activar un receptor específico no identificado completamente o internalizarse a través de un transportador de la membrana y así promover la síntesis de C1P dependiente de CerK. Este incremento en los niveles de C1P activaría a la PI3/Akt, ERK/MAPK, JNK y la cPLA₂ para promover la migración de las células de la retina.

Conclusiones

Los resultados obtenidos a lo largo de esta Tesis nos permiten concluir que:

- ✓ El agregado de C1P promovió la migración de las Células Gliales de Müller y de las del epitelio pigmentario de la retina.
- ✓ La C1P estimuló las vías de PI3K/AKT, ERK/MAPK y JNK para promover la migración glial.
- ✓ La C1P estimuló la migración glial a través de la activación de la Fosfolipasa A2 Citosólica.
- ✓ La síntesis endógena de C1P, mediada por la CerK, fue esencial para la migración de las CGM y las células del EPR.
- ✓ La C1P y la S1P utilizarían las mismas vías de señalización intracelular para estimular la migración glial.
- ✓ La C1P y la S1P exógenas promoverían la migración epitelial regulando la síntesis de C1P.
- ✓ La síntesis endógena de C1P participaría en la proliferación glial, pero no en la proliferación de las células del EPR.

Este trabajo sugiere un rol esencial para el eje C1P/CerK en la regulación de la migración de las células gliales y epiteliales de la retina. Considerando la importancia de una migración exacerbada en el desarrollo de las patologías proliferativas de la retina, concluimos que la regulación de la síntesis de la C1P y sus vías de señalización podría proporcionar nuevos blancos terapéuticos en el tratamiento de estas enfermedades de la retina.

Bibliografía

- Abrahan, Carolina E. et al. 2009. "Oxidative Stress Promotes Proliferation and Dedifferentiation of Retina Glial Cells in Vitro." *Journal of Neuroscience Research* 87(4): 964–77.
- Adorante, Joseph S, and Sheldon S Miller. *Potassium-Dependent Volume Regulation in Retinal Pigment Epithelium Is Mediated by Na, K, Cl Cotransport*.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2229036/pdf/jg9661153.pdf>.
- Aguilar-Solis, E. D. et al. 2017. "FAK Phosphorylation Plays a Central Role in Thrombin-Induced RPE Cell Migration." *Cellular Signalling* 36: 56–66.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2017.04.016>.
- Arana, L. et al. 2013. "Ceramide 1-Phosphate Induces Macrophage Chemoattractant Protein-1 Release: Involvement in Ceramide 1-Phosphate-Stimulated Cell Migration." *AJP: Endocrinology and Metabolism* 304(11): E1213–26.
<http://ajpendo.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpendo.00480.2012>.
- Arana, Lide et al. 2010. "Ceramide and Ceramide 1-Phosphate in Health and Disease." *Lipids in health and disease* 9: 15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20137073>.
- Asaria, R H Y, and Z J Gregor. 2002. "Simple Retinal Detachments: Identifying the at-Risk Case." *Eye* 16(4): 404–10. <http://www.nature.com/articles/6700189> (December 17, 2018).
- Bajjalieh, S. M., T. F J Martin, and E. Floor. 1989. "Synaptic Vesicle Ceramide Kinase. A Calcium-Stimulated Lipid Kinase That Co-Purifies with Brain Synaptic Vesicles." *Journal of Biological Chemistry* 264(24): 14354–60.
- Barcelona, Pablo F., Javier R. Jaldín-Fincati, María C. Sánchez, and Gustavo A. Chiabrando. 2013. "Activated α 2-Macroglobulin Induces Müller Glial Cell Migration by Regulating MT1-MMP Activity through LRP1." *FASEB Journal* 27(8): 3181–97.
- Baudiß, Kristin et al. 2016. "C1P Attenuates Lipopolysaccharide-Induced Acute Lung Injury by Preventing NF- κ B Activation in Neutrophils." *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 196(5): 2319–26. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26800872>.
- Becerra, S Patricia et al. 2004. "Pigment Epithelium-Derived Factor in the Monkey Retinal Pigment Epithelium and Interphotoreceptor Matrix: Apical Secretion and Distribution." *Experimental eye research* 78(2): 223–34.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14729355>
- Bini, Francesca et al. 2012. "New Signalling Pathway Involved in the Anti-Proliferative Action of Vitamin D3 and Its Analogues in Human Neuroblastoma Cells. A Role for Ceramide Kinase." *Neuropharmacology* 63(4): 524–37.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22579669>.
- "Blindness and Visual Impairment." https://www.who.int/features/factfiles/vision/01_en.html
- Bornancin, Frédéric. 2010. "Ceramide Kinase: The First Decade." *Cellular Signalling* 23(6): 999–1008.
- Bradford, M M. 1976. "A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram

- Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding.” *Analytical biochemistry* 72: 248–54. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>.
- Brindley, David N. 2004. “Lipid Phosphate Phosphatases and Related Proteins: Signaling Functions in Development, Cell Division, and Cancer.” *Journal of Cellular Biochemistry* 92(5): 900–912. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15258914>.
- Bringmann, A et al. 2006. “Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina.” *Progress in Retinal and Eye Research* 25(4): 397–424. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16839797>.
- Bringmann, A, and A Reichenbach. 2001. “Role of Muller Cells in Retinal Degenerations.” *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 6: E72-92. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11578954>.
- Bringmann, A 2009. “Cellular Signaling and Factors Involved in Müller Cell Gliosis: Neuroprotective and Detrimental Effects.” *Progress in retinal and eye research* 28(6): 423–51. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S135094620900055X>
- Bringmann, Andreas, Antje Grosche, Thomas Pannicke, and Andreas Reichenbach. 2013. “GABA and Glutamate Uptake and Metabolism in Retinal Glial (Müller) Cells.” *Frontiers in endocrinology* 4: 48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616782>.
- Bringmann, Andreas, and Peter Wiedemann. 2009. “Involvement of Müller Glial Cells in Epiretinal Membrane Formation.” *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 247(7): 865–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19415318>
- Bringmann A. 2012. “Müller Glial Cells in Retinal Disease.” *Ophthalmologica. Journal international d’ophtalmologie. International journal of ophthalmology. Zeitschrift fur Augenheilkunde* 227(1): 1–19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21921569>
- Chirco, K R et al. 2017. “Structural and Molecular Changes in the Aging Choroid: Implications for Age-Related Macular Degeneration.” *Eye (London, England)* 31(1): 10–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27716746>.
- Colombini, Marco. 2017. “Ceramide Channels and Mitochondrial Outer Membrane Permeability.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 49(1): 57–64. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26801188>
- Cuvillier, Olivier et al. 1996. “Suppression of Ceramide-Mediated Programmed Cell Death by Sphingosine-1-Phosphate.” *Nature* 381(6585): 800–803. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8657285>.
- Dang, Yalong et al. 2015. “Effects of Low-Level Laser Irradiation on Proliferation and Functional Protein Expression in Human RPE Cells.” *Lasers in Medical Science* 30(9): 2295–2302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26404781>.
- Das, S R, N Bhardwaj, H Kjeldbye, and P Gouras. 1992. “Muller Cells of Chicken Retina Synthesize 11-Cis-Retinol.” *The Biochemical journal* 285 (Pt 3)(Pt 3): 907–13.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1497628>.
- Dasgupta, Ujjaini et al. 2009. "Ceramide Kinase Regulates Phospholipase C and Phosphatidylinositol 4, 5, Bisphosphate in Phototransduction." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(47): 20063–68. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2785292&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Don, Anthony S., and Hugh Rosen. 2008. "A Fluorescent Plate Reader Assay for Ceramide Kinase." *Analytical Biochemistry* 375(2): 265–71.
- Dressler, K A, and R N Kolesnick. 1990. "Ceramide 1-Phosphate, a Novel Phospholipid in Human Leukemia (HL-60) Cells. Synthesis via Ceramide from Sphingomyelin." *The Journal of biological chemistry* 265(25): 14917–21. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2394706>.
- Farnoodian, Mitra et al. 2016. "High Glucose Promotes the Migration of Retinal Pigment Epithelial Cells through Increased Oxidative Stress and PEDF Expression." *American journal of physiology. Cell physiology* 311(3): C418-36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27440660>.
- Fröhlich, E, and C Klessen. 2000. "Glutamine Synthetase and Marker Enzymes of the Blood-Retina Barrier in Fetal Bovine Retinal Pigment Epithelial Cells." *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie* 238(6): 500–507. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/109436758>.
- Gangoiti, Patricia et al. 2008. "Ceramide 1-Phosphate Stimulates Macrophage Proliferation through Activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 Pathways." *Cellular Signalling* 20(4): 726–36. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18234473>.
- Gangoiti P. 2010. "Activation of Protein Kinase C- α Is Essential for Stimulation of Cell Proliferation by Ceramide 1-Phosphate." *FEBS Letters* 584(3): 517–24. <http://doi.wiley.com/10.1016/j.febslet.2009.11.08>.
- Gangoiti P. 2012. "Ceramide 1-Phosphate Stimulates Proliferation of C2C12 Myoblasts." *Biochimie* 94(3): 597–607. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21945811>.
- Gkouveris, Ioannis, and Nikolaos G Nikitakis. 2017. "Role of JNK Signaling in Oral Cancer: A Mini Review." *Tumor Biology* 39(6): 101042831771165. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28639904>.
- Goldman, Daniel. 2014. "Müller Glial Cell Reprogramming and Retina Regeneration." *Nature reviews. Neuroscience* 15(7): 431–42. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24894585>.
- Gómez-Muñoz, A et al. 1995. "Short-Chain Ceramide-1-Phosphates Are Novel Stimulators of DNA Synthesis and Cell Division: Antagonism by Cell-Permeable Ceramides." *Molecular pharmacology* 47(5): 833–39. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7746276>.

