Tesis de Doctorado en Biología

Opción Biología Celular y Molecular

PEDECIBA - Universidad de la República

Rol de la onda fugaz de calcio en la cicatrización de células de endotelio de córnea de bovino

Lic. Cristian Justet

Orientador: Dra. Silvia Chifflet

Co-orientador: Dr. Julio A. Hernandez

Tribunal:

Dr. Gustavo Brum

Dra. Maria Ana Duhagón

Dr. Juan C. Benech

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina

Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

Mayo de 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis orientadores, Silvia y Julio, por su disposición y paciencia para guiarme, así como la oportunidad para tomar mis propias decisiones, y en especial por todo el conocimiento y sabiduría que me brindaron a lo largo de estos años.

A Alicia Torriglia, por abrirme las puertas de su laboratorio, permitirme trabajar con ella y brindarme todo su apoyo.

A los miembros del tribunal por aceptar corregir esta tesis en forma tan amable.

A mis compañeros de trabajo.

A los frigoríficos Lorsinal y Las Piedras que amablemente nos proveyeron de los ojos de bovino necesarios para el desarrollo de este trabajo.

A las instituciones PEDECIBA, CSIC y ANII, que proporcionaron el financiamiento indispensable para la ejecución de esta tesis.

A mi familia, en particular a Lore, mi amor y compañera de vida y a Clarita, que me da felicidad sin importar nada.

ÍNDICE

Tabla de abreviaturas 1

Resumen 3

1. Introducción 6

1.1. Rol de la matriz extracelular en la cicatrización de células de endotelio de córnea de bovino en cultivo 7

1.2. La onda fugaz de calcio 9

1.2.1. Fuentes de calcio para la FCW 12

1.2.2. Rol de la difusión de factores señalizadores extracelulares. Liberación de ATP. 16

1.2.3. rol de las uniones comunicantes y de los hemicanales en la FCW 18

1.2.4. Modelos de estímulo mecánico de célula puntual 20

1.2.5. Oscilaciones de la [Ca2+]c durante la onda fugaz 22

1.2.6. Rol de la FCW sobre la cicatrización 26

1.3. La onda de sodio y la onda lenta de calcio 28

1.4 Muerte celular regulada 33

1.4.1. Antecedentes históricos 34

1.4.2. Conceptos y definiciones generales 35

1.4.3. Apoptosis 40

Apoptosis intrínseca 42

Apoptosis extrínseca 43

1.4.4. Apoptosis caspasa dependiente e independiente 45

Caspasas 45

Otras proteasas que intervienen en la muerte celular 48

1.4.5. Rol del Inhibidor de la Elastasa Leucocitaria sobre la apoptosis 51

1.4.6. Muerte celular regulada durante la cicatrización 54

2. Objetivos 58

2.1 Objetivos generales 58

2.2. Objetivos específicos 58

3. Materiales y métodos 59

3.1. Reactivos y soluciones 59

3.2. Cultivos celulares 60

3.3. Procedimientos experimentales 61

3.4. Determinación del potencial de membrana plasmática, sodio y calcio citosólico 64

3.5. Dinámica de calcio 65

3.6. Apoptosis y proliferación 66
3.7. Inmunofluorescencia y Western blot 68
3.8. ELISA 70
3.9. Análisis estadístico 70
4. Resultados 71
4.1. Rol de la FCW sobre la onda de sodio, la onda lenta de calcio y la velocidad de cicatrización 72
4.2. Muerte celular regulada durante la cicatrización de células de BCE en cultivo. Rol de la FCW sobre la apoptosis y la proliferación 74
4.3. Cambio de expresión de la LEI durante la cicatrización de endotelio de córnea 76
4.4. Caracterización de las oscilaciones de calcio durante la FCW y su rol en la apoptosis 78
4.5. Migración, proliferación y apoptosis en un modelo de cicatrización sin daño celular 81
4.6. Inhibición de la apoptosis en monocapas indemnes mediante incubación con ATP 90
5. Discusión y conclusiones 97
5.1. Rol de la FCW sobre la migración 97
5.2. Rol de la FCW sobre la proliferación 99
5.3. Muerte celular regulada durante la cicatrización y rol de la FCW 101
5.4. Cambios de expresión de la LEI durante la cicatrización 102
5.5. Respuesta oscilatoria durante la FCW y su rol sobre la apoptosis durante la cicatrización 104
6. Perspectivas 110
7. Bibliografía 113
8. ANEXO 126
Artículo I 126
Artículo II 137
Artículo III 152
Artículo IV 170

TABLA DE ABREVIATURAS

$[Ca^{2+}]_e$	Concentración de calcio extracelular
$[Ca^{2+}]_{re}$	Concentración de calcio en el retículo endoplásmico
α,β-MeATP	α,β-Metilenadenosina 5′-trifosfato de litio
αGA	α-glycyrrhetinic acid
AB	Apoptotic Bodies
ACD	Accidental Cell Death
AI	Apoptotic Index
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Akt/PKB	Protein Kinase B
Amp	Amplitud
APAF1	Apoptosis Protease Activating Factor 1
ARL	ARL-67156
ATII	Alveolar Type II epithelium
BAK	Bcl-2 homologous antagonist/killer
BAX	Bcl-2-associated X protein
BCA	Bicinchoninic Acid
BCE	Bovine Corneal Endothelial
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCL2L2	Bcl-2-like protein 2
BCL-XL	(BCL2L1) Bcl-2-like protein 1
BHK	Baby hamster kidney cells
BID	BH3 interacting-domain death agonist
BIM	Bcl2-interacting mediator of cell death
BMF	Bcl-2-modifying factor
BOK	Bcl-2 related ovarian killer
BrdU	Bromo-2'-deoxiuridina
CAD	Caspase Activated DNAse
CaMK	Ca2+/calmodulin-dependent protein kinase
CARD	Caspase activation and recruitment domain
CitC	Citocromo C
CPA	Cyclopiazonic Acid
CPAE	Calf pulmonary artery endothelial cells
CTL	Cytotoxic T Lymphocytes
Cy3	Cyanine 3
DAG	Diacilglicerol
DAMP	Damage-Associated Molecular Patterns
DD	Death Domain
DISC	Death-Inducing Signaling Complex
DUOX	NADPH oxidasa dual
EC_{50}	Concentración efectiva media máxima
ECM	Extracellular Matrix
ENaC	Epithelial Sodium Channel
ER	Endoplasmic Reticulum
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
EtOH	Etanol
ETOP	Etoposido
FAS	First Apoptosis Signal
FASL	First Apoptosis Signal Ligand
FASR	First Apoptosis Signal Receptor
FCW	Fast Calcium Wave
FFA	Flufenamic Acid
FITC	Fluorescein IsoTioCyanate
FSA	First Stage of Apoptosis
GAAD	Granzyme A-Activated DNase
HCE	Human Corneal Epithelial
Hep-G2	Hepatoblastoma humano
HMA	5-(N,N-hexametilene)amiloride
HRK	Activator of apoptosis harakiri
HSP27	Heat Shock Protein 27
HWCD	Healing Without Cell Damage
IAP	Inhibitor of Apoptosis Protein
ICAD	Inhibitor of CAD
IGF	Insulin-like growth factor
IκB	Inhibitor of κB
IL2	Interleukin 2
IP	Ioduro de Propidio
IP3	Inositol trisphosphate
IP3R	Inositol trisphosphate receptor
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LEI	Leucocyte Elastase Inhibitor

LMP	Lysosome Membrane Permeabilization
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MCF7	Michigan Cancer Foundation-7. Línea de cáncer de mama
MCL1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization
mtROS	ROS generados en la mitocondria
NAC	N-acetylcysteine
NBD	Nucleotide Binding Domain
NCCD	Nomenclature Committe on Cell Death
NCX	Na^{+}/C^{2+} exchanger
NES	Nuclear Export Signal
NFAT	Nuclear factor of activated T-cells
NF-κB	Nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells
NHU	Urotelio normal humano
NLS	Nuclear Localization Signal
NP	Number of Peaks
NW	New Wound
Omi/HtrA2	High-Temperature Requirement serine protease
ONa	Onda de sodio
OPDA	o-fenilendiamina
OW	Old Wound
P2X	Receptores Purinérgicos ionotrópicos
P2Y	Receptores Purinérgicos metabotrópidos
PARP1	Poly (ADP-ribose) Polymerase-1
PCD	Muerte celular programada
PDGF	Platelet-derived growth factor
PFA	Paraformaldehído
PGE2	Prostaglandina E2
PhK	Glycogen Phosphorylase Kinase
PI3K	Phosphoinositide 3-kinase
PIP2	Phosphatidylinositol bisphosphate
PKC	Protein Kinase C
PLA	Phospholipase A
PLC	Phospholipase C
PMCC	Canal de calcio de la membrana plasmática
PMP	Potencial de Membrana Plasmática
PPADS	Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato tetrasódico
PUMA	p53 upregulated modulator of apoptosis
RAI	Relative Apoptotic Index
RCD	Muerte celular regulada
RCEP	Rabbit Corneal Epithelial
ROS	Reactive Oxygen Species
RyR	Ryanodine Receptor
SCW	Slow Calcium Wave
SERCA	Bomba de calcio del retículo endoplásimico y sarcoplasma
SMAC/DIABLO	Second mitochondria-derived activator of caspase/ IAP binding mitochondrial protein
SOCE	Store-Operated Calcium Entry
SSA	Second Stage of Apoptosis
tBID	Truncated BID
TdT	Terminal deoxynucleotidyl transferase
TFP	Time of the first peak
Tg	Tapsigarguina
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR	TNF Receptor
TRAIL	TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand
TRAILR	TRAIL Receptor
TRPC	Transient Receptor Potential Cation channel
TUNEL	Transferase-mediating dUTP Nick-End Labeling
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protein

RESUMEN

La cicatrización de un epitelio requiere de gran variedad de señales que modulan la migración, proliferación, muerte celular regulada y remodelación del tejido, entre otros procesos. Muchos autores han encontrado que en forma instantánea luego de realizada una herida, se produce una onda de incremente de la concentración de calcio citosólico (FCW, "Fast Calcium Wave"), tanto en lesiones en cultivo como in situ. Esta onda se propaga desde el borde de la herida hacia el centro de la monocapa, tiene una duración de pocos minutos y se ha reportado que en algunos casos tiene un comportamiento oscilatorio. En forma frecuente se le ha atribuido funciones de señalización relevantes para el desencadenamiento de la migración y la proliferación.

En esta tesis se caracterizó la FCW y se estudió su rol sobre, la migración, proliferación, muerte celular regulada y otras ondas de incremento de cationes con función de señalización, que ocurren durante la cicatrización en células de endotelio de córnea de bovino (BCE) en cultivo. Nuestros hallazgos muestran que la inhibición reversible de la FCW provoca una disminución escasa de la tasa de migración y no afecta en forma apreciable algunas señales involucradas en dicho proceso celular durante la cicatrización,. como la onda de sodio y la onda lenta de calcio (Chifflet et al., 2012). Asimismo, la falta de onda fugaz provoca una disminución del índice de proliferación de aproximadamente 30% (Justet et al., 2016).

Con el objetivo de comprender mejor el rol de la FCW estudiamos la muerte celular regulada durante la cicatrización de células de BCE en cultivo. Encontramos que se producen dos etapas de apoptosis caspasa-dependiente durante la cicatrización, una temprana (primeras 6 a 8 horas) independiente de la distancia migrada, y una tardía (a partir de las 8 horas) directamente proporcional a la distancia migrada (Justet et al., 2016). Como se demuestra en dicha publicación, la tasa de apoptosis se duplica cuando la FCW es inhibida, pero regresa al nivel observado en el control cuando se incuba con ATP (que provoca un incremento de calcio similar al de la onda). Por otra parte, resultados obtenidos en un modelo de cicatrización sin daño celular (y por lo tanto sin FCW) sugieren que la pérdida de restricciones espaciales es suficiente para inducir la migración, pero en estas condiciones la monocapa celular tiene una tasa de apoptosis del

doble a la observada en la lesión control. En su conjunto, estos resultados sugieren que la FCW tiene un rol de gran importancia en el control de la apoptosis excesiva durante la cicatrización de células de BCE en cultivo.

En virtud de que, durante la onda fugaz algunas células exhiben dinámicas de calcio oscilantes, estudiamos este comportamiento y su rol sobre la muerte celular regulada durante la cicatrización. En este sentido, obtuvimos resultados que muestran que la frecuencia oscilatoria aumenta desde el borde de la herida hasta alcanzar un máximo en la décima fila de células de la monocapa aproximadamente (Justet et al., 2019). Experimentos utilizando inhibidores de receptores purinérgicos o de ecto-nucleotidasas, sugieren que las oscilaciones dependen de la activación de dichos receptores, tanto metabotrópicos como ionotrópicos. Asimismo, mediante la utilización de inhibidores de la bomba de calcio del retículo endoplásmico y sarcoplasma, antagonistas de la fosfolipasa C y la incubación con quelantes específicos, hemos demostrado que el calcio necesario para las oscilaciones, proviene del medio extracelular y del retículo endoplásmico. Por medio de la estrategia de agotar las reservas de calcio extracelular o inhibir las ecto-nucleotidasas, logramos disminuir o aumentar la frecuencia oscilatoria respectivamente, sin afectar la amplitud de la señal. Esto nos permitió obtener resultados que sugieren que el efecto inhibitorio de la apoptosis temprana provocado por la FCW, depende de la respuesta oscilatoria. Sin embargo, las alteraciones de la frecuencia no afectaron la apoptosis tardía. De este modo, en este artículo se presentaron resultados novedosos, que sugieren que la modulación de las dos etapas de muerte celular regulada por la FCW ocurre por mecanismos al menos parcialmente diferentes.

Finalmente, hemos encontrado que durante la cicatrización de células de endotelio de córnea (tanto en cultivo como in situ), se produce un incremento de la expresión del inhibidor de elastasa leucocitaria (LEI, Leukocyte Elastase Inhibitor) (Justet et al., 2015). Esta es una proteína multifuncional que se ha demostrado que puede cambiar su conformación para adquirir función DNAsa II (forma conocida como L-DNAsa II por ser derivada de la LEI) y mediar una apoptosis casapasa independiente. Sin embargo, los resultados expuestos en el mencionado artículo no son consistentes con una función apoptótica y la inhibición reversible de la FCW no provoca cambios en el nivel de expresión o localización de esta proteína.

