

Tesis de Doctorado



I I M T

PAPEL DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y LOS PROGESTÁGENOS EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS DE LA RETINA

Melisa D. Marquioni Ramella

Directora: Dra. Angela M. Suburo

2020

CONICET



UNIVERSIDAD
AUSTRAL



CIENCIAS BIOMÉDICAS

I I M T

**PAPEL DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y LOS
PROGESTÁGENOS EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS
CÉLULAS DE LA RETINA**

Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Lic. Melisa D. Marquioni Ramella

Pilar, Buenos Aires, 2020

IIMT, CONICET- Univ. Austral

Facultad de Ciencias Biomédicas

**PAPEL DE LOS GLUCOCORTICOIDES Y LOS
PROGESTÁGENOS EN LA SUPERVIVENCIA DE LAS
CÉLULAS DE LA RETINA**

Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Lic. Melisa D. Marquioni Ramella

Directora: Dra. Angela M. Suburo

Enfermedades Neurodegenerativas

Pilar, Buenos Aires, 2020

Agradecimientos

A la Universidad Austral, especialmente a la Facultad de Ciencias Biomédicas y el IIMT.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (AGENCIA).

A la Dra. Angela M. Suburo por dirigir esta Tesis.

Al "Suburo Team": Marisa Cubilla, Vicente Bermúdez, Tomás Bachor y Mariela Marazita por trabajar con ustedes y tenerlos de compañeros, pero en particular a Pablo Tate por sus consejos y apoyo en este camino de doctorado que compartimos.

A cada uno de los miembros del IIMT, en particular a los becarios.

Al Dr. John Cidlowski y la Dra. Christine Jewell por su colaboración con el uso de la plataforma NanoString.

Al Dr. Mario Galigniana por su ayuda con las inmunofilinas y por el uso del microscopio confocal.

A mi familia y amigos por acompañarme y apoyarme en este proceso.

A Juan Pablo Almonacid, por su apoyo y consejos, animándome a que siga adelante y luche para alcanzar mis objetivos.

Agradecer hoy y siempre a mis padres, Nora Ramella y Carlos Marquioni, y mi hermano, Juan Pablo Marquioni Ramella, por su apoyo y amor incondicional, pero sobretodo por estar conmigo en cada paso que doy y motivarme para alcanzar mis metas.

Índice General

Resumen	10
Abstract.....	12
Abreviaturas	14
Capítulo 1	16
Introducción.....	16
Finalidad y Objetivos	16
Consideraciones sobre la estructura ocular	18
Estructura general del globo ocular.....	18
La retina neural.....	19
Circulación de la retina	22
La retina del ratón.....	24
Histofisiología de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario.....	25
Estructura de los fotorreceptores	25
Segmento externo de los fotorreceptores y fototransducción	28
Epitelio pigmentario de la retina (EPR).....	30
Ciclo visual	32
Fagocitosis de fragmentos distales del segmento externo	33
Daño y neuroprotección celular en la retina y el EPR	35
Exposición a la luz	35
Lesiones fototóxicas de la retina	36
Modelos de degeneración retinal por luz.....	37
Formas de muerte celular	38
Apoptosis.....	39

Glucocorticoides y progestágenos	42
Implicancias clínicas de los glucocorticoides y progestágenos.....	43
Receptores de glucocorticoides	44
Principales isoformas del RG	45
La isoforma RG α	47
La isoforma RG β	47
Efectos no genómicos de los glucocorticoides.....	49
Receptores de Progesterona	50
Objetivos Específicos	53
Capítulo 2.....	54
Materiales y Métodos	54
Animales de Experimentación	54
Modelos <i>in vivo</i>	54
Tratamientos farmacológicos.....	56
Cultivo Celular.....	56
Tratamientos farmacológicos.....	57
Procedimientos.....	57
Muestras de Animales.....	57
Fijación de los tejidos.....	57
Enucleación y criopreservación	57
Cortes por congelación	58
Coloración con rojo neutro y cuantificación del daño	58
Inmunohistoquímica	59
Inmunofluorescencia	60
Fragmentación del ADN	60
Aislamiento de retinas para western blot	61

Aislamiento de segmentos externos para western blot.....	64
Muestras de ARPE-19.....	65
Ensayos de muerte celular y viabilidad	65
Western blot.....	66
Inmunofluorescencia	66
Extracción de ARN y PCR en tiempo real (qPCR).....	67
Paneles de expresión génica neuropatológica	68
Estadística	69
Capítulo 3	70
Glucocorticoides y progestágenos en la supervivencia de los	
fotorreceptores	70
Resultados	71
Supervivencia de los fotorreceptores dañados por mifepristona o luz	71
Los marcadores de muerte celular, CASP3 y TUNEL, aparecieron selectivamente en	
los fotorreceptores	74
Cuantificación por Western blot de los marcadores de daño (CASP3 y p-H2AX) ...	77
Marcadores de muerte en las lesiones por mifepristona.....	77
Marcadores de muerte en las retinas expuestas a 1500 lux	79
Efectos de la dexametasona y la progesterona sobre las proteínas de la familia	
BCL2.....	80
Lesiones por mifepristona	80
Exposición a 1500 lux.....	83
Esteroides y niveles de rodopsina	84
Discusión.....	86
Comparación de dosis experimentales y clínicas de dexametasona y	
progesterona	86

Tratamientos con esteroides y diferencias sexuales	87
Semejanzas y diferencias entre el daño retiniano por mifepristona y por luz	88
Progesterona y dexametasona en la protección de los fotorreceptores	89
Efectos de los esteroides sobre los reguladores de muerte celular en retinas controles.....	90
Efectos de dexametasona y progesterona sobre los miembros de la familia BCL2 en retinas dañadas.....	91
Papel de la rodopsina en la protección de los fotorreceptores	93
Conclusión	93
Capítulo 4	95
Receptores de glucocorticoides en la retina	95
Resultados	95
Localización de $RG\alpha$ y $RG\beta$ en la retina neural y el epitelio pigmentario.....	95
Expresión de $RG\alpha$ y $RG\beta$ en ratones lesionados por mifepristona o exposición a 1500 lux	99
Localización del complejo receptor $RG\alpha$ en los fotorreceptores.....	100
Discusión.....	103
Receptores de glucocorticoides y células de Müller	103
Localización de $RG\alpha$ en fotorreceptores	104
Receptores de glucocorticoides y protección de la retina.....	105
Receptores de glucocorticoides y EPR	106
Conclusión	106
Capítulo 5	108

Glucocorticoides y progestágenos en el epitelio pigmentario de la retina.....	108
Resultados	109
Dexametasona, levonorgestrel y mifepristona en la supervivencia de las células ARPE-19	109
Estudios de actividad metabólica con MTT	109
Posibles interacciones entre la citotoxicidad de dexametasona y la concentración de glucosa en el medio	111
Dexametasona provocó muerte celular según su concentración	113
Receptores de esteroides y otros marcadores en células EPR	116
Determinación por qPCR.....	116
Localización de receptores de glucocorticoides en células ARPE-19	118
Discusión.....	124
Citotoxicidad de dexametasona en células del epitelio pigmentario	125
Expresión y localización de los receptores de glucocorticoides	126
Cambios en el citoesqueleto	127
Conclusión	128
Capítulo 6.....	130
Expresión de genes asociados a neurodegeneración en el EPR	130
Uso de la plataforma NanoString.....	130
Resultados y discusión	131
Cambios generales en la expresión génica	131
Análisis por anotación genómica.....	133
Genes modificados por las concentraciones altas de dexametasona	137
Genes aumentados o disminuidos 2 veces en D64 vs D8 (Tabla 6.4).....	139

Modificaciones en las vías de muerte celular, estrés del retículo endoplásmico y autofagia	143
Genes modificados por las combinaciones D+M	146
Genes aumentados o disminuidos 2 veces en D+M10 vs D8 (Tabla 6.5)	146
Modificaciones en las vías de muerte celular, estrés del retículo endoplásmico y autofagia	149
Diferencias y semejanzas entre los genes modificados por D64 y D+M10	149
Genes y mecanismos de muerte en las células expuestas a D64 o D+M10.....	151
Conclusión	154
Capítulo 7	155
Conclusiones generales	155
Publicaciones	161
Relacionadas con la Tesis.....	161
Otras publicaciones	161
Capítulo 8.....	163
Bibliografía General	163

Resumen

La muerte de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario (EPR) son la base de enfermedades que causan ceguera. Dado que los glucocorticoides y la progesterona pueden ser terapéuticos en las degeneraciones de la retina, comparamos los efectos de la dexametasona y la progesterona sobre la muerte de los fotorreceptores en la retina del ratón, y sobre células provenientes de EPR humano (línea celular ARPE-19). Además, estudiamos el efecto de la mifepristona (RU486), un bloqueante de receptores de glucocorticoides y progesterona.

En la retina de ratón, demostramos que la muerte de los fotorreceptores selectivamente inducida por mifepristona o por exposición a la luz, era revertida tanto por dexametasona como por progesterona, preservándose más del 88% de los núcleos de los fotorreceptores. El estudio de las moléculas pro- y anti-apoptóticas, y la localización del receptor de glucocorticoides de tipo α (RG α) y su chaperona, FKBP52, sugirieron que los glucocorticoides intervienen en por lo menos tres mecanismos de protección diferentes. Uno basado en la modulación de moléculas anti- y pro-apoptóticas, también sensibles a los progestágenos; el segundo por activación de las células de Müller mediada por RG α ; y un tercero dependiente del control de la producción y/o el tráfico de rodopsina, posiblemente mediado por RG α localizado en los segmentos externos de los fotorreceptores.

La respuesta del EPR a los esteroides fue radicalmente diferente, ya que tanto dexametasona como levonorgestrel, un progestágeno sintético, fueron citotóxicos. La mifepristona no fue citotóxica para el EPR, pero resultó serlo

cuando se aplicó en combinación con dosis bajas (no citotóxicas) de dexametasona. Mediante el análisis de la expresión génica encontramos que la muerte celular provocada por dosis elevadas de dexametasona o por la combinación de dexametasona y mifepristona se asociaba con la expresión de marcadores de estrés oxidativo y estrés del retículo endoplásmico (RE), junto con aumento en la expresión de los receptores de muerte, ciertos marcadores inflamatorios e indicios de desregulación de la autofagia.

La relación del EPR con los fotorreceptores y con los vasos coroideos sugiere que las células del EPR están sometidas a igual o mayor concentración de esteroides que los fotorreceptores. Sin embargo, glucocorticoides y progesterona promueven la supervivencia de los fotorreceptores, pero resultan citotóxicos para el EPR. Postulamos entonces que la supervivencia del EPR en el mismo ambiente que provee los glucocorticoides necesarios para la supervivencia de los fotorreceptores es posible gracias a la presencia citoplasmática del receptor de glucocorticoides de tipo β (RG β) con la consiguiente resistencia a los glucocorticoides.

Los datos obtenidos en este trabajo muestran la diversidad de efectos de los glucocorticoides sobre la retina, que dependen de la expresión diferencial de diversas isoformas y variantes de sus receptores en el EPR y en la retina neural.

Abstract

Photoreceptors death and/or retinal pigment epithelium (RPE) detachment are the basis of prevalent blinding diseases. Since glucocorticoids and progesterone might have a therapeutic role in retinal degenerations, we compared the effects of dexamethasone and progesterone on photoreceptors death in the mouse retina, and on cells derived from human RPE (ARPE-19 cell line). In addition, we studied the effect of mifepristone (RU486), an antagonist of glucocorticoid and progesterone receptors.

In the mouse retina, we showed that photoreceptor death was selectively induced by mifepristone or by light exposure and that it was reversed by dexamethasone and progesterone, preserving more than 88% of photoreceptor nuclei. The study of pro- and anti-apoptotic molecules, and the localization of the glucocorticoid receptor isoform α (GR α) and its chaperone, FKBP52, suggested that glucocorticoids are involved in at least three different protective mechanisms. The first, based on the modulation of anti- and pro-apoptotic molecules, was also sensitive to progestogens; the second requires Müller cell activation mediated by RG α ; and a third would depend on the regulation of rhodopsin production and/or trafficking, possibly mediated by GR α located in photoreceptor outer segments. The RPE response to steroids was radically different, as both dexamethasone and levonorgestrel, a synthetic progestogen, were cytotoxic. Mifepristone did not induce RPE cell death but became cytotoxic when applied in combination with low dose (non-cytotoxic) dexamethasone. By analyzing gene expression, we found that cell death caused by high doses of dexamethasone or by the combination of dexamethasone and mifepristone was associated with the

expression of oxidative stress and endoplasmic reticulum (ER) stress markers, together with an increase expression of death receptors, certain inflammatory markers and autophagy dysregulation.

The association of RPE with photoreceptors and choroidal vessels suggests that RPE cells are subjected to the same or higher concentration of steroids than photoreceptors. However, glucocorticoids and progesterone promote photoreceptor survival but are cytotoxic to RPE. We therefore postulate that survival of the RPE in the same environment that provides the glucocorticoids necessary for the survival of the photoreceptors is possible thanks to the cytoplasmic presence of the β -type glucocorticoid receptor (GR β) with the consequent glucocorticoid resistance.

This work showed the diversity of glucocorticoids effects on the retina and their relationship with differential expression of glucocorticoid receptor isoforms and variants in the RPE and in the neural retina.

Abreviaturas

AUC, áreas bajo la curva

C, control

CASP3, caspasa 3 clivada

CCG, células ganglionares

CNE, capa nuclear externa

CNG, canal activado por nucleótidos cíclicos

CNI, capa nuclear interna

cor, coroides

CPE, capa plexiforme externa

CPI, capa plexiforme interna

CRALBP, proteína de unión al retinaldehído celular

D, dexametasona

D8, dexametasona 0,08 mM

D32, dexametasona 0,32 mM

D64, dexametasona 0,64 mM

D+M1, dexametasona 0,08 mM+ mifepristona 1 μ M

D+M10, dexametasona 0,08 mM+ mifepristona 10 μ M

DMAE, degeneración macular asociada a la edad

EPR, epitelio pigmentario

ERAD, degradación asociada al retículo endoplásmico

EROS, especies reactivas al oxígeno

FDR, tasa de descubrimientos falsos

GCs, glucocorticoides

INM, inmunofilina

IF, inmunofluorescencia

IR, inmunorreactividad

IRBP, proteína interfotorreceptora de unión a retinoides

L, 1500 lux

Levo, levonorgestrel

M, mifepristona (RU486)

MCA, muerte celular accidental

MCR, muerte celular regulada

mle, membrana limitante externa

MOMP, permeabilización de la membrana externa mitocondrial

OD, densidad óptica
p-Ser203-RG, receptor de glucocorticoides fosforilado en la serina 203
P, progesterona
PDE, fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos
PGRMC1, componente de membrana 1 del receptor de progesterona
pH2AX, histona H2A de la familia X fosforilada
RE, retículo endoplásmico
RG, receptor de glucocorticoides
RG α , isoforma alfa del receptor de glucocorticoides
RG β , isoforma beta del receptor de glucocorticoides
RN, retina nerviosa
RP, receptor de progesterona
SD, desviación estándar
SE, segmentos externos
SI, segmentos internos
SNC, sistema nervioso central
TS, terminal sináptico
UPR, respuesta a proteínas mal plegadas
V, vehículo

Capítulo 1

Introducción

Finalidad y Objetivos

Se estima que la prevalencia global de pérdida severa de la visión y ceguera alcanza a 2200 millones de personas [1]. Las causas más frecuentes son los errores de refracción no corregidos y las cataratas. Pero en tercer lugar se encuentra la degeneración macular asociada con la edad (DMAE) que es responsable del 5% de las cegueras [2], estimándose que afecta actualmente a 196 millones de personas, cifra que aumentaría a 288 millones en 2040 [3]. Al igual que otras enfermedades degenerativas de la retina externa, como la retinopatía diabética y las diversas enfermedades hereditarias englobadas bajo la denominación retinitis pigmentaria, la DMAE afecta selectivamente a los fotorreceptores y al epitelio pigmentario de la retina (EPR). Por lo tanto, la identificación de las causas y mecanismos patogénicos determinantes de la muerte de los fotorreceptores y del EPR, o que, por el contrario, favorecen su supervivencia, constituye un objetivo muy importante en la lucha contra la ceguera.

La etiología de las afecciones de la retina externa incluye componentes genéticos y ambientales, que en muchos casos no pueden ser identificados con precisión. Se conocen por lo menos 34 loci genéticos de susceptibilidad para la DMAE [4], mientras que las retinitis pigmentarias están asociadas a mutaciones en más de 250 genes diferentes [5]. El estrés oxidativo, debido a la acumulación de especies reactivas del oxígeno (EROS), parece ser un factor común a muchos

de estos factores etiológicos. En las células sanas, los niveles de estos radicales libres son estrictamente regulados para mantener la homeostasis. Su acumulación, asociada a trastornos metabólicos, la hiperglucemia, el envejecimiento, condiciones inflamatorias y muchas otras causas aún no bien conocidas, genera inicialmente una respuesta protectora, que puede agotarse cuando el estrés oxidativo se prolonga. El agotamiento de la protección endógena permite la acumulación de daño macromolecular, tanto a nivel del ADN como de ciertas proteínas. El resultado final es la senescencia prematura y/o la muerte celular, en un marco inflamatorio que perpetúa la destrucción tisular [6].

Los glucocorticoides, solos o en combinación con moléculas antiangiogénicas, son utilizados ampliamente en diversas enfermedades oftalmológicas, incluyendo la DMAE, la retinopatía por radiación y el edema macular diabético [7-9]. En el ratón, tanto los glucocorticoides como la progesterona protegen a los fotorreceptores dañados por la iluminación excesiva [10-12]. La hipótesis de este trabajo es que los glucocorticoides y la progesterona son esenciales para la supervivencia de los fotorreceptores, aún en condiciones fisiológicas. Estudios previos de nuestro laboratorio demostraron que la mifepristona (RU486), un antagonista de los receptores de glucocorticoides de tipo α ($RG\alpha$), y de los receptores de progesterona (RP), no solo agrava el daño por luz, sino que también induce la muerte selectiva de los fotorreceptores bajo iluminación estándar. Estos trabajos también mostraron que la adrenalectomía produce la muerte selectiva de los fotorreceptores [13, 14]. Por el contrario, los efectos de los glucocorticoides sobre el EPR no son bien conocidos y algunas evidencias indican que podrían ser citotóxicos para sus células [15].

Por lo tanto, esta Tesis tiene como finalidad evaluar el efecto de la luz excesiva, glucocorticoides, progesterona y mifepristona sobre fotorreceptores y el EPR; y analizar la distribución de las principales isoformas del receptor de glucocorticoides.

Consideraciones sobre la estructura ocular

Estructura general del globo ocular

El globo ocular está formado por tres capas: una externa, compuesta por la esclera y la córnea; una capa media, formada por el iris y el cuerpo ciliar en su porción anterior, y por la coroides en su porción posterior. La capa interna incluye la retina neural, en contacto con el humor vítreo, y el epitelio pigmentario de la retina (EPR), más externa y en contacto con la coroides. Interiormente se distinguen tres cámaras: la cámara anterior (entre la córnea y el iris) y la cámara posterior (entre el iris y el cristalino), que contienen humor acuoso. La cámara vítrea, que contiene una matriz extracelular fluida, se encuentra entre el cristalino y la retina. La córnea y el cristalino son estructuras transparentes y constituyen los medios dióptricos del ojo que permiten enfocar los rayos luminosos en el plano de la retina neural (Figura 1.1).

El punto de enfoque, que es el sitio de mayor agudeza visual, corresponde anatómicamente a la fovea o porción central de la mácula lútea (ver más adelante).

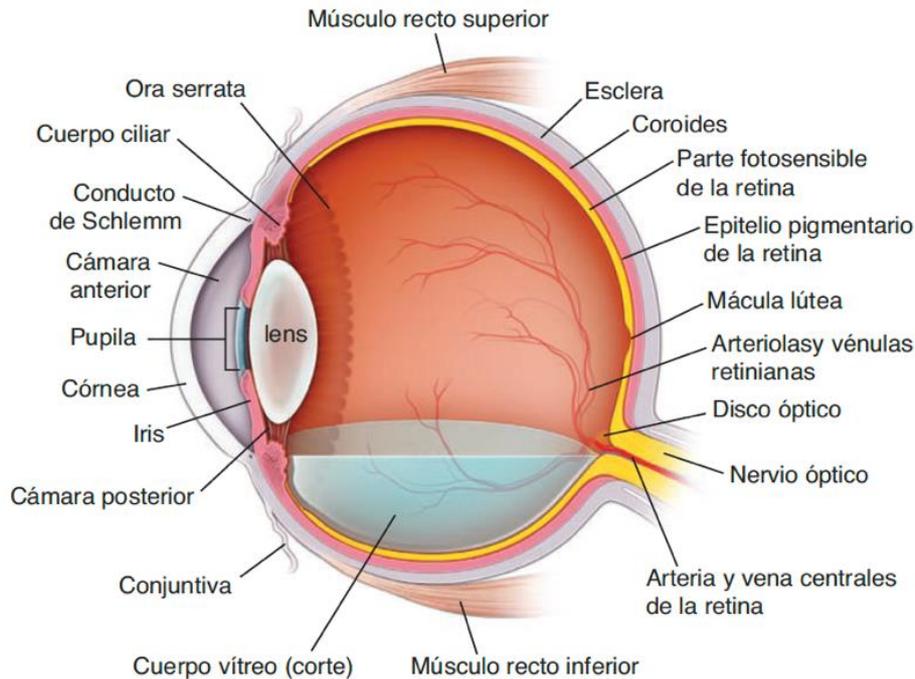


Figura 1.1. Representación esquemática del globo ocular humano [16].

La retina neural

La retina neural incluye cinco tipos neuronales principales: fotorreceptores, células horizontales, células bipolares, células amácrinas y células ganglionares; y tres tipos gliales: las células de Müller, los astrocitos y las células microgliales. Cada tipo neuronal ocupa una capa de la retina que, desde adentro hacia afuera, son: la capa de células ganglionares (CCG), la capa nuclear interna (CNI), que incluye a los núcleos de células bipolares, amácrinas, células de Müller y horizontales, y la capa nuclear externa (CNE), donde se encuentran los núcleos de los fotorreceptores (bastones y conos). Entre estas capas se encuentran zonas ricas en fibras nerviosas y contactos sinápticos: la capa plexiforme externa (CPE) entre la CNE y la CNI, que contiene las sinapsis entre fotorreceptores, células bipolares y células horizontales; y la capa plexiforme interna (CPI), entre la CNI y la CCG, donde se establecen las sinapsis entre las células bipolares, amácrinas y ganglionares. Los axones de las células ganglionares se ubican en

la capa más interna, formando fascículos que se dirigen hacia la papila del nervio óptico [17] (Figura 1.2).

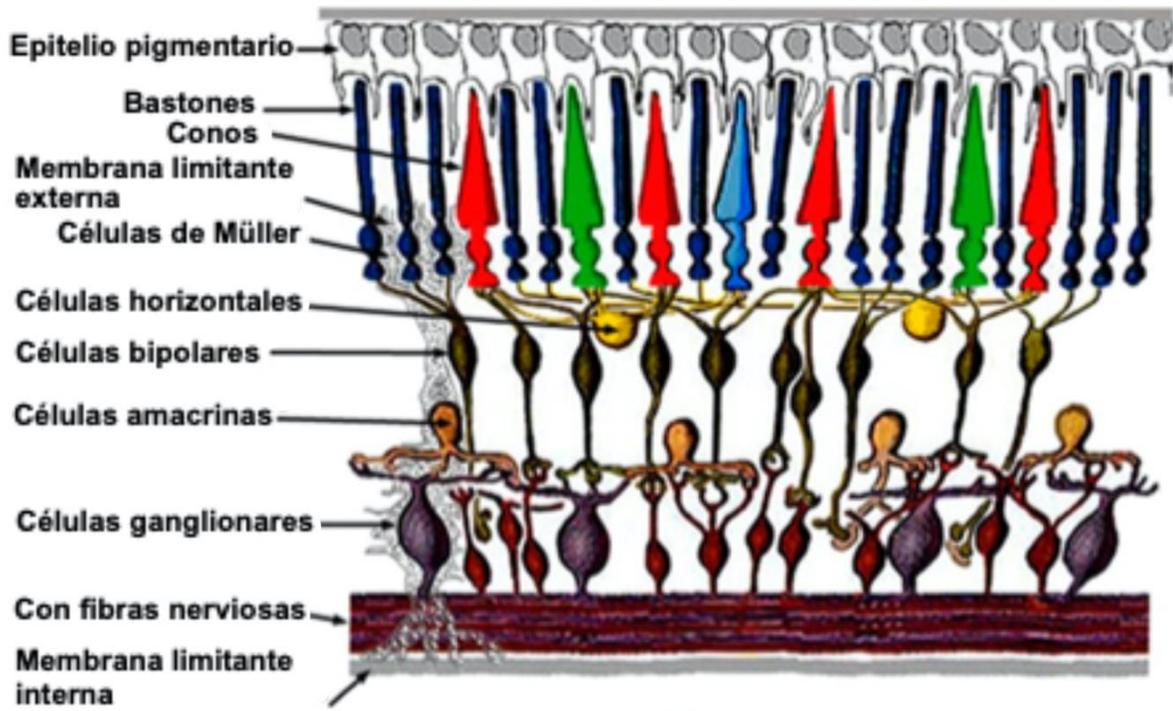


Figura 1.2. Representación esquemática de las capas de la retina. Modificado de Kolb y col. [17].

Las células de Müller, cuyos núcleos ocupan el estrato medio de la CNI, forman dos membranas limitantes: una interna (mli), que se encuentra en contacto con el vítreo, y otra externa (mle), a nivel de los fotorreceptores, que delimita el espacio subretinal [17] (Figura 1.2).

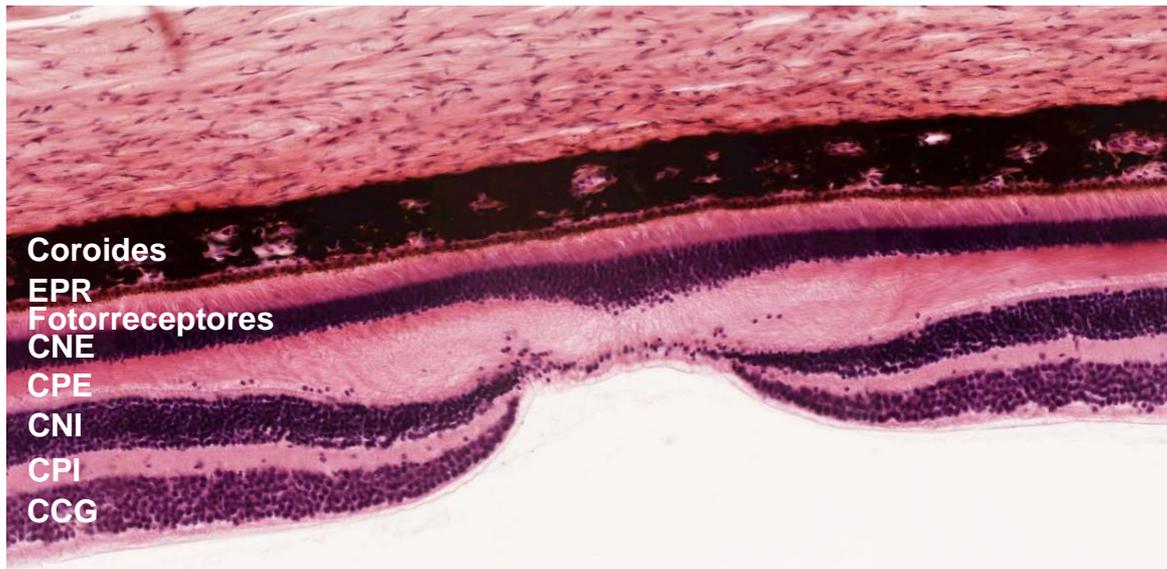


Figura 1.3. Micrografía de un corte de la región foveal de la retina de mono. Se observa el mayor espesor de la CNE, reflejando la mayor densidad de fotorreceptores, y el desplazamiento de la CNI y la CCG.

La mácula lútea es una especialización de la retina de los primates que, aunque apenas comprende el 4% del área total de la retina, es imprescindible para la visión fina. Esta función depende de una alta concentración de fotorreceptores, especialmente en su zona central, la fovea. Allí las capas internas de la retina (CNI, CPI, CCG y las fibras del nervio óptico) están desplazadas, permitiendo la llegada directa de la luz a los fotorreceptores (Figura 1.3). El color amarillento de la mácula deriva de la presencia de los carotenoides, luteína y zeaxantina. Estos pigmentos filtran las ondas de la zona azul, las más fototóxicas del espectro luminoso y, además, son poderosos antioxidantes que reducen los niveles de EROS [18, 19].

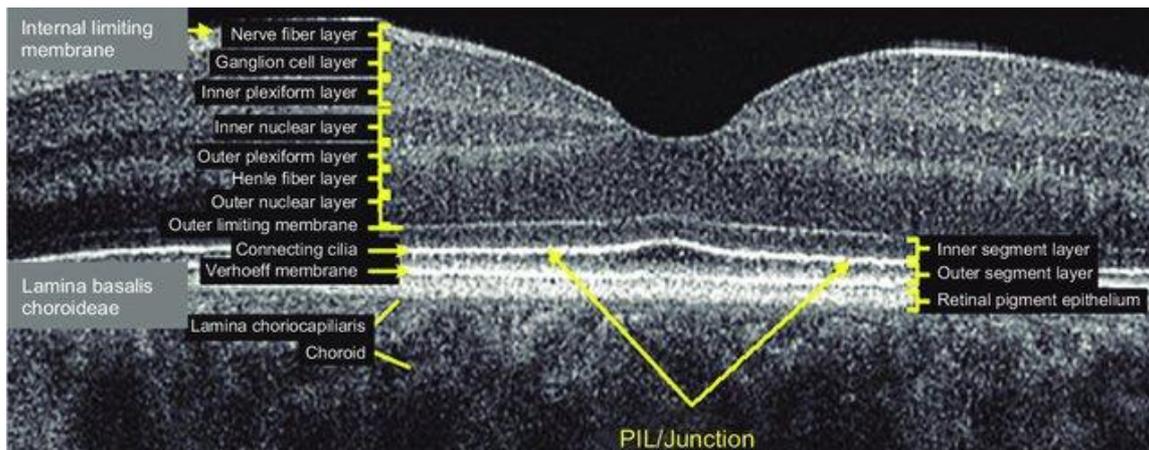


Figura 1.4. Corte gráfico de una retina humana normal obtenido mediante tomografía óptica espectral (SD-OCT) que muestra la fovea y el gran espesor de la capa nuclear externa en esta zona de la mácula lútea [20].

Circulación de la retina

Las demandas metabólicas de la retina, debidas principalmente al consumo de los segmentos externos de los fotorreceptores, son más altas que las de cualquier otro tejido [21, 22]. La circulación en la retina se adapta a estos requerimientos y a la necesaria transparencia que permite la iluminación de los segmentos externos, depende de dos circuitos vasculares diferentes. La retina externa, incluyendo la fovea en los primates, es siempre avascular, ya que todas las especies de vertebrados poseen una rica circulación coroidea. La retina interna puede estar vascularizada, como en los primates y muchas especies de mamíferos, incluyendo al ratón. En estas especies, la retina interna recibe ramificaciones capilares de la arteria central de la retina, rama de la arteria oftálmica [23, 24].

Las ramas de la arteria central de la retina transcurren radialmente cerca de la membrana limitante interna. Las ramas secundarias penetran el espesor de la retina y originan tres lechos capilares paralelos a la superficie: uno en la capa de fibras del nervio óptico y células ganglionares, y dos plexos que siguen los

bordes interno y externo de la CNI. Estos capilares son continuos y la extracción de oxígeno es relativamente alta [23, 24].

La circulación coroidea proviene de los vasos ciliares posteriores, también ramas de la arteria oftálmica. Los vasos de mayor calibre transcurren en la capa más externa de la coroides, mientras que los capilares forman la capa más interna (coriocapilaris). El endotelio de estos capilares es asimétrico, ya que solo presenta fenestras en su cara más interna, vecina a la membrana de Bruch y al EPR. La nutrición de la retina externa está asegurada por el enorme flujo sanguíneo coriocapilar, con poca extracción de oxígeno (< 1 vol %) [25, 26].

La membrana de Bruch es una estructura compleja que incluye la lámina basal del EPR, dos capas ricas en colágeno separadas por una capa de fibras elásticas, y la membrana basal de los capilares coroideos [27]. El EPR controla la formación y el mantenimiento de la coriocapilaris, esencial para la funcionalidad y homeostasis de la retina externa. Las enfermedades degenerativas de la retina externa, como la DMAE y la retinopatía diabética también presentan alteraciones de la membrana de Bruch y de la coriocapilaris [28, 29].

Al igual que en otras regiones del sistema nervioso central, el espacio intercelular del endotelio en la retina está fuertemente sellado por uniones ocluyentes que constituyen la barrera hémato-retinal interna. La barrera hémato-retinal externa, que controla los intercambios entre la retina y la coriocapilaris, depende de las uniones ocluyentes entre las células del EPR [30, 31].

La pérdida de la función normal de las barreras hémato-retinales es otra de las características comunes a los trastornos degenerativos de la retina, incluida la DMAE, la retinopatía diabética y las oclusiones de la vena retiniana [31, 32].

Estas disfunciones se asocian con isquemia, aumento de la producción de VEGF y exceso de permeabilidad vascular [31, 33].

La retina del ratón

La organización funcional básica de la retina del ratón es muy similar a la de otras especies de mamíferos (Figura 1.5). Como es típico en los mamíferos nocturnos [34], el ojo del ratón se caracteriza por una córnea y un cristalino relativamente grandes, que ocupan el 60% de la longitud axial [35]. La retina del ratón está fuertemente dominada por los bastones, que constituyen el 97% de todos los fotorreceptores. Los conos son menos abundantes en el ratón que en los roedores diurnos como la ardilla terrestre (*Spermophilus beecheyi*) [36-38]. La densidad de bastones y conos, así como la densidad de las células ganglionares, alcanza su punto máximo en el área central de la retina y disminuye hacia la periferia [39] pero, como en todos los mamíferos no-primates, la retina del ratón carece de una fovea centralis [34, 40, 41]. La organización neuronal sigue el mismo patrón de los primates, aunque con menor complejidad [42].

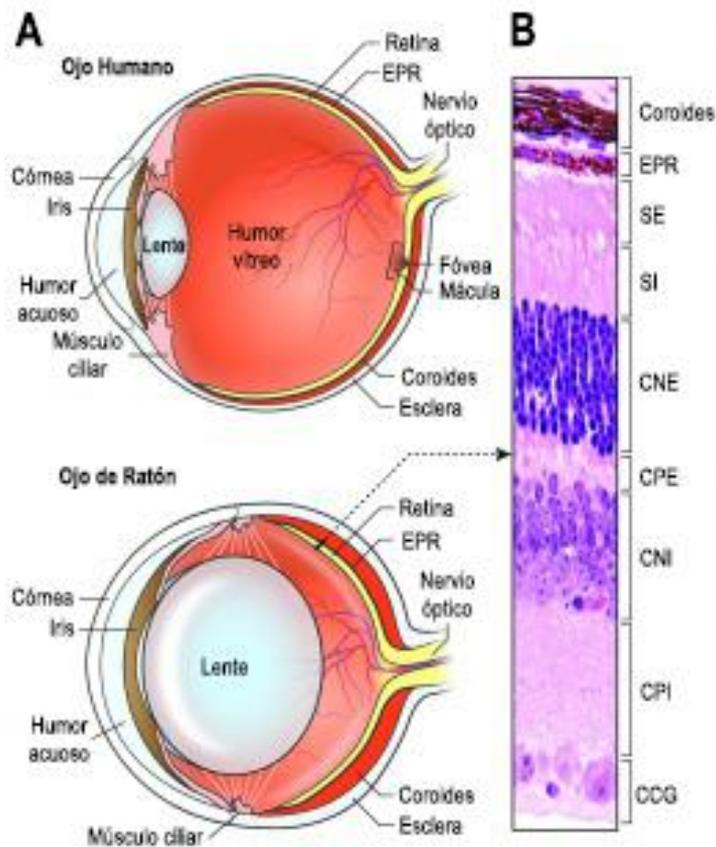


Figura 1.5. Principales diferencias entre el ojo humano y el ojo muino. El cristalino es proporcionalmente mucho mayor en el ojo del ratón, una característica de los animales con predominio de visión nocturna. La retina presenta la misma estratificación, pero no posee mácula ni fóvea. Modificado de Veleri y col. [43].

Histofisiología de los fotorreceptores y del epitelio pigmentario

Estructura de los fotorreceptores

Los fotorreceptores, conos y bastones, son las neuronas primarias de la vía óptica. Contienen pigmentos sensibles a la luz que gatillan una vía de señalización intracelular que origina una señal eléctrica, responsable de una señal química transmitida a las células bipolares, las siguientes neuronas de la vía óptica.

La retina humana contiene 120 millones de bastones y 6 millones de conos, estos últimos concentrados en la mácula lútea [44]. Ambos tipos de fotorreceptores

están altamente compartimentados en estructura y función (Figura 1.6). Poseen cinco regiones principales: segmento externo (SE), el cilio de conexión, el segmento interno (SI), región nuclear y terminal sináptico. El SE es el sitio fotosensible ya que contiene el pigmento visual (rodopsina en bastones y otras opsinas en los conos) localizado en estructuras membranosas con forma de discos aplanados [45]. El SI contiene la maquinaria metabólica y biosintética de la célula, incluidas las mitocondrias, el retículo endoplásmico, el complejo de Golgi, los lisosomas y otros orgánulos subcelulares. El núcleo de la célula se encuentra en el cuerpo, que se continúa con el pie del fotorreceptor. Este último es un terminal axónico que forma las triadas sinápticas con una prolongación de una célula bipolar y dos prolongaciones de células horizontales [44].

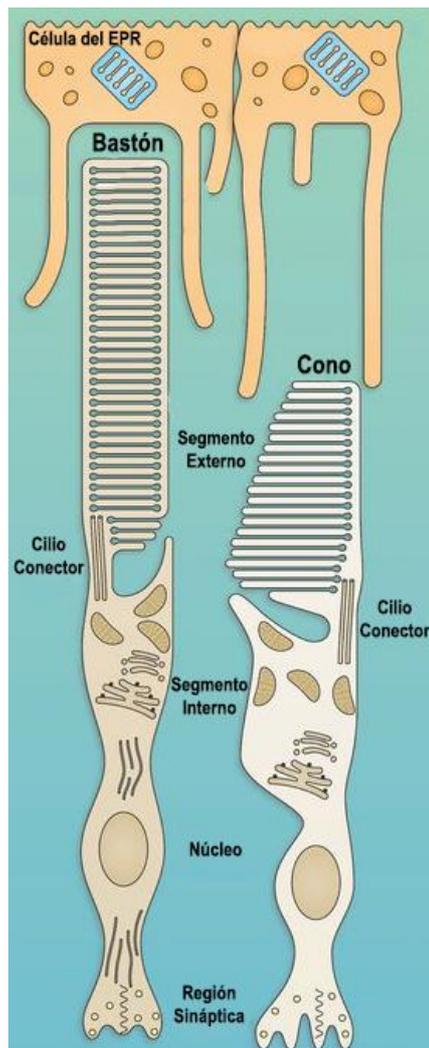


Figura 1.6. Representación gráfica de la estructura de los fotorreceptores, comparación entre conos y bastones. Cada bastón y cada cono se dividen en un SE en contacto con el EPR, un SI con alto contenido de mitocondrias, y un terminal sináptico. Los discos del SE contienen los compuestos fotosensibles que reaccionan a la luz para iniciar el potencial de acción en las vías visuales. Modificado de Molday y Moritz [44].

Los bastones y los conos están especializados para funcionar bajo distintas condiciones de iluminación. Los bastones poseen mayor sensibilidad a la luz, y se activan con iluminación débil (visión escotópica), mientras que los conos funcionan con niveles altos de luz (visión fotópica) y son los responsables de la visión de color y la agudeza visual [44, 46, 47]. La capacidad de la retina para detectar señales luminosas de muy baja intensidad se acrecienta por la convergencia de los bastones sobre una misma neurona bipolar. Los conos, por el contrario, forman un sistema poco convergente, con mayor capacidad para la discriminación espacial.

Segmento externo de los fotorreceptores y fototransducción

En los conos, el SE es corto, grueso y con un extremo afilado, mientras que en los bastones es largo y del mismo diámetro en toda su longitud (Figura 1.6). El SE de los bastones contiene una pila de unos 1000 discos aplanados. Cada disco es una estructura cerrada donde el 85% de la proteína de membrana es rodopsina, un pigmento visual sensible a 500 nm. En los conos, los discos son invaginaciones de la membrana plasmática y contienen distintas opsinas que, en el hombre, son sensibles a 560, 530 y 420 nm [48]. Las restantes proteínas necesarias para la fototransducción forman parte de la membrana discal o están asociadas a la misma. Los canales iónicos permiten transformar la señal transducida por el fopigmento en una señal eléctrica [49, 50].

Las opsinas son miembros de la superfamilia de receptores de 7 pasos transmembrana acoplados a una proteína G. Están compuestas por dos elementos: una apoproteína y un cromóforo, el 11-*cis*-retinal, que deriva de la vitamina A [51]. El 11-*cis*-retinal está incorporado como grupo prostético de la apoproteína. La fototransducción en los bastones se inicia cuando la luz isomeriza el cromóforo 11-*cis*-retinal de la rodopsina a su isómero todo-*trans*, induciendo un cambio conformacional del pigmento visual [52-54]. La forma activada de la rodopsina, R* (también conocida como metarodopsina II), cataliza el intercambio de GDP por GTP en la subunidad α de la proteína G heterotrimérica (transducina). La subunidad α de la transducina con su GTP unido se disocia de las subunidades $\beta\gamma$ y activa a una fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE), que hidroliza al GMPc. La reducción del GMPc intracelular da como resultado el cierre de los canales activados por nucleótidos cíclicos (CNGs) y la hiperpolarización de los fotorreceptores (Figura 1.7). Estos

cambios modulan la transmisión sináptica a las células bipolares e influyen sobre buena parte de la retina mediante las prolongaciones de las células horizontales. El cierre de los canales genera una reducción del Ca^{2+} intracelular que activa la enzima guanilato ciclasa y estimula la síntesis de GMPc. Al restaurarse sus niveles, el GMPc gatilla la reapertura de los canales CNGs [43, 44].

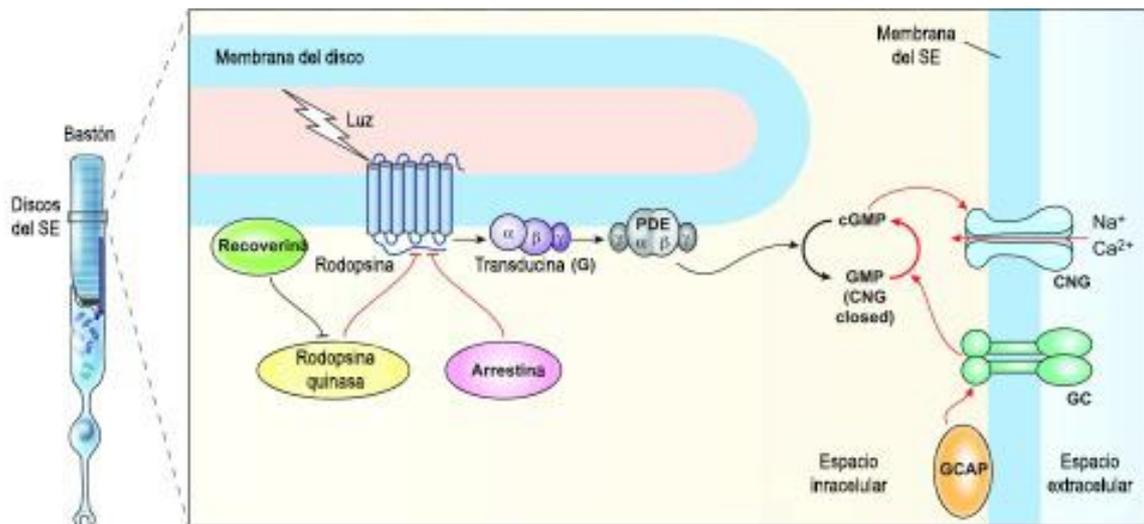


Figura 1.7. El proceso de fototransducción en los bastones. La captura de los fotones activa a la rodopsina, generando la disociación de la transducina (flechas negras), activando PDE. La terminación de la fototransducción (flechas rojas y barras en T) ocurre con la inactivación de la rodopsina. Modificado de Veleri y col. [43].

Para la regeneración de la rodopsina, el todo-*trans*-retinal se convierte en 11-*cis*-retinal mediante una serie de reacciones bioquímicas conocidas como ciclo visual o ciclo de los retinoides (ver más adelante).

La cadena de fototransducción de los conos es semejante a la de los bastones, pero la modulación de cada paso es diferente y otorga a los conos menor sensibilidad a la luz y mayor velocidad de transducción que a los bastones. Los conos se activan con intensidades de luz que saturarían a los bastones, y además mantienen su sensibilidad aún con iluminación muy brillante [55].

Epitelio pigmentario de la retina (EPR)

El EPR es una monocapa de células cúbicas pigmentadas interpuesta entre los fotorreceptores y el lecho capilar coroideo [56, 57]. Está formada por una población estable de unos 3-4 millones de células, donde cada célula interactúa con 30 a 40 fotorreceptores [58, 59]. La densidad celular es mayor a nivel de la fovea que en las áreas periféricas de la retina [27]. Con la edad, el número de células del EPR se reduce de 4000 a 2000/mm² [60-62].

Las células del EPR están altamente polarizadas: la cara basal está adherida a la membrana de Bruch, mientras la cara apical presenta microvellosidades que se extienden al espacio subretinal donde envuelven a los SE (Figura 1.8). La membrana apical contiene diversos transportadores necesarios para los intercambios entre la retina neural y el EPR. Los dominios laterales de las células EPR están unidos por zónulas ocluyentes (uniones estrechas) y zónulas adherentes, que generan una alta resistencia epitelial y mantienen la barrera hémato-retinal externa.

Las microvellosidades, junto con la matriz interfotorreceptora [63], posibilitan la adhesión entre el EPR y la retina, permitiendo simultáneamente un intenso tráfico entre ambos tejidos. La adhesión entre el EPR y la retina es un proceso activo, dependiente del transporte de agua e iones desde la matriz interfotorreceptora hacia los capilares coroideos. La relación entre el EPR y los fotorreceptores es recíproca, cuando cualquiera de las capas funciona mal, la otra también es afectada [64].

Los gránulos de melanina se localizan en las vellosidades y el citoplasma apical de las células. Absorben los fotones que llegan más allá de los SE, reduciendo su dispersión y sus posibles efectos nocivos sobre la retina neural. Las

mitocondrias se acumulan en la región basal del EPR, donde la presión de oxígeno es mayor. Los peroxisomas, lisosomas y fagosomas se distribuyen de manera uniforme en el citoplasma [27].

También se encuentran gránulos de lipofuscina, un pigmento insoluble que aparece como gránulos de color marrón. La lipofuscina deriva de la oxidación incompleta de los lípidos de las membranas y se acumula en las células envejecidas o enfermas [65].

El EPR interviene en la nutrición de la retina externa, la regeneración del pigmento visual, la fagocitosis de los discos envejecidos, en la protección contra el estrés oxidativo y el mantenimiento del privilegio inmunológico del ojo [57].

Otra de sus principales funciones es la capacidad para secretar una serie de factores de crecimiento pro-supervivencia, incluidas las neurotrofinas clásicas (NGF, BDNF y NT3) e IGF, GDNF, PEDF, CNTF, VEGF y FGF. Esta secreción a menudo está polarizada, ya sea hacia los fotorreceptores en la superficie apical (por ejemplo, PEDF) o hacia la membrana basal de Bruch (por ejemplo, VEGF) [66].