- Gomez-Muñoz, A, L M Frago, L Alvarez, and I Varela-Nieto. 1997. “Stimulation of DNA Synthesis by Natural Ceramide 1-Phosphate.” *The Biochemical journal* 325 (Pt 2: 435–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230125>.
- Gómez-Muñoz, Antonio et al. 2005. “Ceramide-1-Phosphate Promotes Cell Survival through Activation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase/protein Kinase B Pathway.” *FEBS Letters* 579(17): 3744–50.
- Gómez Muñoz A 2018. “The Role of Ceramide 1-Phosphate in Tumor Cell Survival and Dissemination.” In *Advances in Cancer Research*, , 217–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30060810>.
- Gómez-Muñoz, Antonio, Jennifer Y. Kong, Bill Salh, and Urs P. Steinbrecher. 2004 “Ceramide-1-Phosphate Blocks Apoptosis through Inhibition of Acid Sphingomyelinase in Macrophages.” *Journal of Lipid Research* 45(1): 99–105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14523050>
- Gómez-Muñoz, Antonio, Jennifer Y Kong, Bill Salh, and Urs P Steinbrecher. 2004b. “Ceramide-1-Phosphate Blocks Apoptosis through Inhibition of Acid Sphingomyelinase in Macrophages.” *Journal of lipid research* 45(1): 99–105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14523050>.
- Graf, Christine, Martin Klumpp, et al. 2008. “Targeting Ceramide Metabolism with a Potent and Specific Ceramide Kinase Inhibitor.” *Molecular pharmacology* 74(4): 925–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18612076>
- Graf, Christine, Satoru Niwa, et al. 2008. “Wild-Type Levels of Ceramide and Ceramide-1-Phosphate in the Retina of Ceramide Kinase-like-Deficient Mice.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 373(1): 159–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18555012> (August 20, 2018).
- Granado, María H., Patricia Gangoiti, Alberto Ouro, Lide Arana, Monika González, et al. 2009. “Ceramide 1-Phosphate (C1P) Promotes Cell Migration. Involvement of a Specific C1P Receptor.” *Cellular Signalling* 21(3): 405–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cellsig.2008.11.003>.
- Granado, María H., Patricia Gangoiti, Alberto Ouro, Lide Arana, and Antonio Gómez-Muñoz. 2009. “Ceramide 1-Phosphate Inhibits Serine Palmitoyltransferase and Blocks Apoptosis in Alveolar Macrophages.” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791(4): 263–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19416641>.
- Grisanti, S, and C Guidry. 1995. “Transdifferentiation of Retinal Pigment Epithelial Cells from Epithelial to Mesenchymal Phenotype.” *Investigative ophthalmology & visual science* 36(2): 391–405. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7531185>
- Gupta, Mrinali Patel, Alexandra A. Herzlich, Theodor Sauer, and Chi-Chao Chan. 2016. “Retinal Anatomy and Pathology.” In *Developments in Ophthalmology*, , 7–17.