En conjunto, nuestros resultados muestran un rol novedoso de la FCW durante la cicatrización de células de BCE en cultivo. , de protección contra la apoptosis excesiva a corto y largo plazo, por mecanismos de modulación de ambas etapas al menos parcialmente independientes. Cabe señalar que esta nueva función de la onda fugaz tiene un efecto muy prolongado en comparación con la brevedad de la señal. Considerando este aspecto y en virtud de que es posible mimetizar la señal de la FCW por incubación con ATP, resulta concebible utilizar esta estrategia para alterar la muerte celular programada durante la cicatrización con el fin de regular este proceso celular en condiciones patológicas.

1. INTRODUCCIÓN

Todo organismo multicelular es capaz de responder a la eventualidad de una herida, desarrollando un conjunto de procesos con la función de reparar y restaurar los tejidos a las condiciones fisiológicas. Cuando ocurre una lesión se desencadena una respuesta fisiológica de cicatrización en la que las células supervivientes responden a los estímulos iniciales (necrosis celular, exposición de matriz extracelular, pérdida de contactos intercelulares, estímulos mecánicos por retracción de tejido) produciendo una variedad de señales, como ondas de incremento de calcio y especies reactivas de oxígeno, activación de quinasas y liberación de citoquinas o factores de crecimiento, que controlan diversos procesos celulares. En dichos procesos suelen intervenir diversos tipos celulares de forma coordinada para restaurar de manera rápida y precisa las condiciones estructurales y fisiológicas de los tejidos que fueron dañados.

En una respuesta cicatricial in situ se reconocen cuatro fases de la cicatrización, las que se solapan unas con otras: 1) hemostasis, 2) inflamación, 3), proliferación y migración de células hacia la zona de la herida, y 4) remodelación (Figura 1.1) (Guo and Dipietro, 2010) (Mellott et al., 2016). En cada una de estas fases participan diferentes tipos celulares como fibroblastos, células epiteliales, células del sistema inmune entre otros. Dichas células producen y responden a señales bioquímicas diversas como citoquinas, factores de crecimiento, prostaglandinas, o radicales libres (Borena et al., 2015) (Childs and Murthy, 2017).

A pesar de que en el organismo la cicatrización involucra gran diversidad celular y variedad de moléculas de señalización, varios tipos de células en cultivo (en especial las epiteliales) son capaces por sí solas de responder a una herida y cerrar la brecha generada por el daño, transitando por algunas de las etapas de la cicatrización, como la proliferación, migración y remodelación, sin la necesidad de encontrarse en el entorno natural del organismo. De este modo, el estudio de la cicatrización de heridas en cultivos celulares proporciona un modelo más simplificado que facilita el estudio de las señales bioquímicas que gobiernan la cicatrización.

En virtud de lo expuesto anteriormente, en esta tesis se aborda el estudio de algunos aspectos de la regulación de la cicatrización, como el rol de las señales de calcio sobre la migración, proliferación y muerte celular programada, en células de endotelio de córnea de bovino en cultivo.

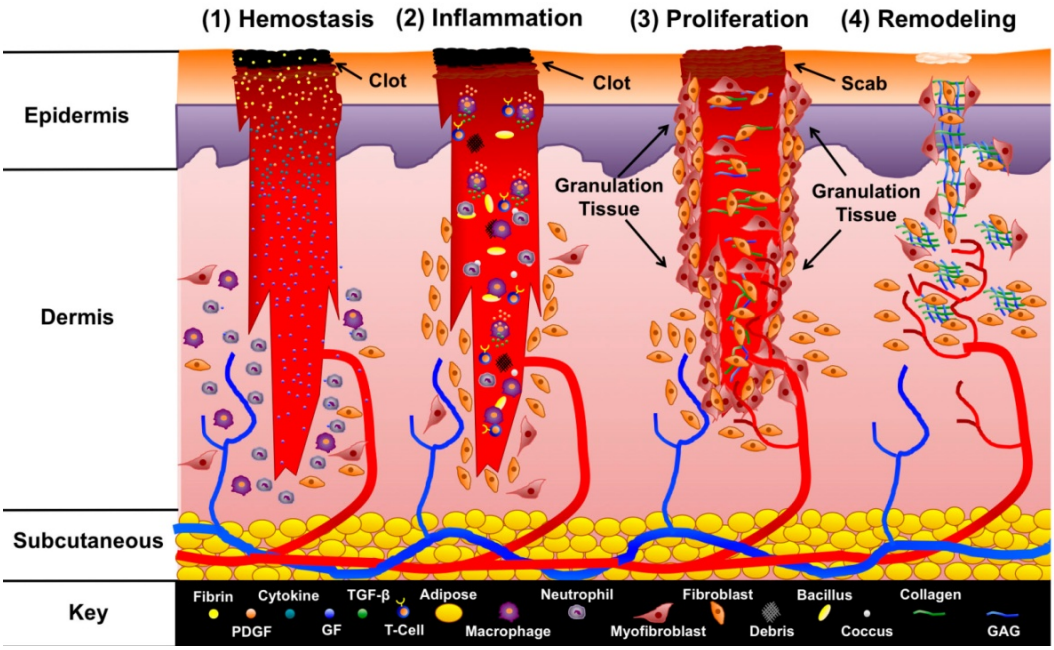


Figura 1.1. Representación de las cuatro fases principales de la cicatrización en piel: 1) hemostasis, 2) inflamación, 3) proliferación y migración, y 4) remodelación. Figura extraída de (Mellott et al., 2016). Se esquematizan diferentes tipos celulares y moléculas de señalización tales como factores de crecimiento y citoquinas, que participan de dichas fases.

1.1. Rol de la matriz extracelular en la cicatrización de células de endotelio de córnea de bovino en cultivo

La matriz extracelular (ECM, "Extracellular Matrix") tiene un papel muy importante en la cicatrización, desde el comienzo hasta el final del proceso. Se reconocen dos grandes clases de ECM, la matriz intersticial y la membrana basal ("basement membrane") que son sintetizadas principalmente por fibroblastos y células epiteliales respectivamente. La matriz de la membrana basal tiene varias funciones, da soporte a los epitelios, tiene influencia sobre la migración y proliferación, promueve la angiogénesis y la diferenciación en células endoteliales y actúa como barrera contra la invasión por células malignas (Saikia et al., 2018). Al inicio de la cicatrización, como consecuencia

de la remoción o muerte de tejido, se exponen ambos tipos de ECM. El colágeno de esta matriz tiene la capacidad de activar las plaquetas promoviendo la formación del coágulo de fibrina, generando un entramado que será luego necesario para la migración de células del sistema inmune y fibroblastos (Midwood et al., 2004). A medida que transcurren las diferentes etapas de la cicatrización, la ECM en forma sucesiva sirve como soporte para la migración de fibroblastos y células del sistema inmune, es degradada y re-sintetizada cambiando su composición para reclutar diferentes células tales como las epiteliales (Rousselle et al., 2018). Asimismo, en la ECM diversas glucoproteínas y proteoglicanos cuentan con sitios de unión a los factores de crecimiento que intervienen en la quimiotaxis durante la cicatrización, concentrando estas moléculas en el sitio de la herida y permitiendo su liberación ante la acción de proteasas específicas (Briquez et al., 2015).

Como se mencionara, parte de las funciones de la ECM durante la cicatrización es dar soporte para la migración celular. En términos generales, se reconoce que los epitelios cicatrizan por tres modalidades según la distribución del citoesqueleto de actina observada: 1) cicatrización con formación de cordón de actina contráctil, 2) modalidad de migración lamelipódica y 3) modalidad mixta. En la primera modalidad, se forma un cordón de actomiosina en las células del borde de la herida que se encuentra asociado a través de uniones adherentes generando una estructura similar a un cable contráctil interconectado entre las células (Danjo and Gipson, 1998) (Jacinto et al., 2001) (Strudwick and Cowin, 2012). La segunda modalidad implica la emisión de lamelipodios y la formación de estructuras migratorias similares a las observadas en células que migran en forma aislada (Jacinto et al., 2001) (Abreu-Blanco et al., 2012) (Chen et al., 2014). En la modalidad mixta coexisten ambas estructuras en diferentes células del borde de la herida o incluso presentes en la misma célula (Waters et al., 2002).

En nuestro laboratorio se ha estudiado el rol de la ECM, la geometría y el tamaño de la herida sobre la modalidad de respuesta cicatricial en células de endotelio de córnea de bovino (BCE, "Bovine Corneal Endothelium") en cultivo. Dichos estudios revelaron que en este modelo, ni las diferencias en la geometría ni el tamaño de la herida afectan la modalidad de cicatrización, sino que esta es definida por la ECM (Grasso et al., 2007). La metodología desarrollada por Grasso y colaboradores permite hacer heridas

removiendo la gruesa membrana basal sintetizada por las células de BCE en cultivo o dejándola intacta. Sin embargo, durante las dos primeras horas, las células migran en presencia de ECM en forma independiente de la metodología usada, debido a que las células que mueren en el borde de la herida dejan expuesta una pequeña porción de matriz. De este modo, a partir de dos horas de realizada la herida, se observa que en ausencia de ECM se produce cicatrización por cordón de actina, mientras que en presencia de la membrana basal ocurre migración lamelipódica. Por otra parte, en las primeras dos horas de realizada la lesión la cicatrización acontece por modalidad mixta (ibídem).

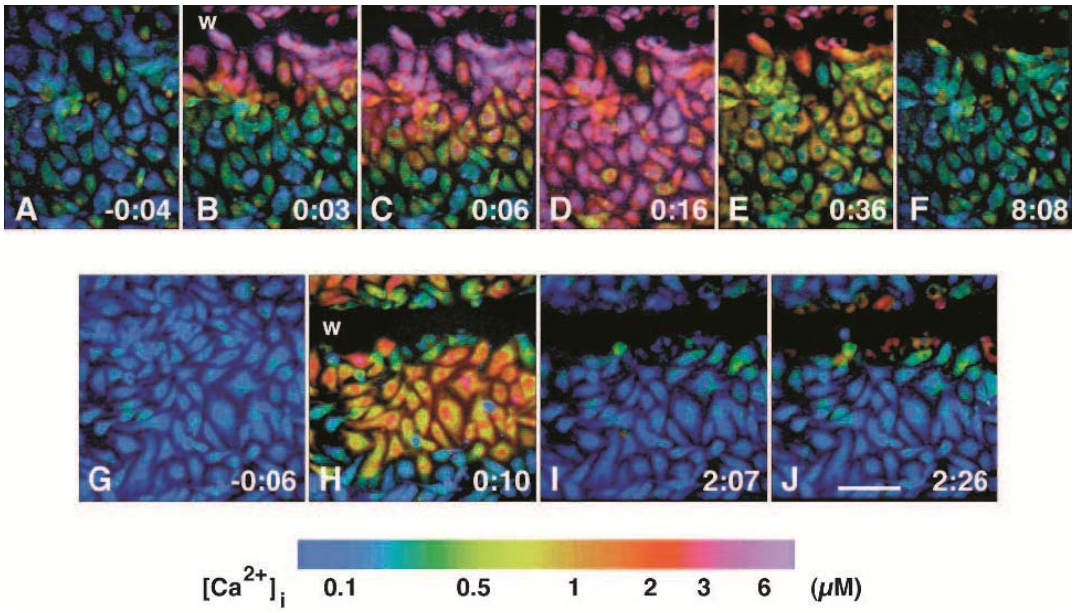


Figura 1.2. FCW en células de endotelio de arteria pulmonar de bovino (CPAE, "Calf Pulmonary Artery Endothelial") en heridas control (A-F) y en heridas realizadas en ausencia de calcio extracelular y presencia de EGTA (G-J). Imágenes en pseudo-color obtenidas de células incubadas con la sonda específica para calcio Fura-2, a los tiempos luego de realizada la herida indicados en segundos en cada imagen. Extraído de (Sammak et al., 1997).

1.2. La onda fugaz de calcio

Cuando ocurre una herida se inicia de forma instantánea una onda de incremento de la concentración de calcio citosólico ($[Ca^{2+}]_c$) que se propaga desde el borde de la herida al resto de las células (Figura 1.2). En nuestro laboratorio la denominamos onda fugaz de calcio (FCW, "Fast Calcium Wave") para diferenciarla de una segunda onda de

calcio de aparición posterior que se describirá más adelante (Chifflet et al., 2012) (Justet et al., 2013). La FCW se ha encontrado en todos los modelos en que se ha estudiado, tanto en cultivo como in situ (Sung et al., 2003) (Berra-Romani et al., 2008) (Clark et al., 2009) (Soto et al., 2013) (Kobayashi et al., 2014) (Handly and Wollman, 2017). En diferentes trabajos se le ha atribuido un rol fundamental en el desencadenamiento de la migración y la proliferación (Tran et al., 1998) (Tran et al., 1999) (Leiper et al., 2006).

