



UNIVERSIDAD
AUSTRAL

Facultad de Ciencias Biomédicas

**ENDOTELINAS Y GLUCOCORTICOIDES EN LAS
ENFERMEDADES DE LA RETINA**

Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Lic. Marisa Angélica Cubilla

Pilar, Buenos Aires, 2012

UNIVERSIDAD AUSTRAL

Facultad de Ciencias Biomédicas

**ENDOTELINAS Y GLUCOCORTICOIDES EN LAS
ENFERMEDADES DE LA RETINA**

Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas

Lic. Marisa Angélica Cubilla

Directora: Dra. Angela M. Suburo

Medicina Celular y Molecular

Pilar, Buenos Aires, 2012

AGRADECIMIENTOS

A mi familia.

A la Universidad Austral. Especialmente a la Facultad de Ciencias Biomédicas.

A la Dra. Angela Suburo por dirigir esta tesis.

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

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

A mis compañeros de trabajo.

ÍNDICE

Resumen

Propósito

El propósito de esta tesis fue investigar algunos de los mecanismos que protegen a los fotorreceptores. Trabajos anteriores de nuestro laboratorio señalaron el compromiso del sistema endotelinérgico en la degeneración de la retina inducida por luz. Otros grupos demostraron que, en el ratón, la expresión de los genes de endotelina-2 (Edn2), factor inhibidor de la leucemia (Lif) y factor de crecimiento fibroblástico 2 (Fgf2) integraban una respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores. Por otra parte, se sabe que los glucocorticoides pueden proteger a los fotorreceptores expuestos a niveles no fisiológicos de iluminación. Dado que en otros tejidos se conocen interacciones entre los glucocorticoides y la expresión de endotelinas, pensamos que la administración de glucocorticoides o la inhibición de su receptor podrían dar información sobre el funcionamiento de la respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores.

Objetivos

1. Estudiar la distribución del receptor de glucocorticoides (GR) y de sus formas fosforiladas (p-Ser 211-GR y p-Ser 203-GR) en la retina normal y después de intervenciones farmacológicas que modifican la señalización dependiente de glucocorticoides.
2. Determinar si el bloqueo de efectos provoca lesiones de dichas células. La confirmación de esta hipótesis nos permitiría contar con un modelo para evaluar las modificaciones producidas por un agonista (dexametasona, DEX) y un antagonista (mifepristona, MFP) sobre los niveles de proteínas involucradas en la muerte celular programada, los factores de supervivencia y el sistema endotelinérgico.
3. Comparar la respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores inducido por MFP, con el patrón de la respuesta al daño de los fotorreceptores provocado por exposición a la luz.

Resultados y conclusiones

Todos los estudios fueron realizados en ratones de la cepa Balb-c, machos. La localización inmunohistoquímica de los GRs y de sus formas fosforiladas sugirió que,

además de la conocida acción genómica de los glucocorticoides, estos podrían también ejercer acciones no genómicas sobre los componentes de la cadena de fototransducción.

En condiciones basales, DEX aumentó la proteína Bcl-X_L, una molécula anti-apoptótica. Por el contrario, MFP indujo daño selectivo de los fotorreceptores, con descenso de Bcl-X_L, aparición de un ejecutor de la muerte, la caspasa-3 clivada (CC-3), la fragmentación del ADN (TUNEL) y la activación de su reparación. Finalmente, desapareció un número significativo de fotorreceptores. Al correlacionar estos estados con la expresión de endotelinas (Edn1, Edn2 y Edn3), sus receptores (Ednra y Ednrb), Fgf2 y Lif distinguimos dos modos de respuesta. Uno de mantenimiento, dependiente de glucocorticoides, con aumento en la expresión de Edn1, Edn3, Ednra, Ednb y Fgf2; y un modo de rescate, bloqueado por los corticoides y activado por MFP, con aumento en la expresión de Edn2, Lif, y Fgf2. Este último factor parece ser el efector común de ambos modos de respuestas.

En la degeneración inducida por luz, el patrón de activación de estas moléculas sugirió la activación de ambos modos de respuesta. En las retinas protegidas por DEX, los resultados fueron compatibles con la sobreactivación del modo de mantenimiento y bloqueo del modo de rescate. En las retinas expuestas a la luz, la administración de MFP agravó el daño, es decir, que los mecanismos de supervivencia no eran funcionales. Aunque en estas retinas aparecía activado el modo de rescate, la expresión de Fgf2 estaba reducida. La falla del modo de rescate puede atribuirse a un defecto en la señalización, ya que MFP también determinó el descenso en la expresión de los receptores endotelinérgicos.

Nuestros resultados confirman el papel esencial de los glucocorticoides para el mantenimiento de los fotorreceptores. También muestran que el sistema endotelinérgico es un intermediario indispensable para la función protectora de los glucocorticoides.

Abstract

Abreviaturas

AdrX, adrenalectomía

CC-3, caspasa-3 clivada

CCG, capa de células ganglionares

CNE, capa nuclear externa

CNO, capa del nervio óptico

CPE, capa plexiforme externa

CPI, capa nuclear interna

CPI, capa plexiforme interna

Cor, coroides

DEX, dexametasona

Edn1, gen murino de ET-1

EDN1, gen humano de ET-1

EDN2, gen humano de ET-2

Edn2, gen murino de ET-2

EDN3, gen humano de ET-3

Edn3, gen murino de ET-3

Ednra, gen murino de ET_A

Ednrb, gen murino de ET_B

EP, epitelio pigmentario

ET-1, endotelina 1

ET-2, endotelina 2

ET-3, endotelina 3

ET_A, receptor endotelinérgico de tipo A

ET_B, receptor endotelinérgico de tipo B

Fgf2, gen murino de FGF2

FGF2, factor de crecimiento fibroblástico de tipo 2

Gapdh, gen murino de gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa

GAPDH, gliceraldehído 3-fosfato dehidrogenasa

GFAP, proteína glial fibrilar ácida

GS, glutamino sintasa

Lif, gen murino del leukemia inhibitory factor

LIF, leukemia inhibitory factor

MFP, mifepristona (RU486)

MLE, membrana limitante externa

SE, segmento externo

SI, segmento interno

VHC, vehículo

Capítulo 1

Finalidad y fundamentos de esta tesis

Finalidad

Esta tesis intenta aportar información original sobre los mecanismos de supervivencia de las células fotorreceptoras de la retina. Estas células son altamente vulnerables a los efectos estresantes de su propio metabolismo, que es muy elevado, y de su prolongada exposición a la radiación luminosa (Graymore, 1959; Winkler, 1981; Lamb, 2009). Se conoce que la retina produce moléculas neuroprotectoras capaces de aumentar la resistencia de las células fotorreceptoras a distintos agentes nocivos. Trabajos anteriores de nuestro laboratorio demostraron la participación de las endotelinas en estos mecanismos de supervivencia, mientras que el papel de los glucocorticoides como protectores de los fotorreceptores es un fenómeno ampliamente estudiado (Organisciak y Vaughan, 2010) y las interacciones entre endotelinas y glucocorticoides constituyen la base molecular de la fisiopatología en diversas enfermedades (Nickel y col, 2009). Por lo tanto, razonamos que el análisis de las posibles interacciones de las endotelinas con los glucocorticoides en la retina podría clarificar el rol de estas moléculas en la protección de los fotorreceptores. El objetivo general de esta tesis consiste entonces, en determinar el efecto de los glucocorticoides sobre la expresión de las endotelinas y otros factores neuroprotectores bajo distintas condiciones experimentales. A continuación, explicaremos los fundamentos de nuestras hipótesis y los objetivos específicos derivados de las mismas.

Fundamentos

Características generales de la retina

Estructura

La retina es un derivado del diencefalo, es decir, una parte del sistema nervioso central (SNC), que recibe información luminosa del medio exterior y la proyecta hacia el cerebro. Está formada por dos láminas estrechamente adheridas: una interna, la retina neural (RN) y otra externa, el epitelio pigmentario (EP) (Fig. 1.1).

La RN contiene diversos tipos celulares. Las neuronas de la retina son: los fotorreceptores (conos y bastones), las células bipolares, las células horizontales, las células amacrinas y las células ganglionares. A estos se agregan los tres tipos gliales: las células de Müller, los astrocitos y la microglia.

Las células retinales se organizan en capas o estratos: las capas nucleares contienen los cuerpos celulares, mientras que los contactos sinápticos se ubican en las capas plexiformes (Figs. 1.1 y 1.2). Los cuerpos celulares de los conos y bastones se encuentran en la capa nuclear externa (CNE), mientras que la capa nuclear interna (CNI) contiene los cuerpos de las células horizontales, bipolares y amacrinas y de Müller. Los cuerpos de las células ganglionares se ubican cerca de la superficie vítrea, en la capa del mismo nombre (CCG), que además incluye un número importante de amacrinas desplazadas. Por dentro de la CCG se encuentra la capa de fibras del nervio óptico (CNO). En la capa plexiforme externa (CPE) se encuentran los pedículos de los fotorreceptores que forman la tríada sináptica con las prolongaciones de las células bipolares y horizontales (Dacey, 1999). En la capa plexiforme interna (CPI) es donde los terminales de las células bipolares y amacrinas contactan con las dendritas de las células ganglionares (Kolb, 1995a).

Las células del EP forman un epitelio cúbico simple, ubicado entre los segmentos externos de los fotorreceptores y la coroides. Las células del EP deben su nombre a los gránulos de melanina que llenan el citoplasma, tanto en el cuerpo celular como en las prolongaciones ubicadas entre los segmentos externos. Este pigmento recibe toda la luz no absorbida por los segmentos externos. El EP forma la barrera hemato-retinal externa, que controla los intercambios moleculares entre la circulación coroidea y el espacio subretinal. Además, participa en el ciclo visual, fagocita los discos gastados del segmento externo de los fotorreceptores y contribuye a la producción de la matriz interfotorreceptora (Kolb, 1995b).

Células fotorreceptoras y fototransducción

Los fotorreceptores se diferencian longitudinalmente en cuatro regiones: segmento externo, segmento interno, cuerpo celular y terminal sináptico. El segmento externo contiene el pigmento visual para la conversión de la luz en energía neuroquímica,

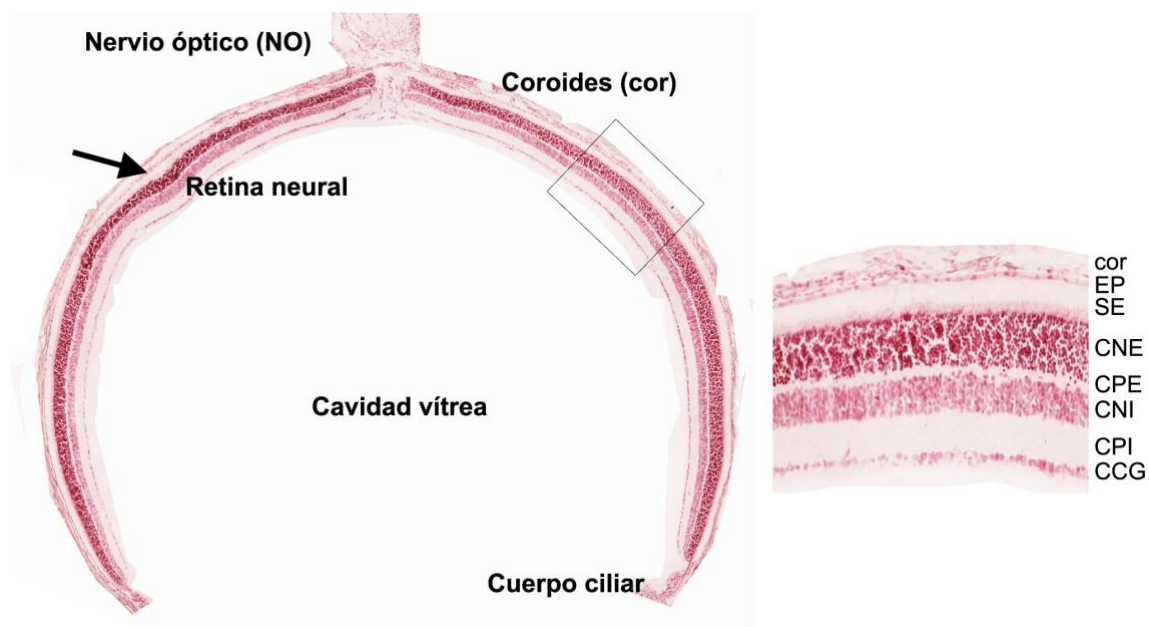


Figura 1.1. A. Corte meridional de una retina de ratón Balb-c, donde los núcleos celulares fueron coloreados con Rojo Neutro. Se observa el nervio óptico (NO) extraocular, que se continúa en la porción intrarretiniana o papila del del NO. Por fuera de la retina se encuentra una capa vascular, la coroides (cor), y el epitelio pigmentario (EP), marcado con una flecha. B. La zona del recuadro se muestra a mayor magnificación para observar la coroides, el EP y las capas nucleares y sinápticas de la retina neural: segmentos externos (SE), Capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI), capa de células ganglionares (CCG).

mientras que el segmento interno incluye el aparato metabólico. Ambos están conectados por un cilio rodeado por una delgada capa citoplasmática (Tasman, 2002). La principal diferencia estructural entre bastones y conos se encuentra en la forma del segmento externo, que en los bastones es largo y delgado, mientras que en los conos es grueso, más corto y posee un extremo externo afilado (Fig. 1.2).

Los dos tipos de fotorreceptores, los bastones y los conos, están especializados para distintas condiciones de iluminación. Los bastones son altamente sensibles y se activan con bajos niveles de iluminación (visión escotópica), mientras que los conos solo funcionan con altos niveles de iluminación (visión fotópica).

Los segmentos externos contienen una pila de discos membranosos aplanados. La membrana discal contiene una alta concentración del pigmento visual (25.000 moléculas/ μm^2), que en los bastones es la rodopsina. Los ratones tienen dos opsinas de conos, S y M, cuyas sensibilidades espectrales máximas son 360 y 508 nm, respectivamente. En el ratón, los conos pueden expresar simultáneamente ambos pigmentos, pero el pigmento M decrece en un gradiente dorsoventral (Applebury y col, 2000; Fu y Yau, 2007). Otras proteínas necesarias para la foto-transducción forman parte de la membrana discal o están asociadas a la misma. Por su parte, la membrana citoplasmática del segmento externo contiene proteínas que forman canales iónicos, necesarios para transformar la señal transducida por el fotopigmento en una señal eléctrica (Ryan, 2001; Tasman, 2002).

La rodopsina es un miembro de la superfamilia de proteínas receptoras de 7 pasos, acopladas a una proteína G (GPCRs). El 11-cis retinal es el ligando que está incorporado a esta proteína como grupo prostético. Cuando absorbe un fotón, el 11-cis retinal es isomerizado a todo-trans retinal generando un cambio conformacional en la proteína. La rodopsina así activada cataliza la unión de GTP a la subunidad α de la transducina (G), que es la proteína G heterotrimérica correspondiente, ubicada en la periferia de la membrana discal. La subunidad α se separa del del dímero $G\beta\gamma$ y estimula a la enzima efectora, la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos (PDE). Esta consta de dos subunidades catalíticas (α y β), y dos subunidades inhibitorias (γ). Dos moléculas G activadas se unen a las subunidades catalíticas de PDE, que se separan e hidrolizan el guanosín monofosfato cíclico (cGMP) (Fig. 1.3).

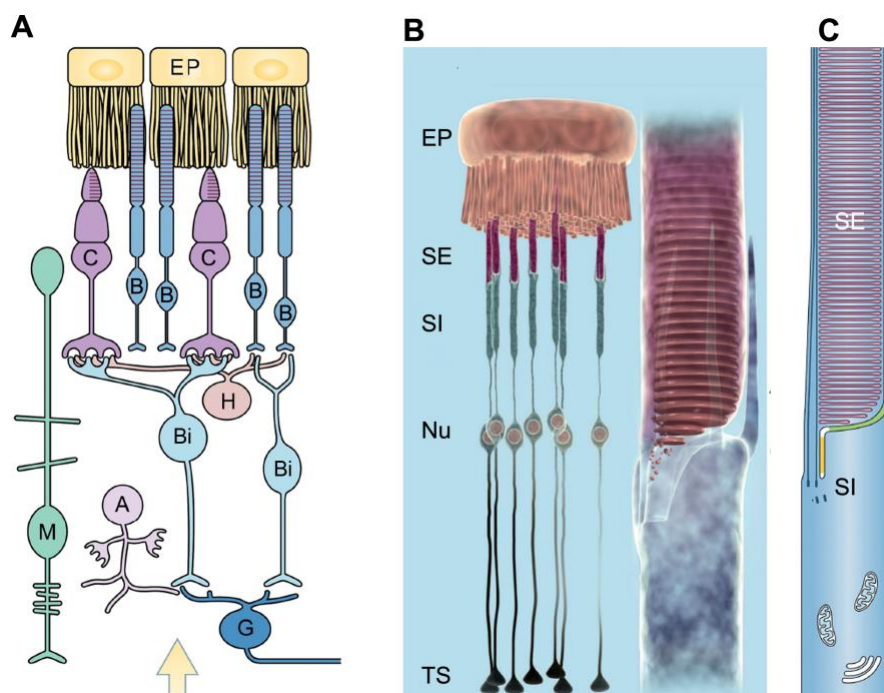


Figura 1.2. A. Esquema de los distintos tipos neuronales y gliales de la retina y los principales circuitos sinápticos. El camino de la luz está indicado por la flecha amarilla. EP, epitelio pigmentario; B, bastón; C, cono; B, célula bipolar; H, célula horizontal; A, célula amacrina; G, neurona ganglionar; M, células de Müller. B y C. Estructura de los bastones y sus distintas regiones. SE, segmento externo en contacto con el EP. SI, segmento interno con alto contenido de mitocondrias. Nu, núcleo ubicado en el cuerpo celular. TS, terminal sináptico. Modificado de (Sung y Chuang, 2010).

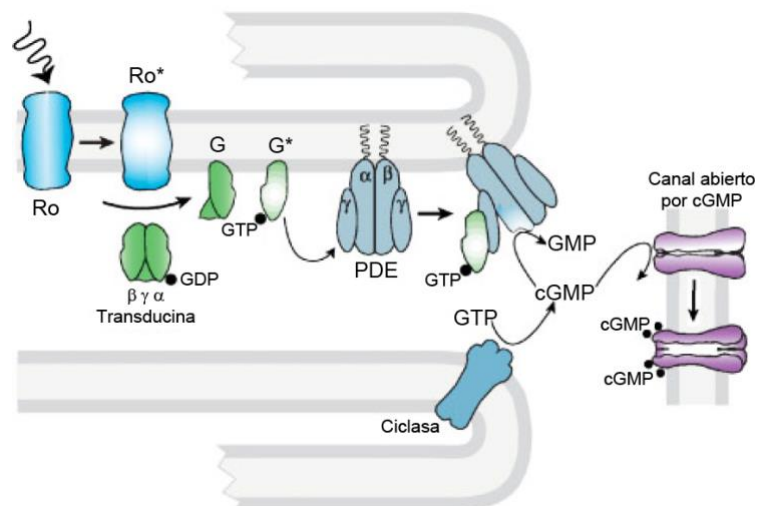


Figura 1.3. Pasos de la fototransducción. Después de absorber un fotón, la rodopsina activada (R^*) se contacta con moléculas de transducina, catalizando el intercambio de GDP por GTP y produciendo la forma activa $G\alpha$ -GTP (G^*). Dos G^* s se unen a subunidades inhibitorias de la fosfodiesterasa (PDE), facilitando la hidrólisis de cGMP y permitiendo el cierre de los canales de membrana abiertos por cGMP. Modificado de (Fain, 2006).

Las proteínas que intervienen en la fototransducción de los conos son semejantes a las de los bastones. Sin embargo, mientras que los bastones se saturan con luz moderadamente brillante, los conos pueden ajustar su sensibilidad y permanecen fotosensibles aún con iluminación muy brillante.

Células gliales de la retina

Entre las células gliales de la retina cabe destacar a las células de Müller y a los astrocitos. Las células de Müller constituyen el soporte estructural extendiéndose radialmente a través del espesor de la retina. El cuerpo de las mismas se encuentra en la CNI y sus prolongaciones externas se mantienen unidas entre sí y a su vez se unen con los fotorreceptores formando la membrana limitante externa (MLE). Las prolongaciones internas de las células de Müller forman la MLE, pero aquí no se dan uniones especializadas. (Miller y Dowling, 1970). Estas células gliales interactúan con los vasos de los plexos vasculares retinianos y contribuyen al establecimiento de la barrera hemato-retinal interna. Además cumplirían un rol en la neuroprotección y, probablemente regeneración, en caso de injuria de la retina (García y Vecino, 2003; Abraham y col, 2009).

Los astrocitos retinales se restringen a la capa de fibras nerviosas de la retina (Stone y Dreher, 1987). Actúan como intermediarios entre los vasos del plexo interno de la retina y las células ganglionares y sus axones (Stone y col, 1995). También podrían participar en la respuesta de la retina ante distintas formas de injuria (Torbidoni y col, 2005; Iribarne y col, 2008).

Irrigación de la retina

Las principales fuentes de suministro de sangre a la retina son la arteria central de la retina y los vasos sanguíneos coroideos. La coroides recibe la mayor parte (65-85%) del flujo sanguíneo ocular (Kolb, 1995b), imprescindible para el mantenimiento de los fotorreceptores y la retina externa. Para que los nutrientes lleguen a los fotorreceptores, estos deben atravesar la membrana basal de los capilares coroides, la membrana de Bruch y el EP (Foulds, 1990). Los mecanismos de cierre de este último epitelio, p.e. las uniones estrechas, controlan la cantidad y calidad de las moléculas que pueden llegar al espacio subretinal, por eso se describe que los capilares coroides y los fotorreceptores están separados por la barrera hematorretinal externa (Cunha-Vaz, 2004).

La arteria central de la retina ingresa por la papila del nervio óptico irrigando a la retina interna (Blanks y Johnson, 1986). Esta arteria origina las arteriolas radiales que a su vez forman tres plexos en el espesor de la retina: uno interno, asociado con las células ganglionares, un plexo intermedio, que se asocia con la CNI y por último un plexo externo en relación con la CPI. (Blanks y Johnson, 1986; Kolb, 1995b). Las células endoteliales de estos plexos poseen una alta resistencia al pasaje de moléculas y forman la barrera hematorretinal interna. Los pericitos, astrocitos, células de Müller que rodean a estos vasos son necesarios para el mantenimiento de esa barrera (Cunha-Vaz, 2004; Abbott y col, 2006).

Degeneraciones de la retina

Aunque la retina contiene varios tipos neuronales susceptibles de degeneración, el término degeneración de la retina suele reservarse para las enfermedades que determinan la muerte de los fotorreceptores. Estos trastornos constituyen un grupo heterogéneo, donde el defecto inicial ocurre a nivel de los fotorreceptores y/o el EP. Las fallas de los bastones son seguidas por un efecto perjudicial sobre los conos, la capa nuclear interna, las células ganglionares. Las causas son variadas, defectos genéticos en la función de los pigmentos visuales o en las interacciones con el EP, alteraciones metabólicas e inmunes, lesiones por estrés oxidativo, pero cualquiera de ellas puede llevar a la ceguera. La muerte de los fotorreceptores ocurre en enfermedades como la degeneración Macular Asociada a la Edad (DMAE) y las diversas formas de retinitis pigmentosa, aunque también contribuye a la pérdida de visión en la retinopatía diabética.

Degeneración de la retina y exposición a la luz

La retina es la única parte del SNC que está constantemente expuesta a la luz. Por lo tanto, enfrenta el desafío de proteger a una población neuronal postmitótica constantemente agredida por la injuria fotoquímica. Numerosos estudios en la retina humana y animal muestran que, después de la exposición a niveles excesivos de luz, los segmentos externos de los fotorreceptores son las estructuras más dañadas de la retina. Con exposiciones muy intensas también se observa lesión del epitelio pigmentario (EP) y la muerte de los fotorreceptores (Tso y La Piana, 1975; Lanum, 1978; Takahashi y col, 1997; Wu y col, 2006; Mandal, 2010; Organisciak y Vaughan, 2010). Cuando el

fotorreceptor sobrevive, el segmento externo puede ser regenerado (Guerin y col, 1993; Williams y col, 1998).

La luz solar fue considerada durante mucho tiempo un posible factor de riesgo para la DMAE (Young, 1988). Aunque pequeña, parece existir una asociación inversa entre maculopatía y catarata nuclear (Sperduto y col, 1981), que al impedir el paso de la luz reduciría la exposición de la retina. El exceso de iluminación es un factor ambiental asociado a la DMAE (Taylor y col, 1992), pero la magnitud de este riesgo es difícil de evaluar y está sujeta a controversias. No existen dudas, sin embargo, sobre la capacidad de la luz para acelerar la muerte de fotorreceptores afectados por alteraciones genéticas (Cideciyan y col, 1998; Mata y col, 2000; Cho y col, 2009).

Aun bajo condiciones normales de iluminación, el fotorreceptor está expuesto a un considerable estrés oxidativo, debido al gran requerimiento energético de la fototransducción visual (Kagan y col, 1973). La sobre-estimulación aumenta las especies reactivas del oxígeno, que lesionan el ADN y otras macromoléculas importantes para la supervivencia del fotorreceptor (Organisciak y Vaughan, 2010; Rodriguez-Rocha y col, 2011).

Degeneración experimental inducida por iluminación excesiva

La injuria por luz se utiliza frecuentemente para el estudio de la degeneración retinal (Kuwabara y Gorn, 1968) y produce la muerte de los fotorreceptores por apoptosis (Wenzel y col, 2005). En los modelos de injuria fótica, la presencia del pigmento visual rodopsina es esencial mediador de la señal de muerte (Grimm y col, 2000b). La lesión comienza en el segmento externo y progresa hacia las regiones más internas de la célula. Una vez lesionado el segmento interno se induce la muerte apoptótica del fotorreceptor (Sykes y col, 1981). La sensibilidad a la injuria luminosa y los mecanismos de muerte celular varían según los niveles de iluminación y el tiempo de exposición. Por ejemplo, cuando la exposición comienza durante la etapa de oscuridad, el daño es mayor que cuando comienza durante el día (Vaughan y col, 2002).

En la muerte de los fotorreceptores inducida se activan distintos sistemas de proteasas (Lohr y col, 2006; Kanan y col, 2007). La participación de las caspasas ha sido ampliamente demostrada (Grimm y col, 2000a; Torbidoni y col, 2006; Perche y col, 2007;2008), pero también intervienen calpaina (Imai y col, 2010), AIF (apoptosis-

inducing factor) (Hisatomi y col, 2001; Hisatomi y col, 2002; Hisatomi y col, 2008; Murakami y col, 2008).

Aunque la toxicidad de la luz se inicia con su absorción por la rodopsina del segmento externo, la respuesta de la cadena visual incluye la generación de especies reactivas del oxígeno que determinan daño foto-oxidativo (Demontis y col, 2002). Esta forma de estrés parece estar siempre involucrada en la muerte de los receptores determinada por la iluminación excesiva (Haruta y col, 2009; Imai y col, 2010; Oveson y col, 2010; O'Driscoll y col, 2011; Yamauchi y col, 2011).

En ciertas formas de degeneración por luz, la activación del factor de transcripción pro-apoptótico AP-1 constituye una señal esencial para la muerte, ya que su supresión por glucocorticoides o por deficiencia genética confiere total protección (Hao y col, 2002).

Protección de la retina

Teniendo en cuenta que la exposición es parte del hábitat y que los fotorreceptores son altamente sensibles a la radiación, debemos concluir que los mecanismos de auto-protección de las células visuales actuarían en forma constante. La membrana de los segmentos externos de los fotorreceptores se mantiene por una constante biogénesis acoplada con la fagocitosis, en el EP, de las membranas más antiguas (Young y Droz, 1968). Esta constante renovación de los segmentos externos permite eliminar en forma eficiente a las macromoléculas fotoquímicamente dañadas. El EP también recicla el ácido docosahexaenoico (DHA) y la vitamina A. La fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores estimula la síntesis, a partir del DHA, de la neuroprotectina D1 (NPD1). La síntesis de esta molécula también es activada por el estrés oxidativo. NPD1 puede gatillar las vías de señalización que modulan señales pro-apoptóticas y anti-apoptóticas (Bazan y col, 2010). Es decir, promueve cambios en la expresión de proteínas de la familia Bcl-2 (ver más adelante), aumentando la expresión de Bcl-2, Bcl-X_L y Bfl-1/A1 y disminuyendo la de Bad, Bak y Bid (Bazan y col, 2010).

Independientemente de la causa, la lesión de los fotorreceptores siempre determina la activación de las células de Müller (Bringmann y Reichenbach, 2001; Garcia y Vecino, 2003; Torbidoni y col, 2006). La activación presenta distintos grados, con consecuencias diversas. En primer término, las células gliales activadas producen factores de crecimiento u otras sustancias que promueven la supervivencia de los

fotorreceptores (Wahlin y col, 2000) (Joly y col, 2008; Vazquez-Chona y col, 2011), pero en otros casos pueden reducir las posibilidades de reparación tisular, aumentando inclusive las lesiones (Torbidoni y col, 2008).

Al comparar los cambios en la expresión génica provocados durante la injuria de la retina, se observó que el repertorio de respuestas parece ser común a distintas causas de agresión (Rattner y Nathans, 2005). Entre los transcritos más expresados después de la agresión se encuentran los correspondientes al gen de la endotelina 2 (Edn2), el receptor de endotelina B (Ednrb) y el factor de crecimiento fibroblástico 2 (Fgf2). Dado que Edn2 parece estar localizado en los fotorreceptores, estos autores postularon que la ET-2 actuaría como una señal de estrés que promovería la expresión de factores neuroprotectores por parte de las células de Müller.

Endotelinas

El sistema endotelinérgico

El sistema endotelinérgico está formado por tres isoformas de endotelinas, ET-1, ET-2 y ET-3 que, aunque derivan de genes separados (Edn1, Edn2 y Edn3), comparten una estructura molecular semejante. Los productos génicos sufren un procesamiento proteolítico postraduccional hasta llegar al péptido maduro de 21 aminoácidos (Fig. 1.4A). El procesamiento comienza con el primer precursor, de 203 aminoácidos, denominado preproendotelina (prepro-ET). Éste es recortado por peptidasas de tipo furina para formar Big-ET, que a su vez es clivada por enzimas convertidoras de endotelinas (ECEs) (Hynynen y Khalil, 2006). Las tres isoformas poseen un dominio N-terminal, y un dominio hidrofóbico C-terminal (Fig. 1.4B). Poseen dos puentes disulfuro y conservan un triptófano terminal (Trp21), que parece ser importante para su actividad (Masaki, 2004; Kawanabe, 2011).

Las endotelinas actúan vía receptores pertenecientes a la familia de receptores acoplados a proteínas G. Se conocen dos receptores endotelinérgicos, ET_A y ET_B (Arai y col, 1990; Davenport y Maguire, 2006). El receptor ET_A tiene distinta afinidad para cada endotelina, ET-1 > ET-2 >> ET-3, mientras que el receptor ET_B presenta prácticamente la misma afinidad para las tres isoformas (Kis y col, 2006). Durante el desarrollo, ninguna de las endotelinas puede compensar a la otra (Pla y Larue, 2003).

ET-1 es la más conocida. Aunque originalmente caracterizada por sus propiedades vasoconstrictoras y su papel en la hipertensión arterial (sistémica y pulmonar), se sabe actualmente que desempeña múltiples papeles en la fisiología neural, cardiovascular, pulmonar, reproductiva y renal. Se han documentado alteraciones de esta hormona en numerosas enfermedades, como asma, cáncer, retinopatía diabética, entre otras. Los efectos de ET-1 son pleiotrópicos, ya que modulan múltiples vías de señalización (Schorlemmer y col, 2008).

Las tres endotelinas se encuentran en el sistema nervioso central (SNC), donde actúan en una variedad de procesos tales como la activación glial y la modulación de la neurotransmisión (Schinelli, 2006a;b). ET-1 y ET-3 intervienen en la diferenciación de los derivados de las crestas neurales y su transformación en melanomas (Pla y Larue, 2003). El sistema endotelinérgico también es necesario para la proliferación y migración de las células precursoras neurales embrionarias (Morishita y col, 1999; Shinohara y col, 2004; Mizuno y col, 2005) y adultas (Castañeda y col, 2010; Castañeda y col, 2011). También está involucrado en el crecimiento de los glioblastomas (Liu y col, 2011).

Las endotelinas pueden intervenir en los mecanismos de supervivencia celular, como lo evidencian los astrocitos con deficiencia de ET-1, que son más vulnerables a situaciones de hipoxia o hipoxia/isquemia (Ho y col, 2001).

Los tres genes de las endotelinas, Edn1, Edn2 y Edn3 son expresados en la retina (Stitt y col, 1996; Chakravarthy y col, 1997; Rattner y Nathans, 2005; Torbidoni y col, 2005). ET-1 cumple un importante papel en el control de la barrera hematorretinal y otras funciones astrocitarias (Torbidoni y col, 2005; Iribarne y col, 2008). Como mencionamos previamente, ET-2 parece estar involucrada en la reacción de la retina al daño de los fotorreceptores (Rattner y Nathans, 2005; Joly y col, 2008).

El gen EDN1 (humano) contiene 5 exones y abarca aproximadamente 6.8 kb de ADN genómico. Posee dos sitios de iniciación, uno primario y otro alternativo, que no modifican la secuencia codificante de preproET-1. La transcripción a partir del sitio de inicio alternativo es específica de tejido y predomina en cerebro y corazón. También se conocen tres isoformas de preproET-1 de 211, 178 y 78 aminoácidos de longitud, producto del recorte y empalme alternativos del transcrito primario. Todas conservan

la secuencia correspondiente al péptido maduro de ET-1. El promotor de Edn1 está altamente conservado en los mamíferos (Stow y col, 2011a).

La disponibilidad de ET-1 es principalmente regulada mediante el control de la velocidad de transcripción de su gen Edn1 (Stow y col, 2011a). Este puede responder a diversas hormonas y estímulos que contribuyen a mantener la expresión de ET-1 característica de los distintos tipos celulares y adaptarla a las condiciones ambientales enfrentadas. Las señales que aumentan la expresión de Edn1 incluyen: Akt (proteína quinasa B), AP-1 (proteína activadora-1); GATA-2, ALK5 (quinasa semejante al receptor de activina 5), ERK1/2 (quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2), FOXO1 (forkhead box O1), GR (receptor de glucocorticoides), GSK3 β (quinasa β de la glucógeno sintasa 3), HIF-1 (factor inducible por hipoxia 1), I κ B (inhibidor de κ B), IKK (quinasa de I κ B), JNK (c-Jun N-terminal quinasa), MAPK (quinasa de proteínas activada por mitógenos), MR (receptor de mineralocorticoides), NADPH (nicotinamida andenina dinucleótido fosfato), Per1 (period 1), PI3K (quinasa de fosfoinosítidos 3), PKC (quinasa de proteínas C), TGF β (transforming growth factor β), TNF α (tumor necrosis factor α), ARN polimerasa, RhoA (Ras homology kinase A) y otros (Dorfman y col, 1992; Stow y col, 2011a). También depende de la disponibilidad del factor transcriptional nuclear -kappaB (NF- κ B) (Quehenberger y col, 2000). El resultado final para la vida de la célula es muy variable según el tipo celular y las condiciones ambientales, ya que ET-1 puede determinar la unión de subunidades de AP-1 y NF- κ B a otros genes (Sutcliffe y col, 2009). NF- κ B también favorece la expresión de ET_B (Zheng y col, 2010).

En los cardiomiocitos, donde los receptores ET_A predominan sobre los ET_B, ET-1 desempeña una función pro-supervivencia regulando, entre otras vías, la expresión de Bcl-X_L (Schorlemmer y col, 2008). ET-1 también inhibe las señales pro-apoptóticas extrínsecas de la vía FasL/TNF, y promovería la expresión de genes necesarios para la supervivencia (Schorlemmer y col, 2008).

Endotelinas en la retina

Las endotelinas están ampliamente distribuidas en la retina (Stitt y col, 1996; Chakravarthy y col, 1997; Rattner y Nathans, 2005; Torbidoni y col, 2005).

Estudios previos de este laboratorio demostraron la presencia de ET-1 en el epitelio pigmentario de la retina (EP), la CPE, las células ganglionares y los astrocitos de la

retina normal (Torbidoni y col, 2005). Los terminales nerviosos de la CPE contienen receptores ET_A, mientras que las prolongaciones de las células horizontales, que también hacen contacto sináptico con los fotorreceptores, poseen receptor ET_B (Torbidoni y col, 2006). La función fisiológica de ET-2 es desconocida, sin embargo, esta isoforma es bien conocida por el gran incremento de su expresión en diversas formas de injuria de los fotorreceptores (Rattner y Nathans, 2005; Joly y col, 2008; Torbidoni y col, 2008).

En la degeneración de la retina inducida por luz, el bloqueo de ambos receptores endotelinérgicos reduce los niveles de endotelina y la actividad de la caspasa-3 clivada (CC-3) (Torbidoni y col, 2006). Además, disminuye el proceso de gliosis que acompaña a la degeneración (Torbidoni y col, 2006).

Todas las endotelinas parecen estar involucradas en la retinopatía diabética (Deng y col, 1999) y en el glaucoma (Prasanna y col, 2010; Howell y col, 2011).

Otros factores protectores de los fotorreceptores

Se han identificado numerosos factores que retardan la muerte de los fotorreceptores en diversos modelos animales. La lista incluye FGF2, las neurotrofinas como BDNF (brain-derived neurotrophic factor) y NGF (nerve growth factor), y diversos miembros de la familia interleuquina 6 como cardiotrofina-1, LIF (factor inhibidor de la leucemia) y CNTF (factor ciliar neurotrófico) (Heinrich y col, 2003; Harada y col, 2011; Sahni y col, 2011). Aquí solo nos ocuparemos de FGF2 y LIF, debido a su particular relación con el sistema endotelinérgico.

FGF2, también conocido como FGF básico, pertenece a la familia de factores de crecimiento fibroblásticos. Tanto en el humano como en el ratón, esta familia posee 22 miembros, FGF1-FGF23. En el humano no se ha identificado FGF15, mientras que en el ratón no se encuentra su ortólogo FGF19 (Itoh, 2010). Se dividen en tres grupos: las subfamilias intracelulares (FGF11/12/13/14), las endocrinas (FGF19/21/23) y las canónicas, que constituyen el grupo más numeroso. FGF2 forma parte de esta familia canónica. Sus miembros actúan en forma autocrina/paracrina, como proteínas extracelulares que se unen a receptores con actividad de tirosina quinasa (FGFRs) (Delrieu, 2000).