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26502225>
- Hait, Nitai C., and Aparna Maiti. 2017a. "The Role of Sphingosine-1-Phosphate and Ceramide-1-Phosphate in Inflammation and Cancer." *Mediators of Inflammation* 2017: 1–17. <https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/4806541/>.
- Hankins, Jody L et al. 2011. "Exogenous Ceramide-1-Phosphate Reduces Lipopolysaccharide (LPS)-Mediated Cytokine Expression." *The Journal of biological chemistry* 286(52): 44357–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22065582>.
- Hankins 2013. "Ceramide 1-Phosphate Mediates Endothelial Cell Invasion via the Annexin a2-p11 Heterotetrameric Protein Complex." *The Journal of biological chemistry* 288(27): 19726–38. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23696646>.
- Hannun, Yusuf A., and Lina M. Obeid. 2017. "Sphingolipids and Their Metabolism in Physiology and Disease." *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(3): 175–91. <http://www.nature.com/doi/10.1038/nrm.2017.107>.
- Hannun, Yusuf A, and Lina M Obeid. 2008. "Principles of Bioactive Lipid Signalling: Lessons from Sphingolipids." *Nature reviews. Molecular cell biology* 9(2): 139–50. <http://www.nature.com/articles/nrm2329>.
- Hinkovska-Galcheva, V T et al. 1998. "The Formation of Ceramide-1-Phosphate during Neutrophil Phagocytosis and Its Role in Liposome Fusion." *The Journal of biological chemistry* 273(50): 33203–9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9837889> .
- Hinton, David R. et al. 1998. "Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Mediates PDGF-Directed Migration of RPE Cells." *Experimental Cell Research* 239(1): 11–15. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9511719>
- Hiscott, P et al. 2002. "Pathobiology of Epiretinal and Subretinal Membranes: Possible Roles for the Extracellular Matrix Proteins Thrombospondin 1 and Osteonectin (SPARC)." *Eye (London, England)* 16(4): 393–403. <http://www.nature.com/articles/6700196>.
- Ho, Joseph et al. 2011. "Documentation of Intraretinal Retinal Pigment Epithelium Migration via High-Speed Ultrahigh-Resolution Optical Coherence Tomography." *Ophthalmology* 118(4): 687–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21093923>.
- Hu, Dan-Ning et al. 2017. *Role of RPE Cells in Pathogenesis of Proliferative Vitreoretinopathy and Age-Related Macular Degeneration: Cell Culture Study of Surgical Excised Pre- and Sub-Retinal Membranes*. http://www.remedypublications.com/clinical-ophthalmology-eye-disorders/articles/pdfs_folder/jcoed-v1-id1002.pdf.
- Hu, Zhi-Xiang et al. 2014. "PI3K-Mediated Glioprotective Effect of Epidermal Growth Factor under Oxidative Stress Conditions." *International journal of ophthalmology* 7(3): 413–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24967183> .
- Hui, Y N et al. 1988. "Glial Epiretinal Membranes and Contraction. Immunohistochemical and Morphological Studies." *Archives of ophthalmology (Chicago, Ill. : 1960)* 106(9): 1280–

85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3415554> (January 28, 2019).
- Jadhav, Ashutosh P., Karin Roesch, and Constance L. Cepko. 2009. "Development and Neurogenic Potential of Müller Glial Cells in the Vertebrate Retina." *Progress in Retinal and Eye Research* 28(4): 249–62. <http://dx.doi.org/10.1016/j.preteyeres.2009.05.002>.
- Jęśko, Henryk, Adam Stępień, Walter J. Lukiw, and Robert P. Strosznajder. 2018a. "The Cross-Talk Between Sphingolipids and Insulin-Like Growth Factor Signaling: Significance for Aging and Neurodegeneration." *Molecular Neurobiology*.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30140974>.
- Jun, Eun Jung, Hwa Sun Kim, and Yeong Hoon Kim. 2007. "Role of HGF/c-Met in Serum-Starved ARPE-19 Cells." *Korean Journal of Ophthalmology* 21(4): 244.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18063891>.
- Kim, C H et al. 2012. "Conditioning for Hematopoietic Transplantation Activates the Complement Cascade and Induces a Proteolytic Environment in Bone Marrow: A Novel Role for Bioactive Lipids and Soluble C5b-C9 as Homing Factors." *Leukemia* 26(1): 106–16. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21769103>.
- Kim, Chihwa et al. 2013. "Ceramide-1-Phosphate Regulates Migration of Multipotent Stromal Cells and Endothelial Progenitor Cells--Implications for Tissue Regeneration." *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31(3): 500–510. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23193025>.
- Kimura, H et al. 1999. "Cellular Response in Subretinal Neovascularization Induced by bFGF-Impregnated Microspheres." *Investigative ophthalmology & visual science* 40(2): 524–28.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9950614>.
- Klimczak, Ryan R et al. 2009. "A Novel Adeno-Associated Viral Variant for Efficient and Selective Intravitreal Transduction of Rat Müller Cells." *PloS one* 4(10): e7467.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19826483>
- Kooijman, Edgar E et al. 2008. "Membrane Organization and Ionization Behavior of the Minor but Crucial Lipid Ceramide-1-Phosphate." *Biophysical journal* 94(11): 4320–30.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349508700870> (January 31, 2019).
- Kuc, Norbert et al. 2018. "Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cell Secreted Extracellular Vesicles Containing Ceramide-1-Phosphate Promote Pancreatic Cancer Stem Cell Motility." *Biochemical Pharmacology* 156: 458–66.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000629521830399X> (January 29, 2019).
- Lamour, Nadia F. et al. 2009. "Ceramide 1-Phosphate Is Required for the Translocation of Group IV a Cytosolic Phospholipase A2 and Prostaglandin Synthesis." *Journal of Biological Chemistry* 284(39): 26897–907.
- Leslie, Christina C. 2015. "Cytosolic Phospholipase A₂: Physiological Function and Role in Disease." *Journal of lipid research* 56(8): 1386–1402.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838312> (December 13, 2018).