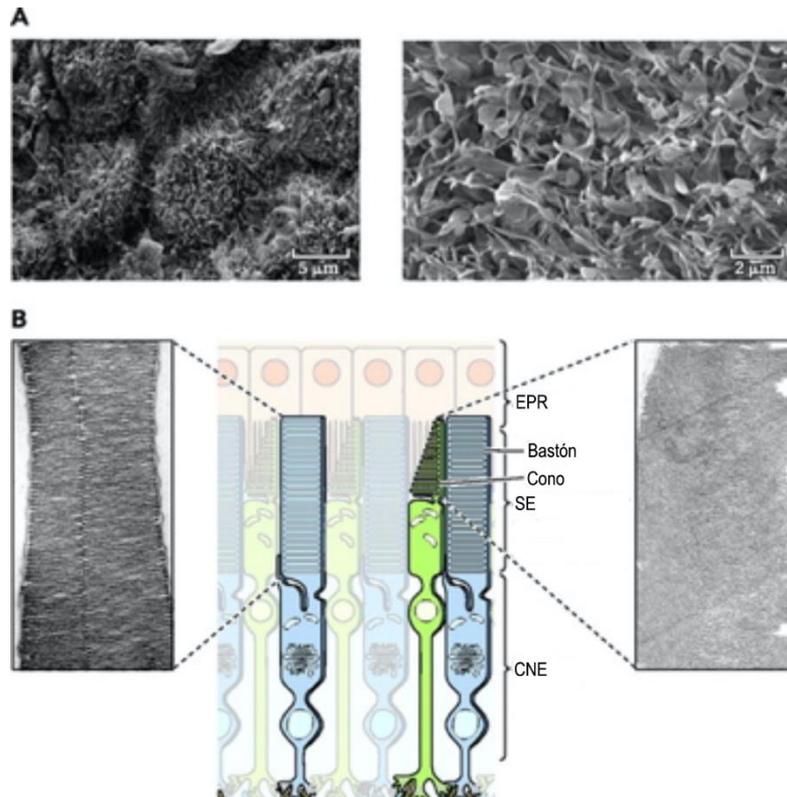


Figura 1.8. A. Micrográficas de la superficie apical del EPR, que muestran las microvellosidades con distinta magnificación. B. Representación gráfica de los conos y bastones, acompañadas por imágenes de microscopía electrónica que muestran los discos y las invaginaciones de la membrana plasmática en los bastones (izquierda) y los conos (derecha). Modificado de Kevany y Palczewski [67].

Ciclo visual

El EPR transporta retinoides desde el torrente sanguíneo y es esencial para la regeneración del 11-*cis*-retinal. Como se mencionó al describir la fototransducción, el cromóforo de la rodopsina se isomeriza a todo-*trans*-retinal por acción de la luz y es reciclado a 11-*cis*-retinal mediante el ciclo visual [27, 68].

La forma canónica o clásica del ciclo visual, común a todos los fotorreceptores, incluye los siguientes pasos: (1) El todo-*trans*-retinal es bombeado fuera de los fotorreceptores por el transportador ABCA4, se une a la proteína de unión al retinol interfotorreceptor (IRBP) y es reducido a todo-*trans*-retinol por las retinol-

dehidrogenasas RDH8 y RDH12; (2) después de difundir al EPR, el todo-*trans*-retinol es esterificado por la lecithin retinol acyltransferase (LCAT). Estos retinil ésteres son almacenados en cuerpos lipídicos denominados retinosomas; (3) la retinal pigment epithelium-specific 65 kDa protein (RPE65) forma 11-*cis*-retinol, que a su vez es oxidado a 11-*cis*-retinal por la RDH5. En estas últimas dos etapas, los retinoides son transportados por el cellular retinaldehyde-binding protein (CRALBP); (4) el 11-*cis*-retinal difunde hacia la matriz interfotorreceptora y los fotorreceptores, donde se une a una opsina para comenzar el ciclo nuevamente [69].

Existe además un ciclo visual específico de los conos, que permite a estos recuperar su sensibilidad a la luz con mayor velocidad que los bastones gracias a la rápida reposición del 11-*cis*-retinal. Las enzimas de este ciclo se encuentran en la retina neural, posiblemente en las células de Müller, y producen 11-*cis*-retinol. Esta molécula solo puede ser utilizada por los conos, que expresan una 11-*cis*-retinol dehidrogenasa [70].

Fagocitosis de fragmentos distales del segmento externo

En el ratón, los discos o invaginaciones del segmento externo se renuevan constantemente: se añaden nuevos discos a nivel del cilio, y los discos envejecidos, que han acumulado compuestos tóxicos provenientes de la foto-oxidación, se extruyen en el extremo próximo al EPR [71]. Los bastones sintetizan tres discos por hora [44], renovándose diariamente el 10% del volumen del SE [58, 72].

La extrusión de los discos de los bastones ocurre generalmente poco después del comienzo de la fase diurna y en los conos ocurre de manera semejante [67, 73]. La extrusión de las membranas envejecidas se sincroniza con la fagocitosis

en las células del EPR. El ritmo de extrusión y fagocitosis se mantiene en oscuridad permanente, hasta 12 días en la rata, pero se pierde bajo condiciones de iluminación constante. La presencia de luz, la transición oscuridad/luz y los mecanismos circadianos regulan este ritmo. En algunas especies predomina el control ambiental, mientras que en otras sobresale el control circadiano endógeno [74].

Las células del EPR contribuyen al desprendimiento de discos y son responsables de la fagocitosis y procesamiento de las proteínas y lípidos alterados por oxidación. Cada célula EPR es capaz de procesar unos 2000 discos diarios [75].

En el EPR, además de los gránulos de melanina, existen gránulos de lipofuscina, un pigmento insoluble de color amarillento-rojizo, derivado de la oxidación incompleta de los lípidos de las membranas. La lipofuscina se forma mayormente a partir de los retinoides y del ácido docosahexanoico alterados por la fotooxidación, provenientes de los fragmentos de fotorreceptores fagocitados. Entre sus componentes más notables se encuentran unos 25 bisretinoides constituidos por dos moléculas todo-*trans*-retinal conjugados de diversas maneras con fosfatidiletanolamina. Los bisretinoides actúan como sensibilizadores para el daño luminoso y contribuyen a la inflamación de bajo grado o parainflamación [65]. Los bisretinoides y la lipofuscina son destruidos por el sistema endo-lisosomal que interactúa con el sistema autofágico [72].

Los ácidos grasos altamente insaturados de la familia ω -3 y ω -6, como el ácido docosahexanoico, que es muy abundante en los SE, son fácilmente atacados por la peroxidación lipídica y forman compuestos como el carboxietil pirrol (CEP). Este último está involucrado en la activación de la vía alternativa del

complemento, la angiogénesis, la generación de autoanticuerpos y la formación de los drusen característicos de la DMAE [72]. Además, los bisretinoides son cruciales en la enfermedad de Stargard, donde una anomalía genética anula la función de una flipasa que transloca retinaldehído conjugado con fosfatidiletanolamina a través de las membranas del SE, promoviendo la acumulación de lipofuscina en el EPR [76].

Daño y neuroprotección celular en la retina y el EPR

Exposición a la luz

La exposición a la luz es inevitable ya que es parte del hábitat y los fotorreceptores la necesitan para disparar la vía de transducción de señales visuales. La luz del día irradia la retina con 0,01-0,1 mW/cm², según la hora del día, la estación, la presencia de nieve o superficies de agua, el uso de sombrero, etc. [77].

La retina humana en promedio absorbe entre 10¹² a 10¹⁵ fotones por día [78], que pueden incrementarse por la permanencia en ambientes con mucha luz. La retina se adapta a irradiación mediante mecanismos de autoprotección que incluyen: renovación de los segmentos externos, comentada más arriba; presencia de barreras de absorción, como los pigmentos de la mácula lútea; y una amplia gama de sistemas moleculares que aseguran el control del estrés oxidativo y la reparación de los daños del ADN nuclear. Una protección especial existe a nivel de la mácula, donde se acumulan la luteína y la zeaxantina, junto con su isómero meso-zeaxantina. Estos carotenoides maculares atenúan la cantidad de luz azul que incide sobre los fotorreceptores y también reaccionan con los radicales libres, actuando como antioxidantes [79].

Lesiones fototóxicas de la retina

El daño fotoquímico comienza cuando una molécula fotosensible absorbe un fotón y sufre cambios fisicoquímicos. En el ojo, las moléculas fotosensibles incluyen los pigmentos visuales y los pigmentos maculares en la retina, y la melanina en la coroides. Los cambios se transmiten a moléculas vecinas, que disipan energía en formas diversas, como la rotura de uniones químicas, el intercambio de hidrógenos y la producción de EROS. A su vez, estas moléculas reaccionan con otras vecinas, produciendo diversos cambios foto-oxidativos. Las células pueden o no reparar estas lesiones según la intensidad de la radiación y el tiempo de exposición.

La luz solar es un posible factor de riesgo para la DMAE, pero la asociación entre la exposición al sol y la DMAE es controversial, ya que es difícil de evaluar y solo se ha encontrado en algunos estudios, pero no en todos. Sin embargo, un meta-análisis basado en 14 estudios respalda un aumento del riesgo de DMAE dependiente de la exposición a la luz solar [80]. A la inversa, también se demostró una relación protectora de sombreros y anteojos [81, 82]. Otros estudios sugieren que la toxicidad de los rayos solares podría ser modificada por las dietas ricas en antioxidantes [83].

Aun en condiciones normales de iluminación, la fototransducción expone a los fotorreceptores a un considerable estrés oxidativo [84]. En los segmentos externos, la isomerización de la rodopsina aumentaría las posibilidades de peroxidación lipídica y daño a la membrana, mientras que la respiración mitocondrial aumenta el estrés oxidativo en los segmentos internos [11, 85]. Por otra parte, la luz acelera la muerte de los fotorreceptores con alteraciones genéticas [86-88].

Modelos de degeneración retinal por luz

La exposición a luz intensa es frecuentemente utilizada para el estudio de la degeneración retinal [89]. En nuestro modelo experimental, la exposición a 1500 lux durante 48 h lesiona primariamente a los bastones [90].

Los estudios en ratón muestran que después de la exposición a niveles excesivos de luz, los SE de los fotorreceptores son las estructuras más dañadas de la retina, produciéndose la muerte de estas células por apoptosis. Además, con exposiciones más intensas se agregan lesiones del EPR [11, 91].

Con frecuencia, las mutaciones de rodopsina aumentan la susceptibilidad a la luz, ya sea por exposición crónica a la luz tenue cíclica [92] o por exposición aguda a luz intensa [93]. White y col. [94] descubrieron que en los ratones con la mutación T17M de la rodopsina, que afecta a la glucosilación, los fotorreceptores morían después de solo unos minutos de tratamiento con 5000-10000 lux, un tratamiento que no afectaba a los ratones con rodopsina de tipo salvaje. Un defecto de glicosilación de rodopsina en perros (T4R) también conduce a una sensibilidad extrema a la luz [95].

Las diferencias diurnas frente a las nocturnas en la susceptibilidad al daño por luz no son exclusivas de los roedores, tal distinción también se encuentra en los primates. Se ha estudiado el daño de los fotorreceptores por luz intensa en el mono nocturno y en macacos diurnos. La exposición del mono nocturno a luz blanca (aproximadamente 0.2 W / cm^2 durante 30 minutos) fue catastrófica [96], pero causó daños insignificantes en los fotorreceptores de los macacos diurnos [97, 98].

Formas de muerte celular

La muerte celular es un proceso complejo, dónde es difícil establecer el límite preciso entre una alteración reversible en la homeostasis y una pérdida irreversible de las actividades celulares. Por ello el Comité de Nomenclatura sobre la Muerte Celular propuso que una célula se considere muerta cuando cumple cualquiera de los siguientes criterios: (1) la pérdida permanente de la función de barrera de la membrana plasmática; (2) la descomposición de las células en fragmentos discretos, que comúnmente se conocen como cuerpos apoptóticos; y/o (3) la envoltura de células por fagocitos profesionales u otras células dotadas de actividad fagocítica [99, 100].

La muerte celular puede clasificarse en dos categorías amplias, mutuamente excluyentes: "accidental" y "regulada". En la "muerte celular accidental" (MCA), las células mueren de manera incontrolable como resultado de su inmediata descomposición estructural, debido a que se encuentran expuestas a estímulos fisicoquímicos o mecánicos extremos (por ejemplo, temperaturas elevadas, altas presiones, detergentes potentes o variaciones extremas en el pH). Aunque la MCA puede ocurrir *in vivo*, como resultado de quemaduras o lesiones traumáticas, no puede prevenirse ni modularse [101]. Al morir, las células liberan cantidades elevadas de patrones moleculares asociados con el daño, es decir, moléculas endógenas con actividad inmunomoduladora (y en ocasiones citotóxicas), por lo tanto, ocurre una muerte celular lítica [101]. La necrosis es un ejemplo de MCA donde la muerte de un conjunto de células, en un organismo vivo, es provocada por un agente nocivo que causa una lesión grave que no se puede reparar. Por ejemplo, el aporte insuficiente de sangre al tejido o isquemia, la acción de sustancias químicas, o el desarrollo de una enfermedad

autoinmune. Una vez que se ha producido y desarrollado, la necrosis es irreversible [101].

La "muerte celular regulada" (MCR) puede ocurrir como parte de programas fisiológicos o puede activarse por perturbaciones del microambiente extracelular o intracelular. Los fenómenos bioquímicos que acompañan a la MCR se pueden aprovechar para clasificarla en subtipos, que a menudo exhiben características morfológicas estereotipadas. La MCR puede iniciarse como respuesta inmediata al agresor, o bien en el contexto de respuestas adaptativas que intentan (sin éxito) restaurar la homeostasis celular [101]. Existen diversos programas de MCR, entre ellos se encuentra la apoptosis que culmina en una muerte celular no lítica, por consiguiente no inflamatoria [102]. Aunque seguramente no es la única, es característica en la degeneración de la retina inducida por luz. La MCR también agrupa a vías adicionales de muerte celular similares a la necrosis, como la necroptosis, la piroptosis y la ferroptosis [103-105]. Lo que diferencia a estas formas de muerte con la apoptosis es que pueden llegar a generar la ruptura de la membrana plasmática, la lisis celular y la fuga de componentes intracelulares, que a su vez pueden propagar respuestas inflamatorias secundarias [106-108], es decir que son formas de muerte de tipo líticas [102].

Apoptosis

La apoptosis es una vía de MCR caracterizada por retracción del citoplasma, condensación de cromatina que se inicia en la membrana nuclear y que termina afectando a todo el núcleo (picnosis), fragmentación nuclear (cariorrhexis), alteraciones diversas de otros orgánulos y ampollamiento de la membrana plasmática que culmina con la formación de fragmentos rodeados por membranas denominados cuerpos apoptóticos [99, 101]. La apoptosis es

gatillada por una vía extrínseca (FAS, TNFR1, TRAIL) o por una vía intrínseca o mitocondrial [109]. Aunque aquí sólo nos referiremos a esta última vía, la evidencia reciente muestra que las vías principales de muerte celular apoptóticas están interconectadas [110].

Las proteínas de la familia BCL2 regulan la vía intrínseca de la apoptosis mediante el control de la liberación al citosol de proteínas mitocondriales que normalmente residen en el espacio intermembrana de esta organela, como el citocromo C (Figura 1.9). Algunas proteínas de la familia BCL2 son pro-apoptóticas (BAX, BID y BAK), mientras que otras son anti-apoptóticas (BCL-2 y BCL-X_L). BAX y BAK se activan en respuesta al daño del ADN u otros insultos promoviendo la muerte celular mediante la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) [111]. Las proteínas anti-apoptóticas ayudan a prevenir la liberación de las proteínas del espacio intermembranoso de la mitocondria, mediante la unión y bloqueo de las proteínas pro-apoptóticas, ya sea en la membrana mitocondrial o en el citosol [112]. El equilibrio entre las actividades de estas dos clases funcionales de proteínas de la familia BCL2 determina en gran medida si una célula vive o muere por la vía intrínseca de la apoptosis. El exceso de proteínas pro-apoptóticas hace que las células sean sensibles a la apoptosis, mientras que el exceso de proteínas anti-apoptóticas hace que las células sean resistentes [110].

Las caspasas (**cysteine-aspartic proteases**) también son esenciales para que ocurra la apoptosis. Las caspasas están presentes dentro de la célula como precursores inactivos o pro-caspasas, y generalmente son activadas mediante el clivaje del dominio “pro” por otra caspasa [110]. Esto genera una cascada de caspasas que no sólo es destructiva y autoamplificante, sino también

irreversible; una vez que una célula alcanza un punto crítico en el camino hacia la apoptosis, no puede regresar [112].

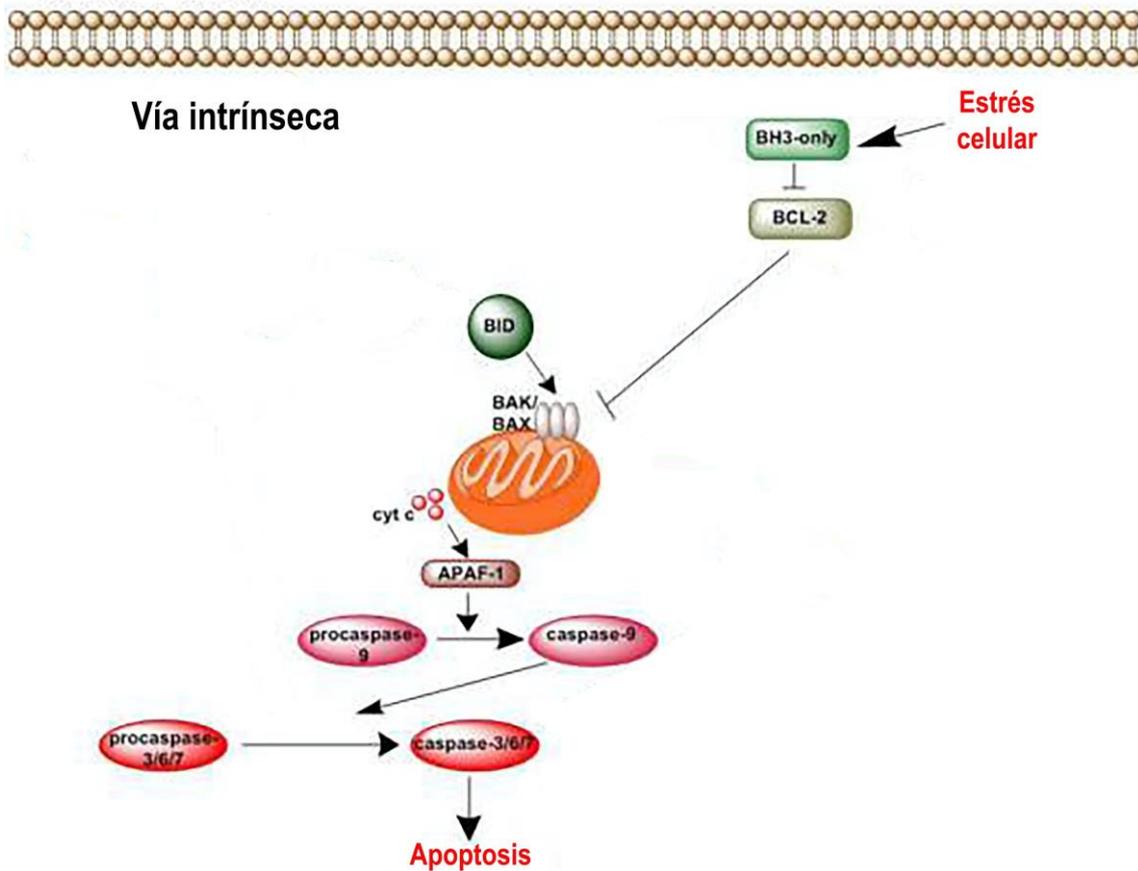


Figura 1.9. Vía intrínseca de la apoptosis. Cuando el estrés celular activa esta vía, las proteínas solo BH3 inactivan a las proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL2, lo que lleva a la MOMP por BAX y BAK resultando en la liberación del citocromo C (Cyt. C). El Cyt C forma un complejo con pro-caspasa 9 y APAF1, lo que lleva a la activación de la caspasa-9 que a su vez activa a las caspasas efectoras (caspasa-3, -6 y -7) induciendo la apoptosis. APAF1, factor de activación de la proteasa apoptótica 1. Modificado de Zaman y col. [113].

Cuando un estímulo desencadena la vía intrínseca de la apoptosis, las proteínas pro-apoptóticas de la familia BCL-2 activan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MOMP) permitiendo la liberación del citocromo C y otros factores del espacio intermembranoso mitocondrial al citosol [111]. Las

moléculas de citocromo C liberadas se ensamblan con otras proteínas formando el apoptosoma que recluta y activa una pro-caspasa iniciadora particular (pro-caspasa 9), para luego activar a las procaspasas ejecutoras (pro-caspasa 3 y pro-caspasa 7) en el citosol [114].

Una vez activadas, las caspasas ejecutoras catalizan, directa o indirectamente, eventos generalizados de escisión y degradación de proteínas y ácidos nucleicos esenciales para la vida de la célula [114]. La destrucción de proteínas nucleares y citoesqueléticas conduce a los cambios bioquímicos y morfológicos típicos en las células apoptóticas [100, 101], y al empaquetamiento de los fragmentos en cuerpos apoptóticos para su eliminación por las células fagocíticas sin generar inflamación [110].

Glucocorticoides y progestágenos

Los glucocorticoides (GC) son de gran utilidad terapéutica en diversas condiciones degenerativas de la retina, experimentales o humanas [10, 115, 116] y su efecto protector sobre los fotorreceptores ha sido demostrado en la degeneración inducida por luz y en la lesión por láser [10, 117]. Sin embargo, su mecanismo de acción es poco conocido [9-11, 13].

En ciertas formas de degeneración por luz, la activación del receptor de glucocorticoides (RG), ya sea por la elevación de glucocorticoides endógenos inducida por estrés o por la administración de agonistas, como la dexametasona o la progesterona, bloquea la apoptosis de los fotorreceptores provocada por la exposición a niveles excesivos de luz [10]. Estos autores postularon que el efecto anti-apoptótico de los glucocorticoides en la retina puede explicarse por la

supresión de la activación del factor de transcripción AP-1, señal fundamental para la muerte [118], pero esta hipótesis no pudo ser comprobada [119].

Diversos estudios han demostrado que la progesterona promueve la viabilidad de las neuronas en el sistema nervioso central (SNC) [120] y además se ha propuesto su uso en el tratamiento de lesiones traumáticas del SNC, como el daño cerebral agudo [121]. Estudios recientes han demostrado que el progestágeno norgestrel protege a los fotorreceptores de la degeneración inducida por luz o diversas alteraciones genéticas en animales de experimentación [12, 122-126]. Algunos estudios sugieren que la progesterona protege a los fotorreceptores estresados mediante un aumento en la expresión del factor de crecimiento fibroblástico [12, 126]. La progesterona también se estudió en modelos animales con otros trastornos del SNC revelando que reduce las lesiones cerebrales en derrames cerebrales, isquemia y lesiones cerebrales traumáticas (TBI) [127-129], aunque ensayos clínicos no pudieron demostrar los beneficios de la progesterona en pacientes con TBI [130, 131].

Implicancias clínicas de los glucocorticoides y progestágenos

Los glucocorticoides se prescriben ampliamente en enfermedades oftalmológicas inflamatorias y vasculares, pero el uso oftalmológico de progesterona y mifepristona es más limitado. Aunque los glucocorticoides se emplean en la retinopatía por láser o eclipse solar, su efecto sobre la supervivencia de los fotorreceptores no ha sido estudiado clínicamente [132]. La dexametasona combinada con moléculas antiangiogénicas fue ensayada en el tratamiento de la DMAE neovascular. Los resultados sugirieron un efecto sinérgico entre la dexametasona y el bevacizumab o ranibizumab [7, 133], pero los pacientes resistentes a ranizumab no mostraron sinergismo [134]. En una

combinación de triamcinolona y bevacizumab, los efectos sinérgicos solo se hicieron evidentes después de 8 meses de seguimiento [135].

Por otra parte, recientemente se ha comunicado que un paciente con edema macular diabético desarrolló epitelio patía pigmentaria paquicoroidea luego de repetidas colocaciones de implantes intravítreos de dexametasona. Con la quinta implantación evolucionó a coriorretinopatía serosa central, con desprendimientos focales en el EPR, posiblemente por el efecto acumulativo de las concentraciones locales y/o sistémicas de dexametasona [136].

Resultados experimentales sugieren que el tratamiento con progestágenos también podría ayudar a los pacientes con DMAE [121]. Sin embargo, los estudios que comparan el riesgo de DMAE en mujeres que reciben terapia de reemplazo hormonal indicaron poca [137] o ninguna [138] ventaja.

La mifepristona, un bloqueante de los efectos genómicos y no genómicos del $RG\alpha$ [139, 140] y también inhibidor de los receptores de progesterona (RP) nucleares y del componente de membrana 1 del receptor de progesterona (PGRMC1) [141, 142] pero no de los RP de membrana (mPR) [143], tiene un efecto beneficioso en algunos casos de coriorretinopatía serosa central [144]. Asimismo, se ha demostrado que inhibe la migración y la invasión de células altamente metastásicas [145], además de inhibir el crecimiento de células cancerosas de origen ovárico, mamario, prostático y glial, sin requerir la presencia de receptores de progesterona [146].

Receptores de glucocorticoides

Los GCs son hormonas esteroideas producidas por la glándula adrenal en forma circadiana, en forma dependiente de la activación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal [147, 148]. Son liberados en forma pulsátil, apareciendo los picos más

altos por la mañana, antes de despertar. Como su nombre lo indica, regulan los niveles de glucosa circulante. Son esenciales para la vida, activan la gluconeogénesis y a la vez aumentan la degradación muscular y la incorporación de glucosa a los tejidos. Los RG se expresan en casi todas las células y regulan una multiplicidad de genes implicados en el desarrollo, el metabolismo y respuesta inmune [149]. Los glucocorticoides pueden promover o bloquear los mecanismos celulares de muerte, según los fenotipos celulares afectados. Desempeñan un importante papel en la neuroprotección [150]. Intervienen en la homeostasis del SNC y regulan funciones como la cognición, la memoria, el humor y el sueño [151, 152]. También modulan la plasticidad neuronal, la supervivencia de las neuronas y las funciones sinápticas [153].

Los RG son codificados por un solo gen, el NR3C1 (receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, miembro 1). Este gen puede ser procesado de diferentes maneras: por recorte y empalme alternativo, mediante el acceso a distintos sitios de iniciación, o por diversas modificaciones postraduccionales, que originan receptores con diferente funcionalidad [149, 154]. En el humano, y en otras especies como el ratón, existen por lo menos 5 isoformas generadas por empalme alternativo y cientos de variantes génicas [155].

Principales isoformas del RG

Mediante el recorte y empalme alternativo se generan dos isoformas principales, $RG\alpha$ y $RG\beta$, que difieren en la secuencia C-terminal (Figura 1.10) [156]. Los últimos 50 aminoácidos de $RG\alpha$ son remplazados en $RG\beta$ por 15 aminoácidos diferentes. $RG\alpha$ tiene un peso de 94-kDa mientras que $RG\beta$ solo tiene 90-kDa [156-159]. La isoforma α del ratón también es de mayor tamaño que la β . Aunque el recorte y empalme del transcritto primario es diferente, los dominios C-

terminales de los receptores β humanos y murinos son casi idénticos y tienen la misma función en ambas especies [160].

Los RG tienen una organización modular, común a otros miembros de la familia de receptores nucleares. Sus principales dominios estructurales son: el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD). La unión a ligandos agonistas estabiliza el dominio LBD.

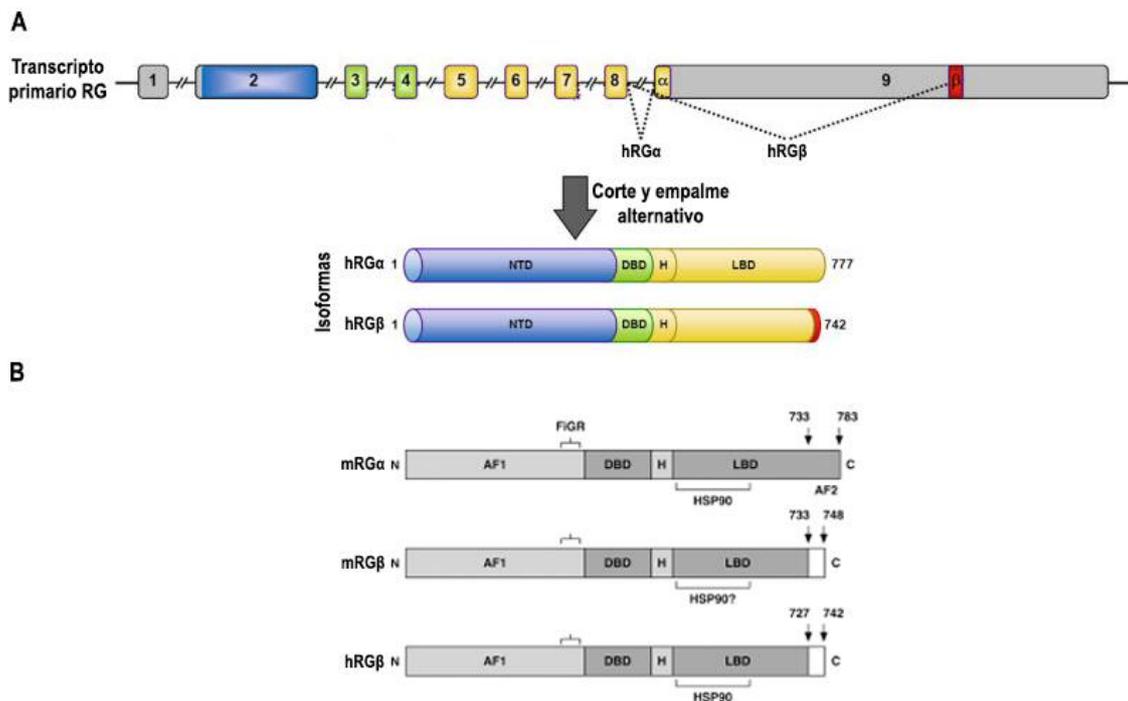


Figura 1.10. A. Transcripto primario del gen *NR3C1* humano. El dominio de transactivación NTD se encuentra en el exón 2, el dominio de unión al ADN (DBD) en los exones 3 y 4. Los exones 5-9 codifican la región bisagra (H) y el dominio de unión al ligando (LBD). En RG α el exón 8 se une al comienzo del exón 9, pero en RG β el exón 8 se une río abajo (posiciones 727–742) del exón 9. Modificado de Oakley y Cidlowski [161]. **B.** Dominios funcionales de las dos isoformas murinas (m) y el RG β humano (h). No hay grandes diferencias entre la estructura del mRG β y la forma humana. Ambos RG β carecen del dominio de activación-2 (AF-2), explicando su escasa capacidad para unirse a la hormona y activar la transcripción. HSP90, regiones de unión a esa proteína. Modificado de Hinds y col. [160].

La isoforma RG α

La isoforma RG α es la más conocida y mejor estudiada, precisamente por sus propiedades esenciales para el mantenimiento de la vida del organismo. Posee una gran afinidad para dexametasona [162] y es la responsable del efecto protector de los glucocorticoides sobre la retina [10, 13].

RG α actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando. En ausencia de este último, RG α permanece en el citoplasma asociada a complejos de proteínas chaperonas [163]. Los GC atraviesan fácilmente la membrana para unirse con los RG α citoplasmáticos libres de ligando.

El complejo RG α /GC se transloca al núcleo donde reconoce secuencias específicas del ADN (GRE) modulando la transcripción génica [164-166]. El tráfico de receptores y ligandos está fuertemente regulado por distintas proteínas chaperonas, que incluyen a la proteína del choque de calor de 90 kDa (Hsp90), a su vez asociada a otras cochaperonas: FKBP51 y FKBP52 (dos inmunofilinas que se unen a FK506), la ciclofilina 40 y la proteína fosfatasa 5 [167, 168]. La unión de la hormona al receptor induce la substitución de FKBP51 por FKBP52 [169]. Esta última facilita la translocación nuclear de los RG α , ya que los engancha a las dineínas responsables del movimiento retrógrado a lo largo de los microtúbulos [170].

En el humano el RG α se puede fosforilar en varias serinas, como por ejemplo la 203, p-Ser203-RG. El p-Ser203-RG se localiza en el citoplasma y en las regiones perinucleares, pero no en el nucleoplasma [171].

La isoforma RG β

Los cambios en la región terminal de RG β , que es más corta que en la isoforma α y presenta alteraciones del dominio de activación 2 (AF-2, Figura 1.10),

impiden su asociación con los glucocorticoides conocidos. Además, la isoforma RG β inhibe la activación de los promotores génicos dependientes de RG α , un efecto conocido como dominancia negativa, generalmente atribuida a la formación de heterodímeros RG α -RG β transcripcionalmente inactivos [172-174]. Por otra parte, se ha demostrado que RG β puede actuar como factor regulador de la transcripción y modula directamente la expresión génica en células que no contienen RG α [175-177]. La inserción de un gen RG β humano en el hígado de ratón que no expresa RG α (ratones knock-out para RG, GRLKO) modificó la transcripción de 1670 genes, 60% de los cuales fueron regulados en forma positiva. Un número mayor es modificado por la inserción de RG β en el hígado de ratón salvaje. Sin embargo, muchos de los genes regulados por RG β en los ratones GRLKO dependen de la pérdida de RG α . En ambos modelos se observó un gran aumento de las señales proinflamatorias, especialmente de aquellas asociadas a la vías del interferon β 1 y STAT1 [178].

RG β se une selectivamente a mifepristona, que antagoniza su actividad transcripcional tanto *in vitro* [177], como *in vivo* [178]. RG β tiene una localización predominantemente nuclear y se transloca totalmente al núcleo en presencia de mifepristona [177, 179]. Además, se ha demostrado que mifepristona estabiliza al receptor RG β , posiblemente aumentando su vida media y permitiendo mayores concentraciones en el núcleo [179].

Mifepristona parece unirse a RG β de la misma manera que a RG α , aunque en RG β faltan algunos de los residuos involucrados en esta interacción. A pesar de sus modificaciones, en presencia de mifepristona, el extremo C-terminal de RG β mantiene buena afinidad para los correpresores, pero no para los co-activadores.

Esto explicaría la actividad inhibitoria de mifepristona sobre los genes activados por $RG\beta$ y $RG\alpha$ [179].

El aumento de la expresión de $RG\beta$ ha sido correlacionado con la atenuación de las señales $RG\alpha$ y el desarrollo de resistencia a los glucocorticoides en diversas enfermedades inflamatorias. La expresión de $RG\beta$ y la resistencia a los glucocorticoides están aumentadas en pacientes con asma bronquial, poliposis nasal, enfermedades inflamatorias del intestino y en diversas situaciones con aumento de las citoquinas pro-inflamatorias o enterotoxinas [180, 181]. Se ha propuesto utilizar la sobre-expresión de $RG\beta$ en el músculo estriado para impedir la pérdida de masa muscular asociada al uso de glucocorticoides [182]. La relación $RG\alpha/RG\beta$ suele ser baja, pero en ciertos fenotipos, como los neutrófilos humanos, expresan altos niveles de $RG\beta$ que se correlacionan con la escasa sensibilidad de estas células frente a los corticoides [183].

En síntesis, las funciones de la isoforma $RG\beta$ son: (a) actúa como inhibidor dominante negativo de $RG\alpha$ [156] y su expresión elevada es causa de resistencia a los glucocorticoides [179]; (b) posee actividades transcripcionales intrínsecas, independientes de $RG\alpha$, tal vez moduladas por la unión a mifepristona [177, 178]; (c) estimula la transcripción de la interleuquina 6 (IL6), una citoquina proinflamatoria [183-185].

Efectos no genómicos de los glucocorticoides

Los glucocorticoides poseen efectos no genómicos mediados por el mismo $RG\alpha$, que puede interactuar directamente con proteínas blanco desde localizaciones citoplasmáticas o desde la membrana celular [186]. Estos efectos incluyen, entre otros, la inhibición de ciertos factores de transcripción como NF- κ B y AP-1 [152]. Los $RG\alpha$ pueden actuar a nivel de la membrana celular; por ejemplo, mediante

el control de la comunicación intercelular a través de uniones de hendidura en las células neuroprogenitoras, donde fosforilan la conexina C43 [187]. También se encuentran efectos no genómicos en la movilización del calcio intracelular en diversos tipos celulares [188-191], y en la reactividad del músculo liso [192, 193]. En algunas células, los efectos no genómicos pueden inducir apoptosis [194]. Los efectos no genómicos pueden o no ser modificados por la mifepristona [194].

Receptores de Progesterona

La progesterona, una hormona esteroide, es producida por los ovarios, la placenta y la glándula adrenal. Pertenece a la clase de hormonas progestágenas que poseen la capacidad de inducir la transformación secretora del útero preparado por los estrógenos. Sus efectos fisiológicos se extienden mucho más allá de la función reproductiva, ya que actúa sobre diversos sistemas, incluyendo el hueso, el corazón y el cerebro [195].

Actúa por medio de un receptor intracelular codificado por el gen NR3C3 (receptor nuclear subfamilia 3, grupo C, miembro 3). El RP regula la transcripción mediante elementos específicos de respuesta ubicados en la región promotora de sus genes blancos. Existen dos isoformas clásicas RP-B y RP-A (Figura 1.11), una forma truncada en el N-terminal [195]. Este último inhibe la transcripción mediada por RP-B y también la dependiente del receptor de estrógenos y del receptor de glucocorticoides [196]. Hay una tercera isoforma denominada RP-C que es más corta ya que posee un codón AUG adicional dentro del dominio de unión al ADN [197].

La activación transcripcional dependiente de RP es relativamente lenta, pero existen respuestas rápidas gatilladas por receptores de membrana. Los receptores clásicos pueden estar asociados a las membranas celulares o

también pueden ser activados directamente por neurotransmisores. Se conocen además dos familias de receptores no clásicos que son activados por progesterona en las membranas. Los mPR, que son proteínas de 7 pasos transmembrana, y los componentes de membrana 1 y 2 de los receptores de progesterona (PGRMC1 y PGRMC2) (Figura 1.12). Estos receptores se encuentran tanto en la periferia como en el sistema nervioso central y sus funciones solo se conocen parcialmente [198].

PGRMC1 es una molécula pequeña con múltiples dominios de señalización y se une a varias hormonas esteroideas aunque con mayor afinidad a la progesterona [199]. Los mecanismos de señalización a través de los cuales PGRMC1 puede actuar son increíblemente diversos, ya que posee múltiples proteínas asociadas, permitiendo la regulación de funciones como la reparación de daños, metabolismo de fármacos y hormonas, la supresión de la apoptosis, el tráfico de membranas y la represión de la transcripción génica.

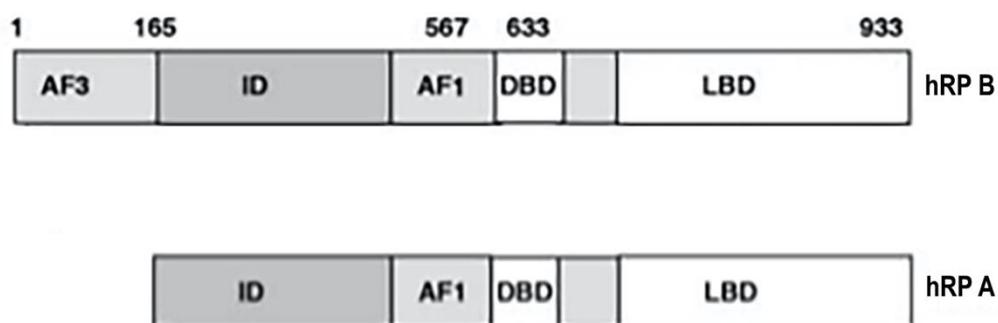


Figura 1.11. Esquema del receptor intracelular de progesterona. Se indican los dominios funcionales de RP-B y RP-A, el dominio de unión al ADN (DBD) y el dominio de unión al ligando (LBD). AF-3, -1 y -2 son funciones de activación. ID es un dominio inhibitorio operativo en RP-A. Modificado de Chabbert-Buffet y col. [200].



Figura 1.12. Esquema del componente de membrana 1 del receptor de progesterona. TM, dominio transmembrana; cyt b5, dominio citocromo b5; SH2 y SH3, dominios de homología de Src; *, sitios de unión a quinasas y de fosforilación; KXX, motivo de retención del retículo endoplásmico. Modificado de Gellersen y col. [201].

PGRMC1 se expresa de manera abundante en los fotorreceptores, y se postula que forma parte de la vía de neuroprotección por progesterona en la retina [12]. Estructuralmente PGRMC2 es similar a PGRMC1, pero su papel en la señalización de progesterona aún no está claro [12, 202].

Objetivos Específicos

Esta Tesis busca determinar las acciones de glucocorticoides, progestágenos y mifepristona en la supervivencia de los fotorreceptores y del EPR. Sus objetivos específicos son:

- A. Comparar los patrones de daño de los fotorreceptores murinos provocados por mifepristona o por exposición a luz excesiva. Evaluar en cada modelo la expresión de marcadores de daño y moléculas reguladoras de muerte celular en dichos modelos de injuria, y su respuesta a la administración de glucocorticoides o progestágenos (ver Capítulo 3).
- B. Determinar la expresión y distribución de los receptores $RG\alpha$ y $RG\beta$ en la retina de ratón en los diferentes modelos experimentales (ver Capítulo 4).
- C. Estudiar la respuesta de las células ARPE-19 ante la administración de glucocorticoides, progestágenos o mifepristona (ver Capítulo 5).
- D. Relacionar dichas respuestas con la expresión de genes relacionados con las vías asociadas a procesos neurodegenerativos (ver Capítulo 6).

Capítulo 2

Materiales y Métodos

Animales de Experimentación

Se utilizaron ratones macho de la cepa Balb/c de 5-7 semanas. Fueron criados bajo condiciones de iluminación estándar de ciclos de luz/oscuridad, de 12 hs por etapa, con niveles máximos de iluminación de 60 lux. Los animales permanecieron 24 hs en completa oscuridad antes de ser separados al azar en los diferentes grupos, debido a que la sensibilidad a la injuria es modificada por los niveles de iluminación previos a la injuria; por ejemplo, es mayor el daño cuando la exposición comienza durante la etapa de oscuridad [203]. Todos los experimentos comenzaron al mediodía, y terminaron a la misma hora, salvo para las muestras de medianoche. Al finalizar los experimentos, los ratones fueron sacrificados con inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (500 mg/kg). Todos los procedimientos se realizaron según las recomendaciones para el uso de animales en investigaciones oftalmológicas provistos por la “Association for Research in Vision and Ophthalmology” (ARVO), y fueron aprobados por el Comité de Bienestar Animal FCB, 2014 y 2015.

Modelos *in vivo*

Se utilizaron dos modelos de degeneración de la retina, uno mediante la administración de mifepristona y otro por iluminación excesiva (1500 lux).

La mifepristona es un antagonista de los RG que induce selectivamente la muerte de los fotorreceptores, aún en condiciones normales de iluminación (≤ 60

lux) [13, 204]. En estos experimentos, los animales recibieron una única dosis de mifepristona subcutánea (10 mg/kg, Sigma-Aldrich, St. Louis MO, EE. UU.), usando propilenglicol como vehículo (V). Luego de 1 h se les administró un suplemento de glucosa para prevenir una condición similar al estrés [13]. Los animales controles recibieron un volumen similar de V, que no afecta los parámetros estudiados [13].

Para producir la degeneración inducida por luz, los animales fueron ubicados en cajas de vidrio transparente colocadas en un módulo de iluminación regulada. El módulo cuenta con un tubo fluorescente de luz blanca (OSRAM L58W/daylight) y paredes blancas que reflejan la luz. Se midió la cantidad de iluminación en el módulo para que haya 1500 lux a nivel del piso de las cajas. La temperatura interna se mantuvo mediante un sistema de recirculación de aire con 20 cambios por hora. Solamente se dispusieron dos animales por caja para evitar que el agrupamiento durante el sueño interfiera con la exposición de la retina a la luz. El tiempo de exposición de los ratones a 1500 lux fue de 48 hs continuas, salvo aclaración.

Un tercer grupo estuvo bajo iluminación estándar (12 hs luz: 12 hs oscuridad) con inversión de los períodos de luz y oscuridad durante una semana, y fueron sacrificados entre las 18 y 20 hs para simular el estado de la retina a la medianoche estándar (24 hs). Un último grupo de ratones se sometió a oscuridad prolongada (OP) durante una semana. Los animales de los dos últimos grupos fueron anestesiados en oscuridad (luz roja tenue) y perfundidos con los ojos tapados para asegurar que no tuvieran contacto con la luz.

Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos fueron aplicados mediante inyecciones subcutáneas. Las drogas utilizadas fueron, progesterona (P; 1 o 4 mg/kg/día) de Schering Argentina (“Proluton”) o Sigma-Aldrich (P0130); promegestona (PMG, R5020, 0.5 mg/kg/día), un agonista específico del receptor de progesterona [205], de Perkin Elmer, Boston, MA; y dexametasona (D; 1 o 4 mg/kg/día) de Sidus, Buenos Aires, Argentina. Las soluciones stock de los esteroides se prepararon en etanol absoluto y luego se realizaron diluciones en solución salina (0,9% NaCl).

Los ratones recibieron la primera dosis de esteroides al mismo tiempo que la inyección de mifepristona o al principio de la exposición a luz. La dosis se repitió a las 24 hs. Para evaluar la supervivencia de los fotorreceptores mediante la coloración de rojo neutro de cortes histológicos, los animales fueron sacrificados luego de 5 días en condiciones estándar, para el resto de los ensayos se los sacrificó a las 48 hs. Los animales controles recibieron volúmenes similares del V al mismo tiempo que los tratados.

Cultivo Celular

Se utilizaron cultivos celulares de ARPE-19, de la American Type Culture Collection, una línea celular proveniente de epitelio pigmentario humano. El medio de cultivo fue DMEM/F12 (Life Technologies, Invitrogen, Argentina) que contiene 2,5 mM de L-glutamina, 100 U/ml de estreptomina/penicilina y 10% de suero fetal bovino (SFB; NATOCOR, Córdoba, Argentina), en atmósfera de aire con 5% de CO₂ a 37°C.

Tratamientos farmacológicos

Las drogas utilizadas en los tratamientos farmacológicos de los cultivos fueron: dexametasona base (D; 0,08, 0,32, 0,64 o 1,28 mM; Parafarm, CABA, Argentina); dexametasona 21-fosfato (D; 0,08, 0,32, 0,64 o 1,28 mM; Parafarm, CABA, Argentina); mifepristona, un inhibidor de los receptores $RG\alpha$ y RP (M; 1, 10 o 50 μ M; Sigma-Aldrich) y levonorgestrel (Levo; 1,27, 2,54 o 5,08 μ M; Sigma-Aldrich), una progestina sintética con alta afinidad de unión al RP. Todas las drogas se disolvieron en etanol absoluto seguido de diluciones seriadas en medio de cultivo (DMEM/F12). En todos los casos se hicieron controles con medio completo con y sin el agregado de etanol absoluto en las concentraciones apropiadas. Los tratamientos se realizaron 48 hs después del plaqueo de las células, con un porcentaje de confluencia del 80%, durante 24 hs. Luego de este período las células se procesaron para cada procedimiento utilizado.

Procedimientos

Muestras de Animales

Fijación de los tejidos

Los animales, una vez anestesiados profundamente con hidrato de cloral, fueron perfundidos por vía transcardíaca con paraformaldehído (4 g/100 ml) en solución buffer fosfato al 0,1 M y pH 7,3, mediante una bomba de jeringa (Orion Sage M 361).

Enucleación y criopreservación

A fin de obtener secciones histológicas orientadas en forma paralela al ecuador, se marcaron con tinta los cuadrantes dorsolaterales de los globos oculares antes

de la enucleación. Luego se extrajo el cristalino. Para lograr una apropiada criopreservación, los ojos fueron almacenados a 4°C toda la noche en sacarosa 5%, y luego se los dispuso en soluciones crecientes de sacarosa, 7,5, 10 y 15% por una hora cada uno, hasta sacarosa 20% dónde se los conservó hasta su utilización [206].

Cortes por congelación

El tejido fue incluido en el compuesto “Optimal Cutting Temperature” (OCT, Biopack), y congelado en acetona enfriada por nitrógeno líquido. Cada taco contenía un ojo control y uno experimental, dispuestos en forma tal de obtener cortes paralelos al ecuador. Se utilizó un criostato Microm (HM 500 OM) para obtener cortes de 8 a 10 μm de espesor. Los cortes fueron montados en portaobjetos gelatinizados y secados a temperatura ambiente por al menos 90 minutos antes de su utilización.