FGF2 se expresa abundantemente en el SNC, donde es necesario para el crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia de las neuronas embrionarias (Morrison y col, 1986) y las neuronas adultas lesionadas (Dietrich y col, 1996; Reuss y von Bohlen und Halbach, 2003). Puede proteger a la retina contra variados insultos (Faktorovich y col, 1992; Unoki y LaVail, 1994; LaVail y col, 1998; Liu y col, 1998; Schuettauf y col, 2004; O'Driscoll y col, 2007; O'Driscoll y col, 2008) y su expresión aumenta bajo distintas condiciones de sufrimiento retinal (Gao y Hollyfield, 1995;1996; Hackett y col, 1997; Grimm y col, 2002). FGF2 es considerado como un efector esencial para las respuestas de condicionamiento, cuando la exposición a estímulos potencialmente dañinos pero en baja intensidad protege a los fotorreceptores contra lesiones de mayor magnitud (Casson y col, 2004; Valter y col, 2005; O'Driscoll y col, 2008).

LIF no parece ser necesario para la supervivencia de los fotorreceptores en condiciones fisiológicas (Amaravadi y Thompson, 2005) pero la injuria promueve la producción de LIF en una subpoblación de células gliales de Müller (Joly y col, 2008). En los ratones con déficit genético ($Lif^{-/-}$), las degeneraciones inducidas por otros agentes progresan más rápidamente que en los animales que expresan LIF ($Lif^{+/+}$). En ausencia de este factor, la cadena de señales intracelulares que culmina con la elevación de FGF2 permanece inactiva. Tampoco se produce reacción glial (Joly y col, 2008). La vía de señalización de LIF incluye a la quinasa Janus 2 (Jak2), el Transductor de señal y activador transcripcional 1 y 3 (STAT1 y STAT3), ET-2 y el receptor ET_B (Samardzija y col, 2006; Burgi y col, 2009). Estudios recientes sugieren que LIF afectaría directamente a los fotorreceptores (Ueki y col, 2009).

Glucocorticoides y su papel en la supervivencia celular

Los glucocorticoides son producidos por la adrenal en forma circadiana y en función de las condiciones de estrés (Chrousos y Kino, 2005). Estas hormonas esteroideas son esenciales para la regulación de diversos procesos fisiológicos. Influyen sobre la actividad y dirección de las reacciones químicas determinantes del metabolismo intermedio, el mantenimiento del tono cardiovascular, la actividad y características de las reacciones inmunes e inflamatorias y numerosas funciones del sistema nervioso central (Zanchi y col, 2010).

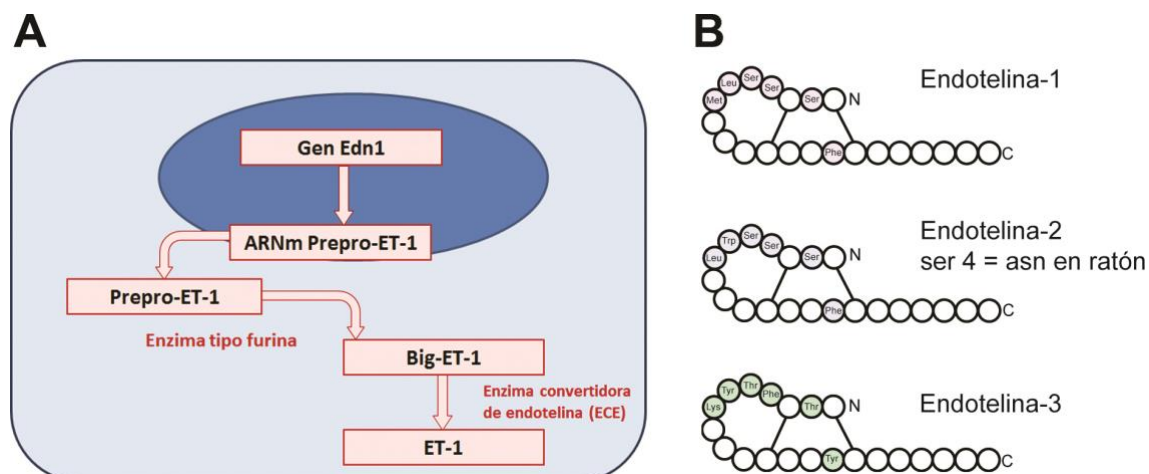


Figura 1.4. A. Esquema que muestra la biosíntesis de endotelina-1 (ET-1) a partir de su gen *Edn1*. El ARNm transcrito a partir de dicho gen genera un péptido precursor de 200 o más aminoácidos, preproendotelina-1, que a su vez es clivado para formar un péptido de 31 aminoácidos (Big-ET) por una proteasa tipo furina. El clivaje final depende de una enzima convertidora de endotelina (ECE) que genera el péptido maduro (ET-1). B. Todas las isoformas maduras poseen 21 aminoácidos con dos uniones disulfuro. Los aminoácidos del extremo -C son los mismos en las tres isoformas. Modificado de (Masaki, 2004).

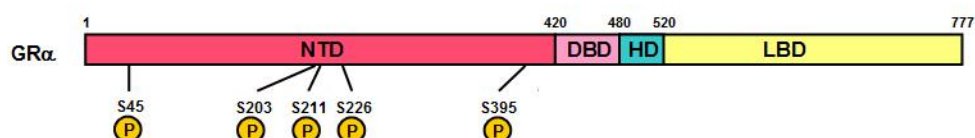


Figura 1.5. Estructura de la proteína del GR α , donde se indica el dominio N-terminal (NTD), el dominio de unión al ADN (DBD), altamente conservado y unido por una región bisagra (HD) al dominio C-terminal de unión al ligando (LBD). Los sitios de fosforilación se encuentran en el NTD, predominantemente en una región denominada motivo de activación funcional 1 (AF1). LBD también posee un motivo de activación funcional 2 (AF2) dependiente de la unión al ligando. Modificado de (Kino, 2007).

Los glucocorticoides pueden inducir muerte celular programada (MCP) en las células del sistema hematopoyético que participan en las reacciones inflamatorias, como monocitos, macrófagos y linfocitos T. Por el contrario, en células glandulares, como las del epitelio mamario, los hepatocitos o las células foliculares ováricas, y también en los fibroblastos, antagonizan las señales apoptóticas provocadas por citoquinas, AMPc, supresores tumorales y genes de muerte (Amsterdam y col, 2002). El efecto anti-apoptótico depende de la modulación de diversos genes de supervivencia, tales como Bcl-2, Bcl-X_L o NFκB. La expresión de un mismo producto génico puede ser aumentada o reducida por los glucocorticoides, en forma específica para cada fenotipo celular. Por lo tanto, es posible concebir el efecto anti-inflamatorio de estos esteroides como la resultante de dos procesos complementarios: la inducción de MCP en las células que provocan la inflamación y la protección de las células residentes del tejido inflamado (Amsterdam y col, 2002).

Los genes más activos en la inducción o prevención de la MCP son los miembros de la familia Bcl-2, así denominada porque fue descubierta en un linfoma de células B (BCL-2). Las proteínas de esta familia se caracterizan por su capacidad de regular la liberación mitocondrial de citocromo c y se agrupan en tres subfamilias con diferente número de dominios de homología Bcl-2 (dominios BH1, BH2, BH3 y BH4). Los miembros de la subfamilia anti-apoptótica, como Bcl-2 y Bcl-X_L poseen los cuatro dominios BH. La subfamilia pro-apoptótica no posee dominios BH4 y sus miembros, como Bax y Bak, se conocen como BH123 (proteínas con multidominio BH1, BH2 y BH3). Los miembros de una tercera subfamilia, como BID y BAD, solo poseen BH3 y regulan a otros miembros de la familia (Taylor y col, 2008). Los glucocorticoides pueden afectar la transcripción o la estabilidad de estas proteínas (Chang y col, 1997; Amsterdam y col, 2002). La dirección negativa o positiva de estos efectos determinará un efecto pro- o anti-apoptótico. En cada fenotipo, estas hormonas afectarían en forma diferente la expresión y estabilidad de distintas isoformas de Bcl-X. La tendencia hacia la muerte o hacia la supervivencia dependería del predominio de las isoformas cortas (Bcl-Xs, pro-apoptóticas) o de las isoformas largas (Bcl-X_L, anti-apoptóticas) (Viegas y col, 2004; Viegas y col, 2008).

El bloqueo de la proteína activadora-1 (AP-1) y NF-κB constituye la base de las funciones anti-inflamatorias de los glucocorticoides (Smoak y Cidlowski, 2004), y probablemente también intervienen en su capacidad de controlar la muerte celular

(Angel y Karin, 1991; Evans-Storms y Cidlowski, 2000). El supresor tumoral p53, también parte esencial de los mecanismos de MCP, es también parte de la cadena de señalización que permite la acción represora de los glucocorticoides sobre la transcripción regulada por NF- κ B (Murphy y col, 2011).

Receptores de glucocorticoides

Los glucocorticoides atraviesan fácilmente la membrana celular, donde interactúan con sus receptores (GRs) disponibles en el citoplasma. Un solo gen codifica a distintas isoformas de estos receptores. La región promotora del gen de GR (NR3C1, subfamilia 3 de receptores nucleares 3, grupo C, miembro 1) contiene sitios de unión para diversos factores de transcripción, entre los que se cuentan factores Sp1, AP-1, YY1, NF- κ B, y el mismo producto génico, GR (Yudt y Cidlowski, 2002).

El recorte y empalme alternativos del gen de GR genera dos isoformas principales, GR α y GR β , que difieren en la secuencia C-terminal (Oakley y Cidlowski, 2011). Existen otras formas menos conocidas: GR γ , que puede unirse a glucocorticoides y al ADN, pero no activa a la misma cantidad de genes estimulados por GR α ; GR-A y GR-P, dos variantes que no se unen a los glucocorticoides, pero que pueden modular la actividad de GR α (Oakley y Cidlowski, 2011). Los ARNm-GR humano y de ratón, así como el de otras especies, poseen 8 codones de iniciación AUG. El GR α clásico corresponde a la más larga de las 8 isoformas posibles, denominadas GR α -A, GR α -B, GR α -C1, GR α -C2, GR α -C3, GR α -D1, GR α -D2 y GR α -D3. Todas parecen tener la misma afinidad por los glucocorticoides y por los GREs. Varían, sin embargo, en su distribución subcelular ya que algunas isoformas se localizan constitutivamente en el núcleo, y en su capacidad para reclutar co-reguladores y ARN polimerasa II hacia los genes blanco (Oakley y Cidlowski, 2011).

Estructuralmente, los GRs se asemejan a otros miembros de la superfamilia de receptores nucleares, todos los cuales actúan como factores de transcripción dependientes de ligando. Este tipo de receptores presenta dominios separados para la unión con el ligando y con el ADN (Weinberger y col, 1985): un dominio de unión al ADN (DBD), altamente conservado, se une por una región bisagra (H) al dominio C-terminal de unión al ligando (LBD) (Fig. 1.5). El dominio N-terminal (NTD) contiene una interfase coactivadora independiente (motivo de activación funcional 1, AF1), LBD

posee una interfase coactivadora dependiente de la hormona (motivo de activación funcional 2, AF2)

En ausencia de ligando, el complejo citoplasmático organizado por la chaperona HSP90, reprime las funciones reguladoras del GR (Pratt y Toft, 1997). La unión con la hormona determina un cambio conformacional en el receptor que a su vez promueve la unión con el ADN, la asociación con otros cofactores reguladores de la transcripción y la regulación de los genes blancos (Jenkins y col, 2001).

Unido el ligando, el receptor se libera y se transloca al núcleo donde se dimeriza. Los complejos receptor-ligando se unen a elementos de respuesta a glucocorticoides (GREs), que pueden ser facilitadores o represores. Tanto el número de GREs, como su relativa proximidad a la caja TATA parecen ser determinantes de la inducibilidad del gen por acción de los glucocorticoides (Smoak y Cidlowski, 2004). Mientras que los genes activados por DEX tienen un sitio de unión a una distancia promedio de 11 kb del sitio de iniciación de la transcripción, en los genes reprimidos por DEX, el sitio de unión más próximo se encuentra a un promedio de 146 kb del sitio de iniciación de la transcripción (Reddy y col, 2009). La unión de GR α a un GRE resulta en un cambio conformacional del receptor que promueve el reclutamiento de varios co-activadores, indispensables para la remodelación de la cromatina por la presencia de actividad de histona acetilasa (Smoak y Cidlowski, 2004). Los glucocorticoides aumentan la síntesis de ciertas proteínas anti-inflamatorias, pero esta propiedad no explica el amplio espectro de su acción. Como mencionamos previamente, gran parte de sus acciones anti-inflamatorias se asocian con la inhibición de NF- κ B y AP-1 (De Bosscher y col, 2008; Zanchi y col, 2010).

Otros mecanismos importantes en la acción de GR α son la inducción de una fosfatasa de las MAP quinasas, la MKP-1; el bloqueo del factor nuclear de las células T activadas (NF-AT); la interacción facilitadora con los factores STAT (Signal Transduction and Activator of Transcription) que pueden inducir ciertas citoquinas; los factores Smad activados por TGF- β (transforming growth factor- β). Estos últimos pueden a su vez interactuar con GR α o sus genes blanco (Smoak y Cidlowski, 2004).

Otros efectos no genómicos de los glucocorticoides son mediados por receptores de la membrana celular (Nicolaidis y col, 2010).

Fosforilación de los receptores de glucocorticoides

La actividad de los GRs puede ser modulada por fosforilación en diversas serinas de su secuencia peptídica (Wang y col, 2002). Existen distintos niveles de fosforilación, que dependen de la ausencia o presencia del ligando. La fosforilación es mayor después de la unión de un agonista (aunque no de un antagonista). GR α se hiperfosforila una vez que está activado y puede unirse al ADN (Orti y col, 1993). La fosforilación dependiente de ligando puede modificar la unión a blancos nucleares, la interacción con cofactores, la fuerza y duración de la señal, y la estabilidad del receptor (Wang y col, 2002).

Los residuos de serina fosforilables se encuentran agrupados en el extremo N de la molécula receptora. Ser203 y Ser211 del GR α humano (hGR α), que resultan hiperfosforilados en presencia de la hormona, se encuentran en la región más pequeña de AF1 cuya mutación reduce la capacidad de GR α para la transactivación (Iniguez-Lluhi y col, 1997). La Ser203 y la Ser211 del GR humano corresponden a la Ser212 y a la Ser220 del receptor murino, respectivamente. Las p-Ser murinas cumplen la misma función que las del receptor humano (Ismaili y Garabedian, 2004).

En ausencia de ligando, una gran proporción de los receptores no está fosforilada, y la subpoblación fosforilada se encuentra principalmente modificada en Ser203. El agonista promueve el aumento de la fosforilación tanto en Ser203 como en Ser211 y en Ser226, determinando un aumento de las formas doble- y triplemente fosforiladas. La proporción de fosforilación en cada uno de estos sitios se modifica con el tiempo, suponiéndose que cada modificación induce cambios conformacionales y/o la asociación con distintas proteínas co-reguladoras (Wang y col, 2002; Blind y Garabedian, 2008).

Solo las moléculas fosforiladas en Ser211 y S226 son reclutadas a los genes sensibles a glucocorticoides, mientras que aquellas únicamente fosforiladas en S203 no ingresarían al núcleo (Blind y Garabedian, 2008).

Mifepristona (MFP, RU486) es un agonista parcial de GR α que permite la translocación nuclear de este receptor. Sin embargo, MFP determina un cambio conformacional que previene la unión de co-activadores y activa el reclutamiento de co-represores (Schoch y col, 2010). MFP no aumenta la fosforilación del receptor (Weigel y Moore, 2007).

El sitio de unión al ligando de GR β no se asocia con ningún glucocorticoide conocido y esta isoforma se comporta como un inhibidor dominante negativo de GR α (Oakley and Cidlowski, 2011). Los altos niveles de GR β presentes en los neutrófilos humanos reducen su vulnerabilidad a los corticoides (Strickland y col, 2001). Algunos estudios sugieren que las isoformas GR β poseen actividades transcripcionales intrínsecas, independientes de GR α , tal vez moduladas por la unión a MFP (Lewis-Tuffin y col, 2007).

Glucocorticoides en la retina

Los glucocorticoides se utilizan ampliamente en distintas condiciones degenerativas de la retina, experimentales o humanas (Wenzel y col, 2001a; Glybina y col, 2009; Campochiaro y col, 2010). Su efecto protector sobre los fotorreceptores ha sido demostrado en la degeneración inducida por iluminación y en la lesión por láser (Wenzel y col, 2001a; She y col, 2008).

Sin embargo, su mecanismo de acción es poco conocido. Originalmente fue correlacionado con una reducción de la peroxidación lipídica (Fu et al., 1992), pero luego fue asociado a la supresión de la proteína activadora-1 (AP1) (Wenzel y col, 2001a). Este último efecto no pudo ser comprobado en otros modelos experimentales de degeneración de la retina (Gu y col, 2009). La relación del aumento de Bcl-X_L con la protección de fotorreceptores dependiente de glucocorticoides no había sido previamente estudiada en la retina, y fue investigada en esta Tesis.

Asociaciones entre glucocorticoides y endotelinas

Se han descrito interacciones entre endotelinas y glucocorticoides en distintos tejidos. El resultado funcional o patológico de estas interacciones depende del tejido y de otras condiciones ambientales. Los glucocorticoides estimulan la liberación de ET-1 producida por células musculares vasculares, pero no del endotelio (Kanase y col, 1991). En las células musculares vasculares, el efecto depende de un aumento en la transcripción de Edn1 (Morin y col, 1998). Los glucocorticoides también estimulan la liberación de ET-1 en células tumorales (Schrey y col, 1992). Por el contrario, la bloquean en células del epitelio respiratorio (Calderon y col, 1994). En estas células, la producción de ET-1 es promovida por las citoquinas inflamatorias y la activación del

factor de transcripción nuclear kappa B (NF- κ B), que es inactivado por los glucocorticoides (Dschietzig y col, 2001).

Los glucocorticoides también pueden afectar la expresión de los receptores endotelinérgicos. DEX reduce la expresión del receptor ET_A en células musculares vasculares y en células endoteliales de cerebro, atenuando la respuesta a ET-1 (Nambi y col, 1992; Stanimirovic y col, 1994). En el tejido óseo, ET-1 estimula la proliferación y diferenciación de los osteoblastos, que expresan el receptor ET_A en forma constitutiva (Borcsok y col, 1998). En estas células, los glucocorticoides aumentan la expresión de ET_A facilitando así el efecto mitogénico de ET-1 (Borcsok y col, 1998). En el hipotálamo y el cerebelo, DEX (1 y 7 mg/kg) aumenta la expresión de Edn1, fenómeno que precede a la reducción en la expresión del ARNm del receptor ET_B (Shibata y col, 1995).

DEX actúa exclusivamente mediante GR α , sin intervención del receptor de mineralocorticoides (Provencher y col, 1995). Los efectos de los mineralocorticoides sobre la producción de endotelinas también serían mediados por GR α (Stow y col, 2011b).

También se conocen interacciones entre los glucocorticoides y las endotelinas en el ojo. Estos péptidos están aumentados en el glaucoma, una patología que puede ser inducida por los glucocorticoides. Las células del trabeculado, un tejido involucrado en el flujo del humor acuoso, transcriben Edn1 y los receptores ET_A y ET_B. DEX no modifica la expresión de ET-1 y ET_A, pero reduce la expresión de ET_B y en consecuencia disminuye la liberación de NO dependiente de ET-1 (Zhang y col, 2003a). Por el contrario, DEX aumenta la producción de ET-1 en el epitelio ciliar no pigmentado, que libera esta endotelina hacia la cámara anterior del ojo. Simultáneamente, DEX disminuye la expresión del receptor ET_A, pero aumenta la del receptor ET_B. Estos efectos pueden ser prevenidos por MFP (Zhang y col, 2003b).

En las células del EP humano (líneas celulares ARPE19 y D407), la producción basal de ET-1 es aumentada por una combinación de tres citoquinas (interferon- γ , TNF α e interleukina-1 β). En la línea D407, pero no en ARPE19, DEX aumenta la producción de ET-1. Por el contrario, DEX suprime el aumento de ET-1 inducido por las citoquinas en ambas líneas celulares (Udono-Fujimori y col, 2004).

Interacciones de glucocorticoides, Lif y Fgf2

LIF es uno de los efectores de las respuestas inflamatorias que estimula la producción del factor liberador de corticotrofina (CRH) en el hipotálamo y la transcripción y liberación de ACTH en la hipófisis (Chesnokova y col, 1998). Estos efectos son eventualmente bloqueados por los glucocorticoides (Martens y col, 2005) que, sin embargo, son necesarios para amplificar los blancos transcripcionales de la cadena LIF/STAT3 (Langlais y col, 2008).

Existen pocos estudios sobre el efecto de MFP sobre LIF. En el endometrio, durante la fase gestacional del ciclo menstrual, MFP disminuye la expresión de LIF (Chen y col, 2011), probablemente por bloqueo del receptor de progesterona. Por el contrario, MFP aumenta la expresión de este factor en las vellosidades coriales, un efecto que podría estar relacionado con GR α (Pei y col, 2010).

Los glucocorticoides y sus análogos aumentan la expresión de Fgf2 en todo el SNC, tanto a nivel de la proteína (Chadi y col, 1993) como del ARNm (Hansson y col, 2000). Se considera que los glucocorticoides ejercen un control tónico sobre la expresión de Fgf2, que es atenuada por la adrenalectomía (AdrX) (Chao y McEwen, 1994; Riva y col, 1995).

Los glucocorticoides y sus análogos aumentan la expresión de Fgf2 en todo el SNC, tanto a nivel de la proteína (Chadi y col, 1993) como del ARNm (Hansson y col, 2000). Se considera que los glucocorticoides ejercen un control tónico sobre la expresión de Fgf2, que es atenuada por la AdrX (Chao y McEwen, 1994; Riva y col, 1995).

A diferencia de la mayor parte de los genes conocidos, el locus de Fgf2 produce un ARN a partir de la cadena antisentido (Fgf2 antisense, Nudt6). Esta secuencia es complementaria de 464 nucleótidos ubicados en la región no traducida 3' (3'-UTR) del gen codificante (Knee y col, 1997). La organización física de Nudt6 está altamente conservada, incluso en el ratón (Gene ID 229228). En condiciones de estrés, los corticoides reducen transitoriamente la expresión de Nudt6, aumentando la traducción del ARNm-FGF2 (Frank y col, 2007). Nudt6 está involucrado en la regulación postranscripcional de FGF2. Se expresa en el sistema nervioso y ha sido correlacionado con conductas inteligentes en ratones (Kolata y col, 2010). Bloquea la traducción de FGF2 in vitro (Li y Murphy, 2000).

Objetivos

Esta Tesis intenta describir el papel de las endotelinas, los glucocorticoides y sus correspondientes receptores, en la respuesta de la retina a la injuria de las células fotorreceptoras. Sus objetivos específicos son

1. Estudiar la distribución del receptor de glucocorticoides (GR) y de sus formas fosforiladas (p-Ser 211-GR y p-Ser 203-GR) en la retina normal y después de intervenciones farmacológicas que modifican la señalización dependiente de glucocorticoides.
2. Dado que los glucocorticoides son protectores de los fotorreceptores, determinar si el bloqueo de efectos provoca la muerte de dichas células fotorreceptoras. En forma complementaria, se desean evaluar las modificaciones producidas por un agonista (dexametasona, DEX) y un antagonista (mifepristona, MFP) sobre los niveles de proteínas pro- y anti-apoptóticas en la retina no expuesta a condiciones tóxicas conocidas.
3. Correlacionar los cambios pro- y anti-apoptóticos producidos por DEX y su antagonista con modificaciones sobre las endotelinas y otros factores (FGF2 y LIF) que integran la respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores.
4. Comparar los efectos de DEX y MFP en condiciones basales con los efectos de los mismos fármacos en retinas expuestas a condiciones de iluminación que inducen la muerte de los fotorreceptores.
5. Comparar la respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores inducido por MFP, con el patrón de dicha respuesta provocada por exposición a la luz.

Capítulo 2

Materiales y métodos

Animales y tratamientos experimentales

Animales

Se emplearon ratones de la cepa Balb/c, de 35 a 45 días de edad. Los animales fueron mantenidos según normas pre-establecidas (ARVO). Las condiciones de iluminación estándar fueron ciclos de luz/oscuridad, de 12 horas por etapa, con niveles máximos de iluminación de 60 lux. Todos los experimentos con animales comenzaron a las 12.00 h, con un período de 24 horas en oscuridad. Los animales fueron entonces separados, aleatoriamente, en los distintos grupos experimentales (ver más abajo). Al finalizar el experimento, los animales fueron sacrificados con inyección intraperitoneal de hidrato de cloral (500 mg/kg)

Exposición a la luz

Todos los procedimientos experimentales fueron realizados según las recomendaciones para el uso de animales en investigaciones oftalmológicas (ARVO). Los animales fueron expuestos a 1.500 lux en cajas de vidrio transparente ubicadas en un módulo de iluminación regulada. Este módulo cuenta con un sistema de recirculación de aire que opera 20 cambios por hora. Su fuente de iluminación es un tubo fluorescente (OSRAM L58W/daylight). El tiempo de exposición, que siempre comenzó a las 12.00 h, fue de 2 o 4 días.

Tratamientos farmacológicos

Los tratamientos farmacológicos, fueron aplicados mediante inyecciones subcutáneas o intraperitoneales. Las drogas utilizadas fueron dexametasona (DEX, Sidus, Buenos Aires, Argentina) y mifepristona (MFP, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EEUU), en dosis que se describen en los capítulos correspondientes. Los controles siempre recibieron volúmenes similares del vehículo (VHC), propilen-glicol, en lugar de las inyecciones de MFP, y solución salina (CINa 0,9%) como reemplazo de las inyecciones de DEX.

Procedimientos

Muestras para histología e inmunohistoquímica

Fijación

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

Se marcaron con tinta indeleble los cuadrantes dorsolaterales de los globos oculares. Estos fueron enucleados y disecados para extraer el cristalino. Los tejidos se almacenaron por una noche en una solución de sacarosa (5 g/ 100 ml) buffer fosfato 0,1 M a 4°C. Para obtener una criopreservación apropiada del material, las muestras fueron pasadas por soluciones crecientes de sacarosa (Barthel y Raymond, 1990).

Cortes por congelación

El material se incluyó en el compuesto “optimal cutting temperature” (OCT, Biopack, Buenos Aires), y congelado en acetona enfriada por nitrógeno líquido. Los tacos fueron armados teniendo en cuenta la orientación anatómica de cada ojo, a fin de estudiar las mismas regiones en cada experimento. Cada taco incluía un ojo control y un ojo experimental, a fin de asegurar un mismo procesamiento para todas las muestras. Se utilizó un criostato Microm (HM 500 OM) para obtener cortes de 6 a 12 μm de espesor, que fueron montados en portaobjetos gelatinizados y secados a temperatura ambiente durante 1.30 h o más.

Inmunohistoquímica

Las criosecciones fueron deshidratadas por pasajes (1 min) en alcoholes de concentraciones crecientes (70 %-100 %). Luego fueron deslipidizados en xilol durante tres minutos, para ser finalmente rehidratados por pasajes en alcoholes 100 % y 96 %. Seguidamente se bloqueó la peroxidasa endógena mediante una incubación en alcohol 96% con peróxido de hidrogeno (0,5 % v/v) por 20 minutos y finalmente se terminó la rehidratación en alcoholes de menor concentración hasta llegar a PBS.

Los anticuerpos primarios utilizados (ver tabla 1) fueron detectados con anticuerpos secundarios biotinilados, los que fueron reconocidos por el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Elite Vector, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EEUU). La actividad

de peroxidasa fue revelada con diaminobencidina en presencia de níquel. Como control negativo el anticuerpo primario fue reemplazado con diluyente. Las fotografías de estos cortes se realizaron con un microscopio de luz clara (Nikon E800) y una cámara digital (Nikon DN100).

Anticuerpos primarios

Tabla 2.1: Anticuerpos primarios para inmunohistoquímica y Western blots		
Anticuerpo	Tipo	Origen
Gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (GAPDH)	Monoclonal de ratón	(6C5, sc-32233) Santa Cruz, Biotechnology, Inc. Santa Cruz, CA, EEUU
Bcl-X	Policlonal de conejo	(B9304) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
Caspasa clivada-3 (CC-3)	Policlonal de conejo	(9661) Cell Signaling Technology Inc. Danvers, MN, EEUU.
Histona H2XA fosforilada (p-H2XA)	Monoclonal conejo	(ab2893) Abcam Inc. Cambridge, MNs, EEUU.
Proteína Glial Fibrilar Acida (GFAP)	Monoclonal de ratón	(G3893) Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU.
Rodopsina B6-30	Monoclonal de ratón	J. Nathans (Dpto. de Biología Molecular y Genética, Escuela de Medicina, Universidad John Hopkins, Baltimore, MD, EEUU)
GR total (N499, raised against hGR 1-499)	Policlonal de conejo	M. Garabedian (Departamento de Microbiología, Instituto del Cáncer, Universidad de Nueva York, NY, EEUU).
p-Ser203-GR (C ₁₉₄ LQDLEFSSG(pS)PGKE ₂₀₇)	Policlonal de conejo	M. Garabedian (Departamento de Microbiología, Instituto del Cáncer, Universidad de Nueva York, NY, EEUU).
p-Ser211-GR (C ₂₀₂ GSPGKETNE(pS)PWRS ₂₁₅)	Policlonal de conejo	M. Garabedian (Departamento de Microbiología, Instituto del Cáncer, Universidad de Nueva York, NY, EEUU).

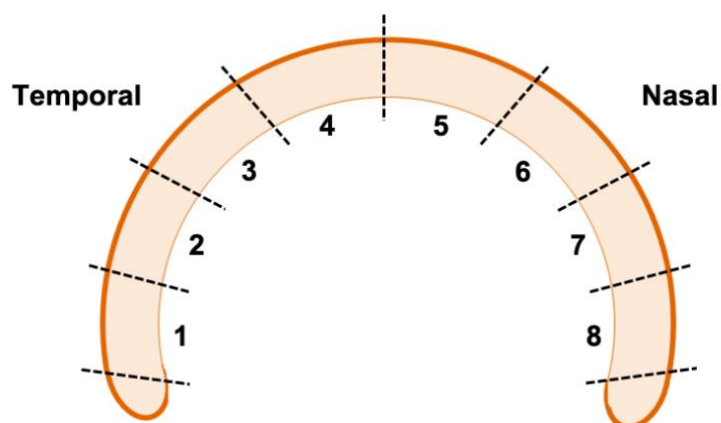


Figura 2.1. Representación esquemática de un corte de la retina paralelo al ecuador. Para la evaluación del daño se examinaron ocho regiones: cuatro temporales (1-4) y cuatro nasales (5-8). Los extremos periféricos, próximos al cuerpo ciliar no fueron evaluados.

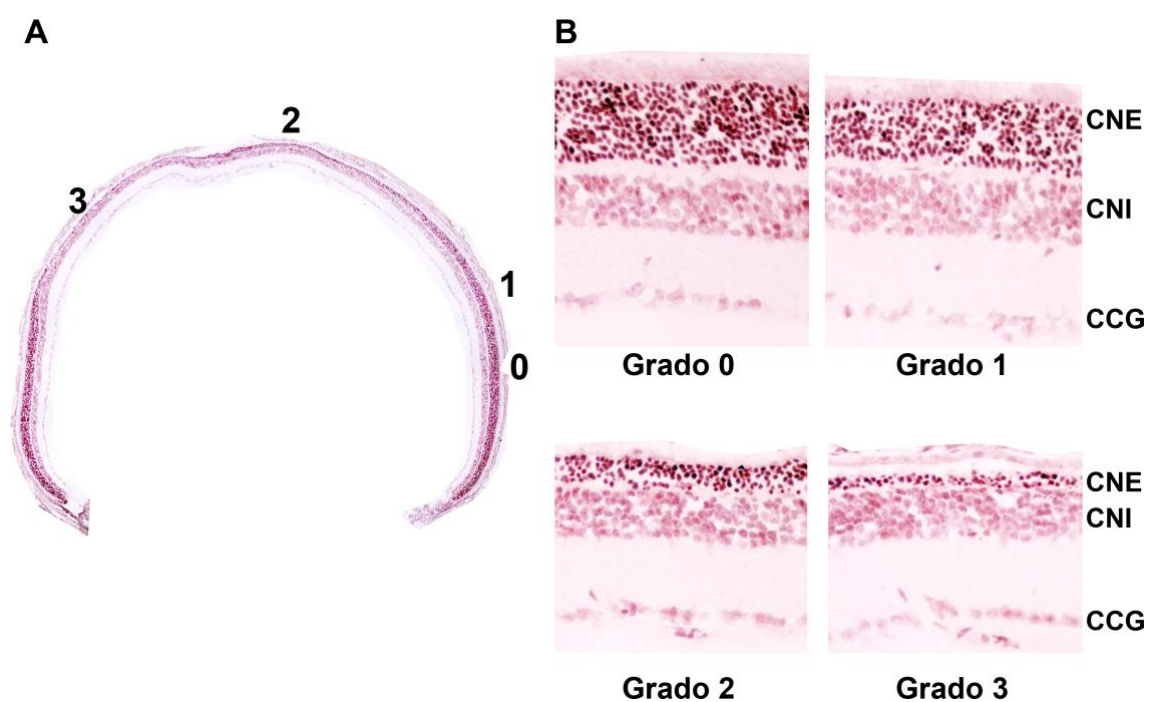


Figura 2.2. A. Corte próximo al ecuador del ojo en una retina lesionada, donde se indican las zonas normales (0), y con distintos grados de lesión 1, 2 y 3. B. Con mayor magnificación se muestra el estado de la CNE en zonas de la retina con lesiones de distinta gravedad. 0, no lesión, la CNE tiene mayor espesor que la CNI; 1, daño leve, la CNE es del mismo espesor que la CNI; 2, daño grave, la CNE es mucho más angosta que la CNI, pero tiene 3 o más hileras de núcleos de fotorreceptores; 3, daño máximo, apenas quedan 1 o 3 hileras de núcleos.

La detección de los anticuerpos primarios en las retinas enteras se realizó con anticuerpo secundario acoplado a un cromóforo fluorescente (Fluoresceína, fluorescein-5-isothiocyanate-conjugated goat antirabbit IgG, FITC). Estas retinas fueron montadas en DABCO (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Para su observación se utilizó un microscopio confocal, Laser Scanning System Radiance 2000 (BioRad, Hemel Hempstead, UK), utilizando la línea 488 del láser de argón y secciones ópticas de 1 μm . Las imágenes fueron procesadas con el programa Confocal Assistant (BioRad, Hemel Hempstead, UK).

Coloración con Rojo Neutro y cuantificación del daño estructural

Se obtuvieron secciones de 9 μm de espesor, que una vez secadas a temperatura ambiente, fueron colocadas en una solución de sacarosa al 5% (g/100 ml) en buffer fosfato por 5 minutos, seguidas por un baño en agua destilada por 10 minutos. Luego los cortes se cubrieron con Rojo Neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EEUU) 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 sintético.

Para valorar el daño sufrido por las distintas zonas de la retinas se utilizaron cortes seriados paralelos al ecuador del ojo, que incluían los hemisferios temporal y nasal. Una vez coloreados con Rojo Neutro, los cortes fueron analizados por un investigador que desconocía el tratamiento aplicado a cada muestra. Se midieron 11 cortes por ojo, separados por 270 μm y que representaban la zona próxima al nervio óptico de los hemisferios ventral y dorsal. Se analizaron 8 puntos en cada corte (como se indica en la Fig. 2.1), con una escala de 0 a 3, donde 0 correspondió al espesor de la CNE en las retinas controles y 3 a la CNE reducida a 1-3 hileras de núcleos (Fig. 2.2.). No se incluyeron los extremos periféricos, próximos al cuerpo ciliar.

Fragmentación del ADN (TUNEL)

Obtenidos los cortes por criostato, los mismos se dejaron secar a temperatura ambiente por 2 h. 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 min en formaldehído 4%, lavados durante 15 minutos en TBS 1X 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 E800 con una cámara digital Nikon DN100, o con el microscopio confocal Laser Scanning System Radiance 2000 (BioRad, Hemel Hempstead, UK), utilizando la línea 488 del láser de argón. Se tomaron secciones ópticas de 1 μm en el eje z, que fueron procesadas con el software Confocal Assistant (BioRad, Hemel Hempstead, UK).

Proteinogramas analizados por Western blot

Luego de sacrificado el animal, las retinas se obtuvieron en solución tamponada con 5 mM Tris-HCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 65 mM NaCl, 1% Triton X-100, y cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Cada extracto contenía 6 retinas (el número total de animales se indica en los capítulos de resultados). Se utilizó el método de Bradford (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) para estimar los niveles de proteínas totales en los homogenatos (Bradford, 1976). Los extractos fueron separados en geles de SDS-poliacrilamida (BioRAD, Canton, MA), a razón de 30 μg de proteína por calle. La proteína separada fue transferida (120 v, 120 min) a un filtro de nitrocelulosa (Hybon-P, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) con técnicas convencionales. Las membranas fueron incubadas con los anticuerpos primarios (Tabla 2.1), seguidos por lavados en Tween-PBS (Tween 20 1% en PBS 0,01 M) y luego incubadas con los anticuerpos secundarios biotinilados apropiados para cada primario. Posteriormente fueron incubadas con Extravidin-Peroxidasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), reveladas por quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) y expuestas a placas sensibles (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ). Para controlar la transferencia, los anticuerpos primarios fueron levantados y las membranas reincubadas con el anticuerpo contra GAPDH. Los resultados se expresaron como píxeles por banda.

RT-PCR semicuantitativa

Después de la enucleación, las retinas fueron disecadas en solución salina estéril. Se utilizaron 2 retinas para cada extracto (ver el número total de animales en los capítulos de resultados). Después de homogeneizar las muestras (Microhomogeneizador Sigma-

Aldrich, St. Louis, MO), el ARN total fue aislado con el RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Inc, Valencia, CA). Las muestras fueron procesadas bajo flujo laminar (Class II A/ B3 Biological Safety Cabinet – Microlat S.R.L).

La concentración de ARN total se midió en espectrofotómetro (Beckman DU 640-ESANCO S.R.L- Arg) obteniéndose una concentración final de 7 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. La integridad del ARN fue verificada en gel de agarosa al 2 %. El cADN se obtuvo por retro transcripción de 2 μg ARN con el kit de transcriptasa reversa SuperScript II. Los controles negativos fueron realizados sin el agregado de ARN.

La amplificación por PCR se realizó utilizando la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y primers específicos (ver Tabla 2). En el caso de Lif y Fgf2, se accedió a la secuencia nucleotídica de interés a través de la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) y los primers fueron escritos con el programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) del Howard Hughes Medical Institute and National Institutes of Health. National Human Genome Research Institute. Se utilizó la amplificación de gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa (Gapdh) como estándar interno (Rhinn y col, 2008). El ciclado se realizó según el siguiente protocolo, con diferentes temperaturas de apareamiento específicas para cada par de primers (T° Annealing).

- a. 1 ciclo de: 92°C por 5 min.
- b. 35 ciclos de: 92°C por 1 min, T_A °C por 1 min, 72°C por 1 min.
- c. 1 ciclo de: 72°C por 10 min.