- Levi, Maya, Michael M. Meijler, Antonio Gómez-Muñoz, and Tsaffrir Zor. 2010. “Distinct Receptor-Mediated Activities in Macrophages for Natural Ceramide-1-Phosphate (C1P) and for Phospho-Ceramide Analogue-1 (PCERA-1).” *Molecular and Cellular Endocrinology* 314(2): 248–55.
- Lewis, Geoffrey P et al. 2010. “The Fate of Müller’s Glia Following Experimental Retinal Detachment: Nuclear Migration, Cell Division, and Subretinal Glial Scar Formation.” *Molecular vision* 16: 1361–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20664798>.
- Li, Rong, Arvydas Maminishkis, Fei E. Wang, and Sheldon S. Miller. 2007. “PDGF-C and -D Induced Proliferation/Migration of Human RPE Is Abolished by Inflammatory Cytokines.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 48(12): 5722. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18055825>
- Liu, Yuan et al. 2017. “Gremlin Promotes Retinal Pigmentation Epithelial (RPE) Cell Proliferation, Migration and VEGF Production via Activating VEGFR2-Akt-mTORC2 Signaling.” *Oncotarget* 8(1): 979–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27894090>.
- Lorenc, Valeria E. et al. 2015. “IGF-1 Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2 and Promotes Müller Glial Cell Motility.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(11): 6948–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26513500>.
- Luo, Wentao et al. 2016. “Epo Inhibits the Fibrosis and Migration of Müller Glial Cells Induced by TGF- β and High Glucose.” *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 254(5): 881–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26907931>.
- Madrakhimov, Sanjar Batirovich, Jin Young Yang, Ha Yan Park, and Tae Kwann Park. 2018. “Essential Role of mTOR Signaling in Human Retinal Pigment Epithelial Cell Regeneration After Laser Photocoagulation.” *Lasers in Medical Science*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30499005>.
- Marazita, Mariela C et al. 2016. “Oxidative Stress-Induced Premature Senescence Dysregulates VEGF and CFH Expression in Retinal Pigment Epithelial Cells: Implications for Age-Related Macular Degeneration.” *Redox biology* 7: 78–87. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26654980> (February 10, 2019).
- Mayor, Roberto, and Sandrine Etienne-Manneville. 2016a. “The Front and Rear of Collective Cell Migration.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 17(2): 97–109. <http://www.nature.com/articles/nrm.2015.14> .
- Mietla, Jennifer A, Dayanjan S Wijesinghe, L Alexis Hoferlin, Michael D Shultz, Ramesh Natarajan, Alpha A Fowler, Charles E Chalfant, et al. 2013. “Characterization of Eicosanoid Synthesis in a Genetic Ablation Model of Ceramide Kinase.” *Journal of lipid research* 54(7): 1834–47. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23576683>.
- Miranda, Gisela E. et al. 2011. “Ceramide-1-Phosphate, a New Mediator of Development and Survival in Retina Photoreceptors.” *Investigative Ophthalmology and Visual Science*