Coloración con rojo neutro y cuantificación del daño

Para valorar el daño sufrido por las retinas expuestas a la luz o a mifepristona con y sin tratamiento de hormonas esteroideas, se obtuvieron cortes que fueron coloreados con Rojo Neutro para medir el espesor de la capa nuclear externa, que contiene los núcleos de los fotorreceptores [207].

Luego de sacrificar a los animales y marcar la región dorsolateral, los ojos se dispusieron en el fijador de Davidson toda la noche a temperatura ambiente [208], y luego se criopreservaron como se explicó más arriba.

Se obtuvieron secciones de 8 a 10 μm de espesor, que una vez secadas a temperatura ambiente, fueron lavadas 5 minutos, 2 veces, en agua destilada. Luego los cortes se cubrieron con Rojo Neutro (Sigma-Aldrich) al 0,2 % en agua

destilada por 8 minutos. Finalmente se sumergieron en alcoholes de concentración creciente (70-100%), se aclararon en xilol y se montaron en Bálsamo de Canadá.

Para valorar el daño sufrido en las distintas zonas de la retina se utilizaron fotos (Nikon DS-5Mc digital camera, Microlat, Argentina, a X4 magnificación con 2560 × 1920 pixels) de 4 cortes seriados no consecutivos, paralelos al ecuador del ojo que incluían los hemisferios temporal y nasal, y el nervio óptico. Se midió la capa nuclear externa a intervalos de 250 µm hacia ambos lados del nervio óptico en un total de 16 cortes por tratamiento (4 cortes por ojo de 4 ojos diferentes), usando Adobe Photoshop CS4 Extended (Adobe, San Jose, CA). Estos datos se mostraron como "spider graphs". Los cortes fueron analizados por un investigador que desconocía el tratamiento aplicado a cada muestra.

Inmunohistoquímica

Los ojos fueron seccionados como se describió previamente. Luego de dejar secar por 90 minutos, los cortes fueron lavados dos veces en PBS 1X durante 5 minutos en cada caso. A continuación, fueron deslipidizados en alcoholes de concentraciones crecientes (70-100%, 2 minutos en cada caso) hasta llegar a xilol (3 minutos en cada caso), e inmediatamente se los rehidrató en alcoholes 100 y 96%. Seguidamente, se bloqueó la peroxidasa endógena con una mezcla de alcohol 96% y peróxido de hidrogeno (0,5 % v/v) durante 20 minutos, y finalmente se completó la rehidratación en alcoholes de concentraciones menores (96-70%) hasta llegar nuevamente a PBS 1X. Finalmente, se bloquearon con albúmina de suero bovino al 2%.

Posteriormente, se procedió a la incubación con el anticuerpo primario de interés (Tabla 2.1) durante toda la noche en cámara húmeda a 4°C, y luego se los incubó

con el anticuerpo secundario correspondiente durante 1 h a temperatura ambiente. Después, se procedió a la detección de la marcación con procedimientos inmunoenzimáticos (complejo avidina-biotina-peroxidasa, Vector Elite Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU), revelado con diaminobencidina amplificada por níquel [209]. En algunos casos se les realizó una contra-tinción con Rojo Neutro, como se describió anteriormente, para marcar los núcleos. La observación se realizó con un microscopio Nikon DS-5Mc digital camera (Microlat) o con un Leica DM500 con una cámara ICC50 E (Bio-Optic, Argentina). El diluyente primario reemplazó el anticuerpo primario en los controles negativos.

Inmunofluorescencia

Los cortes fueron procesados como se explicó más arriba. Después de la incubación con el anticuerpo primario de interés (Tabla 2.1), los cortes fueron cubiertos con los anticuerpos secundarios correspondientes (Alexa Fluor®488 o Alexa Fluor®546; Sondas Moleculares; Invitrogen, Oregon) durante 1 hora a temperatura ambiente, y montados en PBS-glicerol 1:1. Los resultados se fotografiaron con un microscopio Nikon DS-5Mc digital camera (Microlat) o con un microscopio confocal Zeiss LSM510.

Fragmentación del ADN

Los cortes obtenidos por criostato se dejaron secar a temperatura ambiente. Se utilizó el sistema FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Fluorescent - TdT Enzyme (Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los cortes fueron sumergidos 15 minutos en paraformaldehído 4%, lavados durante 15 minutos en solución salina tamponada con TRIS 1X (TBS, pH 7,6) y colocados en cámara húmeda. Luego fueron

permeabilizados con proteinasa K 1% en Tris 1 M por 10 minutos, lavados en TBS, mantenidos en buffer de equilibrio 1X por 10 minutos, e incubados a 37°C con TdT labeling reaction mixture. Finalmente se realizaron lavados con TBS 1X a temperatura ambiente y los cortes se montaron con el medio de montaje del kit. Los especímenes fluorescentes fueron observados con un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E800 con una cámara digital Nikon DS-5Mc.

Aislamiento de retinas para western blot

Antes de la eutanasia, los ratones permanecieron en oscuridad completa por 1 h para facilitar la separación de la retina neural y el EPR. Se utilizaron 6 retinas para cada extracto. Luego de sacrificado el animal, se disecaron las retinas en solución fisiológica, y luego se pasaron a una solución tamponada con 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 65 mM NaCl, 1% Triton X-100, cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y 1 mM de ortovanadato de sodio (Na₃VO₄, Sigma-Aldrich).

Cuando se extrajeron retinas para evaluar rodopsina, los ratones permanecieron en oscuridad por 3 hs antes de la eutanasia. Las retinas se extrajeron en un cuarto oscuro con luz roja tenue y se las dispuso en una solución tamponada con 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 65 mM NaCl, 1% Triton X-100, cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y 1 mM de ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich), luego se pipeteó la muestra para disgregar la retina y se la dejó toda la noche a 4°C, siempre protegidas de la luz con papel de aluminio. Al día siguiente, se las centrifugó a 14000 rpm por 15 minutos a 4°C, y se utilizó el sobrenadante para medir rodopsina.

Se utilizó el método de Bradford (Sigma-Aldrich) para cuantificar los niveles de proteínas totales en los homogenatos [210]. Seguidamente, se mezcló una

alícuota de la muestra con Buffer Laemmli 2x (Sigma-Aldrich), y se hirvió 5 minutos a 99°C, con agitación constante, 300 rpm, para desnaturalizar proteínas. Finalmente se sembraron las muestras, a razón de 20 µg de proteína por calle, en geles de SDS-PAGE para separar los extractos mediante electroforesis (120 v, 120 minutos; BioRAD, Canton, MA). La proteína separada fue transferida (100 v, 90 minutos) a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Todos los elementos utilizados para la transferencia fueron sumergidos en buffer de transferencia antes de su utilización.

Una vez terminada la transferencia, se incubaron las membranas toda la noche a 4°C con albúmina al 5% (Sigma-Aldrich) para bloquearla. Luego, se lavaron 5 minutos con Tween-TBS (Tween 20 1% en TBS 0,01 M) para finalmente ser incubadas con los anticuerpos primarios deseados (Tabla 2.1) overnight a 4°C. Posteriormente se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno con Tween-TBS (Tween 20 1% en TBS 0,01 M) e inmediatamente fueron incubadas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa o biotinilados (Sigma-Aldrich), apropiados para cada caso, durante 1 h a temperatura ambiente con agitación constante. Cuando se utilizaron anticuerpos secundarios biotinilados se procedió al lavado de las membranas con Tween-TBS y a la posterior incubación con Extravidina-Peroxidasa (Sigma-Aldrich) durante 1 h con agitación constante. Finalmente, tanto para secundarios conjugados con peroxidasa o biotinilados, se realizaron 3 lavados de 10 minutos cada uno con Tween-TBS (Tween 20 1% en TBS 0,01 M) y dos lavados con TBS 0,01 M. Las membranas fueron reveladas por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech) y expuestas a placas sensibles (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ).

Para hacer el control de carga, las membradas fueron lavadas y reincubadas con anticuerpo contra β -actina, y se siguió el procedimiento antes descripto. Para analizar los resultados se utilizó el software Image J con el cual se midió la densidad de píxeles por banda. Los resultados se presentan como la relación entre la proteína de interés vs β -actina.

Tabla 2.1: Anticuerpos primarios y otros marcadores fluorescentes

Anticuerpo	Tipo	Origen
Alexa Fluor™ 546 Phalloidin		(A22283) ThermoFisher Scientific, Waltham, MA.
BAX	Monoclonal de ratón	(556467) BD Pharmingen.
BCL-X _L	Policlonal de conejo	(B9304) Sigma-Aldrich.
BCL2	Policlonal de conejo	(1017-1) Epitomics Inc., California
BID	Policlonal de conejo	(sc-11423) Santa Cruz Biotechnology, Inc. Dallas, TX.
Caspasa-3 clivada (CASP3)	Policlonal de conejo	(9661) Cell Signaling Technology Inc., Danvers, MA.
CRALBP	Monoclonal de ratón	(ab15051) Abcam Inc., Cambridge, MA, Reino Unido.
FKBP52	Policlonal de conejo	M. D. Galigniana, Laboratorio de Receptores Nucleares, IBYME-CONICET, Bs. As.
GAPDH	Monoclonal de ratón	(6C5, sc-32233) Santa Cruz Biotechnology, Inc.
GFAP	Monoclonal de ratón	BioGenex, San Ramon, Ca

Anticuerpo	Tipo	Origen
p-Ser203-RG α	Policlonal de conejo	M. Garabedian, Dept. of Microbiology and Urology, NYU School of Medicine, NY 10012.
p-H2AX	Monoclonal de conejo	(ab2893) Abcam Inc.
RG total	Policlonal de conejo	N499 (raised against hGR 1-499), M. Garabedian.
RG α	Policlonal de conejo	J. A. Cidlowski, Laboratory of Signal Transduction, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, NC.
RG β	Policlonal de conejo	J. A. Cidlowski.
Rodopsina	Monoclonal de ratón	(B6-30) J. Nathans (School of Medicine, Johns Hopkins University, Baltimore, MD).
RP	Policlonal de conejo	(sc-538) Santa Cruz Biotechnology, Inc.
RP	Monoclonal de conejo	(8757) Cell Signaling Technology Inc.
RPE65	Monoclonal de ratón	(ab13826) Abcam Inc.
β -actina	Monoclonal de conejo	(A2103) Sigma-Aldrich.
β -tubulina III	Monoclonal de ratón	(60100) Stemcell Technologies, Vancouver, Canadá

Aislamiento de segmentos externos para western blot

Se utilizó el procedimiento descrito por otros autores [211]. Brevemente, los animales fueron anestesiados y luego se enuclearon los ojos. Los globos

oculares fueron rápidamente disecados para remover las retinas a través de una incisión en la cámara anterior y las mismas fueron sumergidas en 0,2 ml de una solución tamponada que bloquea fosfatasas y quinasas (7,6 mM Na₂HPO₄, 2,4 mM NaH₂PO₄, pH 7,2, 50 mM NaCl, 50 mM NaF, y 10 mM EDTA). Los segmentos externos se desprendieron de la retina por pipeteo/agitación. Después se centrifugó 1 minutos a 300 g a 4°C, y se guardó el sobrenadante. El pellet fue resuspendido en 0,2 ml de la solución tamponada, repitiéndose el procedimiento. Finalmente se mezclaron los dos sobrenadantes.

El sobrenadante total se centrifugó a 16.000 g por 2 minutos, a 4°C, obteniéndose un pellet que contenía los segmentos externos. Estos fueron resuspendidos en buffer RIPA (Abcam), cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich) y 1 mM de ortovanadato de sodio (Sigma-Aldrich). Finalmente fueron almacenados a -30 °C hasta su utilización. Los extractos se utilizaron para la técnica western blot, ejecutada como se describió previamente para las muestras estándar.

Muestras de ARPE-19

Ensayos de muerte celular y viabilidad

Para estos estudios se sembraron 10.000 células/well en una placa de 96 pocillos que fueron expuestos a dexametasona, levonorgestrel o mifepristona durante 24 hs. La muerte celular se evaluó mediante la tinción con una mezcla de Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio (AO/EB). Este procedimiento permite la identificación de células vivas/muertas y discrimina entre células apoptóticas y necróticas [212]. Después de lavar en solución salina tamponada con fosfato 0,01 M (pH 7,4), las células se trataron con una solución de AO y EB en partes iguales (2 µg/ml). Luego se estudiaron con microscopía de fluorescencia (Nikon

E800 con una cámara digital Nikon DS-5Mc). AO penetra en células vivas y células muertas, mientras que EB sólo llega a las células muertas que han perdido la integridad de la membrana. Las células vivas aparecen uniformemente verdes. Las células de tipo apoptóticas presentan cromatina condensada o fragmentada, con puntos verdes brillantes o de color naranja, indicando la penetración del EB. Las células con características necróticas también presentan cromatina naranja, pero sin condensación de la cromatina [212].

La viabilidad se evaluó mediante el ensayo de MTT [3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) - 2,5-difeniltetrazolio]. Se utilizó una solución madre de MTT de 5 mg/ml en PBS. Se eliminó el medio de los cultivos, reemplazándolo por una dilución 1:10 de la solución madre durante 4 hs a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ en aire. Después de la incubación y una vez extraída la solución de MTT, las células se suspendieron en 150 µl de isopropanol/HCL 0,04 N, y se midieron a 550 nm utilizando el fotómetro de microplacas Multiscan FC (Thermo Scientific 1.00.79).

Western blot

Se sembraron células ARPE-19 en placas de cultivo de plástico de 10 cm a una densidad de 12.000 células / cm². Las células se recogieron en PBS y se lisaron con dodecilsulfato sódico (SDS) al 2%, ortovanadato de sodio 1 mM (100 µl / 350000 células) e inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich). Cantidades iguales de la muestra resultante (20 µl) se resolvieron en geles de poliacrilamida con el mismo protocolo descrito anteriormente para los extractos de retina. Los anticuerpos utilizados se enumeran en la tabla 2.1.

Inmunofluorescencia

Las células se sembraron en cubreobjetos de 18x18 mm a razón de 30.000 células por cubreobjetos. Después de lavar con PBS 1X, se fijaron con

paraformaldehído al 4% durante 20 minutos. Se permeabilizaron con PBS/Triton X-100 al 0,1% durante 5 minutos y luego se bloquearon durante 1 h con 2% de albúmina de suero bovino en PBS. La incubación con anticuerpos primarios (Tabla 2.1) se llevó a cabo durante la noche en solución de bloqueo. Se utilizaron anticuerpos secundarios Alexa Fluor®488 o Alexa Fluor®546 (Thermo, Invitrogen, OR) durante 2 hs en solución de bloqueo. Las preparaciones se incubaron en 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 2 µg/ml durante 5 minutos para la detección de ADN, se montaron en PBS-glicerol 1:1 y se fotografiaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon E800 con una cámara digital Nikon DS-5Mc).

Extracción de ARN y PCR en tiempo real (qPCR)

Se sembraron placas de cultivo de 10 cm con 800.000 células / placa. Una vez concluido el experimento, se extrajo el ARN con el General RNA Extraction kit (R1051, Dongsheng Biotech, Guangdong, China). La concentración de ARN se determinó espectrofotométricamente mediante los equipos GeneQuant1300 o NanoDrop One (Thermo Scientific).

El ADNc se sintetizó a partir de 1 µg de ARN total utilizando la transcriptasa inversa Superscript II (Thermo, Invitrogen, Carlsbad, CA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para evaluar los niveles de expresión de ARNm, el ADNc se amplificó utilizando el ciclador Stratagene Mx 3005P. El cálculo de la expresión de los genes de interés se llevó a cabo mediante cuantificación relativa (método $\Delta\Delta C_t$). Las muestras fueron sembradas en placas de 96 pocillos junto con la mezcla de reacción SYBR Green PCR Master Mix (ThermoFisher) y los cebadores específicos (volumen final 25 µl). Los cebadores (Tabla 2.3) fueron diseñados mediante Primer Blast y sintetizados por ThermoFisher (Invitrogen). Los parámetros de ciclado fueron:

- 1 ciclo de: 10 minutos a 95°C.
- 50 ciclos de: 30 segundos a 95°C, 1 minuto a 58°C y 1 minuto a 60°C.
- 1 ciclo de: 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 56°C y 30 segundos a 95°C.

Los niveles de ARN de interés se normalizaron contra los de GAPDH de la misma muestra. Cada reacción se realizó por duplicado o triplicado, y se construyeron curvas de disociación para cada ARN para verificar la amplificación de un único producto. La cantidad relativa del producto de PCR de los cultivos control se estableció en 1. Se efectuó un control negativo en cada ensayo y para cada cebador.

Tabla 2.3: Cebadores para ARNs humanos utilizados para qPCR

ARNm (humano)	Cebador sentido (5'-3')	Cebador anti-sentido (5'-3')
CRALBP	AAGTCACAACCTTGGCCCTGAC	AGGGATCTGCTTTCTCTGTCC
GAPDH	GGGGCTGCCCAGAACATCAT	GCCTGCTTCACCACCTTCTTG
RG α	CATTGTCAAGAGGGAAGGAAACTC	TTAAGGAGATTTTCAACCACTTCATG
RG β	CAGAACTGGCAGCGGTTTTATC	AATGTGTGAGATGTGCTTTCTGG
RPE65	TTTACCACCTGTTTGATGGGC	AGTGCGGATGAACCTTCTGTG

Paneles de expresión génica neuropatológica

Este procedimiento permite la medición digital de la expresión génica, proporcionando recuentos simultáneos de hasta varios cientos de transcritos de ARNm únicos, en una reacción de hibridación múltiple sin necesidad de amplificación o conversión a ADNc. Para nuestro estudio utilizamos el “Human

Neuro pathology Panel” (Nanostring, Seattle, WA) que detecta genes involucrados en la apoptosis y la supervivencia celular.

Este procedimiento se realizó en colaboración con el laboratorio de transducción de señales a cargo del Dr. John A. Cidlowski ubicado en el National Institute of Environmental Health Sciences (NIEHS/NIH), Durham, NC, EE. UU. La extracción de ARN se realizó como se explicó anteriormente. Luego de cuantificar el ARN, se adicionó 0,1 volúmenes de acetato de sodio 3 M (pH 5,2) y 2,5 volúmenes de etanol absoluto, almacenando los extractos a -80°C hasta su envío. Al recibir las muestras, los investigadores del NIEHS precipitaron el ARN mediante diversas centrifugaciones y lavados con etanol 70%, para finalmente suspenderlo en agua tratada con dietilpírocabonato (DEPC), y proceder con el análisis multiplex.

Estadística

Las comparaciones estadísticas se calcularon con GraphPad Prism 6.00 para Windows (GraphPad Software, San Diego CA; www.graphpad.com). Las pruebas utilizadas se indican en los Capítulos correspondientes. Los métodos empleados para analizar la expresión del Neuro pathology Panel (NanoString) se describen en el Capítulo 6.

Capítulo 3

Glucocorticoides y progestágenos en la supervivencia de los fotorreceptores

Los glucocorticoides modulan la muerte celular programada en forma específica para cada tejido y fenotipo celular utilizando diversas vías de señalización. Son actores clave en la lucha entre la supervivencia y la muerte celular, que se sabe pueden ser pro- o anti-apoptóticos según el fenotipo celular [213]. Su efecto protector sobre los fotorreceptores de la retina ha sido ampliamente estudiado [10, 11] y numerosas evidencias muestran que la dexametasona mejora la supervivencia de los fotorreceptores en la degeneración experimental de la retina [9, 10, 14, 214]. BCL-X_L es un factor anti-apoptótico y parece ser la molécula que determina la respuesta celular a los corticoides [215] ya que aquellas células que mejoran su supervivencia en presencia de glucocorticoides muestran aumentos en la expresión de BCL-X_L [215, 216]. Curiosamente, este regulador es el miembro predominante de la familia BCL2 en la retina [217]. La acción protectora de los glucocorticoides fue asociada con la represión de la actividad del complejo AP-1 [10].

La progesterona y los progestágenos también apoyan la supervivencia de los fotorreceptores [5, 12], incluida la neuroprotección a largo plazo de los conos [125]. Se sabe que la retina de los mamíferos tiene la capacidad de formar sus propios neuroesteroides, como la progesterona, a partir del colesterol [121], por lo que se considera que podría utilizarse como un tratamiento para diversas enfermedades.

La mifepristona, un antagonista de los receptores de glucocorticoides y progesterona, no solo agrava la degeneración de fotorreceptores inducida por la luz sino que también provoca la muerte aguda de fotorreceptores en ratones [13, 14, 204].

A fin de explorar un potencial tratamiento para emplear en las degeneraciones de la retina, como la DMAE o la retinopatía diabética, comparamos los efectos protectores de la dexametasona y la progesterona en retinas murinas lesionadas por mifepristona o expuestas a iluminación excesiva (1500 lux).

Resultados

Supervivencia de los fotorreceptores dañados por mifepristona o luz

Para evaluar la supervivencia de los fotorreceptores se estudiaron lesiones producidas por mifepristona o iluminación excesiva con o sin tratamiento esteroideo (ver Capítulo 2). Los animales recibieron el tratamiento durante dos días y luego se recuperaron bajo condiciones estándar de iluminación durante otros 5 días debido a que 7 días después de la lesión, la CNE solo contiene los núcleos de los fotorreceptores sobrevivientes. El espesor de la CNE después de la coloración nuclear con Rojo Neutro representa la cantidad de núcleos de fotorreceptores. Dada la existencia de diferencias regionales en el número de fotorreceptores, se utilizó en todos los casos un plano definido de corte, tal como se describió en el Capítulo 2.

En las retinas sanas, la CNE tenía un grosor de $60 \pm 2,1 \mu\text{m}$ en las regiones más cercanas al nervio óptico, reduciéndose gradualmente a aproximadamente $50 \pm 1,8 \mu\text{m}$ en la retina periférica. Después del daño por mifepristona, el espesor de la CNE disminuyó a $25 \pm 1,6 \mu\text{m}$, sin diferencias entre el centro y la periferia. Por

el contrario, la exposición a la luz determinó una pérdida asimétrica de los núcleos de los fotorreceptores, que prácticamente desaparecieron en la retina central y disminuyeron en la retina temporal con respecto a la nasal (Figura 3.1). A pesar de la diferente distribución, la proporción total de núcleos supervivientes fue semejante después de mifepristona o exposición a la luz (mifepristona $43 \pm 0,52\%$; luz $35 \pm 3,4\%$) (Tabla 3.1). Los tratamientos con 4 mg/kg de dexametasona o progesterona (D4 o P4, respectivamente) permitieron la supervivencia de más del 89% de los fotorreceptores en ambos modelos, mientras que 1 mg/kg de progesterona (P1) recuperó el espesor de la CNE control en el daño por mifepristona ($85 \pm 3,1\%$) pero no en el daño por luz ($50 \pm 0,19\%$) (Figura 3.1 y Tabla 3.1).

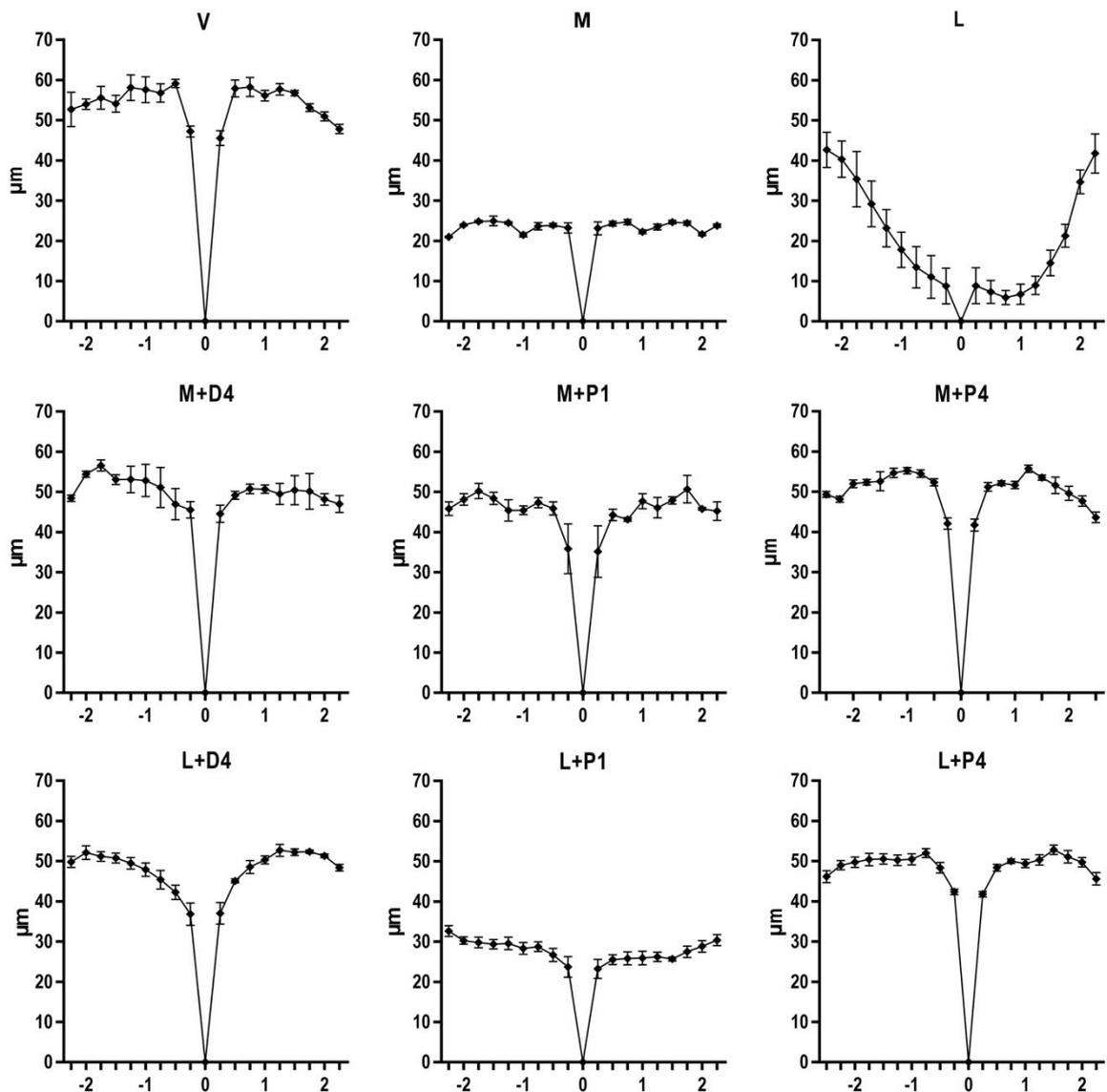


Figura 3.1. “Spider graphs” que muestran el grosor de la CNE a intervalos de 0,25 mm desde el centro del nervio óptico. Los números negativos y positivos indican los hemisferios nasales y temporales, respectivamente. Los datos aparecen como media \pm SEM. La fila superior compara una retina control, que recibió una inyección de vehículo (V), con retinas lesionadas por mifepristona (M) o por la exposición a la luz (L). La fila del medio muestra retinas dañadas por mifepristona y tratadas con D4 (4 mg/kg de dexametasona; M+D4) o P1-4 (1 ó 4 mg/kg de progesterona; M+P1 y M+P4, respectivamente). Los gráficos en la fila inferior demuestran el efecto de los esteroides en las retinas dañadas por la luz. Las áreas bajo la curva (AUC) se muestran en la Tabla 3.1. Se analizaron 4 cortes por ojo de 4 ojos diferentes.

Tabla 3.1. Área de la CNE bajo diferentes condiciones experimentales

Condición	Área Bajo la Curva			
	V	D4	P1	P4
60 lux	232.3±5.1 (4)			
Mifepristona	100.3±1.0 (4) P<0.0001	213.6±11.8 (4) P<0.05	193.2±1.3 (4) P<0.0001	217.8±0.6 (4) NS
1500 lux	82.4±9.7 (4) P<0.0001 P<0.01	203.7±3.9 (4) P<0.01 NS	116.7±3.4 (4) P<0.0001 P<0.0001	207.2±7.9 (4) P<0.01 NS

Tabla 3.1. Las AUC representan la cantidad de núcleos de fotorreceptores para cada condición experimental. Las áreas se expresan como $\text{mm}^2 \pm \text{SEM}$ (n). V, vehículo; D4, 4 mg/kg de dexametasona; P1, 1 mg/kg de progesterona; P4, 4 mg/kg de progesterona. Para cada columna, las diferencias estadísticas con el control se informan debajo de cada AUC. La última fila muestra las diferencias estadísticas entre mifepristona y luz para cada tratamiento con esteroides.

Los marcadores de muerte celular, CASP3 y TUNEL, aparecieron selectivamente en los fotorreceptores

Las caspasas son mediadores esenciales de los procesos apoptóticos. La caspasa-3 activada (CASP3) juega un rol importante en la fragmentación del ADN. Su presencia implica el inicio de la fase de ejecución de la MCR y sugiere que la muerte es producida por un mecanismo apoptótico [101, 103]. Por lo tanto, se evaluó la localización de CASP3 y la presencia de núcleos TUNEL+ en la retina a los 2 días de las injurias por mifepristona o luz. CASP3 estaba ausente

en las retinas control, pero las retinas sometidas a mifepristona o 1500 lux mostraron esta inmunorreactividad en la CNE (Figura 3.2, puntas de flecha) y en el SE de los fotorreceptores (Figura 3.2, flechas). Estas observaciones demostraron que, en nuestras condiciones experimentales, ambos tipos de injuria dañaron selectivamente a los fotorreceptores.

La inmunorreactividad nuclear para CASP3 desapareció en las retinas expuestas a mifepristona tratadas con D4 o P4, mientras que con P1 solo persistieron algunos núcleos débilmente inmunomarcados. En las retinas expuestas a la luz, después del tratamiento con D4 o P4 apenas se observaron algunos núcleos inmunorreactivos, pero los núcleos CASP3+ no disminuyeron después el tratamiento con P1 (Figura 3.2, puntas de flecha).

La presencia de CASP3 en los SE (Figura 3.2, flechas), no descrita previamente, puede ser explicada por acumulación en las mitocondrias [218, 219], muy numerosas en esta región del fotorreceptor. El tratamiento con D4 o P4 redujo en cantidad e intensidad la CASP+ del SE en ambos modelos de daño, pero no se observaron cambios después de P1 (Figura 3.2, flechas).

Para ratificar la presencia de apoptosis, también estudiamos la fragmentación del ADN por medio de la técnica de TUNEL. En este procedimiento la enzima nucleotidil terminal transferasa (TdT) se une a los extremos 3'-OH libres, generados por endonucleasas apoptóticas durante la fragmentación del ADN, y cataliza la adición de deoxinucleótidos acoplados a una marca fluorescente. No se detectaron núcleos TUNEL+ en las retinas controles. Por el contrario, en aquellas que recibieron mifepristona o estuvieron expuestas a iluminación excesiva, se encontraron numerosos núcleos TUNEL+ localizados exclusivamente en la CNE (Figura 3.3).

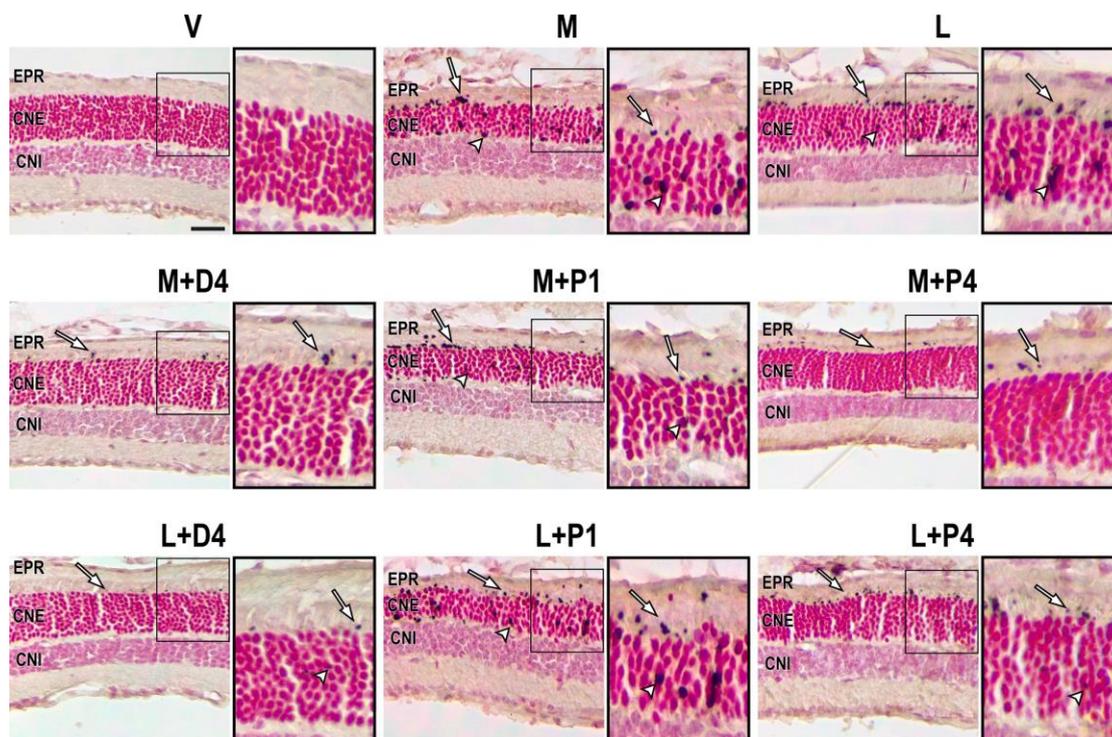


Figura 3.2. Detección de CASP3 en cortes de retina teñidos con Rojo Neutro. El recuadro se magnifica a la derecha. Arriba: V, control; M, mifepristona; L, 1500 lux. Medio: Retinas lesionadas por mifepristona y tratadas con D4, P1 y P4 (M+D4; M+P1; M+P4). Abajo: retinas expuestas a 1500 lux tratadas con D4, P1 y P4 (L+D4; L+P1; L+P4). Los núcleos de la CNE mostraron fuerte inmunorreactividad en las retinas lesionadas o tratadas con P1, pero más débil en las retinas L+D4 y L+P4. La inmunorreactividad de CASP3 en los SE siguió el mismo patrón. Las puntas de flechas muestran núcleos CASP3+, mientras que las flechas señalan depósitos CASP3+ en los SE. Barra de calibración, 50 μm ; incrustación, 12,5 μm .

En ambos modelos de degeneración, el tratamiento con D4 o P1 redujo significativamente los núcleos TUNEL+ (Figura 3.3). Junto con las observaciones histológicas y la medición del espesor de la CNE, la localización de CASP3 y de los núcleos TUNEL+ permiten afirmar que tanto la mifepristona como la luz excesiva solo afectan la supervivencia de los fotorreceptores, posiblemente por un mecanismo apoptótico.

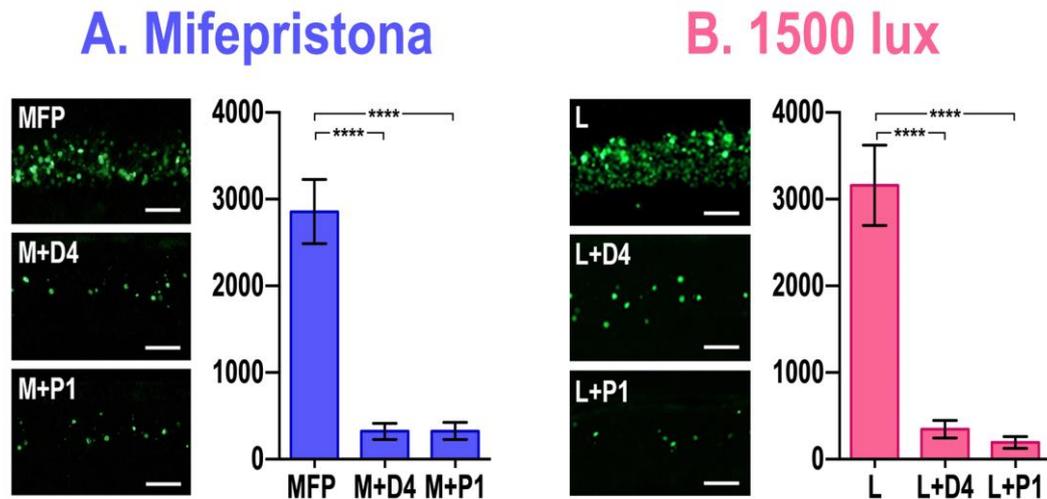


Figura 3.3. Los núcleos TUNEL+ solo se encontraron en retinas dañadas, y estaban selectivamente localizados en la CNE. La mayoría de los núcleos TUNEL+ desaparecieron después del tratamiento con D4 o P1. Barra de calibración, 25 μ m. Los gráficos de barras ilustran las áreas TUNEL+ en segmentos equivalentes de la CNE ($n = 5$). Para este y el resto de los gráficos de este Capítulo, los resultados se analizaron con ANOVA de una vía seguido con la prueba post hoc de Tukey. Las barras indican el promedio \pm IC95%.

Cuantificación por Western blot de los marcadores de daño (CASP3 y p-H2AX)

Marcadores de muerte en las lesiones por mifepristona

No se detectaron marcadores de daño celular, CASP3 o p-H2AX, en retinas control, aun después de la administración de P4. Ambas proteínas estaban presentes en las retinas sometidas a mifepristona. P1 disminuyó CASP3 y p-H2AX a 75% de los niveles de daño con mifepristona. CASP3 se volvió indetectable después de P4, pero dos días después del daño las retinas M+P4 aún mostraban una cantidad significativa de p-H2AX (Figura 3.4 A). Los resultados obtenidos en muestras tratadas con D4 (Figura 3.5) confirmaron los resultados publicados previamente [13].

p-H2AX se redujo después de P1 y P4, aunque todavía era detectable en los animales tratados con P4 (Figura 3.4 A). Esta persistencia sugiere que los mecanismos de reparación seguían activos aún después de la desaparición de CASP3.

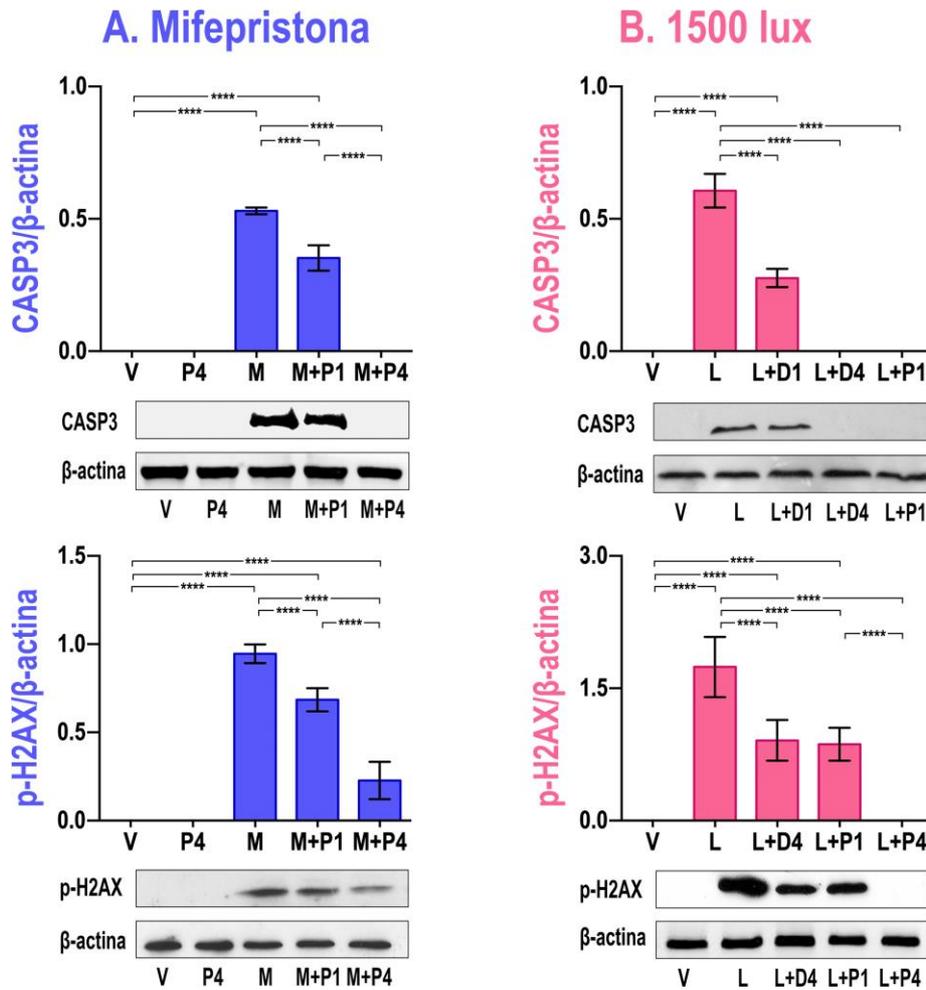


Figura 3.4. Cuantificación de Western blots para CASP3 y p-H2AX. Se muestran bandas típicas para cada marcador. **(A)** Mifepristona. No detectamos CASP3 en las retinas sanas ni en los controles que recibieron P4. Los valores elevados asociados a la lesión se redujeron después del tratamiento con P1 y se hicieron indetectables con la dosis más alta de progesterona ($n = 4$). p-H2AX apareció en retinas dañadas, pero disminuyó después de P1 y P4 ($n = 5$). **(B)** Retinas expuestas a 1500 lux. CASP3, presente después de la lesión, disminuyó después de D1, desapareciendo después de D4 y P1 ($n = 4$). Los altos niveles de p-H2AX detectados en las retinas lesionadas por luz disminuyeron con los tratamientos D4 y P1, y desaparecieron con P4 ($n = 5$).

Cabe destacar que CASP3 también estuvo ausente en ratones tratados con mifepristona más 0,5 mg/kg de PMG (Figura 3.6), un ligando específico del RP [205]. Por lo tanto, el efecto de la progesterona no puede atribuirse a reactividad cruzada entre progesterona y RG.

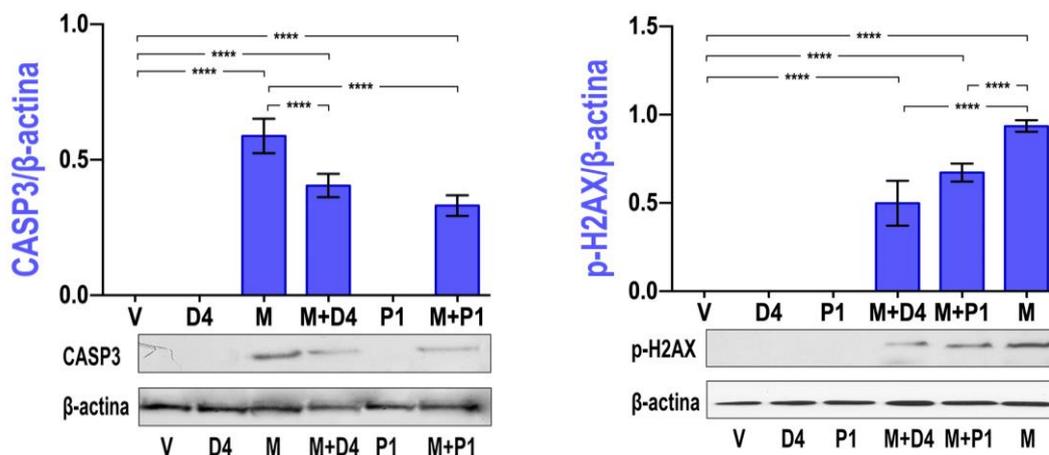


Figura 3.5. Western blots para CASP3 y p-H2AX que comparan los efectos de dexametasona y progesterona en retinas expuestas a mifepristona y confirman los efectos de dexametasona previamente publicados ($n = 4$).

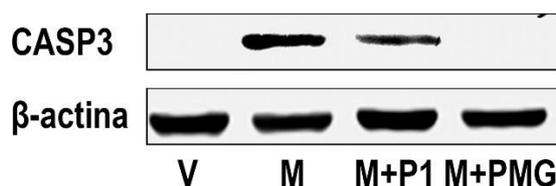


Figura 3.6. Western blot que ilustra el efecto de promegestona (PMG, 0,5 mg/kg), un agonista específico del RP, en el bloqueo de la activación de CASP3 inducida por mifepristona ($n = 4$).

Marcadores de muerte en las retinas expuestas a 1500 lux

En retinas expuestas a la luz, CASP3 se redujo a la mitad después del tratamiento con D1, pero desapareció completamente después de D4, P1 o P4. En estas retinas, se encontró p-H2AX en cantidades mayores que las observadas después de mifepristona, pero con una excelente respuesta a los

tratamientos con dexametasona y progesterona. La CASP3 desapareció con dosis de esteroides menores que las necesarias para la desaparición de p-H2AX (Figura 3.4 B).

Estas observaciones indican que los marcadores de daño celular responden de manera semejante a progesterona y a dexametasona tanto en lesiones por luz como en las inducidas por mifepristona.

Efectos de la dexametasona y la progesterona sobre las proteínas de la familia BCL2

Los glucocorticoides pueden afectar la transcripción o la estabilidad de las proteínas de la familia BCL2 [213, 220]. La tendencia hacia la muerte dependería del predominio de las isoformas cortas (BCL-X_S, pro-apoptóticas), mientras que las isoformas largas (BCL-X_L, anti-apoptóticas) promueven la supervivencia [215, 216]. Por lo tanto, los glucocorticoides pueden alterar el balance de proteínas anti- y pro-apoptóticas, llevándolo en un sentido u otro según cada tejido específico [221].

Lesiones por mifepristona

Los efectos de la dexametasona sobre BCL-X_L y BAX después de la degeneración inducida por mifepristona fueron previamente publicados [13]. Por este motivo, solo informamos los efectos de dexametasona sobre BCL2 y BID (Figura 3.7 A). Sin embargo, el efecto de este esteroide sobre BCL-X_L y BAX fue reestudiado y los resultados se muestran por separado (Figura 3.8).

En las retinas controles, es decir en ausencia de daño, la progesterona (P4) aumentó los niveles de BCL-X_L. Por el contrario, este regulador desapareció completamente en las retinas dañadas con mifepristona. Los niveles basales de

BCL-X_L se mantuvieron en los ratones M+P1, pero aumentaron más de 2 veces en los ratones M+P4 (Figura 3.7 A). Aunque D4 aumentó los niveles de BCL-X_L en las retinas sanas, no tuvo efecto alguno en las retinas M+D4, donde BCL-X_L era indetectable (Figura 3.8).

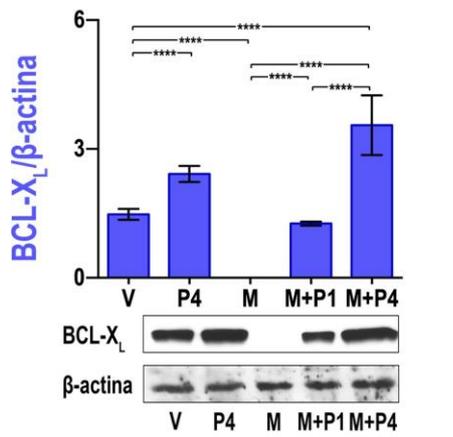
El tratamiento con esteroides no modificó la proteína anti-apoptótica BCL2 en los animales controles, pero esta proteína aumentó más de dos veces en los ratones que recibieron mifepristona. El tratamiento con esteroides, tanto D4 como P1, redujo BCL2 a niveles no detectables (Figura 3.7 A).

BAX, un importante inductor de MOMP [103], no fue significativamente modificado por progesterona ni por mifepristona. Tampoco se observaron cambios significativos en las retinas M+P1, pero BAX disminuyó a valores mínimos en las retinas M+P4 (Figura 3.7 A). La dexametasona no modificó los niveles de BAX en las retinas M+D4 (Figura 3.8).

BID es una proteína solo BH3 que potencialmente se une a todos los miembros de la familia de BCL2 anti-apoptóticos y facilita la activación de BAX. La administración de esteroides a retinas sanas redujo significativamente los niveles de BID, especialmente después de P4. Después del daño por mifepristona, BID mantuvo los mismos niveles de las retinas controles, mientras que en las retinas dañadas y tratadas con esteroides (M+D4 y M+P1) BID descendió por debajo del límite de detección (Figura 3.7 A).