Las condiciones de reacción fueron optimizadas para las siguientes concentraciones finales: buffer PCR 1X; Cl_2Mg 4 mM; dNTPs 0,2 mM; primers 10 pm; Taq 1U; ADN 2 μg . El Volumen Final de Reacción (VFR) fue de 20 μl . El termociclador utilizado fue Gene Cyclor (BIO-RAD, Hemel Hempstead, UK). Para cada par de primers se realizaron PCRs con número de ciclos creciente, 29, 32, 35, 38 y 41. En todos los casos la meseta de la reacción se alcanzó después de los ciclos 38-41. Como se utilizaron 35 ciclos, podemos afirmar que las diferencias medidas entre los distintos grupos experimentales reflejaron la disponibilidad de transcritos en los extractos, aunque no podemos determinar sus valores exactos, ya que se trata de un método semicuantitativo.

Los amplicones fueron resueltos en geles de agarosa 4%, con marcadores de peso molecular (DNA Ladder, Invitrogen, CA) y teñidos con bromuro de etidio al 5%

(Sigma-Aldrich, St Louis, MO). Las bandas se midieron con las herramientas del Adobe Photoshop CS4 Extended, (Adobe System Complex, San Jose, CA USA, www.adobe.com) utilizando secuencias automáticas de ajuste y medición. Los resultados se expresaron como la proporción entre los píxeles de la banda experimental y los píxeles de la banda de Gapdh, multiplicados por 100.

Tabla 2.2. Primers utilizados para reacciones de PCR				
cDNA	Primer sentido	Primer anti-sentido	TM (°C)	Tamaño
Edn1	AGCTGGTGAAGGAAGGAACTACG	GACAGTGCAGAAAGGTGAGGTAGACT	60	728
Edn2	CTGCTGCTGTGTAAAGACTGGCAAG	AGGTTCTGTGCTCCCAAAGTGTC	62	652
Edn3	CTTGATGGGGGCGGATGACAAG	TGCCTCGCTAACTTGCTCAGGC	62	679
Ednra	CCCTTGATTACCGCCATTGAAA	TGACAACCAAGCAGAAGACAGT	60	346
Ednrb	GGCTAGTGTGTTTTTCAGAGGCTTG	CAGAACCACAGAGACCACCCAAAT	60	822
Lif	AAATGCCACCTGTGCCATACG	CAACTTGGTCTTCTCTGTCCCG	63	219
Fgf2	AAGCGGCTCTACTGCAAGAA	TCAGCTCTTAGCAGACAT	60	381
Gapdh	ACCACAGTCCATGCCATCAC	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	58	452

Adrenalectomías

Las adrenalectomías (AdrX) fueron realizadas según procedimientos convencionales (Foley, 2005). Los animales fueron anestesiados con desflurano. Se hizo una incisión

de la piel en la línea media dorsal, a la altura de las vértebras lumbares. La pared muscular se abrió por separado a la izquierda y a la derecha, con un instrumento romo. La adrenal izquierda se localiza lateralmente con respecto al bazo, sobre el polo anterior del riñón. La adrenal derecha se localiza cranealmente con respecto al riñón, cerca de la vena cava. Ambas adrenales fueron extraídas, junto con la grasa periadrenal. Se verificó microscópicamente la presencia de las adrenales en los tejidos obtenidos. La pared abdominal se cerró con suturas absorbibles, y la piel con sutura no absorbible. Como control de estos experimentos se utilizaron animales con incisión y sutura de los planos cutáneos.

Los ratones fueron sacrificados 6 o 48 h después de la AdrX y sus ojos fueron procesados para histología y TUNEL.

Estadísticas

Los datos cuantitativos son presentados como promedio \pm error estándar. El número de muestras para cada experimento se indica en las leyendas de las figuras correspondientes. Las variaciones de cada marcador en distintas condiciones experimentales fueron analizadas con ANOVA de una vía para muestras repetidas. Los promedios de todos los pares fueron comparados con el Test de Tukey para Comparaciones Múltiples. En algunos casos se empleó la prueba t de Student. Los cálculos fueron realizados con el programa GraphPad Prism versión 5.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com).

Capítulo 3

Receptores de glucocorticoides en la retina

Objetivos específicos

Trabajos previos de nuestro laboratorio demostraron la localización del sistema endotelinérgico en la retina (Torbidoni y col, 2005). Para estudiar su posible interacción con los glucocorticoides comenzamos por describir la distribución de los receptores GR α en la retina de ratones Balb-c.

Fundamentos

El receptor de glucocorticoides α (GR α) actúa como un factor de transcripción dependiente de ligando. En ausencia de éste último, GR α permanece en el citoplasma asociado a complejos de proteínas chaperonas que incluyen la *heat shock protein 90* (Hsp90), p23 y cochaperonas, como la fosfatasa de proteínas 5 (Picard, 2006). Después de unirse al ligando, el complejo hormona-receptor se transloca al núcleo donde se une a secuencias específicas de ADN (Elementos de Respuesta a Glucocorticoides, GRE) que modulan la transcripción génica (Kumar y Thompson, 2005; Kumar y Litwack, 2009).

El receptor también sufre diversas modificaciones post-traduccionales, incluyendo la fosforilación, que pueden ocurrir en ausencia o en presencia de ligando. Las fosforilaciones regulan diversas funciones tales como la estabilidad de la molécula, la sensibilidad a la hormona, la localización nuclear, la unión al ADN y otras interacciones que a su vez determinan la especificidad y la intensidad de los efectos del complejo receptor-ligando sobre sus genes blancos (Weigel y Moore, 2007). La mayor parte de los sitios identificados son motivos Ser-Pro, que sugieren su activación por quinasas-dirigidas-a-prolinas, como Pin1, una peptidil prolil isomerasa (Yi y col, 2005), y las quinasas dependientes de ciclinas (Kino y col, 2007)

En el GR humano se encuentran sitios de fosforilación en las serinas 203, 211 y 226, todas ubicadas en el motivo de activación funcional (AF1) de la región N-terminal del

receptor. La fosforilación de todos estos sitios aumenta después de la unión del ligando (Wang y col, 2007).

En ausencia de ligando, la fosforilación en ser211 es menor que en ser203. La unión a los agonistas aumenta la fosforilación en ambos sitios. La forma p-ser 203 se ubica predominantemente en el citoplasma, mientras que la forma p-ser 211 se concentra en el núcleo (Wang y col, 2002). Las formas p-ser211 y p-ser226 se unen más eficientemente a sus sitios GRE de manera hormona-dependiente y se ha sugerido que los distintos patrones de fosforilación determinarían la unión selectiva de los receptores a distintos genes (Blind y Garabedian, 2008).

Diseño experimental

Al comienzo del período experimental (12.00 h), los animales fueron mantenidos en oscuridad completa durante 24 horas. A las 12.00 h del día siguiente, los animales fueron divididos en grupos en forma aleatoria. Todos los grupos de animales retornaron a condiciones de iluminación estándar (12 h a 60 lux: 12 h en oscuridad).

Para estudiar la distribución de GR total y sus formas fosforiladas, los animales fueron fijados por perfusión 1 h después de completado el período de oscuridad total.

Para estudiar los efectos farmacológicos, los animales fueron inyectados inmediatamente después del período de oscuridad con: DEX (10 mg/kg/día, sc), MFP (10 mg/kg/2 días, sc,) o volúmenes similares del vehículo (VHC), propilen-glicol. Los ratones recibieron 1 ml de dextrosa al 5% i.p. según necesidad. Todos los animales fueron anestesiados y fijados por perfusión 6 h después del tratamiento farmacológico, a las 18.00 h. Empleamos el método inmunoenzimático (Cap. 2) para determinar la localización de los receptores GR y sus isoformas fosforiladas utilizando los anticuerpos GR total, GRp-Ser203 y GRp-Ser211 (Wang y col, 2002) en las retinas con y sin intervenciones farmacológicas.

Resultados

Distribución de GR total y sus formas fosforiladas

Se detectó inmunorreactividad de GR total en todos los estratos nucleares de la retina, aunque con distinta intensidad en cada uno de ellos (Fig. 3.1A-C). Tanto para el GR total como para las dos isoformas fosforiladas, encontramos la máxima intensidad de inmunorreactividad en la CCG. También se detectó inmunorreactividad en la CNI y en la CNE, pero de menor intensidad que en la CCG. La CNI y la CNE mostraron inmunorreactividad moderada para el GR total y débil para p-Ser203- y p-Ser-211-GRs. La primera de las isoformas fosforiladas, p-Ser203-GR, coloreó intensamente a las estructuras gliales de la CCG y la CNO. Además, esta isoforma fue la única que mostró afinidad por los segmentos externos. El EP presentó una débil inmunorreactividad para GR total, pero se tiñó intensamente con p-Ser211-GR.

Cambios producidos por la administración de DEX o MFP

No se detectaron cambios en la estructura de los fotorreceptores, ni de otras capas de la retina, 6 o 24 h después de la administración de DEX o MFP. Sin embargo, se detectaron algunos cambios en la localización e intensidad de la inmunoreactividad.

En las retinas fijadas a las 6 h, la localización de la inmunorreactividad para GR total era predominantemente nuclear. Sin embargo, la inmunorreactividad tenía mayor intensidad en las retinas en los animales que habían recibido DEX, que en los que habían recibido VHC o MFP (Fig. 3.2A-C).

Las diferencias fueron mucho más marcadas a las 24 h, cuando la inmunorreactividad en las retinas de animales que habían recibido DEX o MFP era mucho más intensa que a las 6 h. Para poder evaluar las diferencias se utilizaron diluciones más altas del anticuerpo primario. Además, a las 24 h, se observó mayor inmunorreactividad en todas las capas nucleares de las retinas MFP que en las retinas DEX. En ambas, la CNI mostraba algunos núcleos intensamente teñidos y de forma alargada. El tamaño y ubicación de estos núcleos permiten inferir que correspondían, presumiblemente, a las células gliales de Müller (Fig. 3.2D-F y G-I).

A las 6 h, además de un aumento generalizado en la inmunorreactividad nuclear de las isoformas fosforiladas en Ser203 y Ser211, observamos efectos selectivos sobre sus

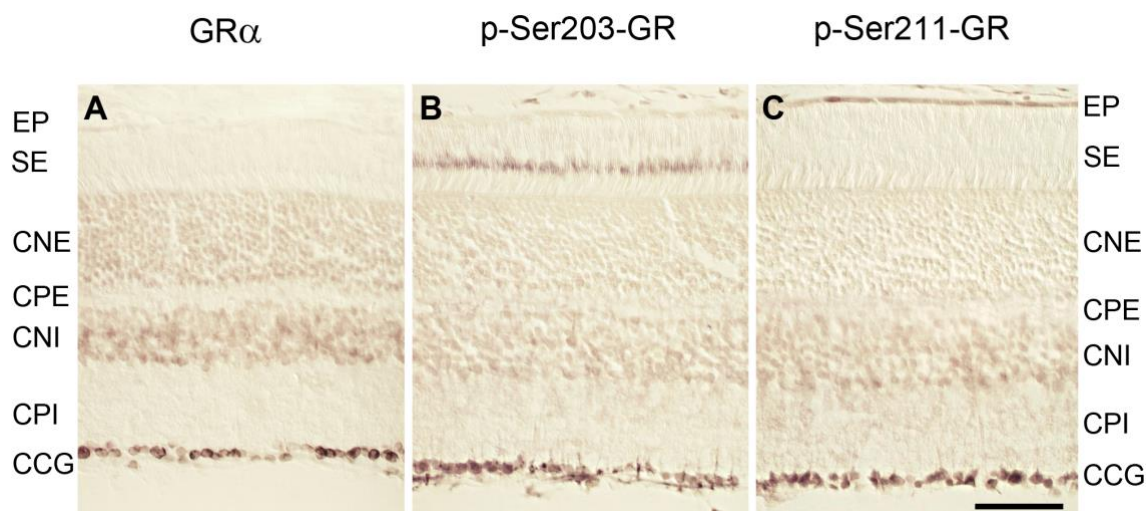


Figura 3.1: Distribución de los receptores de glucocorticoides en la retina normal. **A.** La inmunorreactividad GR total apareció en todas las capas nucleares, pero con mayor intensidad en la CCG. El EP mostró escasa inmunorreactividad. **B.** p-Ser203-GR también reaccionó con mayor intensidad en la CCG, donde también apareció en estructuras de tipo glial. La inmunorreactividad en la CNI y en la CNE fue débil, menor que la correspondiente al GR total. Además, p-Ser203-GR se observó en los segmentos externos. **C.** La inmunorreactividad de p-Ser211-GR también fue más intensa en la CCG, aunque no se observaron estructuras de tipo glial. Esta inmunorreactividad era de intensidad comparable a la de p-Ser203-GR en la CNI y CNE, pero de mayor intensidad a nivel del EP. Barra de calibración, 50 μ m.

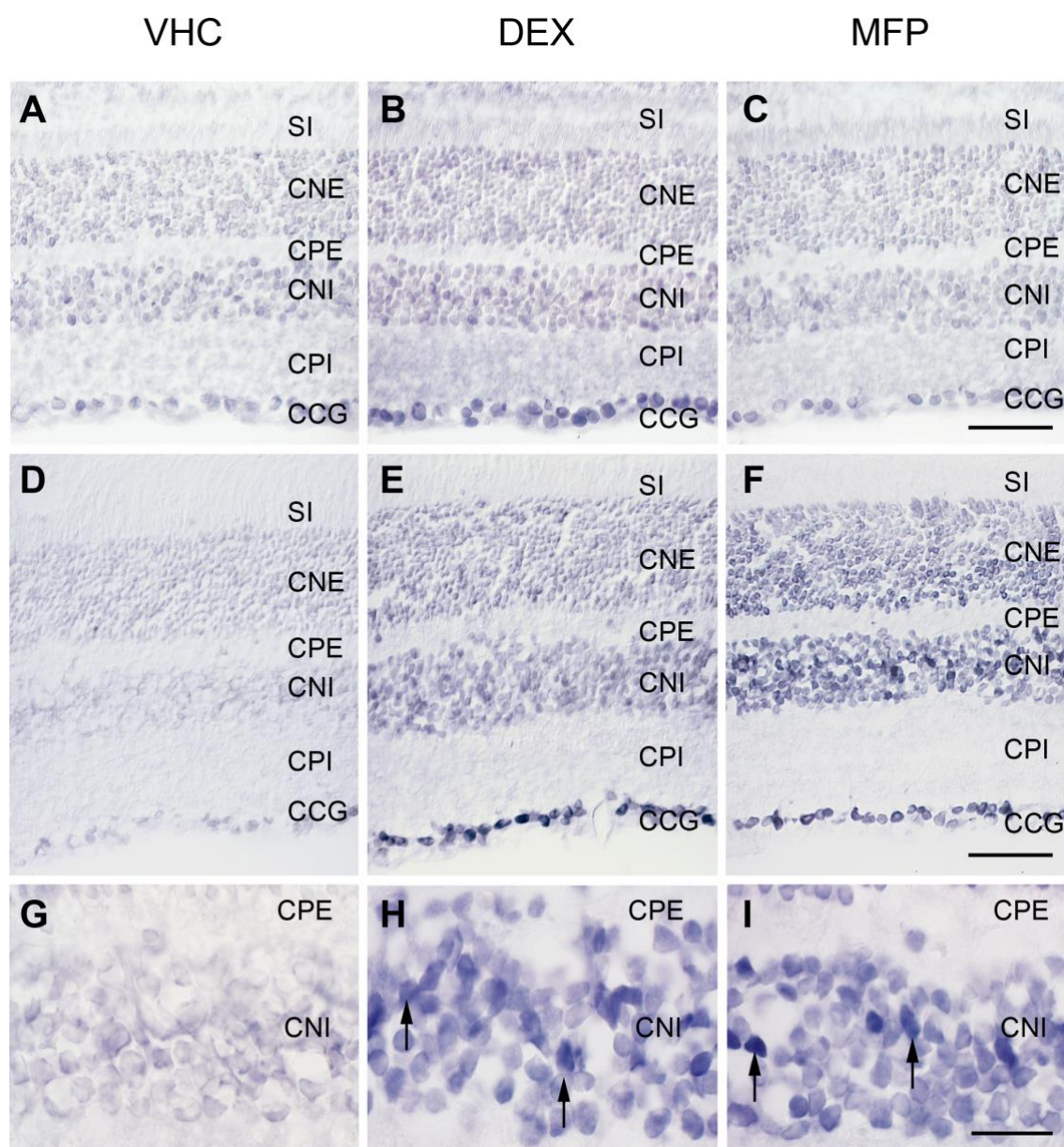


Figura 3.2. Inmunorreactividad para GR total en retinas bajo condiciones de iluminación basal, provenientes de animales que recibieron VHC, DEX o MFP. **A, B y C.** Retinas fijadas 6 h después de la inyección de VHC, DEX o MFO. Las microfotografías corresponden a retinas que fueron procesadas simultáneamente y muestran que la inmunorreactividad después de 6 h de DEX fue mayor que después de 6 h de VHC o MFP. Barra, 50 μ m. **D, E y F.** Retinas fijadas 24 h después de la inyección de VHC, DEX o MFO. Estas preparaciones se procesaron simultáneamente con una dilución del anticuerpo N499 más alta que la utilizada para las retinas de 6 h. En este experimento, la inmunorreactividad después de 24 h de MFP fue mayor que después de DEX, y ésta a su vez, mayor que la de VHC. Barra, 50 μ m. **G, H e I.** El aumento de inmunorreactividad afectó a todas las capas nucleares. En la CNI aparecieron núcleos elongados (flechas), con mayor intensidad de marca, probablemente correspondientes a células de Müller. Barra de calibración, 20 μ m.

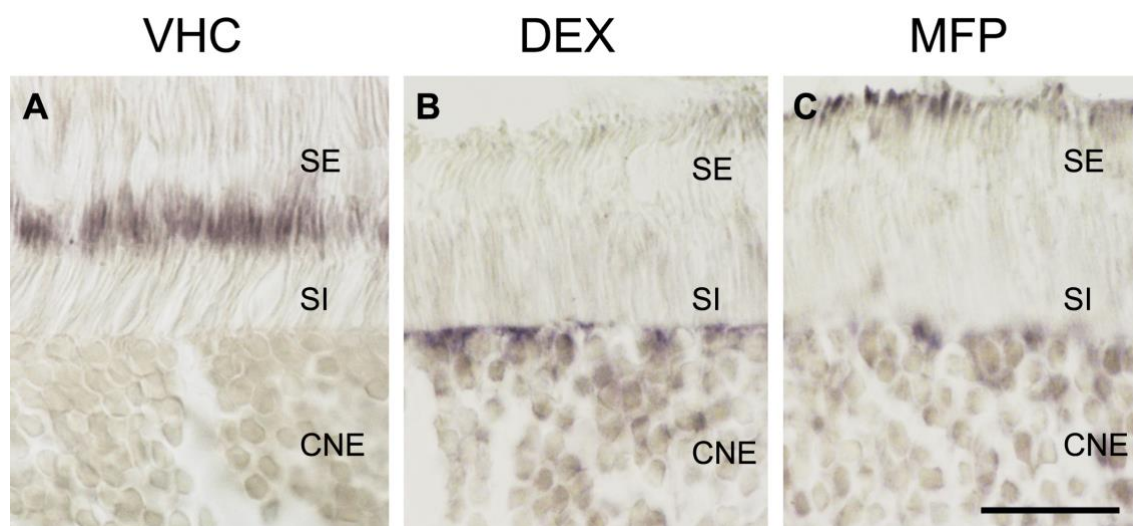


Figura 3.3. Inmunorreactividad para p-Ser203-GR en la capa de fotorreceptores de retinas expuestas a iluminación estándar, fijadas 6 h después de la administración de VHC, DEX o MFP. **A.** En los animales controles, inyectados con VHC, la inmunorreactividad de esta isoforma fosforilada aparece en la porción interna del segmento externo. **B.** Después de DEX, los segmentos externos no mostraron inmunorreactividad p-Ser203-GR. Ésta se encontraba en la CNE, a nivel de la limitante externa. **C.** Después de MFP, la mayor inmunorreactividad apareció en los extremos más externos de los fotorreceptores, aunque también se detectó inmunorreactividad de menor intensidad cercana a la limitante externa. Barra de calibración, 20 μ m.

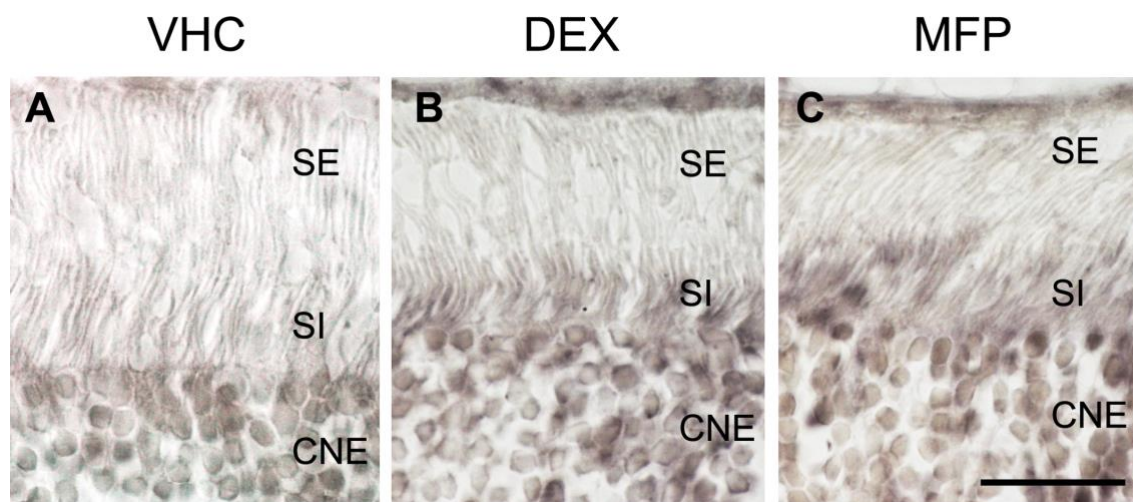


Figura 3.4. Cortes semejantes a los anteriores, pero con inmunotinción para la isoforma p-Ser211-GR. **A.** Los controles (VHC) mostraron débil coloración nuclear en la CNE. **B.** Después de DEX aumentó ligeramente la coloración nuclear, y apareció inmunotinción en los segmentos internos. **C.** La inmunorreactividad observada después de MFP era semejante a la observada en las retinas de ratones tratados con DEX. Barra de calibración, 20 μ m.

localizaciones en los segmentos internos y externos de los fotorreceptores. La inmunorreactividad para p-Ser203-GR, desapareció de los segmentos externos, donde se encontraba en las retinas controles (VHC). Por el contrario, se detectó inmunorreactividad en la zona de la CNE próxima a la membrana limitante externa (MLE). En los ratones que habían recibido MFP; la inmunorreactividad para p-Ser203-GR aparecía en el extremo más externo de los segmentos externos, próximos al EP. También se observó inmunorreactividad asociada a la MLE.

En los animales tratados con DEX, se observó inmunorreactividad para p-Ser211 en los segmentos internos. También apareció en idéntica localización en los animales que habían recibido MFP.

Discusión

Localización de los GRs

La inmunorreactividad para GR total presentó localización nuclear en todas las capas de la retina. Las diferencias en la intensidad de la inmunorreactividad nuclear en la CCG, la CNI y la CNE probablemente reflejan la mayor proporción de eucromatina en el núcleo de las células ganglionares con respecto a los núcleos de los fotorreceptores.

Solo en la CCG, donde la inmunorreactividad fue más intensa, se encontró cierta localización citoplasmática. La falta de coloración citoplasmática no fue un artificio del procedimiento, ya que observamos inmunorreactividad citoplasmática en el EP. La preponderancia de la localización nuclear sobre la citoplasmática podría ser una peculiaridad de la retina, ya que en las neuronas del hipocampo la localización habitual es en el citoplasma (Sarabdjitsingh y col, 2010). Generalmente se acepta que el GR no unido a ligando reside predominantemente en el citoplasma, y que la activación hormonal determina su translocación al núcleo con la consiguiente modulación genómica (Nishi y col, 1999). En consecuencia, inferimos que este anticuerpo principalmente mostraba GR α unido a sus ligandos endógenos (Nicolaidis y col, 2010).

Toda la evidencia disponible al momento de realizar esta tesis indicaba que los roedores solo producían receptores de la forma α , ya que no se habían detectado transcritos con

la secuencia desordenada del extremo C basada en el distinto uso de los exones 9 α y 9 β (Otto y col, 1997). Sin embargo, en 2010 se demostró que los exones 9 α y 9 β del ratón podían ser recortados y empalmados utilizando un sitio de recorte ubicado en una región previamente asignada al exón 8. Este proceso origina una isoforma β murina con una secuencia C-terminal de 15 aminoácidos, que es de la misma longitud y comparte buena parte de los aminoácidos encontrados en el extremo C del GR β humano (Hinds y col, 2010). Por el momento se desconoce la fisiología del GR β murino y no se dispone actualmente de anticuerpos que permitan su localización. Más aún, existen todavía controversias sobre su localización en las células humanas. Originalmente se reportó que su ubicación es constitutivamente nuclear (Oakley y col, 1996). Sin embargo, experimentos más recientes sugieren que en algunos casos se localiza en el citoplasma y se transloca al núcleo cuando las células son tratadas con MFP (Lewis-Tuffin y col, 2007). Entonces, es posible que parte de la inmunorreactividad detectada por el anticuerpo contra GR total corresponda a la forma GR β .

Sin embargo, todos los tipos celulares de la retina con inmunorreactividad para GR total también mostraron inmunorreactividad para las dos isoformas fosforiladas, confirmando la presencia de GR α en dichos sitios. Además, la presencia de las isoformas fosforiladas en localizaciones no nucleares sugiere efectos no genómicos de GR α .

Cambios inducidos por DEX y MFP

La mayor inmunorreactividad de GR después de la administración de DEX puede ser explicada por la translocación del receptor unido a su ligando (Nishi y col, 1999; Nicolaides y col, 2010). La aparición de núcleos de células de Müller intensamente inmunorreactivos es coherente con algunas actividades de los glucocorticoides en la retina. En efecto, desde hace muchos años se conoce que estos esteroides son imprescindibles para la maduración glial en el embrión, donde estimulan la expresión de la glutamino sintasa (GS), una enzima selectivamente localizada en las células de Müller (Vardimon y col, 1986). Como las células de Müller son productoras de factores tróficos que estimulan la supervivencia de los fotorreceptores (Wahlin y col, 2000), el aumento de la inmunorreactividad de GR en los núcleos de estas células podría estar correlacionado con el efecto protector de los corticoides para las neuronas de la retina externa (Wenzel y col, 2001a).

Algunos trabajos sugieren que se acumula ARNm de GR después de la adrenalectomía, especialmente en cerebro y riñón (Kalinyak y col, 1987). Por el contrario, el tratamiento con DEX resulta en una disminución de la acumulación de este ARNm, que también afectaría selectivamente a los distintos tejidos (Kalinyak y col, 1987). Trabajos *in vitro* de la misma época indican que DEX también reduce la disponibilidad de GR-ARNm pero en el plazo de 2 o más días (Silva y col, 1994). Sin embargo, no existe evidencia sobre los factores fisiológicos que regulan la disponibilidad de las distintas isoformas traduccionales de GR α .

El aumento de la inmunoreactividad en las células de Müller provocado por MFP, podría atribuirse a la posible translocación nuclear de los GRs acoplados a MFP (Lewis-Tuffin y col, 2007). Por el contrario, podría reflejar una mayor expresión de ARNm-GR, tal como la que se produce después de la adrenalectomía.

Los cambios de localización e intensidad de ambas isoformas fosforiladas en los segmentos externos, encontradas apenas 6 h después de la administración de glucocorticoides o su bloqueo, sugieren que estos GRs podrían actuar directamente sobre el fotorreceptor en forma no genómica. Aunque se requieren mayores estudios para identificar su ubicación submicroscópica, podrían ser GRs asociados a membranas, ya sea a las membranas del segmento externo (p-Ser203-GR) o a las membranas mitocondriales (p-Ser211-GR). Los GRs asociados a membranas se encuentran en numerosas neuronas (Johnson y col, 2005), y permiten efectos ultrarrápidos, producidos con la misma velocidad por conjugados impermeables de DEX-seroalbúmina como por corticosteroides solubles (Xiao y col, 2010). Por otra parte, se sabe que el GR puede translocarse al interior de las mitocondrias, y que esta localización se asocia con funciones de neuroprotección (Du y col, 2009).

Los cambios en la asociación de la isoforma p-S203-GR con el segmento externo podrían relacionarse con la translocación de las proteínas que intervienen en la fototransducción (Calvert y col, 2006). En los fotorreceptores adaptados a la oscuridad, la transducina y la arrestina se concentran en el segmento externo e interno, respectivamente. La estimulación luminosa induce un rápido movimiento de la transducina hacia el segmento interno y el terminal sináptico, mientras que la arrestina se mueve en dirección inversa desde el segmento interno hacia el externo. Se postula

que esta translocación no solo contribuye a la adaptación a la luz sino que también protegería a los fotorreceptores de las lesiones por estrés luminoso (Artemyev, 2008).

Sitios de acción de los glucocorticoides en la retina neural

La ubicación de la inmunorreactividad para GR indica que, en condiciones de iluminación estándar, los glucocorticoides podrían actuar sobre los fotorreceptores directamente, o a través de moléculas activadas por ellos en las células de Müller o en el EP. La localización nuclear de los GRs no deja dudas sobre la importancia de los efectos genómicos. Sin embargo, la presencia de receptores fosforilados en los segmentos externos e internos sugiere la posibilidad de efectos no genómicos, que son de gran importancia en la regulación de la activación neuronal (Groeneweg y col, 2011).

Capítulo 4

Vida y muerte de los fotorreceptores: papel de los glucocorticoides

Objetivos específicos

Dado que los glucocorticoides son protectores de la retina, intentamos demostrar que el bloqueo de sus receptores tendría el efecto opuesto. Por lo tanto, los objetivos de este capítulo consisten en:

- Evaluar el efecto de DEX, MFP o su combinación sobre la supervivencia de los fotorreceptores en condiciones de iluminación estándar.
- Determinar las modificaciones de moléculas relacionadas con el control de la muerte celular, Bcl-X_L, Bcl2, caspasa 3 clivada (CC-3), fragmentación del ADN (TUNEL), histona H2XA fosforilada (p-H2XA), inducidas por DEX, MFP o su combinación.
- Comparar las respuestas de la retina a MFP y a la adrenalectomía (AdrX).

Fundamentos

Hasta el presente, los efectos de glucocorticoides sobre la supervivencia de los fotorreceptores solo fueron estudiados en retinas estresadas (Organisciak y Vaughan, 2010). Sin embargo, es razonable suponer que la ausencia de señales de esta vía podría afectar la viabilidad de los fotorreceptores. En este caso, deberíamos encontrar que la administración de DEX estimula la actividad de moléculas anti-apoptóticas, mientras que su bloqueo por MFP determinaría lo opuesto, el predominio de las moléculas pro-apoptóticas, con la consiguiente injuria o desaparición de los fotorreceptores afectados.

Es bien conocido que los glucocorticoides pueden ser pro- o anti-apoptóticos según el fenotipo celular (Amsterdam y col, 2002). La dirección de la respuesta en uno u otro sentido parece depender de cambios en los niveles de Bcl-X_L (Viegas y col, 2008) que, curiosamente, es el miembro predominante de la familia bcl-2 en la retina (Levin y col, 1997). El gen de la proteína Bcl-X origina, por recorte y empalme alternativos,

isoformas de distinta longitud que cumplen funciones pro- o anti-apoptóticas. La forma larga, Bcl-X_L, es anti-apoptótica y parece ser la molécula que determina la respuesta celular a los corticoides (Viegas y col, 2004).

Dado que MFP es también un buen antagonista de los receptores de progesterona, comparamos los efectos de esta droga con los de la AdrX, a fin de verificar si los efectos dependen de corticosteroides.

Diseño experimental

Al comienzo del período experimental (12.00 h), los ratones (machos Balb-c, 35-45 días de edad) fueron mantenidos en oscuridad completa durante 24 horas. A las 12.00 h del día siguiente, los animales fueron divididos en distintos grupos en forma aleatoria. Todos los grupos retornaron a iluminación estándar (12 h a 60 lux: 12 h en oscuridad) pero cada uno recibió un tratamiento farmacológico diferente.

Los animales recibieron inyecciones subcutáneas de DEX (4 mg/kg/día, Sidus, Buenos Aires) o de MFP (10 mg/kg/2 días; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) disuelto en propilenglicol (VHC). Otros animales recibieron DEX y MFP (D+M) en inyecciones diferentes pero simultáneas. En algunos casos, los resultados indicaron la necesidad de ensayar otras dosis, que se indican en el texto. Los animales controles recibieron volúmenes equivalentes de VHC. Dos horas después de iniciado el experimento, los animales tratados con MFP recibieron 1 ml de glucosa al 5% (Fidex, Buenos Aires).

Los animales fueron sacrificados a las 6 o 48 h, o a los 7 días de iniciado el experimento. Todos los grupos permanecieron bajo iluminación estándar. Los grupos tratados recibieron una única inyección de MFP, y 1 o 2 inyecciones de DEX.

A fin de comparar la respuesta a la MFP con la respuesta a la privación de glucocorticoides endógenos, se estudiaron animales adrenalectomizados.

Para evaluar la pérdida de los fotorreceptores se analizaron las hileras de núcleos en la CNE, tal como se describe en el Cap. 2. Para determinar el balance entre los componentes pro- y antiapoptóticos se utilizaron Western blots e inmunohistoquímica para la detección de Bcl-X_L, Bcl-2, CC-3 y p-H2XA, y el procedimiento de TUNEL para la identificación de ADN fragmentado.

Resultados

Alteraciones en la estructura de la CNE

A excepción de los cambios en la intensidad de la inmunoreactividad de GR, no se observaron modificaciones de la CNE a las 6 y 48 h. Sin embargo, las células dañadas pueden parecer estructuralmente intactas para desaparecer después de varios días. Por lo tanto, evaluamos la estructura de la CNE a los 2 y a los 7 días de una única inyección de MFP. Los animales de los grupos experimentales DEX y D+M recibieron corticosteroide sólo durante los dos primeros días del experimento. Para todos los puntos se estudiaron 3 ojos correspondientes a 3 animales diferentes.

No se detectaron alteraciones de la CNE en los animales que recibieron VHC o DEX, ni a los 2 ni a los 7 días. Por el contrario, se encontraron déficits de esta capa nuclear en las retinas de animales MFP y D+M (Fig. 4.1). En ambos casos, el daño estaba focalizado cerca de la papila del nervio óptico. A los 2 días, la zona lesionada de las retinas MFP era de grado 1 y pequeña ($18,2 \pm 1,7$ % del área total, $n = 3$). En las retinas D+M, la lesión, del mismo grado, era aún de menor tamaño ($4,9 \pm 2,5$ % del área total, $n = 3$). La diferencia fue estadísticamente significativa (prueba t, $p < 0.012$).

A los 7 días se observó un área lesionada de mayor extensión y gravedad (Fig. 4.1). En las retinas MFP el área lesionada abarcaba aproximadamente la mitad de la superficie ($53,0 \pm 1,5$ % del área total, $n = 3$). En el grupo D+M, la lesión se extendía sobre una superficie menor ($14,0 \pm 4,2$ % del área total, $n = 3$). La diferencia fue estadísticamente significativa (prueba t, $p < 0.001$). Sólo se encontraron lesiones de grado 3 en las retinas del grupo MFP, donde ocupaban $14,9 \pm 2,1$ % del área afectada. Este valor fue significativamente diferente de 0 (prueba t de una muestra, $p < 0.02$).

Cambios en los niveles de rodopsina

Dos días después de la administración de DEX o MFP, los niveles de rodopsina de las retinas controles (VHC) no eran estadísticamente diferentes de los niveles en las retinas con DEX o MFP (Fig. 4.2A). A los 7 días, el tratamiento con DEX no había modificado los niveles de rodopsina, mientras que la administración de MFP los había reducido a una tercera parte de los controles. El tratamiento combinado evitó parte de esa reducción, aunque la rodopsina aún estaba aproximadamente al 50% de los controles (Fig. 4.2B).

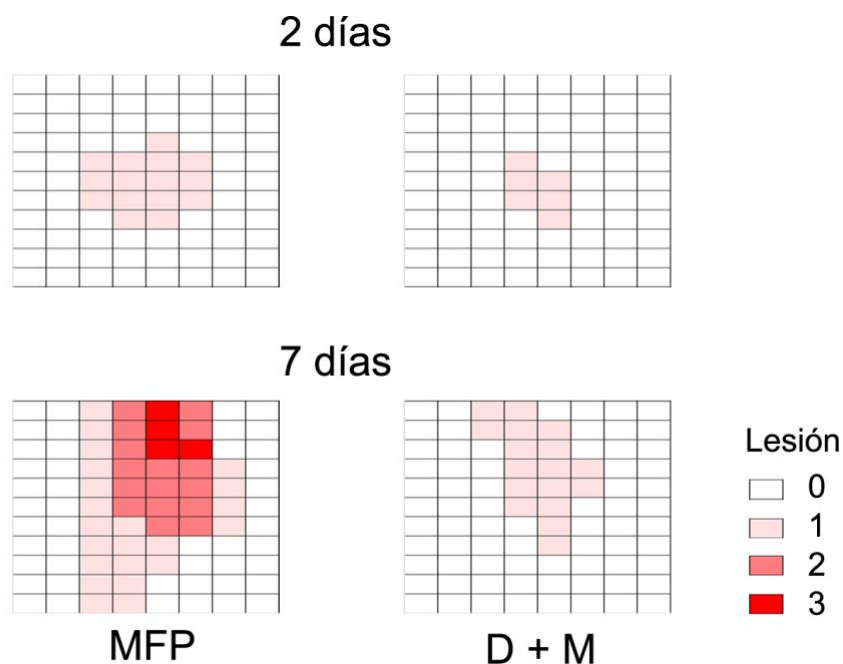


Figura 4.1. Mapas de la CNE, con el hemisferio temporal a la izquierda y el nasal a la derecha. Cada hilera representa 270 μm a lo largo del eje dorsoventral del ojo, y cada columna representa 1/8 del eje témporo-nasal. Se muestran las áreas lesionadas (0, no lesión; 3, lesión máxima) en retinas de animales que recibieron MFP (una dosis al comenzar el experimento), solo o combinado con DEX (dos dosis a las 0 y 24 h, D+M) sin exposición a niveles tóxicos de iluminación. **A.** En los animales fijados 2 días después del inicio del experimento únicamente se encontraron lesiones de grado 1 en la zona central de la retina. El  rea lesionada fue significativamente menor en los animales D+M. **B.** En los animales fijados 7 días después del inicio del experimento, el área lesionada fue mayor, abarcaba parte del hemisferio ventral y alcanzaba grado 3. El tratamiento combinado redujo la extensión y gravedad de la lesión, pero no la evitó totalmente.