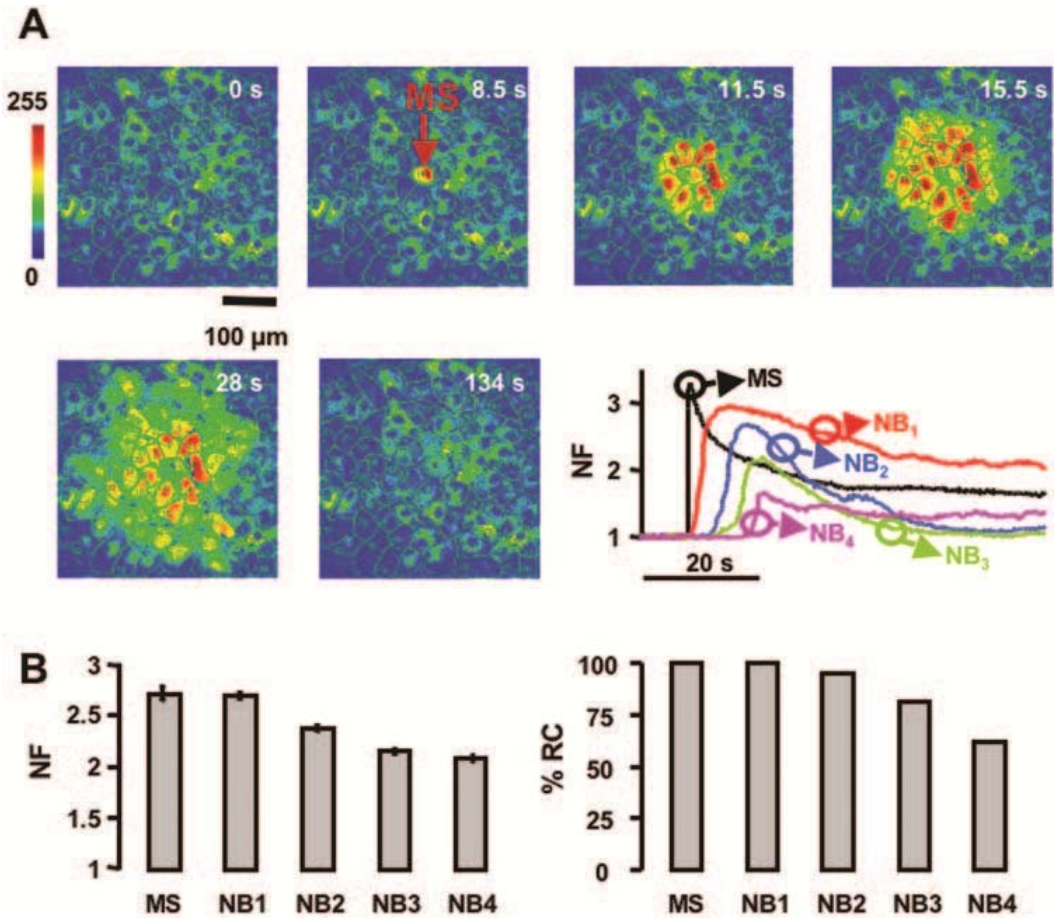


Figura 1.3. Propagación de la onda intercelular de incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ en células de BCE en cultivo, inducida por estímulo mecánico. A) Curso temporal de la onda, puesta en evidencia con Fluo-4 AM, imágenes en pseudo-color. Se presenta además un gráfico de la fluorescencia normalizada (NF) en función del tiempo, en la célula estimulada y en células vecinas (NB) designadas en forma concéntrica y sucesiva a partir de la célula estimulada mecánicamente (NB1 a NB4). B) Promedio por conjunto de células vecinas de fluorescencia máxima (izquierda) y porcentaje de células que responden (%RC) (derecha). Extraído de (Gomes et al., 2005b)

Asimismo, se han realizado diversos estudios respecto al incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ provocado por un estímulo mecánico (Figura 1.3) (Boitano et al., 1994) (D'Hondt et al.,

2007a) (D'Hondt et al., 2009) (Takada et al., 2014). Es importante señalar que, sin importar el tipo de herida, en cualquier lesión ocurre estímulo mecánico por la contracción de las células sobrevivientes al liberarse la tensión generada por las uniones intercelulares (Murrell et al., 2011). De este modo, es esperable que las respuestas observadas como consecuencia de un estímulo mecánico puntual, ocurran también en una herida en simultáneo al resto de los estímulos generados en el proceso de injuria, como la activación de receptores a factores solubles liberados por las células que mueren por necrosis, la pérdida de contacto intercelular, entre otros.

Las características de la FCW varían según el tipo celular, sin embargo, en todos los casos estudiados se presenta un pico de incremento máximo de la concentración de calcio seguido de una fase de decaimiento (Klepeis et al., 2001) (Berra-Romani et al., 2008) (Handly and Wollman, 2017). Asimismo, en todos los modelos la amplitud del pico inicial disminuye con la distancia respecto al borde de la herida, mientras que el tiempo de aparición se ve aumentado (Figura 1.4) (ibídem).

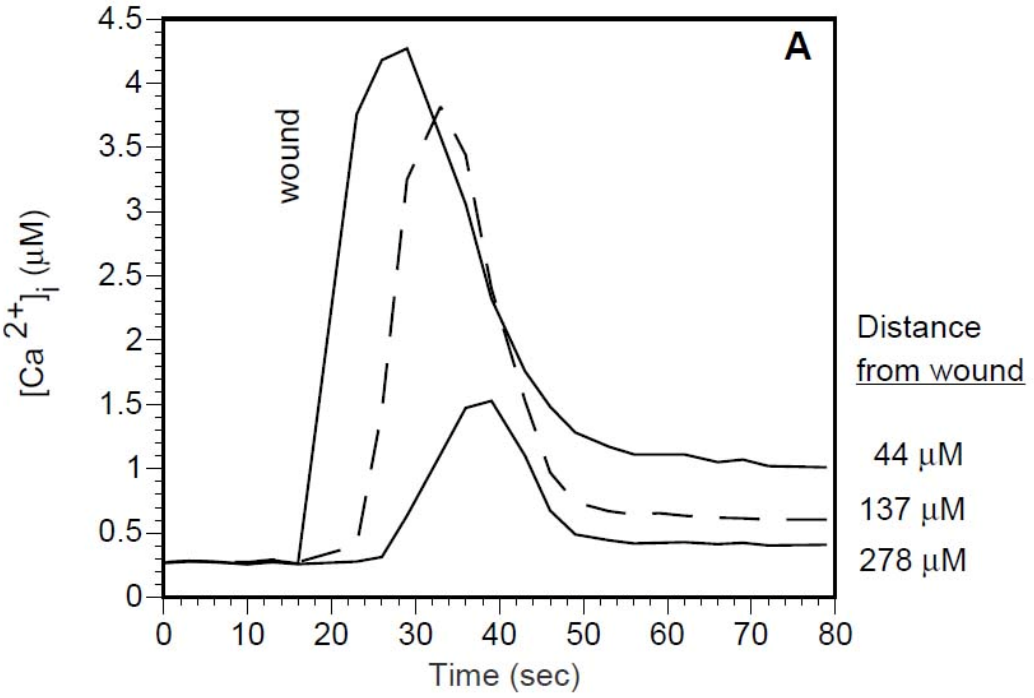


Figura 1.4. FCW en células de CPAE en cultivo. Variación de la $[Ca^{2+}]_c$ en función del tiempo a diferentes distancias de la herida. Resultados obtenidos usando la sonda Fura-2. Extraído de (Sammak et al., 1997).

En células de endotelio de arteria pulmonar de bovino (CPAE, "Calf Pulmonary Artery Endothelial") en cultivo la FCW puede provocar un incremento de la concentración de calcio de hasta 80 veces, desde un valor basal de 50 nM hasta un valor máximo cercano a 4 μM y se desplaza más de 300 μm (hasta 12 filas de células) a una velocidad de aproximadamente 30 μm/s (Sammak et al., 1997) (Tran et al., 1998).

En células de epitelio alveolar tipo II (ATII) en cultivo la FCW presenta incremento máximo superior a las 10 veces, desde un valor basal de 0.23 μM a más de 2.5 μM, se desplaza 250 μm, alcanza su máximo a los 15 segundos y se extingue casi por completo a los 2 minutos (Hinman et al., 1997).

En la línea de células de urotelio humano normal (NHU) en cultivo el incremento de $[Ca^{2+}]_c$ máximo durante la FCW es de aproximadamente 25 veces (determinado por proporción Fluo-4 AM/Fura red). Este incremento de calcio se extingue en casi la totalidad de las células más alejadas de la herida a los 90s pero puede mantenerse más allá de 40 minutos en las primeras filas de células (Shabir and Southgate, 2008).

Por otra parte, en el endotelio de aorta de rata in situ, Berra-Romani y colaboradores encontraron que en la FCW el incremento de calcio máximo es de 2.5 veces el valor basal, se desplaza no más allá de 100 μm respecto a la herida y la fase de decaimiento se puede prolongar por más de 40 minutos (Berra-Romani et al., 2008) (Berra-Romani et al., 2012).

1.2.1. Fuentes de calcio para la FCW

En condiciones basales el calcio citosólico es mantenido en concentraciones muy bajas, en el orden de 100 nM (Schwaller, 2012). El incremento de calcio citosólico, incluso a nivel localizado sirve como señal secundaria que gobierna diferentes respuestas en la célula. Las posibles fuentes de calcio para el incremento observado en el FCW son el proveniente del medio extracelular ($[Ca^{2+}]_e$), el calcio almacenando en el retículo endoplásmico ($[Ca^{2+}]_{re}$) o el calcio mitocondrial (Berra-Romani et al., 2012) (Takada et al., 2014). Hasta donde conocemos, no se ha investigado el rol del calcio mitocondrial sobre la FCW.

El rol del calcio extracelular sobre la FCW ha sido abordado en diferentes publicaciones. La estrategia principal de estudio ha consistido en evaluar los cambios de concentración del catión de forma cuantitativa o semi-cuantitativa, variando las condiciones de cultivo de modo de alterar las diferentes fuentes de calcio, como se describe a continuación. En varios trabajos se han analizado las variaciones de calcio en células incubadas en ausencia de calcio extracelular y presencia de un quelante de calcio como el EGTA y el BAPTA, o la incubación con el doble de concentración de calcio respecto a la solución control (Tran et al., 1999). Asimismo, otra estrategia utilizada en estos trabajos, es la incubación de las células con La^{3+} o Gd^{3+}; en virtud de que poseen alta densidad de carga y radios similares al calcio, ambos iones compiten con este catión en diversos canales de la membrana plasmática como los TRP y ORAI entre otros (ibídem) (Hou et al., 2012) (Bouron et al., 2015). En todos los modelos en los que se ha analizado, se ha encontrado que la disminución del calcio extracelular provoca una disminución del pico inicial de incremento de calcio y de la fase de decaimiento, mientras que el incremento de la concentración extracelular provoca un incremento en ambas fases (Stanisstreet, 1982) (Sammak et al., 1997) (Hinman et al., 1997) (Tran et al., 1998) (Tran et al., 1999) (Klepeis et al., 2001) (Leiper et al., 2006) (Shabir and Southgate, 2008) (Berra-Romani et al., 2008). Sin embargo, la ausencia de calcio extracelular en ningún caso ha sido suficiente para inhibir por completo el incremento de calcio citosólico de la onda (ibídem), y en algunos casos sólo ha resultado de gran importancia para las células del borde de la herida (Figura 1.5) (Klepeis et al., 2001) (Shabir and Southgate, 2008).

Por otra parte, el rol del calcio almacenado en el retículo endoplásmico también ha sido analizado en diferentes sistemas. Típicamente, el calcio es liberado del retículo endoplásmico tras una sucesión de reacciones en las que la fosfolipasa C (PLC) es activada (frecuentemente por un receptor de membrana plasmática asociado a proteína G) y esta cataliza la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP2) en diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) (Berridge, 2016). El IP3 difunde en el citosol hasta alcanzar los receptores de IP3 (IP3R) en la membrana del retículo endoplásmico, y estos receptores que forman canales específicos de calcio se abren permitiendo la salida de calcio a favor de su gradiente químico (ibídem) (Ver más adelante en Figura 1.9).

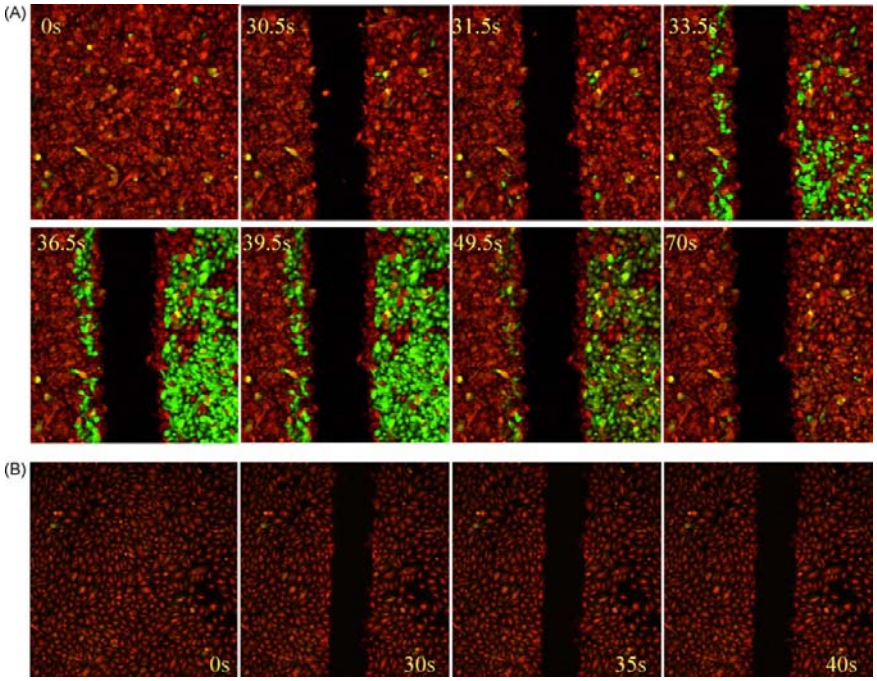


Figura 1.5. FCW en células de NHU en cultivo. Imágenes de monocapas celulares cargadas con las sondas específicas de calcio Fluo-4 AM y Fura-red. Se muestran los cursos temporales de la FCW en monocapas control (A) o en ausencia de calcio extracelular y pre-tratamiento con 0.1 μM de tapsigarguina (B). Extraído de (Shabir and Southgate, 2008).

La estrategia principal para estudiar el rol del calcio del retículo endoplásmico ha sido la incubación con quelantes de calcio difusibles como el BAPTA-AM o la incubación con inhibidores específicos de la bomba de calcio del retículo endoplásmico (SERCA, "Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+}/ATPase") como la tapsigarguina (Tg) o el ácido ciclopiazónico (CPA) (Michelangeli and East, 2011). La inhibición de la SERCA provoca el vaciamiento lento de calcio del retículo lo que provoca en sí mismo un incremento transitorio de la $[Ca^{2+}]_c$ de características diferentes a la FCW, sin embargo, luego de un tiempo los mecanismos de homeostasis del calcio a nivel de la membrana plasmática y de la mitocondria restauran la concentración fisiológica (ibídem) (Chemaly et al., 2018). En dichas condiciones la $[Ca^{2+}]_c$ es igual a la $[Ca^{2+}]_{re}$ por lo que las células son incapaces de responder a los estímulos de liberación del calcio del retículo (ibídem). En los estudios realizados con este tipo de estrategia se ha encontrado tanto en modelos de estímulo mecánico como en heridas en células en cultivo o in situ, que el aporte del calcio del retículo endoplásmico es más importante que el del calcio extracelular, especialmente para la propagación de la FCW (Boitano et al., 1994) (Hinman et al., 1997) (Klepeis et al., 2001) (Leiper et al., 2006) e incluso se ha encontrado en algunos

tipos de células que la falta de calcio extracelular en combinación con el vaciamiento de calcio del retículo endoplásmico es suficiente para inhibir por completo la FCW (Figura 1.5) (Shabir and Southgate, 2008).