- 52(9): 6580–88.
- Mitra, Poulami et al. 2007. “Ceramide Kinase Regulates Growth and Survival of A549 Human Lung Adenocarcinoma Cells.” *FEBS Letters* 581(4): 735–40.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17274985> (February 5, 2019).
- Moon, Kun et al. 2017. “Bortezomib Inhibits Proliferation, Migration, and TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition of RPE Cells.” *Molecular vision* 23: 1029–38.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29386876> (December 11, 2018).
- Newman, E A, and K R Zahs. 1998. “Modulation of Neuronal Activity by Glial Cells in the Retina.” *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 18(11): 4022–28. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9592083> (January 27, 2019).
- Obeid, L M, C M Linardic, L A Karolak, and Y A Hannun. 1993. “Programmed Cell Death Induced by Ceramide.” *Science (New York, N.Y.)* 259(5102): 1769–71.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8456305> (January 28, 2019).
- Ordoñez, Marta, Io Guané Rivera, Natalia Presa, and Antonio Gomez-Muñoz. 2016. “Implication of Matrix Metalloproteinases 2 and 9 in Ceramide 1-Phosphate-Stimulated Macrophage Migration.” *Cellular Signalling* 28(8): 1066–74.
- Van Overloop, Helena, and Paul P. Van Veldhoven. 2007. “Ceramide-Dependent Release of Ceramide Kinase from Cultured Cells.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 364(1): 169–74.
- Pasquaré, S.J., and N.M. Giusto. 2008. “Diacylglyceride Lipase Activity in Rod Outer Segments Depends on the Illumination State of the Retina.” *Neurochemistry International* 53(6–8): 382–88. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18926868>.
- Pasquaré, Susana J., Gabriela A. Salvador, and Norma Maria Giusto. 2008. “Involvement of Lysophosphatidic Acid, Sphingosine 1-Phosphate and Ceramide 1-Phosphate in the Metabolization of Phosphatidic Acid by Lipid Phosphate Phosphatases in Bovine Rod Outer Segments.” *Neurochemical Research* 33(7): 1205–15.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18288612>.
- Pastukhov, Oleksandr et al. 2014a. “The Ceramide Kinase Inhibitor NVP-231 Inhibits Breast and Lung Cancer Cell Proliferation by Inducing M Phase Arrest and Subsequent Cell Death.” *British Journal of Pharmacology* 171(24): 5829–44.
- Payne, Ania W, Dhruv K Pant, Tien-Chi Pan, and Lewis A Chodosh. 2014. “Ceramide Kinase Promotes Tumor Cell Survival and Mammary Tumor Recurrence.” *Cancer research* 74(21): 6352–63. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25164007> (December 13, 2018).
- Pena, Juan et al. 2018. “Controlled Microenvironments to Evaluate Chemotactic Properties of Cultured Müller Glia.” *Experimental eye research* 173: 129–37.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014483518301854> (December 11, 2018).
- Pettus, Benjamin J. et al. 2004. “Ceramide 1-Phosphate Is a Direct Activator of Cytosolic

- Phospholipase A 2.” *Journal of Biological Chemistry* 279(12): 11320–26.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14676210> (August 21, 2018).
- Poitry-Yamate, C L, S Poitry, and M Tsacopoulos. 1995. 15 *The Journal of Neuroscience*
Lactate Released by Müller Glial Cells Is Metabolized by Photoreceptors from
Mammalian Retina. <http://www.jneurosci.org/content/jneuro/15/7/5179.full.pdf> (January
 27, 2019).
- Presa, Natalia et al. 2016. “Regulation of Cell Migration and Inflammation by Ceramide 1-
 Phosphate.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*
 1861(5): 402–9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbalip.2016.02.007>.
- Rando, R R. 1991. “Membrane Phospholipids as an Energy Source in the Operation of the
 Visual Cycle.” *Biochemistry* 30(3): 595–602.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1988047> (January 27, 2019).
- Ratajczak, Mariusz Z et al. 2014. “The Role of Sphingosine-1 Phosphate and Ceramide-1
 Phosphate in Trafficking of Normal Stem Cells and Cancer Cells.” *Expert opinion on*
therapeutic targets 18(1): 95–107. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24188167>.
- Reh, T A, and A J Fischer. 2001. “Stem Cells in the Vertebrate Retina.” *Brain, behavior and*
evolution 58(5): 296–305. <https://www.karger.com/Article/FullText/57571> (January 30,
 2019).
- Reichenbach, A et al. 1995. “Hepatic Retinopathy: Morphological Features of Retinal Glial
 (Müller) Cells Accompanying Hepatic Failure.” *Acta neuropathologica* 90(3): 273–81.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8525801> (February 6, 2019).
- Reichenbach, Andreas, and Andreas Bringmann. 2013. “New Functions of Müller Cells.” *GLIA*:
 651–78.
- Reichenbach A and Robinson SR. 1995. “Phylogenetic Constraints on Retinal Organization and
 Development: An Haeckelian Perspective.” *Progress in Retinal and Eye Research* 15: 39–
 171. [https://ac.els-cdn.com/1350946295000089/1-s2.0-1350946295000089-
 main.pdf?_tid=cc4605b0-bb10-4579-bd4e-
 6362e79a6218&acdnat=1548516373_f336d8ac465149a56e516284f5e47904](https://ac.els-cdn.com/1350946295000089/1-s2.0-1350946295000089-main.pdf?_tid=cc4605b0-bb10-4579-bd4e-6362e79a6218&acdnat=1548516373_f336d8ac465149a56e516284f5e47904) (January 26,
 2019).
- Rivera, Io-Guané et al. 2016. “Ceramide 1-Phosphate Regulates Cell Migration and Invasion of
 Human Pancreatic Cancer Cells.” *Biochemical pharmacology* 102: 107–19.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006295215007649>.
- Romano, Mario R et al. 2018. “Correction: Intraretinal Changes in Idiopathic versus Diabetic
 Epiretinal Membranes after Macular Peeling.” *PloS one* 13(7): e0201503.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30044861>.
- Romo, Phillip, Michele C. Madigan, Jan M. Provis, and Karen M. Cullen. 2011. “Differential
 Effects of TGF- β and FGF-2 on in Vitro Proliferation and Migration of Primate Retinal