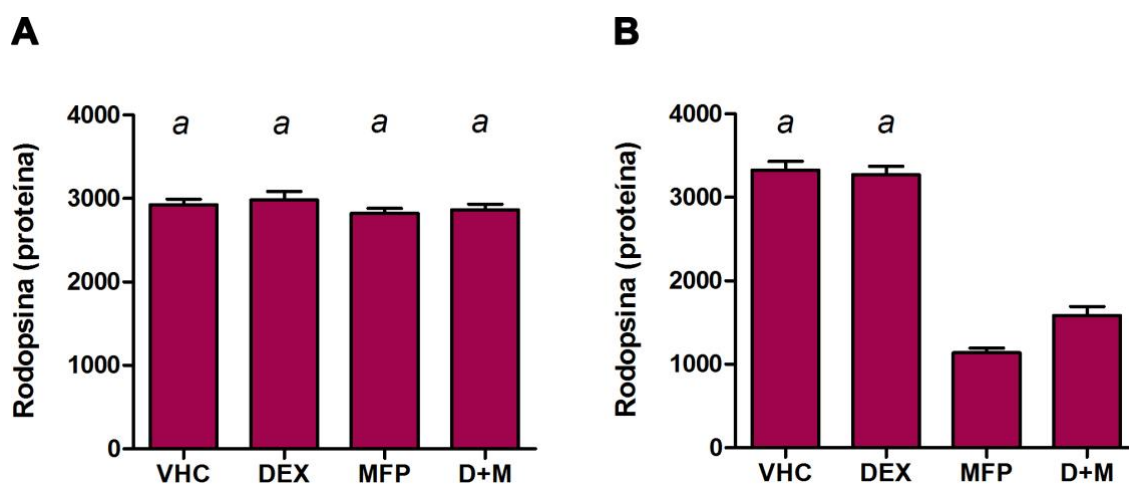


Figura 4.2. Rodopsina a los 2 y 7 días después de la administración de DEX, MFP o la combinación de ambas. **A.** Dos días después de la administración de DEX o MFP, no se detectaron diferencias entre los distintos grupos experimentales ($n = 3$). **B.** A los 7 días (ANOVA, $p < 0,001$; $n = 3$) las retinas sometidas a MFP tenían una tercera parte de la rodopsina basal, mientras que aquellas que habían recibido DEX y MFP mostraban un descenso menor $p < 0,001$ para MFP y D+M vs cualquiera de los otros puntos).

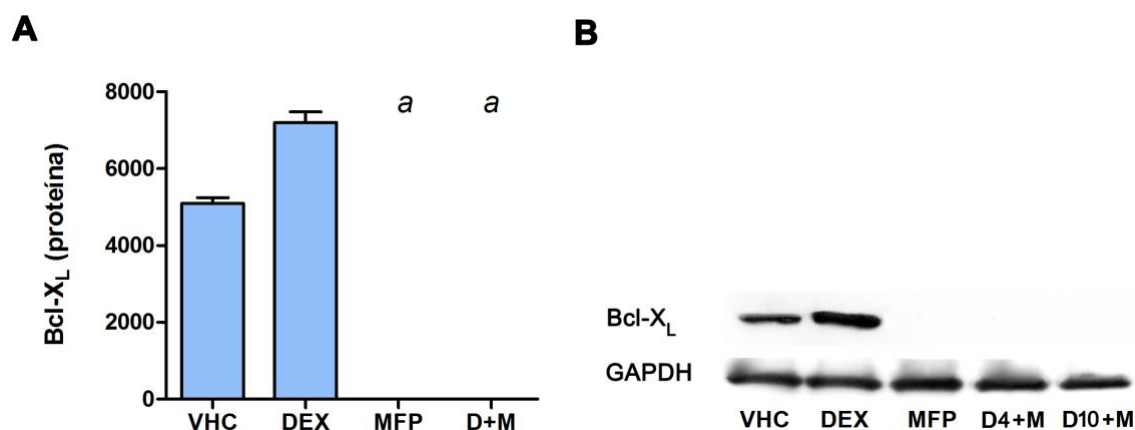


Figura 4.3. **A.** Análisis densitométrico de proteinogramas para Bcl-X_L 6 horas después del tratamiento farmacológico (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 3$). Todas las comparaciones fueron significativas ($p < 0,001$ VHC vs DEX, MFP o D+M; DEX vs MFP o D+M), salvo las indicadas por dos letras iguales. Bcl-X_L aumentó después de DEX, pero descendió por debajo de los niveles de detección después de MFP o D+M. **B.** Proteinogramas típicos que muestran la total desaparición de Bcl-X_L en los animales que recibieron MFP, o la combinación con DEX 4 mg/kg (D4+M). En este experimento se ensayó una dosis mayor de DEX (10 mg/kg, D10+M) que tampoco evitó la desaparición de esta proteína.

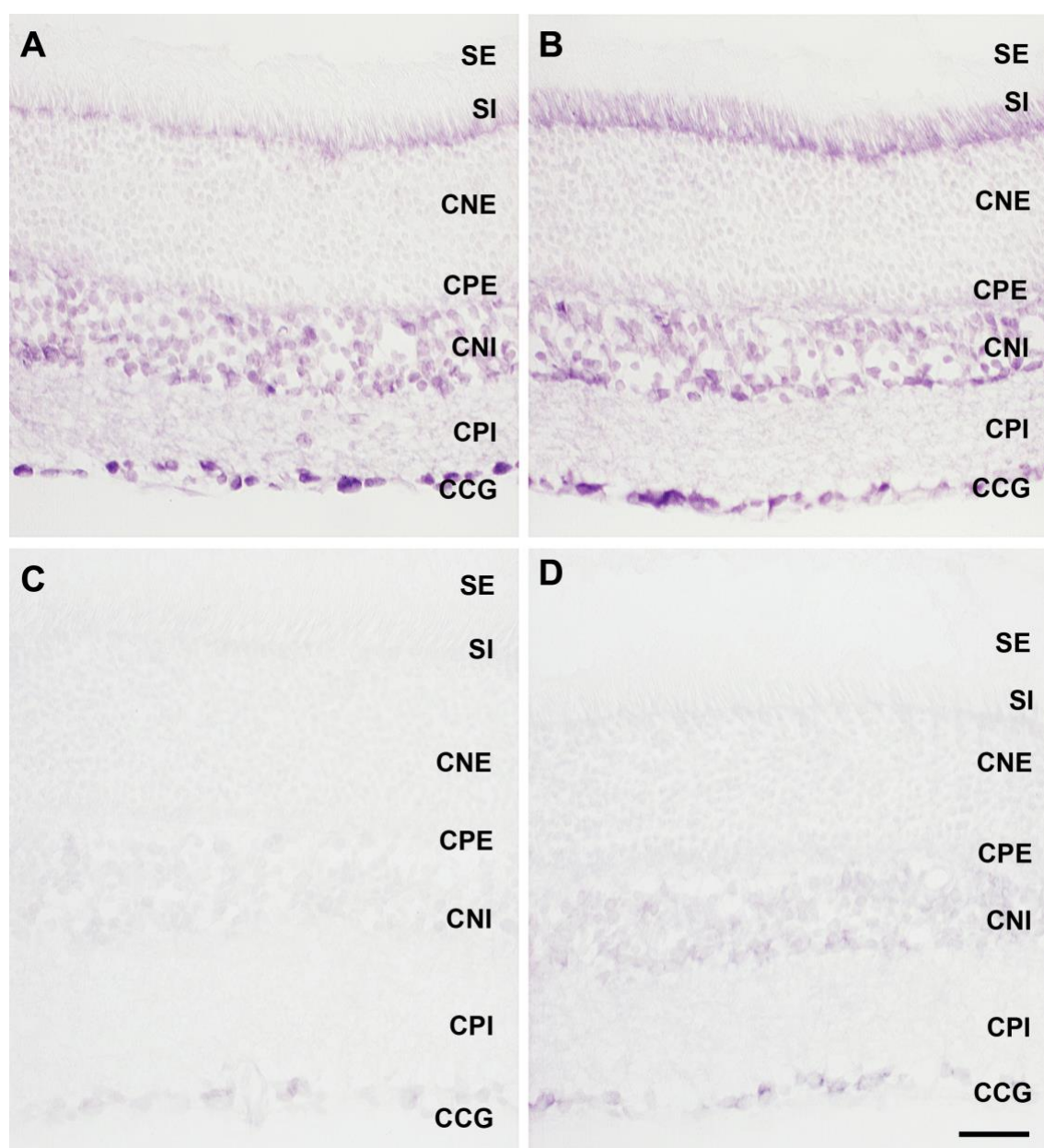


Figura 4.4. Inmunorreactividad de *Bcl-X_L* en cortes de retinas fijadas 6 h después de las intervenciones farmacológicas. **A.** Retinas controles, donde la inmunorreactividad se concentró en la CCG, la CNI y los SI. **B.** Después del tratamiento con DEX se observó un ligero aumento especialmente a nivel de los segmentos internos (SI). **C.** No se observó inmunorreactividad después de la administración de MFP. **D.** El tratamiento combinado (D+M) apenas produjo un ligero aumento de la inmunorreactividad en la CCG. Barra de calibración, 40 μ m.

Marcadores de muerte o supervivencia celular

Bcl-X_L

6 horas después del tratamiento encontramos que la proteína Bcl-X_L aumentaba significativamente a consecuencia de la administración de DEX. Por el contrario, no se pudo detectar esta proteína después de MFP, ni después de la administración simultánea de DEX y MFP (Fig. 4.3A). Tampoco se detectó Bcl-X_L cuando se utilizó una combinación de 10 mg/kg/día DEX y 10 mg/kg/2 días MFP (4.3B). La ausencia de esta proteína se mantuvo por lo menos durante los 2 días siguientes a una única administración de MFP.

En las retinas controles se observó inmunorreactividad Bcl-X_L en todos los estratos. La mayor intensidad aparecía en las células de la CCG y la CNI. La inmunorreactividad en la retina externa era de menor intensidad, y se concentraba en los segmentos internos (Fig. 4.4A). Después de la administración de DEX, la inmunorreactividad de Bcl-X_L aumentó en todas las capas de la retina (Fig.4.4B) y desapareció totalmente luego de MFP (Fig. 4.4C). La inmunorreactividad con el tratamiento combinado fue escasa, semejante a la observada en las retinas con MFP solamente (Fig. 4.4D).

Caspasa-3 clivada

Esta proteasa ejecutora de la apoptosis fue estudiada mediante Western blots. Como era esperado, no se detectó esta proteína en los animales controles. Por el contrario, apareció en cantidades significativas apenas a las 6 horas de administrar distintas dosis (4, 10 y 30 mg/kg) de MFP (Fig. 4.5A). Se observó proteína CC-3 aun con la dosis más baja de 4 mg/kg. Los niveles de proteína CC-3 se duplicaron con 10 mg/kg y se cuadruplicaron con 20 mg/kg de MFP (Fig. 4.5A).

En el siguiente experimento estudiamos el efecto de distintas dosis de DEX sobre ratones que habían recibido MFP (10 mg/kg) inmediatamente antes de la inyección de DEX (Fig. 4.5B). En presencia de DEX (4 mg/kg) los niveles de CC-3 fueron apenas una tercera parte de los niveles determinados por MFP. Curiosamente, una dosis mayor de DEX (10 mg/kg) permitió un aumento mayor de CC-3 (Fig. 4.5B).

Finalmente, analizamos los niveles de CC-3 a 6 y 48 h, utilizando 4 mg/kg/día de DEX y 10 mg/kg/2 días de MFP (Fig. 4.5C). Al igual que los controles (VHC), los animales tratados con DEX no presentaron proteína CC-3, ni a las 6 ni a las 48 h. Como se mencionó más arriba, a las 6 h, MFP indujo la aparición de CC-3 en forma parcialmente

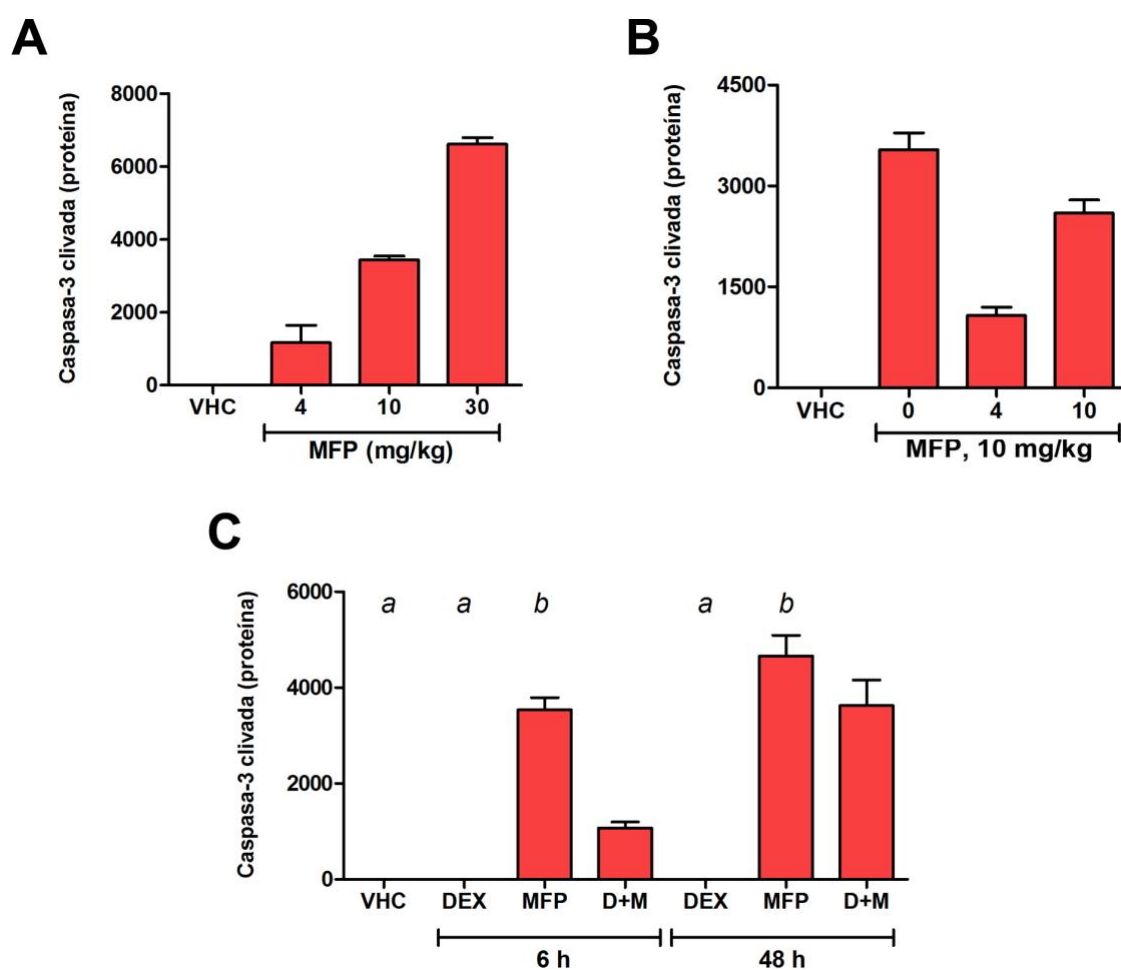


Figura 4.5. CC-3 a las 6 h de las intervenciones farmacológicas (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 3$ para A, B y C). **A.** Aumento de CC-3 según la dosis de MFP. 4 mg/kg fueron suficientes para la aparición de esta caspasa ejecutora ($p < 0,001$ para 30 vs 10, 4 o VHC y 10 vs VHC; $p < 0,01$ para 10 vs 4). **B.** Modificaciones de CC-3 en animales que recibieron MFP (10 mg/kg) y las dosis de DEX indicadas en cada barra (0, 4 y 10 mg/kg). Todos los pares comparados mostraron diferencias significativas ($p < 0,01$). **C.** Comparación de los niveles de CC-3 a las 6 y 48 horas de la administración de DEX (4 mg/kg/día) y MFP (10 mg/kg, una dosis). La ausencia de diferencias estadísticamente significativas está indicada por una misma letra. Nótese el aumento de CC-3 en los animales D+M a las 48 h comparado con los animales de 6 h ($p < 0,001$).

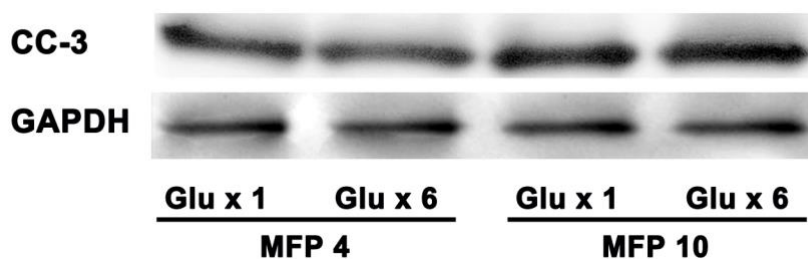


Figura 4.6. Proteinogramas de CC-3 y sus correspondientes controles con GAPDH en extractos de retina tomados 6 h después de la administración de 4 o 10 mg/kg de MFP. Los niveles de CC-3 no fueron modificados por la administración de 1 o 6 suplementos de glucosa (Glu x1 vs. Glu x 6).

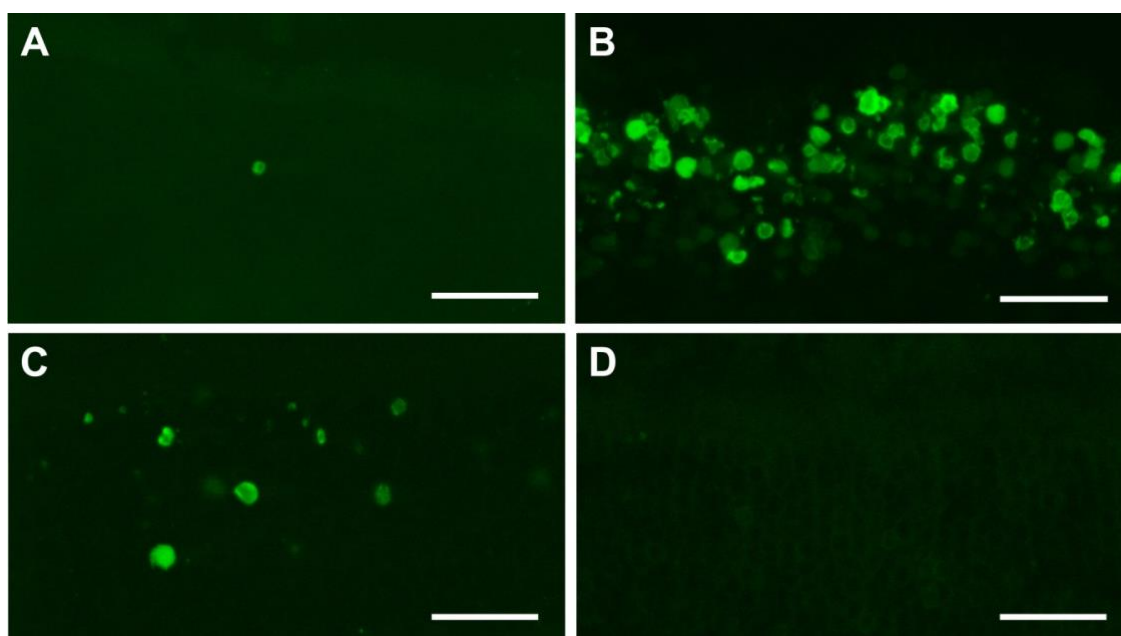


Figura 4.7. Microfotografías de la reacción TUNEL en la CNE. **A.** Algunos núcleos aparecieron apenas 2 h después de la administración de MFP. **B.** El número de núcleos TUNEL⁺ aumentó considerablemente a las 6 h. La foto muestra una región central de la retina. **C.** En las mismas retinas, las áreas más periféricas mostraban menor densidad de núcleos TUNEL⁺. **D.** No se detectaron núcleos TUNEL⁺ en las retinas de animales tratados con D+M. Barras de calibración, 20 μ m.

prevenible por DEX. A las 48 h, los niveles de CC-3 inducidos por MFP era aún mayores y DEX parecía menos eficiente para prevenir su acumulación. Estos animales, a pesar de haber recibido dos dosis de DEX, tenían 4 veces más CC-3 que el grupo D+M a las 6 h.

Caspasa-3 clivada y disponibilidad de glucosa

La principal (o única) fuente de energía de los fotorreceptores es la glucosa (Cohen y Noell, 1960; Gospe y col, 2010). Como tanto la gluconeogénesis como la glucogénesis requieren glucocorticoides, el bloqueo de GR α disminuiría la producción de energía (Christiansen y col, 2007) y este déficit podría ser la causa del efecto pro-apoptótico. De hecho, los ratones que reciben MFP requieren un suplemento de glucosa para evitar el deterioro de su estado general. En los experimentos de 6 h de duración, todos los ratones inyectados con MFP recibieron una inyección de glucosa (1 ml de dextrosa al 5% i.p.) 2 h después de la intervención farmacológica. Para verificar si la aparición de CC-3 dependía de la privación de glucosa, comparamos dos grupos de ratones que recibieron el suplemento habitual, con otros dos grupos que recibieron 6 inyecciones de glucosa, la primera inmediatamente después de administrada la MFP. El número de suplementos de glucosa no modificó los niveles de proteína CC-3 en los animales que recibieron 4 o 10 mg/kg de MFP (Fig. 4.6). Tampoco dependían de la pigmentación de los animales, ya que en experimentos piloto realizados en ratones de la cepa C57Bl6/J MFP y DEX tuvieron el mismo efecto sobre la activación de la CC-3.

Fragmentación del ADN

En el proceso de fragmentación del ADN, las endonucleasas apoptóticas generan, extremos 3-OH libres. Mediante el procedimiento TUNEL, la enzima nucleotidil terminal transferasa (TdT) se une a estos extremos 3'-OH libres y cataliza la adición de deoxinucleótidos acoplados a una marca fluorescente. No se detectaron núcleos TUNEL⁺ en las retinas controles ni en las tratadas con DEX. Por el contrario, en aquellas que habían recibido MFP, ya se encontraron algunos núcleos TUNEL⁺ a las 2 h de iniciado el experimento (Fig. 4.7A). Los núcleos TUNEL⁺, exclusivamente localizados en la CNE, fueron mucho más numerosos a las 6 h (Figs. 4.7B,C; 4.8A). Aunque los núcleos TUNEL⁺ aparecían con mayor densidad en la región próxima a la papila del nervio óptico, se encontraban prácticamente en toda la retina (Fig. 4.8A). A

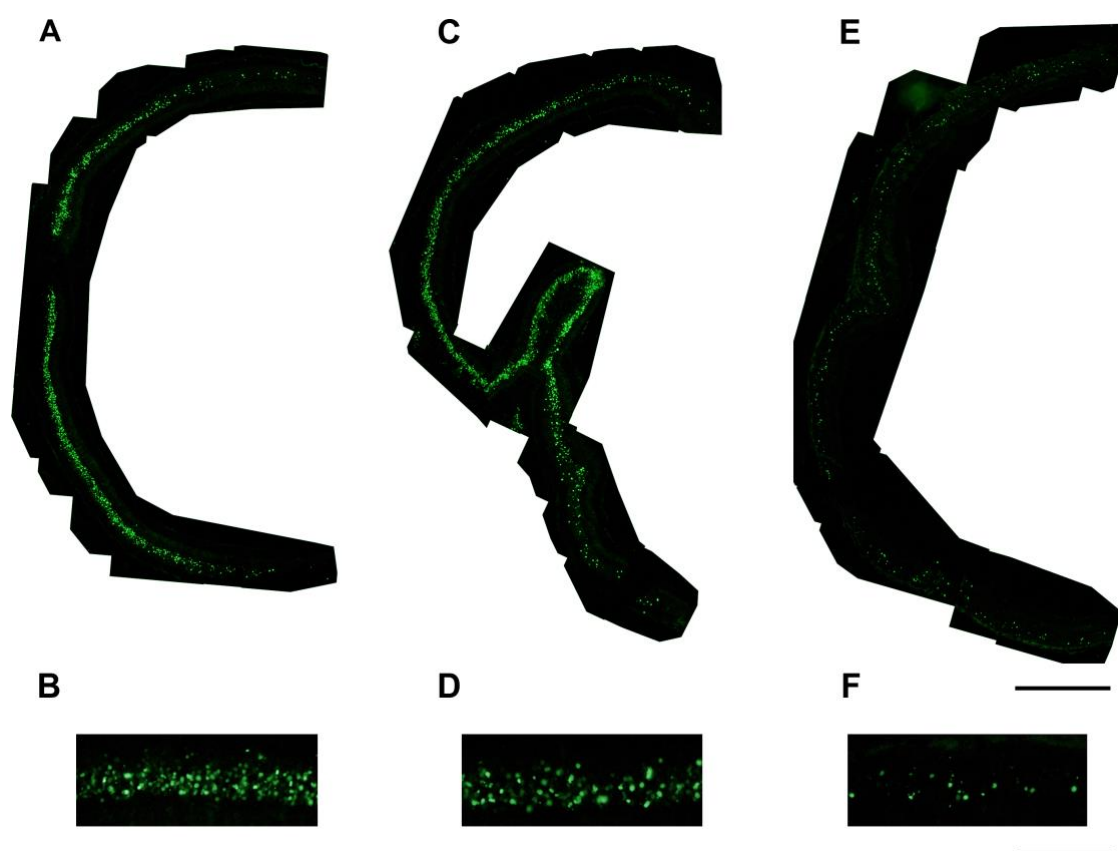


Figura 4.8. Montajes fotográficos de cortes ecuatoriales de retinas procesadas con TUNEL para demostrar la fragmentación del ADN provocada por MFP. **A.** Numerosos núcleos TUNEL⁺ aparecieron, en toda la extensión de la retina, a las 6 hs de la administración de MFP. **B.** Los núcleos TUNEL⁺ estaban selectivamente localizados en la CNE. **C.** También se observaron gran cantidad de núcleos TUNEL⁺ 2 días después de la administración de MFP. **D.** Los núcleos con ADN fragmentado aparecieron también en la CNE. **E.** En los animales que recibieron D+M, las retinas presentaron un número mucho menor de núcleos TUNEL⁺. **F.** En las retinas D+M, LA CNE mostró un número mucho menor de núcleos TUNEL⁺. Barras de calibración, A, C, E, 100 μ m; B, D, F, 40 μ m.

las 6 h no se detectaron núcleos TUNEL⁺ en los animales que recibieron el tratamiento combinado D+M (4.7D).

Dos días después de una única inyección de MFP se seguían observando numerosos núcleos TUNEL⁺, siempre localizados selectivamente en la CNE (Fig. 4.8B). En este tiempo también se detectaron núcleos TUNEL⁺ en los animales que habían recibido DEX y MFP, aunque en menor cantidad (Fig. 4.8C).

Histona 2XA fosforilada (p-H2XA)

La fragmentación del ADN puede ser reparada por los mecanismos intrínsecos de conservación del genoma (Finn y col, 2011). En consecuencia, evaluamos los niveles de la proteína histona 2AX fosforilada (p-H2AX), una variante de la H2 que se fosforila rápidamente en la cromatina vecina a las roturas de la doble cadena del ADN (van Attikum y Gasser, 2009). La presencia de esta histona fosforilada sirve tanto como marcador de las roturas de la doble cadena como evidencia de la activación de mecanismos de reparación.

No se detectó p-H2XA en los controles ni en las retinas de animales tratados con DEX. Por el contrario, p-H2XA estaba elevada 6 h después de administrada la MFP (10 mg/kg/2 días) y, a las 48 h, sus niveles se habían duplicado (Fig. 4.9). El tratamiento combinado (D+M) no evitó la aparición de este marcador de daño y reparación del ADN. Los niveles parecían mayores a las 48 que a las 6 h, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

Adrenalectomía

Los animales con AdrX fueron fijados a las 6 y 48 h. Las retinas fueron cortadas y procesadas para la reacción TUNEL. No se detectaron núcleos TUNEL⁺ en los animales con operación simulada. En los animales adrenalectomizados se observaron núcleos TUNEL⁺, localizados exclusivamente en la CNE, como en aquellos que habían recibido MFP. El número de núcleos aumentó en forma marcada a las 48 h, llegando a niveles semejantes a los observados en las retinas de animales MFP de 6 a 48 h (Fig. 4.10).

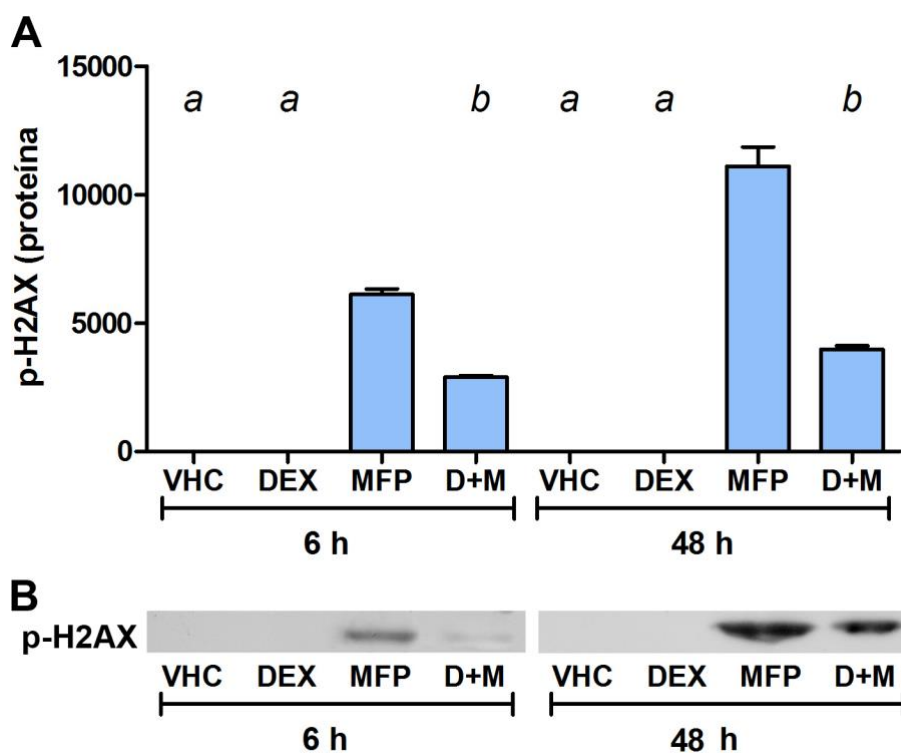


Figura 4.9. **A.** Niveles de histona p-H2AX demostrados por Western Blot, a 6 y 48 h de la administración de DEX o MFP (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 3$). Este marcador de roturas del ADN no fue detectado en las retinas controles (VHC) ni en las tratadas con DEX. Aumentó a las 6hs de administrar MFP, duplicándose a las 48 h ($p < 0,001$ para MFP vs VHC o DEX). El tratamiento combinado evitó parcialmente la aparición de p-H2AX, tanto a las 6 ($p < 0,001$ para D+M vs MFP) como a las 48 h ($p < 0,001$ para D+M vs MFP). **B.** Proteinogramas para p-H2AX.

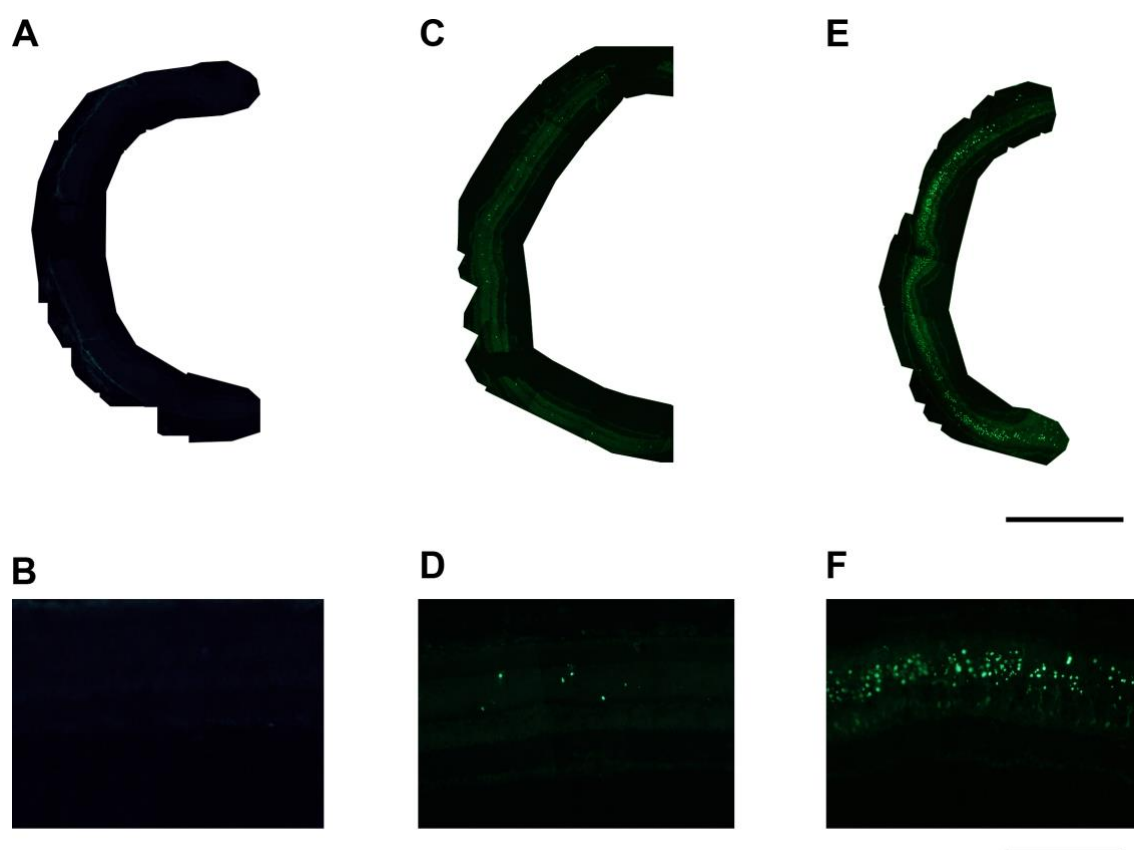


Figura 4.10. Montajes de cortes ecuatoriales de retinas procesadas con TUNEL para demostrar la fragmentación del ADN provocada por AdrX. **A.** Controles, 2 días después de AdrX simulada. No se observaron núcleos TUNEL⁺. **B.** Tampoco fueron detectados a mayor magnificación. **C.** Algunos núcleos TUNEL⁺ aparecieron, en toda la extensión de la retina, a las 6 hs de la AdrX. **D.** Los núcleos TUNEL⁺ estaban selectivamente localizados en la CNE. **E.** También se observaron gran cantidad de núcleos TUNEL⁺ 2 días después de la administración de AdrX. **F.** Estos núcleos también se localizaron selectivamente en la CNE. Barras de calibración, A, C, E, 200 μm ; B, D, F, 50 μm .

Discusión

Muerte y supervivencia de los fotorreceptores

Los glucocorticoides pueden inducir la muerte celular programada o promover la supervivencia celular, dependiendo del tipo celular (Viegas y col, 2008; Schlossmacher y col, 2011). En el caso de la retina, evaluamos el efecto sobre los fotorreceptores mediante dos marcadores: las hileras de núcleos en la CNE en cortes teñidos con Rojo Neutro, y la masa de rodopsina, evaluada por Western blot. En los períodos estudiados, DEX no afectó los valores de dichos marcadores. Por el contrario, ambos fueron reducidos por MFP. El déficit de hileras de núcleos de fotorreceptores se detectó en la CNE a partir de los 2 días de administración de MFP, en una zona relativamente pequeña. La regionalización del daño es una característica común de las degeneraciones de la retina, probablemente relacionada con la distribución de la luz y con factores ópticos de la retina (Organisciak y Vaughan, 2010).

La reducción de rodopsina solo se hizo aparente a los 7 días. El método histológico fue más sensible porque permitió analizar por separado cada región de la retina y detectar así las lesiones focalizadas en áreas particulares. La rodopsina medida por WB, que refleja a todos los fotorreceptores existentes en el momento de la extracción, solo se redujo a los 7 días, cuando la lesión afectaba aproximadamente la mitad de la retina. En esa etapa, en las áreas más dañadas solo quedaban 1-2 hileras de núcleos.

Los defectos de la CNE y de la rodopsina resultaron parcialmente evitados en los ratones que habían recibido DEX junto con la MFP. DEX es un ligando selectivo para $GR\alpha$, con muy baja afinidad por los receptores de mineralocorticoides y de progesterona (Issar y col, 2006; Edelman, 2010). Por lo tanto, estos resultados tienden a confirmar que los glucocorticoides y los receptores $GR\alpha$, son necesarios para la supervivencia de los fotorreceptores, en particular los bastones.

La desaparición de fotorreceptores provocada por MFP solo se detectó apenas 2 d después de una única dosis (10 mg/kg). Sin embargo, se encontraron evidencias de protección por DEX o daño por MFP dentro de las 6 h de iniciado el experimento. En ese lapso, DEX aumentó en un 40% los niveles de Bcl-X_L, tal como ocurre en otros tejidos donde los glucocorticoides tienen efecto anti-apoptótico (Viegas y col, 2008). MFP, por el contrario, redujo esta proteína por debajo de los niveles de detección.

El descenso de Bcl-X_L provocado por MFP no explicaría la muerte selectiva de los fotorreceptores, ya que Bcl-X_L desapareció en todas las capas de la retina. Es razonable suponer que el aumento de Bcl-X_L inducido por DEX contribuye al efecto protector de los glucocorticoides, mientras que su descenso a instancias de MFP los volvería más vulnerables. Sin embargo, la insuficiencia de Bcl-X_L no provoca la muerte de los fotorreceptores en condiciones de iluminación estándar, solamente aumenta la susceptibilidad al daño inducido por luz (Zheng y col, 2006).

La muerte de los fotorreceptores provocada por MFP fue casi totalmente evitada por el tratamiento simultáneo con DEX, pero esta misma combinación no previno el descenso de Bcl-X_L. Este último fenómeno no dependería solamente de la falta de activación del promotor distal del gen Bcl-X (Viegas y col, 2004). Los niveles de Bcl-X_L también podrían ser reducidos por represión de otras vías controladas por glucocorticoides, como NF- κ B (Evans-Storms y Cidlowski, 2000).

MFP provocó la aparición de CC-3, la forma activada de la caspasa-3, que no se detecta en las retinas normales (Torbidoni y col, 2006). Los niveles de CC-3 aumentaron en forma proporcional a la dosis de MFP. Señalemos que esta caspasa ejecutora fue detectada aún con una dosis de 4 mg/kg de MFP, mucho menor que la utilizada habitualmente (30-50 mg/kg) en experimentación animal (Pryce y col, 2003; Asagami y col, 2011).

DEX evitó parcialmente la aparición de CC-3 provocada por MFP, un efecto que fue mayor con la dosis de 4 mg/kg que con la de 10 mg/kg de DEX. Esta acción paradójica de DEX sobre los niveles de CC-3 probablemente se asocia con los datos contradictorios que han dado origen a una controversia aún no resuelta sobre los efectos benéficos o perjudiciales de los glucocorticoides en la degeneración de la retina inducida por luz (Tanito y Anderson, 2006; Lopez y col, 2008).