Por lo tanto, la supervivencia de fotorreceptores dependiente de progesterona después de la exposición a mifepristona se asoció con una desaparición casi completa de BAX y BID e, inesperadamente, también de BCL2 (Figura 3.7 A).

A. Mifepristona



B. 1500 lux

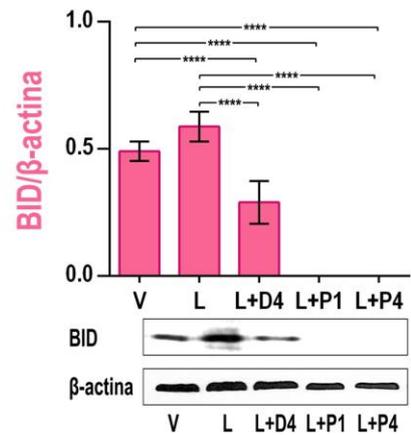
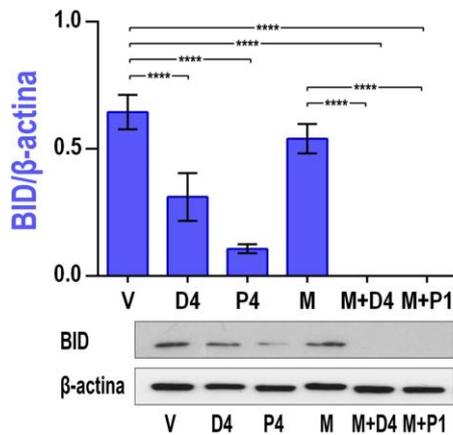
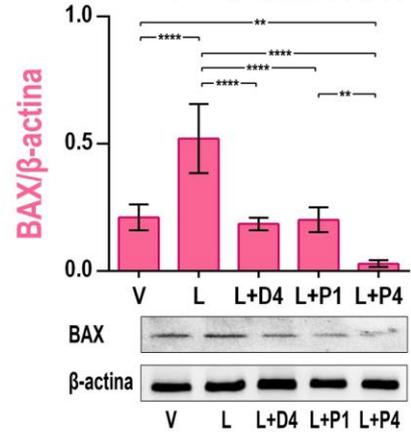
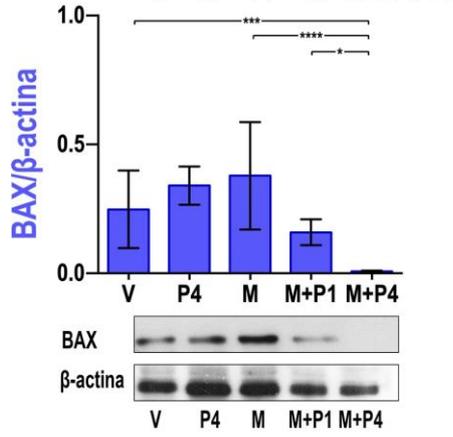
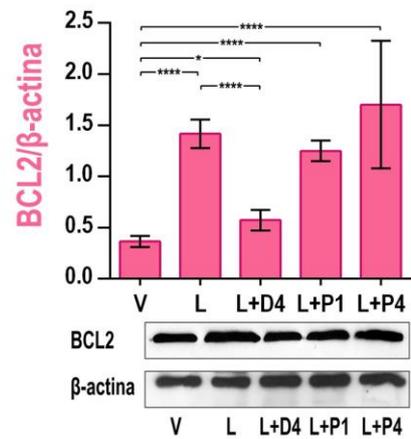
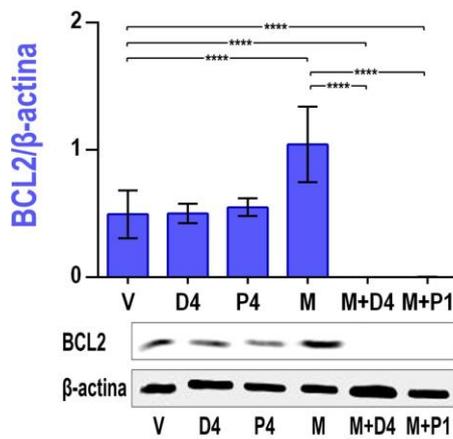
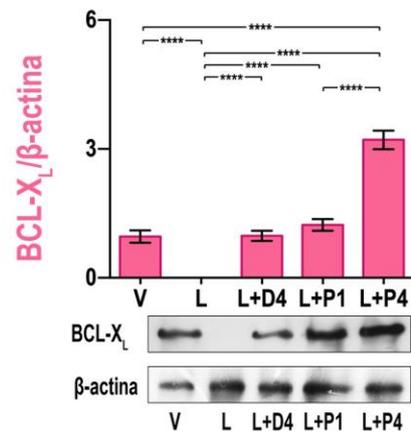


Figura 3.7. Western blots para proteínas reguladoras de la muerte celular. **(A)** Mifepristona. P4 aumentó BCL-X_L pero esta proteína desapareció en retinas dañadas por mifepristona. P1 disminuyó los valores de BCL-X_L en las retinas expuestas a mifepristona, mientras M+P4 triplicó estos valores (n = 6). Ni D4 ni P1 modificaron BCL2, pero este regulador se duplicó después del daño por mifepristona. BCL2 no se detectó en las retinas M+P1 y M+D4 (n = 4). Se observaron grandes disminuciones de BAX en las retinas M+P1 y M+P4 (n = 3). BID disminuyó después de D4 o P4. No se encontró BID en las retinas M+P1, M+P4 y M+D4 (n = 5). **(B)** Exposición a 1500 lux. No se encontró BCL-X_L en las retinas lesionadas por luz. Los tratamientos con D4 y P1 mantuvieron los niveles basales de BCL-X_L, que fueron considerablemente aumentados por P4 (n = 6). BCL2 aumentó notablemente en las retinas dañadas por luz. El tratamiento con D4 disminuyó esta proteína, que aumentó con P1 y P4 (n = 6). BAX subió significativamente después del daño por luz, pero disminuyó hasta niveles similares o menores al control después de los tratamientos con esteroides (n = 5). BID se redujo después de D4, desapareciendo después de los tratamientos con P1 y P4 (n = 5).

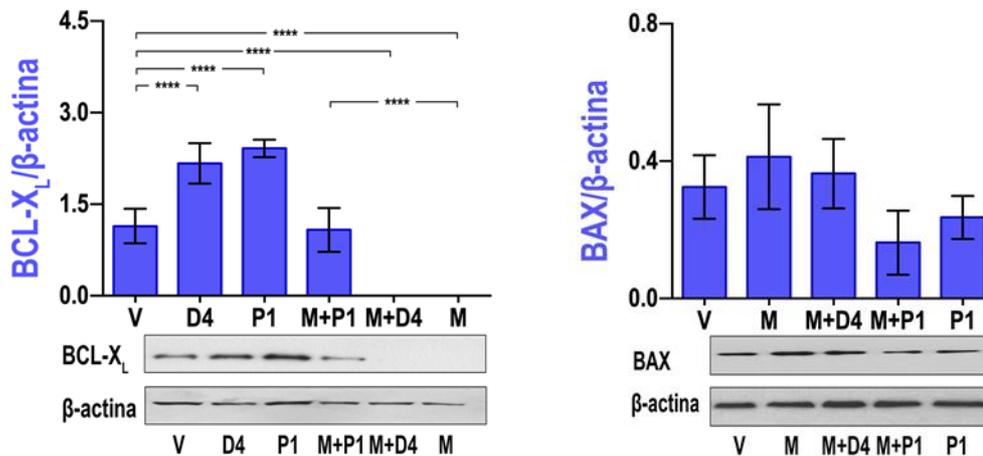


Figura 3.8. Western blots para BCL-X_L y BAX que muestran los efectos de dexametasona y progesterona en retinas expuestas a mifepristona (BCL-X_L, n = 3; BAX, n = 4).

Exposición a 1500 lux

BCL-X_L desapareció en las retinas de ratones expuestos a 1500 lux, pero esta proteína anti-apoptótica permaneció en los niveles basales en los ratones expuestos y tratados con D4 o P1. Curiosamente, en las retinas L+P4, BCL-X_L

aumentó tres veces sobre los niveles de las retinas controles, en forma semejante a lo observado en las retinas lesionadas por mifepristona.

La proteína BCL2 aumentó casi 4 veces después de la exposición a la luz, en forma inversa a la respuesta de BCL-X_L. El aumento de BCL2 en las retinas dañadas por luz fue semejante al observado en los animales dañados por mifepristona. Después del tratamiento con esteroides, los niveles de BCL2 en todas las retinas expuestas a 1500 lux fueron mayores que en los controles. El aumento de BCL2 observado con ambas dosis de progesterona se acercó a los valores de las retinas dañadas por la luz sin tratamiento (Figura 3.7 B).

La exposición a la luz aumentó significativamente los valores de BAX, que volvió a los valores basales después del tratamiento con D4 y P1, y disminuyó por debajo de dichos valores con P4. BID no fue modificado por la luz, pero disminuyó luego de D4 y no pudo ser detectado después del tratamiento con P1 o P4. Por lo tanto, la protección de los fotorreceptores en las retinas expuestas a la luz también se asoció con una desaparición casi completa de BAX y BID. Curiosamente, BCL2 disminuyó después del tratamiento con D4, pero persistió cerca de los valores de daño después del tratamiento con P1 y P4 (Figura 3.7 B).

Esteroides y niveles de rodopsina

El papel de la rodopsina en el daño por luz ha sido ampliamente estudiado [11, 91, 222] y los mecanismos de foto-transducción han sido implicados en el efecto protector de los glucocorticoides [10]. Por lo tanto, estudiamos los niveles de rodopsina en ratones tratados con esteroides. En retinas sanas, los niveles basales de rodopsina (RHO) aumentaron después de D4 y P1 (Figura 3.9 A). Por el contrario, la exposición a la luz redujo a la mitad los niveles basales de

RHO. El tratamiento con esteroides de las retinas expuestas a la luz mantuvo valores elevados de RHO, similares a los inducidos con los esteroides en las retinas no dañadas (Figura 3.9 B). Sorprendentemente, P1 indujo un aumento de RHO significativamente mayor que el producido por D4, tanto en retinas sanas como dañadas (Figura 3.9).

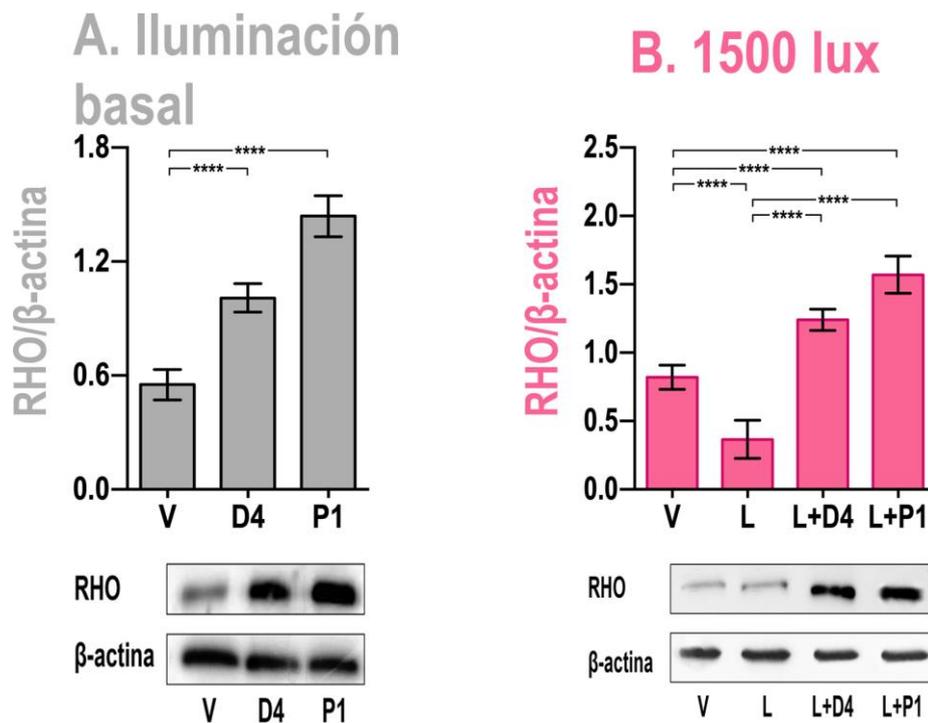


Figura 3.9. Efectos de los esteroides y la luz sobre la rodopsina. **(A)** Retinas no dañadas. Los esteroides aumentan los niveles de rodopsina, que disminuyen cuando las retinas son expuestas a 1500 lux ($n = 5$). **(B)** Retinas expuestas a 1500 lux. En las retinas dañadas que recibieron tratamiento (L+D4 y L+P1) la concentración de rodopsina vuelve a aumentar ($n = 4$).

Estas observaciones permiten postular que el daño de los fotorreceptores dependería de una falla en el mantenimiento de los niveles de rodopsina. Las mutaciones en la rodopsina pueden generar un plegamiento erróneo, un tráfico incorrecto o una falla en la actividad constitutiva y son bases para la muerte de los fotorreceptores [223-226]. Según estudios el 30% de los pacientes

diagnosticados con retinitis pigmentosa autosómica dominante poseen mutaciones en la rodopsina [227].

Discusión

Estos experimentos comparan la protección de progesterona y dexametasona sobre fotorreceptores injuriados por mifepristona, un inhibidor de los receptores de glucocorticoides y progestágenos, o por la exposición a luz excesiva (1500 lux). La protección que brindan los glucocorticoides en modelos animales es muy conocida [5, 10, 11]. Los progestágenos también han demostrado ser beneficiosos para la protección de fotorreceptores en ratones rd1, rd10 o bajo estrés lumínico [122-125], pero no hay evidencia clínica que respalde estos resultados. Excepto por pequeñas diferencias cuantitativas, la muerte de los fotorreceptores siguió el mismo patrón, y fue igualmente controlada por dexametasona y progesterona en ambos modelos de degeneración.

Comparación de dosis experimentales y clínicas de dexametasona y progesterona

La dosis de dexametasona utilizada (1-4 mg/kg) es mucho mayor que las dosis recomendadas en la clínica [228]. Sin embargo, podría producir concentraciones intravítreas tan altas como las alcanzadas después de los implantes intravítreos [229], cuya utilidad en la protección de los fotorreceptores humanos ha sido demostrada [230, 231]. Por el contrario, los 4 mg/kg de progesterona utilizados se asemejan a las dosis indicadas en los tratamientos ginecológicos de reemplazo hormonal [232].

También se ha obtenido protección experimental de la retina con dosis de progesterona mayores que las empleadas en este trabajo. Por ejemplo, para la

protección de fotorreceptores en ratones rd1 se usaron 100 mg/kg/2 días de progesterona [122]. Asimismo, se utilizaron 80-100 mg/kg de norgestrel, un progestágeno sintético, para proteger los fotorreceptores de ratones rd10 o bajo estrés lumínico [123-125]. Esta dosis es por lo menos 100 veces mayor [233] que las dosis de 1-4 mg/kg de progesterona empleadas en nuestros modelos. Las disparidades en las dosis de progesterona sugieren que podrían existir diversos mecanismos de protección, sensibles a diferentes concentraciones de esteroides.

Los progestágenos son beneficiosos en modelos animales sometidos a lesión cerebral traumática, accidente cerebrovascular o isquemia [127, 128], pero los ensayos clínicos no pudieron demostrar los beneficios de la progesterona en pacientes con accidente cerebrovascular o lesión cerebral traumática [129-131]. Nuestros resultados apoyan la necesidad de repetir estos estudios modificando las dosis y periodicidad en la administración de progesterona.

Tratamientos con esteroides y diferencias sexuales

Se han descrito diferencias fisiológicas y patológicas de la retina según el sexo, pero sus consecuencias clínico-patológicas aún no se comprenden completamente [121, 234]. Sin embargo, las formas neovascular y drusenoides parecen predominar en las mujeres [121]. La presencia de distintos receptores hormonales y neuroesteroides derivados del colesterol y la pregnenolona podrían explicar estas diferencias sexuales [235].

La mifepristona se usa ampliamente en la anticoncepción y el aborto [236, 237], en la coriorretinopatía serosa central [238] y como adyuvante en el tratamiento de varias enfermedades neoplásicas [239]. Estudios preliminares de nuestro laboratorio (Cubilla y col. en preparación) sugieren que la resistencia al daño de

la retina por mifepristona sería mayor en los ratones hembra, y mayor aún en las hembras preñadas. Por lo tanto, necesitamos nuevas investigaciones que comparen la respuesta a la mifepristona, la dexametasona y la progesterona en modelos masculinos y femeninos de degeneración retiniana.

Semejanzas y diferencias entre el daño retiniano por mifepristona y por luz

Como lo demuestran la inmunohistoquímica de CASP3 y el procedimiento de TUNEL, ambas injurias afectaron exclusivamente a la CNE. El análisis cuantitativo de esta capa retiniana demostró que más de la mitad de los núcleos habían desaparecido a los 7 días en ambos modelos de injuria, sin que se observaran lesiones en otras capas retinianas. El daño por mifepristona mostró una distribución uniforme a lo largo de la retina, mientras que la exposición a la luz produjo mayor daño en la retina central, concordante con lo descrito por otros autores [207]. La pérdida de fotorreceptores con distribución asimétrica es típica de la degeneración retiniana inducida por luz y refleja las diferencias metabólicas de las regiones retinianas, posiblemente relacionadas con las diferencias locales en las reservas de rodopsina [11].

Por otra parte, la muerte de los fotorreceptores producida por el bloqueo de los receptores de glucocorticoides y progesterona, sugiere que estos esteroides serían necesarios para controlar el estrés foto-oxidativo producido por la absorción de la luz, aún bajo condiciones de iluminación habituales que no se asocian con lesiones agudas [77, 240]. La distribución uniforme del daño de los fotorreceptores inducido por mifepristona sugiere que este bloqueante atacaría a moléculas protectoras que no dependen de la iluminación de la retina.

Progesterona y dexametasona en la protección de los fotorreceptores

Los grandes aumentos de CASP3, tanto en los núcleos como en las mitocondrias, junto con la presencia de núcleos TUNEL+, apoyan fuertemente un mecanismo apoptótico en ambos modelos de degeneración [103]. Sin embargo, no podemos excluir la participación de otros mecanismos de muerte celular [241-243].

En dosis bajas, la progesterona protegió mayor proporción de fotorreceptores afectados por mifepristona que fotorreceptores desaparecidos por la exposición a la luz. Sin embargo, P4 protegió por igual a los núcleos de la CNE en ambos modelos experimentales.

En ambos modelos de injuria, CASP3 alcanzó niveles semejantes, que fueron reducidos tanto por dexametasona como por progesterona. Sin embargo, los niveles de p-H2AX fueron menores en las retinas dañadas por mifepristona que en aquellas dañadas por luz, reflejando posiblemente una mayor demora en la reparación del ADN de los fotorreceptores dañados por luz. En ambos modelos, D4 y P4 protegieron la misma proporción (> 89 %) de núcleos de fotorreceptores a los 7 días.

En las retinas sometidas a mifepristona, CASP3 fue parcialmente reducida por P1, mientras que resultó indetectable después de P4. Los niveles de CASP3 inducidos por luz cayeron por debajo del nivel de detección después de P1. Del mismo modo, las retinas dañadas por mifepristona tratadas con D4 mostraron una reducción parcial de CASP3 [13], mientras que esta caspasa ejecutora fue indetectable en las retinas expuestas a luz tratadas con D4. Estas comparaciones sugieren que CASP3 sería más sensible a los esteroides en las retinas expuestas a la luz que en aquellas sometidas a mifepristona.

Los niveles de p-H2AX en las retinas dañadas por mifepristona fueron menores que en aquellas lesionadas por la luz. Sin embargo, los niveles de p-H2AX en las retinas M+P4 fueron mayores que en las retinas L+P4, donde p-H2AX era indetectable. Estas diferencias también sugieren una mayor respuesta a P4 en las retinas lesionadas por luz. Por el contrario, p-H2AX mostró igual sensibilidad a los glucocorticoides en ambos modelos, ya que M+D4 y L+D4 mostraron los mismos niveles de p-H2AX.

Efectos de los esteroides sobre los reguladores de muerte celular en retinas controles

Dexametasona y progesterona promovieron modificaciones de algunos reguladores en forma independiente de las lesiones de los fotorreceptores. BCL-X_L mostró una respuesta directa, aumentando en retinas sanas después de la de progesterona o dexametasona [13]. Por lo tanto, los fotorreceptores se comportaron como las células del epitelio mamario, del endometrio, los hepatocitos, fibroblastos o cardiomiocitos, donde el efecto anti-apoptótico de los glucocorticoides y progestágenos se correlaciona con una mayor expresión de BCL-X_L [216, 244, 245].

Los cambios inducidos por dexametasona y progesterona sobre los reguladores de muerte celular en la retina fueron concordantes con su papel en la protección de los fotorreceptores. D4 redujo a la mitad los niveles de BID, mientras que P4 los llevó a menos de 1/6 de los valores basales. Esta molécula pro-apoptótica está regulada negativamente por glucocorticoides en condrocitos [246] y por progesterona en membranas fetales humanas [247].

Efectos de dexametasona y progesterona sobre los miembros de la familia BCL2 en retinas dañadas

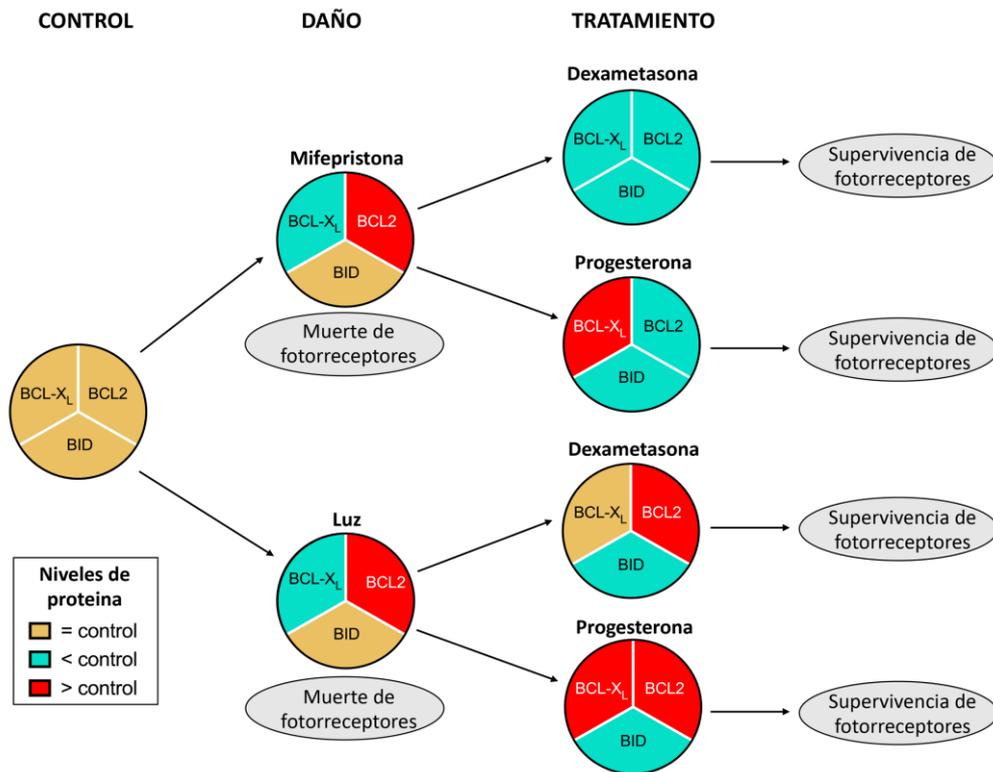


Figura 3.10. Cambios en miembros de la familia BCL2 asociados a la protección de los fotorreceptores por dexametasona y progesterona. Estos reguladores de muerte celular mostraron cambios similares después de dexametasona o progesterona: BCL-X_L disminuyó, BCL2 aumentó y BID permaneció como en los controles. Se sugiere que el aumento de BCL2 es la respuesta principal al daño. Los tratamientos fueron igualmente efectivos para promover la supervivencia de los fotorreceptores; sin embargo, cada condición mostró un patrón característico de la relación BCL-X_L / BCL2. La disminución de BID, que aparece en todas las condiciones de tratamiento, sería el factor de supervivencia común.

Las moléculas anti-apoptóticas BCL-X_L y BCL2 mostraron respuestas opuestas, con BCL-X_L desapareciendo y BCL2 aumentando ante el daño. Se sabe que los glucocorticoides aumentan la expresión de BIM, proteína de la familia de BCL2, que puede activar a proteínas pro-apoptóticas como BAX y BAK. Estas ayudan a agujerear la membrana mitocondrial permitiendo la liberación del citocromo C

y otras proteínas apoptóticas [248]. Se ha demostrado que estos efectos dependen de $RG\alpha$ [249]. La supervivencia de 1/3 de la población de fotorreceptores en las retinas lesionadas y no tratadas podría atribuirse al aumento de BCL2. Sin embargo, en condiciones de supervivencia aumentada, como en las retinas expuestas a mifepristona y tratadas con D4 o P4, BCL2 disminuye. El aumento de BCL- X_L podría justificar la supervivencia de fotorreceptores en M+P4, pero BCL- X_L desapareció en las retinas expuestas a mifepristona y tratadas con D4 donde los fotorreceptores sobrevivieron en igual proporción. Los fotorreceptores también sobrevivieron en las retinas L+D4, donde BCL- X_L permaneció en valores similares a los basales. Por lo tanto, BCL- X_L no sería la causa primaria de la supervivencia. BID fue el único regulador afectado de la misma manera por los dos esteroides en ambos modelos de injuria. La regulación negativa de BID podría explicar la supervivencia de los fotorreceptores después de los tratamientos con progesterona y dexametasona, ya que BID es un iniciador intrínseco de la apoptosis y un mediador de las señales de estrés [250]. BID activa BAX en la membrana mitocondrial [101, 103] y en ambos modelos se encontró una disminución de BAX después del tratamiento con P4. Sin embargo, BAX permaneció elevado en M+D4. Por lo tanto, la reducción de BID parece ser el factor común a las condiciones que promueven la supervivencia de los fotorreceptores. Del mismo modo, la progesterona inhibe la apoptosis de las membranas fetales mediante la supresión de la expresión de BID [247], mientras que la dexametasona induce resistencia a la apoptosis en carcinomas por el mismo mecanismo [251]. Otros mecanismos podrían explicar la supervivencia dependiente de glucocorticoides y progesterona, como la hiperexpresión de factores anti-apoptóticos, la

activación de MEK-ERK1/2, la proporción $RG\alpha/RG\beta$ [221] o la disponibilidad de factores neurotróficos [252].

Sin embargo, la opción celular por la muerte o la reparación es mucho más compleja que la suma algebraica de moléculas pro- y anti-apoptóticas disponibles [253], requiriéndose mayor información para comprender el papel de los esteroides endógenos en el equilibrio de muerte/supervivencia de los fotorreceptores. Por ejemplo, la supervivencia de los fotorreceptores con dosis mínimas de progesterona podría ser explicada por la capacidad de esta hormona para aumentar los niveles de BCL-X_L.

Papel de la rodopsina en la protección de los fotorreceptores

La rodopsina, el pigmento visual de los bastones, desempeña un papel clave en la fototransducción y es el componente predominante de las membranas discales de los bastones [254]. En la retina no dañada y tratada con dexametasona o progesterona, los niveles de rodopsina fueron significativamente más altos que en los controles, sugiriendo un efecto directo de estos esteroides sobre los mecanismos de transducción de luz. Este aumento podría mejorar la resistencia de la retina, ya que se requiere la activación de la rodopsina para la degeneración de la retina inducida por luz [255, 256] y la cantidad de rodopsina determina la susceptibilidad de los fotorreceptores ante el daño por luz [10].

Conclusión

La muerte de los fotorreceptores fue inducida selectivamente por la exposición a luz excesiva o por un inhibidor de los receptores de glucocorticoides y de progesterona, la mifepristona, implicando que estos esteroides podrían ser

necesarios para la supervivencia de los fotorreceptores en condiciones ambientales estándar. La administración de progesterona fue al menos tan eficiente como la de dexametasona, como agente protector de los fotorreceptores, en ambos modelos.

Nuestros hallazgos también respaldan observaciones anteriores sobre los efectos dañinos de la mifepristona en la retina, aún en ausencia de otros tóxicos ambientales o genéticos [13]. Nuestra principal conclusión es que las respuestas de protección retiniana a los glucocorticoides y progestágenos incluyen efectos directos sobre las moléculas reguladoras de la muerte celular y posiblemente dependen de interacciones, aún desconocidas, con los receptores de glucocorticoides y de progestágenos.

En resumen, el daño retiniano estaría asociado con una disminución de BCL-X_L y un aumento de BCL2, mientras que la protección de los fotorreceptores por dexametasona o progesterona se correlacionaría con una disminución de BID. Nuestros resultados sugieren que la dexametasona y la progesterona podrían ser útiles en la prevención de la muerte de los fotorreceptores humanos, no solo en enfermedades raras como las retinopatías solares, sino también en las fases tempranas de la DMAE y la retinopatía diabética.

Capítulo 4

Receptores de glucocorticoides en la retina

Previamente demostramos que tanto la dexametasona como la progesterona protegían a los fotorreceptores selectivamente lesionados por luz o mifepristona, un bloqueante de los receptores de glucocorticoides y de progesterona. Además, encontramos que la mifepristona presentaba daño selectivo sobre los fotorreceptores [13, 204], sugiriendo que los receptores de esteroides podrían actuar en forma no genómica, directamente sobre los segmentos externos de los fotorreceptores. Los experimentos descritos en este Capítulo intentan apoyar esta hipótesis demostrando la presencia de receptores de glucocorticoides en los segmentos externos. Con este propósito, (1) se evaluaron las modificaciones en la localización y expresión de los receptores de glucocorticoides; (2) se estudió con microscopía confocal la localización de la proteína FKBP52, una chaperona de $RG\alpha$; (3) y se detectaron isoformas de RG en segmentos externos aislados.

Resultados

Localización de $RG\alpha$ y $RG\beta$ en la retina neural y el epitelio pigmentario

Se realizaron estudios inmunohistoquímicos y de inmunofluorescencia (IF) para detectar la localización de los receptores de corticoides en las distintas células y regiones de la retina neural y el EPR. También se compararon retinas sometidas a distintas condiciones de iluminación.

La principal localización de $RG\alpha$ en la retina es nuclear. Al mediodía, apareció en los núcleos de todas capas, pero mostró mayor intensidad en la hilera central de la capa nuclear interna, donde se ubican los núcleos de las células de Müller. También se encontró coloración nuclear en las células del EPR, y se observó un depósito extranuclear a lo largo de la limitante externa, que podría corresponder a las microvellosidades de las células de Müller y/o a el segmento interno de los fotorreceptores (bastones). Además, se observó marcación en los núcleos de las células de la coroides (Figura 4.1).

A medianoche, después de 5 hs de oscuridad, la coloración nuclear estaba disminuida, salvo en el EPR y en los núcleos de las células de Müller. Bajo estas condiciones no se observó inmunorreactividad a lo largo de la limitante externa. Después de 7 días de oscuridad la inmunorreactividad $RG\alpha$ prácticamente había desaparecido, incluso en los núcleos de las células de Müller.

Después de 24 hs bajo 1500 lux, la inmunorreactividad de $RG\alpha$ había aumentado considerablemente en la hilera de células de Müller, donde se podía apreciar coloración perinuclear. También había importante inmunorreactividad a lo largo de la limitante interna (Figura 4.1). La administración de mifepristona por 6 hs indujo la translocación de $RG\alpha$ al segmento externo de los fotorreceptores, y aumentó la localización en las células ganglionares (Figura 4.2). Este cambio podría estar relacionado con la muerte de los fotorreceptores.

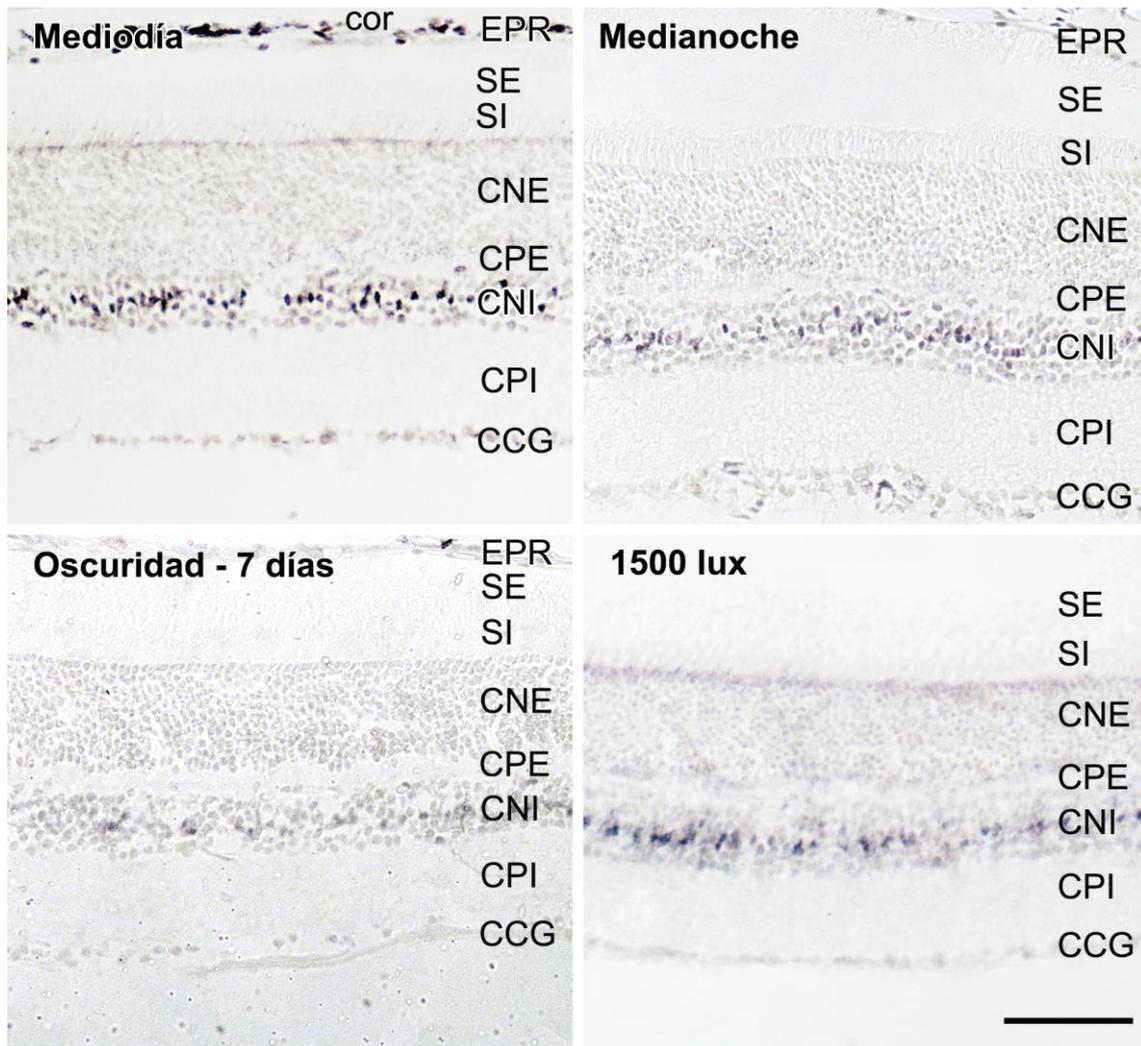


Figura 4.1. Inmunorreactividad para $RG\alpha$ en cortes de retina bajo distintas condiciones de iluminación. Se observó marcación nuclear en la CNE, CNI y CCG, que se redujo notablemente después de oscuridad prolongada. La mayor intensidad se encontró en la CNI, a nivel de los núcleos de las células de Müller. Los núcleos del EPR aparecieron ligeramente marcados a mediodía y medianoche. En las retinas obtenidas a mediodía y en aquellas sometidas a 1500 lux, se encontró marcación próxima a la membrana limitante externa. cor, coroides; EPR, epitelio pigmentario; SE, segmento externo de los fotorreceptores; SI, segmento interno de los fotorreceptores; CNE, capa nuclear externa; CPE, capa plexiforme externa; CNI, capa nuclear interna; CPI, capa plexiforme interna; CCG, capa de células ganglionares. Barra de calibración, 50 μ m.

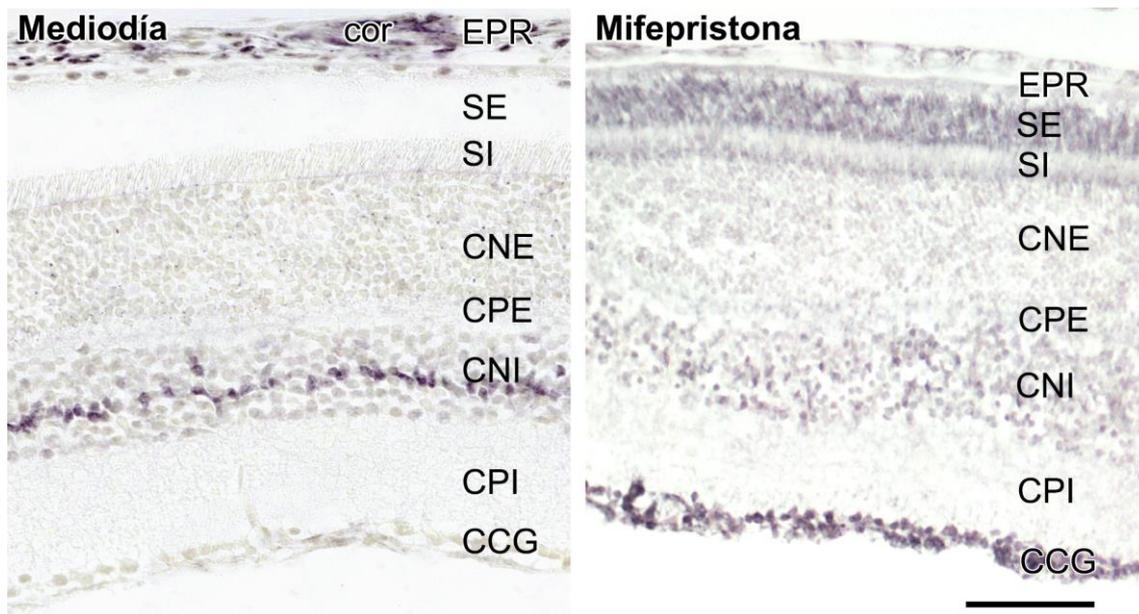


Figura 4.2. Inmunorreactividad para $RG\alpha$ en cortes de retina control y luego de 6 hs de mifepristona. La mifepristona aumenta la marcación de los segmentos externos y las células ganglionares, y disminuye la tinción de la hilera central en la CNI. Abreviaturas al igual que en la Figura 4.2. Barra de calibración, 50 μm .

La principal localización de $RG\beta$ corresponde al EPR, donde no solo apareció a nivel nuclear sino también en el citoplasma, en todas las condiciones estudiadas. El patrón de distribución fue similar tanto al mediodía como en los ojos fijados a medianoche. $RG\beta$ se encontraba en todas las capas nucleares, pero sin la localización selectiva en la hilera de núcleos de células de Müller mostrada por $RG\alpha$. A medianoche se observaron depósitos puntiformes en la CPE, sugiriendo la localización de $RG\beta$ en prolongaciones sinápticas. También se intensificaron los depósitos a lo largo de la membrana limitante externa (Figura 4.3). No se observaron cambios en las retinas sometidas a 1500 lux ni a OP.

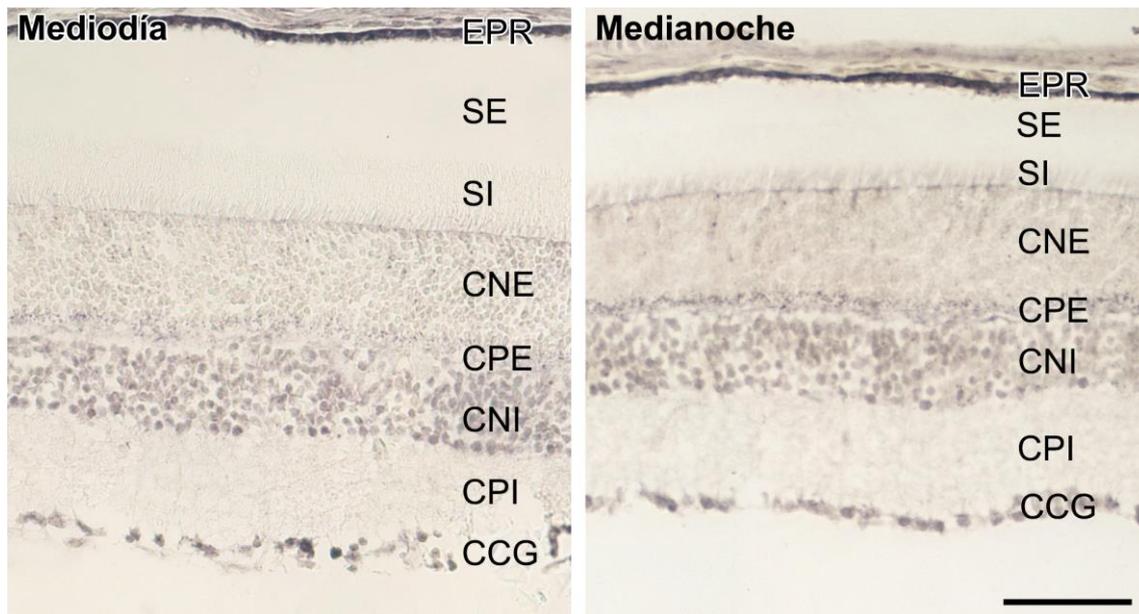


Figura 4.3. Inmunorreactividad para $RG\beta$ bajo distintas condiciones de iluminación. Se detectó $RG\beta$ en todas las capas nucleares. La mayor intensidad inmunorreactividad se observó en el citoplasma y núcleos del EPR. Abreviaturas al igual que en la Figura 4.2. Barra de calibración, 50 μm .

Expresión de $RG\alpha$ y $RG\beta$ en ratones lesionados por mifepristona o exposición a 1500 lux

Los niveles de $RG\alpha$ y $RG\beta$ se valoraron mediante Western blots en los modelos descritos en el Capítulo 3. Las muestras de retina contenían niveles bajos de proteína $RG\alpha$, que no fueron modificados significativamente por dexametasona (D4) o progesterona (P4). Se observó un ligero aumento en las retinas dañadas por mifepristona que solo fue estadísticamente significativo en las retinas M+P4. La luz produjo un aumento mayor, concordante con los mayores niveles de daño observados en estas retinas. En las retinas L+P4, los niveles de $RG\alpha$ casi triplicaron los niveles controles (Figura 4.4).

$RG\beta$ mostró un comportamiento diferente. En las retinas controles, no fue modificado por dexametasona, mientras que sus niveles basales fueron duplicados por progesterona (P4). $RG\beta$ tampoco varió en las retinas dañadas

por mifepristona ni en las retinas M+D4, pero sus niveles superaron a los controles en las retinas M+P4. El daño fototóxico no modificó los niveles de RG β con respecto al control, pero las retinas L+P4 mostraron un aumento significativo sobre los niveles controles (Figura 4.4).

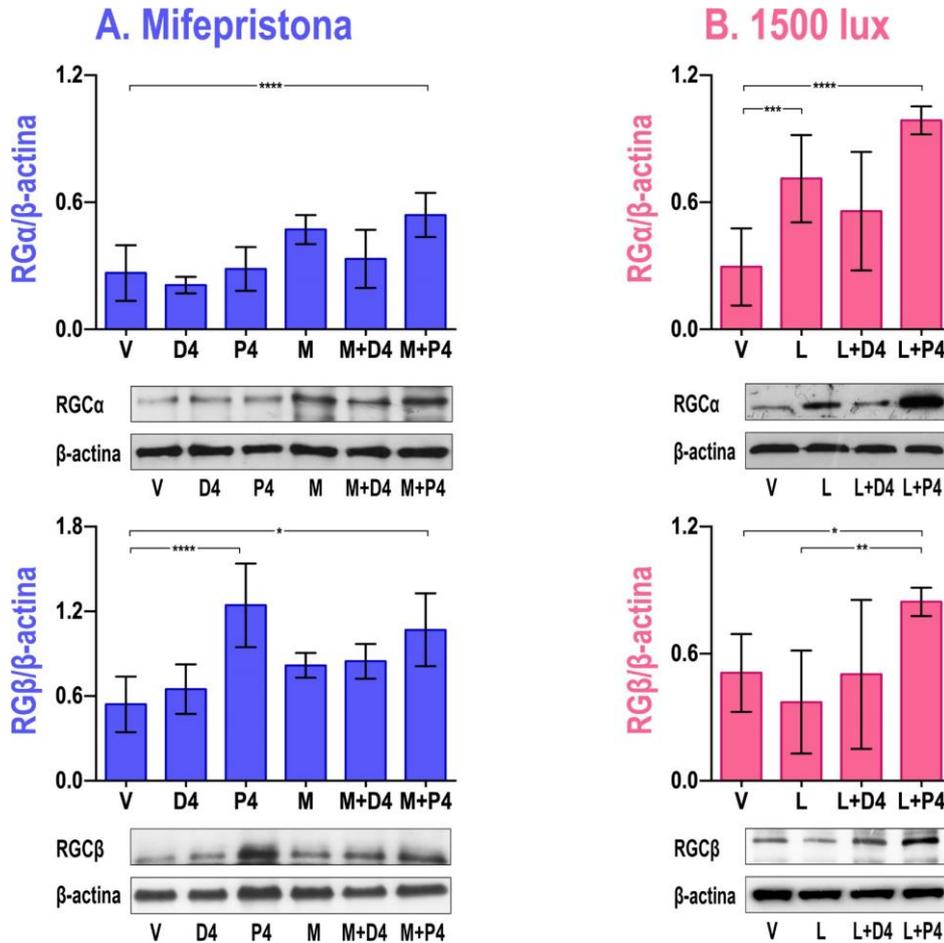


Figura 4.4. Western blots de las isoformas RG α y RG β en retinas sometidas a mifepristona o 1500 lux. Los resultados se analizaron con ANOVA de una vía seguido con la prueba post hoc de Tukey. Las barras indican el promedio \pm IC95% para cada punto experimental. **(A)** RG α aumentó después de M+P4, L y L+P4. **(B)** RG β aumentó después de P4, M+P4 y L+P4. $n = 3$ para todos los grupos.

Localización del complejo receptor RG α en los fotorreceptores

Los estudios inmunoenzimáticos verificaron la presencia de RG α a lo largo de la membrana limitante externa, indicando que este receptor podría encontrarse en las microvellosidades apicales de las células de Müller y/o en los segmentos

internos de los fotorreceptores (Figura 4.1, mediodía). Para resolver esta cuestión se estudió, mediante microscopía confocal, la variante fosforilada, p-Ser203-RG α , cuya localización es predominantemente citoplasmática [171]. El anti-p-Ser203-RG α marcó selectivamente los segmentos externos e internos de los fotorreceptores (Figura 4.5). Es decir que la marca observada a lo largo de la membrana limitante externa podría incluir RG α correspondiente al citoplasma de los fotorreceptores.

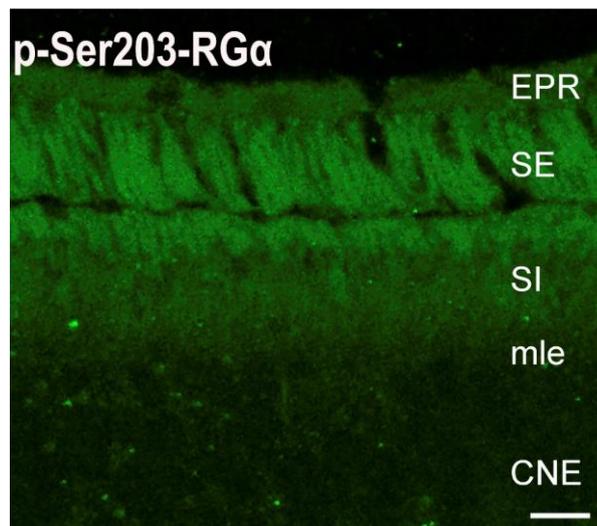


Figura 4.5. El receptor p-Ser203-RG α se detectó en los SE y en los SI, pero no en la CNE. mle, membrana limitante externa, el resto de las abreviaturas como en la Figura 4.2. Barra de calibración, 20 μ m.