- Endothelial and Müller Cells.” *Acta Ophthalmologica* 89(3): e263–68.
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1755-3768.2010.01968.x>.
- Rovina, Philipp et al. 2009. “Subcellular Localization of Ceramide Kinase and Ceramide Kinase-like Protein Requires Interplay of Their Pleckstrin Homology Domain-Containing N-Terminal Regions Together with C-Terminal Domains.” *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1791(10): 1023–30.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2009.05.009>.
- Rovina, Philipp, Christine Graf, and Frédéric Bornancin. 2010. “Modulation of Ceramide Metabolism in Mouse Primary Macrophages.” *Biochemical and biophysical research communications* 399(2): 150–54.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X10013367> (December 13, 2018).
- Schneider, Gabriela et al. 2013. “Bioactive Lipids S1P and C1P Are Prometastatic Factors in Human Rhabdomyosarcoma, and Their Tissue Levels Increase in Response to Radio/chemotherapy.” *Molecular cancer research : MCR* 11(7): 793–807.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23615526>.
- “Search Begins for Non-Toxic Enzymatic Solution to Macular Degeneration: 2013 Intern Anuj Kudva | SENS Research Foundation.” <https://www.sens.org/education/education-blog/search-begins-non-toxic-enzymatic-solution-macular-degeneration-2013-intern>.
- Shinghal, R, R H Scheller, and S M Bajjalieh. 1993. “Ceramide 1-Phosphate Phosphatase Activity in Brain.” *Journal of neurochemistry* 61(6): 2279–85.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8245978>.
- Silver, I A, J Deas, and M Erecińska. 1997. “Ion Homeostasis in Brain Cells: Differences in Intracellular Ion Responses to Energy Limitation between Cultured Neurons and Glial Cells.” *Neuroscience* 78(2): 589–601. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9145812> -
- Simanshu, Dharendra K et al. 2013. “Non-Vesicular Trafficking by a Ceramide-1-Phosphate Transfer Protein Regulates Eicosanoids.” *Nature* 500(7463): 463–67.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23863933>.
- Simón, María V., Facundo H. Prado Spalm, Luis E. Politi, and Nora P. Rotstein. 2015. “Sphingosine-1-Phosphate Is a Crucial Signal for Migration of Retina Müller Glial Cells.” *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(10): 5808.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26325420>.
- Simón, María V., Vera M, Prado Spalm, Nora P. Rotstein. 2018. “Sphingosine-1-Phosphate Is a Crucial Signal for Migration of RPE Cells. AIVO
- Smith, E R, A H Merrill, L M Obeid, and Y A Hannun. 2000. “Effects of Sphingosine and Other Sphingolipids on Protein Kinase C.” *Methods in enzymology* 312: 361–73.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11070884>.
- Spiegel, Sarah, and Sheldon Milstien. 2003. “Sphingosine-1-Phosphate: An Enigmatic