Daño y reparación del ADN

Los primeros núcleos TUNEL⁺ se observaron apenas 2 h después de la inyección. A las 6 h encontramos gran número de núcleos positivos en toda la extensión de la CNE. Este patrón temporal de fragmentación del ADN es comparable al observado en retinas expuestas a luz blanca (3000 lux) durante 2 h (Hafezi y col, 1997).

Dos días después de la administración de MFP, las retinas no habían recuperado los niveles normales de Bcl-X_L y contenían aún más núcleos TUNEL⁺ que a las 6 h. En los animales que recibieron D+M no se detectaron núcleos TUNEL⁺ a las 6 h, pero aparecieron a los 2 d, aunque en menor densidad que en las retinas MFP. Ambos resultados sugieren un proceso de fragmentación del ADN prolongado en el tiempo, que se manifiesta 7 días después de una única inyección de MFP por la desaparición de una cantidad pequeña pero significativa de fotorreceptores. La prolongación del proceso degenerativo probablemente se relaciona con la larga vida media de MFP, que en la mujer es de 25-30 h (Heikinheimo y col, 2003).

El área ocupada por núcleos TUNEL⁺ a las 6 h era bastante mayor que el área con déficit de núcleos (Rojo Neutro) detectada a los 2 días o a los 7 días. Podemos inferir, entonces, que el daño del ADN de los fotorreceptores podría ser reparado, tal vez por los procesos asociados a la fosforilación de H2XA. Otros autores han demostrado que los fotorreceptores cuentan con un mecanismo de reparación del ADN que permite la supervivencia de estas células aún después de la exposición a niveles tóxicos de luz (Cortina y col, 2003). Nuestros resultados sugieren que DEX podría promover estos procesos de reparación.

La AdrX produjo daño de los núcleos de los fotorreceptores de manera semejante a la de MFP, confirmando que el efecto de ésta última depende de los glucocorticoides.

Para comprender como MFP o la AdrX pueden, en ausencia de agentes ambientales, provocar lesiones tan graves y selectivas de los fotorreceptores, es necesario recordar que éstas son las células que más oxígeno consumen (por mg de tejido) en todo el organismo (Cringle y col, 2006). La producción de ATP genera radicales libres del oxígeno (ROS). La producción de ROS es además exacerbada por la misma función de los fotorreceptores, que implica la absorción de energía radiante. El mantenimiento de la función visual requiere la reposición cotidiana de los discos del segmento externo, un proceso de fagocitosis que también contribuye a la producción de ROS (Miceli y col, 1994). Como los fotorreceptores se encuentran en estado postmitótico, la acumulación de daño oxidativo puede activar la duplicación del ADN en una forma disfuncional que determina roturas de la doble cadena (Barzilai y col, 2008; Wang y col, 2009). Aunque los mecanismos todavía no son conocidos, sabemos que los glucocorticoides son necesarios para controlar el daño oxidativo en las neuronas del SNC (Shuto y col, 2009), y que estas lesiones son exacerbadas por MFP o AdrX.

Conclusiones

Estos experimentos demostraron que el bloqueo de los receptores GR α por la MFP induce la muerte selectiva de los fotorreceptores. Los niveles de CC-3 provocados por MFP no dependieron del aporte de glucosa. Por lo tanto debemos buscar otros mecanismos para explicar la rápida activación de mecanismos de muerte. Los niveles de CC-3 sugieren muerte por apoptosis, pero esto no excluye la puesta en marcha de otras formas de MCP.

La presencia de GRs fosforilados en los segmentos externos e internos, así como los cambios que sufren en presencia de DEX o de MFP, sugieren efectos directos sobre estas regiones del fotorreceptor. Estos no afectarían a la rodopsina en forma primaria, ya que los niveles de esta proteína solo descendieron después de la desaparición de los fotorreceptores. Podemos suponer, sin embargo, que la inactivación de los GRs del segmento externo podría perturbar la cadena de transducción visual o la actividad mitocondrial en el segmento interno.

Nuestros estudios demuestran que los glucocorticoides endógenos son necesarios para la supervivencia de los fotorreceptores. Este hecho se correlaciona con el efecto protector de los glucocorticoides para la retina dañada por la luz y otros agentes (Glybina y col, 2009; Organisciak y Vaughan, 2010). Es necesario profundizar estas investigaciones para comprender como la falla en la señalización dependiente de glucocorticoides se traduce en la fragmentación del ADN. La acumulación de roturas y/o las fallas en la reparación del ADN contribuyen a la degeneración de los fotorreceptores asociadas con el envejecimiento y defectos metabólicos.

Capítulo 5

Interacciones de glucocorticoides con el sistema endotelinérgico y con factores protectores de la retina

Objetivos específicos

El hallazgo del daño y ulterior desaparición de los fotorreceptores por efecto de MFP nos proporcionó un modelo para explorar los efectos inmediatos de la injuria. En este capítulo se intenta determinar cómo la administración de glucocorticoides o el bloqueo de su receptor, bajo condiciones de iluminación estándar, modifican la disponibilidad de endotelinas, sus receptores, y los factores de crecimiento involucrados en las respuestas de los fotorreceptores a la injuria (factor de crecimiento fibroblástico 2, FGF2 y el leukemia inhibitory factor, LIF). Esto nos permitiría comprender como se relacionan las distintas endotelinas con la muerte o la supervivencia de los fotorreceptores.

Fundamentos

Mecanismos que protegen a los fotorreceptores

La degeneración de la retina es acompañada por cambios en la transcripción. Curiosamente, las modificaciones transcripcionales afectan a conjuntos semejantes de genes, aun cuando la degeneración obedece a causas muy diferentes (Chen y col, 2004; Grewal y col, 2004). De aquí surgió la idea de una “respuesta propia de la retina” al daño de los fotorreceptores. En la fase aguda de la degeneración, se destaca el aumento de Edn2, cuya nivel de expresión supera al de cualquier otro gen (Rattner y Nathans, 2005). La injuria de los fotorreceptores también induce FGF2 y su receptor FGFR1 (Rattner y Nathans, 2005). En la etapa aguda del estrés también aumenta el receptor endotelinérgico ET_B (Ednrb) en las células de Müller (Rattner y Nathans, 2005; Torbidoni y col, 2006). Se ha postulado que ET-2, por vía de los receptores ET_B, activaría la producción de FGF2, que es uno de los factores protectores de los fotorreceptores (O'Driscoll y col, 2008).

Otro grupo de investigadores demostró que la exposición a la luz también activa una cascada de señalización que incluye la expresión de LIF y sus efectores STAT1 y STAT3 (Samardzija y col, 2006). La inyección intravítrea de LIF, al igual que la de FGF2, protege a los fotorreceptores de la degeneración por luz (Ueki y col, 2008). Pero, aunque FGF2 es esencial para el desarrollo de la retina (Pittack y col, 1997), la retina de los ratones *Lif^{-/-}* no se distingue morfológica- ni funcionalmente de la retinas de los ratones *Lif^{+/+}* (Joly y col, 2008). Sin embargo, cuando es sometida a estrés, la retina de los ratones *Lif^{-/-}* degenera más rápidamente y no muestra el aumento en la expresión de *Edn2* y *Fgf2* característico de las retinas *Lif^{+/+}* (Joly y col, 2008). Un agonista de los receptores *ET_B* (BQ-3020) es capaz de inducir la expresión de *Fgf2*, *Edn2* y *Lif* in la retina *Lif^{+/+}*. Por el contrario, el agonista no induce a *Fgf2* en las retinas *Lif^{-/-}*, aunque puede inducir aumento en la expresión de *Edn2* (Joly y col, 2008). LIF es producido por una subpoblación de células de Müller y se considera que su presencia es imprescindible para la expresión basal de *Edn2* y para su inducción a niveles mucho más elevados en la retina estresada. En este modelo de respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores, *Edn2* y *ET_B* participarían en una cascada de retroalimentación positiva, que produciría mayores niveles de LIF y determinaría el aumento en la producción de FGF2 (Joly y col, 2008).

Cambios similares se observan en el fenómeno de condicionamiento, cuando la retina expuesta a bajos niveles de luz o bajos niveles de otros agentes estresantes adquiere resistencia contra una exposición ulterior de niveles dañinos (Liu y col, 1998; Li y col, 2003; Casson y col, 2004; Valter y col, 2005). El condicionamiento con luz constante de moderada intensidad (10 d a 250 lux) produce una inducción parcial de los transcritos de *Edn2*, que impide el incremento habitual en la expresión de este gen después de exposición a luz intensa (Rattner y Nathans, 2005). El condicionamiento también induce la expresión de FGF2 (O'Driscoll y col, 2008) y LIF (Chollangi y col, 2009).

Aunque todos estudios confirman la importancia de ET-2 en la respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores, estos experimentos no excluyen la participación de otras endotelinas. Todas ellas afectan por igual al receptor *ET_B* (Davenport y Maguire, 2006), de modo que los efectos de BQ-3020 son atribuibles a cualquiera de las endotelinas. Tampoco excluyen la participación del receptor *ET_A*, que puede ser activado por ET-2 (Davenport y Maguire, 2006) y que, según datos de nuestro laboratorio (Torbidoni y

col, 2006), se encuentra localizado en los terminales presinápticos de los fotorreceptores.

Por lo tanto, resolvimos explorar el balance entre los componentes del sistema endotelinérgico y los factores protectores después de la administración de DEX, MFP o la combinación de ambos factores. Como en el tiempo del experimento no se detectan cambios estructurales, analizamos la proteína glial fibrilar ácida (GFAP) (Zhu y col, 2010) y la glutamino sintasa (GS) (El-Remessy y col, 2010), como marcadores de la respuesta glial. Los glucocorticoides sistémicos regulan la expresión de glutamino sintasa (GS) en la retina durante el desarrollo (Vardimon y col, 1986), pero existe muy poca información sobre el efecto de los glucocorticoides sobre esta enzima en el adulto. Tampoco existe mucha información sobre GFAP, aunque junto con GS, constituyen importantes marcadores gliales en la retina del adulto.

Relaciones entre glucocorticoides y endotelinas

En la introducción describimos diversas interacciones entre los glucocorticoides y las endotelinas. Aquí solo mencionaremos las evidencias del papel de los glucocorticoides en la expresión de los genes *Edn1* y *Edn2*, ya que hasta ahora no se habían estudiado sus posibles relaciones con *Edn3*. En la línea celular A549, donde los glucocorticoides son pro-apoptóticos, DEX aumenta casi 10 veces la expresión de *EDN2* entre las 2 y 6 h (Wang y col, 2004). El efecto es transitorio, ya que a las 24 h apenas se duplican los valores iniciales. En estas mismas células, un estudio más reciente comprobó que DEX aumenta la expresión de *EDN2* pero disminuye aquella *EDN1*; DEX también reprime, vía $GR\alpha$, la expresión de *LIF* (Reddy y col, 2009).

El promotor de *Edn1* también es controlado por un sitio de unión a AP-1, que recluta a ambas subunidades de AP-1, Fos y Jun (Lee y col, 1991). AP-1 es un factor de transcripción que media la respuesta genómica a diversos factores de crecimientos, citoquinas y otras señales anti y pro inflamatorias y es esencial para la expresión, tanto basal como inducida, de *Edn1*. Diversos activadores de la transcripción de *Edn1* actúan mediante AP-1. La transcripción basal en las células endoteliales aparentemente requiere la interacción cooperativa de AP-1 con GATA-2 (Kawana y col, 1995). Por otra parte, los bloqueantes del sitio de unión a AP-1, como los agonistas del PPAR- γ

(peroxisome-proliferator activated receptor γ) y el resveratrol, impiden la inducción de Edn1 (Delerive y col, 1999; Chao y col, 2005).

Para comprender los alcances de nuestra hipótesis, efectuamos un estudio bioinformático de los mecanismos de regulación transcripcional de genes de endotelinas, Fgf2 y Lif por los corticoides.

Diseño experimental

Se utilizaron ratones Balb-c, machos, de 35-45 días, que antes de iniciar las maniobras experimentales estuvieron durante 24 h en oscuridad permanente. Los animales volvieron al ciclo de iluminación estándar y las intervenciones farmacológicas fueron semejantes a las descritas en el capítulo anterior, utilizando 4 mg/kg/día de DEX o 10 mg/kg/2 días de MFP.

Las retinas fueron disecadas bajo luz roja y extraídas para la determinación de transcritos de interés mediante RT-PCR semicuantitativa (Edn1, Edn2, Edn3, Ednra, Ednrb, Fgf2 y Lif). Los marcadores gliales, GS y GFAP, fueron evaluados mediante Western blot. Los procedimientos han sido descritos en el Cap. 2.

Estudio *in silico*

Para comprobar la existencia de sitios de unión para los factores de transcripción AP-1, NF- κ B y sitios GREs en los genes de endotelinas, Lif y Fgf2 se utilizaron las bases de datos y algoritmos de cREMaG (<http://www.cremag.org>), SABiosciences' Text Mining Application, (<http://www.sabiosciences.com>) y UCSC Genome Browser (<http://www.genome.ucsc.edu>). Los tres permiten investigar *in silico* los sitios de unión a factores reguladores de la transcripción en un gen determinado (Piechota y col, 2010). Como parten de presupuestos no idénticos, únicamente se tomaron como positivos los resultados comunes a los tres sistemas. Se utilizaron los símbolos génicos para *Mus musculus*: Edn1, Edn2, Edn3, Lif y Fgf 2.

Resultados

Endotelinas y sus receptores

La retina neural contenía transcriptos de los tres genes endotelinérgicos (Edn1, Edn2 y Edn3). Todos ellos fueron modificados por las intervenciones farmacológicas realizadas.

La expresión de Edn1 prácticamente se triplicó después de 6 h de tratamiento con DEX, pero se redujo a menos de la mitad de los valores controles por efecto de MFP. El descenso provocado por MFP fue prevenido por la administración simultánea de DEX. En los animales D+M, el nivel relativo de amplicones de Edn1 fue mayor que en los grupos control (VHC) y MFP, pero menor que en el grupo DEX (Fig. 5.1A).

Las retinas controles tenían niveles bajos de amplicones Edn2, que desaparecieron después del tratamiento con DEX. Por el contrario, la expresión de Edn2 aumentó unas 12 veces en el grupo MFP. El aumento de Edn2 fue mucho menor cuando se administraron DEX y MFP simultáneamente (Fig. 5.1B).

No se detectaron cambios en la expresión de Edn3 por efecto de DEX, pero la administración de MFP la redujo por debajo del umbral de detección. Este descenso fue parcialmente prevenido por la administración simultánea de DEX (Fig. 5.1C).

Las intervenciones experimentales también modificaron la expresión de los dos receptores endotelinérgicos. Ednra aumentó unas 4 veces por efecto de DEX, mientras que Ednrb aumentó casi 3 veces. El tratamiento con el bloqueante redujo los niveles de ambos receptores por debajo de los valores encontrados en los grupos controles. En los animales que recibieron el tratamiento combinado, los niveles de amplicones de ET_A y ET_B no diferían de los valores en los animales controles (Fig. 5.2).

Fgf2 y Lif

DEX aumentó significativamente los niveles de expresión de Fgf2. Curiosamente, se observó un aumento similar con MFP y con el tratamiento combinado (Fig. 5.3A), es decir, no se detectaron diferencias entre las distintas intervenciones farmacológicas.

Los amplicones de Lif desaparecieron después del tratamiento con DEX, mientras que MFP los aumentó por encima de los valores correspondientes a los controles (VHC). La

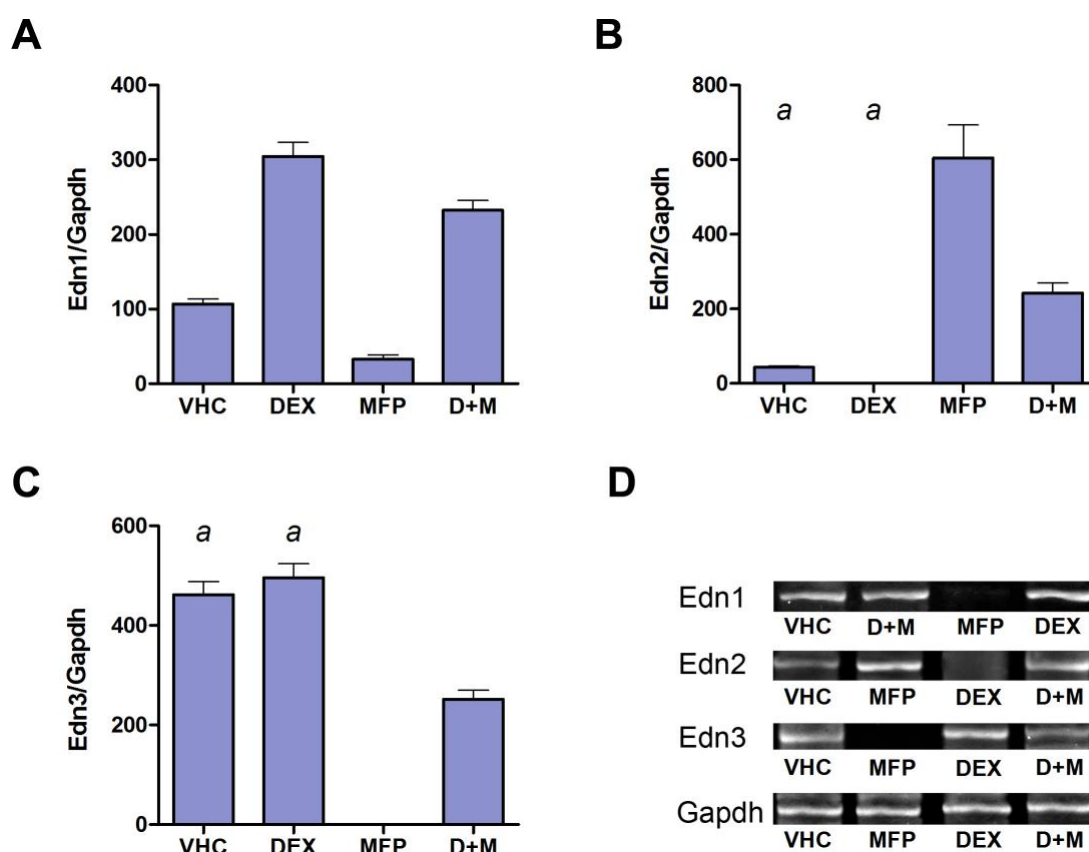


Figura 5.1. Amplicones de *Edn1*, *Edn2* y *Edn3* 6 h en extractos de retina después de la administración de VHC (controles), DEX (4 mg/kg), MFP (10mg/kg) o ambos (D+M). En éste y en los siguientes gráficos, se representan los promedios \pm error estándar, comparados mediante ANOVA ($p < 0,0001$; $n = 4$ para los tres *Edns*). Las barras con la misma letra no mostraron diferencias estadísticamente significativas (prueba de Tukey). **A.** Los amplicones de *Edn1* subieron en las retinas tratados con DEX y se redujeron en presencia de MFP. Después de D+M, los valores de *Edn1* fueron intermedios entre DEX y MFP. Todas las comparaciones eran estadísticamente diferentes ($p < 0,001$). **B.** Los niveles de *Edn2* ($n = 2$) fueron igualmente bajos en los controles y en los tratados con DEX. MFP produjo un aumento significativo y en los ratones D+M se observó un valor intermedio ($p < 0,001$ para MFP vs VHC, DEX o D+M; $p < 0,05$ para D+M vs VHC o DEX). **C.** Los niveles relativos de *Edn3* fueron igualmente altos en los controles y en los tratados con DEX. No se detectaron transcritos en los animales que recibieron MFP. Todas las comparaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$), salvo las indicadas con a. **D.** Los mismos extractos fueron utilizados para determinar las tres endotelinas. Se muestran las bandas, marcadas con bromuro de etidio, de un experimento.

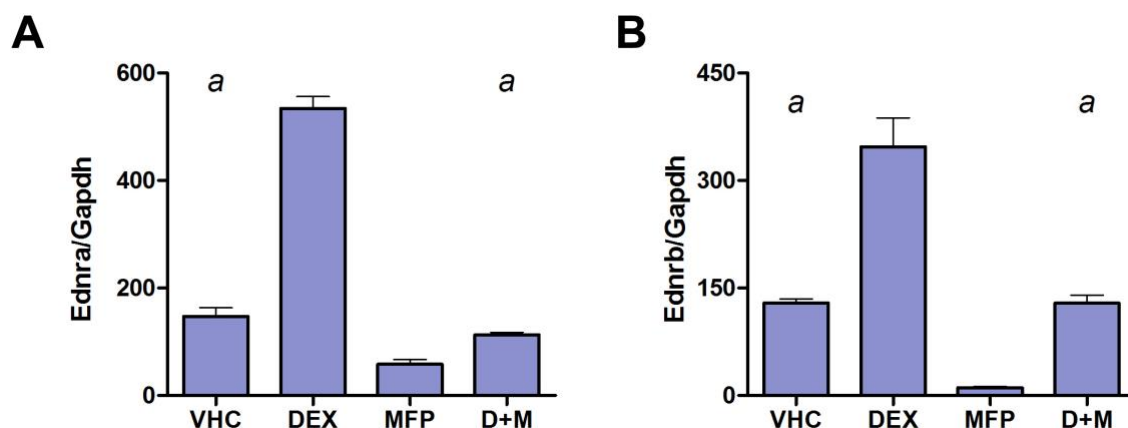


Figura 5.2. Amplicones de receptores endotelinérgicos después de DEX, MFP o su combinación (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 4$ para los dos Ednrs). **A.** DEX incrementó *Ednra*, mientras que MFP redujo su expresión por debajo del control. En las retinas D+M, los amplicones *Ednra* no diferían de los controles (VHC). Las restantes comparaciones fueron estadísticamente significativas ($p < 0,001$ para DEX vs VHC, MFP o D+M; $p < 0,01$ para MFP vs D+M; $p < 0,05$ para MFP vs VHC). **B.** DEX aumentó los amplicones de *Ednrb*, mientras que MFO los redujo por debajo del control (VHC). No se encontraron diferencias entre VHC y D+M. Todas las restantes comparaciones resultaron significativas ($p < 0,001$ para DEX vs MFP; $p < 0,01$ para DEX vs VHC y D+M; $p < 0,05$ para MFP vs VHC y D+M).

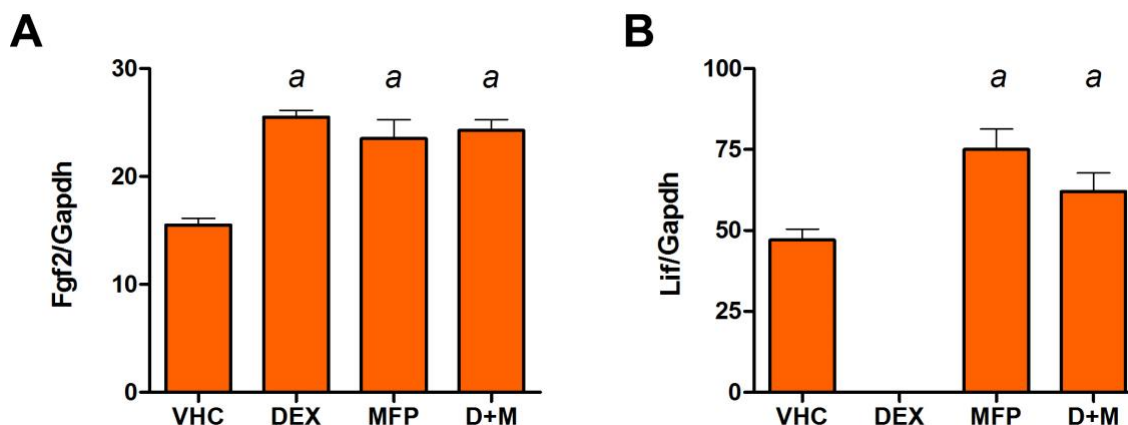


Figura 5.3. Amplicones de *Fgf2* y *Lif* 6 h después de la administración de DEX, MFP o D+M. **A.** *Fgf2* aumentó en DEX, MFP y D+M (ANOVA, $p < 0,0003$; $n = 3$). Todas las diferencias con respecto a VHC fueron significativas ($p < 0,01$ para VHC vs MFP; $p < 0,001$ para VHC vs DEX y D+M). **B.** Amplicones para *Lif* (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 3$). No se detectaron amplicones en las retinas tratadas con DEX, mientras que en MFP superaban a los controles (VHC). Los amplicones de *Lif* en MFP no diferían de los mismos amplicones en D+M. Las restantes comparaciones fueron significativas ($p < 0,001$ para DEX vs MFP; $p < 0,05$ para VHC vs D+M).

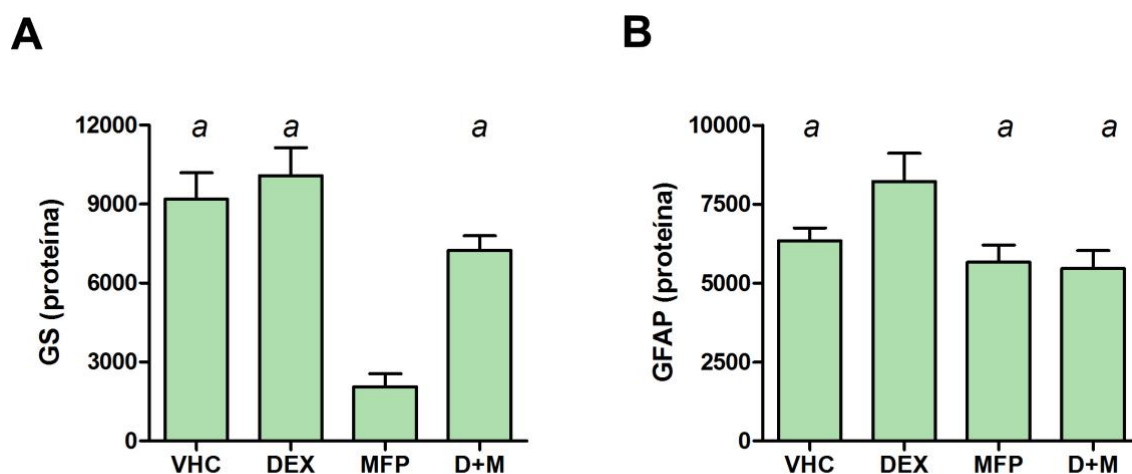


Figura 5.4. Evaluación densitométrica de Western blots para GS y GFAP y GFAP en retinas extraídas 6 h después de los tratamientos indicados. **A.** GS (ANOVA, $p < 0,001$; $n = 3$). Esta proteína solo se modificó después de MFP ($p < 0,01$ para MFP vs cualquiera de las otras condiciones). **B.** GFAP (ANOVA, $p < 0,05$; $n = 3$). Esta proteína solo se modificó ligeramente por efecto de DEX ($p < 0,05$ para DEX vs cualquiera de las otras condiciones).

expresión de Lif en los animales que recibieron DEX y MFP no fue significativamente diferente de la observada después de MFP (Fig. 5.3B).

Marcadores gliales

GS no fue afectada por DEX, pero se redujo más de 4 veces después de la administración de MFP. La combinación del agonista con el antagonista llevó los valores de GS a niveles intermedios entre los valores del grupo control y del grupo MFP (Fig. 5.4A).

Los niveles de GFAP solo se modificaron significativamente en los ratones que recibieron DEX. No se detectaron diferencias en los otros grupos experimentales (Fig. 5.4B).

Glucocorticoides como reguladores transcripcionales de los genes estudiados

Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas que incluyen el factor de transcripción (TF) y la posición de su sitio de unión a cada uno de los genes (TF-BS).

Edn1	Gene	TF	TF-BS
	<u>EDN1</u>	AP-1	12272410
	<u>EDN1</u>	AP-1	12275527
	<u>EDN1</u>	AP-1	12290489
	<u>EDN1</u>	AP-1	12296669
	<u>EDN1</u>	NF-kappaB	12288494
	<u>EDN1</u>	NF-kappaB	12292307
	<u>EDN1</u>	NF-kappaB	12293034
	<u>EDN1</u>	NF-kappaB	12296613
	<u>EDN1</u>	GRE	12288427

Edn2	Gene	TF	TF-BS
	<u>EDN2</u>	AP-1	119821475
	<u>EDN2</u>	AP-1	119824672
	<u>EDN2</u>	AP-1	119824783

Edn2	Gene	TF	TF-BS
	<u>EDN2</u>	AP-1	119827443
	<u>EDN2</u>	AP-1	119827513
	<u>EDN2</u>	GRE	119818829
	<u>EDN2</u>	GRE	119821448
	<u>EDN2</u>	GRE	119830283
	<u>EDN2</u>	NF-kappaB	119834333

Edn3	Gene	TF	TF-BS
	<u>EDN3</u>	AP-1	17 54578704

Fgf2	Gene	TF	TF-BS
	<u>FGF2</u>	AP-1	37253856
	<u>FGF2</u>	GRE	37345672

Lif	Gene	TF	TF-BS
	<u>LIF</u>	AP-1	4140291
	<u>LIF</u>	NF-kappaB	4163012
	<u>LIF</u>	NF-kappaB	4166524

Los tres programas detectaron un GRE en Edn1 y 2 en Edn2. Solo uno de los programas detectó un GRE en Edn3, considerándose poco probable su existencia. Los tres genes tendrían sitios de unión para AP-1, 4 en Edn1, 5 en Edn2 y 1 en Edn-3. Tanto Edn1 como Edn2 tienen sitios de unión a NF- κ B, 4 en Edn1 y uno en Edn2. Ningún programa detectó sitios para NF- κ B en Edn3.

Fgf2 tenía un único GRE, un sitio para AP-1 y ninguno para NF- κ B. Los sitios de control de la transcripción de Lif eran diferentes, ya que no presentaba ningún GRE y contaba con un sitio AP-1 y dos sitios para NF- κ B.

Discusión

MFP, que como demostramos previamente, produce daño y muerte de los fotorreceptores, indujo aumentos significativos en la expresión de Edn2 y Lif. Simultáneamente, redujo la expresión de Edn1, Edn3 y los dos receptores endotelinérgicos. Este patrón de respuesta se asemeja al descrito previamente en la degeneración por luz, el desprendimiento de retina y el ratón VPP, un transgénico con mutaciones de la rodopsina que determinan una retinitis pigmentosa dominante (Rattner y Nathans, 2005; Joly y col, 2008).

DEX, que actúa como protector de los fotorreceptores (Organisciak y Vaughan, 2010), aumentó la expresión de Fgf2, Edn1 y los dos receptores Ednra y Ednrb. Además, evitó total o parcialmente los descensos de Edn1, Edn3, Ednra y Ednrb provocados por MFP.

Tanto DEX como MFP, así como la combinación de ambos, activaron la expresión de Fgf2. Por el contrario, DEX determinó un descenso en la expresión de Lif, que quedó por debajo del límite de detección. A la inversa, MFP aumentó la expresión de Lif por encima de los valores en los controles que sólo habían recibido VHC.

Estos efectos de DEX y MFP, previamente desconocidos, sugieren la existencia de varios mecanismos superpuestos que intervienen en el control de la vida y la muerte de los fotorreceptores. Cuando la retina es lesionada, Edn2 podría actuar como señal de peligro que estimula la expresión de Lif. DEX protegería a la retina por un mecanismo distinto, que no incluiría a LIF. En ambos casos, FGF2 actuaría como vía final común (Fig. 5.5).

Los datos existentes permiten concebir un modo de mantenimiento, activo en condiciones basales, que depende de glucocorticoides, Edn1 y Edn3. También existiría un modo de rescate, activado por la injuria, que incluiría a LIF y Edn2. El mantenimiento dependería tanto de la activación de ET_A como de ET_B, ya que DEX aumentó la expresión de ambos receptores. ET-1 es un ligando de ambos receptores, mientras que ET-3 solo tiene afinidad por ET_B (Davenport y Maguire, 2006).

Tanto el mantenimiento como el rescate aumentarían la expresión de FGF2, aunque no necesariamente de la misma manera ni en los mismos tipos celulares. Los sitios de producción y liberación de FGF2 en la retina parecen ser complejos. Algunos autores

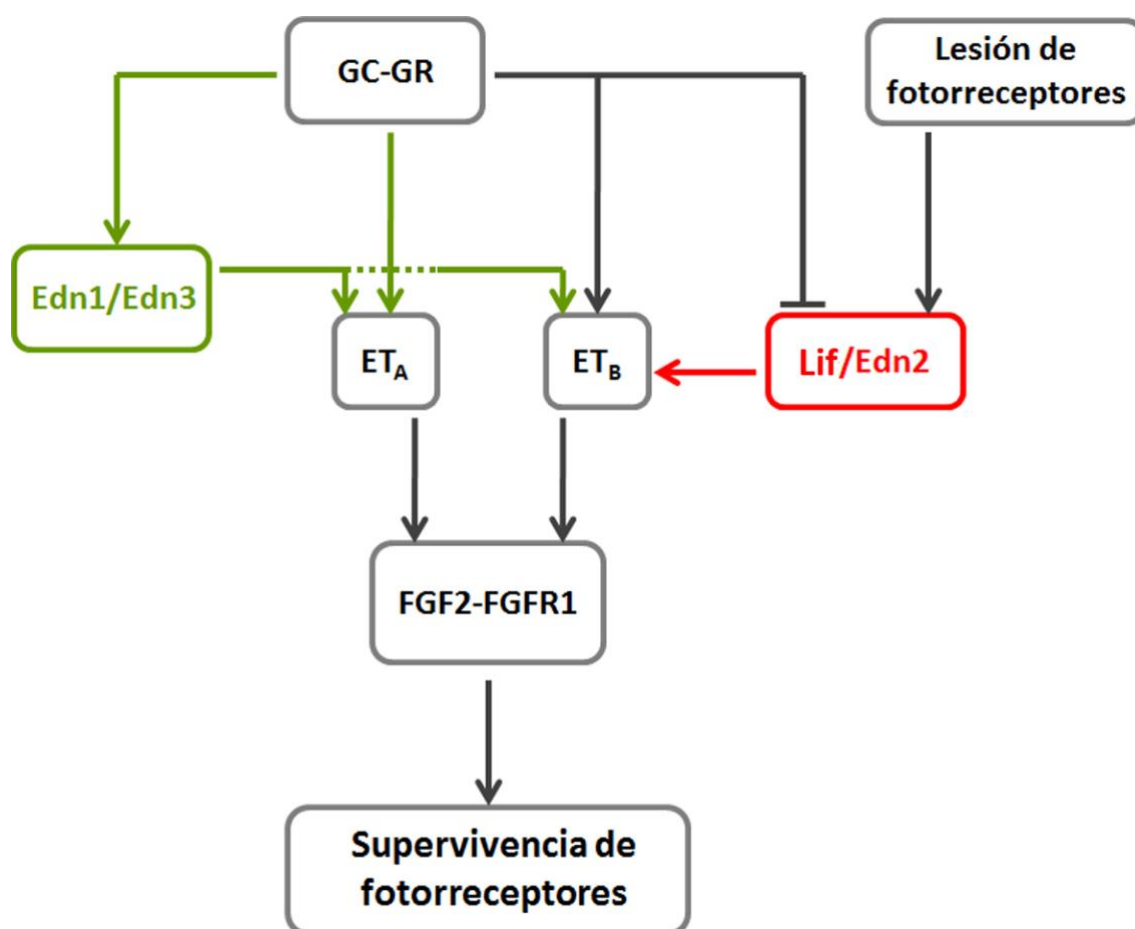


Figura 5.5. Hipótesis sobre los dos modos o redes que contribuyen a la supervivencia de los fotorreceptores. En el esquema, la vía de mantenimiento (verde) depende de la activación de GR α por su ligando (GR-GC). Estas señales activan la expresión de *Edn1*, *Edn3*, *Ednra* y *Ednrb*, que directa o indirectamente activan la expresión de *Fgf2* y promueven la supervivencia de los fotorreceptores. El receptor de FGF2, FGFR1, puede ser transactivado directamente por GC-GR (no incluido en el esquema). La lesión de los fotorreceptores estimula la vía de rescate (roja) que determina la expresión de *Lif* y *Edn2*. La vía de rescate puede ser bloqueada por los glucocorticoides y activada por su ausencia.

han mostrado la presencia de los ARNm correspondientes en la CNI (Wen y col, 1995), donde se encuentran los cuerpos celulares de las células de Müller, mientras que otros los han detectado en los fotorreceptores (Rattner y Nathans, 2005).

En presencia de DEX, que hiperestimularía el modo mantenimiento, el modo rescate quedaría inactivado. Como el bloqueo de GRs aumentó la expresión de Lif y Edn2, en este modelo se postula que la falla del modo supervivencia dispararía el modo rescate (Fig. 5.5).

En nuestras condiciones experimentales, el modo de rescate no fue totalmente exitoso. Esta falla podría atribuirse a fallas en la activación glial provocadas por MFP. Estas fallas se manifestaron en la reducción de la proteína GS, que interviene en las actividades protectoras de la glia de Müller (El-Remessy y col, 2010). MFP también redujo la expresión de los receptores endotelinérgicos, necesaria para la activación glial (Gadea y col, 2008; Castañeda y col, 2011). La activación glial temprana es esencial para la producción de factores protectores, tanto FGF2 como otros factores neurotróficos (García y Vecino, 2003; Harada y col, 2011).

En el modo rescate, las señales LIF/ET-2 actuarían únicamente sobre el receptor ET_B, localizados en las células de Müller (Rattner y Nathans, 2005; Joly y col, 2008) o en las células horizontales (Torbidoni y col, 2006), que forman parte de los complejos sinápticos entre fotorreceptores y células bipolares. El modo mantenimiento podría utilizar tanto los ET_B como los ET_A. Estos últimos se ubican en la CPE, probablemente en los terminales sinápticos de los fotorreceptores (Torbidoni y col, 2006). La expresión de las tres endotelinas en los fotorreceptores (Stitt y col, 1996; Chakravarthy y col, 1997; Rattner y Nathans, 2005; Torbidoni y col, 2005), sumada a la presencia de los dos receptores, hace de la CPE un centro de señalización endotelinérgico de gran complejidad. Por otra parte, la barrera hematorretinal externa, formada por las células del EP, constituye otro foco donde confluyen las endotelinas producidas o acumuladas por el endotelio de la coriocapilaris, el EP y los fotorreceptores. Tanto el endotelio como el EP poseen receptores ET_A y ET_B (Zhang y col, 2003b; Torbidoni y col, 2005). Ambos centros de señalización endotelinérgica podrían intervenir en el mantenimiento y/o rescate de los fotorreceptores.

Posibles interacciones entre glucocorticoides, endotelinas y factores protectores en la retina

Los dos modos descritos más arriba constituyen un modelo simplificado que explica los efectos opuestos de DEX y MFP sobre la supervivencia de los fotorreceptores no agredidos por factores ambientales o genéticos. El modelo se apoya en la evidencia disponible sobre la regulación de Edns y Ednrs por acción de los glucocorticoides (ver Capítulo 1). Ya mencionamos que esta regulación ocurre en los tejidos oculares (Zhang y col, 2003a; Zhang y col, 2003b; Udono-Fujimori y col, 2004).