Los segmentos externos e internos de los fotorreceptores también mostraron intensa IF para FKBP52, una chaperona de RG α necesaria para el tráfico intracelular de este receptor [169]. Al mediodía, la FKBP52-IF fue mayor en el EPR que en los fotorreceptores, mientras que después de 7 días de oscuridad predominaba en los SE. En estas retinas, los segmentos externos también mostraron mayor IF de tubulina que al mediodía (Figura 4.6). La localización selectiva de esta chaperona apoya un posible efecto directo de RG α sobre los SE.

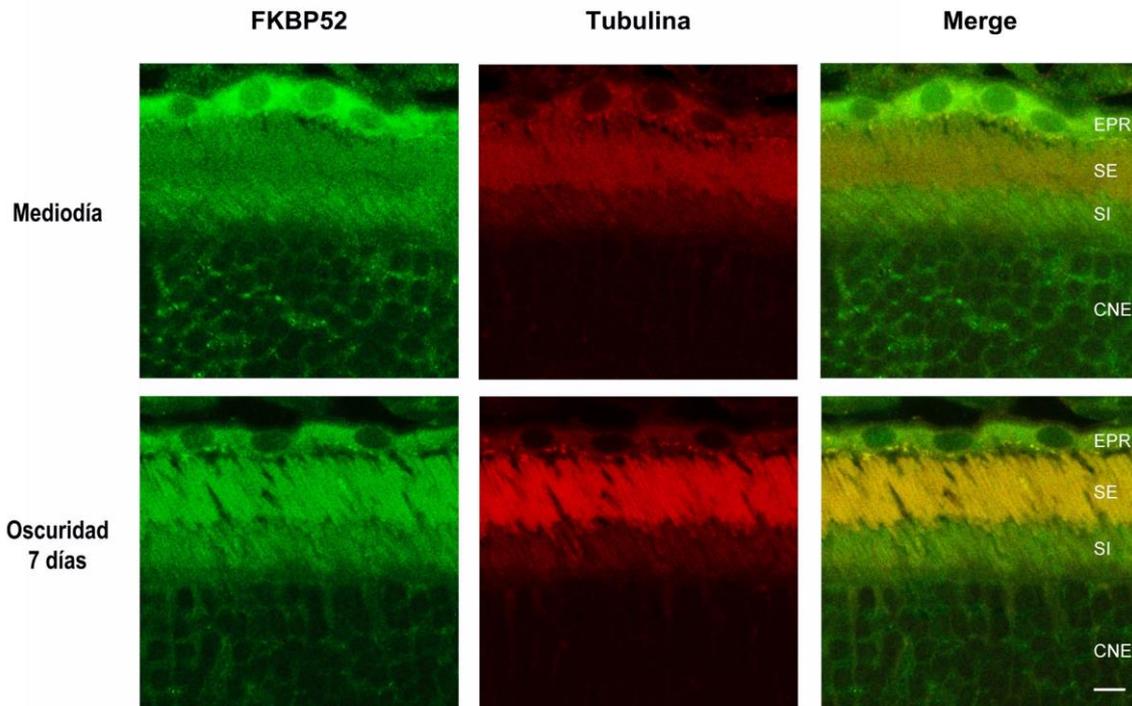


Figura 4.6. *Inmunofluorescencia para FKBP52 y tubulina al mediodía y luego de oscuridad prolongada. Al mediodía, la IF de FKBP52 era intensa en el EPR, moderada en los SI y débil en los SE. La IF de los SE aumentó después de oscuridad, cuando alcanzó la intensidad de la FKBP52-IF del EPR. En la oscuridad también aumentó la marcación para tubulina en los SE. Abreviaturas como en la Figura 4.2. Barra de calibración, 20 μ m.*

Para corroborar la presencia de receptores de glucocorticoides en los SE, estos fueron aislados a partir de homogenatos de retina. Mediante Western blot, se demostró que los SE aislados contenían RG total, RG α y RG β . También se encontró la variante fosforilada de RG α , p-Ser203-RG α (Figura 4.7).

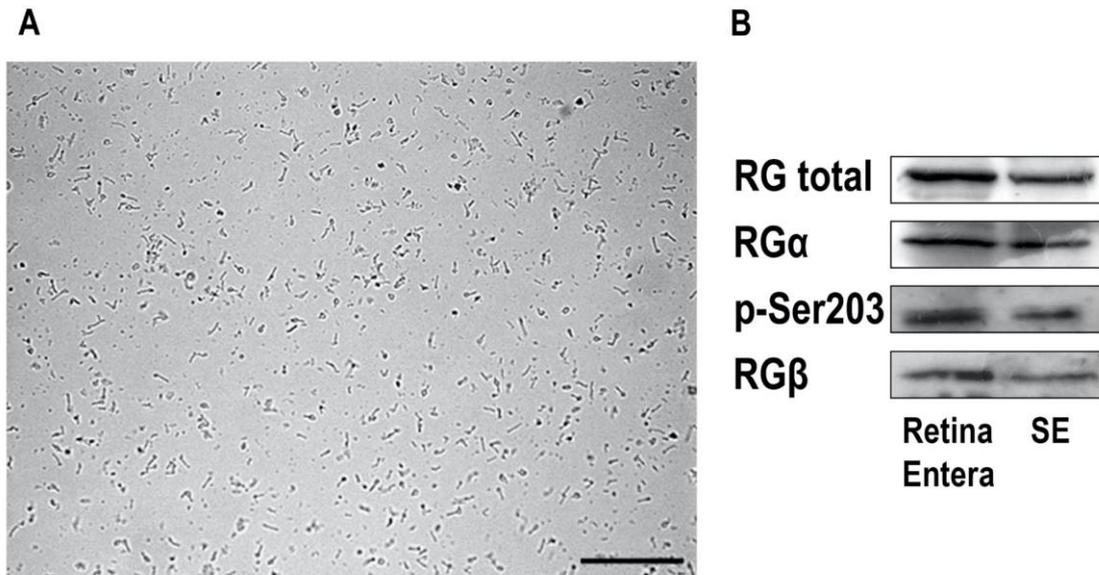


Figura 4.7. (A) Preparación de segmentos externos aislados. Barra de calibración, 50 μm . **(B)** Western blots que demuestran la presencia del receptor de glucocorticoides, y sus isoformas α y β , así como la forma fosforilada p-Ser203-RG α , en retina total y en extractos de segmentos externos aislados.

Discusión

En este Capítulo se muestran distintas localizaciones de los RG, cada una de ellas compatible con distintos mecanismos de supervivencia. Mas importante aún, es que la mifepristona, al igual que la luz, daña selectivamente a los fotorreceptores, apuntando a un rol fundamental de RG α en el mantenimiento de estas células.

Receptores de glucocorticoides y células de Müller

Se demostró que todas las células de la retina neural y del EPR poseen RG α nuclear, reflejando la extensa actividad transcripcional dependiente de glucocorticoides. Sin embargo, la marcación nuclear más intensa se observó en las células de Müller, ubicadas en el estrato medio de la CNI, cuya elevada

expresión de $RG\alpha$ es bien conocida [257]. El $RG\alpha$ de las células de Müller se redujo en la oscuridad con respecto a la iluminación diurna, se mantuvo en el nivel diurno en las retinas expuestas a 1500 lux y desapareció con mifepristona. La reducción de $RG\alpha$ durante el período de oscuridad o después de mifepristona implica menor actividad transcripcional dependiente de glucocorticoides en la retina no estimulada, así como cuando $RG\alpha$ está inhibido. Por el contrario, la abundante expresión de $RG\alpha$ nuclear en las células de Müller de la retina iluminada es consistente con la producción de factores de crecimiento u otras sustancias que promueven la supervivencia de los fotorreceptores [258-260]. Su desaparición en las retinas sometidas a mifepristona sugiere que la menor producción de factores tróficos, como el FGF2 [261], podría afectar directamente la supervivencia de los fotorreceptores, aun en un ambiente con iluminación estándar.

En las células de Müller, solo se detectó $RG\beta$ de localización nuclear, con la misma intensidad que en los núcleos de otros tipos celulares de la retina neural.

Localización de $RG\alpha$ en fotorreceptores

Aunque codificados por un único gen, el NR3C1 [161], RG aparece en diversas isoformas, incluyendo variantes fosforiladas y formas unidas a membranas que pueden mostrar efectos no genómicos [262]. Encontramos la forma fosforilada p-Ser203- $RG\alpha$, la única isoforma de $RG\alpha$ fosforilada en ausencia de ligando [171], en segmentos internos y externos de los fotorreceptores. Esta localización sugiere la participación de p-Ser203- $RG\alpha$ en fenómenos locales, posiblemente no genómicos. La presencia de $RG\alpha$ en los segmentos externos estaría relacionada con las modificaciones en los niveles de rodopsina producidos por

dexametasona y mifepristona (ver Capítulo 3). Asimismo, la toxicidad selectiva de la mifepristona sobre los fotorreceptores podría ser explicada por el bloqueo de estos receptores no-nucleares.

Los segmentos externos e internos también mostraron IF para FKBP52, demostrando que la migración de los receptores de glucocorticoides hacia la periferia del fotorreceptor es posible. Al igual que la tubulina, esta chaperona aparecía más concentrada en condiciones de oscuridad, a semejanza de los desplazamientos de la transducina y la arrestina, importantes componentes de la cadena de fototransducción, que pasan del segmento interno al externo, y viceversa, en función de los estímulos luminosos [263].

Receptores de glucocorticoides y protección de la retina

Los WB mostraron un aumento de $RG\alpha$ por la exposición a la luz, pero no por mifepristona. Estos cambios, consistentes con las observaciones inmunohistoquímicas, apoyan una regulación positiva de $RG\alpha$ dependiente de la lesión fótica y la consiguiente activación de las células de Müller. La lesión por mifepristona, que ocurre en ausencia de daño extrínseco, sugiere que la actividad transcripcional dependiente de glucocorticoides es necesaria para controlar el estrés de la estimulación fótica cotidiana [77]. Esta función de los glucocorticoides posiblemente puede ser reemplazada por la progesterona y otros progestágenos, ya que tanto M+P4 como L+P4 aumentaron los niveles de $RG\alpha$ sobre los controles expuestos a daño que solo recibieron vehículo.

El papel anti-apoptótico de los glucocorticoides en los fotorreceptores es una excepción, ya que el $RG\alpha$ activado induce la muerte celular en la mayoría de las regiones del cerebro [264]. Por el contrario, las señales de progesterona son anti-apoptóticas en la mayoría de los tejidos, y en las células de la granulosa del

ovario son mediadas por PGRMC1 [265]. Los progestágenos también muestran un papel pro-supervivencia de los fotorreceptores mediado por PGRMC1 [12], pero a dosis mucho mayores que las utilizadas en nuestros experimentos.

La progesterona *per se* aumentó la expresión de RG β en ratones no lesionados, mientras que M+P4 y L+P4 también aumentaron RG β , además del aumento de RG α mencionado anteriormente. Estos aumentos sugieren que la supervivencia de los fotorreceptores dependiente de progesterona dependería de la disponibilidad de RG α y RG β . Cabe notar que, además de actuar como inhibidor del receptor α , RG β tiene un transcriptoma propio [177, 178] que también podría intervenir en la supervivencia de los fotorreceptores.

Receptores de glucocorticoides y EPR

Al igual que las células de la retina neural, las del EPR mostraron RG α nuclear. Por el contrario, se encontró intensa inmunorreactividad RG β , tanto en los núcleos como en el citoplasma del EPR. Esta distribución concuerda con el predominio de la localización citoplasmática de esta isoforma en los tejidos epiteliales [158] y sugiere resistencia a los glucocorticoides [266].

Conclusión

La eficacia de la dexametasona y la progesterona en la protección de los fotorreceptores en ambos modelos de degeneración (ver Capítulo 3) podría ser explicada por dos mecanismos. (1) La activación de las células de Müller mediada por RG α , indispensable para la provisión de abundantes factores tróficos, como el FGF2, que mantienen la vida de los fotorreceptores; (2) la estimulación de receptores de glucocorticoides en los segmentos externos, posiblemente involucrados en la producción y/o el tráfico de rodopsina. Tanto los

glucocorticoides como la progesterona aumentan la disponibilidad de rodopsina; por el contrario, el descenso o ausencia de rodopsina se asocia con la muerte de los fotorreceptores [11] (ver Capítulo 3).

La elevada expresión de $RG\beta$ en el EPR, y su localización citoplasmática, sugirieron la necesidad de evaluar la resistencia a los glucocorticoides en este epitelio y su importancia para la supervivencia de las células visuales.

Capítulo 5

Glucocorticoides y progestágenos en el epitelio pigmentario de la retina

El EPR es esencial para el funcionamiento de la retina externa y sus alteraciones pueden limitar la funcionalidad y supervivencia de los fotorreceptores. Sin embargo, sus respuestas a glucocorticoides y progestágenos son poco conocidas. Algunos estudios sugieren que los glucocorticoides facilitan la muerte de estas células [15]. Más aún, los glucocorticoides se asocian con la coriorretinopatía serosa central (CRS), o epiteliopatía pigmentaria paquicoroidea, una enfermedad del segmento posterior que conlleva desprendimientos focales del EPR y alteraciones de la coroides [267]. Las personas afectadas presentan concentraciones elevadas de cortisol, acompañadas por descensos de la aldosterona. La CRS aparece en un 5% de los pacientes con Cushing y es más frecuente en personas del sexo masculino o con distrés emocional [267]. Recientemente se describieron casos asociados al uso de dexametasona intravítrea [268, 269]. Por otra parte, como demostramos en el Capítulo anterior, las células del EPR presentan elevada inmunorreactividad citoplasmática de $RG\beta$, que podría determinar resistencia a los glucocorticoides. Esta localización de $RG\beta$ es inusual, y sugiere que la respuesta del EPR a los corticoides es inversa a la respuesta de la retina neural. Cabe entonces preguntarse cuáles son los mecanismos celulares que promueven esta respuesta.

Estudiamos el efecto de dexametasona, levonorgestrel y mifepristona en células ARPE-19, una línea celular derivada de EPR humano. Utilizamos levonorgestrel

debido a que es un progestágeno con menor afinidad por los receptores $RG\alpha$ que la progesterona [270]. Los objetivos específicos de este Capítulo fueron: (1) evaluar el efecto de dexametasona, levonorgestrel y mifepristona sobre la supervivencia de células ARPE-19; (2) y estudiar la expresión de receptores de glucocorticoides en dichas células.

Resultados

Dexametasona, levonorgestrel y mifepristona en la supervivencia de las células ARPE-19

Estudios de actividad metabólica con MTT

Las células, cultivadas en DMEM/F12 con 17,5 mM glucosa y 10% de SFB, fueron expuestas a los esteroides durante 24 hs, siendo evaluadas inmediatamente después de este período. Se utilizó el MTT para medir la supervivencia de los cultivos (ver Capítulo 2). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles sin o con etanol (E) (Figura 5.1), utilizándose estos últimos para comparar los resultados.

La dexametasona redujo los valores de MTT en todas las concentraciones ensayadas, aunque los descensos solo fueron significativos a partir de 0,32 mM. Mifepristona (1-50 μ M) no modificó la densidad óptica (OD), pero potenció la inhibición de la proliferación inducida por dexametasona en todas las concentraciones ensayadas (Figura 5.1). Levonorgestrel 1,27 μ M no modificó los valores del MTT, pero estos se redujeron significativamente en concentraciones mayores, 2,54 y 5,08 μ M (datos no mostrados).

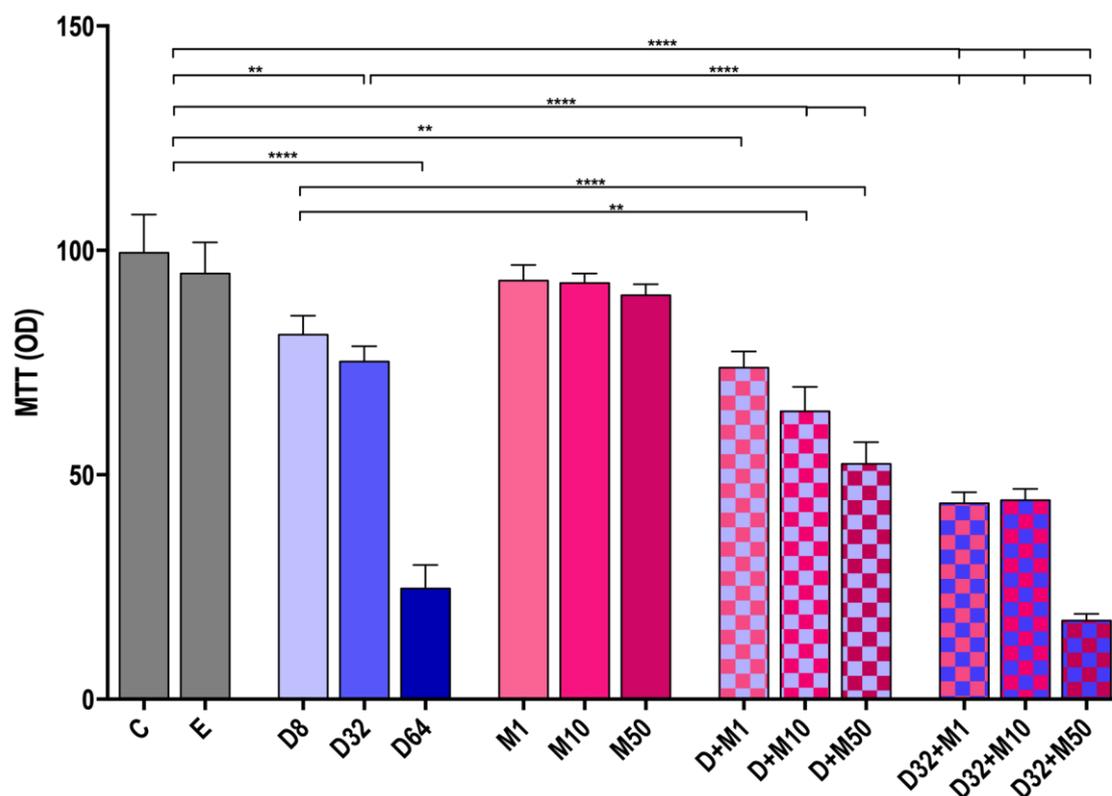


Figura 5.1. Las barras corresponden a valores normalizados de OD e indican la actividad metabólica de los cultivos de células ARPE-19 a las 24 hs, que a su vez refleja la masa de células que han sobrevivido/proliferado en cada cultivo. La OD disminuyó significativamente con dexametasona 0,32 y 0,64. Después de mifepristona la OD de MTT no difería de los controles. Las combinaciones dexametasona + mifepristona fueron altamente citotóxicas, particularmente cuando se utilizó dexametasona mayor o igual a 0,32 mM. Sólo se muestran las diferencias significativas respecto al control, y a dexametasona vs su combinación con mifepristona ($n = 4$). En los experimentos de este Capítulo, los datos se muestran como media \pm SEM y fueron comparados con ANOVA de una vía seguido del post-test de Holm-Sidak.

Para descartar un efecto tóxico del solvente (etanol) se repitieron los mismos ensayos con dexametasona 21-fosfato, soluble en medio acuoso, obteniéndose los mismos efectos que con la dexametasona base (resultados no mostrados).

Posibles interacciones entre la citotoxicidad de dexametasona y la concentración de glucosa en el medio

Las altas concentraciones de glucosa (30-50 mM) en el medio inducen apoptosis de las células ARPE-19 [271]. Como la dexametasona se utiliza en forma intravítrea en los pacientes con edema de papila de origen diabético, una lesión que refleja una falla del EPR, analizamos la existencia de interacciones entre las concentraciones de glucosa en el medio y la toxicidad de la dexametasona. Se utilizaron los medios: (1) DMEM/F12, con 17,5 mM glucosa (utilizado como comparador, ya que es el medio de cultivo habitual para las células ARPE-19), (2) DMEM LG, cuya concentración de glucosa (5,6 mM) se asemeja a la normogluemia (3-7 mM), (3) y DMEM HG, con 25 mM glucosa. Todos con 10% de SFB.

Como se esperaba, las células ARPE-19 mostraron mayor MTT con el medio DMEM/F12 que con los otros dos, DMEM LG o DMEM HG (Figura 5.2). Como en los experimentos previamente descritos, la supervivencia de las células cultivadas en DMEM/F12 10% SFB solo fue reducida por la dexametasona 0,32 mM (D32, Figuras 5.1 y 5.3). La dexametasona 0,08 mM (D8) no modificó los valores de OD en DMEM HG, pero los disminuyó significativamente en el medio DMEM LG. Por su parte, D32 disminuyó el MTT en ambos medios (Figura 5.3). Estas observaciones sugieren que, *in vitro*, las bajas concentraciones de glucosa podrían exacerbar la citotoxicidad de la dexametasona.

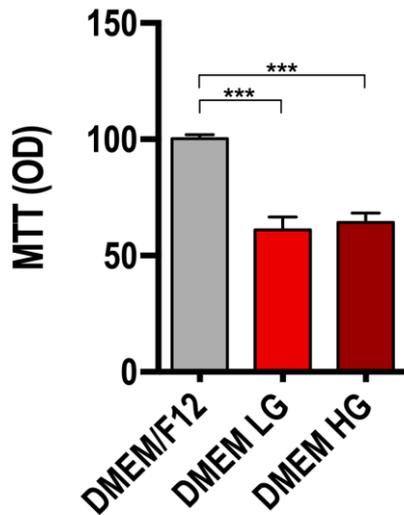


Figura 5.2. Porcentaje de supervivencia de las ARPE-19 en medios con distintas concentraciones de glucosa. El OD de las células ARPE-19 disminuyó aproximadamente 50% al utilizar DMEM LG o DMEM HG (n = 4).

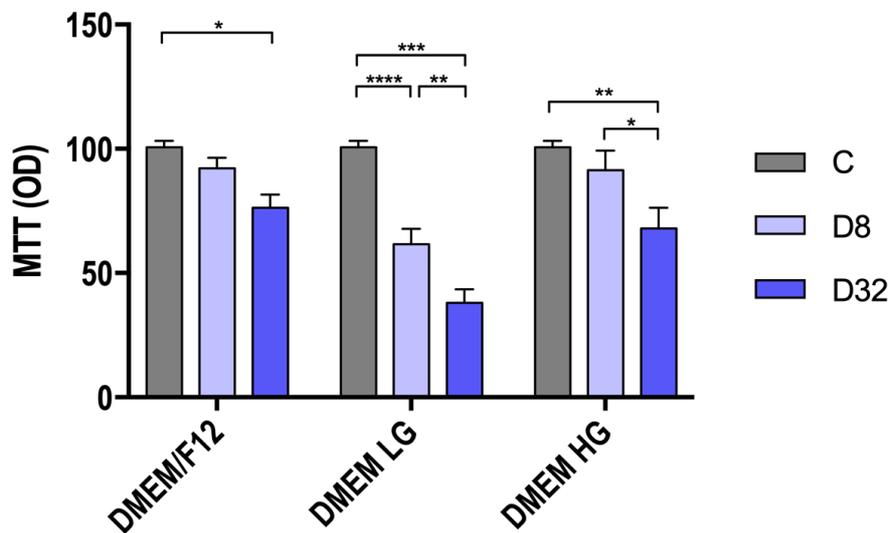


Figura 5.3. Efectos de la dexametasona sobre la actividad metabólica (MTT OD) de células ARPE-19 en medios con distinta concentración de glucosa. Los cultivos tratados se comparan con el control (C) incubado en el mismo medio normalizado a 100 %. La adición de D8 en los medios DMEM/F12 o DMEM HG no generó cambios significativos, pero redujo la OD en el medio con baja glucosa. La D32 redujo significativamente el valor de MTT en las tres condiciones de cultivo (n = 4). Los datos fueron comparados con ANOVA de dos vías seguido del post-test de Holm-Sidak, y aparecen como media \pm SEM.

Dexametasona provocó muerte celular según su concentración

Se utilizó el procedimiento de Naranja de Acridina/Bromuro de Etidio (AO/EB, ver Capítulo 2) para identificar células con condensación nuclear y/o coloración citoplasmática que indica pérdida de la integridad de la membrana. Para la evaluación cuantitativa de estos experimentos, se contaron al menos 700 células por cubreobjetos de 3 experimentos independientes. La estadística se realizó comparando contra E debido a que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los controles sin o con etanol (Figura 5.7).

Los cultivos en DMEM-F12, tratados con D8 mM, mostraron un 2% de núcleos con indicios de muerte celular. Las células muertas aumentaron en forma proporcional a la concentración de dexametasona hasta totalizar un 20% en los cultivos expuestos a dexametasona 0,64 mM (D64, Figuras 5.4 y 5.7). Con la concentración más alta, 1,28 mM, se encontraron señales de muerte en 38% de los núcleos (datos no mostrados). Las células con indicios de muerte aumentaron progresivamente según la concentración de dexametasona.

Los resultados del procedimiento AO/EB sugieren dos procesos de muerte celular (o dos estadios de un mismo proceso). Aproximadamente la mitad de las células presentaba cromatina condensada, con o sin permeabilidad de la membrana plasmática al EB, sugiriendo un proceso apoptótico [212]. La otra mitad solo presentaba permeabilidad de la membrana, lo que correspondería a procesos necróticos, aunque la metodología es insuficiente para identificar formas reguladas y no reguladas de necrosis.

Mifepristona no alteró la proporción de núcleos muertos con respecto al control. Con las dosis más bajas (1 y 10 μ M), las células muertas eran menos del 3%. Aun con la dosis más alta (50 μ M), los núcleos muertos no superaron el 5%

(Figuras 5.5 y 5.7). Sin embargo, la combinación de dexametasona y mifepristona (D+M) produjo, en todos los casos, el mismo daño, o incluso más, que la dexametasona sola, sin diferencias significativas entre células con la cromatina condensada y no condensada (Figuras 5.6 y 5.7).

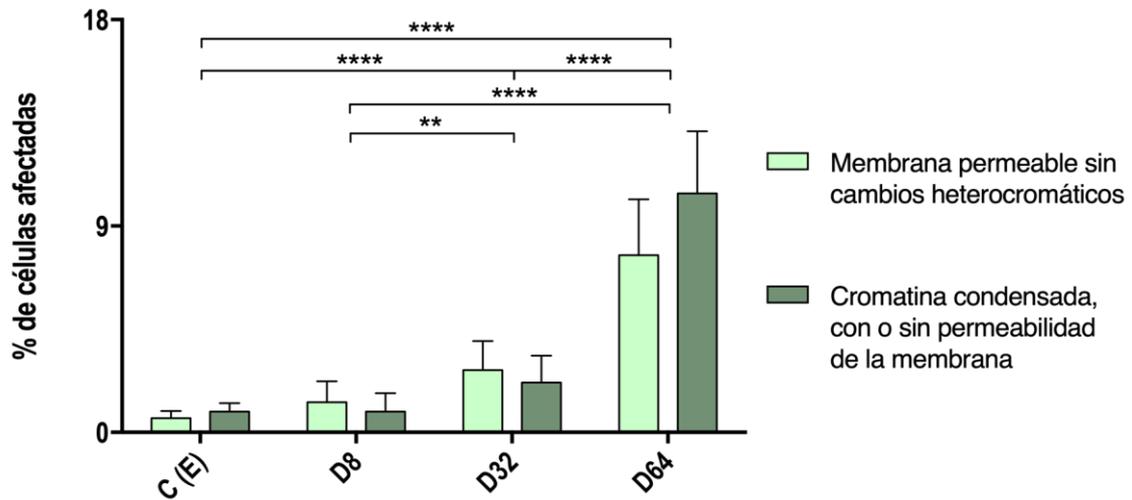


Figura 5.4. Proporción de células con indicios de muerte detectados mediante el procedimiento AO/EB. Las barras muestran el porcentaje de células con membrana permeable al EB, y de células con cromatina condensada, con o sin membrana permeable al EB, en cultivos expuestos a concentraciones crecientes de dexametasona. Ambas formas de muerte subieron en igual proporción para todas las concentraciones. La significación estadística fue calculada para todas las células con indicios de muerte ($n = 3$).

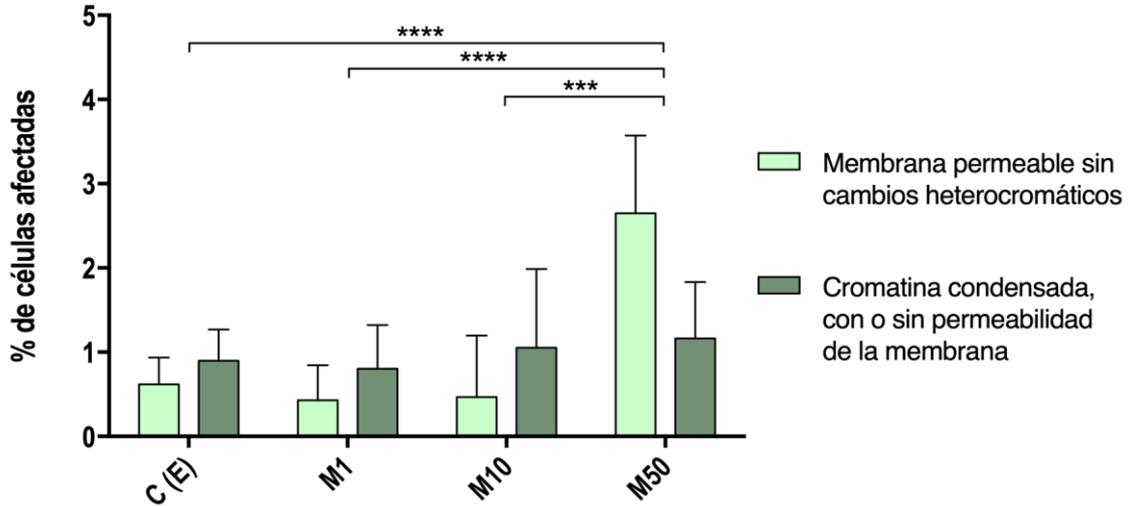


Figura 5.5. Proporción de células con membrana permeable al EB y de células con cromatina condensada, con o sin alteraciones de la membrana, después de la exposición a concentraciones crecientes de mifepristona. La proporción de núcleos afectados fue muy baja y solo los cultivos tratados con 50 μ M superaron los niveles del control. La significancia corresponde al total de células muertas para cada condición ($n = 3$).

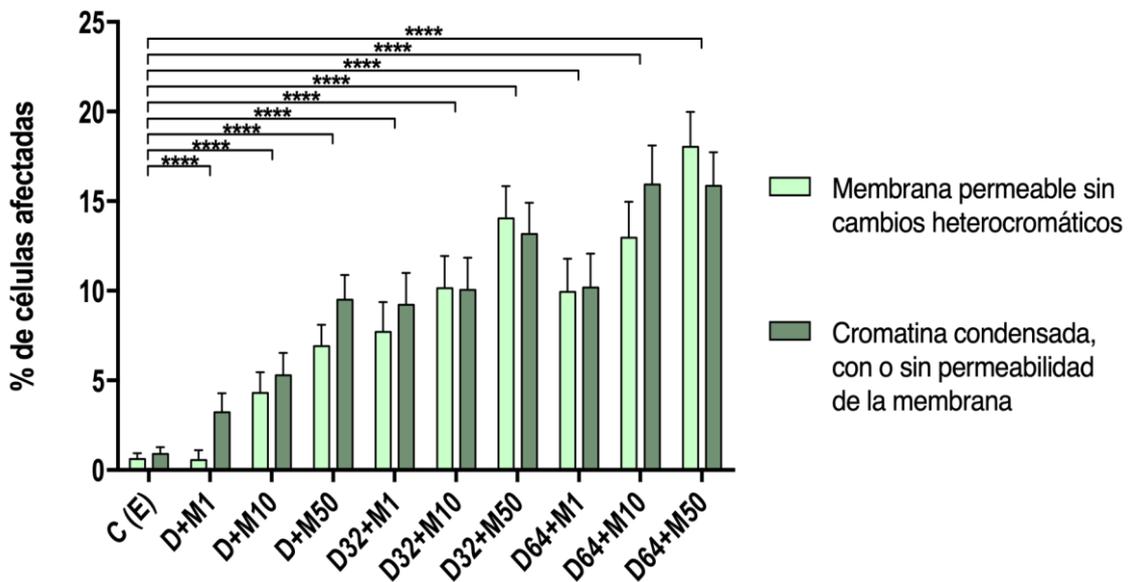


Figura 5.6. Proporción de células con membrana permeable al EB y de células con cromatina condensada, con o sin alteraciones de la membrana, en cultivos expuestos a dexametasona y mifepristona. La proporción de núcleos afectados aumentó al incrementarse las concentraciones de dexametasona y/o mifepristona. Sólo se muestran las diferencias significativas respecto al control. La significancia corresponde al total de células muertas para cada condición ($n = 3$).

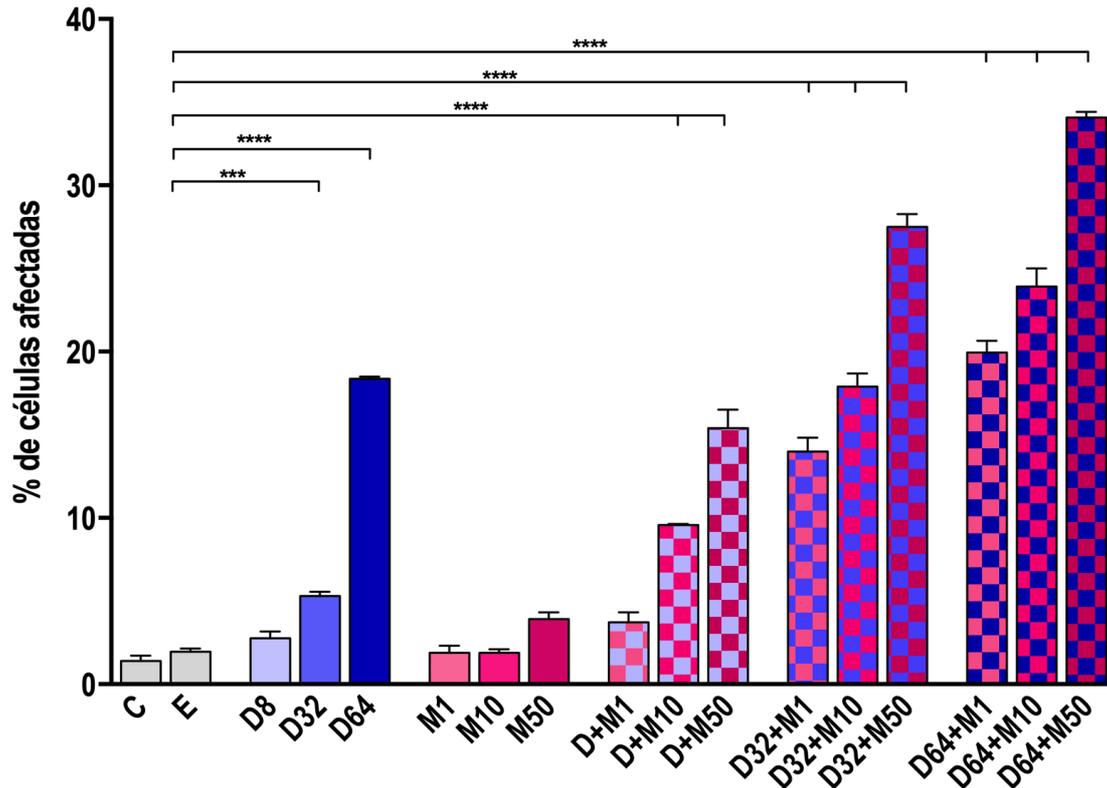


Figura 5.7. Porcentaje de células muertas totales detectadas mediante AO/EB según la concentración de dexametasona, mifepristona o su combinación. D32 y D64 aumentaron significativamente las células muertas. D+M indujo mayor daño que la dexametasona sola. Sólo se muestran las diferencias significativas respecto al control ($n = 3$).

Receptores de esteroides y otros marcadores en células EPR

Determinación por qPCR

Mediante qPCR comparamos la expresión de $RG\alpha$ y $RG\beta$ en presencia de 0,08, 0,32 y 0,64 mM dexametasona, y 1, 10 y 50 μ M mifepristona. D8 y D32 no modificaron significativamente la expresión de $RG\alpha$ - ni $RG\beta$ -ARNm. Por su lado, D64 disminuyó significativamente $RG\alpha$, pero produjo el efecto opuesto sobre $RG\beta$, que aumentó con respecto a la concentración basal. Mifepristona 10 y 50 μ M (M10 y M50, respectivamente) aumentaron significativamente ambos

receptores. $RG\beta$ aumentó más con mifepristona que con dexametasona (Figura 5.8).

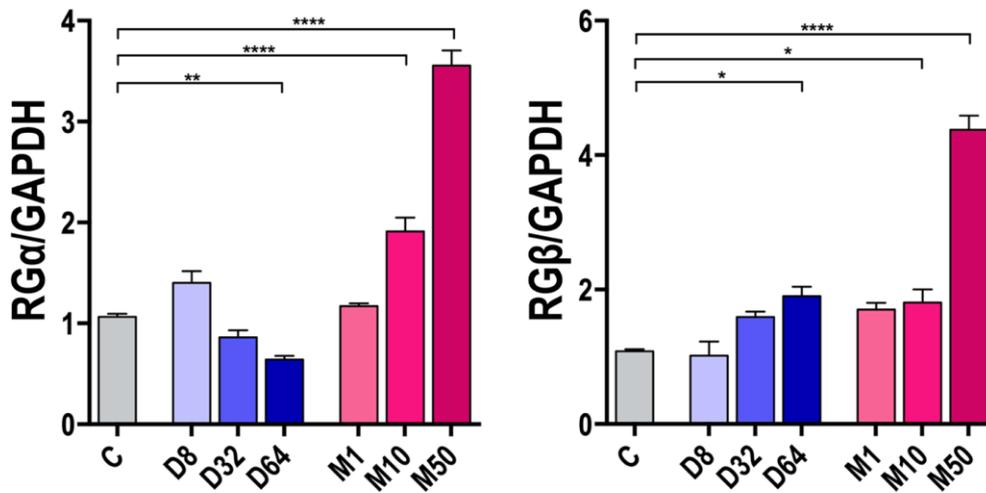


Figura 5.8. Expresión de ARNms que codifican $RG\alpha$ y $RG\beta$ después de exponer las células ARPE-19 a distintas concentraciones de dexametasona y mifepristona. Sólo se muestran los controles con etanol ya que no fueron diferentes de los controles sin etanol ($n = 5$).

En cuanto a los marcadores de EPR, encontramos que CRALBP disminuyó con D8, pero aumentó con M10. Los valores de RPE65 aumentaron con mifepristona y levonorgestrel (Figura 5.9).

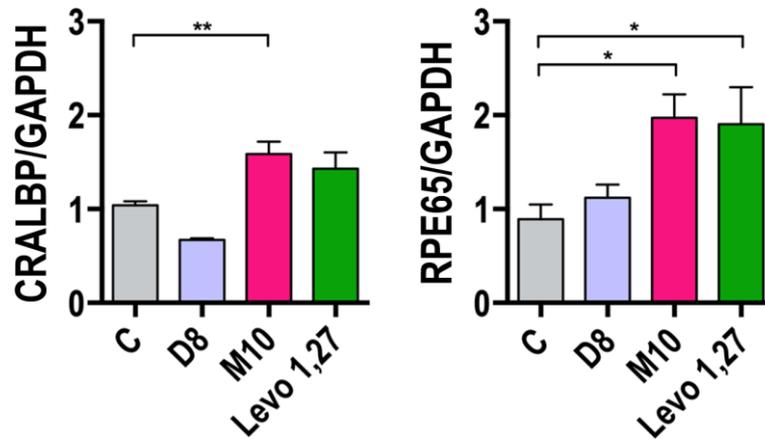


Figura 5.9. Expresión de ARNm de marcadores de epitelio pigmentario. CRALBP incrementó con mifepristona, mientras que RPE65 aumentó tanto con mifepristona como con levonorgestrel ($n = 5$).

Localización de receptores de glucocorticoides en células ARPE-19

Se utilizó inmunofluorescencia para detectar RG en células ARPE-19 tratadas con distintas concentraciones de dexametasona y mifepristona, empleándose DAPI como marcador nuclear.

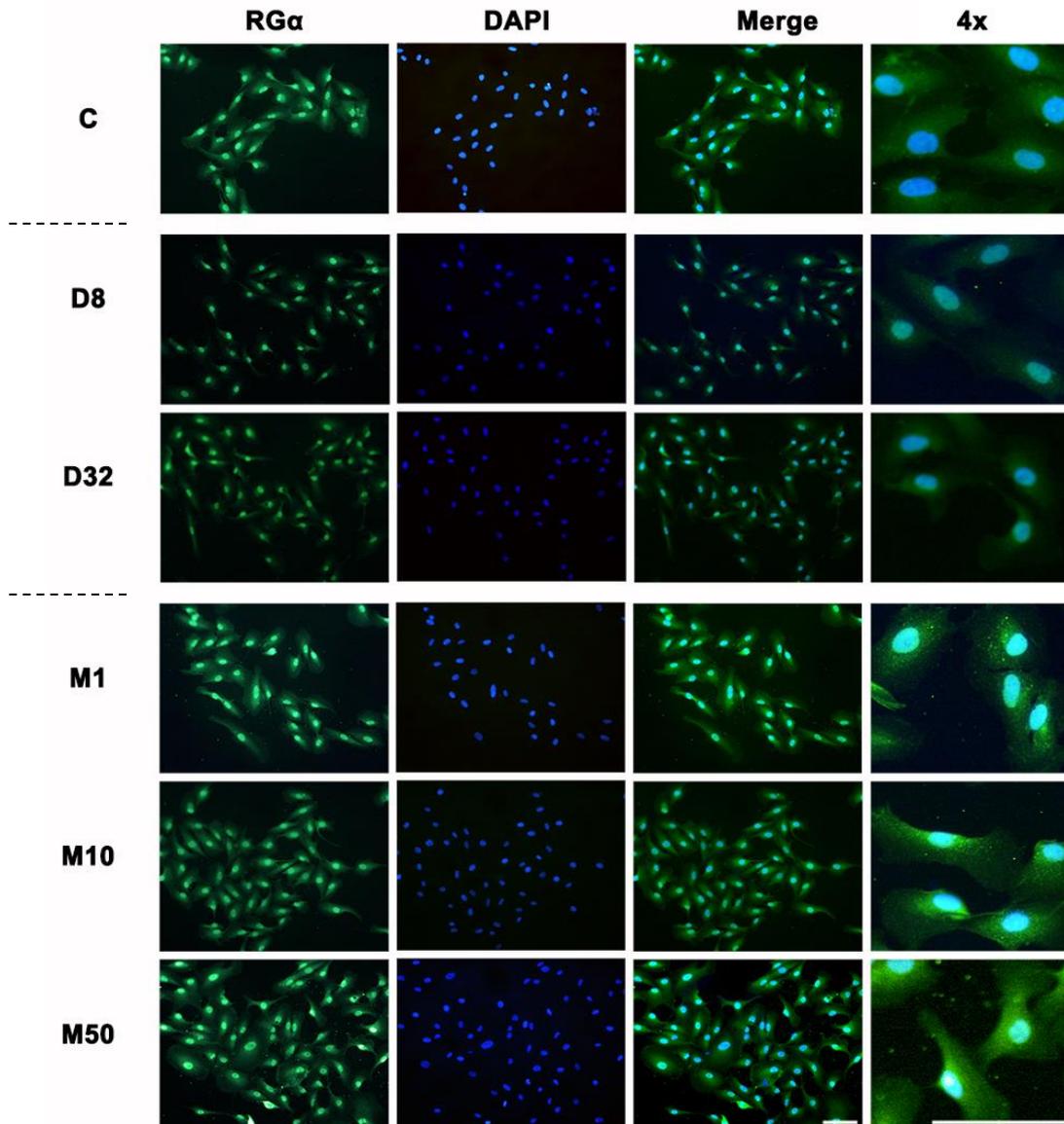


Figura 5.10. Localización de RG α -IF en células ARPE-19 tratadas con distintas concentraciones de dexametasona o mifepristona. Los RG α mostraron principalmente una localización nuclear. Dexametasona no provocó grandes modificaciones. Mifepristona aumentó el tamaño celular y nuclear, así como la inmunofluorescencia RG α en toda la célula. Barra de calibración, 20 μ m.

En condiciones basales, las células mostraron un aspecto fusiforme con intensa RG α -IF nuclear, que fue muy débil en el citoplasma. El tratamiento con D8 o D32 no produjo mayores cambios, aunque la RG α -IF citoplasmática parecía de

menor intensidad (Figura 5.10). Estas observaciones concuerdan con los experimentos de qPCR.

En los cultivos tratados con mifepristona, RG α -IF era intensa en el citoplasma, pero mucho más en el núcleo. Estos cambios fueron más evidentes en los cultivos tratados con M10 y M50, que además mostraban aumento del tamaño celular (Figura 5.10).

RG β -IF predominaba en el citoplasma, concentrándose en las regiones perinucleares, aunque también aparecía en el citoplasma y sus prolongaciones. En los cultivos tratados con D8, la presencia de espacios redondeados libres de inmunofluorescencia, sugirió que RG β -IF se acumulaba alrededor de vacuolas próximas al núcleo. Tanto el citoplasma como el nucleoplasma mostraron mayor RG β -IF que los controles. La misma distribución se observó después de D32, una concentración que también aumentó el tamaño celular y modificó la forma de las células (Figura 5.11).

En las células tratadas con mifepristona 1 μ M (M1), RG β -IF se distribuía de manera semejante a la del control (C) Con M10, RG β -IF se concentró en el núcleo y regiones perinucleares. Con M50 se observaron células de citoplasma expandido, donde la RG β -IF se concentraba en regiones perinucleares, desapareciendo en el citoplasma cortical (Figura 5.11). El aumento perinuclear de RG β -IF podría estar correlacionado con el aumento del RG β -ARNm mostrado por la qPCR.

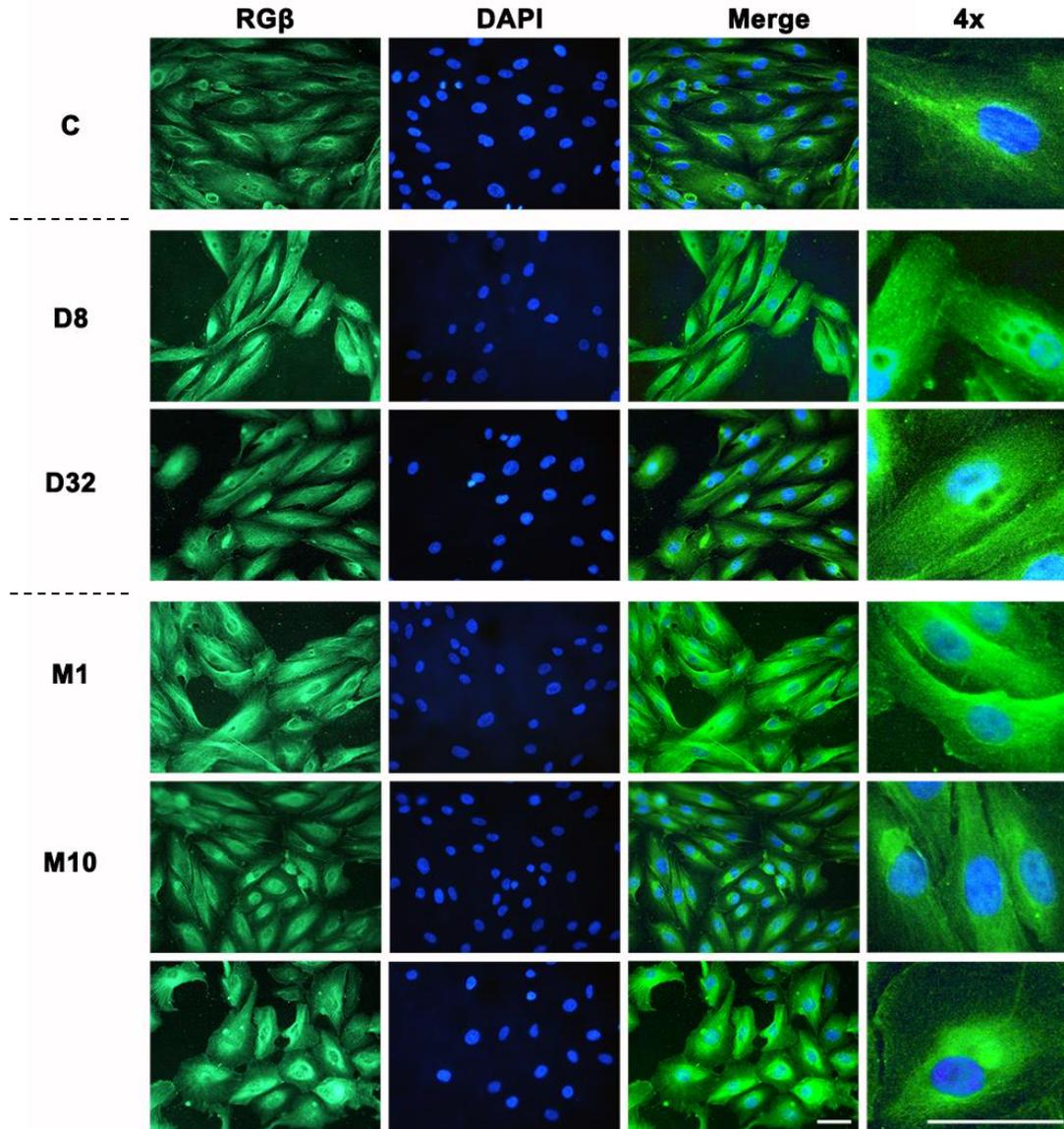


Figura 5.11. Localización de RG β -IF en células ARPE-19 tratadas con dexametasona o mifepristona. En los cultivos controles, RG β -IF muestra localización citoplasmática, especialmente perinuclear. El tratamiento con dexametasona o mifepristona aumentó la intensidad de RG β -IF, especialmente alrededor del núcleo. El aumento perinuclear fue más evidente en los cultivos tratados con M10 y M50, donde las células también mostraron cambios en la forma celular. Barra de calibración, 10 μ m.