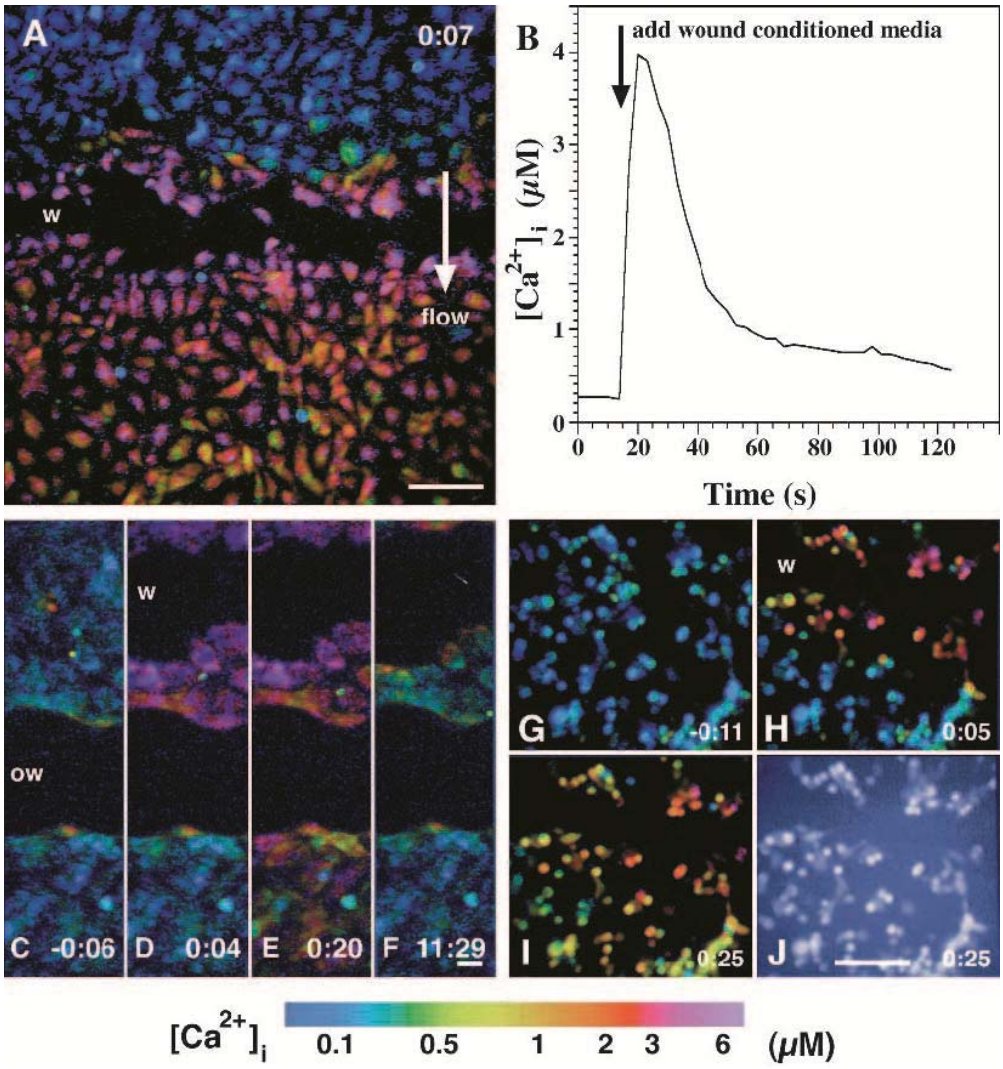


Figura 1.6. FCW en células CPAE en cultivo, rol de los factores solubles. En las células perfundidas con un flujo de solución control en dirección perpendicular a la herida, se observa que la distancia de propagación de la onda incrementa en un borde mientras que se reduce en el otro (A). La adición de un medio condicionado con un homogeneizado celular a una monocapa indemne provoca un incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ (B). La FCW generada por una nueva herida (W) es capaz de propagarse a través de una brecha libre de células generada por una herida anterior o "vieja" (OW) (C-F). En monocapas en las que se desmantelan las uniones intercelulares (mediante tratamiento durante 40 min con EGTA seguido de restitución de solución control por 20 min), se produce FCW cuando se genera una herida (G-J) sugiriendo que los mecanismos de propagación son independientes de las uniones comunicantes al menos en forma parcial. Extraído de (Sammak et al., 1997).

1.2.2. Rol de la difusión de factores señalizadores extracelulares. Liberación de ATP.

Se han hecho numerosos esfuerzos para determinar los mecanismos de desencadenamiento y propagación tanto de la FCW como de la onda de calcio producida por un estímulo mecánico. En la mayoría de los estudios realizados se ha encontrado que la propagación de estas ondas depende en forma importante de la liberación de factores solubles que difunden y actúan de forma autócrina o parácrina provocando el incremento de calcio citosólico.

En células de CPAE y NHU en cultivo se ha demostrado que la FCW es capaz de propagarse incluso en presencia de una brecha en la monocapa, generada al herir las células previamente (Sammak et al., 1997) (Shabir and Southgate, 2008). La FCW se desencadena en el borde de la herida nueva, se propaga hasta alcanzar uno de los bordes de la herida anterior y alcanza el otro borde de herida a un tiempo similar al esperado de no haber existido la brecha (ibídem). Asimismo, en células de CPAE en cultivo se ha encontrado que la propagación de la FCW en presencia de un flujo laminar de solución control en dirección perpendicular a la herida, provoca cambios en la distancia de propagación a ambos lados de la herida de tal modo que sugiere que la FCW depende de la liberación de factores solubles que actúan de forma parácrina (Sammak et al., 1997) (Figura 1.6). Se han estudiados varios factores que actúan a nivel extracelular afectando la propagación de la FCW al unirse a receptores de membrana como factores de crecimiento y principalmente nucleótidos como el ATP (Leiper et al., 2006) (Berra-Romani et al., 2008).

Para discutir el rol del ATP sobre la FCW es conveniente revisar algunos aspectos sobre el proceso de liberación de ATP al medio extracelular así como de los receptores purinérgicos. Se ha demostrado en diversos sistemas que el ATP puede ser liberado al medio extracelular como consecuencia de una variedad de estímulos donde activa de forma autócrina y parácrina receptores específicos denominados receptores purinérgicos P2 (Zhang et al., 2012) (Saez et al., 2017) (Takahashi et al., 2017). Se ha encontrado que la señales mediadas por los receptores purinérgicos participan de varios procesos neuronales así como secreción exócrina y endócrina, respuesta inmune, inflamación, agregación plaquetaria y vasodilatación mediada por el endotelio (Burnstock and

Knight, 2004) (Burnstock, 2006). Asimismo, la activación de receptores purinérgicos ha sido implicada en la mediación de la proliferación, diferenciación y muerte celular (Burnstock, 2002) (Burnstock and Di Virgilio, 2013). Existen dos tipos de receptores P2: 1) los P2X o ionotrópicos, que están asociados a canales de la membrana plasmática o son en sí mismos canales catiónicos no selectivos y 2) los P2Y o metabotrópicos, que transducen la señal extracelular en una señal intracelular (Coddou et al., 2011b) (von Kugelgen and Hoffmann, 2016). En mamíferos se han identificado siete genes distintos de receptores P2X denominados P2X1 a P2X7, cada uno con variantes de empalme alternativo; la apertura de estos canales en condiciones fisiológicas suele generar un flujo de calcio debido al importante gradiente electroquímio de este catión pero puede generar también flujo de sodio con la despolarización concomitante (Coddou et al., 2011a). Asimismo, se han encontrado ocho genes de P2Y en mamíferos cuya denominación no es secuencial (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13, and P2Y14); son receptores acoplados a proteína G y la respuesta principal de su unión a ligando es la activación de la PLC generando la síntesis de IP3 y la liberación de calcio del retículo endoplásmico, pero también pueden provocar la activación de la adenilil ciclasa (Figura 1.7) (Erb et al., 2006) (von Kugelgen and Hoffmann, 2016).

Es ya reconocida la función como señal de peligro del ATP extracelular durante una lesión, resulta fundamental en varios procesos como la agregación plaquetaria, el reclutamiento celular durante la inflamación, donde funciona como señal quimiotáctil o la inducción de la maduración y secreción de citoquinas pro-inflamatorios (Ishimaru et al., 2014) (Dou et al., 2017). Varios autores han encontrado en diferentes modelos que el ATP es liberado como resultado de una herida difundiendo hacia las células vecinas, aunque no es del todo evidente cuál o cuáles son los mecanismos de liberación de este nucleótido. Asimismo, se ha encontrado que el ATP liberado al realizar la herida es responsable en gran medida del incremento de calcio observado en la onda fugaz, principalmente a través de la activación de receptores purinérgicos (Hinman et al., 1997) (Klepeis et al., 2001) (Sung et al., 2003) (Weinger et al., 2005) (Leiper et al., 2006) (Shabir and Southgate, 2008) (Block et al., 2010) (Handly and Wollman, 2017). En varios estudios de la FCW se han utilizado inhibidores inespecíficos de receptores purinérgicos para determinar el efecto del ATP sobre la onda fugaz, como la suramina o el PPADS (Sung et al., 2003) (Leiper et al., 2006) (Shabir and Southgate, 2008). Asimismo, también se ha estudiado el rol de los receptores purinérgicos en la onda

mediante incubación con la enzima apirasa, que cataliza la rápida hidrólisis de los ésteres de fosfato tanto de ATP como ADP (Klepeis et al., 2001) (Block et al., 2010) (Handly and Wollman, 2017) o el tratamiento de las células con el inhibidor de ecto-nucleotidasas ARL-67156, que permite un mayor incremento de la concentración y duración del ATP extracelular (Grafe et al., 2006) (Handly and Wollman, 2017). Estos estudios han revelado que la activación de receptores purinérgicos es necesaria para la propagación de la FCW (ibídem). Los resultados obtenidos con el uso de algunas de estas drogas deben ser analizados con cuidado, sobre todo los que utilizan suramina, porque estas drogas pueden inhibir una variedad importante de otros receptores, canales y enzimas (Coddou et al., 2011b). Sin embargo, la corroboración de estos resultados mediante diferentes estrategias y los resultados obtenidos en modelos de estímulo mecánico de una célula puntual (se describirán más adelante) le han dado robustez a la teoría del rol del ATP sobre la FCW.

1.2.3. Rol de las uniones comunicantes y de los hemicanales en la FCW

En diversos trabajos se ha explorado el rol de las uniones comunicantes y los hemicanales sobre la FCW. Para poder analizar eficientemente estos resultados es necesario realizar una breve descripción sobre las diferencias entre uniones comunicantes, hemicanales, conexinas y panexinas. Los hemicanales son canales de la membrana plasmática compuestos por seis subunidades de proteína que forman un poro con la capacidad de abrirse o cerrarse según diferentes estímulos (Pogoda et al., 2016). Las proteínas que los forman pueden ser conexinas o panexinas, en cual caso el hemicanal puede ser denominado conexón o panexón respectivamente (ibídem). Ambas familias de proteínas tienen cuatro dominios transmembrana pero no presentan gran homología estructural, las panexinas tienen homología con las inexinas en los invertebrados (ibídem). Dos hemicanales de conexinas o conexones ubicados en células vecinas pueden unirse e interactuar "cabeza con cabeza" generando una unión comunicante, permitiendo el acoplamiento metabólico de ambas células (ibídem). Se considera que los hemicanales de panexina o panexones son incapaces de formar uniones comunicantes e incluso debido a esta característica varios autores recomiendan usar el término "canal" en vez de "hemicanal" al referirse a los panexones (Sosinsky et al., 2011) (Lohman and Isakson, 2014). Tanto conexones como panexones pueden formar hemicanales libres, habitualmente insertos a nivel de la membrana apical, que

permiten el pasaje de solutos entre el citosol y el medio extracelular cuando se encuentran abiertos (ibídem).

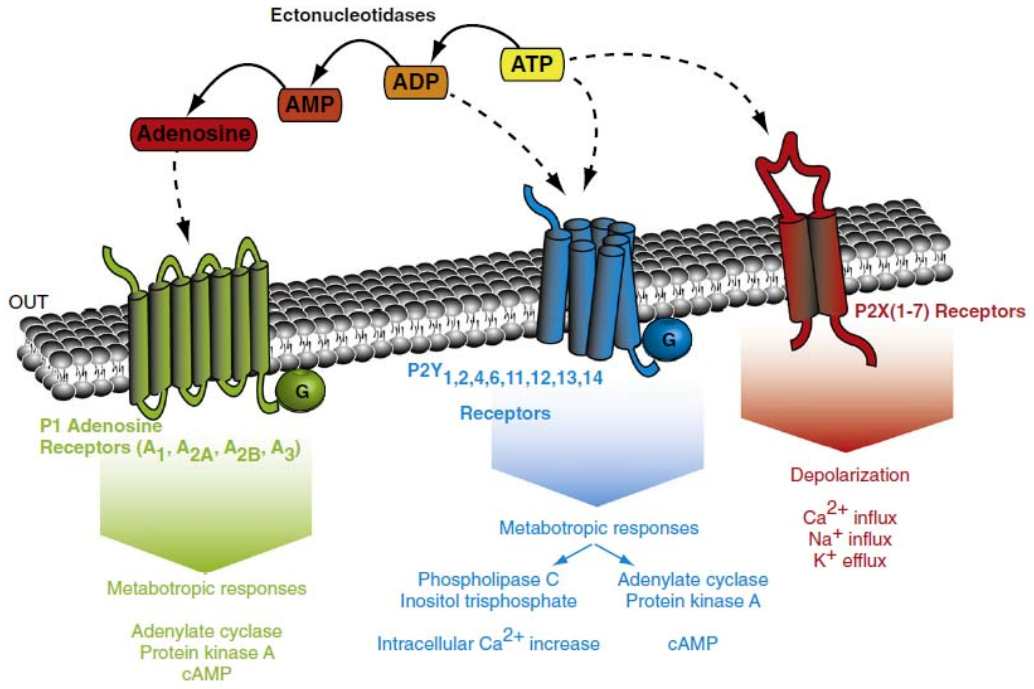


Figura 1.7. Diagrama resumiendo la familia de receptores purinérgicos y mecanismos de acción. El ATP extracelular tiene dos destinos posibles, puede actuar sobre receptores o ser hidrolizado sucesivamente en ADP, AMP y adenosina por la acción de ectonucleotidasas. Los receptores P2X son activados por ATP, los P2Y por ATP y con menor afinidad por el ADP y los P1 por la adenosina. Los receptores P2X son ionotrópicos, es decir que su activación provoca la apertura de un canal catiónico que puede ser el mismo receptor o un canal asociado como un hemicanal de panexina. En ambos casos dicho canal tiene baja selectividad permitiendo tanto el influjo de calcio y sodio como el eflujo de potasio. Tanto los receptores P2Y como los P1 son metabotrópicos, están asociados a proteína G y median la activación de la PLC. Extraído de (Baroja-Mazo et al., 2013)

Los trabajos respecto a la participación de las uniones comunicantes y de los hemicanales libres en el desencadenamiento y propagación de la FCW en heridas de monocapas celulares en cultivo y en lesiones in situ en endotelio de aorta, han proporcionado resultados más difíciles de interpretar y con mayores diferencias entre los distintos tipos celulares (Klepeis et al., 2001) (Shabir and Southgate, 2008) (Berra-Romani et al., 2008). Los estudios utilizando inhibidores de uniones comunicantes como heptanol, octanol y ácido alfa-glicirretínico (αGA) han mostrado escaso o nulo efecto tanto en el desencadenamiento como la propagación de la FCW en las líneas

celulares de epitelio de córnea humano (HCE) y NHU en cultivo (ibídem). Sin embargo, en el endotelio de aorta de rata in situ se ha observado que la utilización de dichas drogas provoca una disminución de la fase de decaimiento en el incremento de calcio citosólico, aunque no se ha evaluado el efecto sobre la propagación de la FCW (Berra-Romani et al., 2008). Asimismo, se ha encontrado en embriones de *Drosophila* que la propagación de la FCW depende fundamentalmente de la difusión de IP3 a través de uniones comunicantes de inexinas (los homólogos de las conexinas en invertebrados) (Razzell et al., 2013) (Narciso et al., 2015). Se debe ser cauto a la hora de interpretar estos resultados considerando que el heptanol, octanol y αGA pueden inhibir tanto a las uniones comunicantes como a los hemicanales libres de conexinas según la concentración y el tipo de célula (Lohman and Isakson, 2014).