Se ha demostrado que DEX regula sitios de transcripción en EDN1 y EDN2 (Wang y col, 2004; Reddy y col, 2009). En las células A549, una línea derivada de pulmón humano donde los glucocorticoides tienen efecto pro-apoptótico, DEX aumenta la expresión de EDN2 y disminuye la de EDN1. Es decir que el único GRE de EDN1 tiene características de represor, mientras que los dos GREs de EDN2 son de naturaleza inductora (Reddy y col, 2009). Nuestro análisis *in silico* también mostró un único GRE en Edn1 y tres en Edn2. En los fotorreceptores, entonces, esos GREs tendrían una función diferente a la descrita en las células A549, o bien predominarían efectos indirectos como los mediados por NF- κ B y AP-1. Se sabe que estos factores de transcripción intervienen en el control de la muerte celular dependiente de glucocorticoides (Angel y Karin, 1991; Evans-Storms y Cidlowski, 2000). En la retina, los niveles de NF- κ B aumentan en los fotorreceptores en diversos modelos de degeneración de la retina (Wu y col, 2002; Zeng y col, 2008). Además, algunas evidencias sugieren que en las degeneraciones prevenidas por glucocorticoides intervienen mecanismos dependientes de AP-1 (Hao y col, 2002).

No existen evidencias en la literatura sobre las relaciones entre Edn3 y el GR α . Los resultados *in silico* indicaron que Edn3 carece de sitios GREs o NF- κ B y posee un único sitio AP-1. Es decir, que los efectos de los glucocorticoides sobre la expresión de este gen serían principalmente indirectos, por alguna de las otras vías posibles.

FGF2 es un factor necesario para la supervivencia de las células retinales, tanto en condiciones basales como después de la exposición a diversos factores tóxicos (Faktorovich y col, 1992; Unoki y LaVail, 1994; LaVail y col, 1998; Liu y col, 1998; Schuettauf y col, 2004; O'Driscoll y col, 2007; O'Driscoll y col, 2008). Curiosamente, en la retina observamos un aumento en la expresión de Fgf2 tanto después de la

administración de DEX como de MFP. La respuesta a DEX es compatible con la presencia de un GRE y de un sitio AP-1, y concuerda con la expresión dependiente de glucocorticoides en otras regiones del SNC (Chadi y col, 1993; Chao y McEwen, 1994; Riva y col, 1995). Por el contrario, la mayor expresión de Fgf2 provocada por MFP no es compatible con un efecto directo de GR α sobre la expresión dicho gen. Nuestro modelo propone un efecto indirecto, mediado por ET-1 y ET-3 y los receptores endotelin α rgicos. Este tipo de interacción no ha sido demostrado en la retina, pero se conocen ejemplos en otros tejidos. ET-1 es uno de los agentes que promueve la producción de FGF2 en células cardíacas (Santiago y col, 2011). A la inversa, en células endoteliales, la aplicación de FGF2 reduce la producción de ET-1 (Ulbrich y col, 2008).

La inducción de Fgf2, en cualquier caso, tendría un efecto multiplicador, ya que este gen puede ser autoregulado en forma positiva por su producto (Cao y col, 1997). Por otra parte GR α -unido-a-su-ligando puede transactivar el receptor del factor de crecimiento fibroblástico-1 (FGFR-1), una interacción bloqueada por MFP (Cheung y col, 2011). FGFR-1, un receptor para FGF2, se localiza en las células de Müller y en la CNE de la retina de ratón (Catalani y col, 2009). Vale decir que los glucocorticoides podrían incrementar la supervivencia de los fotorreceptores a través de la transactivación de FGFR-1 sin necesariamente aumentar la expresión de factores de crecimiento.

En Lif detectamos un sitio AP-1 y dos sitios NF- κ B, pero ningún GRE. Sin embargo, en las células A549 se identificó un GRE represor (Reddy y col, 2009). Este efecto es compatible con nuestras observaciones, ya que en la retina tratada con DEX no detectamos expresión de Lif. Por el contrario, Lif aumentó después de MFP. Asimismo, LIF aumenta en las vellosidades coriales después de la administración de MFP a mujeres embarazadas, probablemente por bloqueo de GR α (Pei y col, 2010).

Conclusiones

Correlacionamos el daño y muerte de los fotorreceptores por efecto de MFP con las alteraciones provocadas en dos cadenas de señalización que promueven la supervivencia de los fotorreceptores. Una de ellas sería un modo de mantenimiento, donde los glucocorticoides determinan, probablemente por medio de Edn1 y Edn2,

niveles de FGF2 suficientes para promover la vida de los fotorreceptores. Los glucocorticoides también podrían promover la salud de los fotorreceptores por transactivación de la señalización por FGFR-1 y por el aumento de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-X_L.

En ausencia de actividad GR α , como en las retinas sometidas a MFP, se activaría un modo de rescate, donde predominan la producción de ET-2 y LIF, que también resultan en un aumento de la producción de FGF2. En condiciones basales, la señalización dependiente de glucocorticoides bloquearía la vía de rescate.

Capítulo 6

Glucocorticoides y mecanismos apoptóticos durante la degeneración inducida por luz

Objetivos específicos

En el capítulo 4 demostramos que, en la retina no estresada, DEX aumenta Bcl-X_L, mientras que MFP, antagonista de GR α , reduce esta molécula y determina daño y muerte de los fotorreceptores. Aquí, nos proponemos verificar si el conocido efecto protector de los glucocorticoides sobre la degeneración inducida por luz sigue el mismo patrón observado en la retina no estresada.

Los objetivos específicos consisten en estudiar animales expuestos a 1500 lux durante 2 y 4 días para determinar:

- La localización inmunohistoquímica de los GRs
- La magnitud del daño de la CNE en animales expuestos tratados con DEX, MFP o su combinación
- Los cambios en las moléculas pro- y anti-apoptóticas en animales expuestos tratados con DEX, MFP o su combinación

Fundamentos de los objetivos

Los glucocorticoides modulan la muerte celular programada en forma específica para cada tejido y fenotipo celular utilizando diversas vías de señalización. En la retina, estos esteroides contrarrestan la muerte de los fotorreceptores inducida por exposiciones cortas a altos niveles de iluminación, 15000 lux (Wenzel y col, 2001a). Aunque su acción protectora ha sido asociada con la represión de la actividad del complejo AP-1 (Wenzel y col, 2001a), este mecanismo no parece ser el único factor protector asociado a glucocorticoides. Por ejemplo, DEX no protege a los fotorreceptores en perros portadores de una mutación de la rodopsina que hace que los fotorreceptores sean más vulnerables a la luz, a pesar de reducir los niveles de AP-1 (Gu y col, 2009).

Por otra parte, sabemos que el efecto pro-supervivencia de los glucocorticoides puede depender de los niveles de Bcl-X_L (Viegas y col, 2008). Por eso, parece oportuno verificar las modificaciones de esta proteína anti-apoptótica en un modelo de fototoxicidad crónica, donde la lesión de los fotorreceptores es inducida por niveles relativamente bajos de luz (1500 lux) y determina la desaparición de la mitad de la población de bastones en 4-6 días (Torbidoni y col, 2005; Torbidoni y col, 2006).

También interesa comparar cómo interactúan la agresión luminosa y el bloqueo de los GR α , ya que en los animales con degeneración inducida por luz la rodopsina desciende rápidamente (Cubilla y col, 2011). Por el contrario, MFP no parece tener un efecto directo sobre la rodopsina, puesto que en los animales no expuestos tratados con esta droga, los niveles de rodopsina solo descendieron después de la desaparición de fotorreceptores (Capítulo 4).

Diseño Experimental

Al comienzo del período experimental (12 h), los animales fueron mantenidos en oscuridad completa durante 24 h. A las 12 h del día siguiente, los animales fueron divididos en 5 grupos en forma aleatoria. Un grupo retornó a las condiciones de iluminación estándar (12 h a 60 lux: 12 h en oscuridad). Los otros 4 grupos fueron expuestos a 1500 lux durante 2 o 4 días. En éste y el siguiente capítulo, los experimentos incluyeron dos controles, uno bajo condiciones estándar de iluminación y otro expuesto a los 1500 lux durante 2 d.

La intervención farmacológica comenzó simultáneamente con la exposición a la luz. Los tratamientos fueron; DEX (4 mg/kg/día, sc, Sidus, Buenos Aires), MFP (10 mg/kg/2 días, sc, Sigma-Aldrich, St Louis, MO), MFP y DEX en inyecciones consecutivas pero separadas (D+M), o volúmenes similares del vehículo (VHC), propilen-glicol. En algunos experimentos, indicados en el texto, los ratones recibieron 1 mg/kg DEX/día. A los ratones con MFP se les administró 1 ml de dextrosa al 5% i.p., en cantidad suficiente para mantener un buen estado general. Todos los ratones fueron sacrificados al mediodía, después de 1 hora en oscuridad total para permitir la separación total del EP en las retinas destinadas a la preparación de extractos.

Algunos animales fueron fijados por perfusión para obtener criosecciones, con las cuales se estudió la distribución de los GR α por inmunohistoquímica y la conservación

de la estructura de la CNE después de la coloración con Rojo Neutro. El estado de los núcleos celulares fue evaluado mediante TUNEL. Otros grupos experimentales se utilizaron para extraer proteínas que fueron estudiadas mediante Western blot: rodopsina, la proteína ejecutora de la apoptosis caspasa-3 clivada (CC-3) y la proteína antiapoptótica Bcl-X_L.

Resultados

Inmunorreactividad de GR total en retinas controles y expuestas a la luz

Como ya se describió en el Capítulo 3, existe inmunorreactividad para GR total en todos los estratos nucleares de la retina y el EP. Las células con mayor inmunorreactividad fueron las de la CCG, que no sólo presentaban reacción nuclear sino también en el citoplasma. La CNI y la CNE solo mostraron inmunorreactividad nuclear. En el EP se encontró una débil inmunorreactividad citoplasmática (Fig. 6.1A,D).

Después de 1500 lux durante 2 d se observaron cambios estructurales en algunas regiones de la retina, cerca de la papila del nervio óptico. Sin embargo, en comparación con las retinas no expuestas la CNE mostraba mayor inmunorreactividad para GR en todos los cuadrantes (Fig. 6.1B,E). A los 4 días de exposición, la localización e intensidad de la inmunorreactividad para GR fueron esencialmente similares a las observadas a los 2 días, aunque el daño de la CNE era más grave (Fig. 6.1C,F). Los segmentos externos habían desaparecido totalmente en la zona de mayor lesión, donde también se habían reducido las hileras nucleares de la CNE.

Lesiones fototóxicas en presencia de glucocorticoides o su antagonista

Nuestro propósito fue comprender las interacciones entre los glucocorticoides y los fotorreceptores durante la etapa de injuria, es decir, cuando puede presumirse que los fotorreceptores están lesionados pero no en forma irreversible. Por lo tanto, solo analizamos el resultado de las intervenciones farmacológicas a los 2 días de exposición.

Alteraciones estructurales de la CNE

En los animales no tratados (VHC), la CNE solo estaba dañada en una pequeña región de la retina vecina a la papila del nervio óptico (10% del área estudiada). No se detectaron anomalías estructurales en los animales tratados con DEX. Por el contrario,

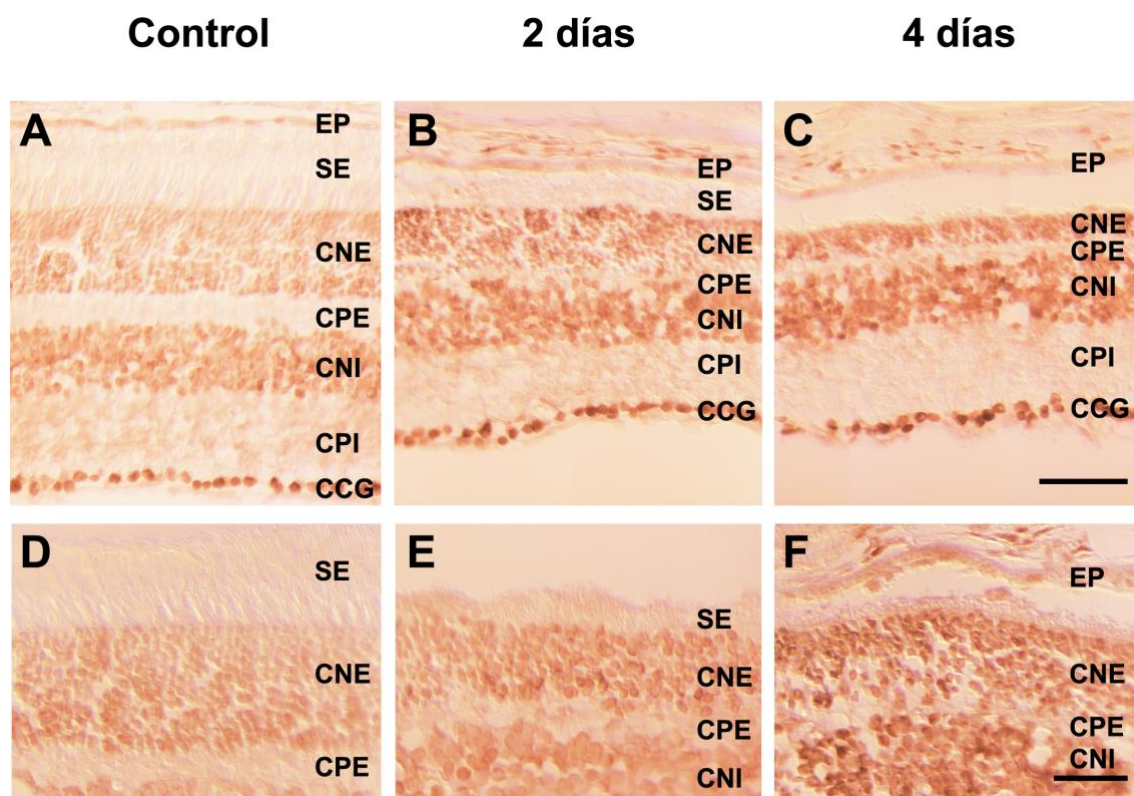


Figura 6.1. Inmunorreactividad para GR total en retinas controles y expuestas a 1500 lux durante 2 y 4 días. Las imágenes corresponden a la región próxima a la papila óptica, donde el daño era mayor que en el resto de la retina. En las retinas controles (**A** y **D**) se observó inmunorreactividad moderada en todas las capas nucleares, de mayor intensidad en la CCG. El citoplasma de las células EP mostraba inmunorreactividad leve. Después de 2 d de exposición a 1500 lux (**B** y **E**), se redujo el número de hileras nucleares y la longitud de los segmentos externos. Los núcleos de la CNE aparecían desordenados y mostraban mayor inmunorreactividad que los controles. A los 4 d de exposición (**C** y **F**) los segmentos externos habían desaparecido. La CNE presentaba menos hileras de núcleos, pero su inmunorreactividad para GR total era semejante a la observada a los 2. Barras de calibración, A-C, 50 μ m; D-F, 25 μ m.

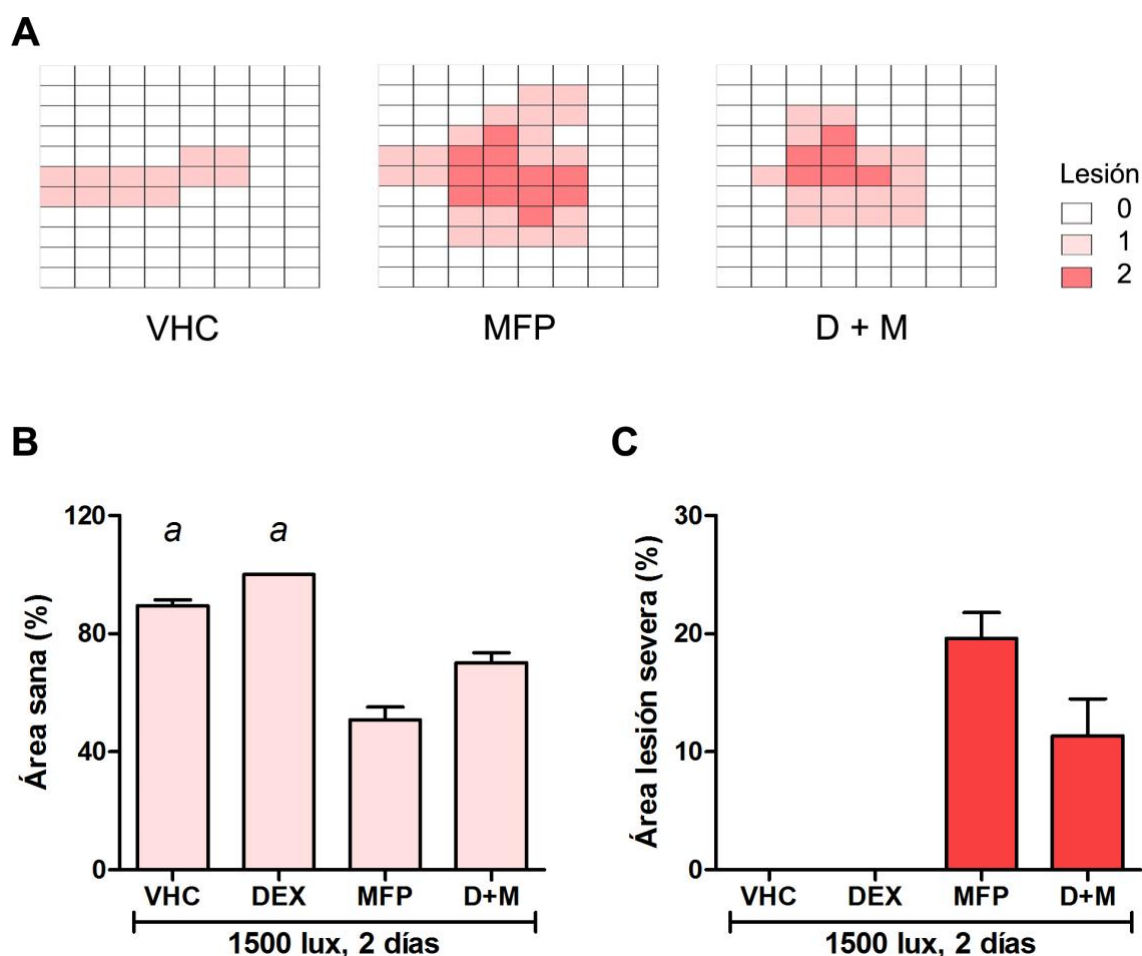


Figura 6.2. **A.** Mapas de la CNE, con el hemisferio temporal a la izquierda y el nasal a la derecha, correspondientes a animales expuestos a 1500 lux durante 2 días. Cada hilera representa 270 μm a lo largo del eje dorsoventral del ojo, y cada columna representa 1/8 del eje témporo-nasal. Se muestran las áreas lesionadas (0, no lesión; 3, lesión máxima) en retinas de animales que recibieron MFP (una dosis al comenzar el experimento), solo o combinado con DEX (dos inyecciones, a las 0 y 24 h, D+M). Las lesiones de mayor extensión y gravedad se observaron en los ratones que recibieron MFP. En los ratones D+M se observaron lesiones de menor gravedad, pero que eran más serias que en los controles (animales expuestos a 1500 lux que recibieron VHC). **B.**  reas sin lesión detectable. Aproximadamente 90% del área de la CNE estaba indemne en los controles (VHC). No se detectó daño en aquellos tratados con DEX. Las retinas MFP tenían 50% del área retinal sana, mientras que en el grupo D+M esta proporción se elevó a 70%. ANOVA ($p < 0,0001$, $n = 4$), las diferencias entre las barras que no comparten la letra **a** fueron estadísticamente significativas ($p < 0,01$; prueba de Tukey MFP vs VHC, DEX o D+M y D+M vs VHC o DEX). **C.** Sólo se observó lesión de tipo 2 (severa) en los grupos MFP y D+M. La diferencia entre ambos fue estadísticamente significativa (prueba t, $p < 0,05$ para MFP vs D+M).

en aquellos que recibieron MFP (una sola dosis) se observó déficit de la CNE en 50% del área estudiada. DEX previno parcialmente la lesión producida por la luz + MFP, ya que en los animales D+M solo estaba afectada 30% del área estudiada (Fig. 6.2A,B).

Los animales expuestos sin tratamiento mostraron lesiones leves (grado 1). Sólo se encontraron lesiones de grado 2 (pérdida de la mitad del espesor de la CNE) en los animales que recibieron MFP. También aparecieron lesiones severas en los animales con tratamiento combinado, pero en menor proporción que en los del grupo MFP (Fig.6.2C).

Fragmentación del ADN

Se detectó fragmentación del ADN por medio de TUNEL a los 2 días de exposición. Solo se encontraron núcleos marcados en la CNE pero, a diferencia del daño estructural en dicho estrato, aparecían en todas las regiones de la retina. Por el contrario, no se detectaron núcleos TUNEL⁺ en las retinas de animales tratados con DEX. Los animales expuestos a la luz después de MFP presentaron mayor cantidad de núcleos TUNEL⁺ que los inyectados con VHC (Fig. 6.3). En las retinas D+M, la densidad de núcleos TUNEL⁺ se asemejaba a la de los expuestos sin tratamiento.

Efectos sobre la rodopsina

La exposición a 1500 lux durante 2 días redujo los niveles de rodopsina con respecto a los controles no expuestos (2212 ± 364 vs 3299 ± 301) (Fig. 6.5A). Las retinas expuestas bajo tratamiento con DEX tenían niveles de rodopsina significativamente más altos que las expuestas sin tratamiento (4523 ± 382 vs 2212 ± 364). La administración de MFP junto con la exposición a la luz determinó el descenso de la rodopsina a 17% de los valores controles (554 ± 53). El efecto de MFP sobre los niveles de rodopsina fue prevenido por DEX, ya que los animales que recibieron el tratamiento combinado (D+M) presentaron valores de rodopsina semejantes a los que habían recibido solamente DEX (5210 ± 457) (Fig. 6.4).

Moléculas que intervienen en la muerte celular

En los experimentos realizados en animales no expuestos a la luz (Capítulo 4) observamos un efecto paradójal, donde CC-3 era más elevada en los ratones tratados con 10 mg/kg que en aquellos que habían recibido 4 mg/kg. Por lo tanto, ensayamos aquí la dosis habitual de 4 mg/kg/día y una menor, de 1 mg/kg/día.

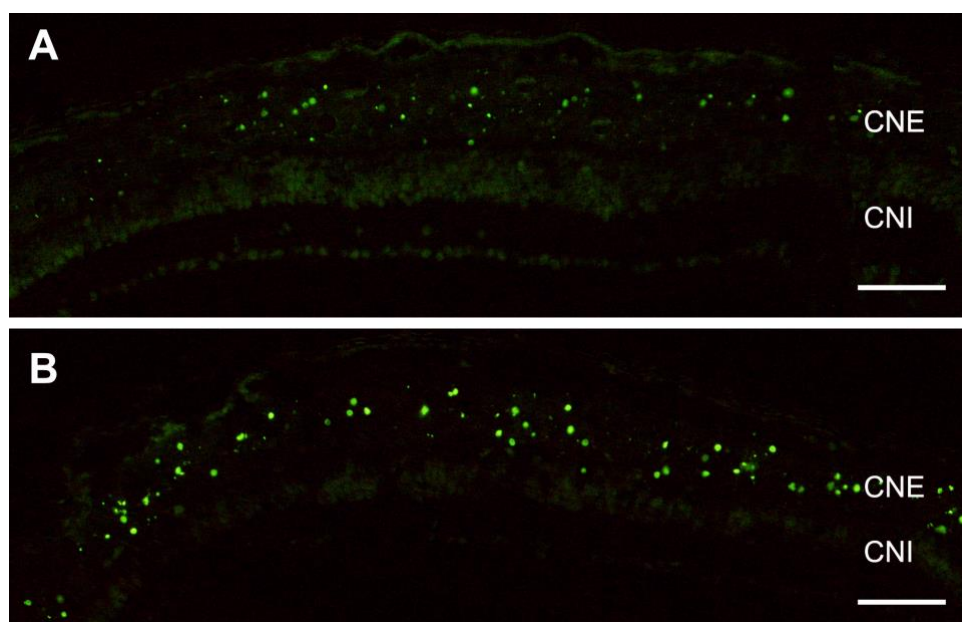


Figura 6.3. Núcleos TUNEL⁺ en la región central de retinas expuestas a 1500 lux durante 2 días. **A.** Animal que recibió VHC. **B.** Animal que recibió MFP. En ambos casos los núcleos TUNEL⁺ estaban selectivamente localizados en la CNE. Los núcleos eran mucho más abundantes, y la intensidad de la marca fluorescente parecía mayor en los animales que recibieron MFP. Barras de calibración, 50 μ m.

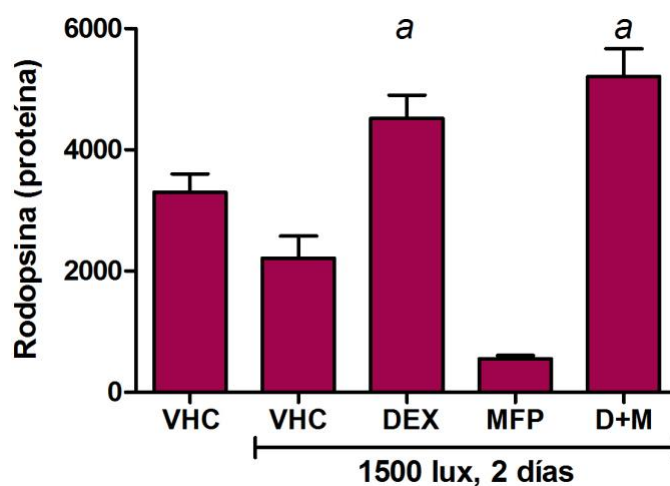


Figura 6.4. Densitometría de rodopsina (ANOVA, $p < 0,001$; $n = 3$) en retinas expuestas a luz durante 2 días. Las letras iguales indican que las diferencias entre las barras no son estadísticamente significativas. El descenso en los animales expuestos con respecto a los controles no alcanzó significación estadística. Los niveles de rodopsina en los animales expuestos y tratados con DEX fueron significativamente mayores que en el grupo no tratado ($p < 0.01$ para DEX vs VHC). En los animales que recibieron MFP, la rodopsina fue significativamente menor que en los restantes grupos experimentales ($p < 0.001$ para MFP vs VHC, DEX o D+M). En el grupo D+M, los niveles no fueron significativamente diferentes de los niveles en el grupo DEX.

En condiciones basales, la retina contenía niveles altos de Bcl-X_L (3080 ± 28), que desaparecieron completamente después de 2 días de exposición a la luz. Ambas dosis de DEX ensayadas evitaron ese descenso e incluso aumentaron los niveles de Bcl-X_L (DEX1, 3432 ± 29 ; DEX2, 3738 ± 90). Las diferencias con respecto al control no expuesto, y entre las dos dosis de DEX fueron estadísticamente significativas (Fig. 6.5A).

Por el contrario, CC-3 no se detectaba en las retinas no expuestas a la luz, pero apareció en las retinas expuestas sin tratamiento (2019 ± 92). DEX (1 mg/ml) evitó parcialmente ese ascenso (1003 ± 47), pero DEX4 lo evitó totalmente (Fig. 6.6A).

En consecuencia, se realizó otra serie completa de experimentos utilizando 4 mg/kg/día de DEX y 10 mg/kg/2 días de MFP. Para el caso de Bcl-X_L, la exposición a la luz con y sin tratamiento con DEX produjo resultados semejantes a los descritos más arriba (VHC, 0; DEX4, 3452 ± 268). En los animales expuestos que habían recibido MFP, Bcl-X_L descendió a niveles no detectables, al igual que en los expuestos sin tratamiento alguno. La administración simultánea de DEX no evitó ese descenso (Fig. 6.5B).

En esta segunda serie de experimentos, el tratamiento con 4 mg/kg de DEX también previno la aparición de CC-3 en los animales expuestos. Por el contrario, la administración de MFP a dichos animales duplicó los valores medidos en los expuestos no tratados (VHC 1416 ± 210 vs MFP 3016 ± 234). Este efecto del bloqueante de GR α fue prevenido parcialmente por la administración simultánea de DEX (D+M, 2061 ± 236). En estas retinas, los niveles de CC-3 no diferían estadísticamente de los valores observados en los expuestos no tratados (Fig. 6.6B).

Discusión

Receptores de glucocorticoides

El aumento de los GRs en los núcleos de los fotorreceptores en las retinas expuestas a 1500 lux sugiere un aumento de la activación por ligandos endógenos; ya que la activación de GR α por su ligando determina la translocación del receptor hacia el núcleo (Nishi y col, 1999).

Sin embargo, esta mayor disponibilidad no alcanzaría para la protección de los fotorreceptores agredidos por la luz. La protección solo se lograría con dosis

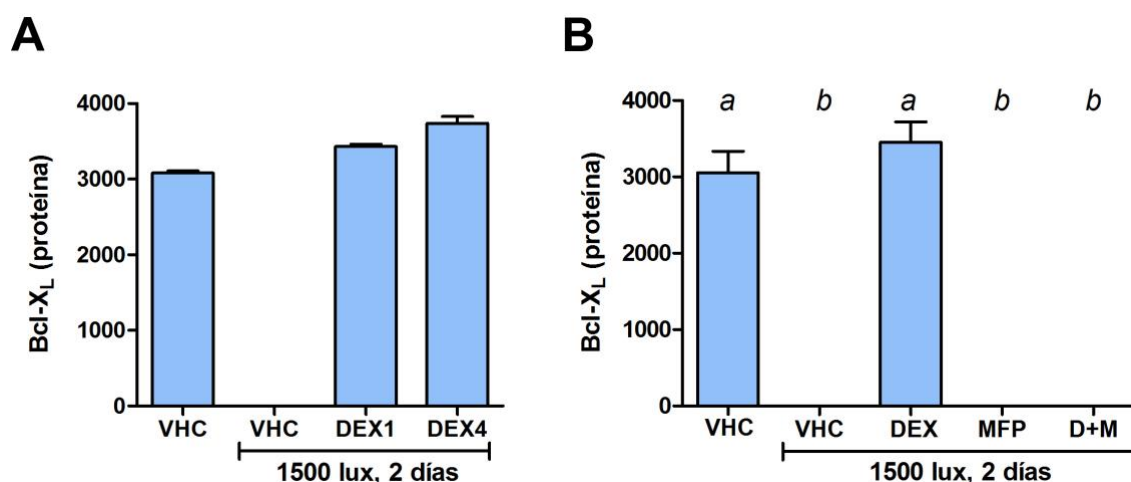


Figura 6.5. **A.** Respuesta de Bcl-X_L a la exposición a 1500 lux durante 2 d, con diferentes dosis de DEX (1 y 4 mg/kg). Los altos niveles basales desaparecieron totalmente después de 2 d de exposición, pero aumentaron con DEX (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 3$; $p < 0,01$ para VHC no expuesto vs DEX1, y DEX1 vs DEX4; $p < 0,001$ para VHC no expuesto vs DEX4). **B.** Respuesta de Bcl-X_L a la exposición a luz en presencia de DEX (4 mg/kg), MFP (10 mg/kg) o su combinación (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 6$). Bcl-X_L desapareció después de la exposición en los animales que recibieron VHC, MFP o D+M. DEX evitó el efecto de la luz, pero no el de la luz + MFP.

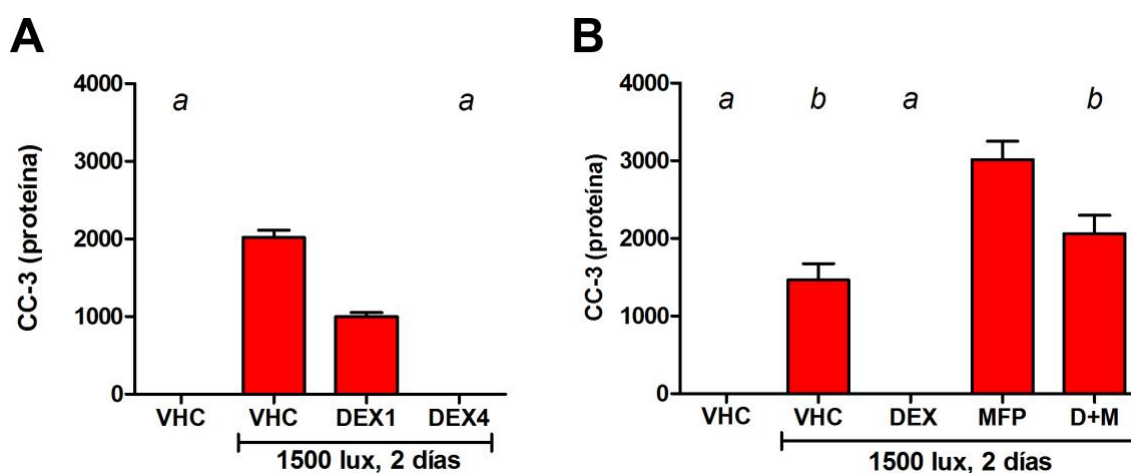


Figura 6.6. **A.** Densitometría de CC-3 en extractos de retinas expuestas a luz por 2 días con dos dosis de DEX (1 y 4 mg/kg). Esta proteína no aparecía en los controles, pero subió significativamente cuando los animales fueron expuestos a la luz, y en los expuestos que recibieron 1 mg/kg DEX. La aparición de CC-3 fue evitada por DEX4 (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 3$; $p < 0,001$ para DEX1 vs DEX4). **B.** Respuesta de CC-3 a la exposición a 1500 lux por 2 d en presencia de DEX (4 mg/kg), MFP (10 mg/kg) o su combinación (ANOVA, $p < 0,001$; $n = 3$). DEX4 evitó la aparición de CC-3, mientras que MFP la aumentó dos veces con respecto a los expuestos no tratados ($p < 0,001$ para MFP vs VHC). Los niveles de CC-3 después de D+M no diferían de los controles expuestos, pero eran menores que en los expuestos con MFP ($p < 0,01$, D+M vs MFP).

relativamente elevadas de DEX, como la utilizada en este caso (4 mg/kg) o la empleada en un modelo de iluminación aguda (52 mg/kg) (Wenzel y col, 2001a). Las dosis utilizadas en perros con una mutación de la rodopsina que los sensibiliza a la luz, donde no se logró protección mediante DEX, fueron intermedias entre nuestras dosis de 1 y 4 mg/kg. En los perros se aplicaron dos dosis de 0,18 mg/kg el día anterior a la exposición, seguidas por una dosis de 1,8 mg/kg 2-3 h antes de la exposición (Gu y col, 2009). Es muy probable que el procesamiento metabólico del perro sea diferente de ese procesamiento en el ratón. Pero, además, cabe pensar que el bloqueo de la expresión de *Edn2* producido por DEX (ver Capítulo 4), bien podría deteriorar la capacidad de respuesta de la retina al daño cuando la injuria ocurre mucho después de iniciado el tratamiento.

Dexametasona y mecanismos de supervivencia

En estos experimentos, la aplicación de un procedimiento cuantitativo a toda la superficie de la retina permitió la detección de muerte y desaparición de fotorreceptores en cantidades significativas apenas a los 2 d de iniciada la exposición. DEX resultó un protector efectivo contra la agresión luminosa, ya que a pesar de la exposición a 1500 lux no se detectaron ni daños estructurales ni núcleos TUNEL⁺ en las retinas tratadas con este esteroide. En presencia de DEX, la exposición a la luz tampoco modificó los niveles de rodopsina, por el contrario, estos resultaron más altos que en los controles no expuestos. Se requieren nuevos experimentos para determinar si este aumento se debe a cambios en el recambio de los discos del segmento externo o a una mayor producción de la proteína.

La mayor disponibilidad de rodopsina afectaría a la fototransducción. Sabemos que la regeneración rápida de la rodopsina aumenta la sensibilidad a las lesiones por iluminación, mientras que el bloqueo de la regeneración previene el daño inducido por luz (Keller y col, 2001; Saari y col, 2001; Sieving y col, 2001; Wenzel y col, 2001b; Fain, 2006). Los glucocorticoides, entonces, podrían enlentecer la regeneración de la rodopsina activada. Este efecto primario sobre la fototransducción y la rodopsina explicaría porque DEX evitó totalmente la aparición de CC-3, es decir que evitó la puesta en marcha de los mecanismos ejecutores de la muerte celular. DEX también impide la activación de calpaína, una proteasa involucrada en la degeneración retinal

inducida por luz (Imai y col, 2010). La activación de calpaína en neuronas sometidas a estrés oxidativo es exacerbada por MFP y AdrX (Shuto y col, 2009).

La exposición a la luz fue suficiente para reducir Bcl-X_L a niveles no detectables, pero esa caída fue evitada por DEX. Este fenómeno podría obedecer a dos causas: una, el efecto protector directo de la rodopsina; la otra el efecto positivo de los glucocorticoides sobre la expresión de esta isoforma de Bcl-X (Viegas y col, 2004).

Bcl-X_L no se recuperó en los animales expuestos a 1500 lux y tratados simultáneamente con MFP. Tampoco se recuperó en los animales expuestos que recibieron D+M. Este resultado concuerda con hallazgos recientes en cardiomiocitos, donde MFP impide el aumento de Bcl-X_L-dependiente de DEX (Xu y col, 2011). El fenómeno se asemeja al descenso de Bcl-X_L observado en las retinas sin estrés fototóxico (Capítulo 5). También aquí parece que, además de impedir la acción de los glucocorticoides sobre la transcripción del gen Bcl-X (Viegas y col, 2004), MFP probablemente lo regula por otras vías, como NF- κ B (Evans-Storms y Cidlowski, 2000), o tal vez por inactivación del producto (Allen and El-Deiry, 2011; El Fajoui et al., 2011). Otra posibilidad que debe ser considerada en futuros experimentos es un efecto mediado por receptores de progesterona, también bloqueados por MFP.

Conclusiones

Durante el proceso de degeneración inducido por luz observamos un aumento de la inmunorreactividad de GR en los núcleos de los fotorreceptores que implica mayor actividad de esta vía. Sin embargo, los glucocorticoides endógenos no serían suficientes para proteger a los fotorreceptores expuestos a niveles no fisiológicos de iluminación. Por el contrario, en este modelo de degeneración inducida por luz blanca fueron necesarios entre 1 y 4 mg para obtener protección completa.

Correlacionamos la protección dependiente de glucocorticoides con un posible efecto directo sobre la rodopsina y con el aumento de Bcl-X_L. Estos mecanismos probablemente desaceleran el proceso de rotura de la doble cadena del ADN iniciado por el estrés oxidativo consecutivo a la exposición a la luz. El agravamiento producido por MFP puede ser atribuido al descenso prolongado de Bcl-X_L y al mantenimiento del estrés oxidativo.

Capítulo 7

Glucocorticoides y respuesta de la retina a la injuria luminosa

Objetivo

Evaluar la respuesta de moléculas endotelinérgicas y de factores de crecimiento al daño de los fotorreceptores inducido por luz.

Determinar cuáles de esos cambios pueden ser correlacionados con el efecto protector de los glucocorticoides.