Para analizar los cambios citoesqueléticos asociados al tratamiento con mifepristona, estudiamos la localización de actina y tubulina utilizando faloidina y anticuerpo anti-tubulina, respectivamente. En los cultivos control (C), la actina se localizaba en el citoplasma cortical. La tubulina, por el contrario, mostraba una

localización central, con un predominio de fascículos orientados en el eje mayor de las células (Figura 5.12).

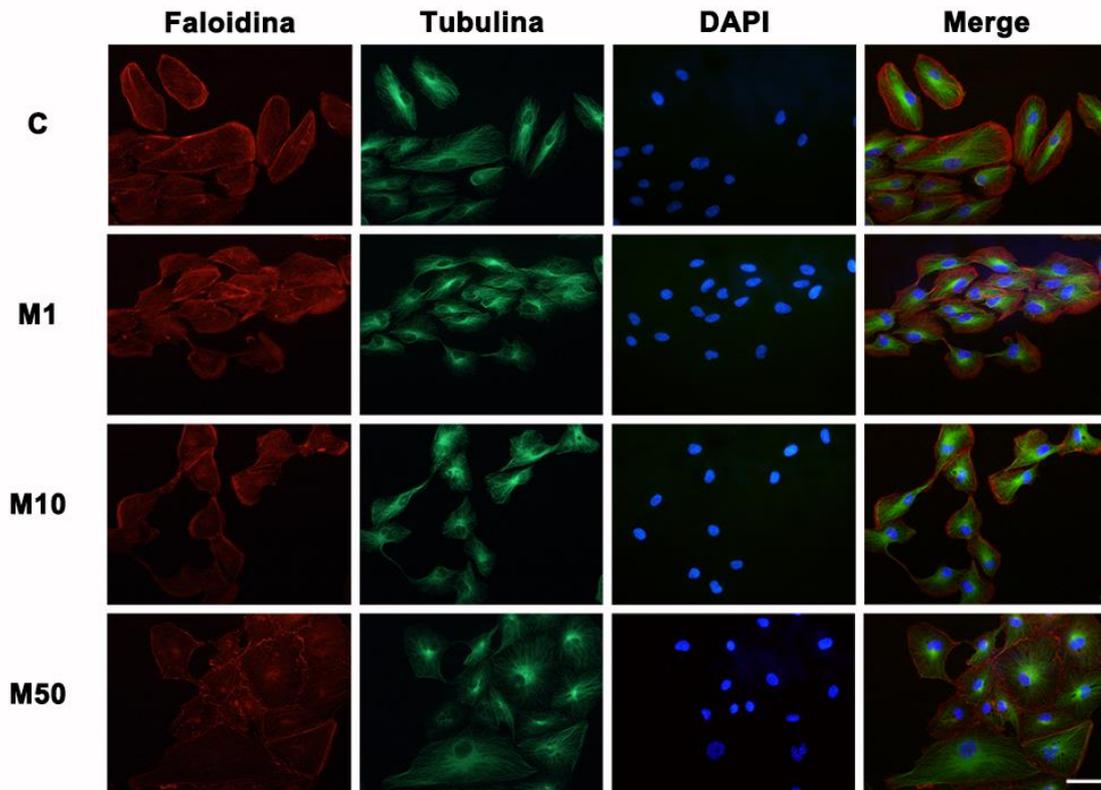


Figura 5.12. Organización de los componentes citoesqueléticos, actina y tubulina, en células ARPE-19 tratadas con mifepristona. Con M1 se observó aumento de tubulina-IF, concentrada alrededor del núcleo. Después de 10 μM , la actina-IF se acumuló en un borde de avance, asociado a una expansión de los microtúbulos. Con 50 μM , las células adoptaron una forma poligonal, con actina periférica relativamente escasa y microtúbulos perinucleares dispuestos radialmente, aunque en forma asimétrica. Barra de calibración, 20 μm .

Después de M1, la actina se distribuyó en forma semejante a la observada en los controles, pero la tubulina marcaba las estructuras fibrilares axiales con mayor intensidad. En los cultivos tratados con 10 μM , las células presentaban la morfología y la organización citoesquelética de una célula migrante, de aspecto bipolar, con un borde de avance rico en actina, mientras que las estructuras fibrilares axiales marcadas por anti-tubulina ahora se expandían cerca del borde

de avance. Como describimos anteriormente, las células tratadas con 50 μM eran de gran tamaño y presentaban un núcleo central. Estas células tenían poca actina en la periferia y la tubulina se acumulaba en la zona perinuclear, distribuyéndose en forma radial. Tubulina y RG β mostraron el mismo patrón de localización perinuclear para todas las dosis de mifepristona (Figuras 5.12 y 5.13). La ausencia de cambios cuantitativos en los Western blots de actina y tubulina (Figura 5.14) sugiere que las concentraciones mayores de mifepristona alteraron la organización tridimensional del citoesqueleto.

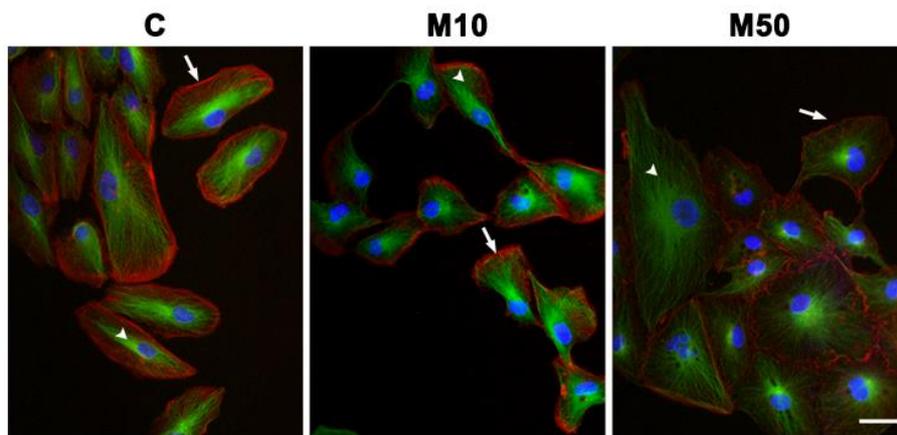


Figura 5.13. Coloración con faloidina (actina) y tubulina-IF (punta de flecha) en las células ARPE-19, controles y tratadas con M10 y M50. Con 10 μM , la actina se concentraba en un borde de avance, asociado a un acúmulo microtubular. Con 50 μM , las células mostraron varias prolongaciones, asociadas a haces de microtúbulos. La actina se localizaba en todo el contorno cortical. Barra de calibración, 20 μm .

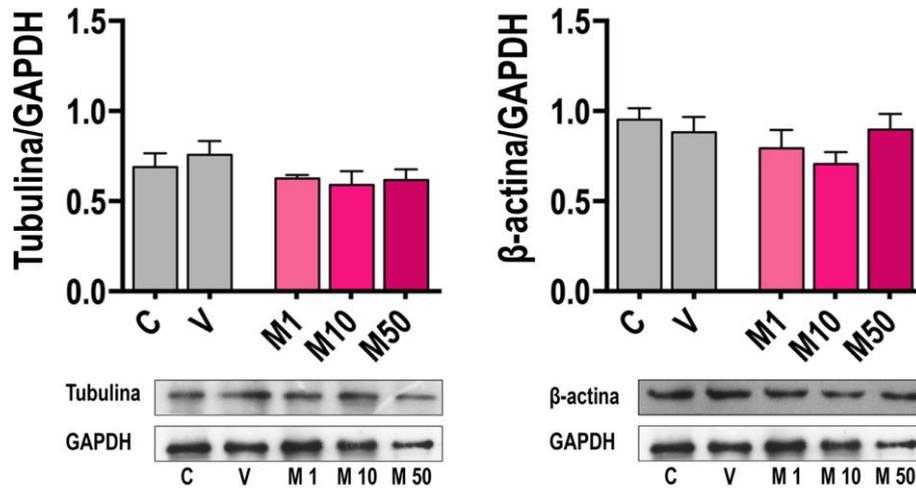


Figura 5.14. Cuantificación de Western blots para tubulina y β -actina. Se demostró la ausencia de modificaciones cuantitativas de tubulina o β -actina inducidas por la mifepristona ($n = 4$).

Discusión

Los resultados mostraron que el EPR respondió a los corticoides y a la mifepristona en forma inversa a la retina neural. Las principales diferencias fueron:

- (1) La dexametasona y el levonorgestrel resultaron tóxicos para el EPR, al contrario de lo observado en los fotorreceptores (ver Capítulo 3). Mifepristona no mostró citotoxicidad propia, pero potenció la correspondiente a dexametasona.
- (2) Mediante qPCR se demostró que, en las concentraciones más elevadas, dexametasona redujo $RG\alpha$ y aumentó $RG\beta$. Mifepristona aumentó la expresión de ambos receptores, $RG\alpha$ y $RG\beta$. En la retina neural, la expresión de $RG\alpha$ y $RG\beta$ no fue modificada significativamente por dexametasona o mifepristona. Sin embargo, la comparación con los anteriores resultados es difícil, ya que fueron obtenidos *in vivo*.
- (3) En el EPR, la inmunofluorescencia mostró que $RG\alpha$ se localizaba principalmente en el núcleo y que la intensidad de la señal era reducida por

dexametasona y aumentada por mifepristona. Por el contrario, $RG\beta$ tenía una localización citoplasmática, perinuclear, aumentando tanto en presencia de dexametasona como de mifepristona. Estas diferencias podrían ser explicadas por cambios en el tráfico intracelular de los receptores de glucocorticoides. Por otra parte, dexametasona aumentó el número de vacuolas, un fenómeno probablemente asociado a su citotoxicidad.

Citotoxicidad de dexametasona en células del epitelio pigmentario

En los cultivos de células ARPE-19, la dexametasona y el levonorgestrel disminuyeron la viabilidad y aumentaron la proporción de células muertas según su concentración. Es importante aclarar que no se detectaron cambios de CASP3 por Western blot ni por inmunohistoquímica. Tampoco se encontró actividad de β -galactosidasa, descartándose así un proceso de senescencia (datos no mostrados).

El procedimiento AO/EB mostró un 2% de células muertas con D8, un 5% con D32, y un 18% con D64, siendo significativo a partir de D32. La combinación de dexametasona 0,08 mM + mifepristona 1 μ M (D+M1) presentó un 4% de células muertas, que fue aumentando de forma significativa a medida que aumentaba uno de los dos esteroides, hasta llegar a un 34% con dexametasona 0,64 mM + mifepristona 50 μ M (D64+M50). La actividad metabólica también se vio reducida a partir de D32 y en todas las combinaciones de D+M, sugiriendo que la proliferación celular fue mucho menor en estas condiciones que en los controles. En los cultivos D+M, la reducción de la masa metabólica fue mayor que la producida solamente por dexametasona o mifepristona, por lo que posiblemente D+M habría potenciado la muerte celular al disminuir la proliferación celular.

La citotoxicidad de dexametasona fue concordante con resultados de Kuppermann y col. [272], quienes observaron que dexametasona 0,24 mM y 0,49 mM no reducen la viabilidad de las células ARPE-19 o R28, también derivadas de EPR, mientras que aparece citotoxicidad en cultivos tratados con 1,94 mM (24 hs de tratamiento). Es decir que el EPR se asemeja a otros tejidos donde la activación de $RG\alpha$ por dexametasona induce muerte celular [264, 273, 274]. Generalmente, este efecto tóxico es bloqueado por mifepristona [275, 276]. Por el contrario, en nuestros cultivos, al igual que en cultivos de células epiteliales de cristalino [277] mifepristona potenció la vulnerabilidad celular al corticoide. Esta respuesta sugiere que $RG\alpha$ no contribuiría significativamente a la citotoxicidad de dexametasona.

Expresión y localización de los receptores de glucocorticoides

Los estudios inmunohistoquímicos confirmaron el predominio de la ubicación nuclear de $RG\alpha$ en las células del EPR. Por el contrario, $RG\beta$ se localizaba en el citoplasma, una ubicación poco frecuente en otros fenotipos [157, 158]. Al igual que Hinds y col. [160], encontramos que la administración de dexametasona aumentó la IF de $RG\beta$ tanto en el citoplasma como en el nucleoplasma, y redujo la expresión de $RG\alpha$ y aumentó la de $RG\beta$. La mifepristona, por su parte, aumentó tanto $RG\alpha$ como $RG\beta$. Una situación semejante fue observada por Whorwood y col. [278] en células de músculo esquelético expuestas a cortisol. Se ha sugerido la existencia de una retroalimentación negativa, probablemente mediada por $RG\alpha$, que regula positivamente la expresión de $RG\beta$, controlando así la sensibilidad de las células a los glucocorticoides [160].

El aumento de $RG\beta$, producido por dexametasona y también por mifepristona, implica aumento de la resistencia a los glucocorticoides, ya que $RG\beta$ inhibe la actividad transcripcional de $RG\alpha$ dependiente de glucocorticoides [177, 179]. Más aun, en presencia de mifepristona, $RG\beta$ se encuentra en una conformación que favorece la unión a correpresores, potenciando la inhibición de $RG\alpha$ a nivel transcripcional [179]. Vale decir que la muerte celular podría estar asociada al bloqueo de $RG\alpha$, y también a modificaciones transcripcionales inducidas por $RG\beta$ unido a mifepristona. Además, tampoco podemos descartar posibles efectos de la unión de mifepristona a los receptores de progesterona. El gran aumento de $RG\beta$ en la retina del ratón estimulada por progesterona (ver Capítulo 4) sugiere que aun desconocemos muchas interacciones entre los ligandos esteroideos y $RG\beta$.

Cambios en el citoesqueleto

Mifepristona produjo, en ausencia de dexametasona, importantes modificaciones citoesqueléticas que sugieren cambios en la adhesividad y migración de las células ARPE-19. Estos cambios concuerdan con el reordenamiento de las proteínas citoesqueléticas inducido por mifepristona en diversos fenotipos de células tumorales [145, 279]. Estos efectos podrían influir marcadamente sobre la funcionalidad del EPR, ya que el citoesqueleto es crucial para el mantenimiento de la polaridad celular, el transporte de los componentes del ciclo visual, las vacuolas autofágicas y los gránulos de lipofuscina, así como para el reacomodamiento de las células vecinas cuando una de ellas es dañada [280].

En las células ARPE-19, la inmunofluorescencia de $RG\beta$ tenía la misma localización que los microtúbulos, especialmente en la región perinuclear. Esta distribución sugiere que los cambios en la organización microtubular inducidos por mifepristona podrían determinar un mayor transporte de $RG\beta$ hacia el núcleo [281]. Los microtúbulos también intervienen en el transporte de $RG\alpha$ [282], pero la inmunofluorescencia indicó que la concentración citoplasmática de este receptor, en las células ARPE-19 y en el EPR de ratón, es relativamente baja.

Conclusión

Los glucocorticoides se han identificado como potentes reguladores que controlan una sorprendente cantidad de vías de señalización, y sus efectos sobre la apoptosis y la supervivencia celular tienen una importancia clínica sustancial [283]. Los glucocorticoides y la progesterona son esenciales para la supervivencia de los fotorreceptores [125, 204], pero en este Capítulo demostramos que los mismos esteroides pueden ser tóxicos para el EPR *in vitro*. En células ARPE-19 tratadas con dexametasona, mifepristona y levonorgestrel, se encontró que la dexametasona y el levonorgestrel, pero no la mifepristona, fueron citotóxicos en forma dosis dependiente. Mifepristona alteró la morfología celular como consecuencia de cambios citoesqueléticos pero su principal efecto fue potenciar la citotoxicidad de dosis bajas de dexametasona.

Los efectos de la combinación mifepristona y dexametasona sugirieron la presencia de mecanismos no dependientes de $RG\alpha$. Estos podrían estar relacionados con la actividad transcripcional de $RG\beta$, tanto propia o como represor de la actividad de $RG\alpha$. Cabe destacar que no observamos signos de daño del EPR *in vivo* [14]. Estas diferencias podrían reflejar una menor disponibilidad de dexametasona *in vivo* o, lo que parece más probable, el

antagonismo fisiológico de la alta concentración citoplasmática de $RG\beta$, que bloquearía los efectos citotóxicos de los corticoides necesarios para la supervivencia de los fotorreceptores.

Capítulo 6

Expresión de genes asociados a neurodegeneración en el EPR

Previamente demostramos que tanto la dexametasona como la dexametasona + mifepristona son citotóxicos para las células ARPE-19, mientras que la mifepristona *per se* no modificó la supervivencia de estas células. Con el propósito de identificar los mecanismos involucrados en estas respuestas, estudiamos los cambios inducidos por dexametasona y mifepristona en la expresión de un panel de genes asociados a neurodegeneración.

Los tiempos de exposición y las concentraciones de dexametasona y mifepristona fueron elegidos con los siguientes objetivos: (a) encontrar indicios sobre la forma de muerte inducida por las altas concentraciones de dexametasona; y (b) explicar por qué la mifepristona, un inhibidor de $RG\alpha$, no bloqueó la muerte inducida por dexametasona (ver Capítulo 5).

Uso de la plataforma NanoString

Para comprender los mecanismos de muerte celular producidos por dexametasona o dexametasona + mifepristona (D+M1, y dexametasona 0,08 mM + mifepristona 10 μ M, D+M10) se evaluó la expresión de 760 genes asociados a neurodegeneración mediante un panel selectivo (Human Neuropathology Panel, nCounter[®],HNP, NanoString, www.nanostring.com), utilizándose 50 ng de cada muestra de ARN total según las instrucciones del fabricante. Los ARNs fueron cuantificados con el nCounter[®] Digital Analyzer[™] y

los resultados fueron analizados con el software nSolver (v4.0)TM. Los datos se ajustaron con las sondas de control experimental positivas y negativas del fabricante y con 10 genes domésticos. Estos últimos mostraron una variabilidad mínima en todas las muestras y abarcaron el rango de recuento del conjunto de datos. Todas las muestras pasaron las pruebas de control y aseguramiento de la calidad (QA/QC) del nSolver y las réplicas correlacionaron correctamente ($R^2 \geq 0,97$). Los datos se ajustaron mediante el Partek_v7.0, eliminándose 292 sondas cuya señal máxima estaba por debajo del límite de detectabilidad. Los datos fueron transformados logarítmicamente (\log_2) y normalizados por cuantiles para una nueva evaluación QA/QC. Para la estadística se usó ANOVA de una vía seguido por la prueba *post hoc* de Benjamini-Hochberg. Para detectar diferencias significativas ($p < 0.05$) en la expresión génica se utilizaron valores p corregidos por la tasa de descubrimientos falsos (FDR).

Resultados y discusión

Cambios generales en la expresión génica

El total de ARN modificados significativamente fue de 468, algunos de los cuales se comparten entre los diferentes tratamientos (Tabla 6.1 y Figura 6.1). Las comparaciones estadísticas se realizaron contra el control o D8, siendo D8 una condición que no produjo cambios significativos en la muerte celular (ver Capítulo 5). Las modificaciones inducidas por mifepristona, 1 o 10 μM , no fueron estadísticamente significativas, por lo tanto, no serán comentadas aquí.

Tabla 6.1. Número de ARNm modificados significativamente para cada tratamiento

Condición	Total	Aumentaron	Disminuyeron
D8 vs C	136	71	65
D32 vs C	221	104	117
D64 vs C	212	90	122
D+M1 vs C	198	83	115
D+M10 vs C	220	95	125
D32 vs D8	59	28	31
D64 vs D8	101	49	52
D+M1 vs D8	97	40	58
D+M10 vs D8	96	39	57

Cabe destacar que el aumento o disminución de los ARNm puede ser un efecto directo de la dexametasona sobre los genes que los codifican o bien efectos indirectos determinados por la mayor o menor expresión de genes sensibles a los glucocorticoides. Según sus funciones conocidas, mifepristona debería bloquear los efectos dependientes de los receptores nucleares $RG\alpha$ y de los receptores de progesterona, RP-A y RP-B [284]. Por lo tanto, la ausencia de cambios significativos en los cultivos que solo recibieron mifepristona sugiere que los niveles de estos esteroides en el medio de cultivo utilizado serían relativamente bajos, o bien que la mifepristona *per se* no modificaría la expresión de genes asociados a muerte celular. Esta última posibilidad podría ser explicada si el efecto inhibitor de $RG\beta$ presente en D8 fuese muy superior al producido por la mifepristona.

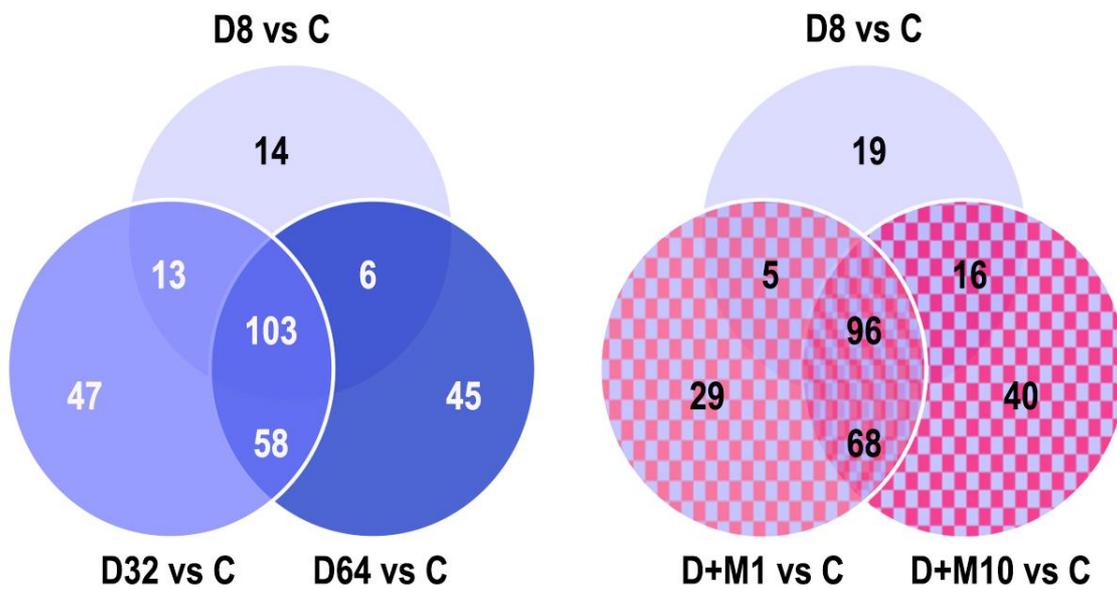
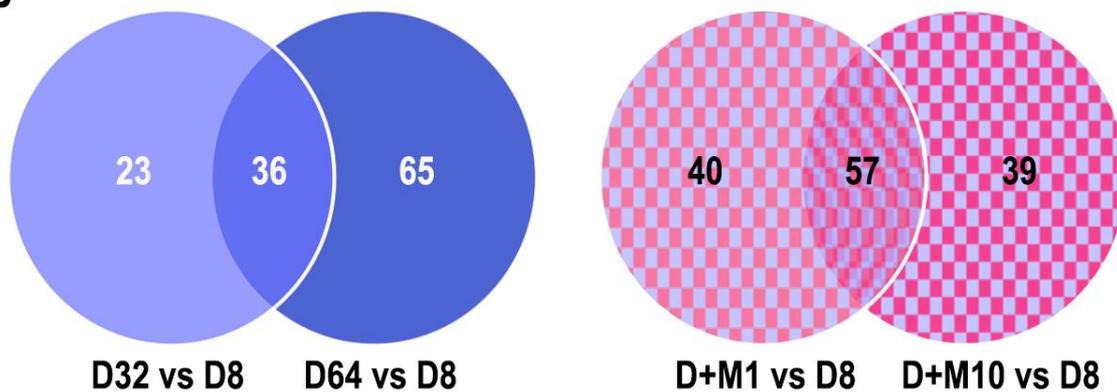
A**B**

Figura 6.1. Diagramas de Venn. **(A)** Genes modificados significativamente respecto al control. **(B)** Genes modificados significativamente respecto a D8. Aquellos que fueron compartidos por dos o más tratamientos se encuentran en las intersecciones de los círculos.

Análisis por anotación genómica

Para comprender los mecanismos de muerte celular producidos por dexametasona o dexametasona + mifepristona, analizamos los genes involucrados en distintas vías de señalización (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>), los temas fundamentales del panel de

neuropatología (NanoString) y la KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) PATHWAY Database (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>). Los genes fueron identificados según el HUGO (Human Genome Organization) Gene Nomenclature Committee (HGNC, www.genenames.org/), y en algunos casos se aclaró la nomenclatura KEGG entre paréntesis (Tablas 6.2. y 6.3.).

Tabla 6.2. Nomenclatura de los genes analizados en este Capítulo

Símbolo del Gen	Nombre del Gen	GeneID (<i>Homo sapiens</i>)
ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase	18
ADRB2	Adrenoceptor beta 2	154
APAF1	Apoptotic peptidase activating factor 1	317
ATF4	Activating transcription factor 4	468
ATF6	Activating transcription factor 6	22926
ATP13A2	Atpase cation transporting 13A2	23400
ATP6V1D	ATPase H ⁺ transporting V1 subunit D	51382
ATXN3	Ataxin 3	4287
Bax	BCL2 associated X, apoptosis regulator	581
BCL2	BCL2 apoptosis regulator	596
BCL2L1	BCL2 like 1	598
C3	Complement C3	718
CASP3	Caspase 3	836
CASP7	Caspase 7	840
CASP8	Caspase 8	841
CCS	Copper chaperone for superoxide dismutase	9973
CFH	Complement factor H	3075
CHMP2B	Charged multivesicular body protein 2B	25978
CLU	Clusterin	1191
CSF1	Colony stimulating factor 1	1435
CTNS	Cystinosis, lysosomal cystine transporter	1497
DDIT3	DNA damage inducible transcript 3	1649
EIF2S1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit alpha	1965

Símbolo del Gen	Nombre del Gen	GeneID (<i>Homo sapiens</i>)
GSN	Gelsolin	2943
HMOX1	Heme oxygenase 1	3162
IDH1	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1	3417
IGF1R	Insulin like growth factor 1 receptor	3480
IKBKB	Inhibitor of nuclear factor kappa B kinase subunit beta	3551
IL10	Interleukin 10	3586
IL10RA	Interleukin 10 receptor subunit alpha	3587
IL13RA	Interleukin 13 receptor subunit alpha 1	3597
IL15	Interleukin 15	3600
IL15RA	Interleukin 15 receptor subunit alpha	3601
IL1B	Interleukin 1 beta	3553
IL1R1	Interleukin 1 receptor type 1	3554
IL4R	Interleukin 4 receptor	3566
IL6	Interleukin 6	3569
IL6R	Interleukin 6 receptor	3570
ITPR1	Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 1	3708
Jak	Janus kinase 2	3717
MAPK3	Mitogen-activated protein kinase 3	5595
MAPK8	Mitogen-activated protein kinase 8	5599
mTOR	Mechanistic target of rapamycin kinase	2475
NF-κB	Nuclear factor kappa B subunit 1	4790
NFE2L2	Nuclear factor, erythroid 2 like 2	4780
NGF	Nerve growth factor	4803
NGFR	Nerve growth factor receptor	4804
NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1	1728
p38MAPK	Mitogen-activated protein kinase 1	5594
p62/SQSTM1	Sequestosome 1	8878
PARK7	Parkinsonism associated deglycase	11315
PARP1	Poly(ADP-ribose) polymerase 1	142
PHF19	PHD finger protein 19	26147
PIK3R1	Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 1	5295
PLCB4	Phospholipase C beta 4	5332
PLXNB3	Plexin B3	5365

Símbolo del Gen	Nombre del Gen	GeneID (<i>Homo sapiens</i>)
POLR2K	RNA polymerase II, I and III subunit K	5440
PPP2CA	Protein phosphatase 2 catalytic subunit alpha	5515
PRKAA2	Protein kinase AMP-activated catalytic subunit alpha 2	5563
PSMB8	Proteasome 20S subunit beta 8	5696
PSMB9	Proteasome 20S subunit beta 9	5698
RAC1	Rac family small GTPase 1	5879
RAF1	Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase	5894
RAN	RAN, member RAS oncogene family	5901
SEC23A	Sec23 homolog A, COPII coat complex component	10484
SOD1	Superoxide dismutase 1	6647
SOD2	Superoxide dismutase 2	6648
SYT1	Synaptotagmin 1	6857
SYT13	Synaptotagmin 13	57586
SYT4	Synaptotagmin 4	6860
SYT7	Synaptotagmin 7	9066
TGFB1	Transforming growth factor beta 1	7040
TNF	Tumor necrosis factor	7124
TNFRSF10B	TNF receptor superfamily member 10b	8795
TNFRSF1A	TNF receptor superfamily member 1A	7132
TRPV1	Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1	7442
USP21	Ubiquitin specific peptidase 21	27005
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	7422

Tabla 6.3. Enlaces a las vías de KEGG analizadas

Vía	Enlace
Apoptosis (hsa04210)	https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map04210
Autofagia (hsa04140)	https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map04140
Necroptosis (hsa04217)	https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map04217
NF-κB (hsa04064)	https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map04064
Procesamiento de proteínas en el retículo endoplásmico (hsa04141)	https://www.kegg.jp/kegg-bin/show_pathway?map04141

Genes modificados por las concentraciones altas de dexametasona

Asumimos que los genes responsables de la muerte celular podrían encontrarse entre aquellos modificados significativamente por D32 y D64 con respecto a D8, donde la proporción de células muertas fue muy baja. Se utilizó el agrupamiento jerárquico no supervisado (Figura 6.2) para comparar los genes expresados por D8 vs los expresados por D32 y D64.



Figura 6.2. Clave de colores para interpretar el agrupamiento jerárquico. Los tonos rojizos representan el aumento en la expresión relativa, mientras que los verdes la disminución en la expresión relativa.

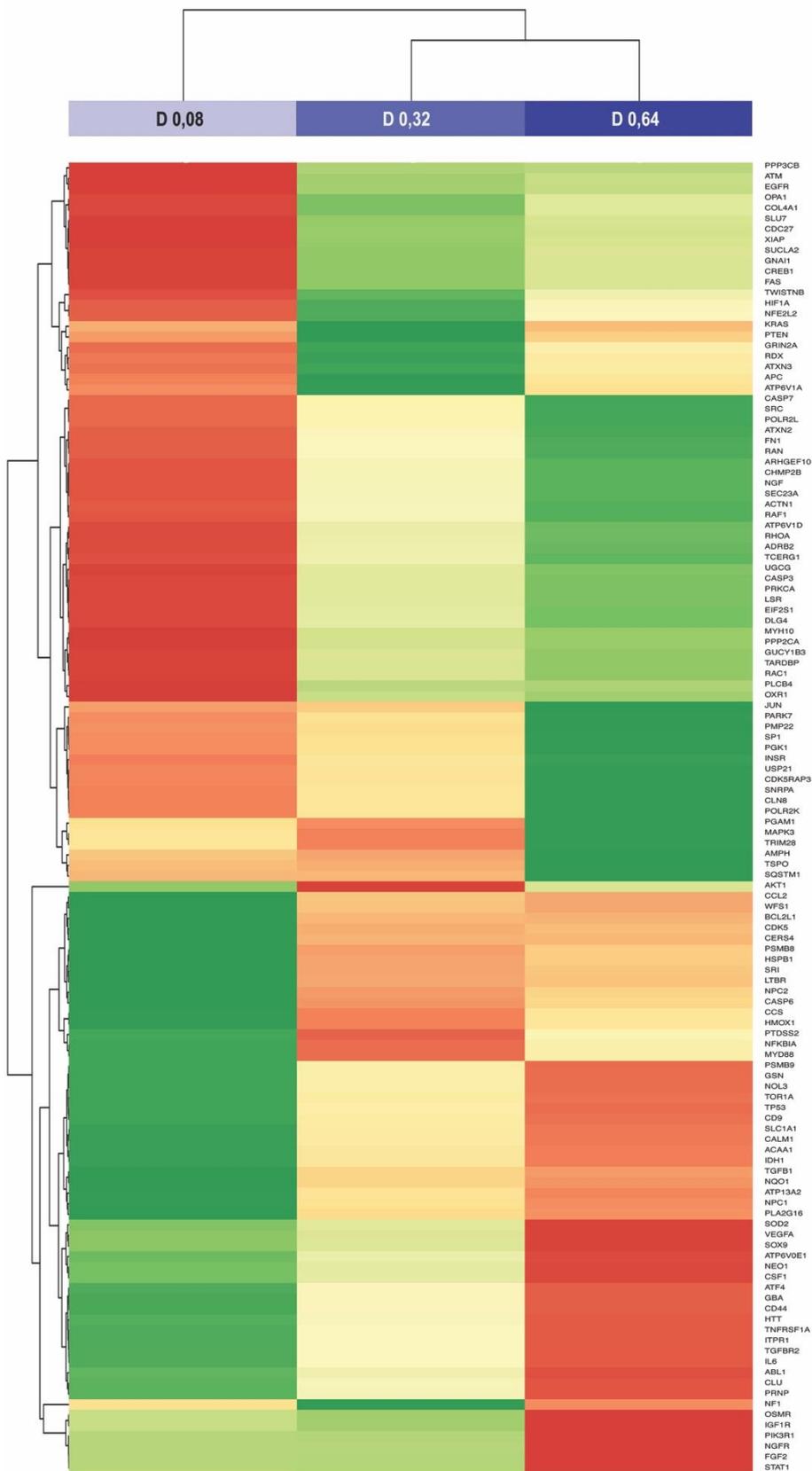


Figura 6.3.
 Agrupamiento jerárquico no supervisado de los ARNm del HNP, modificados significativamente por D32 y/o D64 con respecto a D8.

La Figura 6.3 muestra que la mitad de los genes tuvo su menor expresión con D8 y su mayor expresión con D32 y/o D64. La otra mitad mostró un comportamiento inverso, con mayor actividad en D8, que se redujo con las otras dos concentraciones de esteroide. No detectamos asociaciones entre los subgrupos definidos por el agrupamiento jerárquico no supervisado, y los fenómenos de muerte celular inducidos por D32 y D64 (ver Capítulo 5). Por lo tanto, analizamos los genes que habían sufrido mayores modificaciones con las dosis altas de este esteroide.

Genes aumentados o disminuidos 2 veces en D64 vs D8 (Tabla 6.4)

El gen más aumentado fue NGFR y, como contrapartida, el gen más reducido fue su ligando NGF. NGFR es un receptor de muerte, cuya sobreexpresión en células ARPE-19 promueve la muerte celular inducida por el exceso de glucosa [285]. Por el contrario, su delección reduce la secreción de factores proangiogénicos e inflamatorios [286].

Tabla 6.4. Genes modificados dos veces en D64 vs D8

Gen	Fold-Change >	Gen	Fold-Change <
NGFR	17,893	USP21	-2,106
IDH1	3,415	PLCB4	-2,165
CSF1	2,848	ADRB2	-2,473
PSMB9	2,544	NGF	-3,069
IL6	2,466		
ATP13A2	2,253		
NQO1	2,034		
ITPR1	1,959		
CLU	1,900		

En segundo lugar, aumentó IDH1, que codifica isocitrato dehidrogenasa. Las mitocondrias producen citrato a partir de acetil-CoA y oxaloacetato como parte del ciclo TCA, pero en condiciones de hipoxia lo producen por carboxilación reductiva utilizando las IDHs. Esta vía, de gran importancia para la protección contra el estrés oxidativo, se encuentra muy bien desarrollada en las células del EPR. La carboxilación reductiva y su efecto protector son mantenidos por el suministro de precursores de NAD⁺ o inhibidores de la PARP1 [287].

CSF codifica una citoquina que controla la producción de macrófagos. No encontramos referencias sobre su posible función en el EPR, pero su hiperexpresión posiblemente se relacione con la de otras moléculas asociadas a la inflamación que aumentan en las células sometidas a D64.

PSMB9 (LMP2/β1i) corresponde a una subunidad de los inmunoproteasomas, muy numerosos en el EPR [288]. Al igual que otros proteasomas, éstos clivan péptidos por procesos dependientes de ATP y ubiquitina, pero tienen como función principal el procesamiento de los péptidos del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase 1. También están involucrados en la respuesta al envejecimiento y al estrés oxidativo. Cabe destacar que en el EPR, los inmunoproteasomas también están involucrados en la autofagia [289]. Aunque en menor grado que PSMB9, la subunidad PSMB8 (LMP7/β5i) del inmunoproteasoma, también aumentó en los cultivos sometidos a D64. El aumento de estas dos subunidades del inmunoproteasoma probablemente sea consecuencia del aumento de citoquinas inflamatorias [290, 291].

La interleuquina 6 (IL6) es una citoquina pleiotrópica sintetizada por las células de Müller y el EPR. Bloquea la apoptosis de los fotorreceptores después de los desprendimientos de retina [292]. La muerte celular necrótica inducida por

diversos estímulos coincide con la mayor expresión y secreción de esta citoquina pro-inflamatoria, mediada por NF- κ B y p38MAPK [293]. La misma citoquina podría contribuir a la activación de la necroptosis [294] y otras formas de necrosis regulada [295].

La ATP13A2 (PARK9) es una ATPasa de la membrana lisosomal necesaria para mantener la autofagia y la función lisosomal [296]. Su función es crítica para el transporte y almacenamiento de calcio, selenio, manganeso, níquel y hierro. También es un exportador lisosomal de poliaminas, como la espermina y la espermidina. En ausencia de ATP13A2 se reduce el contenido celular de poliaminas, que a su vez contribuye a la acumulación de metales pesados y EROS. Los niveles de poliaminas declinan con la edad, mientras que sus suplementos aumentan la expectativa de vida en diversos modelos animales [297].

La quinona oxidoreductasa codificada por NQO1 forma parte del espectro de respuesta antioxidante dependiente de la activación de NFE2L2 (NRF2). Aumenta en células ARPE-19 y en EPR murino, como consecuencia del estrés oxidativo por paraquat [298].

CLU es una glucoproteína secretada que funciona como chaperona extracelular estabilizando proteínas para facilitar su plegamiento. Es inducida por estrés oxidativo, contribuyendo a mantener la viabilidad celular mediante la reducción de moléculas anormales capaces de estimular los receptores de muerte. También se localiza en las mitocondrias donde interactúa con Bax inhibiendo la apoptosis. Su expresión aumenta en la senescencia celular y forma parte de los depósitos característicos (drusen y depósitos laminares basales) de las primeras etapas de la DMAE [299].

NGF es un importante factor de supervivencia del EPR [300], y su casi total desaparición posiblemente está involucrada en la muerte celular asociada a D64. La reducción de ADRB2 también se asociaría con una disminución de las defensas antioxidantes, ya que los agonistas de este receptor beta-adrenérgico pueden proteger a las células EPR del estrés del retículo endoplásmico (RE) provocado por hidroxiclороquina [301].

USP21, que es uno de los ARNms con mayor descenso en D64, remueve ubiquitinas de proteínas y ribosomas, sugiriendo un posible retardo o atascamiento en el reciclaje de proteínas y polirribosomas [302]. También se encontró disminuida PLCB4, una fosfolipasa C que hidroliza fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP2), con la ulterior producción de inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), y liberación de calcio [303]. En el EPR, la PLC β está involucrada en las vías subsiguientes a la activación de la proteína Gq, que incluyen procesos asociados a mTOR y autofagia [304].

En resumen, el conjunto de genes con máxima y mínima expresión en los cultivos tratados con D64 es consistente con hiperactivación de los receptores de muerte. Los niveles de muerte celular observados sugieren que las defensas celulares (aumento de la expresión de IDH, ATP13A2 y NQ01) fueron superadas por la activación de dichos receptores y el subsiguiente estrés del RE. El aumento de posibles marcadores de senescencia (PSMB9, CLU) también reflejaría el fracaso de estas defensas. Cabe destacar que los cultivos tratados con D32 mostraron cambios semejantes a los descritos más arriba, aunque de menor magnitud.

Modificaciones en las vías de muerte celular, estrés del retículo endoplásmico y autofagia

La vía ubiquitina-proteasoma y la vía lisosomal/autofagica son los dos principales sistemas proteolíticos para eliminar proteínas y orgánulos dañados en las células eucariotas [305]. En nuestro modelo detectamos alteraciones en algunos componentes de la maquinaria que interviene en el plegamiento de proteínas, con la consiguiente activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), un importante promotor de los programas de muerte celular [306]. Cuando se excede la capacidad de depuración del UPR, la célula utiliza la autofagia como mecanismo pro-supervivencia para degradar las proteínas mal o no-plegadas acumuladas. Este mecanismo citoprotector también puede ser desencadenado por estrés oxidativo, hipoxia y agregados de moléculas tóxicas [307].

D64 no solo aumentó la expresión de NGFR, sino también la de TNFRSF1A (TNFR1), otro receptor de muerte. Tanto NGFR como TNFRSF1A pueden contribuir a la muerte celular por la vía apoptótica, o promover la inflamación y la supervivencia mediante la activación de MAPK8 (JNK), o la vía del NF- κ B [308]. El descenso de CASP3 y CASP7 no parece apoyar la muerte de tipo apoptótico, aunque los datos de AO/EB sugieren que algunas células morirían por este mecanismo. Además, encontramos una reducción en CHMP2B, un componente del complejo heteromérico ESCRT-III. Dado que este complejo permite reparar lesiones del sistema de endomembranas, endosomas y autofagosomas [309], podemos suponer que su descenso facilitarían la muerte celular.

El incremento de ITPR1 (IP3R), signo de alteraciones en la homeostasis del calcio, avala el estrés del RE [310] y la muerte autofágica [311]. El aumento de este receptor marcaría la diferencia entre el estado adaptativo y el estado

citotóxico del estrés del RE [312]. El descenso de SEC23A, una proteína necesaria para el transporte de vesículas desde el RE al Golgi, junto con el descenso del factor de iniciación EIF2S1 (eIF2 α), y el aumento de ATF4 y TGF β 1, también estaría relacionado con estrés del RE [306, 313, 314]. Los mayores niveles de moléculas antioxidantes como SOD2, NQO1 y HMOX1 [315], aunque estadísticamente significativos, no habrían sido suficientes para contrarrestar el proceso de estrés del RE.

El incremento en la expresión de PIK3R1 (PI3K), IGF1R (IGFR), ITPR1, y la disminución de p62/SQSTM1, RAF1 y MAPK3 (ERK), nos permiten suponer que la autofagia se encontraría inhibida [316-318]. D64 también aumentó la expresión de BCL2L1 (BCL-X_L) que inhibe la actividad de Beclin-1, otro mediador esencial de la autofagia [319].

El aumento de IL6, descrito más arriba, podría estar asociado a la disminución de USP21 [320] y p62/SQSTM1 [321]. Estas modificaciones, junto con la activación de la vía NF- κ B, y el aumento de los inmuno proteasomas, sugieren la presencia de un escenario inflamatorio [322], que a su vez podría regular la expresión de los RG. Se ha demostrado que las citoquinas pro-inflamatorias, como TNF α e IL1B, influyen en la función del RG en varios niveles: disminuyen la expresión del RG, bloquean la translocación de este receptor desde el citoplasma al núcleo y las interacciones proteína-proteína del RG, y alteran su unión con los sitios GRE del ADN. Estas citoquinas, entre otros factores, aumentan la expresión de la isoforma β [323], que predomina durante la inflamación *in vitro* [176]. Por lo tanto, el aumento de RG β observado con dexametasona podría deberse a la elevada expresión de citoquinas pro-inflamatorias. Por otro lado, la mayor expresión de RG β bloquea la actividad

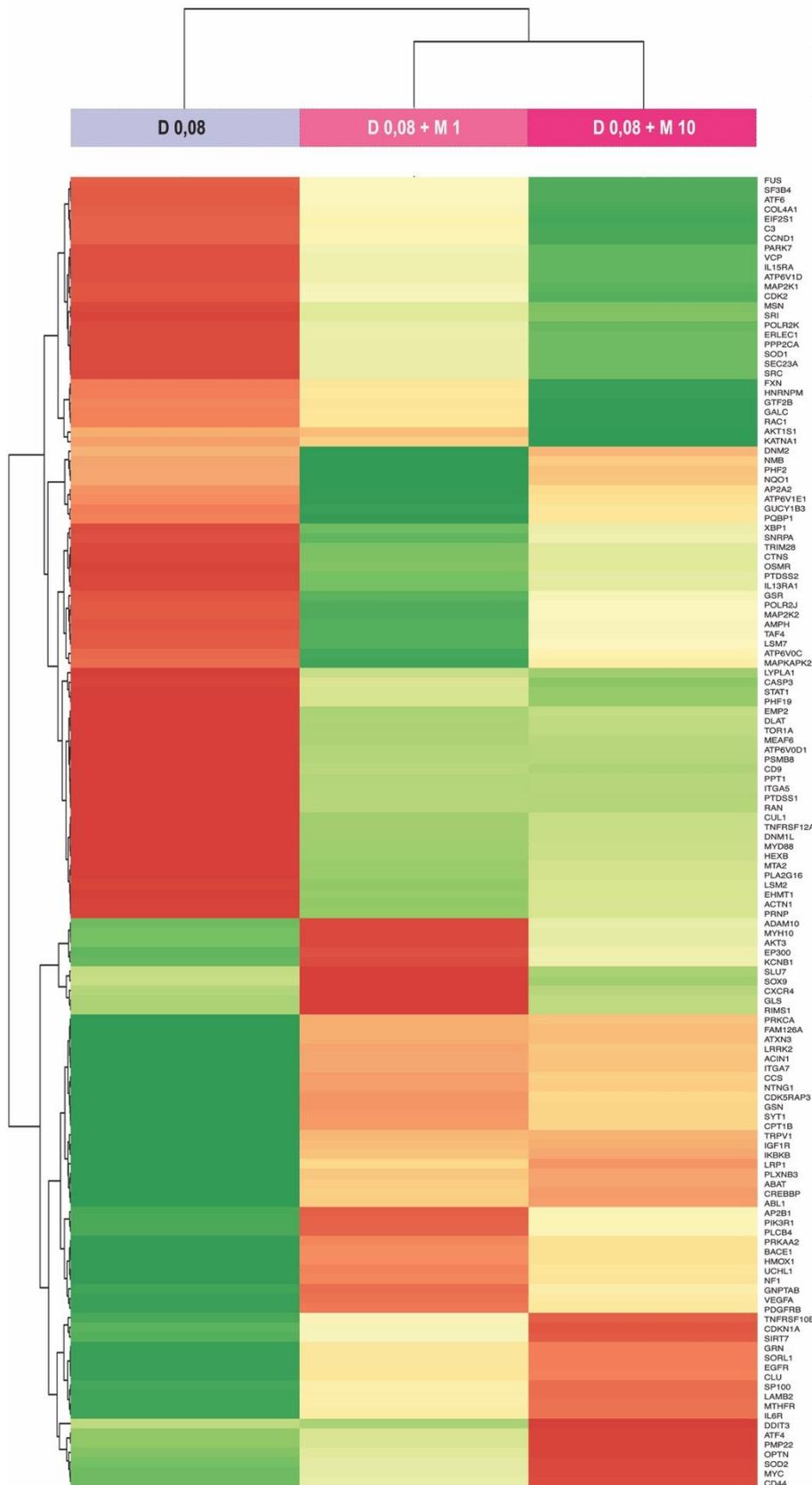


Figura 6.4.
 Agrupamiento jerárquico no supervisado de los ARNm del HNP modificados significativamente por D+M1 y/o D+M10 con respecto a D8.

transactivante de $RG\alpha$, así como la capacidad de este último para reprimir a los promotores dependientes de AP-1 y NF- κ B [183].