- Signalling Lipid.” *Nature reviews. Molecular cell biology* 4(5): 397–407.
<http://www.nature.com/articles/nrm1103>.
- Steinberg, R H. 1985. “Interactions between the Retinal Pigment Epithelium and the Neural Retina.” *Documenta ophthalmologica. Advances in ophthalmology* 60(4): 327–46.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3905312>.
- Steindl-Kuscher, Kerstin et al. 2011. “Epidermal Growth Factor: The Driving Force in Initiation of RPE Cell Proliferation.” *Graefe’s Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology* 249(8): 1195–1200. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21494877> .
- Strauss, Olaf. 1995. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System *The Retinal Pigment Epithelium*. University of Utah Health Sciences Center.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21563333>.
- Strauss 2005. “The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function.” *Physiological Reviews* 85(3): 845–81. <http://www.physiology.org/doi/10.1152/physrev.00021.2004>.
- Subirada, Paula V. et al. 2018. “A Journey into the Retina: Müller Glia Commanding Survival and Death.” *European Journal of Neuroscience* 47(12): 1429–43.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29790615>
- Sugiura, Masako et al. 2002. “Ceramide Kinase, a Novel Lipid Kinase MOLECULAR CLONING AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION*.” <http://www.jbc.org/>
- Tackenberg, Mark A et al. 2009. “Müller Cell Activation, Proliferation and Migration Following Laser Injury.” *Molecular vision* 15: 1886–96.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19768129>.
- Tamiya, Shigeo, and Henry J. Kaplan. 2016a. “Role of Epithelial–mesenchymal Transition in Proliferative Vitreoretinopathy.” *Experimental Eye Research* 142: 26–31.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26675400>.
- Tosi, Gian Marco, Davide Marigliani, Napoleone Romeo, and Paolo Toti. 2014. “Disease Pathways in Proliferative Vitreoretinopathy: An Ongoing Challenge.” *Journal of Cellular Physiology* 229(11): 1577–83. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24604697>.
- Tsacopoulos, Marco, and Pierre J Magistretti. 1996. 76 The Journal of Neuroscience *Metabolic Coupling between Glia and Neurons*.
<http://www.jneurosci.org/content/jneuro/16/3/877.full.pdf>.
- Umazume, Kazuhiko et al. 2014. “Role of Retinal Pigment Epithelial Cell β -Catenin Signaling in Experimental Proliferative Vitreoretinopathy.” *The American journal of pathology* 184(5): 1419–28. <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002944014000960> .
- Vecino, Elena et al. 2016. “Glia-Neuron Interactions in the Mammalian Retina.” *Progress in retinal and eye research* 51: 1–40.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350946215000452>.
- Wang, Hai-Yan et al. 2018. “Crosslink between Lipids and Acute Uveitis: A Lipidomic

- Analysis.” *International journal of ophthalmology* 11(5): 736–46.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29862170>.
- Wenkel, H, and J W Streilein. 2000. “Evidence That Retinal Pigment Epithelium Functions as an Immune-Privileged Tissue.” *Investigative ophthalmology & visual science* 41(11): 3467–73. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11006240>.
- Wijesinghe, Dayanjan S. et al. 2014. “Ceramide Kinase Is Required for a Normal Eicosanoid Response and the Subsequent Orderly Migration of Fibroblasts.” *Journal of Lipid Research* 55(7): 1298–1309. <http://www.jlr.org/lookup/doi/10.1194/jlr.M048207>.
- Wijesinghe, Dayanjan S., Nadia F. Lamour, Antonio Gomez-Munoz, and Charles E. Chalfant. 2007. “Ceramide Kinase and Ceramide-1-Phosphate.” *Methods in Enzymology* 434(7): 265–92.
- Winkler, B S, M J Arnold, M A Brassell, and D G Puro. 2000. “Energy Metabolism in Human Retinal Müller Cells.” *Investigative ophthalmology & visual science* 41(10): 3183–90. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967082>.
- Witmer, A N, G F J M Vrensen, C J F Van Noorden, and R O Schlingemann. 2003. “Vascular Endothelial Growth Factors and Angiogenesis in Eye Disease.” *Progress in retinal and eye research* 22(1): 1–29. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12597922>.
- Zheng, Wenjing et al. 2006. “Ceramides and Other Bioactive Sphingolipid Backbones in Health and Disease: Lipidomic Analysis, Metabolism and Roles in Membrane Structure, Dynamics, Signaling and Autophagy.” *Biochimica et Biophysica Acta* 1758: 1864–84. www.elsevier.com/locate/bbamem.
- Zhou, Kecheng, and Tomas Blom. 2015a. “Trafficking and Functions of Bioactive Sphingolipids: Lessons from Cells and Model Membranes.” *Lipid Insights* 2015(Suppl 1): 11–20. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26715852>.
- Zhu, DanHong, Parameswaran G Sreekumar, David R Hinton, and Ram Kannan. 2010. “Expression and Regulation of Enzymes in the Ceramide Metabolic Pathway in Human Retinal Pigment Epithelial Cells and Their Relevance to Retinal Degeneration.” *Vision research* 50(7): 643–51. <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0042698909004064> .