1.2.4. Modelos de estímulo mecánico de célula puntual

Al producir una herida se generan varios estímulos, entre ellos la liberación del contenido citoplásmico al medio extracelular, la pérdida de contacto con células vecinas y el estímulo mecánico. Este último ocurre incluso en modelos de herida no mecánica como en las heridas químicas o las quemaduras, donde puede existir estímulo mecánico generado al contraerse el tejido, debido a la interrupción de la continuidad, que libera la tensión pre-existente. En resumen no es posible hacer una herida sin generar algún tipo de tensión física a nivel celular. De lo anterior se desprende que las señales generadas por un estímulo mecánico puntual deben ocurrir también al generar una herida, además de otras señales desencadenadas durante este proceso más complejo. Como se mencionó anteriormente, el estímulo mecánico puntual sobre una célula, sin ruptura de la membrana plasmática y muerte necrótica, es suficiente para provocar una onda de incremento de la concentración de calcio citosólico similar a la FCW (D'Hondt et al., 2007a) (D'Hondt et al., 2007b) (Kobayashi et al., 2014). De este modo, conocer los mecanismos por los que se produce dicho fenómeno es de gran utilidad para comprender los procesos que gobiernan la FCW.

En diversos tipos celulares se ha encontrado que el incremento de calcio citosólico inducido por un estímulo mecánico puntual es mayoritariamente debido a la liberación del calcio del retículo endoplásmico, sobre todo en lo que refiere a la propagación de la onda (Boitano et al., 1994). Asimismo, se ha encontrado que en la célula estimulada

mecánicamente el principal aporte de calcio es extracelular (ibídem). Sin embargo, en células de queratinocito humano HaCaT se ha demostrado que el calcio extracelular contribuye de forma importante en la fase de decaimiento, entrando a la célula a través del canal de calcio TRPC6, activado por el DAG generado a partir de la hidrólisis del PIP2 (Takada et al., 2014). Por otra parte, diversos autores han demostrado que el estímulo mecánico induce liberación de ATP, mediante estudios usando inhibidores de receptores purinérgicos como suramina, inhibidores de ecto-nucleotidasas como el ARL-67156, la enzima apirasa o incluso mediante determinación directa en tiempo real de la concentración de ATP extracelular con un sistema luciferina-luciferasa (Figura 1.8) (Gomes et al., 2005b) (D'Hondt et al., 2009) (Grygorczyk et al., 2013) (Takada et al., 2014). Del mismo modo, ha sido demostrado que la liberación de ATP al medio extracelular depende fundamentalmente de la apertura de hemicanales libres de conexina, principalmente a partir de resultados obtenidos usando inhibidores de conexina como el ácido flufenámico (FFA) o péptidos específicos como los denominados Gap26 y Gap27 (Cotrina et al., 1998) (Gomes et al., 2005a) (Gomes et al., 2006) (D'Hondt et al., 2009).

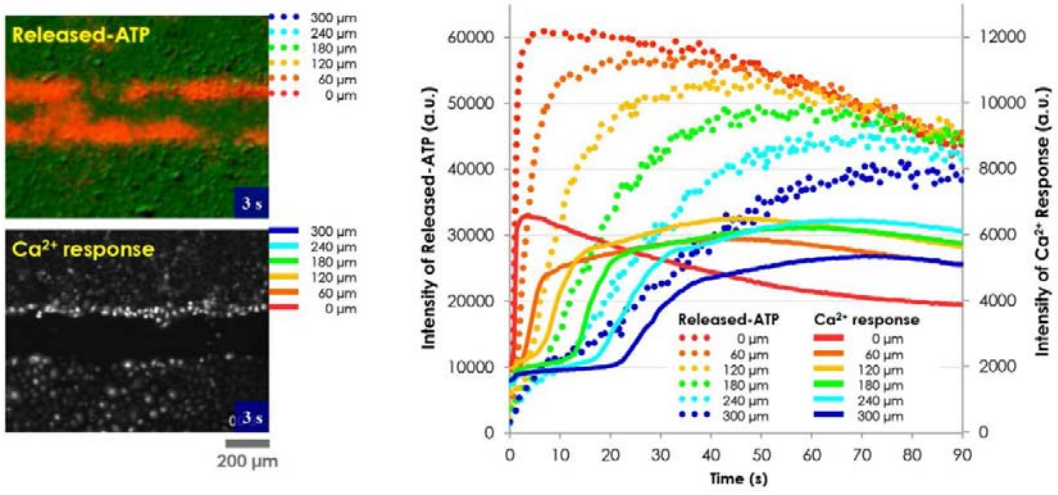


Figura 1.8. Propagación de la onda intercelular de incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ en queratinocitos inmortalizados HaCaT en cultivo, inducida por estímulo mecánico (MS). Se evidencia la liberación de ATP inducida por estiramiento de la monocapa mediante sistema luciferina-luciferasa y el calcio por incubación con la sonda específica Fluo-8 AM. En el gráfico de la derecha se presentan las variaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ y ATP en función del tiempo a diferentes distancias respecto al borde libre previamente generado. Extraído de (Takada et al., 2014)

Actualmente se postulan modelos que explicarían parte del proceso de incremento de calcio y su propagación como respuesta a un estímulo mecánico. En general, en dichos modelos el estímulo provoca la activación de una PLC que cataliza la hidrólisis del PIP2 en IP3 y DAG, el IP3 activa los IP3R en el retículo endoplásmico provocando un incremento de calcio citosólico que induce la apertura de hemicanales libres de conexina, permitiendo la salida del ATP al medio extracelular (Figura 1.9) (D'Hondt et al., 2013) (Kobayashi et al., 2014) (Takada et al., 2014) (D'Hondt et al., 2014). En el modelo presentado por Takada et al. el DAG además induce la apertura de los canales de calcio TRPC6 permitiendo la entrada del calcio extracelular (Takada et al., 2014). Asimismo, se propone que la propagación de la onda ocurre en parte por la difusión de IP3 y calcio, desde una célula a otra a través de las uniones comunicantes y en parte por la acción autócrina y parácrina del ATP sobre receptores P2Y de las células vecinas, que generan más IP3 así como DAG (D'Hondt et al., 2013) (Kobayashi et al., 2014) (Takada et al., 2014). Existe algo de controversia respecto a si existe regeneración de la onda por nueva liberación de ATP o si el incremento de calcio es inducido exclusivamente por la difusión del ATP e IP3 generado en las células estimuladas inicialmente (ibídem).

1.2.5. Oscilaciones de la $[Ca^{2+}]_c$ durante la onda fugaz

Las señales de calcio modulan una miríada de procesos fisiológicos como contracción, secreción, migración, proliferación, diferenciación, sobrevivencia y muerte celular programada (Brini et al., 2013) (Berridge, 2016) (Capiod, 2016) (Dupont and Combettes, 2016) (Chemaly et al., 2018). Diversos estímulos generan respuestas que involucran alteraciones del calcio celular con gran variedad de tipos de dinámica, desde un simple incremento transitorio de la concentración, hasta comportamientos más complejos como respuestas oscilatorias o incluso caóticas (Dupont and Combettes, 2016). Se ha encontrado que el comportamiento oscilatorio del calcio puede generar diversidad de respuestas dependiendo del tipo celular y del sistema estudiado, algunos ejemplos son el estímulo de secreción de hormonas (Holl et al., 1988), la activación de un oocito o la inducción de su apoptosis dependiendo de la edad del mismo (Cuthbertson and Cobbold, 1985) (Gordo et al., 2002), la inducción del desensamble de los contactos focales (Giannone et al., 2002) o la inducción de la sobrevivencia de neuronas y linfocitos T (Harr and Distelhorst, 2010), entre otros.

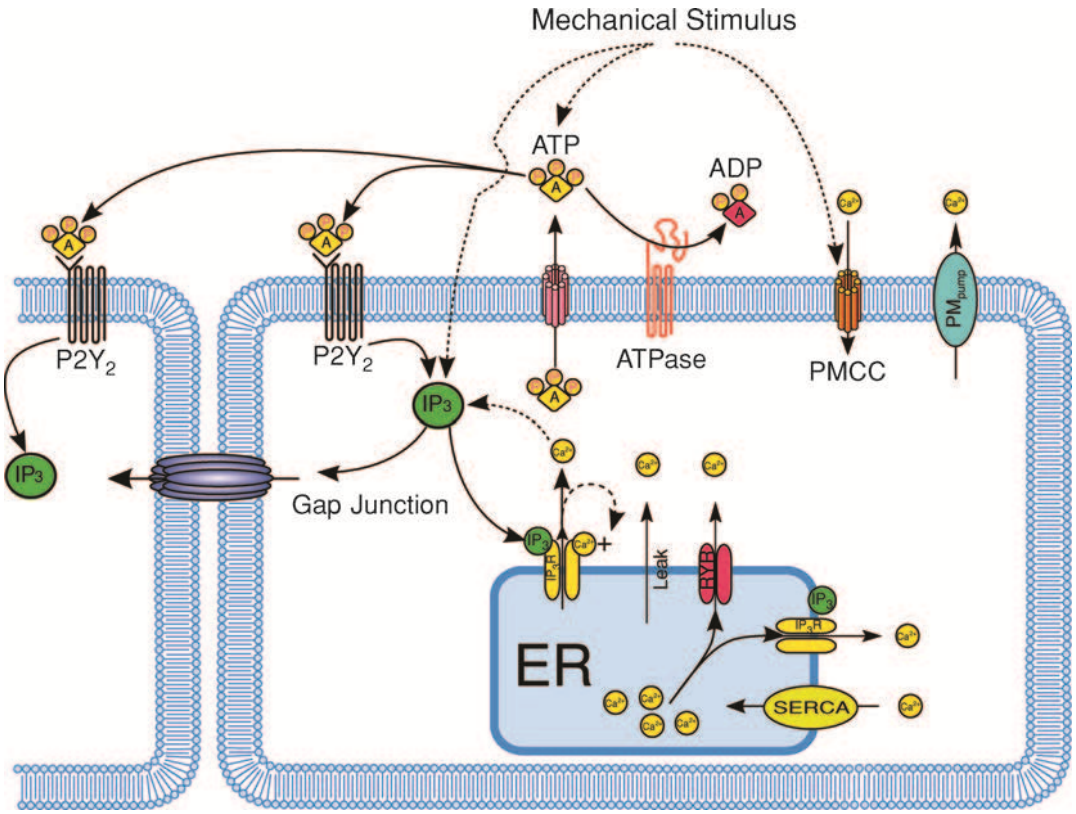


Figura 1.9. Modelo del mecanismo de propagación de la onda intercelular de incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ provocada por un estímulo mecánico en epitelio respiratorio ciliado. El estímulo mecánico desencadena la liberación de ATP al medio extracelular así como la apertura de canales de calcio de la membrana plasmática (PMCC, Plasma Membrane Ca^{2+} Channel). El ATP activa desde el medio extracelular en forma autócrina y parácrina los receptores P2Y2 que conducen a la síntesis y liberación de IP3. El IP3 activa los receptores de IP3 en el retículo endoplásmico en la célula objetivo y en células vecinas por difusión a través de uniones comunicantes. Extraído de (Warren et al., 2010).

Si bien se ha observado que la activación de algunos receptores por sus hormonas específicas puede desencadenar un incremento oscilatorio del calcio citosólico (Yule and Gallacher, 1988), en la mayoría de los sistemas estudiados este proceso depende de la activación de receptores purinérgicos por parte del ATP libre en el medio extracelular (Evans and Sanderson, 1999) (Block et al., 2010) (Sun et al., 2012). Las causas de la aparición del ATP en el medio extracelular varían dependiendo de los sistemas, por ejemplo, se ha encontrado que este nucleótido puede ser liberado a través de hemicanales, que en condrocitos, epitelio pigmentario y células de MDCK pueden abrirse de forma espontánea o por estímulo mecánico (Pearson et al., 2005) (Kono et al., 2006) (Geyti et al., 2008). En experimentos en los que se expone a células en cultivo o

tejidos con ATP y otros nucleótidos, se ha encontrado evidencia de la inducción de un incremento de la concentración de calcio con dinámica oscilatoria y en algunos casos se ha informado la existencia de una fuerte correlación entre la frecuencia oscilatoria y la concentración del nucleótido (Tomic et al., 1996) (Palmer et al., 2004) (De Bock et al., 2012) (Tang et al., 2015b) (Potter et al., 2016).

Como se mencionó anteriormente en todos los tipos celulares en que se ha estudiado se observa que el incremento de calcio citosólico durante la FCW presenta un pico inicial abrupto y una fase de decaimiento más lenta o "fase de relajación" hasta la línea de base. Sin embargo, en varios estudios tanto en células en cultivo como in situ, se ha registrado un comportamiento oscilatorio de la concentración del calcio durante la onda fugaz, con la aparición de otros picos a parte del inicial que se superponen con la fase de relajación, generalmente en una subpoblación de células (Block et al., 2010) (Berra-Romani et al., 2012) (Appleby et al., 2015) (Lembong et al., 2017).