Genes modificados por las combinaciones D+M

El agrupamiento jerárquico no supervisado mostró que aproximadamente la mitad de los genes presentó su máxima expresión con D8 y la mínima con D+M1 y D+M10. La otra mitad sufrió un comportamiento inverso (Figura 6.4). Ambas combinaciones presentaron un mismo patrón de respuesta, pero como D+M10 ocasionó mayor muerte celular (ver Capítulo 5), elegimos analizar los resultados de esta combinación.

Genes aumentados o disminuidos 2 veces en D+M10 vs D8 (Tabla 6.5)

Entre los genes elevados >2 veces encontramos a ABAT, que codifica la transaminasa del ácido gamma-aminobutírico (GABAT) [324]. La consecuencia de este aumento sería una degradación acelerada de GABA [325]. GABA es un conocido antioxidante [326] y podemos suponer que su actividad sería reducida por el aumento de GABAT, contribuyendo al estrés oxidativo.

En segundo lugar aumentó TRPV1, un canal de calcio sensible a una amplia gama de estímulos que incluyen calor, pH bajo e hipoxia [327], y agentes irritantes como la capsaicina [328]. Ha sido descrito en el EPR [329], pero su función en estas células no ha sido identificada. Estudios recientes demostraron que, al igual que otros receptores de la misma familia, puede ser activado por factores estresores como la homocisteína, aumentando los niveles intracelulares de calcio y la producción de EROS [330].

Tabla 6.5. Genes modificados dos veces en D+M10 vs D8

Gen	Fold-Change >	Gen	Fold-Change <
ABAT	5,695	C3	-1,799
TRPV1	3,320	PHF19	-1,920
IL6R	3,276	CTNS	-3,157
PLXNB3	2,846	IL15RA	-3,574
SYT1	2,112		
HMOX1	2,102		

El aumento del receptor de IL6 (IL6R) parece ser selectivo, ya que no se detectaron aumentos de otras interleuquinas o sus receptores (IL10, IL10RA, IL13RA, IL15RA, IL1B, IL1R1, IL4R, IL6). IL6R ha sido detectado en células del EPR [331], y su bloqueo por el anticuerpo tocilizumab parece ser eficiente en el edema macular [332].

PLXNB3, que codifica a un receptor de semaforinas, no ha sido previamente reportada en el EPR. No se han descrito asociaciones de PLXNB3 con mecanismos de muerte celular, pero su aumento en las células tratadas con D+M10 podría ser una consecuencia de reordenamientos citoesqueléticos [333].

SYT1, cuya expresión se duplicó, es una proteína integral de la membrana que interviene como sensor de Ca^{2+} en el proceso de tráfico vesicular y exocitosis.

No se modificaron otras sinaptotagminas como SYT13, SYT4, SYT7. La primera, SYT1, se encuentra en la membrana de las células EPR [334], aunque su función en estas células no ha sido estudiada. En células nerviosas regula la fusión de las vesículas sinápticas con la membrana plasmática, y también interviene en la fusión de vesículas y gotitas lipídicas en hepatocitos [335].

Además, encontramos un aumento en HMOX1 (HO-1), la forma inducible de la hem-oxigenasa. Esta enzima, cuya expresión es activada por NRF2, protege a las células ARPE-19 del estrés oxidativo [336] e inflamatorio [337].

En el grupo de genes hiporegulados apareció C3, un miembro del sistema del complemento que juega un papel central en la modulación de las respuestas inflamatorias y es uno de los factores asociados a la degeneración del EPR en la DMAE [338]. Por lo tanto, ésta podría ser considerada una respuesta protectora. CFH, cuyo aumento es una respuesta de protección mejor conocida, no estaba incluido en el panel.

En estos cultivos se observó una marcada reducción de PHF19 (PCL3), un componente esencial del complejo represor polycomb [339], que sugiere cambios epigenéticos importantes.

Encontramos disminuido a CTNS, un transportador lisosomal de cistina, cuya ausencia determina la cistinosis [340]. Su silenciamiento aumenta la producción de especies reactivas de oxígeno intracelular y disminuye la capacidad antioxidante [341]. Estudios con ratones CTNS^{-/-} han demostrado que la pérdida de CTNS está asociada con aberraciones del compartimento endolisosómico, proliferación anormal, acumulación de mitocondrias y autofagia deficiente [342]. El ARNm que más disminuyó su expresión fue IL15RA, componente importante de la señalización pro-inflamatoria de IL15 [343]. El par IL15-IL15RA regula la inhibición de la apoptosis en múltiples sistemas [344]. *En las células del EPR la IL15 desempeña un papel importante en las respuestas inmunes e inflamatorias [345].*

En resumen, el conjunto de genes que sufrió mayores modificaciones en los cultivos tratados con D+M10 es consistente con una desregulación de la respuesta antioxidante y antiinflamatoria. El estrés oxidativo, junto con la merma de factores protectores como CTNS e IL15RA, reduciría la eficacia de las defensas celulares representadas por el aumento de ABAT y HMOX1.

Modificaciones en las vías de muerte celular, estrés del retículo endoplásmico y autofagia

La combinación de D+M10 también incrementó la expresión de los receptores de muerte, aunque en proporción menor a 2x, especialmente TNFRSF10B (TRAIL-R). También subieron los niveles de ATF4, como en los cultivos expuestos a D64. Además, aumentó la expresión de DDIT3 (CHOP), que podría desencadenar la detención del ciclo celular, promover la producción de EROS y la muerte celular [346]. La disminución del factor eIF2 α también estaría asociada con estrés del RE [313]. Al igual que con D64, a pesar del aumento significativo de moléculas antioxidantes como SOD2 y HMOX1 [315], la proporción de células muertas sugiere que prevaleció el proceso de estrés del RE.

Por otra parte, aumentó IKBKB (IKK) que fosforila a I κ B [347] determinando la degradación I κ B por el proteasoma y la posterior activación de NF- κ B [348]. El factor de transcripción NF- κ B juega un papel importante en procesos inflamatorios, respuesta inmune, supervivencia y apoptosis [349].

Además, aumentó ATXN3 (DUB), que promueve la degradación proteasómica de proteínas mal plegadas o disfuncionales [350]. Se encontró aumentada PRKAA2 (AMPK), que inhibe a mTOR e induce autofagia [351]. En conjunto con la disminución de ATF6 y los aumentos de ATF4 y DDIT3, estos cambios sugieren trastornos del procesamiento de proteínas y mayor estrés del RE [352].

Diferencias y semejanzas entre los genes modificados por D64 y D+M10

En los cultivos expuestos a D64 se modificaron significativamente 101 genes con respecto a D8, mientras que en los expuestos a D+M10 se modificaron 96. 31 de estos genes fueron compartidos por ambos grupos experimentales (Figura 6.5).

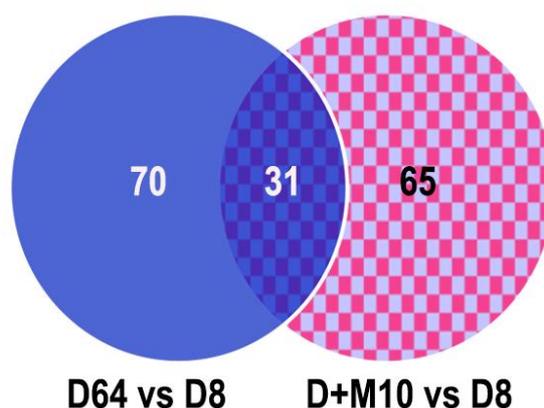


Figura 6.5. Diagrama de Venn de genes modificados significativamente respecto a D8. Aquellos que fueron compartidos por ambos tratamientos se encuentran en la intersección de los círculos.

Teniendo en cuenta que $RG\beta$ ganaría la capacidad de regular muchos genes cuando falla $RG\alpha$ [178], y dado que mifepristona bloquea a $RG\alpha$, esperaríamos que D+M10 produjera efectos inversos a los inducidos por D64. Sin embargo, solo el 32% mostró este tipo de modificaciones, siendo sus variaciones relativamente bajas (rango -1,4 a +1,5) (Figura 6.6). Estos genes no parecen estar directamente involucrados en los procesos de muerte celular ya que sus variaciones, aunque estadísticamente significativas, fueron de escasa magnitud. Por otra parte, la muerte celular no se encuentra dentro de las funciones atribuidas a estos genes. Una explicación alternativa puede ser que diferentes vías de señalización inducidas por glucocorticoides pueden usarse en células que expresan altos niveles de $RG\beta$.

El 68% de los genes que se modificó en el mismo sentido tanto en los cultivos expuestos a D64 como en los expuestos a D+M10 podrían estar involucrados en los mecanismos de daño o defensa celular (Figura 6.6). Este conjunto incluye descensos (rango -1,5 a - 1.1) de CASP3, SEC23A, EIF2S1, RAC1, POLR2K, ATP6V1D, PARK7, PPP2CA, RAN. Entre los genes cuya expresión aumenta

tanto en D64 como en D+M10 (rango 1,2-1,9) se encuentran: IGF1R (receptor de IGF que puede actuar como antiapoptótico), CCS (una chaperona que proporciona cobre a SOD1), GSN (proteína necesaria para la formación de filamentos de actina), SOD2, HMOX1 (uno de los blancos de NRF2), ATF4 (CREB2), VEGFA y CLU. La mayor expresión de estos genes, que no dependería de $RG\alpha$, puede ser explicada como una respuesta celular de defensa, independiente de la causa del daño.

Genes y mecanismos de muerte en las células expuestas a D64 o D+M10

Como se describió en el Capítulo 5, el procedimiento AO/EB mostró la presencia de células muertas con condensación heterocromática nuclear y células con permeabilidad de la membrana al EB pero sin condensación nuclear. Concluimos que una proporción importante de las células habría sufrido una muerte de tipo necrótico, que conduciría a la lisis celular y a la liberación de una amplia gama de componentes intracelulares y citoquinas inflamatorias. Es decir, una forma de necrosis no regulada, o regulada como la piroptosis y la necroptosis [353].

Aunque una proporción significativa de células mostró cambios estructurales típicos de la apoptosis, los cambios génicos detectados no apoyaron la presencia de este proceso. Por el contrario, observamos una reducción de CASP3, tanto en D64 como en D+M10, y CASP7 en D64. En ningún caso se modificó la expresión de APAF1, necesaria para el comienzo de la apoptosis intrínseca [114]. En las ARPE-19, BCL2 nunca varió significativamente, mientras que BCL2L1 aumentó en forma proporcional a la concentración de dexametasona. Como se demostró en el Capítulo 3, si bien los niveles de estas proteínas dependen de la disponibilidad de dexametasona (o progesterona), no implican necesariamente la presencia o ausencia de muerte celular.

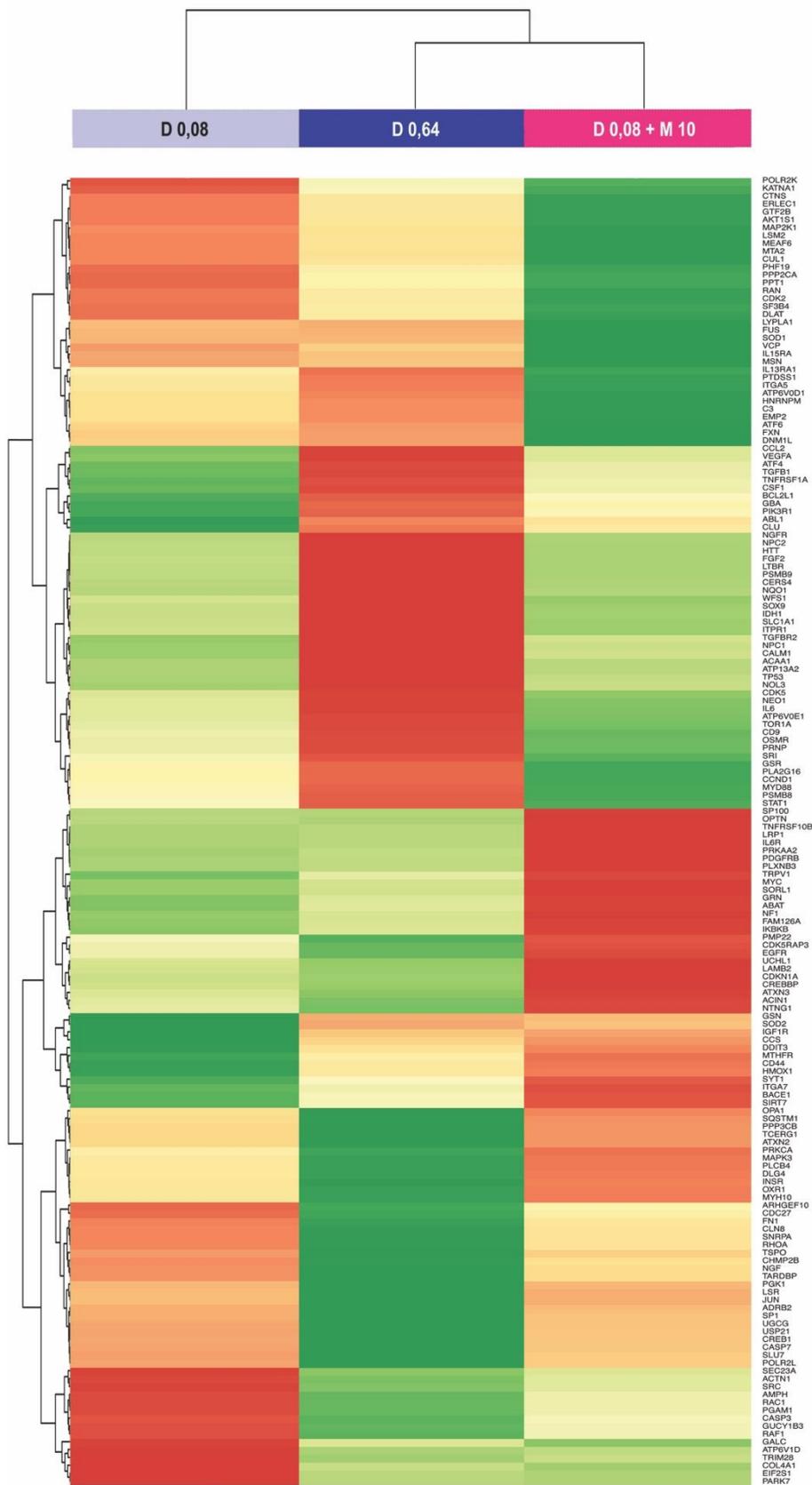


Figura 6.6. Agrupamiento jerárquico no supervisado de los ARNm del HNP modificados significativamente por D+M10 y/o D64 con respecto a D8.

Por otro lado, la disminución de EIF2S1 (eIF2 α) en ambas condiciones, indica inhibición generalizada de la síntesis de proteínas, salvo de aquellas implicadas en la respuesta a estrés celular como ATF4 [313], aumentada tanto con D64 como con D+M10. ATF4 induce la expresión de genes que promueven la muerte celular como DDIT3 [354], aumentada en D+M10. Estos aumentos sugieren la presencia de mecanismos no-apoptóticos de muerte celular debido a que ambos factores de transcripción están involucrados en la MCR inducida por estrés del RE [355]. La vía eIF2 α /ATF4/DDIT3 interviene en la muerte del EPR inducida por 2-fenil-APB-144, atribuida a alteraciones del RE y de las funciones autofágicas [356]. También estimula la expresión de VEGFA, aumentada en ambos modelos, una citoquina conocida por la promoción de la neovascularización coroidea y la pérdida de la visión en la DMAE [357].

La reducción de CHMP2B, un complejo que promueve la supervivencia aún cuando hay daño en la membrana [358], en los cultivos expuestos a D64 sugiere susceptibilidad para la necrosis y/o la necroptosis. La necroptosis inducida por TNF no requiere la activación de PARP1, disminuida en nuestras condiciones [359]. D+M10, por su parte, aumentó la expresión de TNFRSF10B, que promueve la muerte celular independiente de CASP8, como ocurre en la necroptosis [360].

Encontramos que tanto D64 como D+M10 aumentaron proteínas antioxidantes como SOD2 y HMOX1. El aumento de SOD2 fue similar, pero el de HMOX1 fue mayor en D+M10. Mutsaers y Tofighi [361] demostraron que el tratamiento con mifepristona atenúa completamente el aumento del estrés oxidativo inducido por dexametasona. Algo similar se encontró en macrófagos, donde el pretratamiento con mifepristona inhibió casi por completo el aumento de la expresión de

proteínas relacionadas con el estrés del RE inducida por corticosterona en dosis bajas, sugiriendo que el RG es necesario para la inducción de la respuesta al estrés del RE en macrófagos por corticosterona [362]. Al estudiar la relación entre los glucocorticoides y el estrés oxidativo, Costantini y col. [363] informaron que existe una correlación positiva entre la duración del tratamiento con glucocorticoides y la inducción de estrés oxidativo. Sin embargo, la evidencia a favor de los efectos prooxidantes de los glucocorticoides es mixta. Por un lado, los glucocorticoides pueden aumentar el daño oxidativo [364], pero por otro pueden mejorar las defensas antioxidantes y reducir la producción de EROS [365].

Conclusión

Las modificaciones de expresión génica detectadas en las células ARPE-19 expuestas a D64 sugieren que la muerte celular está asociada con estrés oxidativo, estrés del RE y desregulación de la autofagia. Los mismos mecanismos parecen estar involucrados en la muerte inducida por D+M10, aunque en cada caso serían gatilladas de manera diferente. Como ejemplo, se destaca el aumento de NGFR, TFNR1 e IL6 en D64 vs el aumento de TNFRSF10B (TRAIL-R) e IL6R en D+M10. No obstante, se requieren mas estudios para resolver que tipo de muerte sufren las ARPE-19 en las condiciones estudiadas. Asimismo, se requiere estudiar la expresión de un conjunto mayor de genes para dilucidar el papel de $RG\alpha$ y $RG\beta$ en la respuesta celular a la dexametasona y mifepristona.

Capítulo 7

Conclusiones generales

La retina es altamente vulnerable a los efectos estresantes de su cotidiana exposición a la radiación luminosa, que constantemente genera una agresión foto-oxidativa. Para aumentar la defensa de las células fotorreceptoras a diversos agentes nocivos, la retina produce moléculas neuroprotectoras. Por otro lado, la supervivencia de los fotorreceptores, encargados de absorber la luz, y del EPR, que fagocita los discos envejecidos, requiere la acción constante de mecanismos que promueven la supervivencia o impiden la MCR. La falla de estos mecanismos origina lesiones graves de la retina que llevan a la ceguera, como ocurre en la DMAE o en la retinopatía diabética.

El papel de los glucocorticoides y progestágenos como factores de protección en la respuesta al daño de los fotorreceptores es conocido, pero poco se sabe sobre su efecto en el epitelio pigmentario. Hasta donde hemos podido averiguar, este constituye el primer trabajo que intenta comparar los efectos y las vías activadas por glucocorticoides y progestágenos en los dos tipos celulares de la retina externa.

Nuestros hallazgos experimentales permitieron comprender que estos esteroides y sus receptores cumplen roles radicalmente opuestos en la supervivencia de los fotorreceptores y el EPR. Mientras que los primeros no sobreviven cuando los receptores de progestágenos y glucocorticoides son inactivados, las células del EPR mueren a medida que aumenta la concentración de glucocorticoides y/o progestágenos en el medio.

Cabe señalar que, en Cubilla y col. [13], el estudio que sugirió las hipótesis de este trabajo, la adrenalectomía afectó a los fotorreceptores pero no alteró al EPR. Este resultado, junto con la degeneración inducida por mifepristona, completamente reversible por dexametasona o progesterona, indica que estos esteroides son esenciales para la supervivencia de los fotorreceptores, aun en condiciones basales. Los estudios que aquí se presentan confirmaron que una de las acciones de los glucocorticoides y de la progesterona es la activación de las células gliales de Müller, fuente de los factores tróficos necesarios para el mantenimiento de las células fotorreceptoras, explicándose así algunas de las funciones de protección de la retina dependientes de glucocorticoides. Asimismo, estos esteroides aumentan la disponibilidad de rodopsina, el pigmento visual presente en los segmentos externos de los bastones. Pensamos que este aumento no solo se debe a la acción de los factores tróficos, sino que también reflejaría una acción directa de los esteroides sobre receptores no nucleares presentes en los mismos segmentos externos. A nivel molecular, los glucocorticoides y los progestágenos bloquearon la muerte de los fotorreceptores mediante la regulación del sistema BCL2. Cada forma de agresión a la retina se caracterizó por cambios selectivos de las moléculas de este sistema, pero en todos los casos, tanto dexametasona como progesterona determinaron un descenso de BID, un componente imprescindible para el desencadenamiento de la muerte celular.

Anatómicamente, los segmentos externos de los fotorreceptores se encuentran muy próximos a las células del EPR, con cuyas prolongaciones interactúan. Podemos entonces afirmar que fotorreceptores y EPR estarían expuestos a los mismos niveles de esteroides. Mas aun, en la retina externa, los niveles de

glucocorticoides no solo dependen de la secreción adrenal, sino que también podrían ser sintetizados por el EPR [366]. Por lo tanto, es necesario explicar como sobreviven ambos tipos celulares *in vivo*, estando en contacto con niveles igualmente elevados de glucocorticoides. Los resultados mostrados en esta Tesis indican que la supervivencia del EPR en un medio rico en glucocorticoides estaría asegurada por la extraordinaria abundancia de $RG\beta$, un receptor que bloquea la actividad de $RG\alpha$, en el citoplasma de estas células. Postulamos entonces que la expresión diferencial de $RG\alpha$ y $RG\beta$ aseguraría la supervivencia del EPR en presencia de las concentraciones de glucocorticoides necesarias para la supervivencia de los fotorreceptores, pero tóxicas para el EPR.

Se requieren estudios adicionales para comprender con mayor detalle las vías moleculares controladas por estos receptores, tanto en los fotorreceptores como en el epitelio pigmentario, así como las interacciones mecánicas entre ellos. Asimismo, es necesario comprender si los esteroides son el eslabón final o si existen otras sustancias involucrada, quizás uno o mas metabolitos de los esteroides endógenos.

Estos hallazgos pueden ser importantes para comprender y eventualmente mejorar el uso terapéutico de los glucocorticoides y de los progestágenos en la retina. Los primeros son ampliamente utilizados para el tratamiento del edema macular y mejorar la agudeza visual en pacientes con edema macular provocado por retinopatía diabética o trombosis de las venas retinales (vena central o sus ramas). Lamentablemente, no existen todavía estudios clínicos que avalen el uso clínico de los progestágenos en las retinopatías. Actualmente, la retinopatía diabética recibe tratamiento médico-farmacológico cuando existen alteraciones maculares y/o vasculares que comprometen la agudeza visual. Sin embargo, se

detectan indicios clínicos de alteraciones de la retina neural, incluyendo apoptosis neuronal [367, 368] mucho antes de la aparición de edema macular diabético. Cabe entonces preguntarse si la administración temprana de dosis relativamente bajas de esteroides o progestágenos, capaces de promover la supervivencia de fotorreceptores y neuronas retinianas, podría enlentecer el avance de la retinopatía diabética. El manejo de la dosis de esteroides aplicadas a un ojo diabético parece aún más importante si recordamos que en todos los casos, la menor supervivencia de las células EPR expuestas a dexametasona se asoció con las variaciones de los niveles de glucosa y con las mayores concentraciones de glucocorticoide.

Asimismo, se debería estudiar con mayor profundidad el efecto de las dosis bajas de glucocorticoides y progestágenos sobre el EPR. Teniendo en cuenta que la expresión genética con dexametasona 0,08 mM es radicalmente diferente de la observada con 0,32 y 0,64 mM, cabe la posibilidad de un efecto benéfico sobre el EPR con las concentraciones mas bajas.

El bloqueo de los receptores de glucocorticoides y progestágenos con mifepristona genera muerte selectiva de los fotorreceptores en ratones, pero no existen estudios ni datos clínicos que muestren un efecto similar en los seres humanos. En presencia de las elevadas concentraciones de progesterona durante el embarazo, es posible que la mayor parte de una dosis de mifepristona quede atrapada por los esteroides circulantes. Su uso frecuente, sin embargo, podría lesionar progresivamente a los fotorreceptores, sumándose a los efectos estresantes y pro-senescentes de la iluminación, la presencia de altos niveles de EROS en la retina externa, el envejecimiento, el tabaquismo y ciertas mutaciones genéticas.

El bloqueo de los receptores de glucocorticoides y progestágenos con mifepristona genera muerte selectiva de los fotorreceptores en ratones, pero no existen estudios ni datos clínicos que sugieran un efecto similar en los seres humanos.

Teniendo en cuenta el uso frecuente de la dexametasona en la terapéutica oftalmológica, los hallazgos de esta Tesis podrían constituir un aporte importante para el manejo clínico de los trastornos de la retina. También sugieren que es necesario explorar los posibles efectos terapéuticos de la progesterona en las lesiones de la retina. Asimismo es necesario evaluar los efectos adversos que pudiera tener la mifepristona. Una mejor comprensión de los efectos específicos de cada esteroide sobre la expresión génica en los distintos tipos celulares de la retina puede tener importantes implicaciones clínicas para un mejor manejo de las diversas patologías oculares.

En resumen, las principales conclusiones son:

- La mifepristona, un bloqueante de $RG\alpha$, es tóxica para los fotorreceptores, pero no así para el EPR. Por el contrario, la dexametasona y los progestágenos son tóxicos para el EPR.
- Como agente protector de los fotorreceptores, progesterona fue al menos tan eficiente como la de dexametasona, tanto en la lesión por luz como en la lesión por mifepristona.
- $RG\alpha$ activaría las células de Müller, indispensable fuente de factores tróficos. Además, su localización no-nuclear en los segmentos externos de los

fotorreceptores podría estar involucrada en la producción y/o el tráfico de rodopsina.

- Aunque no hemos podido demostrarlo en este estudio, postulamos que la alta presencia del $RG\beta$, que inhibe la acción de $RG\alpha$, controlaría los efectos citotóxicos de los corticoides.

Publicaciones

Relacionadas con la Tesis

- **Marquioni-Ramella MD**, Tate PS, Suburo AM. Glucocorticoids and progestogens in the retinal pigment epithelium. *In preparation*.
- **Marquioni-Ramella MD**, Cubilla MA, Bermúdez V, Tate PS, Marazita MC, Suburo AM. Glucocorticoid and progesterone mechanisms in photoreceptor survival. *Exp Eye Res.* 190:107854, 2020. doi: 10.1016/j.exer.2019.107854.
- **Marquioni-Ramella MD**, Suburo AM. Photo-damage, photo-protection and age-related macular degeneration. *Photochem Photobiol Sci.* 14(9):1560-1577, 2015. doi: 10.1039/c5pp00188a.
- Cubilla MA, Bermúdez V, **Marquioni-Ramella MD**, Bachor TP, Suburo AM. Mifepristone, a blocker of glucocorticoid receptors, promotes photoreceptor death. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 54(1):313-322, 2013. doi: 10.1167/iovs.12-10014.

Otras publicaciones

- Tate PS, Marazita MC, **Marquioni-Ramella MD**, Suburo AM. Ilex paraguariensis extracts and its polyphenols prevent oxidative damage and senescence of human retinal pigment epithelium cells. *J Funct Foods.* 2020. doi: 10.1016/j.jff.2020.103833.
- Bachor TP, Karbanová J, Büttner E, Bermúdez V, **Marquioni-Ramella MD**, Carmeliet P, Corbeil D, Suburo AM. Early ciliary and prominin-1 dysfunctions

precede neurogenesis impairment in a mouse model of type 2 diabetes. *Neurobiol Dis.* 108:13-28, 2017. doi: 10.1016/j.nbd.2017.07.010.

- Marazita MC, Dugour A, **Marquioni-Ramella MD**, Figueroa JM, Suburo AM. Oxidative stress-induced premature senescence dysregulates VEGF and CFH expression in retinal pigment epithelial cells: Implications for Age-related Macular Degeneration. *Redox Biol.* 7:78-87, 2016. doi: 10.1016/j.redox.2015.11.011.
- Bachor TP, **Marquioni-Ramella MD**, Suburo AM. Sitagliptin protects proliferation of neural progenitor cells in diabetic mice. *Metab Brain Dis.* 30(4):885-893, 2015. doi: 10.1007/s11011-015-9656-2.

Capítulo 8

Bibliografía General

1. WHO, W.H.O., *Blindness and vision impairment*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/blindness-and-visual-impairment>, 2020. (Accessed January 15, 2020).
2. National Institutes of Health, *Age-Related Macular Degeneration (AMD) Data and Statistics*. <https://www.nei.nih.gov/learn-about-eye-health/resources-for-health-educators/eye-health-data-and-statistics/age-related-macular-degeneration-amd-data-and-statistics>, 2019.
3. Wong, W.L., et al., *Global prevalence of age-related macular degeneration and disease burden projection for 2020 and 2040: a systematic review and meta-analysis*. *Lancet Glob Health*, 2014. **2**(2): p. e106-e116.
4. Grassmann, F., et al., *Genetic pleiotropy between age-related macular degeneration and 16 complex diseases and traits*. *Genome Med*, 2017. **9**(1): p. 29.
5. Pardue, M.T. and R.S. Allen, *Neuroprotective strategies for retinal disease*. *Prog Retin Eye Res*, 2018. **65**: p. 50-76.
6. Bellezza, I., *Oxidative Stress in Age-Related Macular Degeneration: Nrf2 as Therapeutic Target*. *Front Pharmacol*, 2018. **9**: p. 1280.
7. Rezar-Dreindl, S., et al., *Role of additional dexamethasone for the management of persistent or recurrent neovascular age-related macular degeneration under ranibizumab treatment*. *Retina*, 2017. **37**(5): p. 962-970.
8. Kuppermann, B.D., et al., *Intravitreal dexamethasone effects on different patterns of diabetic macular edema*. *Arch Ophthalmol*, 2010. **128**(5): p. 642-3.
9. Fu, J., T.T. Lam, and M.O. Tso, *Dexamethasone ameliorates retinal photic injury in albino rats*. *Exp Eye Res*, 1992. **54**(4): p. 583-94.
10. Wenzel, A., et al., *Prevention of photoreceptor apoptosis by activation of the glucocorticoid receptor*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2001. **42**(7): p. 1653-9.
11. Organisciak, D.T. and D.K. Vaughan, *Retinal light damage: mechanisms and protection*. *Prog Retin Eye Res*, 2010. **29**(2): p. 113-34.
12. Wyse Jackson, A.C., et al., *Progesterone receptor signalling in retinal photoreceptor neuroprotection*. *J Neurochem*, 2016. **136**(1): p. 63-77.
13. Cubilla, M.A., et al., *Mifepristone, a blocker of glucocorticoid receptors, promotes photoreceptor death*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2013. **54**(1): p. 313-322.
14. Cubilla, M.A., et al., *Glucocorticoid-dependent mechanisms in photoreceptor survival*. *Adv Exp Med Biol.*, 2012. **723**: p. 101-106.
15. Torriglia, A., F. Valamanesh, and F. Behar-Cohen, *On the retinal toxicity of intraocular glucocorticoids*. *Biochem Pharmacol*, 2010. **80**(12): p. 1878-86.

16. Pawlina, W., *Histología Texto y Atlas, Correlación con biología celular y molecular*. 7 ed. 2015: Wolters Kluwer.
17. Kolb, H., E. Fernandez, and R. Nelson, *Webvision: The organization of the retina and visual system*. 1997: Salt Lake City, University of Utah Health Sciences Center.
18. Bernstein, P.S., et al., *Lutein, zeaxanthin, and meso-zeaxanthin: The basic and clinical science underlying carotenoid-based nutritional interventions against ocular disease*. *Prog Retin Eye Res*, 2016. **50**: p. 34-66.
19. Arunkumar, R., A. Gorusupudi, and P.S. Bernstein, *The macular carotenoids: A biochemical overview*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020: p. 158617-158617.
20. Zaharova, E. and J. Sherman, *The use of SD-OCT in the differential diagnosis of dots, spots and other white retinal lesions*. *Eye Brain*, 2011. **3**: p. 69-80.
21. Buttery, R.G., et al., *How thick should a retina be? A comparative study of mammalian species with and without intraretinal vasculature*. *Vision Res*, 1991. **31**(2): p. 169-87.
22. Kur, J., E.A. Newman, and T. Chan-Ling, *Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease*. *Prog Retin Eye Res*, 2012. **31**(5): p. 377-406.
23. Kolb, H., *Simple Anatomy of the Retina*. 1995.
24. Blanks, J.C. and L.V. Johnson, *Vascular atrophy in the retinal degenerative rd mouse*. *J Comp Neurol*, 1986. **254**(4): p. 543-53.
25. Aristodemou, P. and M. Stanford, *Therapy insight: The recognition and treatment of retinal manifestations of systemic vasculitis*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2006. **2**(8): p. 443-51.
26. An, L. and R.K. Wang, *In vivo volumetric imaging of vascular perfusion within human retina and choroids with optical micro-angiography*. *Opt Express*, 2008. **16**(15): p. 11438-52.
27. Thumann, G., et al., *Cell Biology of the Retinal Pigment Epithelium*. *Retina Fifth Edition*, 2013. **1**: p. 401-414.
28. Spencer, C., et al., *Identification of a synergistic interaction between endothelial cells and retinal pigment epithelium*. *J Cell Mol Med*, 2017. **21**(10): p. 2542-2552.
29. Kauppinen, A., et al., *Inflammation and its role in age-related macular degeneration*. *Cell Mol Life Sci*, 2016. **73**(9): p. 1765-1786.
30. Barar, J., et al., *Ocular Drug Delivery; Impact of in vitro Cell Culture Models*. *J Ophthalmic Vis Res*, 2009. **4**(4): p. 238-252.
31. Claesson-Welsh, L., *Vascular permeability--the essentials*. *Ups J Med Sci*, 2015. **120**(3): p. 135-143.
32. Stewart, M.W., *The expanding role of vascular endothelial growth factor inhibitors in ophthalmology*. *Mayo Clin Proc*, 2012. **87**(1): p. 77-88.
33. Miller, J.W., et al., *Vascular endothelial growth factor a in intraocular vascular disease*. *Ophthalmology*, 2013. **120**(1): p. 106-14.
34. Walls, G.L., *The vertebrate eye and its adaptive radiation*. 1942, Bloomfield Hills, Mich.: Cranbrook Institute of Science.
35. Remtulla, S. and P.E. Hallett, *A schematic eye for the mouse, and comparisons with the rat*. *Vision Res*, 1985. **25**(1): p. 21-31.

36. Carter-Dawson, L.D. and M.M. LaVail, *Rods and cones in the mouse retina. I. Structural analysis using light and electron microscopy*. J Comp Neurol, 1979. **188**(2): p. 245-262.
37. Jeon, C.J., E. Strettoi, and R.H. Masland, *The major cell populations of the mouse retina*. J Neurosci, 1998. **18**(21): p. 8936-8946.
38. Kryger, Z., et al., *The topography of rod and cone photoreceptors in the retina of the ground squirrel*. Vis Neurosci, 1998. **15**(4): p. 685-691.
39. Dräger, U.C. and J.F. Olsen, *Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice*. J Comp Neurol, 1980. **191**(3): p. 383-412.
40. Rowe, M.H. and B. Dreher, *Functional morphology of beta cells in the area centralis of the cat's retina: a model for the evolution of central retinal specializations*. Brain Behav Evol, 1982. **21**(1): p. 1-23.
41. Provis, J.M., C.M. Diaz, and B. Dreher, *Ontogeny of the primate fovea: a central issue in retinal development*. Prog Neurobiol, 1998. **54**(5): p. 549-580.
42. Haverkamp, S. and H. Wässle, *Immunocytochemical analysis of the mouse retina*. J Comp Neurol, 2000. **424**(1): p. 1-23.
43. Veleri, S., et al., *Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models*. Dis Model Mech, 2015. **8**(2): p. 109-129.
44. Molday, R.S. and O.L. Moritz, *Photoreceptors at a glance*. J Cell Sci, 2015. **128**(22): p. 4039-45.
45. Bachmann-Gagescu, R. and S.C. Neuhauss, *The photoreceptor cilium and its diseases*. Curr Opin Genet Dev, 2019. **56**: p. 22-33.
46. Wässle, H., *Parallel processing in the mammalian retina*. Nat Rev Neurosci, 2004. **5**: p. 747-757.
47. Peichl, L., *Diversity of mammalian photoreceptor properties: adaptations to habitat and lifestyle?* Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol, 2005. **287**: p. 1001-1012.
48. Srinivasan, S., et al., *Ligand Binding Mechanisms in Human Cone Visual Pigments*. Trends Biochem Sci, 2019. **44**(7): p. 629-639.
49. Ryan, S., *Retina*. 3rd ed. Vol. 1. 2001: Mosby.
50. Tasman, W., *Duane's Ophthalmology*. CD-ROM Edition ed, ed. L.W.a. Wilkinds. 2002.
51. Hubbard, R. and G. Wald, *Cis-trans isomers of vitamin A and retinene in the rhodopsin system*. J Gen Physiol, 1952. **36**(2): p. 269-315.
52. Lamb, T.D. and E.N. Pugh, Jr., *Phototransduction, dark adaptation, and rhodopsin regeneration the proctor lecture*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(12): p. 5137-52.
53. Luo, D.G., T. Xue, and K.W. Yau, *How vision begins: an odyssey*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(29): p. 9855-62.
54. Palczewski, K., *Chemistry and biology of the initial steps in vision: the Friedenwald lecture*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2014. **55**(10): p. 6651-6672.
55. Kefalov, V.J., *Phototransduction: Phototransduction in Cones*. In *Encyclopedia of the Eye*, , D.A. Dartt, Editor. 2010, Oxford: Academic Press. p. 389-396.

56. Simo, R., et al., *The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy*. J Biomed Biotechnol, 2010. **2010**: p. 190724.
57. Du, W., et al., *Protection of Kaempferol on Oxidative Stress-Induced Retinal Pigment Epithelial Cell Damage*. Oxid Med Cell Longev, 2018. **2018**: p. 1610751-1610751.
58. Young, R.W., *The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey*. J Cell Biol, 1971. **49**: p. 303-318.
59. Panda-Jonas, S., J.B. Jonas, and M. Jakobczyk-Zmija, *Retinal pigment epithelial cell count, distribution, and correlations in normal human eyes*. Am J Ophthalmol, 1996. **121**(2): p. 181-189.
60. Yoo, S.H. and A.P. Adamis, *Retinal manifestations of aging*. Int Ophthalmol Clin, 1998. **38**(1): p. 95-101.
61. Boulton, M. and P. Dayhaw-Barker, *The role of the retinal pigment epithelium: topographical variation and ageing changes*. Eye (Lond), 2001. **15**(Pt 3): p. 384-9.
62. Sparrow, J.R. and M. Boulton, *RPE lipofuscin and its role in retinal pathobiology*. Exp Eye Res, 2005. **80**(5): p. 595-606.
63. Ishikawa, M., Y. Sawada, and T. Yoshitomi, *Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells*. Exp Eye Res, 2015. **133**: p. 3-18.
64. Remington, L.A., *Chapter 4 - Retina*, in *Clinical Anatomy and Physiology of the Visual System (Third Edition)*, L.A. Remington, Editor. 2012, Butterworth-Heinemann: Saint Louis. p. 61-92.
65. Sparrow, J.R., et al., *The bisretinoids of retinal pigment epithelium*. Prog Retin Eye Res, 2012. **31**(2): p. 121-35.
66. Strauss, O., *The retinal pigment epithelium in visual function*. Physiol Rev, 2005. **85**(3): p. 845-81.
67. Kevany, B.M. and K. Palczewski, *Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors*. Physiology (Bethesda), 2010. **25**(1): p. 8-15.
68. Kiser, P.D., M. Golczak, and K. Palczewski, *Chemistry of the retinoid (visual) cycle*. Chem Rev, 2014. **114**(1): p. 194-232.
69. Daruwalla, A., et al., *Structural biology of 11-cis-retinaldehyde production in the classical visual cycle*. Biochem J, 2018. **475**(20): p. 3171-3188.
70. Wang, J.S. and V.J. Kefalov, *The cone-specific visual cycle*. Prog Retin Eye Res, 2010. **30**(2): p. 115-28.
71. Kocaoglu, O.P., et al., *Photoreceptor disc shedding in the living human eye*. Biomed Opt Express, 2016. **7**(11): p. 4554-4568.
72. Keeling, E., et al., *Impaired Cargo Clearance in the Retinal Pigment Epithelium (RPE) Underlies Irreversible Blinding Diseases*. Cells, 2018. **7**(2): p. 16.
73. Bobu, C., et al., *Prolonged light exposure induces widespread phase shifting in the circadian clock and visual pigment gene expression of the Arvicanthis ansorgei retina*. Mol Vis, 2013. **19**: p. 1060-1073.
74. Ruggiero, L. and S.C. Finnemann, *Rhythmicity of the Retinal Pigment Epithelium*, in *The Retina and Circadian Rhythms*, G. Tosini, et al., Editors. 2014, Springer New York: New York, NY. p. 95-112.
75. Young, R.W., *Renewal systems in rods and cones*. Ann Ophthalmol, 1973. **5**(8): p. 843-854.

76. Lenis, T.L., et al., *Expression of ABCA4 in the retinal pigment epithelium and its implications for Stargardt macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(47): p. E11120-E11127.
77. Marquioni-Ramella, M.D. and A.M. Suburo, *Photo-damage, photo-protection and age-related macular degeneration*. Photochem. Photobiol. Sci., 2015. **14**: p. 1560-1577.
78. Hunter, J.J., et al., *The susceptibility of the retina to photochemical damage from visible light*. Prog Retin Eye Res, 2012. **31**(1): p. 28-42.
79. Arunkumar, R., et al., *What do we know about the macular pigment in AMD: the past, the present, and the future*. Eye (Lond), 2018. **32**(5): p. 992-1004.
80. Sui, G.Y., et al., *Is sunlight exposure a risk factor for age-related macular degeneration? A systematic review and meta-analysis*. Br J Ophthalmol, 2013. **97**(4): p. 389-94.
81. Hirakawa, M., et al., *Age-related maculopathy and sunlight exposure evaluated by objective measurement*. Br J Ophthalmol, 2008. **92**(5): p. 630-4.
82. Cruickshanks, K.J., R. Klein, and B.E. Klein, *Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study*. Arch Ophthalmol, 1993. **111**(4): p. 514-8.
83. Fletcher, A.E., et al., *Sunlight exposure, antioxidants, and age-related macular degeneration*. Arch Ophthalmol, 2008. **126**(10): p. 1396-403.
84. Kagan, V.E., et al., *Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retina*. Biochim Biophys Acta, 1973. **330**(1): p. 76-9.
85. Demontis, G.C., B. Longoni, and P.L. Marchiafava, *Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(7): p. 2421-7.
86. Cideciyan, A.V., et al., *Disease sequence from mutant rhodopsin allele to rod and cone photoreceptor degeneration in man*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(12): p. 7103-8.
87. Mata, N.L., J. Weng, and G.H. Travis, *Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(13): p. 7154-9.
88. Cho, Y., et al., *Toll-like receptor polymorphisms and age-related macular degeneration: replication in three case-control samples*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2009. **50**(12): p. 5614-8.
89. Kuwabara, T. and R.A. Gorn, *Retinal damage by visible light. An electron microscopic study*. Arch Ophthalmol, 1968. **79**(1): p. 69-78.
90. Torbidoni, V., M. Iribarne, and A.M. Suburo, *Endothelin receptors in light-induced retinal degeneration*. Exp Biol Med (Maywood), 2006. **231**(6): p. 1095-100.
91. Wenzel, A., et al., *Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration*. Prog Retin Eye Res, 2005. **24**(2): p. 275-306.
92. Naash, M.I., et al., *Polygenic disease and retinitis pigmentosa: albinism exacerbates photoreceptor degeneration induced by the expression of a mutant opsin in transgenic mice*. J Neurosci, 1996. **16**(24): p. 7853-8.

93. Wang, M., et al., *Expression of a mutant opsin gene increases the susceptibility of the retina to light damage*. *Vis Neurosci*, 1997. **14**(1): p. 55-62.
94. White, D.A., et al., *Increased sensitivity to light-induced damage in a mouse model of autosomal dominant retinal disease*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007. **48**(5): p. 1942-51.
95. Gu, D., et al., *Steroids do not prevent photoreceptor degeneration in the light-exposed T4R rhodopsin mutant dog retina irrespective of AP-1 inhibition*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. **50**: p. 3482-3494.
96. Fuller, D., R. Machemer, and R.W. Knighton, *Retinal damage produced by intraocular fiber optic light*. *Am J Ophthalmol*, 1978. **85**(4): p. 519-537.
97. Sykes, S.M., et al., *Damage to the monkey retina by broad-spectrum fluorescent light*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1981. **20**(4): p. 425-34.
98. Tso, M.O., *Retinal photic injury in normal and scorbutic monkeys*. *Trans Am Ophthalmol Soc*, 1987. **85**: p. 498-556.
99. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. *Cell Death Differ.*, 2009. **16**: p. 3-11.
100. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. *Cell Death Differ.*, 2011. **19**: p. 107-120.
101. Galluzzi, L.B.-S.P., J. M., Vitale, I., Aaronson, S. A., Abrams, J. M., Adam, D., Alnemri, E. S., Altucci, L., Andrews, D., Annicchiarico-Petruzzelli, M., Baehrecke, E. H., Bazan, N. G., Bertrand, M. J., Bianchi, K., Blagosklonny, M. V., , et al., *Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015*. *Cell Death Differ.*, 2015. **22**: p. 58-73.
102. Choi, M.E., et al., *Necroptosis: a crucial pathogenic mediator of human disease*. *JCI Insight*, 2019. **4**(15).
103. Galluzzi, L., et al., *Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018*. *Cell Death Differ*, 2018. **25**(3): p. 486-541.
104. Galluzzi, L., et al., *Necroptosis: Mechanisms and Relevance to Disease*. *Annu Rev Pathol*, 2017. **12**: p. 103-130.
105. Weinlich, R., et al., *Necroptosis in development, inflammation and disease*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017. **18**(2): p. 127-136.
106. Linkermann, A. and D.R. Green, *Necroptosis*. *N Engl J Med*, 2014. **370**(5): p. 455-65.
107. Kaczmarek, A., P. Vandenabeele, and D.V. Krysko, *Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance*. *Immunity*, 2013. **38**(2): p. 209-23.
108. Tonnus, W., et al., *The pathological features of regulated necrosis*. *J Pathol*, 2019. **247**(5): p. 697-707.
109. Igney, F.H. and P.H. Krammer, *Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis*. *Nat Rev Cancer.*, 2002. **2**(4): p. 277-288.
110. Siddiqui, W.A., A. Ahad, and H. Ahsan, *The mystery of BCL2 family: Bcl-2 proteins and apoptosis: an update*. *Arch Toxicol.*, 2015. **89**(3): p. 289-317.
111. Green, D.R. and G. Kroemer, *The pathophysiology of mitochondrial cell death*. *Science*, 2004. **305**(5684): p. 326-629.