Fundamentos

La respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores se caracteriza por un conjunto de cambios transcripcionales comunes a distintos tipos de injuria (Rattner y Nathans, 2006; Joly y col, 2008). Entre estos se destacan el aumento en la expresión de Edn2, su receptor Ednrb, Fgf2 y Lif. Los resultados obtenidos (Capítulos 4 y 5) indican que el efecto protector de los glucocorticoides podría entroncarse con esta respuesta.

Uno de nuestros hallazgos más sorprendentes fue la muerte selectiva de fotorreceptores provocada por MFP, en ausencia de factores genéticos o ambientales que pudieran explicar esa mortalidad. Este fenómeno nos permitió correlacionar el estado de activación de los GR α con la expresión de los genes de endotelinas y los factores Fgf2 y Lif. En presencia de DEX se activó la expresión de Edn1 y Edn3, pero se bloqueó la de Edn2 y Lif. Por el contrario, el daño inducido por MFP se correlacionó con la expresión de Edn2 y de Lif. En ambos casos, sin embargo, se estimuló la expresión de Fgf2.

A fin de explorar esta hipótesis, comparamos el efecto de DEX y MFP sobre los factores mencionados en retinas expuestas a iluminación excesiva. Se sabe que la administración de DEX reduce la muerte de los fotorreceptores en retinas expuestas a condiciones excesivas de luz. Por lo tanto, cabe preguntarse cuál es la modificación en

la expresión de las respuestas de protección gatilladas por la exposición a la luz en presencia de agonistas o bloqueantes del receptor de glucocorticoides.

Diseño experimental

El tratamiento farmacológico y la separación de grupos experimentales fué semejante a la utilizada en el capítulo anterior. Se utilizaron 4 mg/kg/día de DEX y 10 mg/kg/2 días de MFP. La exposición a la 1500 lux duró 2 d, y luego se procedió a la extracción de las retinas bajo luz roja para la determinación de Edn1, Edn2, Edn3, Lif y Fgf 2 mediante RT-PCR.

Resultados

Moléculas endotelinérgicas y sus receptores

La exposición a la luz elevó significativamente la expresión de Edn1 y Edn2, que aumentaron un 7% y 72%, respectivamente (Fig. 7.1A,B). No ocurrió lo mismo con la expresión de Edn3, cuyos niveles después de la exposición no se distinguían de los observados en los controles no expuestos (Fig. 7.1C).

En los animales expuestos tratados con DEX, los niveles de los tres Edns aumentaron significativamente. Con respecto a los controles no expuestos, los incrementos fueron de 81, 177 y 30% para Edn1, Edn2 y Edn3, respectivamente. También fueron significativos los aumentos de los tres Edns en las retinas tratadas con DEX con respecto a los controles expuestos.

MFP redujo los niveles de Edn1 y Edn3 con respecto a los valores de los controles no expuestos (-83 y -21%, respectivamente). La expresión de Edn2, por el contrario, aumentó aún más (207%). Los ascensos o descensos provocados por MFP fueron estadísticamente significativos con respecto a cualquiera de los puntos experimentales.

La administración de D+M evitó todo cambio en la expresión de Edn1, que en estas retinas permaneció en los valores del control no expuesto. Por el contrario, para Edn2, las retinas D+M mostraron los mismos valores que los controles expuestos.

Curiosamente, para D+M, los valores de Edn3 fueron más altos que para cualquier otra intervención (Fig. 7.1).

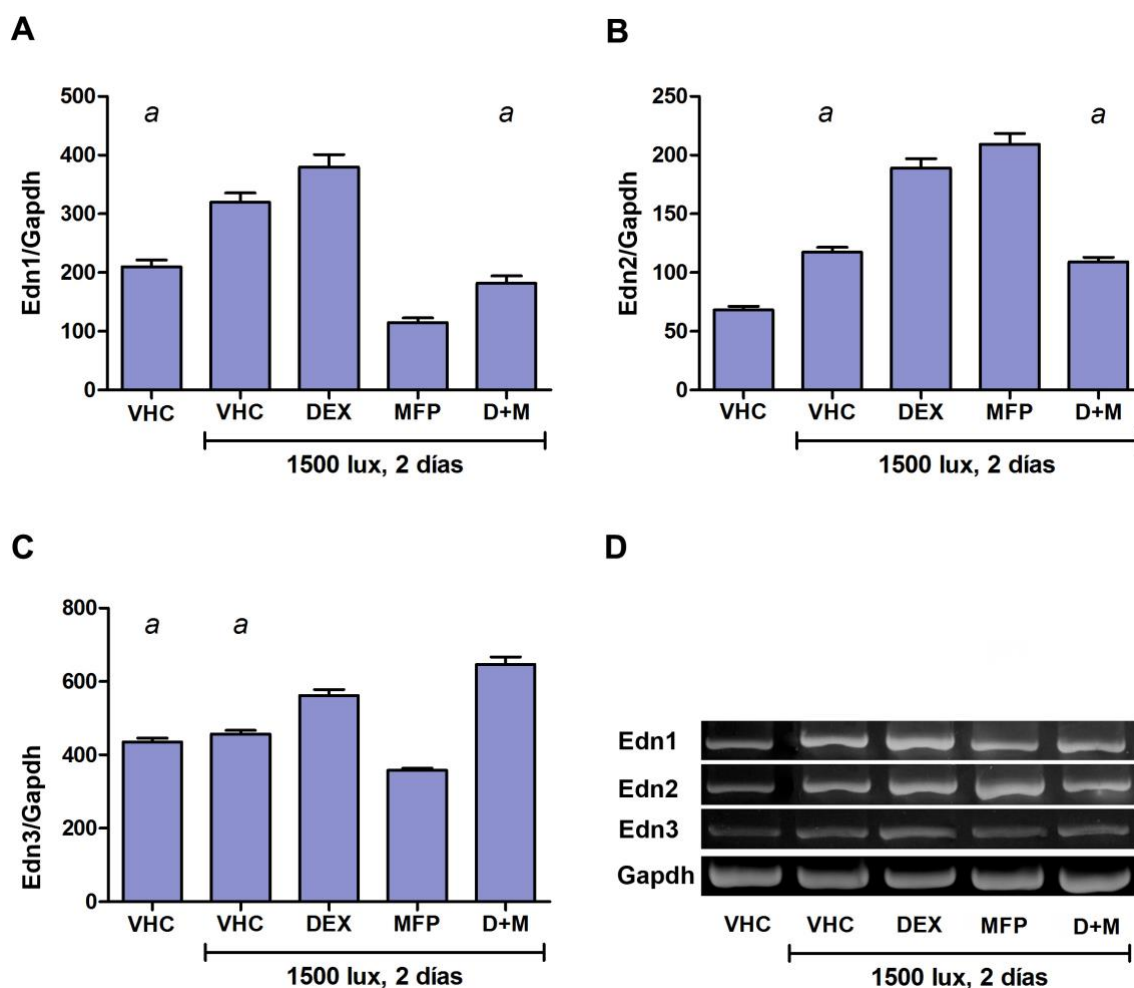


Fig. 7.1. Niveles relativos de los amplicones de *Edn1*, *Edn2* y *Edn3* en controles no expuestos (VHC) y después de exposición a 1500 lux durante 2 días, en retinas VHC, DEX (4 mg/kg/día), MFP (10mg/kg/2 días) o ambos (D+M; (ANOVA $p < 0,0001$; $n = 4$ para todos los Edns). **A.** Los niveles de *Edn1* subieron después de la exposición a la luz, con VHC o DEX, pero disminuyeron por la administración de MFP. Todas las comparaciones fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,001$), salvo VHC no expuesto vs D+M. **B.** Los niveles de *Edn 2* aumentaron con la luz y luego del tratamiento con DEX. También aumentaron con MFP. Todas las comparaciones fueron estadísticamente diferentes ($p < 0,01$ para DEX vs MFP; $p < 0,001$ las restantes), pero no se encontraron diferencias entre el control expuesto y D+M. **C.** Los niveles de *Edn3* en los controles expuestos y no expuestos fueron semejantes. Los niveles de DEX y D+M superaron a cualquiera de los controles ($p < 0,001$), mientras que aquellos de MFP eran inferiores a cualquiera de los anteriores ($p < 0,001$). **D.** Imágenes representativas de los productos de la PCR fluorescentes por el bromuro de etidio.

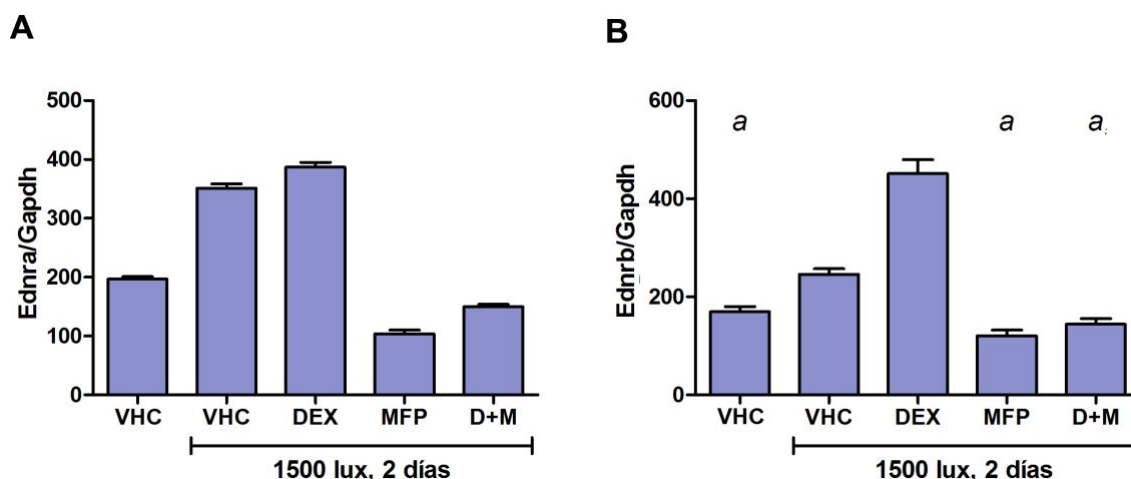


Fig. 7.2. Amplicones de los receptores endotelinérgicos en retinas expuestas a 1500 lux por 2 días. (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 4$ para ambos grupos). **A.** La exposición incrementó la expresión de *Ednra*, tanto en los controles (VHC) como en los tratados con DEX. Los niveles más bajos se observaron después de MFP y D+M ($p < 0,01$ para DEX vs VHC expuesto; $p < 0,001$ para las restantes comparaciones). **B.** Los amplicones de *Ednrb* aumentaron con la exposición a la luz, más aún en los animales tratados con DEX ($p < 0,01$ para VHC no expuesto vs expuesto; $p < 0,001$ para todas las restantes salvo las indicadas por la letra a, que no son estadísticamente diferentes).

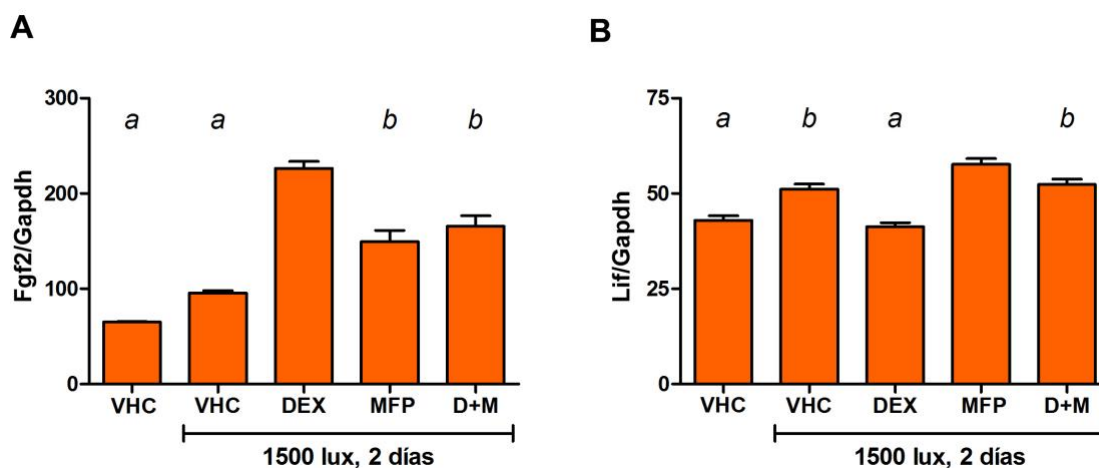


Fig. 7.3. *Fgf2* y *Lif* en retinas expuestas a 1500 lux durante 2 d (ANOVA, $p < 0,0001$; $n = 3$ para los dos). **A.** Todos los valores de *Fgf2* fueron mayores en las retinas expuestas que en las no expuestas. No se detectaron diferencias entre los dos controles (VHCs). Las restantes comparaciones con el control no expuesto fueron significativas ($p < 0,01$ para MFP; $p < 0,001$ para DEX y D+M). En los tratados con DEX, *Fgf2* fue más abundante que en los tratados con MFP. No se detectaron diferencias entre MFP y D+M. **B.** *Lif* aumentó en todas las retinas expuestas salvo en aquellas tratadas con DEX. El incremento de *Lif* fue máximo en los animales que recibieron MFP ($p < 0,001$ con respecto a los controles expuestos y no expuestos). Las retinas D+M mostraron el mismo aumento que el control expuesto.

Los dos receptores endotelinérgicos aumentaron ambos con la sola exposición a la luz (Fig. 7.2). Los valores más altos correspondieron a las retinas tratadas con DEX (96% y 66% con respecto al control no expuesto para Ednra y Ednrb, respectivamente). MFP determinó los valores más bajos para ambos receptores (-15% para Ednra y sin diferencias significativas con respecto al control no expuesto para Ednrb). El tratamiento combinado apenas subió los valores para Ednra (44% sobre los valores de DEX), y sin diferencias significativas ni con respecto a DEX ni al control no expuesto para Ednrb.

Factores protectores

La expresión de Fgf2 pareció aumentar después de la exposición a la luz, pero la diferencia no resultó estadísticamente significativa. Por el contrario, DEX produjo los valores más altos, casi 250% superiores a los del control no expuesto (Fig. 7.3A). La expresión de Ffg2 en las retinas sometidas a MFP o a D+M fueron iguales entre sí, pero superiores a los de ambos controles e inferiores a los de DEX.

Las variaciones de Lif siguieron un patrón diferente (Fig. 7.3B). Aumentaron significativamente con la exposición a la luz (21% de diferencia entre el control expuesto y el no expuesto), pero se redujeron en la retina expuesta tratada con DEX (sin diferencias significativas con el control no expuesto). Los valores más altos aparecieron en las retinas expuestas a la luz después de recibir MFP, donde los amplicones de Lif aumentaron un 13% con respecto a los amplicones en el control no expuesto. Los valores en las retinas con tratamiento combinado (D+M) no mostraron diferencias significativas con el control expuesto (Fig. 7.3B).

Discusión

Como se describió en el capítulo anterior, después de 2 días de exposición a 1500 lux las retinas muestran pérdida leve de núcleos de fotorreceptores restringida a la zona central y numerosos núcleos con fragmentación del ADN (TUNEL⁺). También demostramos que las retinas de los animales tratados con DEX no presentaron daño alguno, ni tampoco células TUNEL⁺ en la CNE. A la inversa, la administración de MFP, un bloqueante de los GR α , aumentó la gravedad y extensión de las lesiones. Correlacionamos el efecto protector de DEX con un posible efecto directo sobre la rodopsina y con el aumento de Bcl-X_L. Estos mecanismos probablemente desaceleran el proceso de muerte celular desencadenado por la exposición a la luz. La respuesta de la retina al daño por luz incluyó el aumento en la expresión de los tres Ednrs, los dos receptores endotelinérgicos y Lif. También se observó un leve aumento de Fgf2, que no alcanzó significación estadística.

Cuando las retinas expuestas fueron tratadas con DEX, no solo incrementó la expresión de todas las moléculas endotelinérgicas, también se elevó la expresión de Fgf2, casi tres veces por encima de su expresión en los controles no expuestos. La protección de la retina por efecto de DEX coincidió también con la mayor expresión de los dos receptores endotelinérgicos, Ednra y Ednrb y con la mayor expresión de Edn1. La expresión de Edn2 y Edn3 también estaba significativamente aumentada con respecto al control no expuesto. Se concluye que estas retinas, donde a la agresión por la luz se sumó la acción del glucocorticoide, muestran una intensa activación del sistema endotelinérgico. Esta activación no solo fue compatible con la protección de los fotorreceptores sino que probablemente fue necesaria para generar esa protección. Estudios recientes de nuestro laboratorio muestran que el bloqueo del receptor A (ET_A) durante la exposición a la luz aumenta el número de fotorreceptores desaparecidos (Bermudez y col, 2012).

En las retinas expuestas y tratadas con DEX desapareció el aumento de Lif que acompañaba a la injuria. Recordemos aquí que, en las retinas no expuestas a la luz, DEX bloqueó totalmente la expresión de este factor (ver Capítulo 5).

La suma de la exposición a la luz y MFP determinó lesiones más graves que las producidas por cualquiera de estos agentes por separado (ver Capítulos 4 y 6). En estas

condiciones observamos un aumento en la expresión de Fgf2, significativamente menor que el determinado por DEX. Por el contrario, los valores de Lif y Edn2 se elevaron por encima de los valores observados en controles expuestos y no expuestos a la luz, o de las retinas expuestas tratadas con DEX. Estas diferencias implican que MFP sería capaz de estimular el denominado modo o red de rescate también dentro de un contexto de sufrimiento provocado por la agresión de la luz.

Al igual que en las retinas sin estrés fototóxico, la activación del modo de rescate no fue efectiva para prevenir el daño de los fotorreceptores. Probablemente, porque esta red también requiere la disponibilidad de receptores endotelinérgicos, cuya expresión fue reducida por MFP. Como mencionamos más arriba, el bloqueo de los receptores endotelinérgicos, en particular de ET_A, aumenta la pérdida de fotorreceptores inducida por la luz (Bermudez y col, 2012).

Las funciones de Edn3 en la lesión fototóxica son poco claras. Los datos sugieren que no intervendría directamente en la respuesta al daño de los fotorreceptores. Sus niveles de expresión en los controles expuestos no diferían de aquellos en los controles no expuestos; además, los niveles en el grupo D+M fueron más elevados que en el grupo MFP, aunque el daño fue mucho mayor en este último grupo. Por otra parte, ET-3 no activa a los receptores ET_A, que por su localización en la plexiforme externa (Torbidoni y col, 2006) podrían ser los directos encargados de proteger a los fotorreceptores.

Conclusiones

Al analizar la expresión de las endotelinas, sus receptores, Ff2 y Lif en condiciones de estrés luminoso, junto con las modificaciones inducidas por los glucocorticoides o su bloqueante, concluimos que la respuesta al daño fototóxico incluiría tanto al modo de rescate como al modo de mantenimiento.

Sin embargo, la protección más eficiente fue lograda por DEX. Este glucocorticoide, a pesar de suprimir parcialmente el modo de rescate, permitiría el uso eficiente de las señales endotelinérgicas, ya que también aumentó la expresión de los dos receptores, Ednr y Ednr_b. Por el contrario, aunque el bloqueo por MFP activó Edn2 y Lif, determinantes del modo de rescate, también suprimió a los receptores, impidiendo así la acción de Edn2.

Capítulo 8

Reflexiones y conclusiones finales

La retina es la única parte del SNC que está expuesta a la luz y por lo tanto enfrenta el desafío de una agresión foto-oxidativa permanente. La supervivencia de los fotorreceptores, cuyos segmentos externos son los que absorben la luz, y del epitelio pigmentario de la retina (EP), encargado de renovar las porciones más expuestas de los fotorreceptores, requiere la acción constante de mecanismos que promueven la supervivencia o impiden la muerte celular programada. La falla de estos mecanismos origina lesiones graves de la retina que llevan a la ceguera, como ocurre en la degeneración macular asociada con la edad o con las degeneraciones retinales de origen genético.

El papel de los glucocorticoides y las endotelinas como factores de protección en la respuesta de la retina al daño de los fotorreceptores es conocido. Los efectos protectores de los glucocorticoides fueron descritos hace 20 años, mientras que las primeras publicaciones sobre la participación del sistema endotelinérgico en la degeneración de la retina apenas tienen 7 años. Hasta donde hemos podido averiguarlo, este constituye el primer trabajo que intenta verificar si las vías dependientes de los glucocorticoides y aquellas asociadas al sistema endotelinérgico se entrecruzan en la retina, y si ambas redes de señalización contribuyen a la protección de los fotorreceptores.

Las vías endotelinérgicas en la retina fueron estudiadas previamente en nuestro laboratorio. Por lo tanto, comenzamos directamente con el estudio de la localización del receptor de glucocorticoides clásico ($GR\alpha$), y los efectos de su ligando selectivo, la dexametasona (DEX) y de un antagonista, la mifepristona (MFP). Nuestra primera conclusión, basada en datos inmunohistoquímicos, fue que los $GR\alpha$ se acumulan en los núcleos de las neuronas retinales y que los núcleos de los fotorreceptores acumulaban aún más inmunorreactividad cuando estaban sometidos a algún tipo de injuria. La detección de isoformas fosforiladas en las mismas localizaciones nos permite suponer que se trata de un $GR\alpha$ activo. Además, encontramos isoformas fosforiladas de $GR\alpha$ en los segmentos externo e interno de los fotorreceptores. Este hallazgo sugiere que los glucocorticoides podrían intervenir directamente sobre los procesos de fototransducción.

Ya que DEX protege a los fotorreceptores agredidos por el exceso de iluminación, era esperable que un antagonista agravara esa degeneración. Así ocurrió, pero el fenómeno imprevisto fue que MFP dañaba a los fotorreceptores por sí misma, en ausencia de otros tóxicos ambientales o genéticos. Esto nos permitió estudiar con profundidad el proceso de lesión de los fotorreceptores, ya que las lesiones por MFP fueron altamente reproducibles, podían detectarse apenas 6 h después de la administración de la droga, y aparecían exclusivamente en los fotorreceptores. Durante ese breve lapso, MFP indujo fragmentación del ADN de los fotorreceptores, prácticamente sin daño estructural detectable con los procedimientos convencionales. A las 6 h de administrado MFP, también había desaparecido una molécula antiapoptótica, la isoforma larga de Bcl-X (Bcl-X_L) y se podía detectar la caspasa-3 clivada (CC-3) una de las moléculas ejecutoras de la muerte celular programada. También se encontraba la histona H2XA fosforilada (p-H2XA), una variante de la histona H2 que reconoce las fracturas de la doble cadena del ADN e interviene en su reparación. Este proceso de daño celular se mantuvo activo hasta por lo menos 48 h después de una única dosis de MFP (10 mg/kg). Dado el extenso uso de esta droga como inductor de abortos, más nuevas recomendaciones para su empleo como anticonceptivo, en el tratamiento de la miomatosis y la endometriosis, la depresión, y la coriorretinopatía serosa central, parece necesario profundizar el estudio de este fenómeno. Es poco probable que los protocolos de dosificación utilizadas en el humano desencadenen fenómenos apoptóticos masivos como los observados en la retina del ratón. Sin embargo, la fragmentación del ADN puede originar la acumulación selectiva de mutaciones en los fotorreceptores, y contribuir así a la degeneración de los fotorreceptores desencadenada por otros factores, como el envejecimiento o los trastornos metabólicos.

Las lesiones provocadas por MFP fueron total o parcialmente evitadas por DEX, salvo el descenso de Bcl-X_L. Este hecho sugirió una posible participación del receptor de progesterona, también bloqueado por MFP. Sin embargo, descubrimos que el mismo proceso de fragmentación del ADN aparecía en los animales adrenalectomizados.

Estudiamos entonces la asociación entre las lesiones de los fotorreceptores con la expresión de los tres genes de las endotelinas, Edn1, Edn2 y Edn3, sus receptores, Ednra y Ednrb, y dos factores que tienen relación directa con los mecanismos de supervivencia de los fotorreceptores, Fgf2 y Lif. Los resultados de estos experimentos fueron muy ilustrativos ya que mostraron claramente dos tipos de respuesta. Una, que

hemos denominado modo de mantenimiento, dependía de DEX y activaba la expresión de Edn1 y Edn3, los dos receptores y Fgf2. Simultáneamente, la expresión de Edn2 y Lif se volvían indetectables. Por el contrario, la administración de MFP activó una red distinta, denominada modo de rescate, que incluía el aumento en la expresión de Edn2 y Lif, al mismo tiempo que se reducía la expresión de Edn1 y Edn3. El modo de rescate también incluye el aumento en la expresión de Fgf2, que es necesario para la supervivencia de los fotorreceptores.

Finalmente, comparamos estas respuestas de la retina sin estrés lumínico, con los efectos de DEX y MFP en retinas expuestas a luz durante 2 d. Sin tratamiento, estas retinas pierden un número significativo de fotorreceptores. Como era de esperar, la administración de DEX protegió totalmente a los fotorreceptores, mientras que MFP aumentó la proporción de fotorreceptores desaparecidos. Las conclusiones más importantes de estos experimentos provienen de las alteraciones observadas en las moléculas asociadas a la muerte celular, las del sistema endotelinérgico, Fgf2 y Lif. La exposición a la luz, por si misma, determinó los mismos cambios de Bcl-XL y CC-3 que producía la administración de MFP a las retinas no expuestas a la luz. Solo que en este caso, la depleción de Bcl-XL fue completamente prevenida por DEX. En las retinas expuestas que habían recibido MFP, DEX no pudo evitar ese descenso, y solo controló parcialmente el aumento de la CC-3.

Con respecto a las vías de mantenimiento y de rescate, las observaciones sobre los niveles de expresión de los genes involucrados sugieren ambas serían simultáneamente activadas por la exposición a la luz. El tratamiento con DEX aumentó la activación de la vía de mantenimiento, a la vez que impidió el aumento de Lif sobre los niveles basales. Por el contrario, MFP bloqueó el aumento en la expresión de Edn1 y de ambos receptores endotelinérgicos, y redujo la expresión de Fgf2, a la vez que promovía la expresión de Lif. Concluimos que, aunque en otro nivel de funcionamiento ambas vías serían activadas durante la exposición a la luz. En los animales con sufrimiento lumínico, DEX también aumentó Edn2 aunque no permitió el incremento en la expresión de Lif. Por otra parte, tanto en los animales expuestos como en los no expuestos a la luz, la activación de la vía de rescate por acción de MFP, no coincide con una mayor supervivencia de los fotorreceptores. Los experimentos en los animales expuestos al estrés lumínico sugieren que esta incapacidad podría deberse a la reducción en la expresión de Ednra y Ednrb, que obstaculizaría la transmisión de las señales

dependientes de LIF. Esto explicaría porque el daño de los fotorreceptores en los animales expuestos que recibieron MFP fue mayor que en los controles expuestos que solo recibieron inyecciones de vehículo. En estos controles, la agresión lumínica determinó un aumento en la expresión de los receptores, que desapareció en presencia de MFP.

En resumen, nuestros hallazgos y comprobaciones experimentales permitieron comprender una parte de las interacciones entre los glucocorticoides, el sistema endotelinérgico y los factores de supervivencia. Seguramente el mecanismo que controla el equilibrio entre la vida o la muerte de un fotorreceptor es mucho más complejo que lo que hasta ahora hemos descrito. Sin embargo, entendemos que nuestro trabajo confirma el papel esencial de los glucocorticoides para el mantenimiento de estas células constantemente expuestas a un nivel de estrés mayor que el de otros tejidos. También confirma que el sistema endotelinérgico es un intermediario indispensable para la función protectora de los glucocorticoides.

Referencias bibliográficas

- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7:41-53.
- Abrahan CE, Insua MF, Politi LE, German OL, Rotstein NP (2009) Oxidative stress promotes proliferation and dedifferentiation of retina glial cells in vitro. *J Neurosci Res* 87:964-977.
- Amaravadi R, Thompson CB (2005) The survival kinases Akt and Pim as potential pharmacological targets. *J Clin Invest* 115:2618-2624.
- Amsterdam A, Tajima K, Sasson R (2002) Cell-specific regulation of apoptosis by glucocorticoids: implication to their anti-inflammatory action. *Biochem Pharmacol* 64:843-850.
- Angel P, Karin M (1991) The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072:129-157.
- Applebury ML, Antoch MP, Baxter LC, Chun LL, Falk JD, Farhangfar F, Kage K, Krzystolik MG, Lyass LA, Robbins JT (2000) The murine cone photoreceptor: a single cone type expresses both S and M opsins with retinal spatial patterning. *Neuron* 27:513-523.
- Arai H, Sanbongi Y, Igarashi Y, Kodama T (1990) Cloning and sequencing of the gene encoding cytochrome c-551 from *Pseudomonas aeruginosa*. *FEBS Lett* 261:196-198.
- Artemyev NO (2008) Light-dependent compartmentalization of transducin in rod photoreceptors. *Mol Neurobiol* 37:44-51.
- ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research.
- Asagami T, Belanoff JK, Azuma J, Blasey CM, Clark RD, Tsao PS (2011) Selective Glucocorticoid Receptor (GR-II) Antagonist Reduces Body Weight Gain in Mice. *J Nutr Metab* 2011:235389.
- Barthel LK, Raymond PA (1990) Improved method for obtaining 3-microns cryosections for immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem* 38:1383-1388.
- Barzilai A, Biton S, Shiloh Y (2008) The role of the DNA damage response in neuronal development, organization and maintenance. *DNA Repair (Amst)* 7:1010-1027.
- Bazan NG, Calandria JM, Serhan CN (2010) Rescue and repair during photoreceptor cell renewal mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1. *J Lipid Res* 51:2018-2031.
- Bermudez V, Cubilla MA, Bachor TA, Olivera M, Suburo AM (2012) Endothelin receptor A antagonist enhances light-induced damage in the mouse retina. In: *ARVO 2012 Ft. Lauderdale*.
- Blanks JC, Johnson LV (1986) Vascular atrophy in the retinal degenerative rd mouse. *J Comp Neurol* 254:543-553.
- Blind RD, Garabedian MJ (2008) Differential recruitment of glucocorticoid receptor phospho-isoforms to glucocorticoid-induced genes. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:150-157.
- Borcsok I, Schairer HU, Sommer U, Wakley GK, Schneider U, Geiger F, Niethard FU, Ziegler R, Kasperk CH (1998) Glucocorticoids regulate the expression of the human osteoblastic endothelin A receptor gene. *J Exp Med* 188:1563-1573.
- Bringmann A, Reichenbach A (2001) Role of Muller cells in retinal degenerations. *Front Biosci* 6:E72-92.

- Burgi S, Samardzija M, Grimm C (2009) Endogenous leukemia inhibitory factor protects photoreceptor cells against light-induced degeneration. *Mol Vis* 15:1631-1637.
- Calderon E, Gomez-Sanchez CE, Cozza EN, Zhou M, Coffey RG, Lockey RF, Prockop LD, Szentivanyi A (1994) Modulation of endothelin-1 production by a pulmonary epithelial cell line. I. Regulation by glucocorticoids. *Biochem Pharmacol* 48:2065-2071.
- Calvert PD, Strissel KJ, Schiesser WE, Pugh EN, Jr., Arshavsky VY (2006) Light-driven translocation of signaling proteins in vertebrate photoreceptors. *Trends Cell Biol* 16:560-568.
- Campochiaro PA, Hafiz G, Shah SM, Bloom S, Brown DM, Busquets M, Ciulla T, Feiner L, Sabates N, Billman K, Kapik B, Green K, Kane F (2010) Sustained ocular delivery of fluocinolone acetonide by an intravitreal insert. *Ophthalmology* 117:1393-1399 e1393.
- Cao W, Wen R, Li F, Cheng T, Steinberg RH (1997) Induction of basic fibroblast growth factor mRNA by basic fibroblast growth factor in Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:1358-1366.
- Casson RJ, Chidlow G, Wood JP, Vidal-Sanz M, Osborne NN (2004) The effect of retinal ganglion cell injury on light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:685-693.
- Castañeda MM, Cubilla MA, Bachor T, Suburo AM (2011) Endothelinergic signaling during recovery of brain cortical lesions. *Neurol Res* 33:137-144.
- Castañeda MM, Cubilla MA, López-Vicchi MM, Suburo AM (2010) Endothelinergic cells in the subependymal region of mice. *Brain Res* 1321:20-30.
- Catalani E, Tomassini S, Dal Monte M, Bosco L, Casini G (2009) Localization patterns of fibroblast growth factor 1 and its receptors FGFR1 and FGFR2 in postnatal mouse retina. *Cell Tissue Res* 336:423-438.
- Cideciyan AV, Hood DC, Huang Y, Banin E, Li ZY, Stone EM, Milam AH, Jacobson SG (1998) Disease sequence from mutant rhodopsin allele to rod and cone photoreceptor degeneration in man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7103-7108.
- Cohen LH, Noell WK (1960) Glucose catabolism of rabbit retina before and after development of visual function. *J Neurochem* 5:253-276.
- Cortina MS, Gordon WC, Lukiw WJ, Bazan NG (2003) DNA repair in photoreceptor survival. *Mol Neurobiol* 28:111-122.
- Cringle SJ, Yu PK, Su EN, Yu DY (2006) Oxygen distribution and consumption in the developing rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:4072-4076.
- Cubilla MA, Castañeda MM, Bachor TP, Suburo AM (2011) Glucocorticoid-dependent mechanisms in photoreceptor survival. *Adv Exp Med Biol*
- Cunha-Vaz JG (2004) The blood-retinal barriers system. Basic concepts and clinical evaluation. *Exp Eye Res* 78:715-721.
- Chadi G, Rosen L, Cintra A, Tinner B, Zoli M, Pettersson RF, Fuxe K (1993) Corticosterone increases FGF-2 (bFGF) immunoreactivity in the substantia nigra of the rat. *Neuroreport* 4:783-786.
- Chakravarthy U, Hayes RG, Stitt AW, Douglas A (1997) Endothelin expression in ocular tissues of diabetic and insulin-treated rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2144-2151.
- Chang J, Park K, Bang YJ, Kim WS, Kim D, Kim SJ (1997) Expression of transforming growth factor beta type II receptor reduces tumorigenicity in human gastric cancer cells. *Cancer Res* 57:2856-2859.

- Chao HH, Juan SH, Liu JC, Yang HY, Yang E, Cheng TH, Shyu KG (2005) Resveratrol inhibits angiotensin II-induced endothelin-1 gene expression and subsequent proliferation in rat aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol* 515:1-9.
- Chao HM, McEwen BS (1994) Glucocorticoids and the expression of mRNAs for neurotrophins, their receptors and GAP-43 in the rat hippocampus. *Brain Res Mol Brain Res* 26:271-276.
- Chen L, Wu W, Dentchev T, Zeng Y, Wang J, Tsui I, Tobias JW, Bennett J, Baldwin D, Dunaief JL (2004) Light damage induced changes in mouse retinal gene expression. *Exp Eye Res* 79:239-247.
- Chen Y, Wang W, Zhuang Y, Chen X, Huang L (2011) Effects of low-dose mifepristone administration in two different 14-day regimens on the menstrual cycle and endometrial development: a randomized controlled trial. *Contraception* 84:64-70.
- Chesnokova V, Auernhammer CJ, Melmed S (1998) Murine leukemia inhibitory factor gene disruption attenuates the hypothalamo-pituitary-adrenal axis stress response. *Endocrinology* 139:2209-2216.
- Cheung LW, Leung KW, Wong CK, Wong RN, Wong AS (2011) Ginsenoside-Rg1 induces angiogenesis via non-genomic crosstalk of glucocorticoid receptor and fibroblast growth factor receptor-1. *Cardiovasc Res* 89:419-425.
- Cho KI, Yi H, Yeh A, Tserentsoodol N, Cuadrado L, Searle K, Hao Y, Ferreira PA (2009) Haploinsufficiency of RanBP2 is neuroprotective against light-elicited and age-dependent degeneration of photoreceptor neurons. *Cell Death Differ* 16:287-297.
- Chollangi S, Wang J, Martin A, Quinn J, Ash JD (2009) Preconditioning-induced protection from oxidative injury is mediated by leukemia inhibitory factor receptor (LIFR) and its ligands in the retina. *Neurobiol Dis* 34:535-544.
- Christiansen JJ, Djurhuus CB, Gravholt CH, Iversen P, Christiansen JS, Schmitz O, Weeke J, Jorgensen JO, Moller N (2007) Effects of cortisol on carbohydrate, lipid, and protein metabolism: studies of acute cortisol withdrawal in adrenocortical failure. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3553-3559.
- Chrousos GP, Kino T (2005) Intracellular glucocorticoid signaling: a formerly simple system turns stochastic. *Sci STKE* 2005:pe48.
- Dacey DM (1999) Primate retina: cell types, circuits and color opponency. *Prog Retin Eye Res* 18:737-763.
- Davenport AP, Maguire JJ (2006) Endothelin. *Handb Exp Pharmacol* 295-329.
- De Bosscher K, Van Craenenbroeck K, Meijer OC, Haegeman G (2008) Selective transrepression versus transactivation mechanisms by glucocorticoid receptor modulators in stress and immune systems. *Eur J Pharmacol* 583:290-302.
- Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Duriez P, Staels B (1999) Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 85:394-402.
- Delrieu I (2000) The high molecular weight isoforms of basic fibroblast growth factor (FGF-2): an insight into an intracrine mechanism. *FEBS Lett* 468:6-10.
- Demontis GC, Longoni B, Marchiafava PL (2002) Molecular steps involved in light-induced oxidative damage to retinal rods. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2421-2427.