En endotelio de aorta de rata extirpado, Berra Romani et al. han caracterizado la FCW y han encontrado que aproximadamente el 16% de la población de células que desarrollan incremento de calcio tienen comportamiento oscilatorio (Berra-Romani et al., 2008). Sus resultados en anillos de aorta de rata sugieren que las oscilaciones de calcio dependen tanto de la entrada desde el medio extracelular como de su liberación del retículo endoplásmico (Berra-Romani et al., 2012). Asimismo, han encontrado evidencia que descarta que el aporte de calcio intracelular para la generación de la dinámica oscilatoria dependa de la activación de receptores P2Y o receptores tirosina quinasas (ibídem). A partir de sus resultados, Berra-Romani y colaboradores sugieren que el mecanismo que provoca las oscilaciones depende de: 1) la apertura de hemicanales libres que permite un flujo de sodio hacia el citosol, 2) la inversión del flujo normal del intercambiador de sodio y calcio (NCX) que provoca la entrada de calcio desde el medio extracelular y 3) la liberación de calcio del retículo endoplásmcio inducida por IP3 que podría producirse por la activación de PLCs no convencionales no vinculado a receptores purinérgicos o tirosina quinasas (ibídem).

En células de NHU en cultivo, el grupo de Appleby y colaboradores ha realizado estudios exhaustivos para caracterizar la variabilidad de respuestas oscilatorias de la concentración de calcio frente a estímulos como la incubación con ATP o la realización

de una herida mecánica (Appleby et al., 2015) (Figura 1.10). Con el propósito de interpretar más eficientemente los resultados, estos autores han desarrollado un algoritmo de segmentación, que permite registrar los cambios de concentración de calcio del 95% de la población de células, de una forma semi-automática (ibídem). Asimismo, para evidenciar los cambios de concentración de calcio los autores utilizan una combinación de dos sondas específicas, el Fluo-4 AM y el Fura Red, cuya unión con el catión divalente provoca un incremento y una disminución de fluorescencia respectivamente, esto permite realizar una corrección de carga de la sonda para cada célula (ibídem). De cada registro individual los autores extrajeron varios datos: la amplitud y tiempo de aparición del primer pico, la aparición de una meseta en la fase de relajación así como su magnitud, el tiempo en que se alcanza una intensidad igual a la mitad de la amplitud y el período oscilatorio (en las células que presentaron más de un pico). Utilizando estos parámetros Appleby y colaboradores identificaron 14 diferentes dinámicas oscilatorias de tal modo que en sus experimentos toda célula respondía de forma que se le podía asignar una de estas dinámicas (ibídem). Sin embargo, en dicho trabajo no fue evaluado el mecanismo mediante el cual se producen las oscilaciones, así como no se ha desarrollado un método que permita reducir o incrementar la frecuencia oscilatoria sin alterar el pico inicial y la fase de decaimiento de la respuesta de calcio en la onda fugaz.

En células NIH 3T3 de fibroblastos de ratón en cultivo, el grupo de Lembong y colaboradores ha encontrado que durante la FCW también existe una sub-población celular que presenta oscilaciones (Lembong et al., 2017). En este trabajo los resultados sugieren que la frecuencia de oscilación de $[Ca^{2+}]_c$ es directamente proporcional a la densidad celular y que los cambios de calcio están acoplados a la actividad de actomiosina (ibídem). Asimismo, el trabajo de Lembong et al. sugiere que la ubicación de las células con frecuencia máxima de oscilación es influenciada por la rigidez del sustrato, de tal modo que en sustratos poco rígidos las primeras filas de células presentan mayor frecuencia oscilatoria, mientras que en sustratos más rígidos son las células más alejadas del borde las que muestran mayor número de picos (ibídem). Tanto en los resultados obtenidos por Berra-Romani y Appleby como en los experimentos realizados en el modelo de Lembong no se ha obtenido información sobre el rol del comportamiento oscilatorio del calcio durante la onda fugaz sobre la cicatrización (Berra-Romani et al., 2012) (Appleby et al., 2015) (Lembong et al., 2017).

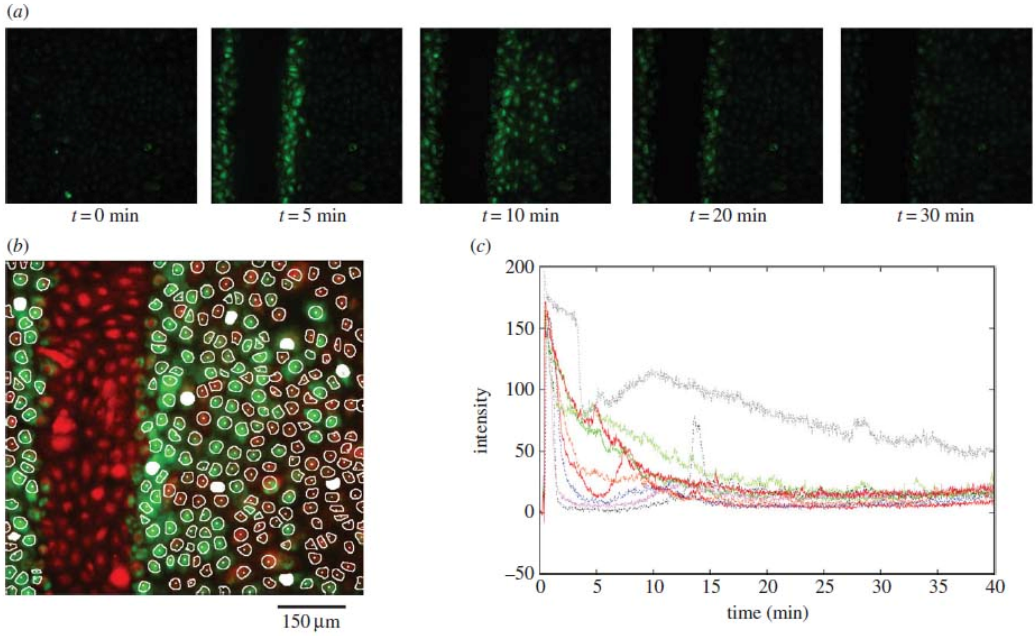


Figura 1.10. Oscilaciones durante la FCW en células de NHU en cultivo. Curso temporal de la FCW evidenciado con la sonda específica para calcio Fluo-4 AM (A). La combinación del uso de sondas específicas para calcio Fluo-4 AM y Fura-red cuya fluorescencia incrementa y disminuye respectivamente por la unión al calcio permite la corrección por diferencia de carga de la sonda y la detección automatizada de las diferentes células delimitadas por una región de interés individual (B). El registro de células individuales revela patrones de respuesta variados, en algunos casos oscilantes (C) Extraído de (Appleby et al., 2015)

1.2.6. Rol de la FCW sobre la cicatrización

Aún cuando los mecanismos que gobiernan la FCW han sido estudiados con cierta profundidad, existe considerablemente menos información acerca del rol de la onda sobre el proceso global de cicatrización. En células de CPAE en cultivo, experimentos utilizando el quelante EGTA o el catión Gd^{3+} (inhibidor competitivo del calcio), indican que la FCW induce la proliferación durante la cicatrización (Tran et al., 1998). Sin embargo, en dicho trabajo se demuestra que también se requieren los factores de crecimiento proporcionados en el suero para la estimulación de la proliferación. En forma posterior, los autores han obtenido resultados en el mismo modelo de cicatrización que sugieren que el incremento de calcio de la onda es responsable de la inducción de la transcripción de los genes c-fos y c-jun (Tran et al., 1999). Este incremento en la trasncripción se inicia pocos minutos luego de realizada la herida, tiene

su máximo a la hora y decrece significativamente luego de transcurridas dos horas. Los experimentos utilizando inhibidores de las quinasas CaMK y PKC sugieren que el calcio de la onda fugaz activa dichas enzimas (fundamentalmente la CaMK) y estas median el efecto sobre la transcripción de c-fos y c-jun (ibídem). Por otra parte, la tasa de cicatrización de 24 μm/h observada en el período de 1 a 3 horas luego de provocada la lesión, se reduce hasta un 50% cuando se inhibe parcialmente la FCW utilizando Gd^{3+} o EGTA, mientras que se incrementa aproximadamente un 50% si se realiza la herida en presencia de una solución con el doble de la concentración de calcio extracelular (ibídem).

En modelos de herida en células de hepatoblastoma humano (Hep-G2) y en MDCK en cultivo, se han obtenido resultados que sugieren que la inhibición de la FCW provoca una disminución significativa del índice de proliferación durante la cicatrización (Sung et al., 2003). En este trabajo los autores utilizaron dos estrategias para inhibir la onda, la inhibición irreversible de la SERCA con tapsigarguina o la inhibición conjunta de conexones y receptores purinérgicos utilizando los inhibidores respectivos αGA y suramina. Por otra parte, en experimentos realizados en presencia de suramina en cultivos primarios de epitelio de córnea de ratón se ha encontrado evidencia que sugiere que la FCW es determinante en el desencadenamiento de la migración (Leiper et al., 2006).

Resulta importante tener precaución al interpretar resultados obtenidos al utilizar drogas que pueden modular diversos efectores moleculares. Un ejemplo muy relevante para este trabajo es la tapsigarguina, un inhibidor irreversible de la SERCA (Lytton et al., 1991) que puede inducir el desencadenamiento de la apoptosis (Wang et al., 2014). Asimismo, la suramina también tiene efectos diversos, además de inhibir de forma no selectiva los receptores purinérgicos también desplaza a la calmodulina de los receptores de ryanodina (RyR) induciendo un incremento en la probabilidad de apertura y en la conductancia del canal (Hill et al., 2004) e inhibe el acoplamiento de algunas proteínas G con sus receptores específicos (Chung and Kermode, 2005), entre otros efectos adicionales que hacen muy difícil interpretar resultados utilizando esta droga.

Considerando los trabajos mencionados en forma previa, cabe señalar que, hasta donde sabemos, no existen estudios que evalúen el rol de la FCW sobre la cicatrización más

allá de las 3 horas de infligida la herida, que además, hayan sido realizados inhibiendo la onda de forma completamente reversible. Es por esta razón, que parte de objetivos de esta tesis consisten en determinar el rol de la FCW a más largo plazo por un método que nos permita inhibir la onda de forma reversible, comprometiendo la homeostasis del calcio por un período lo más acotado posible a la duración de la onda.

1.3. La onda de sodio y la onda lenta de calcio

Durante todo el proceso de cicatrización ocurren varias ondas de señalización de diferente cinética, algunas aparecen de forma instantánea o muy temprana luego de realizada la herida y desaparecen rápidamente, mientras que otras aparecen más tarde y se prolongan durante horas o hasta el cierre de la herida. La más temprana es la FCW que se desencadena de forma instantánea y ya fue descripta en las secciones previas. Otras ondas tempranas se caracterizan por liberación de especies reactivas de oxígeno (ROS, "Reactive Oxygen Species"), activación de ERK y de MAPK, encontradas en lesiones de embriones de *Drosophila melanogaster*, en células de MDCK y en células de epitelio de córnea humana en cultivo respectivamente (Matsubayashi et al., 2004) (Yang et al., 2004) (Razzell et al., 2013). En el embrión de *D. melanogaster*, luego de generada una lesión se produce una onda de liberación de H_2O_2 que alcanza un máximo a los 3 minutos (ibídem). En este modelo, la FCW provoca la activación de la enzima DUOX, una NADPH oxidasa, que cataliza la síntesis de H_2O_2. Esta onda contribuye a la activación de ERK1/2, el NF-kB y la matriz metaloproteinasa 9, así como la inducción de varios genes asociados a la cicatrización (el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), varias interleuquinas y mucinas) (Razzell et al., 2013) (van der Vliet and Janssen-Heininger, 2014).

Por otro lado, también se han descrito ondas de liberación de ROS y activación de ERK y MAPK de inicio posterior y duración considerablemente más prolongada. En modelos de herida en cola de zebrafish, se ha encontrado una onda de liberación de H_2O_2 sintetizado por oxidasa dual (DUOX) con función de reclutamiento de linfocitos, que inicia a los 3 min de provocada la lesión y dura más de 100 min (Niethammer et al., 2009). Asimismo, en la línea inmortal de células de cáncer de mama MCF7 en cultivo, también existen resultados que sugieren una onda de ROS de similares características (Riahi et al., 2014). Por otro lado, en células de MDCK y de epitelio de córnea en

cultivo así como en piel de rata in vivo, se han encontrado ondas de activación de ERK y MAPK que dan inicio recién a los 15 min de provocada la lesión y pueden durar varias horas (Matsubayashi et al., 2004) (Yang et al., 2004) (Hiratsuka et al., 2015) (Aoki et al., 2017).

En nuestro laboratorio se han encontrado y caracterizado dos ondas de incremento de la concentración de cationes sodio y calcio de inicio posterior a la FCW y de duración más prolongada que serán descritas en esta sección.

En el modelo de cicatrización en células de endotelio de córnea de bovino (BCE) en cultivo, tanto en ausencia como presencia de ECM, se ha encontrado que se produce una onda de incremento de la concentración citosólica de sodio (ONa) durante la cicatrización (Chifflet et al., 2005) (Justet et al., 2013). Esta onda, evidenciada mediante el uso de la sonda SodiumGreen-AM, es detectable a partir de los 30 minutos de realizada la herida, se propaga lentamente hacia el centro de monocapa y continúa por lo menos hasta 36 horas luego de generado el daño (ibídem). Los resultados sugieren que el incremento de sodio intracelular se debe principalmente al incremento de expresión del canal de sodio epitelial (ENaC, "Epithelial Sodium Channel") que una vez inserto en la membrana plasmática permite la entrada de sodio a favor de su gradiente electroquímico (ibídem). Esta entrada de sodio provoca la despolarización del potencial de membrana plasmática (PMP), evidenciado por la incubación con la sonda potenciométrica Oxonol V (ibídem). Los experimentos sustituyendo el sodio extracelular por colina, un catión no difusible, o la incubación con fenamil, inhibidor del ENaC, disminuyen significativamente la formación de lámelas y de cordones intercelulares de actomiosina característicos del proceso de migración durante la cicatrización (ibídem) (Figura 1.11). Paralelamente, la sustitución del sodio extracelular por litio, un catión monovalente que puede ingresar al citosol a través del ENaC y genera la despolarización del potencial de membrana plasmática, provoca un incremento significativo de las estructuras antes mencionadas, especialmente de cordón de actomiosina (ibídem). Resultados similares fueron obtenidos en células de MDCK y epitelio de córnea de conejo en cultivo (RCEP, "Rabbit Corneal Epithelial") (Justet et al., 2013).