112. Crawford, E.D. and J.A. Wells, *Caspase substrates and cellular remodeling*. *Annu Rev Biochem*, 2011. **80**: p. 1055-1087.
113. Zaman, S., R. Wang, and V. Gandhi, *Targeting the apoptosis pathway in hematologic malignancies*. *Leuk Lymphoma*, 2014. **55**(9): p. 1980-92.
114. Cuda, C.M., R.M. Pope, and H. Perlman, *The inflammatory role of phagocyte apoptotic pathways in rheumatic diseases*. *Nat Rev Rheumatol*, 2016. **12**: p. 543-558.
115. Glybina, I.V., et al., *Photoreceptor neuroprotection in RCS rats via low-dose intravitreal sustained-delivery of fluocinolone acetonide*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009. **50**(10): p. 4847-57.
116. Campochiaro, P.A., et al., *Sustained ocular delivery of fluocinolone acetonide by an intravitreal insert*. *Ophthalmology*, 2010. **117**(7): p. 1393-9 e3.
117. She, H., et al., *Photoreceptor protection after photodynamic therapy using dexamethasone in a rat model of choroidal neovascularization*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2008. **49**(11): p. 5008-14.
118. Hao, W., et al., *Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration*. *Nat Genet*, 2002. **32**(2): p. 254-60.
119. Gu, J., et al., *Assessing susceptibility to age-related macular degeneration with proteomic and genomic biomarkers*. *Mol Cell Proteomics*, 2009. **8**(6): p. 1338-49.
120. De Nicola, A.F., et al., *Neurosteroidogenesis and progesterone anti-inflammatory/neuroprotective effects*. *J Neuroendocrinol*, 2018. **30**(2): p. 10.1111/jne.12502.
121. Nuzzi, R., et al., *Gonadal Hormones and Retinal Disorders: A Review*. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2018. **9**: p. 66.
122. Sánchez-Vallejo, V., et al., *Neuroprotective actions of progesterone in an in vivo model of retinitis pigmentosa*. *Pharmac Res*, 2015. **99**: p. 276-288.
123. Doonan, F., et al., *Enhancing survival of photoreceptor cells in vivo using the synthetic progestin Norgestrel*. *J Neurochem.*, 2011. **118**(5): p. 915-927.
124. Roche, S.L., et al., *Microglial-induced Müller cell gliosis is attenuated by progesterone in a mouse model of retinitis pigmentosa*. *Glia*, 2018. **66**(2): p. 295-310.
125. Roche, S.L., et al., *Norgestrel, a Progesterone Analogue, Promotes Significant Long-Term Neuroprotection of Cone Photoreceptors in a Mouse Model of Retinal Disease*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2019. **60**(8): p. 3221-3235.
126. Wyse Jackson, A.C. and T.G. Cotter, *The synthetic progesterone Norgestrel is neuroprotective in stressed photoreceptor-like cells and retinal explants, mediating its effects via basic fibroblast growth factor, protein kinase A and glycogen synthase kinase 3 β signalling*. *Eur. J. Neurosci*, 2016. **43**(7): p. 899-911.
127. Cutler, S.M., et al., *Progesterone improves acute recovery after traumatic brain injury in the aged rat*. *J Neurotrauma*, 2007. **24**(9): p. 1475-86.
128. Allen, R.S., et al., *Progesterone treatment shows greater protection in brain vs. retina in a rat model of middle cerebral artery occlusion: Progesterone receptor levels may play an important role*. *Restor Neurol Neurosci*, 2016. **34**(6): p. 947-963.

129. Tanaka, M., et al., *Nestorone exerts long-term neuroprotective effects against transient focal cerebral ischemia in adult male rats*. Brain Res, 2019. **1719**: p. 288-296.
130. Theis, V. and C. Theiss, *Progesterone Effects in the Nervous System*. Anat Rec (Hoboken), 2019. **302**(8): p. 1276-1286.
131. Schumacher, M., et al., *Progesterone neuroprotection: The background of clinical trial failure*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2016. **160**: p. 53-66.
132. Gonzalez Martin-Moro, J., J.L. Hernandez Verdejo, and J. Zarallo Gallardo, *Photoc maculopathy: A review of the literature (ii)*. Arch Soc Esp Oftalmol, 2018. **93**(11): p. 542-550.
133. Ranchod, T.M., et al., *LuceDex: a prospective study comparing ranibizumab plus dexamethasone combination therapy versus ranibizumab monotherapy for neovascular age-related macular degeneration*. Retina, 2013. **33**(8): p. 1600-4.
134. Barikian, A., et al., *Intravitreal dexamethasone implant as adjuvant treatment for bevacizumab- and ranibizumab-resistant neovascular age-related macular degeneration: a prospective pilot study*. Retina, 2017. **37**(7): p. 1337-1344.
135. Motarjemizadeh, Q., et al., *Intravitreal Bevacizumab with or without Triamcinolone for Wet Age-related Macular Degeneration: Twelve-month Results of a Prospective, Randomized Investigation*. Middle East Afr J Ophthalmol, 2018. **25**(1): p. 1-7.
136. Ersoz, M.G., et al., *DEVELOPMENT OF PACHYCHOROID PIGMENT EPITHELIOPATHY AND TRANSFORMATION TO CENTRAL SEROUS CHORIORETINOPATHY AFTER INTRAVITREAL DEXAMETHASONE IMPLANTATION*. Retin Cases Brief Rep, 2018.
137. Haan, M.N., et al., *Hormone therapy and age-related macular degeneration: the Women's Health Initiative Sight Exam Study*. Arch Ophthalmol, 2006. **124**(7): p. 988-92.
138. Abramov, Y., et al., *The effect of hormone therapy on the risk for age-related maculopathy in postmenopausal women*. Menopause, 2004. **11**(1): p. 62-8.
139. Deng, Q., et al., *Rapid Glucocorticoid Feedback Inhibition of ACTH Secretion Involves Ligand-Dependent Membrane Association of Glucocorticoid Receptors*. Endocrinology, 2015. **156**(9): p. 3215-27.
140. Chien, E.J., et al., *In human T cells mifepristone antagonizes glucocorticoid non-genomic rapid responses in terms of Na/H-exchange 1 activity, but not ezrin/radixin/moesin phosphorylation*. Steroids, 2016.
141. Li, X., et al., *Progesterone receptor membrane component-1 regulates hepcidin biosynthesis*. J Clin Invest., 2016. **126**(1): p. 389-401.
142. Zheng, Q., et al., *ANP promotes proliferation and inhibits apoptosis of ovarian granulosa cells by NPRA/PGRMC1/EGFR complex and improves ovary functions of PCOS rats*. Cell Death Dis., 2017. **8**(10:e3145).
143. Kelder, J., et al., *Comparison between steroid binding to membrane progesterone receptor alpha (mPRalpha) and to nuclear progesterone receptor: correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPRalpha-specific agonists*. Steroids, 2010. **75**(4-5): p. 314-322.

144. Fusi-Rubiano, W., et al., *Oral medications for central serous chorioretinopathy: a literature review*. Eye (Lond), 2019.
145. Ritch, S.J., et al., *Advanced assessment of migration and invasion of cancer cells in response to mifepristone therapy using double fluorescence cytochemical labeling*. BMC Cancer, 2019. **19**(1): p. 376.
146. Tieszen, C.R., et al., *Antiprogestin mifepristone inhibits the growth of cancer cells of reproductive and non-reproductive origin regardless of progesterone receptor expression*. BMC Cancer, 2011. **11**: p. 207.
147. Chrousos, G.P. and T. Kino, *Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic*. Sci STKE, 2005. **2005**(304): p. pe48.
148. Miroslav, A., Ana Djordjevic, Constantinos Demonacos, Marija Krstic-Demonacos, Marija B. Radojicic, *The role of phosphorylated glucocorticoid receptor in mitochondrial functions and apoptotic signalling in brain tissue of stressed Wistar rats*. Int J Biochem Cell Biol., 2009. **41**: p. 2181-2188.
149. Kadmiel, M. and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in health and disease*. Trends Pharmacol Sci, 2013. **34**(9): p. 518-30.
150. De Nicola, A.F., et al., *Steroid protection in aging and age-associated diseases*. Exp Gerontol, 2009. **44**(1-2): p. 34-40.
151. Kino, T., Chrousos G.P., *Glucocorticoid effect on gene expression*. 2005: Elsevier.
152. Zanchi, N.E., et al., *Glucocorticoids: extensive physiological actions modulated through multiple mechanisms of gene regulation*. J Cell Physiol, 2010. **224**(2): p. 311-5.
153. Numakawa, T., et al., *The influence of glucocorticoids on neuronal survival and synaptic function*. Biomolecular concepts, 2012. **3**(6): p. 495-504.
154. Nicolaidis, N.C., et al., *The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function*. Steroids, 2010. **75**(1): p. 1-12.
155. Leventhal, S.M., et al., *Uncovering a multitude of human glucocorticoid receptor variants: an expansive survey of a single gene*. BMC genetics, 2019. **20**(1): p. 16-16.
156. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: New mechanisms for generating tissue specific actions of glucocorticoids*. J Biol Chem, 2011. **286**(5): p. 3177-3184.
157. Oakley, R.H., M. Sar, and J.A. Cidlowski, *The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function*. J Biol Chem, 1996. **271**(16): p. 9550-9.
158. Oakley, R.H., et al., *Expression and subcellular distribution of the beta-isoform of the human glucocorticoid receptor*. Endocrinology, 1997. **138**(11): p. 5028-38.
159. Pujols L, M., J., Roca-Ferrer, J., Torrego, A., Xaubet, A., Cidlowski, J.A., Picado, C., *Expression of glucocorticoid receptor and isoforms in human cells and tissues*. Am J Physiol Cell Physiol, 2002. **283**: p. 1324 - 1331.
160. Hinds, T.D., et al., *Discovery of Glucocorticoid Receptor- β in Mice with a Role in Metabolism*. Mol Endocrinol, 2010. **24**(9): p. 1715-1727.

161. Oakley, R.H. and J.A. Cidlowski, *The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease*. J Allergy Clin Immunol., 2013. **132**: p. 1033-1044.
162. Schaaf, M.J. and J.A. Cidlowski, *Molecular determinants of glucocorticoid receptor mobility in living cells: the importance of ligand affinity*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(6): p. 1922-1934.
163. Picard, D., *Chaperoning steroid hormone action*. Trends Endocrinol Metab, 2006. **17**(6): p. 229-35.
164. Kumar, R. and G. Litwack, *Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain*. Steroids, 2009. **74**(12): p. 877-83.
165. Kumar, R. and E.B. Thompson, *Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2005. **94**(5): p. 383-94.
166. Vandevyver, S., L. Dejager, and C. Libert, *On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back*. Traffic, 2012. **13**(3): p. 364-374.
167. Echeverría, P.C., et al., *Nuclear import of the glucocorticoid receptor-hsp90 complex through the nuclear pore complex is mediated by its interaction with Nup62 and importin beta*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(17): p. 4788-4797.
168. Lorenz, O.R., et al., *Modulation of the Hsp90 chaperone cycle by a stringent client protein*. Mol Cell, 2014. **53**(6): p. 941-953.
169. Davies, T.H., Y.M. Ning, and E.R. Sanchez, *A new first step in activation of steroid receptors: hormone-induced switching of FKBP51 and FKBP52 immunophilins*. J Biol Chem, 2002. **277**(7): p. 4597-600.
170. Galigniana, M.D., et al., *Binding of hsp90-associated immunophilins to cytoplasmic dynein: direct binding and in vivo evidence that the peptidylprolyl isomerase domain is a dynein interaction domain*. Biochemistry, 2002. **41**(46): p. 13602-13610.
171. Wang, Z., J. Frederick, and M.J. Garabedian, *Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo*. J Biol Chem, 2002. **277**(29): p. 26573-80.
172. Bamberger, C.M., et al., *Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans*. J Clin Invest, 1995. **95**(6): p. 2435-41.
173. Oakley, R.H., et al., *The dominant negative activity of the human glucocorticoid receptor beta isoform. Specificity and mechanisms of action*. J Biol Chem, 1999. **274**(39): p. 27857-66.
174. Yudt, M.R., et al., *Molecular origins for the dominant negative function of human glucocorticoid receptor beta*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(12): p. 4319-30.
175. Kino, T., et al., *Glucocorticoid receptor (GR) beta has intrinsic, GRalpha-independent transcriptional activity*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. **381**(4): p. 671-5.
176. Lewis-Tuffin, L.J. and J.A. Cidlowski, *The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1069**: p. 1-9.
177. Lewis-Tuffin, L.J., et al., *Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(6): p. 2266-82.

178. He, B., et al., *Human Glucocorticoid Receptor beta Regulates Gluconeogenesis and Inflammation in Mouse Liver*. Mol Cell Biol, 2015. **36**(5): p. 714-30.
179. Min, J., et al., *Probing Dominant Negative Behavior of Glucocorticoid Receptor beta through a Hybrid Structural and Biochemical Approach*. Mol Cell Biol, 2018. **38**(8).
180. Pujols, L., J. Mullol, and C. Picado, *Importance of glucocorticoid receptors in upper and lower airways*. Front Biosci, 2010. **15**: p. 789-800.
181. Barnes, P.J., *Glucocorticosteroids*. Handb Exp Pharmacol, 2017. **237**: p. 93-115.
182. Hinds, T.D., et al., *Overexpression of Glucocorticoid Receptor β Enhances Myogenesis and Reduces Catabolic Gene Expression*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(2): p. 232-232.
183. Strickland, I., et al., *High constitutive glucocorticoid receptor beta in human neutrophils enables them to reduce their spontaneous rate of cell death in response to corticosteroids*. J Exp Med, 2001. **193**(5): p. 585-93.
184. Lv, Y., et al., *Erlotinib overcomes paclitaxel-resistant cancer stem cells by blocking the EGFR-CREB/GRbeta-IL-6 axis in MUC1-positive cervical cancer*. Oncogenesis, 2019. **8**(12): p. 70.
185. Li, L.B., et al., *Divergent expression and function of glucocorticoid receptor beta in human monocytes and T cells*. J Leukoc Biol, 2006. **79**(4): p. 818-827.
186. Grzanka, A., et al., *Molecular mechanisms of glucocorticoids action: implications for treatment of rhinosinusitis and nasal polyposis*. Eur Arch Otorhinolaryngol, 2011. **268**(2): p. 247-53.
187. Samarasinghe, R.A., et al., *Nongenomic glucocorticoid receptor action regulates gap junction intercellular communication and neural progenitor cell proliferation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(40): p. 16657-62.
188. Urbach, V., et al., *Rapid anti-secretory effects of glucocorticoids in human airway epithelium*. Steroids, 2006. **71**(4): p. 323-328.
189. Yukawa, H., et al., *Acute effects of glucocorticoids on ATP-induced Ca²⁺ mobilization and nitric oxide production in cochlear spiral ganglion neurons*. Neuroscience, 2005. **130**(2): p. 485-496.
190. Takahashi, T., et al., *Corticosterone acutely prolonged N-methyl-d-aspartate receptor-mediated Ca²⁺ elevation in cultured rat hippocampal neurons*. J Neurochem, 2002. **83**(6): p. 1441-1451.
191. He, L.M., et al., *Rapid inhibitory effects of corticosterone on calcium influx in rat dorsal root ganglion neurons*. Neuroscience, 2003. **116**(2): p. 325-333.
192. Sun, H.W., et al., *Rapid inhibitory effect of glucocorticoids on airway smooth muscle contractions in guinea pigs*. Steroids, 2006. **71**(2): p. 154-159.
193. Wehling, M., et al., *Nongenomic effects of aldosterone on intracellular Ca²⁺ in vascular smooth muscle cells*. Circ Res, 1995. **76**(6): p. 973-979.
194. Panettieri, R.A., et al., *Non-genomic Effects of Glucocorticoids: An Updated View*. Trends Pharmacol Sci, 2019. **40**(1): p. 38-49.
195. Singh, M., C. Su, and S. Ng, *Non-genomic mechanisms of progesterone action in the brain*. Front Neurosci, 2013. **7**: p. 159.

196. Vegeto, E., et al., *Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(10): p. 1244-55.
197. Check, J.H., *The role of progesterone and the progesterone receptor in cancer*. Expert Rev Endocrinol Metab, 2017. **12**(3): p. 187-197.
198. Mittelman-Smith, M.A., et al., *Rodent Models of Non-classical Progesterone Action Regulating Ovulation*. Front Endocr (Lausanne), 2017. **8**: p. 165-165.
199. Petersen, S.L., et al., *Nonclassical progesterone signalling molecules in the nervous system*. J Neuroendocrinol, 2013(991-1001).
200. Chabbert-Buffet, N., et al., *Selective progesterone receptor modulators and progesterone antagonists: mechanisms of action and clinical applications*. Hum Reprod Update., 2005. **11**(3): p. 293-307.
201. Gellersen, B., M.S. Fernandes, and J.J. Brosens, *Non-genomic progesterone actions in female reproduction*. Hum Reprod Update., 2009. **15**: p. 119-138.
202. Wendler, A. and M. Wehling, *PGRMC2, a yet uncharacterized protein with potential as tumor suppressor, migration inhibitor, and regulator of cytochrome P450 enzyme activity*. Steroids, 2013. **78**(6): p. 555-558.
203. Vaughan, D.K., et al., *Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage*. Photochem Photobiol, 2002. **75**(5): p. 547-53.
204. Marquioni-Ramella, M.D., et al., *Glucocorticoid and progesterone mechanisms in photoreceptor survival*. Exp Eye Res, 2019. **190**: p. 107854.
205. Schindler, A.E., et al., *Classification and pharmacology of progestins*. Maturitas, 2003. **46 Suppl 1**: p. S7-S16.
206. Barthel, L.K. and P.A. Raymond, *Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry*. J Histochem Cytochem, 1990. **38**(9): p. 1383-8.
207. Tanito, M., et al., *Topography of retinal damage in light-exposed albino rats*. Exp Eye Res, 2008. **87**(3): p. 292-5.
208. Chidlow, G., et al., *Localization of a wide-ranging panel of antigens in the rat retina by immunohistochemistry: comparison of Davidson's solution and formalin as fixatives*. J Histochem Cytochem, 2011. **59**(10): p. 884-98.
209. Ogawa, L., et al., *Endothelin Immunoreactive Cells in Human Proliferative Vitreoretinopathy*. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2003. **44**(5): p. 531-.
210. Bradford, M., *A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*. Anal. Biochem., 1976. **72**: p. 248-254.
211. Bereta, G., et al., *A functional kinase homology domain is essential for the activity of photoreceptor guanylate cyclase 1*. J Biol Chem, 2010. **285**(3): p. 1899-908.
212. Kasibhatla, S., et al., *Acridine Orange/Ethidium Bromide (AO/EB) Staining to Detect Apoptosis*. CSH protoc, 2006. **2006**(3): p. pdb.prot4493.
213. Amsterdam, A., K. Tajima, and R. Sasson, *Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action*. Biochem. Pharmacol., 2002. **64**(5-6): p. 843-850.

214. Sulaiman, R.S., M. Kadmiel, and J.A. Cidlowski, *Glucocorticoid receptor signaling in the eye*. *Steroids*, 2018. **133**: p. 60-66.
215. Viegas, L.R., et al., *Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(11): p. 9831-9.
216. Viegas, L.R., et al., *Mechanisms involved in tissue-specific apoptosis regulated by glucocorticoids*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2008. **109**(3-5): p. 273-8.
217. Levin, L.A., et al., *Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina*. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1997. **38**(12): p. 2545-53.
218. Chandra, D. and D.G. Tang, *Mitochondrially localized active caspase-9 and caspase-3 result mostly from translocation from the cytosol and partly from caspase-mediated activation in the organelle. Lack of evidence for Apaf-1-mediated procaspase-9 activation in the mitochondria*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(19): p. 17408-17420.
219. Kim, J.E. and T.C. Kang, *Differential Roles of Mitochondrial Translocation of Active Caspase-3 and HMGB1 in Neuronal Death Induced by Status Epilepticus*. *Front Cell Neurosci*, 2018. **12**: p. 301.
220. Chang, J., et al., *Expression of transforming growth factor beta type II receptor reduces tumorigenicity in human gastric cancer cells*. *Cancer Res*, 1997. **57**(14): p. 2856-9.
221. Gruver-Yates, A.L. and J.A. Cidlowski, *Tissue-specific actions of glucocorticoids on apoptosis: a double-edged sword*. *Cells*, 2013. **2**(2): p. 202-23.
222. Samardzija, M., et al., *Light stress affects cones and horizontal cells via rhodopsin-mediated mechanisms*. *Exp Eye Res*, 2019. **186**: p. 107719.
223. Sung, C.H., C.M. Davenport, and J. Nathans, *Rhodopsin mutations responsible for autosomal dominant retinitis pigmentosa. Clustering of functional classes along the polypeptide chain*. *J Biol Chem*, 1993. **268**(35): p. 26645-9.
224. DeCaluwe, G.L. and W.J. DeGrip, *Point mutations in bovine opsin can be classified in four groups with respect to their effect on the biosynthetic pathway of opsin*. *Biochem J*, 1996. **320 (Pt 3)**: p. 807-15.
225. Mendes, H.F., et al., *Mechanisms of cell death in rhodopsin retinitis pigmentosa: implications for therapy*. *Trends Mol Med*, 2005. **11**(4): p. 177-85.
226. Bales, K.L. and A.K. Gross, *Aberrant protein trafficking in retinal degenerations: The initial phase of retinal remodeling*. *Exp Eye Res*, 2016. **150**: p. 71-80.
227. Chen, J., et al., *Stable rhodopsin/arrestin complex leads to retinal degeneration in a transgenic mouse model of autosomal dominant retinitis pigmentosa*. *J Neurosci*, 2006. **26**(46): p. 11929-37.
228. Medscape, *Dexamethasone (Rx)*, in *Drugs & Diseases*. <https://reference.medscape.com/drug/decadron-dexamethasone-intensol-dexamethasone-342741>, 2019. (accessed 4 September 2019).
229. Chang-Lin, J.E., et al., *Pharmacokinetics and pharmacodynamics of a sustained-release dexamethasone intravitreal implant*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011. **52**(1): p. 80-6.

230. Altunel, O., et al., *Evaluation of foveal photoreceptor layer in eyes with macular edema associated with branch retinal vein occlusion after ozurdex treatment*. *Int Ophthalmol*, 2017. **37**(2): p. 333-339.
231. Iacono, P., et al., *Morphological and functional changes in recalcitrant diabetic macular oedema after intravitreal dexamethasone implant*. *Br J Ophthalmol*, 2017. **101**(6): p. 791-795.
232. Medscape, *Progesterone micronized (Rx)*, in *Drugs & Diseases*. <https://reference.medscape.com/drug/prometrium-progesterone-micronized-342792>, 2019. (accessed 4 September 2019).
233. Stanczyk, F.Z., et al., *Progestogens used in postmenopausal hormone therapy: differences in their pharmacological properties, intracellular actions, and clinical effects*. *Endocr Rev*, 2013. **34**(2): p. 171-208.
234. Brule, J., et al., *Evidence of a possible impact of the menstrual cycle on the reproducibility of scotopic ERGs in women*. *Doc Ophthalmol*, 2007. **114**(3): p. 125-34.
235. Guarneri, P., et al., *Neurosteroidogenesis in rat retinas*. *J Neurochem*, 1994. **63**(1): p. 86-96.
236. Chen, M.J. and M.D. Creinin, *Mifepristone With Buccal Misoprostol for Medical Abortion: A Systematic Review*. *Obstet Gynecol*, 2015. **126**(1): p. 12-21.
237. Mittal, S., *Emergency contraception: which is the best?* *Minerva Ginecol*, 2016. **68**(6): p. 687-99.
238. Nielsen, J.S. and L.M. Jampol, *Oral mifepristone for chronic central serous chorioretinopathy*. *Retina*, 2011. **31**(9): p. 1928-36.
239. Rojas, P.A., et al., *Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogesterin Responsiveness*. *J Natl Cancer Inst*, 2017. **109**(7): p. djw317.
240. Hajkova, D., et al., *Proteomic Changes in the Photoreceptor Outer Segment upon Intense Light Exposure*. *J Proteome Res*, 2010. **9**(2): p. 1173-1181.
241. Chang, Q., M.E. Peter, and M.A. Grassi, *Fas ligand-Fas signaling participates in light-induced apoptotic death in photoreceptor cells*. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2012. **53**(7): p. 3703-16.
242. Reichenhofer, M., et al., *Multiple programmed cell death pathways are involved in N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor degeneration*. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2015. **253**(5): p. 721-31.
243. Prado Spalm, F.H., et al., *Ceramide Induces the Death of Retina Photoreceptors Through Activation of Parthanatos*. *Mol Neurobiol.*, 2018.
244. Bertucci, P.Y., et al., *Progesterone receptor induces bcl-x expression through intragenic binding sites favoring RNA polymerase II elongation*. *Nucleic Acids Res*, 2013. **41**(12): p. 6072-86.
245. Morrissy, S.J., et al., *Differential Regulation of Bcl-xL Gene Expression by Corticosterone, Progesterone, and Retinoic Acid*. *J Biochem Mol Toxicol*, 2016. **30**(6): p. 309-16.
246. Zaman, F., et al., *Dexamethasone differentially regulates Bcl-2 family proteins in human proliferative chondrocytes: role of pro-apoptotic Bid*. *Toxicol Lett*, 2014. **224**(2): p. 196-200.
247. Wang, Y., et al., *Progesterone Inhibits Apoptosis in Fetal Membranes by Altering Expression of Both Pro- and Antiapoptotic Proteins*. *Reprod Sci.*, 2018. **25**(8): p. 1161-1167.

248. Heidari, N., et al., *Glucocorticoid-mediated BIM induction and apoptosis are regulated by Runx2 and c-Jun in leukemia cells*. Cell Death Dis, 2012. **3**(7): p. e349.
249. Lu, N.Z., et al., *Selective regulation of bone cell apoptosis by translational isoforms of the glucocorticoid receptor*. Mol Cell Biol, 2007. **27**(20): p. 7143-60.
250. Edlich, F., et al., *Bcl-x(L) retrotranslocates Bax from the mitochondria into the cytosol*. Cell, 2011. **145**(1): p. 104-16.
251. Herr, I., et al., *Glucocorticoid cotreatment induces apoptosis resistance toward cancer therapy in carcinomas*. Cancer Res, 2003. **63**(12): p. 3112-20.
252. Wyse Jackson, A.C., et al., *Progesterone analogue protects stressed photoreceptors via bFGF-mediated calcium influx*. Eur J Neurosci, 2016. **44**(12): p. 3067-3079.
253. Bleicken, S. and A.J. Garcia-Saez, *Bcl-2 proteins: Unraveling the details of a complex and dynamic network*. Mol Cell Oncol, 2017. **5**(1): p. e1384880.
254. Kwok, M.C., et al., *Proteomics of photoreceptor outer segments identifies a subset of SNARE and Rab proteins implicated in membrane vesicle trafficking and fusion*. Mol Cell Proteomics, 2008. **7**(6): p. 1053-1066.
255. Grimm, C., et al., *Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration*. Nat Genet, 2000. **25**(1): p. 63-6.
256. Keller, C., et al., *Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration*. Ophthalmol. Vis. Sci., 2001. **42**: p. 476-480.
257. Gallina, D., C. Zelinka, and A.J. Fischer, *Glucocorticoid receptors in the retina, Müller glia and the formation of Müller glia-derived progenitors*. Development, 2014. **141**(17): p. 3340-3351.
258. Wahlin, K.J., et al., *Neurotrophic factors cause activation of intracellular signaling pathways in Muller cells and other cells of the inner retina, but not photoreceptors*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(3): p. 927-36.
259. Joly, S., et al., *Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors in vivo*. J Neurosci, 2008. **28**(51): p. 13765-74.
260. Vazquez-Chona, F.R., et al., *Proliferative reactive gliosis is compatible with glial metabolic support and neuronal function*. BMC Neurosci, 2011. **12**: p. 98.
261. Gallina, D., et al., *Activation of glucocorticoid receptors in Müller glia is protective to retinal neurons and suppresses microglial reactivity*. Exp Neurol, 2015. **273**: p. 114-125.
262. Gray, J.D., et al., *Genomic and epigenomic mechanisms of glucocorticoids in the brain*. Nat Rev Endocrinol., 2017. **13**(11): p. 661-673.
263. Slepak, V.Z. and J.B. Hurley, *Mechanism of light-induced translocation of arrestin and transducin in photoreceptors: interaction-restricted diffusion*. IUBMB Life, 2008. **60**(1): p. 2-9.
264. Wnuk, A. and M. Kajta, *Steroid and Xenobiotic Receptor Signalling in Apoptosis and Autophagy of the Nervous System*. Int J Mol Sci, 2017. **18**(11): p. 2394.

265. Peluso, J.J., et al., *Progesterone activates a progesterone receptor membrane component 1-dependent mechanism that promotes human granulosa/luteal cell survival but not progesterone secretion*. J Clin Endocrinol Metab, 2009. **94**(7): p. 2644-2649.
266. Molina, M.L., et al., *LPS regulates the expression of glucocorticoid receptor α and β isoforms and induces a selective glucocorticoid resistance in vitro*. J Inflamm (Lond), 2017. **14**: p. 22-22.
267. Daruich, A., et al., *Central serous chorioretinopathy: Recent findings and new physiopathology hypothesis*. Prog Retin Eye Res, 2015. **48**: p. 82-118.
268. Noh, G.M., et al., *Central Serous Chorioretinopathy Following Intravitreal Dexamethasone Implant*. Korean J Ophthalmol, 2019. **33**(4): p. 392-394.
269. Georgalas, I., et al., *Central serous chorioretinopathy in the fellow eye as a complication of intravitreal dexamethasone implant for the treatment of Irvine-Gass syndrome*. Clin Exp Optom, 2016. **99**(6): p. 601-603.
270. Winneker, R.C., D. Bitran, and Z. Zhang, *The preclinical biology of a new potent and selective progestin: trimegestone*. Steroids, 2003. **68**(10-13): p. 915-20.
271. Zhang, Y., et al., *High-glucose induces retinal pigment epithelium mitochondrial pathways of apoptosis and inhibits mitophagy by regulating ROS/PINK1/Parkin signal pathway*. Biomed Pharmacother, 2019. **111**: p. 1315-1325.
272. Kuppermann, B.D., L.C. Zacharias, and M.C. Kenney, *Steroid differentiation: the safety profile of various steroids on retinal cells in vitro and their implications for clinical use (an American Ophthalmological Society thesis)*. Trans Am Ophthalmol Soc, 2014. **112**: p. 116-41.
273. Spang, C., J. Chen, and L.J. Backman, *The tenocyte phenotype of human primary tendon cells in vitro is reduced by glucocorticoids*. BMC Musculoskelet Disord, 2016. **17**(1): p. 467.
274. Chang, C., A. Greenspan, and M.E. Gershwin, *The pathogenesis, diagnosis and clinical manifestations of steroid-induced osteonecrosis*. J Autoimmun, 2020: p. 102460.
275. Xing, W., et al., *Glucocorticoids induce apoptosis by inhibiting microRNA cluster miR-17-92 expression in chondrocytic cells*. Mol Med Rep, 2014. **10**(2): p. 881-6.
276. Li, H., et al., *Glucocorticoid receptor and sequential P53 activation by dexamethasone mediates apoptosis and cell cycle arrest of osteoblastic MC3T3-E1 cells*. PLoS One, 2012. **7**(6): p. e37030.
277. Petersen, A., et al., *Effects of dexamethasone on human lens epithelial cells in culture*. Mol Vis, 2008. **14**: p. 1344-1352.
278. Whorwood, C.B., et al., *Regulation of glucocorticoid receptor alpha and beta isoforms and type I 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase expression in human skeletal muscle cells: a key role in the pathogenesis of insulin resistance?* J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(5): p. 2296-308.
279. Valastyan, S. and R.A. Weinberg, *Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms*. Cell, 2011. **147**(2): p. 275-92.
280. Tarau, I.S., et al., *The Cytoskeleton of the Retinal Pigment Epithelium: from Normal Aging to Age-Related Macular Degeneration*. Int J Mol Sci, 2019. **20**(14): p. 3578.

281. Zhang, X., A. Clark, and T. Yorio, *Heat shock protein 90 is an essential molecular chaperone for nuclear transport of glucocorticoid receptor beta*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2006. **47**(2): p. 700-708.
282. Harrell, J.M., et al., *Evidence for glucocorticoid receptor transport on microtubules by dynein*. J Biol Chem, 2004. **279**(52): p. 54647-54.
283. Rocha-Viegas, L., et al., *Glucocorticoids uncover a critical role for ASH2L on BCL-X expression regulation in leukemia cells*. Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech, 2020. **1863**(1): p. 194475.
284. Rosati, R., et al., *Clinical association of progesterone receptor isoform A with breast cancer metastasis consistent with its unique mechanistic role in preclinical models*. BMC Cancer, 2020. **20**(1): p. 512.
285. Liu, R., X. Li, and X. Zhang, *Dexmedetomidine protects high-glucose induced apoptosis in human retinal pigment epithelial cells through inhibition on p75(NTR)*. Biomed Pharmacother, 2018. **106**: p. 466-471.
286. Zhang, J., et al., *Effects of p75 neurotrophin receptor on regulating hypoxia-induced angiogenic factors in retinal pigment epithelial cells*. Mol Cell Biochem, 2015. **398**(1-2): p. 123-34.
287. Du, J., et al., *Reductive carboxylation is a major metabolic pathway in the retinal pigment epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016. **113**(51): p. 14710-14715.
288. Karim, M.R., et al., *Investigating AKT activation and autophagy in immunoproteasome-deficient retinal cells*. PLoS One, 2020. **15**(4): p. e0231212.
289. Pinelli, R., et al., *A Re-Appraisal of Pathogenic Mechanisms Bridging Wet and Dry Age-Related Macular Degeneration Leads to Reconsider a Role for Phytochemicals*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(15).
290. Hallermalm, K., et al., *Tumor necrosis factor-alpha induces coordinated changes in major histocompatibility class I presentation pathway, resulting in increased stability of class I complexes at the cell surface*. Blood, 2001. **98**(4): p. 1108-15.
291. Loukissa, A., et al., *Control of LMP7 expression in human endothelial cells by cytokines regulating cellular and humoral immunity*. Cytokine, 2000. **12**(9): p. 1326-30.
292. Chong, D.Y., et al., *Interleukin-6 as a photoreceptor neuroprotectant in an experimental model of retinal detachment*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008. **49**(7): p. 3193-200.
293. Vanden Berghe, T., et al., *Necrosis is associated with IL-6 production but apoptosis is not*. Cell Signal, 2006. **18**(3): p. 328-35.
294. Dhuriya, Y.K. and D. Sharma, *Necroptosis: a regulated inflammatory mode of cell death*. J Neuroinflammation, 2018. **15**(1): p. 199.
295. Peng, J.J., et al., *Involvement of regulated necrosis in blinding diseases: Focus on necroptosis and ferroptosis*. Exp Eye Res, 2020. **191**: p. 107922.
296. Anand, N., et al., *Dysregulated iron metabolism in C. elegans catp-6/ATP13A2 mutant impairs mitochondrial function*. Neurobiol Dis, 2020. **139**: p. 104786.
297. van Veen, S., et al., *ATP13A2 deficiency disrupts lysosomal polyamine export*. Nature, 2020. **578**(7795): p. 419-424.

298. Biswal, M.R., et al., *Systemic treatment with a 5HT1a agonist induces anti-oxidant protection and preserves the retina from mitochondrial oxidative stress*. *Exp Eye Res*, 2015. **140**: p. 94-105.
299. Johnson, L.V., et al., *Cell culture model that mimics drusen formation and triggers complement activation associated with age-related macular degeneration*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(45): p. 18277-82.
300. Cao, G.F., et al., *Rapamycin sensitive mTOR activation mediates nerve growth factor (NGF) induced cell migration and pro-survival effects against hydrogen peroxide in retinal pigment epithelial cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011. **414**(3): p. 499-505.
301. Zhang, R., D.N. Hu, and R. Rosen, *Beta-adrenergic agonist protects retinal pigment epithelium against hydroxychloroquine toxicity via cAMP-PKA signal pathway*. *Int J Ophthalmol*, 2020. **13**(4): p. 552-559.
302. Garshott, D.M., et al., *Distinct regulatory ribosomal ubiquitylation events are reversible and hierarchically organized*. *Elife*, 2020. **9**.
303. Li, Y., et al., *RNA Sequencing Uncovers Molecular Mechanisms Underlying Pathological Complete Response to Chemotherapy in Patients with Operable Breast Cancer*. *Med Sci Monit*, 2017. **23**: p. 4321-4327.
304. Jin, L., et al., *Activated CRH receptors inhibit autophagy by repressing conversion of LC3BI to LC3BII*. *Cell Signal*, 2019. **58**: p. 119-130.
305. Kaarniranta, K., et al., *Mechanisms of mitochondrial dysfunction and their impact on age-related macular degeneration*. *Prog Retin Eye Res*, 2020: p. 100858.
306. Amodio, G., et al., *Endoplasmic reticulum stress reduces COPII vesicle formation and modifies Sec23a cycling at ERESs*. *FEBS Lett*, 2013. **587**(19): p. 3261-6.
307. Saha, S., et al., *Autophagy in health and disease: A comprehensive review*. *Biomed Pharmacother*, 2018. **104**: p. 485-495.
308. Skeldal, S. and E. Coulson, *Signaling and Function of Death Receptors of the Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily*. *Encyclopedia of Cell Biology*, 2016.
309. Herbst, S., et al., *LRRK2 activation controls the repair of damaged endomembranes in macrophages*. *Embo j*, 2020: p. e104494.
310. Kiviluoto, S., et al., *Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptors during endoplasmic reticulum stress*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(7): p. 1612-24.
311. Kania, E., et al., *IP(3) Receptor-Mediated Calcium Signaling and Its Role in Autophagy in Cancer*. *Front Oncol*, 2017. **7**: p. 140.
312. Fink, E.E., et al., *XBP1-KLF9 Axis Acts as a Molecular Rheostat to Control the Transition from Adaptive to Cytotoxic Unfolded Protein Response*. *Cell Rep*, 2018. **25**(1): p. 212-223.e4.
313. Gkogkas, C., N. Sonenberg, and M. Costa-Mattioli, *Translational control mechanisms in long-lasting synaptic plasticity and memory*. *J Biol Chem*, 2010. **285**(42): p. 31913-7.
314. Kasetti, R.B., et al., *Transforming growth factor β 2 (TGF β 2) signaling plays a key role in glucocorticoid-induced ocular hypertension*. *J Biol Chem*, 2018. **293**(25): p. 9854-9868.

315. Martin, P.J., et al., *Cellular response and extracellular vesicles characterization of human macrophages exposed to fine atmospheric particulate matter*. Environ Pollut, 2019. **254**(Pt A): p. 112933.
316. Ravanan, P., I.F. Srikumar, and P. Talwar, *Autophagy: The spotlight for cellular stress responses*. Life Sci, 2017. **188**: p. 53-67.
317. Rubinsztein, D.C., G. Mariño, and G. Kroemer, *Autophagy and aging*. Cell, 2011. **146**(5): p. 682-95.
318. Vicencio, J.M., et al., *The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1*. Cell Death Differ, 2009. **16**(7): p. 1006-17.
319. Maiuri, M.C., et al., *Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1*. Embo j, 2007. **26**(10): p. 2527-39.
320. Xu, G., et al., *Ubiquitin-specific peptidase 21 inhibits tumor necrosis factor alpha-induced nuclear factor kappaB activation via binding to and deubiquitinating receptor-interacting protein 1*. J Biol Chem, 2010. **285**(2): p. 969-78.
321. Mylka, V., et al., *The autophagy receptor SQSTM1/p62 mediates anti-inflammatory actions of the selective NR3C1/glucocorticoid receptor modulator compound A (CpdA) in macrophages*. Autophagy, 2018. **14**(12): p. 2049-2064.
322. Libermann, T.A. and D. Baltimore, *Activation of interleukin-6 gene expression through the NF-kappa B transcription factor*. Mol Cell Biol, 1990. **10**(5): p. 2327-34.
323. Webster, J.C., et al., *Proinflammatory cytokines regulate human glucocorticoid receptor gene expression and lead to the accumulation of the dominant negative beta isoform: a mechanism for the generation of glucocorticoid resistance*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(12): p. 6865-70.
324. Lingeshwar, P., et al., *A study on the involvement of GABA-transaminase in MCT induced pulmonary hypertension*. Pulm Pharmacol Ther, 2016. **36**: p. 10-21.
325. Erdö, S.L. and F. Amenta, *Specific, vascular localization of GABA-transaminase in the guinea pig lung*. Neurosci Lett, 1986. **68**(2): p. 202-6.
326. Ngo, D.H. and T.S. Vo, *An Updated Review on Pharmaceutical Properties of Gamma-Aminobutyric Acid*. Molecules, 2019. **24**(15).
327. Tsuji, F. and H. Aono, *Role of transient receptor potential vanilloid 1 in inflammation and autoimmune diseases*. Pharmaceuticals (Basel), 2012. **5**(8): p. 837-52.
328. Yang, F. and J. Zheng, *Understand spiciness: mechanism of TRPV1 channel activation by capsaicin*. Protein Cell, 2017. **8**(3): p. 169-177.
329. Martínez-García, M.C., et al., *Differential expression and localization of transient receptor potential vanilloid 1 in rabbit and human eyes*. Histol Histopathol, 2013. **28**(11): p. 1507-16.
330. Övey, İ.S. and M. Nazıroğlu, *Effects of homocysteine and memantine on oxidative stress related TRP cation channels in in-vitro model of Alzheimer's disease*. J Recept Signal Transduct Res, 2020: p. 1-11.
331. Kociok, N., et al., *The mRNA expression of cytokines and their receptors in cultured iris pigment epithelial cells: a comparison with retinal pigment epithelial cells*. Exp Eye Res, 1998. **67**(2): p. 237-50.

332. Mesquida, M., et al., *Modelling Macular Edema: The Effect of IL-6 and IL-6R Blockade on Human Blood-Retinal Barrier Integrity In Vitro*. *Transl Vis Sci Technol*, 2019. **8**(5): p. 32.
333. Sadanandam, A., et al., *Semaphorin 5A promotes angiogenesis by increasing endothelial cell proliferation, migration, and decreasing apoptosis*. *Microvasc Res*, 2010. **79**(1): p. 1-9.
334. Uhl, P.B., et al., *In situ cell surface proteomics reveals differentially expressed membrane proteins in retinal pigment epithelial cells during autoimmune uveitis*. *J Proteomics*, 2014. **109**: p. 50-62.
335. Sancho-Knapik, S., et al., *Hepatic Synaptotagmin 1 is involved in the remodelling of liver plasma- membrane lipid composition and gene expression in male Apoe-deficient mice consuming a Western diet*. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2020: p. 158790.
336. Saito, Y., et al., *Transient acceleration of autophagic degradation by pharmacological Nrf2 activation is important for retinal pigment epithelium cell survival*. *Redox Biol*, 2018. **19**: p. 354-363.
337. Song, Y., L. Huang, and J. Yu, *Effects of blueberry anthocyanins on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through Nrf2/HO-1 signaling*. *J Neuroimmunol*, 2016. **301**: p. 1-6.
338. Mohlin, C., et al., *A model to study complement involvement in experimental retinal degeneration*. *Ups J Med Sci*, 2018. **123**(1): p. 28-42.
339. Wang, H., et al., *Downregulation of PHF19 inhibits cell growth and migration in gastric cancer*. *Scand J Gastroenterol*, 2020: p. 1-7.
340. McDowell, G.A., et al., *Linkage of the gene for cystinosis to markers on the short arm of chromosome 17*. *Nature Genetics*, 1995. **10**(2): p. 246-248.
341. Sumayao, R., et al., *Lysosomal cystine accumulation promotes mitochondrial depolarization and induction of redox-sensitive genes in human kidney proximal tubular cells*. *J Physiol*, 2016. **594**(12): p. 3353-70.
342. Luciani, A., et al., *Defective autophagy degradation and abnormal tight junction-associated signaling drive epithelial dysfunction in cystinosis*. *Autophagy*, 2018. **14**(7): p. 1157-1159.
343. Loro, E., et al., *IL15RA is required for osteoblast function and bone mineralization*. *Bone*, 2017. **103**: p. 20-30.
344. Bulfone-Paus, S., et al., *Interleukin-15 protects from lethal apoptosis in vivo*. *Nat Med*, 1997. **3**(10): p. 1124-8.
345. Kumaki, N., et al., *Expression of interleukin-15 and its receptor by human fetal retinal pigment epithelial cells*. *Curr Eye Res*, 1996. **15**(8): p. 876-82.
346. Marciniak, S.J., et al., *CHOP induces death by promoting protein synthesis and oxidation in the stressed endoplasmic reticulum*. *Genes Dev*, 2004. **18**(24): p. 3066-77.
347. Lawrence, T., *The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2009. **1**(6): p. a001651.
348. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *NF-kB, the first quarter-century: remarkable progress and outstanding questions*. *Genes Dev*, 2012. **26**(3): p. 203-34.
349. Chen, L., et al., *Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs*. *Oncotarget*, 2018. **9**(6): p. 7204-7218.

350. Liu, Y. and Y. Ye, *Roles of p97-associated deubiquitinases in protein quality control at the endoplasmic reticulum*. *Curr Protein Pept Sci*, 2012. **13**(5): p. 436-46.
351. Høyer-Hansen, M., et al., *Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, and Bcl-2*. *Mol Cell*, 2007. **25**(2): p. 193-205.
352. Yang, H., et al., *ATF6 Is a Critical Determinant of CHOP Dynamics during the Unfolded Protein Response*. *iScience*, 2020. **23**(2): p. 100860.
353. Place, D.E. and T.D. Kanneganti, *Cell death-mediated cytokine release and its therapeutic implications*. *J Exp Med*, 2019. **216**(7): p. 1474-1486.
354. Urra, H., et al., *When ER stress reaches a dead end*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12): p. 3507-3517.
355. Kasai, S., et al., *Role of the ISR-ATF4 pathway and its cross talk with Nrf2 in mitochondrial quality control*. *J Clin Biochem Nutr*, 2019. **64**(1): p. 1-12.
356. Hirai, S., et al., *2-Phenyl-APB-144-Induced Retinal Pigment Epithelium Degeneration and Its Underlying Mechanisms*. *J Ocul Pharmacol Ther*, 2015. **31**(9): p. 570-84.
357. Sano, R. and J.C. Reed, *ER stress-induced cell death mechanisms*. *Biochim Biophys Acta*, 2013. **1833**(12): p. 3460-3470.
358. Gong, Y.N., et al., *ESCRT-III Acts Downstream of MLKL to Regulate Necroptotic Cell Death and Its Consequences*. *Cell*, 2017. **169**(2): p. 286-300.e16.
359. Sosna, J., et al., *TNF-induced necroptosis and PARP-1-mediated necrosis represent distinct routes to programmed necrotic cell death*. *Cell Mol Life Sci*, 2014. **71**(2): p. 331-48.
360. Gong, Y., et al., *The role of necroptosis in cancer biology and therapy*. *Mol Cancer*, 2019. **18**(1): p. 100.
361. Mutsaers, H.A. and R. Tofighi, *Dexamethasone enhances oxidative stress-induced cell death in murine neural stem cells*. *Neurotox Res*, 2012. **22**(2): p. 127-37.
362. Zhou, J.Y., et al., *Corticosterone exerts immunostimulatory effects on macrophages via endoplasmic reticulum stress*. *Br J Surg*, 2010. **97**(2): p. 281-93.
363. Costantini, D., V. Marasco, and A.P. Møller, *A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates*. *J Comp Physiol B*, 2011. **181**(4): p. 447-56.
364. Yuan, H.J., et al., *Glucocorticoids impair oocyte competence and trigger apoptosis of ovarian cells via activating the TNF- α system*. *Reproduction*, 2020. **160**(1): p. 129-140.
365. Gabbia, D., et al., *Dexamethasone counteracts hepatic inflammation and oxidative stress in cholestatic rats via CAR activation*. *PLoS One*, 2018. **13**(9): p. e0204336.
366. Zmijewski, M.A., R.K. Sharma, and A.T. Slominski, *Expression of molecular equivalent of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in adult retinal pigment epithelium*. *J Endocrinol*, 2007. **193**(1): p. 157-69.
367. Barber, A.J., et al., *Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin*. *J Clin Invest*, 1998. **102**(4): p. 783-91.

368. Énzsöly, A., et al., *Novel features of neurodegeneration in the inner retina of early diabetic rats*. *Histol Histopathol*, 2015. **30**(8): p. 971-85.