- Deng D, Evans T, Mukherjee K, Downey D, Chakrabarti S (1999) Diabetes-induced vascular dysfunction in the retina: role of endothelins. *Diabetologia* 42:1228-1234.
- Dietrich WD, Alonso O, Busto R, Finklestein SP (1996) Posttreatment with intravenous basic fibroblast growth factor reduces histopathological damage following fluid-percussion brain injury in rats. *J Neurotrauma* 13:309-316.
- Dorfman DM, Wilson DB, Bruns GA, Orkin SH (1992) Human transcription factor GATA-2. Evidence for regulation of preproendothelin-1 gene expression in endothelial cells. *J Biol Chem* 267:1279-1285.
- Dschietzig T, Richter C, Pfannenschmidt G, Bartsch C, Laule M, Baumann G, Stangl K (2001) Dexamethasone inhibits stimulation of pulmonary endothelins by proinflammatory cytokines: possible involvement of a nuclear factor kappa B dependent mechanism. *Intensive Care Med* 27:751-756.
- Du J, McEwen B, Manji HK (2009) Glucocorticoid receptors modulate mitochondrial function: A novel mechanism for neuroprotection. *Commun Integr Biol* 2:350-352.
- Edelman JL (2010) Differentiating intraocular glucocorticoids. *Ophthalmologica* 224 Suppl 1:25-30.
- El-Remessy AB, Khalifa Y, Ola S, Ibrahim AS, Liou GI (2010) Cannabidiol protects retinal neurons by preserving glutamine synthetase activity in diabetes. *Mol Vis* 16:1487-1495.
- Evans-Storms RB, Cidlowski JA (2000) Delineation of an antiapoptotic action of glucocorticoids in hepatoma cells: the role of nuclear factor-kappaB. *Endocrinology* 141:1854-1862.
- Fain GL (2006) Why photoreceptors die (and why they don't). *Bioessays* 28:344-354.
- Faktorovich EG, Steinberg RH, Yasumura D, Matthes MT, LaVail MM (1992) Basic fibroblast growth factor and local injury protect photoreceptors from light damage in the rat. *J Neurosci* 12:3554-3567.
- Finn K, Lowndes NF, Grenon M (2011) Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci*.
- Foley LP (2005) Common surgical procedures in rodents. In: *Laboratory Animal Medicine and Management*, vol. B2515.0605 (Reuter JD, ySuckow MA, eds) Ithaca, N.Y.: International Veterinary Information Service.
- Foulds WS (1990) The choroidal circulation and retinal metabolism--an overview. *Eye (Lond)* 4 (Pt 2):243-248.
- Frank MG, Der-Avakian A, Bland ST, Watkins LR, Maier SF (2007) Stress-induced glucocorticoids suppress the antisense molecular regulation of FGF-2 expression. *Psychoneuroendocrinology* 32:376-384.
- Fu Y, Yau KW (2007) Phototransduction in mouse rods and cones. *Pflugers Arch* 454:805-819.
- Gadea A, Schinelli S, Gallo V (2008) Endothelin-1 regulates astrocyte proliferation and reactive gliosis via a JNK/c-Jun signaling pathway. *J Neurosci* 28:2394-2408.
- Gao H, Hollyfield JG (1995) Basic fibroblast growth factor in retinal development: differential levels of bFGF expression and content in normal and retinal degeneration (rd) mutant mice. *Dev Biol* 169:168-184.
- Gao H, Hollyfield JG (1996) Basic fibroblast growth factor: increased gene expression in inherited and light-induced photoreceptor degeneration. *Exp Eye Res* 62:181-189.
- Garcia M, Vecino E (2003) Role of Muller glia in neuroprotection and regeneration in the retina. *Histol Histopathol* 18:1205-1218.

- Glybina IV, Kennedy A, Ashton P, Abrams GW, Iezzi R (2009) Photoreceptor neuroprotection in RCS rats via low-dose intravitreal sustained-delivery of fluocinolone acetonide. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:4847-4857.
- Gospe SM, 3rd, Baker SA, Arshavsky VY (2010) Facilitative glucose transporter Glut1 is actively excluded from rod outer segments. *J Cell Sci* 123:3639-3644.
- Graymore C (1959) Metabolism of the developing retina. I. Aerobic and anaerobic glycolysis in the developing rat retina. *Br J Ophthalmol* 43:34-39.
- Grewal R, Stepczynski J, Kelln R, Erickson T, Darrow R, Barsalou L, Patterson M, Organisciak DT, Wong P (2004) Coordinated changes in classes of ribosomal protein gene expression is associated with light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45:3885-3895.
- Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seeliger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Reme CE (2002) HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med* 8:718-724.
- Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Reme CE (2000a) Gene expression in the mouse retina: the effect of damaging light. *Mol Vis* 6:252-260.
- Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Yu S, Redmond TM, Reme CE (2000b) Protection of Rpe65-deficient mice identifies rhodopsin as a mediator of light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 25:63-66.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M (2011) Mineralocorticoid and glucocorticoid receptors at the neuronal membrane, regulators of nongenomic corticosteroid signalling. *Mol Cell Endocrinol*.
- Gu D, Beltran WA, Pearce-Kelling S, Li Z, Acland GM, Aguirre GD (2009) Steroids do not prevent photoreceptor degeneration in the light-exposed T4R rhodopsin mutant dog retina irrespective of AP-1 inhibition. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 50:3482-3494.
- Guerin CJ, Lewis GP, Fisher SK, Anderson DH (1993) Recovery of photoreceptor outer segment length and analysis of membrane assembly rates in regenerating primate photoreceptor outer segments. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 34:175-183.
- Hackett SF, Schoenfeld CL, Freund J, Gottsch JD, Bhargava S, Campochiaro PA (1997) Neurotrophic factors, cytokines and stress increase expression of basic fibroblast growth factor in retinal pigmented epithelial cells. *Exp Eye Res* 64:865-873.
- Hafezi F, Marti A, Munz K, Reme CE (1997) Light-induced apoptosis: differential timing in the retina and pigment epithelium. *Exp Eye Res* 64:963-970.
- Hansson AC, Cintra A, Belluardo N, Sommer W, Bhatnagar M, Bader M, Ganten D, Fuxe K (2000) Gluco- and mineralocorticoid receptor-mediated regulation of neurotrophic factor gene expression in the dorsal hippocampus and the neocortex of the rat. *Eur J Neurosci* 12:2918-2934.
- Hao W, Wenzel A, Obin MS, Chen CK, Brill E, Krasnoperova NV, Eversole-Cire P, Kleyner Y, Taylor A, Simon MI, Grimm C, Reme CE, Lem J (2002) Evidence for two apoptotic pathways in light-induced retinal degeneration. *Nat Genet* 32:254-260.
- Harada C, Guo X, Namekata K, Kimura A, Nakamura K, Tanaka K, Parada LF, Harada T (2011) Glia- and neuron-specific functions of TrkB signalling during retinal degeneration and regeneration. *Nat Commun* 2:189.
- Haruta M, Bush RA, Kjellstrom S, Vijayasarathy C, Zeng Y, Le YZ, Sieving PA (2009) Depleting Rac1 in mouse rod photoreceptors protects them from photo-oxidative stress without affecting their structure or function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:9397-9402.

- Heikinheimo O, Kekkonen R, Lahteenmaki P (2003) The pharmacokinetics of mifepristone in humans reveal insights into differential mechanisms of antiprogesterone action. *Contraception* 68:421-426.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1-20.
- Hinds TD, Jr., Ramakrishnan S, Cash HA, Stechschulte LA, Heinrich G, Najjar SM, Sanchez ER (2010) Discovery of Glucocorticoid Receptor- β in Mice with a Role in Metabolism. *Mol Endocrinol* 24:1715-1727.
- Hisatomi T, Nakazawa T, Noda K, Almulki L, Miyahara S, Nakao S, Ito Y, She H, Kohno R, Michaud N, Ishibashi T, Hafezi-Moghadam A, Badley AD, Kroemer G, Miller JW (2008) HIV protease inhibitors provide neuroprotection through inhibition of mitochondrial apoptosis in mice. *J Clin Invest* 118:2025-2038.
- Hisatomi T, Sakamoto T, Goto Y, Yamanaka I, Oshima Y, Hata Y, Ishibashi T, Inomata H, Susin SA, Kroemer G (2002) Critical role of photoreceptor apoptosis in functional damage after retinal detachment. *Curr Eye Res* 24:161-172.
- Hisatomi T, Sakamoto T, Murata T, Yamanaka I, Oshima Y, Hata Y, Ishibashi T, Inomata H, Susin SA, Kroemer G (2001) Relocalization of apoptosis-inducing factor in photoreceptor apoptosis induced by retinal detachment in vivo. *Am J Pathol* 158:1271-1278.
- Ho MC, Lo AC, Kurihara H, Yu AC, Chung SS, Chung SK (2001) Endothelin-1 protects astrocytes from hypoxic/ischemic injury. *Faseb J* 15:618-626.
- Howell GR, Macalinao DG, Sousa GL, Walden M, Soto I, Kneeland SC, Barbay JM, King BL, Marchant JK, Hibbs M, Stevens B, Barres BA, Clark AF, Libby RT, John SW (2011) Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J Clin Invest* 121:1429-1444.
- Hynynen MM, Khalil RA (2006) The vascular endothelin system in hypertension--recent patents and discoveries. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 1:95-108.
- Imai S, Shimazawa M, Nakanishi T, Tsuruma K, Hara H (2010) Calpain inhibitor protects cells against light-induced retinal degeneration. *J Pharmacol Exp Ther*.
- Iniguez-Lluhi JA, Lou DY, Yamamoto KR (1997) Three amino acid substitutions selectively disrupt the activation but not the repression function of the glucocorticoid receptor N terminus. *J Biol Chem* 272:4149-4156.
- Iribarne M, Ogawa L, Torbidoni V, Dodds CM, Dodds RA, Suburo AM (2008) Blockade of endothelinergic receptors prevents development of proliferative vitreoretinopathy in mice. *Am J Pathol* 172:1030-1042.
- Ismaili N, Garabedian MJ (2004) Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1024:86-101.
- Issar M, Sahasranaman S, Buchwald P, Hochhaus G (2006) Differences in the glucocorticoid to progesterone receptor selectivity of inhaled glucocorticoids. *Eur Respir J* 27:511-516.
- Itoh N (2010) Hormone-like (endocrine) Fgfs: their evolutionary history and roles in development, metabolism, and disease. *Cell Tissue Res* 342:1-11.
- Jenkins BD, Pullen CB, Darimont BD (2001) Novel glucocorticoid receptor coactivator effector mechanisms. *Trends Endocrinol Metab* 12:122-126.
- Johnson LR, Farb C, Morrison JH, McEwen BS, LeDoux JE (2005) Localization of glucocorticoid receptors at postsynaptic membranes in the lateral amygdala. *Neuroscience* 136:289-299.

- Joly S, Lange C, Thiersch M, Samardzija M, Grimm C (2008) Leukemia inhibitory factor extends the lifespan of injured photoreceptors in vivo. *J Neurosci* 28:13765-13774.
- Kagan VE, Shvedova AA, Novikov KN, Kozlov YP (1973) Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retina. *Biochim Biophys Acta* 330:76-79.
- Kalinyak JE, Dorin RI, Hoffman AR, Perlman AJ (1987) Tissue-specific regulation of glucocorticoid receptor mRNA by dexamethasone. *J Biol Chem* 262:10441-10444.
- Kanan Y, Moiseyev G, Agarwal N, Ma JX, Al-Ubaidi MR (2007) Light induces programmed cell death by activating multiple independent proteases in a cone photoreceptor cell line. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:40-51.
- Kanse SM, Takahashi K, Warren JB, Ghatei M, Bloom SR (1991) Glucocorticoids induce endothelin release from vascular smooth muscle cells but not endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 199:99-101.
- Kawana M, Lee ME, Quertermous EE, Quertermous T (1995) Cooperative interaction of GATA-2 and AP1 regulates transcription of the endothelin-1 gene. *Mol Cell Biol* 15:4225-4231.
- Kawanabe (2011) Endothelin. *cell mol life Sci* 68.
- Keller C, Grimm C, Wenzel A, Hafezi F, Reme C (2001) Protective effect of halothane anesthesia on retinal light damage: inhibition of metabolic rhodopsin regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:476-480.
- Kino T (2007) Tissue glucocorticoid sensitivity: beyond stochastic regulation on the diverse actions of glucocorticoids. *Horm Metab Res* 39:420-424.
- Kino T, Ichijo T, Amin ND, Kesavapany S, Wang Y, Kim N, Rao S, Player A, Zheng YL, Garabedian MJ, Kawasaki E, Pant HC, Chrousos GP (2007) Cyclin-dependent kinase 5 differentially regulates the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through phosphorylation: clinical implications for the nervous system response to glucocorticoids and stress. *Mol Endocrinol* 21:1552-1568.
- Kis B, Chen L, Ueta Y, Busija DW (2006) Autocrine peptide mediators of cerebral endothelial cells and their role in the regulation of blood-brain barrier. *Peptides* 27:211-222.
- Knee R, Li AW, Murphy PR (1997) Characterization and tissue-specific expression of the rat basic fibroblast growth factor antisense mRNA and protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:4943-4947.
- Kolata S, Light K, Wass CD, Colas-Zelin D, Roy D, Matzel LD (2010) A dopaminergic gene cluster in the prefrontal cortex predicts performance indicative of general intelligence in genetically heterogeneous mice. *PLoS One* 5:e14036.
- Kolb H (1995a) Morphology and Circuitry of Ganglion Cells.
- Kolb H (1995b) Simple Anatomy of the Retina.
- Kumar R, Litwack G (2009) Structural and functional relationships of the steroid hormone receptors' N-terminal transactivation domain. *Steroids* 74:877-883.
- Kumar R, Thompson EB (2005) Gene regulation by the glucocorticoid receptor: structure: function relationship. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94:383-394.
- Kuwabara T, Gorn RA (1968) Retinal damage by visible light. An electron microscopic study. *Arch Ophthalmol* 79:69-78.
- Lamb TD (2009) Evolution of vertebrate retinal photoreception. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364:2911-2924.

- Langlais D, Couture C, Balsalobre A, Drouin J (2008) Regulatory network analyses reveal genome-wide potentiation of LIF signaling by glucocorticoids and define an innate cell defense response. *PLoS Genet* 4:e1000224.
- Lanum J (1978) The damaging effects of light on the retina. Empirical findings, theoretical and practical implications. *Surv Ophthalmol* 22:221-249.
- LaVail MM, Yasumura D, Matthes MT, Lau-Villacorta C, Unoki K, Sung CH, Steinberg RH (1998) Protection of mouse photoreceptors by survival factors in retinal degenerations. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:592-602.
- Lee ME, Dhady MS, Temizer DH, Clifford JA, Yoshizumi M, Quertermous T (1991) Regulation of endothelin-1 gene expression by Fos and Jun. *J Biol Chem* 266:19034-19039.
- Levin LA, Schlamp CL, Spieldoch RL, Geszvain KM, Nickells RW (1997) Identification of the bcl-2 family of genes in the rat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 38:2545-2553.
- Lewis-Tuffin LJ, Jewell CM, Bienstock RJ, Collins JB, Cidlowski JA (2007) Human glucocorticoid receptor beta binds RU-486 and is transcriptionally active. *Mol Cell Biol* 27:2266-2282.
- Li AW, Murphy PR (2000) Expression of alternatively spliced FGF-2 antisense RNA transcripts in the central nervous system: regulation of FGF-2 mRNA translation. *Mol Cell Endocrinol* 170:233-242.
- Li F, Cao W, Anderson RE (2003) Alleviation of constant-light-induced photoreceptor degeneration by adaptation of adult albino rat to bright cyclic light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:4968-4975.
- Liu C, Peng M, Laties AM, Wen R (1998) Preconditioning with bright light evokes a protective response against light damage in the rat retina. *J Neurosci* 18:1337-1344.
- Liu Y, Ye F, Yamada K, Tso JL, Zhang Y, Nguyen DH, Dong Q, Soto H, Choe J, Dembo A, Wheeler H, Eskin A, Schmid I, Yong WH, Mischel PS, Cloughesy TF, Kornblum HI, Nelson SF, Liau LM, Tso CL (2011) Autocrine endothelin-3/endothelin receptor B signaling maintains cellular and molecular properties of glioblastoma stem cells. *Mol Cancer Res* 9:1668-1685.
- Lohr HR, Kuntchithapautham K, Sharma AK, Rohrer B (2006) Multiple, parallel cellular suicide mechanisms participate in photoreceptor cell death. *Exp Eye Res* 83:380-389.
- Lopez EM, Julian LK, Capani F, Cymeryng CB, Coirini H, Lopez-Costa JJ (2008) Endogenous glucocorticoids participate in retinal degeneration during continuous illumination. *Int J Neurosci* 118:1725-1747.
- Mandal NA (2010) Injury and repair: light damage. In: *Encyclopedia of the eye*(Dartt DA, ed), pp 392-399.
- Martens C, Bilodeau S, Maira M, Gauthier Y, Drouin J (2005) Protein-protein interactions and transcriptional antagonism between the subfamily of NGFI-B/Nur77 orphan nuclear receptors and glucocorticoid receptor. *Mol Endocrinol* 19:885-897.
- Masaki T (2004) Historical review: Endothelin. *Trends Pharmacol Sci* 25:219-224.
- Mata NL, Weng J, Travis GH (2000) Biosynthesis of a major lipofuscin fluorophore in mice and humans with ABCR-mediated retinal and macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7154-7159.
- Miceli MV, Liles MR, Newsome DA (1994) Evaluation of oxidative processes in human pigment epithelial cells associated with retinal outer segment phagocytosis. *Exp Cell Res* 214:242-249.

- Miller RF, Dowling JE (1970) Intracellular responses of the Muller (glial) cells of mudpuppy retina: their relation to b-wave of the electroretinogram. *J Neurophysiol* 33:323-341.
- Mizuno N, Kokubu H, Sato M, Nishimura A, Yamauchi J, Kurose H, Itoh H (2005) G protein-coupled receptor signaling through Gq and JNK negatively regulates neural progenitor cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:12365-12370.
- Morin C, Asselin C, Boudreau F, Provencher PH (1998) Transcriptional regulation of pre-pro-endothelin-1 gene by glucocorticoids in vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 244:583-587.
- Morishita R, Shinohara H, Ueda H, Kato K, Asano T (1999) High expression of the gamma5 isoform of G protein in neuroepithelial cells and its replacement of the gamma2 isoform during neuronal differentiation in the rat brain. *J Neurochem* 73:2369-2374.
- Morrison RS, Sharma A, de Vellis J, Bradshaw RA (1986) Basic fibroblast growth factor supports the survival of cerebral cortical neurons in primary culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:7537-7541.
- Murakami Y, Ikeda Y, Yonemitsu Y, Onimaru M, Nakagawa K, Kohno R, Miyazaki M, Hisatomi T, Nakamura M, Yabe T, Hasegawa M, Ishibashi T, Sueishi K (2008) Inhibition of nuclear translocation of apoptosis-inducing factor is an essential mechanism of the neuroprotective activity of pigment epithelium-derived factor in a rat model of retinal degeneration. *Am J Pathol* 173:1326-1338.
- Murphy SH, Suzuki K, Downes M, Welch GL, De Jesus P, Miraglia LJ, Orth AP, Chanda SK, Evans RM, Verma IM (2011) Tumor suppressor protein (p)53, is a regulator of NF-kappaB repression by the glucocorticoid receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:17117-17122.
- Nambi P, Pullen M, Wu HL, Nuthulaganti P, Elshourbagy N, Kumar C (1992) Dexamethasone down-regulates the expression of endothelin receptors in vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* 267:19555-19559.
- Nickel T, Deutschmann A, Hanssen H, Summo C, Wilbert-Lampen U (2009) Modification of endothelial biology by acute and chronic stress hormones. *Microvasc Res* 78:364-369.
- Nicolaides NC, Galata Z, Kino T, Chrousos GP, Charmandari E (2010) The human glucocorticoid receptor: molecular basis of biologic function. *Steroids* 75:1-12.
- Nishi M, Takenaka N, Morita N, Ito T, Ozawa H, Kawata M (1999) Real-time imaging of glucocorticoid receptor dynamics in living neurons and glial cells in comparison with non-neural cells. *Eur J Neurosci* 11:1927-1936.
- O'Driscoll C, Doonan F, Sanvicens N, Messeguer A, Cotter TG (2011) A novel free radical scavenger rescues retinal cells in vivo. *Exp Eye Res* 93:65-74.
- O'Driscoll C, O'Connor J, O'Brien CJ, Cotter TG (2008) Basic fibroblast growth factor-induced protection from light damage in the mouse retina in vivo. *J Neurochem* 105:524-536.
- O'Driscoll C, Wallace D, Cotter TG (2007) bFGF promotes photoreceptor cell survival in vitro by PKA-mediated inactivation of glycogen synthase kinase 3beta and CREB-dependent Bcl-2 up-regulation. *J Neurochem* 103:860-870.
- Oakley RH, Cidlowski JA (2011) Cellular processing of the glucocorticoid receptor gene and protein: New mechanisms for generating tissue specific actions of glucocorticoids. *J Biol Chem* 286:3177-3184.
- Oakley RH, Sar M, Cidlowski JA (1996) The human glucocorticoid receptor beta isoform. Expression, biochemical properties, and putative function. *J Biol Chem* 271:9550-9559.

- Organisciak DT, Vaughan DK (2010) Retinal light damage: mechanisms and protection. *Prog Retin Eye Res* 29:113-134.
- Orti E, Hu LM, Munck A (1993) Kinetics of glucocorticoid receptor phosphorylation in intact cells. Evidence for hormone-induced hyperphosphorylation after activation and recycling of hyperphosphorylated receptors. *J Biol Chem* 268:7779-7784.
- Otto C, Reichardt HM, Schutz G (1997) Absence of glucocorticoid receptor-beta in mice. *J Biol Chem* 272:26665-26668.
- Oveson BC, Iwase T, Hackett SF, Lee SY, Usui S, Sedlak TW, Snyder SH, Campochiaro PA, Sung JU (2010) Constituents of Bile, Bilirubin and TUDCA, Protect Against Oxidative Stress-Induced Retinal Degeneration. *J Neurochem*.
- Pei K, Yu C, Shi X, Jia M (2010) The effects of mifepristone on the expressions of osteopontin, interleukin-6 and leukemia inhibitory factor in the villi of early pregnant women. *Contraception* 82:379-384.
- Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I (2007) Caspase-dependent apoptosis in light-induced retinal degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 48:2753-2759.
- Perche O, Doly M, Ranchon-Cole I (2008) Transient protective effect of caspase inhibitors in RCS rat. *Exp Eye Res* 86:519-527.
- Picard D (2006) Chaperoning steroid hormone action. *Trends Endocrinol Metab* 17:229-235.
- Piechota M, Korostynski M, Przewlocki R (2010) Identification of cis-regulatory elements in the mammalian genome: the cREMaG database. *PLoS One* 5:e12465.
- Pittack C, Grunwald GB, Reh TA (1997) Fibroblast growth factors are necessary for neural retina but not pigmented epithelium differentiation in chick embryos. *Development* 124:805-816.
- Pla P, Larue L (2003) Involvement of endothelin receptors in normal and pathological development of neural crest cells. *Int J Dev Biol* 47:315-325.
- Prasanna G, Krishnamoorthy R, Yorio T (2010) Endothelin, astrocytes and glaucoma. *Exp Eye Res*.
- Pratt WB, Toft DO (1997) Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* 18:306-360.
- Provencher PH, Saltis J, Funder JW (1995) Glucocorticoids but not mineralocorticoids modulate endothelin-1 and angiotensin II binding in SHR vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52:219-225.
- Pryce G, Giovannoni G, Baker D (2003) Mifepristone or inhibition of 11beta-hydroxylase activity potentiates the sedating effects of the cannabinoid receptor-1 agonist Delta(9)-tetrahydrocannabinol in mice. *Neurosci Lett* 341:164-166.
- Quehenberger P, Bierhaus A, Fasching P, Muellner C, Klevesath M, Hong M, Stier G, Sattler M, Schleicher E, Speiser W, Nawroth PP (2000) Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes* 49:1561-1570.
- Rattner A, Nathans J (2005) The genomic response to retinal disease and injury: evidence for endothelin signaling from photoreceptors to glia. *J Neurosci* 25:4540-4549.
- Rattner A, Nathans J (2006) An evolutionary perspective on the photoreceptor damage response. *Am J Ophthalmol* 141:558-562.
- Reddy TE, Pauli F, Sprouse RO, Neff NF, Newberry KM, Garabedian MJ, Myers RM (2009) Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation. *Genome Res* 19:2163-2171.

- Reuss B, von Bohlen und Halbach O (2003) Fibroblast growth factors and their receptors in the central nervous system. *Cell Tissue Res* 313:139-157.
- Riva MA, Fumagalli F, Blom JM, Donati E, Racagni G (1995) Adrenalectomy reduces FGF-1 and FGF-2 gene expression in specific rat brain regions and differently affects their induction by seizures. *Brain Res Mol Brain Res* 34:190-196.
- Rodriguez-Rocha H, Garcia-Garcia A, Panayiotidis MI, Franco R (2011) DNA damage and autophagy. *Mutat Res* 711:158-166.
- Ryan S (2001) *Retina*: Mosby.
- Saari JC, Nawrot M, Kennedy BN, Garwin GG, Hurley JB, Huang J, Possin DE, Crabb JW (2001) Visual cycle impairment in cellular retinaldehyde binding protein (CRALBP) knockout mice results in delayed dark adaptation. *Neuron* 29:739-748.
- Sahni JN, Angi M, Irigoyen C, Semeraro F, Romano MR, Parmeggiani F (2011) Therapeutic challenges to retinitis pigmentosa: from neuroprotection to gene therapy. *Curr Genomics* 12:276-284.
- Samardzija M, Wenzel A, Aufenberg S, Thiersch M, Reme C, Grimm C (2006) Differential role of Jak-STAT signaling in retinal degenerations. *FASEB J* 20:2411-2413.
- Santiago JJ, Ma X, McNaughton LJ, Nickel BE, Bestvater BP, Yu L, Fandrich RR, Neticadan T, Kardami E (2011) Preferential accumulation and export of high molecular weight FGF-2 by rat cardiac non-myocytes. *Cardiovasc Res* 89:139-147.
- Sarabdjitsingh RA, Meijer OC, de Kloet ER (2010) Specificity of glucocorticoid receptor primary antibodies for analysis of receptor localization patterns in cultured cells and rat hippocampus. *Brain Res* 1331:1-11.
- Schinelli S (2006a) Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. *Curr Med Chem* 13:627-638.
- Schinelli S (2006b) Pharmacology and physiopathology of the brain endothelin system: an overview. *Curr Med Chem* 13:627-638.
- Schlossmacher G, Stevens A, White A (2011) Glucocorticoid receptor-mediated apoptosis: mechanisms of resistance in cancer cells. *J Endocrinol* 211:17-25.
- Schoch GA, D'Arcy B, Stihle M, Burger D, Bar D, Benz J, Thoma R, Ruf A (2010) Molecular switch in the glucocorticoid receptor: active and passive antagonist conformations. *J Mol Biol* 395:568-577.
- Schorlemmer A, Matter ML, Shohet RV (2008) Cardioprotective signaling by endothelin. *Trends Cardiovasc Med* 18:233-239.
- Schrey MP, Patel KV, Tezapsidis N (1992) Bombesin and glucocorticoids stimulate human breast cancer cells to produce endothelin, a paracrine mitogen for breast stromal cells. *Cancer Res* 52:1786-1790.
- Schuettauf F, Vorwerk C, Naskar R, Orlin A, Quinto K, Zurakowski D, Dejneka NS, Klein RL, Meyer EM, Bennett J (2004) Adeno-associated viruses containing bFGF or BDNF are neuroprotective against excitotoxicity. *Curr Eye Res* 29:379-386.
- She H, Nakazawa T, Matsubara A, Connolly E, Hisatomi T, Noda K, Kim I, Gragoudas ES, Miller JW (2008) Photoreceptor protection after photodynamic therapy using dexamethasone in a rat model of choroidal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 49:5008-5014.
- Shibata K, Komatsu C, Misumi Y, Furukawa T (1995) Dexamethasone down-regulates the expression of endothelin B receptor mRNA in the rat brain. *Brain Res* 692:71-78.

- Shinohara H, Udagawa J, Morishita R, Ueda H, Otani H, Semba R, Kato K, Asano T (2004) Gi2 signaling enhances proliferation of neural progenitor cells in the developing brain. *J Biol Chem* 279:41141-41148.
- Shuto M, Higuchi K, Sugiyama C, Yoneyama M, Kuramoto N, Nagashima R, Kawada K, Ogita K (2009) Endogenous and exogenous glucocorticoids prevent trimethyltin from causing neuronal degeneration of the mouse brain in vivo: involvement of oxidative stress pathways. *J Pharmacol Sci* 110:424-436.
- Sieving PA, Chaudhry P, Kondo M, Provenzano M, Wu D, Carlson TJ, Bush RA, Thompson DA (2001) Inhibition of the visual cycle in vivo by 13-cis retinoic acid protects from light damage and provides a mechanism for night blindness in isotretinoin therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:1835-1840.
- Silva CM, Powell-Oliver FE, Jewell CM, Sar M, Allgood VE, Cidlowski JA (1994) Regulation of the human glucocorticoid receptor by long-term and chronic treatment with glucocorticoid. *Steroids* 59:436-442.
- Smoak KA, Cidlowski JA (2004) Mechanisms of glucocorticoid receptor signaling during inflammation. *Mech Ageing Dev* 125:697-706.
- Sperduto RD, Hiller R, Seigel D (1981) Lens opacities and senile maculopathy. *Arch Ophthalmol* 99:1004-1008.
- Stanimirovic DB, McCarron RM, Spatz M (1994) Dexamethasone down-regulates endothelin receptors in human cerebrovascular endothelial cells. *Neuropeptides* 26:145-152.
- Stitt AW, Chakravarthy U, Gardiner TA, Archer DB (1996) Endothelin-like immunoreactivity and receptor binding in the choroid and retina. *Curr Eye Res* 15:111-117.
- Stone J, Dreher Z (1987) Relationship between astrocytes, ganglion cells and vasculature of the retina. *J Comp Neurol* 255:35-49.
- Stone J, Makarov F, Hollander H (1995) The glial ensheathment of the soma and axon hillock of retinal ganglion cells. *Vis Neurosci* 12:273-279.
- Stow LR, Jacobs ME, Wingo CS, Cain BD (2011a) Endothelin-1 gene regulation. *Faseb J* 25:16-28.
- Stow LR, Voren GE, Gumz ML, Wingo CS, Cain BD (2011b) Dexamethasone stimulates endothelin-1 gene expression in renal collecting duct cells. *Steroids en prensa*.
- Strickland I, Kisich K, Hauk PJ, Vottero A, Chrousos GP, Klemm DJ, Leung DY (2001) 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* 193:585-593.
- Sung CH, Chuang JZ (2010) The cell biology of vision. *J Cell Biol* 190:953-963.
- Sutcliffe AM, Clarke DL, Bradbury DA, Corbett LM, Patel JA, Knox AJ (2009) Transcriptional regulation of monocyte chemotactic protein-1 release by endothelin-1 in human airway smooth muscle cells involves NF-kappaB and AP-1. *Br J Pharmacol* 157:436-450.
- Sykes SM, Robison WG, Jr., Waxler M, Kuwabara T (1981) Damage to the monkey retina by broad-spectrum fluorescent light. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 20:425-434.
- Takahashi K, Lam TT, Fu J, Tso MO (1997) The effect of high-dose methylprednisolone on laser-induced retinal injury in primates: an electron microscopic study. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 235:723-732.

- Tanito M, Anderson RE (2006) Bright cyclic light rearing-mediated retinal protection against damaging light exposure in adrenalectomized mice. *Exp Eye Res* 83:697-701.
- Tasman W (2002) *Duane's Ophthalmology*.
- Taylor HR, West S, Munoz B, Rosenthal FS, Bressler SB, Bressler NM (1992) The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol* 110:99-104.
- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ (2008) Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9:231-241.
- Torbidoni V, Iribarne M, Ogawa L, Prasanna G, Suburo AM (2005) Endothelin-1 and endothelin receptors in light-induced retinal degeneration. *Exp Eye Res* 81:265-275.
- Torbidoni V, Iribarne M, Suburo AM (2006) Endothelin receptors in light-induced retinal degeneration. *Exp Biol Med (Maywood)* 231:1095-1100.
- Torbidoni V, Iribarne M, Suburo AM (2008) Changes in endothelinergic mRNAs in light-induced retinal degeneration in mice. In: *Neuroscience, 2008* Washington, DC.
- Tso MO, La Piana FG (1975) The human fovea after sungazing. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol* 79:OP788-795.
- Udono-Fujimori R, Totsune K, Murakami O, Arihara Z, Kikuchi K, Tamai M, Shibahara S, Takahashi K (2004) Suppression of cytokine-induced expression of endothelin-1 by dexamethasone in human retinal pigment epithelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 44 Suppl 1:S471-473.
- Ueki Y, Le YZ, Chollangi S, Muller W, Ash JD (2009) Preconditioning-induced protection of photoreceptors requires activation of the signal-transducing receptor gp130 in photoreceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:21389-21394.
- Ueki Y, Wang J, Chollangi S, Ash JD (2008) STAT3 activation in photoreceptors by leukemia inhibitory factor is associated with protection from light damage. *J Neurochem* 105:784-796.
- Ulbrich C, Westphal K, Baatout S, Wehland M, Bauer J, Flick B, Infanger M, Kreutz R, Vadrucci S, Egli M, Cogoli A, Derradji H, Pietsch J, Paul M, Grimm D (2008) Effects of basic fibroblast growth factor on endothelial cells under conditions of simulated microgravity. *J Cell Biochem* 104:1324-1341.
- Unoki K, LaVail MM (1994) Protection of the rat retina from ischemic injury by brain-derived neurotrophic factor, ciliary neurotrophic factor, and basic fibroblast growth factor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 35:907-915.
- Valter K, Bisti S, Gargini C, Di Loreto S, Maccarone R, Cervetto L, Stone J (2005) Time course of neurotrophic factor upregulation and retinal protection against light-induced damage after optic nerve section. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:1748-1754.
- van Attikum H, Gasser SM (2009) Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response. *Trends Cell Biol* 19:207-217.
- Vardimon L, Fox LE, Moscona AA (1986) Developmental regulation of glutamine synthetase and carbonic anhydrase II in neural retina. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83:9060-9064.
- Vaughan DK, Nemke JL, Fliesler SJ, Darrow RM, Organisciak DT (2002) Evidence for a circadian rhythm of susceptibility to retinal light damage. *Photochem Photobiol* 75:547-553.
- Vazquez-Chona FR, Swan A, Ferrell WD, Jiang L, Baehr W, Chien WM, Fero M, Marc RE, Levine EM (2011) Proliferative reactive gliosis is compatible with glial metabolic support and neuronal function. *BMC Neurosci* 12:98.

- Viegas LR, Hoijman E, Beato M, Pecci A (2008) Mechanisms involved in tissue-specific apoptosis regulated by glucocorticoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 109:273-278.
- Viegas LR, Vicent GP, Baranao JL, Beato M, Pecci A (2004) Steroid hormones induce bcl-X gene expression through direct activation of distal promoter P4. *J Biol Chem* 279:9831-9839.
- Wahlin KJ, Campochiaro PA, Zack DJ, Adler R (2000) 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* 41:927-936.
- Wang JC, Derynck MK, Nonaka DF, Khodabakhsh DB, Haqq C, Yamamoto KR (2004) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) scanning identifies primary glucocorticoid receptor target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15603-15608.
- Wang W, Bu B, Xie M, Zhang M, Yu Z, Tao D (2009) Neural cell cycle dysregulation and central nervous system diseases. *Prog Neurobiol* 89:1-17.
- Wang Z, Chen W, Kono E, Dang T, Garabedian MJ (2007) Modulation of glucocorticoid receptor phosphorylation and transcriptional activity by a C-terminal-associated protein phosphatase. *Mol Endocrinol* 21:625-634.
- Wang Z, Frederick J, Garabedian MJ (2002) Deciphering the phosphorylation "code" of the glucocorticoid receptor in vivo. *J Biol Chem* 277:26573-26580.
- Weigel NL, Moore NL (2007) Steroid receptor phosphorylation: a key modulator of multiple receptor functions. *Mol Endocrinol* 21:2311-2319.
- Weinberger C, Hollenberg SM, Rosenfeld MG, Evans RM (1985) Domain structure of human glucocorticoid receptor and its relationship to the v-erb-A oncogene product. *Nature* 318:670-672.
- Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, Steinberg RH (1995) Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *J Neurosci* 15:7377-7385.
- Wenzel A, Grimm C, Samardzija M, Reme CE (2005) Molecular mechanisms of light-induced photoreceptor apoptosis and neuroprotection for retinal degeneration. *Prog Retin Eye Res* 24:275-306.
- Wenzel A, Grimm C, Seeliger MW, Jaissle G, Hafezi F, Kretschmer R, Zrenner E, Reme CE (2001a) Prevention of photoreceptor apoptosis by activation of the glucocorticoid receptor. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42:1653-1659.
- Wenzel A, Reme CE, Williams TP, Hafezi F, Grimm C (2001b) The Rpe65 Leu450Met variation increases retinal resistance against light-induced degeneration by slowing rhodopsin regeneration. *J Neurosci* 21:53-58.
- Williams TP, Henrich S, Reiser M (1998) Effect of eye closures and openings on photostasis in albino rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 39:603-609.
- Winkler BS (1981) Glycolytic and oxidative metabolism in relation to retinal function. *J Gen Physiol* 77:667-692.
- Wu J, Seregard S, Algvere PV (2006) Photochemical damage of the retina. *Surv Ophthalmol* 51:461-481.
- Wu T, Chen Y, Chiang SK, Tso MO (2002) NF-kappaB activation in light-induced retinal degeneration in a mouse model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 43:2834-2840.
- Xiao L, Feng C, Chen Y (2010) Glucocorticoid rapidly enhances NMDA-evoked neurotoxicity by attenuating the NR2A-containing NMDA receptor-mediated ERK1/2 activation. *Mol Endocrinol* 24:497-510.

- Xu B, Strom J, Chen QM (2011) Dexamethasone induces transcriptional activation of Bcl-xL gene and inhibits cardiac injury by myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol* 668:194-200.
- Yamauchi M, Tsuruma K, Imai S, Nakanishi T, Umigai N, Shimazawa M, Hara H (2011) Crocetin prevents retinal degeneration induced by oxidative and endoplasmic reticulum stresses via inhibition of caspase activity. *Eur J Pharmacol* 650:110-119.
- Yi P, Wu RC, Sandquist J, Wong J, Tsai SY, Tsai MJ, Means AR, O'Malley BW (2005) Peptidyl-prolyl isomerase 1 (Pin1) serves as a coactivator of steroid receptor by regulating the activity of phosphorylated steroid receptor coactivator 3 (SRC-3/AIB1). *Mol Cell Biol* 25:9687-9699.
- Young RW (1988) Solar radiation and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 32:252-269.
- Young RW, Droz B (1968) The renewal of protein in retinal rods and cones. *J Cell Biol* 39:169-184.
- Yudt MR, Cidlowski JA (2002) The glucocorticoid receptor: coding a diversity of proteins and responses through a single gene. *Mol Endocrinol* 16:1719-1726.
- Zanchi NE, Filho MA, Felitti V, Nicastro H, Lorenzetti FM, Lancha AH, Jr. (2010) Glucocorticoids: extensive physiological actions modulated through multiple mechanisms of gene regulation. *J Cell Physiol* 224:311-315.
- Zeng HY, Tso MO, Lai S, Lai H (2008) Activation of nuclear factor-kappaB during retinal degeneration in rd mice. *Mol Vis* 14:1075-1080.
- Zhang X, Clark AF, Yorio T (2003a) Interactions of endothelin-1 with dexamethasone in primary cultured human trabecular meshwork cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44:5301-5308.
- Zhang X, Krishnamoorthy RR, Prasanna G, Narayan S, Clark A, Yorio T (2003b) Dexamethasone regulates endothelin-1 and endothelin receptors in human non-pigmented ciliary epithelial (HNPE) cells. *Exp Eye Res* 76:261-272.
- Zheng JP, Zhang Y, Edvinsson L, Hjalt T, Xu CB (2010) NF-kappaB signaling mediates vascular smooth muscle endothelin type B receptor expression in resistance arteries. *Eur J Pharmacol* 637:148-154.
- Zheng L, Anderson RE, Agbaga MP, Rucker EB, 3rd, Le YZ (2006) Loss of BCL-XL in rod photoreceptors: Increased susceptibility to bright light stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 47:5583-5589.
- Zhu Y, Valter K, Stone J (2010) Environmental damage to the retina and preconditioning: contrasting effects of light and hyperoxic stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51:4821-4830.