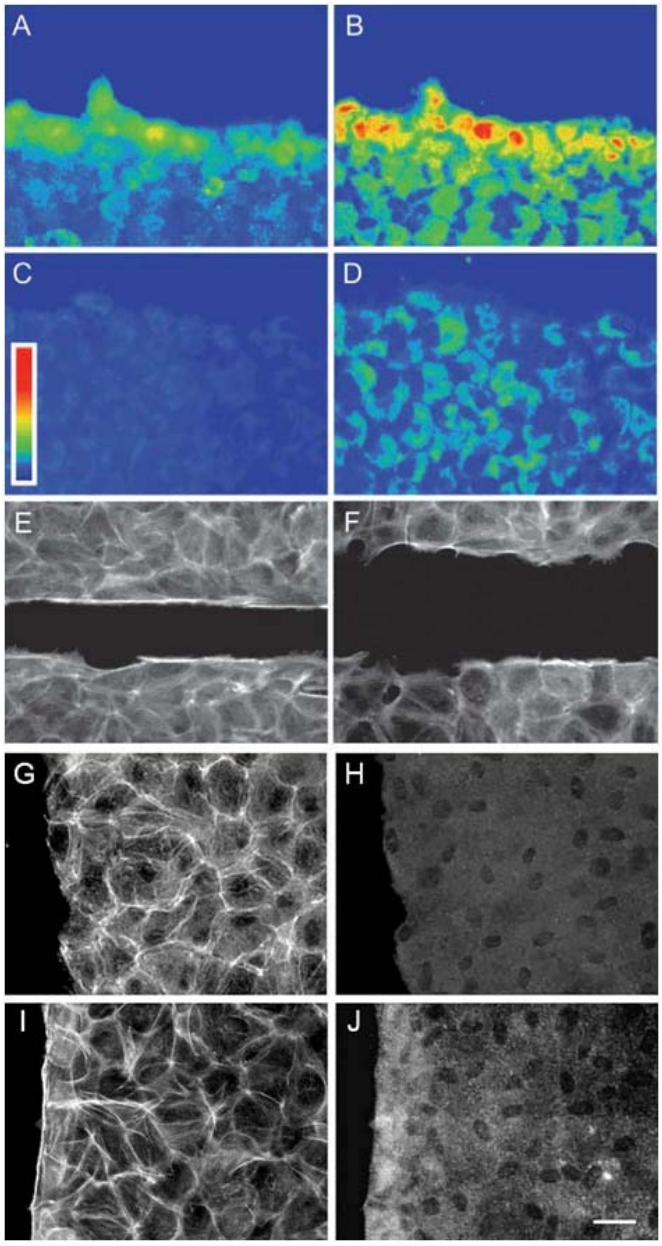


Figura 1.11. Onda de sodio y despolarización del PMP durante la cicatrización en células de BCE en cultivo en ausencia de ECM. Monocapas celulares 1 h (A-D), 4 h (I-J), 6 h (E-F) y 0 h (G-H) luego de realizada la herida. Imágenes en pseudo-color revelando diferencias en la $[Na^+]_c$ (A yC) y en el PMP (B y D), evidenciados mediante incubación con SodiumGreen AM y Oxonol V respectivamente. Imágenes de F-actina (E, F, G, I) y ENaC (H, J) evidenciados respectivamente con faloidina-FITC e inmunofluorescencia indirecta. (C, D y F) monocapas incubadas con fenamil 50 µM durante todo el proceso de cicatrización. Extraído de (Chifflet et al., 2005).

Por otra parte, en nuestro laboratorio hemos encontrado que durante la cicatrización de células de BCE en cultivo en ausencia de ECM, ocurre además una segunda onda de incremento del calcio citosólico denominada SCW ("Slow Calcium Wave") para

diferenciarla de la FCW (Chifflet et al., 2012). Esta onda es simultánea a la de sodio tiene un distribución en la monocapa similar a la observada para la despolarización del PMP, se inicia en el borde de la herida y se propaga al resto de la monocapa. Los resultados publicados en este artículo muestran que la inhibición del ENaC mediante incubación con fenamil o amiloride provoca no sólo la inhibición de la onda de sodio sino también de la SCW. Esto sugiere que la SCW está determinada por el incremento de sodio intracelular y/o por la despolarización del potencial de membrana plasmática. Con el propósito de determinar de dónde proviene el calcio en la onda lenta, se realizaron estudios utilizando tapsigarguina, que descartan al retículo endoplásmico como fuente principal de este catión para la SCW (Figura 1.12) (ibídem). Al igual que con la onda de sodio, en células RCEP y MDCK en cultivo también se produce SCW. Asimismo, tanto la inhibición del ENaC como del NCX determinan una reducción de la tasa de cicatrización (Justet et al., 2013). A diferencia de lo que ocurre en células de BCE, RCEP y MDCK, en células de endotelio de aorta de bovino en cultivo no se encontró evidencia de la onda de sodio ni la SCW. Sin embargo, en dichas células la alteración de la expresión del ENaC o su inserción en la membrana plasmática generó resultados que sugieren que la actividad de este canal es esencial para la migración durante la cicatrización, incluso en células en cultivo donde no ocurre SCW (ibídem).

Teniendo en cuenta los resultados recién mencionados, hemos explorado el rol del intercambiador de sodio y calcio (NCX, "Na^+/Ca^{2+} exchanger") en la SCW y la cicatrización (ibídem). Esta proteína presenta dos modalidades de operación, la forma directa y la reversa. En el modo directo se impulsa la salida de calcio al medio extracelular aprovechando la energía liberada por la entrada de sodio a favor del gradiente electroquímico, mientras que en el modo reverso el calcio ingresa al citosol y el sodio es transferido al medio extracelular (Blaustein and Lederer, 1999). Tanto la despolarización del potencial de membrana plasmática como el incremento de la concentración de sodio citosólico inducen el cambio a la modalidad reversa (ibídem). Estas condiciones existen durante la cicatrización mediadas por la onda de sodio debido al incremento de expresión de ENaC (Chifflet et al., 2005).

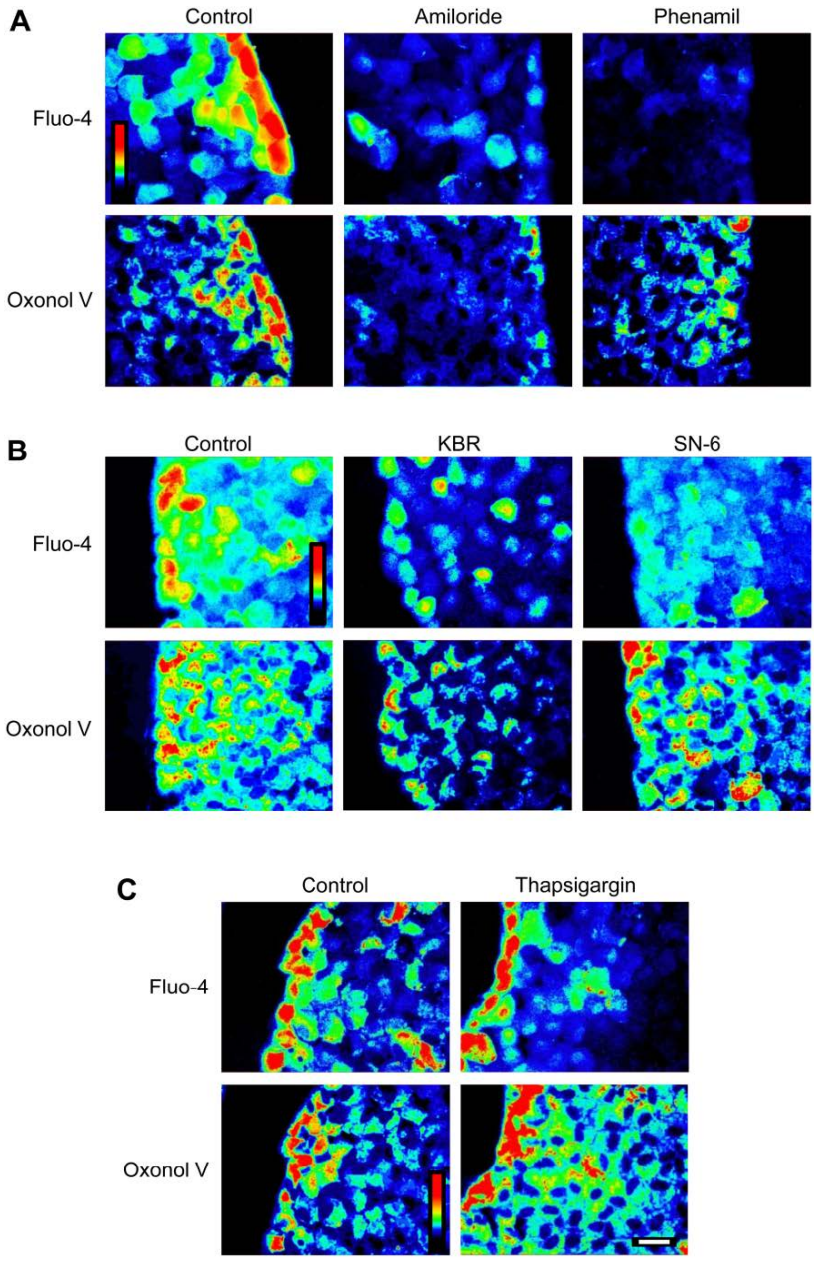


Figura 1.12. Rol del ENaC y el NCX en la onda lenta de calcio. Imágenes en pseudo-color de Fluo-4 AM y Oxonol V de monocapas de BCE en cultivo luego de 4 hs de realizada la herida. Las células fueron incubadas en medio de cultivo con 10 µM de amiloride y 33 µM de fenamil (inhibidores del ENaC) (A), con 10 µM de KB-R7943 y 30 µM de SN-6 (inhibidores del NCX) (B) o con tapsigarguina (C). Los resultados sugieren que la SCW no depende del calcio del retículo endoplásmico sino que se encuentra acoplada a la onda de sodio con participación del NCX. Extraído de (Chifflet et al., 2012).

En estudios utilizando inhibidores del NCX como el KB-R7943 o el SN-6 hemos observado la abolición o la disminución de la SCW (Chifflet et al., 2012) (Figura 1.12). Asimismo, la inhibición de la onda de sodio o la SCW utilizando las drogas antes

mencionadas provocan una disminución de la velocidad de cicatrización entre el 60 y 80% (ibídem). En conjunto estos resultados sugieren que en condiciones fisiológicas la corriente de sodio generada por el ENaC es muy baja, permitiendo que el NCX funcione en sentido directo (Figura 1.13-A) (ibídem). Por otra parte, durante la cicatrización, en las células del borde de la herida incrementa la expresión del ENaC generando un aumento de la corriente de sodio, lo cual provoca un incremento de la concentración citosólica de este catión y la despolarización del potencial de membrana plasmática, ambos fenómenos inducen la función en sentido reverso del NCX provocando el incremento de la concentración de calcio citosólico característicos de la SCW (Figura 1.13-B) (ibídem). Parte de los resultados publicados en el artículo previamente citado fueron obtenidos en el marco de mis estudios de Doctorado y serán presentados en la sección de Resultados.

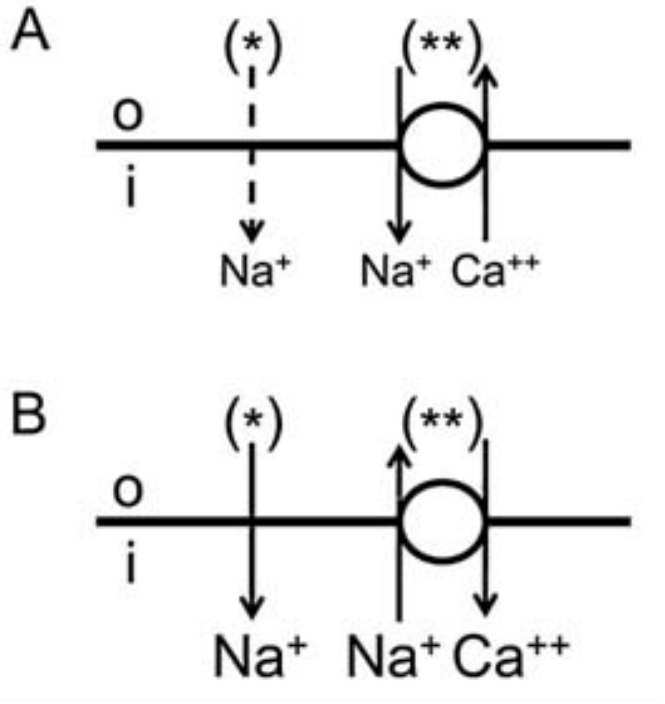


Figura 1.13. Modelo de acoplamiento de la onda de sodio y la onda lenta de calcio dependiente de la reversión del transporte de sodio y calcio. Propuesto por (Chifflet et al., 2012).

1.4. Muerte celular regulada.

Además de la migración y proliferación celular, durante la cicatrización ocurre muerte celular programada de algunas de las células que sobreviven al daño directo de la

herida. Con el fin de facilitar la comprensión de los resultados, en esta sección se describirán algunos aspectos generales de la muerte celular programada, en especial de la apoptosis. Se describirán con mayor profundidad varias características de la apoptosis caspasa dependiente e independiente necesarias para interpretar los resultados, pero no se realizará una revisión exhaustiva de todos los mecanismos de muerte celular programada porque excedería los objetivos de este texto.

1.4.1. Antecedentes históricos

La teoría de la "célula viva" postulada en 1838 fue la culminación del trabajo de varios científicos incluyendo Matthias Jakob Schleiden, Theodor Schwann y Rudolf Virchow que propusieron por primera vez que: 1) todos los organismos están compuestos de una o más células, 2) la célula es la unidad básica de la vida y 3) las células se generan a partir de células pre-existentes. La muerte celular fue descripta por primera vez dos décadas más tarde por Rudolf Virchow. En 1877 Carl Weigart describe las células necróticas durante la coagulación. En 1885 Walther Flemming observó un fenómeno de muerte celular fisiológica al cual denominó cromatolisis, y que décadas más tarde sería reconocido como apoptosis. Sin embargo, recién a mediados del siglo XX comenzó a forjarse en la comunidad científica la idea de que la muerte celular puede ser programada además de accidental.

A mediados de los años sesenta fue generado el concepto de muerte celular programada (PCD, "Programmed Cell Death") y se consolidó la idea de que existe muerte celular que puede ser provocada por componentes genéticos de forma fisiológica además de la muerte accidental (Lockshin and Williams, 1965) (Saunders, 1966). El término apoptosis para describir a la PCD fue acuñado recién en 1972 por Kerr y Currie, quienes describen este tipo de muerte en diferentes tipos celulares de variados organismos, casi un siglo después de la primera vez en que se documentara el fenómeno (Kerr et al., 1972). En su artículo, describen la apoptosis como el proceso durante el cual la célula se separa de las células vecinas, se redondea, disminuye el volumen, se produce condensación nuclear, fragmentación del núcleo y de la célula, y por último, los fragmentos celulares son fagocitados por células vecinas (ibídem). Posteriormente en 1990, Alders et al. observaron que la apoptosis estaba caracterizada por la fragmentación del ADN en las regiones inter-nucleosomales, estos estudios fueron

responsables en parte de que durante varios años la degradación del ADN fuese considerada necesaria y suficiente para diagnosticar la apoptosis (Arends et al., 1990), aunque actualmente se han reconocido eventos de apoptosis caracterizados por retardo o incluso ausencia de degradación del ADN (Zakeri et al., 1993).

Actualmente la idea dicotómica de necrosis versus apoptosis ha dado paso al descubrimiento de gran variedad de mecanismos de PCD interrelacionados como la apoptosis, anoikis, muerte celular dependiente de autofagia, necroptosis, piroptosis, parthanatos, entre otros, y esto ha requerido una formulación de la muerte celular más compleja (Galluzzi et al., 2018).

1.4.2. Conceptos y definiciones generales

Debido a la aparición de nuevas formas de muerte celular programada y a la enorme e intrincada complejidad de las vías moleculares que intervienen en estos procesos se han hecho grandes esfuerzos para uniformizar conceptos y definir criterios para el mejor estudio de los mecanismos que modulan la muerte celular. En este sentido, los editores de la revista Cell Death and Differentiation han conformado el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular (NCCD, "Nomenclature Committe on Cell Death") que ha reunido en varias ocasiones desde el año 2005 a investigadores destacados en la temática de muerte celular para generar revisiones y puestas en común de los conceptos centrales en la materia (Kroemer et al., 2005) (Kroemer et al., 2009) (Galluzzi et al., 2012) (Galluzzi et al., 2015) (Galluzzi et al., 2018). En esta sección se hará mención y uso de varias de estas definiciones y recomendaciones.

La muerte celular se caracteriza por la pérdida irreversible de las funciones celulares. Sin embargo, se han encontrado grandes dificultades para establecer el límite preciso en el que se hace imposible restablecer la homeostasis celular. Teniendo esto en cuenta el NCCD ha propuesto en 2005 definir a una célula como muerta cuando se cumplen alguno de los siguientes criterios (Kroemer et al., 2005):

1) Pérdida permanente de la integridad de la membrana plasmática, usualmente puesta en evidencia mediante el empleo de colorantes vitales.

2) Fragmentación celular en porciones discretas usualmente designadas "cuerpos apoptóticos".

3) Fagocitocis de la célula por parte de células fagocíticas profesionales o por otras células con dicha actividad.

Sin embargo, se ha observado que el hecho de que una célula fagocite a otra no implica necesariamente que el fagosoma formado se fusione con un lisosoma e incluso se ha encontrado en diferentes líneas celulares y en modelos de cáncer de mama que en ciertas circunstancias las células fagocitadas pueden llegar a ser liberadas del fagosoma conservando la viabilidad (Overholtzer et al., 2007) (Underhill and Goodridge, 2012) (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013). De este modo, la recomendación del NCCD hasta 2018 es considerar una célula muerta sólo cuando se evidencia alguno de los dos primeros eventos antes mencionados, pérdida de la integridad de la membrana plasmática o fragmentación en cuerpos apoptóticos (Galluzzi et al., 2015).

Habiendo establecido una forma de reconocimiento de la muerte celular es posible clasificar la muerte celular según sus características. La primera clasificación formal de la muerte celular fue de carácter morfológico y distinguía tres tipos de muerte celular (Schweichel and Merker, 1973) (Galluzzi et al., 2007):

1) Muerte celular tipo 1 (apoptosis), caracterizada por contracción del citoplasma, marginalización de la membrana nuclear, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación nuclear (cariorrexis), mínima alteración de organelos y formación de fragmentos celulares discretos recubiertos de membrana plasmática, denominados cuerpos apoptóticos.

2) Muerte celular tipo 2 (autofagia), caracterizada por vacuolización del citoplasma.

3) Muerte celular tipo 3 (necrosis), muerte accidental con incremento de volumen del citoplasma y organelos (oncósis), pérdida de la integridad de membrana plasmática y ausencia de las características observadas en la apoptosis y autofagia.

Sin embargo, actualmente se ha encontrado que existen varios otros tipos de muerte celular así como eventos de muerte celular donde aparecen características morfológicas de necrosis pero se trata de un proceso regulado, o incluso muerte celular con características morfológicas y moleculares tanto de apoptosis como de necrosis (Roach and Clarke, 2000) (Krysko et al., 2008) (Kroemer et al., 2009) (Vandenabeele et al., 2010).

En el paradigma actual propuesto por el NCCD en 2015, la muerte celular se divide en tres grandes conjuntos como se esquematiza en la Figura 1.14 (Galluzzi et al., 2015):

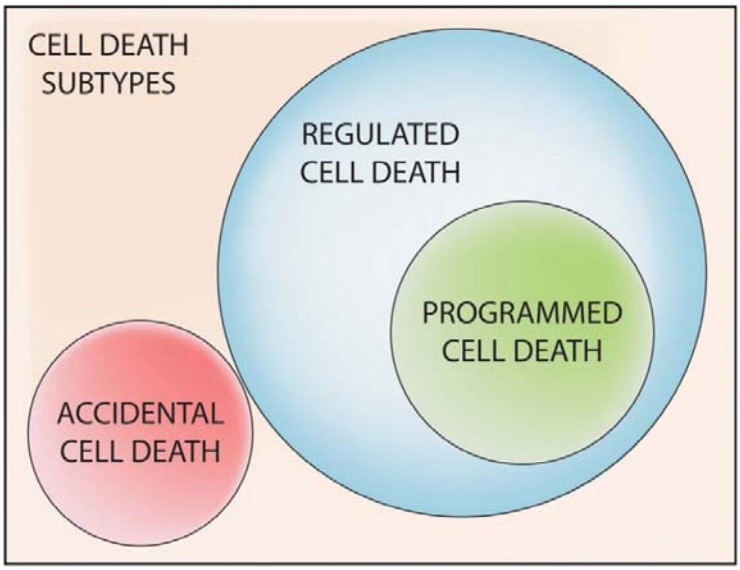


Figura 1.14. Diagrama de conjuntos para clasificar los diferentes tipos de muerte celular. Propuesto por (Galluzzi et al., 2015)

i) Muerte accidental ACD ("Accidental Cell Death"). La ACD es causada por una injuria severa, incluyendo diversos estímulos como daño físico (e.g., elevada presión o temperatura), químico (e.g., detergentes, variaciones extremas de pH) y mecánico. Se caracteriza por ser inmediata e insensible a modulación genética o intervenciones farmacológicas de cualquier tipo. En este tipo de muerte celular in situ, se puede producir una liberación de cantidades elevadas de moléculas con actividad moduladora de la inflamación y sistema inmune (DAMPs, "Damage-Associated Molecular Patterns"). En cantidades adecuadas los DAMPs son esenciales para la restitución tisular, tienen funciones importantes como señalizadores de daño, promueven la inflamación y el reclutamiento de células del sistema inmune, y desencadenan

respuestas complejas en células vecinas (Pandolfi et al., 2016). Sin embargo, en cantidades elevadas pueden tener efectos citotóxicos que propagan el daño del tejido, generando la muerte de otras células cercanas, frecuentemente de una forma regulada (Brenner et al., 2013).

ii) Muerte celular regulada RCD ("Regulated Cell Death"). Este tipo de muerte celular no es inmediata y puede ser prevenida o modulada hasta cierto punto por intervención de la maquinaria molecular que participa del proceso mediante farmacología o técnicas de biología molecular. La RCD puede ocurrir como consecuencia de la perturbación del microambiente celular, cuando los mecanismos de adaptación a respuestas de estrés fallan en restaurar la homeostasis celular, generando señales que eventualmente desencadenan un proceso de muerte modulada con la función de preservar la homeostasis de todo el organismo (o de la colonia en algunos tipos de levaduras). Un caso típico de RCD es la muerte que ocurre por el efecto citotóxico de la liberación de DAMPs a consecuencia de la muerte accidental o de un evento primario de RCD.

iii) Muerte celular programada PCD. Se trata de una RCD que ocurre en el contexto del desarrollo, en la homeostasis celular y la respuesta inmune, entre otras circunstancias fisiológicas.

En el transcurso de la RCD ocurren dos grandes etapas, la iniciación y la ejecución. El término ejecución se usa para designar al conjunto de procesos bioquímicos que efectivamente provocan la muerte celular (Galluzzi et al., 2015). El término iniciación se refiere al conjunto de señales que activan la maquinaria de ejecución (ibídem). Por ejemplo, se suele considerar que en la apoptosis mediada por ligando de FAS (apoptosis extrínseca, ver más adelante) la activación de la caspasa 8 es parte del proceso de iniciación, mientras que la consecuente activación de caspasa 3 se considera que forma parte de la ejecución de la muerte celular (ibídem). El NCCD recomienda que el término "iniciación" sea reservado para los eventos causantes de la muerte regulada que son reversibles, es decir que no conducen a la muerte celular en forma irrevocable (ibídem). Asimismo, el NCCD recomienda que el uso de la expresión "ejecución" se restrinja a los procesos que determinan la muerte irreversible de la célula y que el término "propagación" se utilice para describir los procesos que vinculan la RCD

primaria (dependiente del estímulo inicial), con la RCD secundaria, como por ejemplo, la muerte ocasionada por el efecto citotóxico de los DAMPs (ibídem).

El modelo más aceptado para explicar la RCD es el de "competición", el cual plantea la coexistencia de señales inhibitorias y promotoras de la muerte celular que compiten entre sí (Galluzzi et al., 2015). De acuerdo a este modelo, la RCD sobreviene cuando el nivel de señales promotoras de la muerte celular predomina sobre las inhibitorias (Figura 1.15) (ibídem).

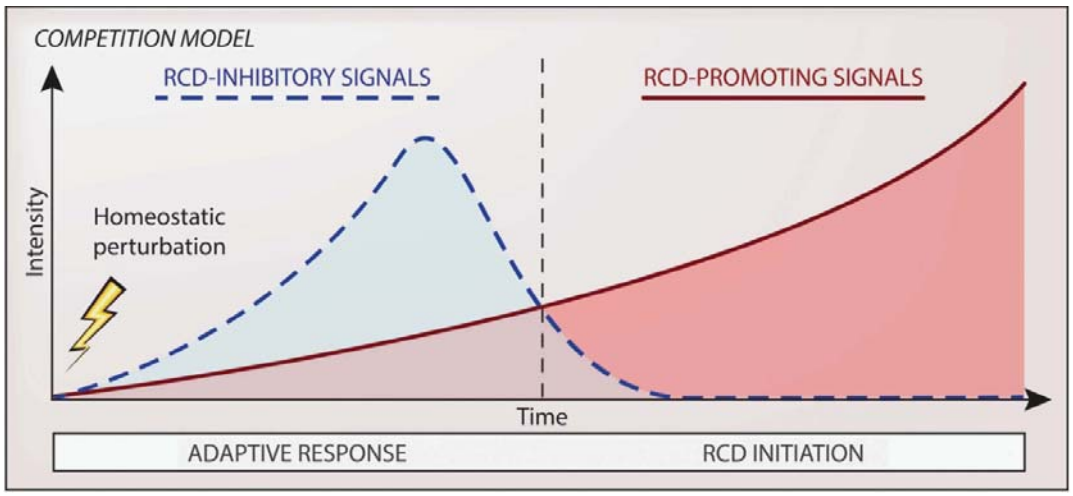


Figura 1.15. Modelo de competición para representar el modo en que las señales inhibitorias y promotoras de RCD interactúan para desencadenar la muerte celular. Propuesto por (Galluzzi et al., 2015)

Otro concepto que es muy usado en el contexto de la muerte celular es el "punto sin retorno". Se refiere a las condiciones celulares que una vez alcanzadas sellan el destino de muerte de la célula (Galluzzi et al., 2015). Sin embargo, a pesar de que pueda parecer un problema de simple solución no ha sido posible hasta la fecha definir con precisión las bases moleculares del fenómeno, en particular en modelos de mamíferos (ibídem). En este sentido, en diferentes modelos celulares que alcanzan a presentar manifestaciones bioquímicas y morfológicas asociadas a etapas tardías de la RCD, como la permeabilización de la membrana mitocondrial interna, la activación de caspasa 3 o la formación de "blebs" de membrana, se ha encontrado que la eliminación del estímulo de muerte inicial permite que las células se recuperen a un estado homeostático con potencial replicativo, un proceso que se ha denominado anastasis (Tang et al., 2012)

(Tang et al., 2015a). Esto sugiere que en cierto grado y dependiendo del contexto, los fenómenos característicos de la etapa de ejecución como la activación de proteasas y DNAsas pueden consolidar el punto sin retorno aunque no lo determinen por sí mismo. De este modo se mantiene la interrogante de cuáles factores determinan el punto sin retorno.

Aunque las diferentes ediciones del NCCD han formulado definiciones en su mayoría morfológicas para los conceptos más generales como la definición de muerte celular, en las sucesivas revisiones de la NCCD se ha insistido en un enfoque bioquímico como forma de definición de los distintos tipos de muerte celular, algunos de los cuales serán mencionados más adelante (Galluzzi et al., 2012).

Una revisión exhaustiva sobre todos los tipos de muerte celular excede los objetivos de este texto. Considerando la relevancia para este trabajo, se describirán con mayor profundidad varios aspectos del tipo más estudiado de RCD, la apoptosis, así como algunos tipos de apoptosis menos frecuentes.

1.4.3. Apoptosis

La apoptosis es un tipo de RCD que durante muchos años fue considerada como la única forma de PCD en oposición a la ACD o necrosis. En la célula que muere por apoptosis se ejecuta un complejo programa molecular de demolición controlada, donde se hidrolizan tanto proteínas como ADN y se fragmenta la célula en porciones discretas denominadas cuerpos apoptóticos, mientras se evita la liberación descontrolada del contenido citoplásmico al medio extracelular. La apoptosis tiene un rol crítico en el desarrollo embrionario, la regulación del sistema inmune y la homeostasis celular. Como se mencionó anteriormente, las formas de definir la muerte celular han ido cambiando. La recomendación del NCCD en 2005 hacía énfasis en el aspecto morfológico para la definición general de la apoptosis (Kroemer et al., 2005). En dicha revisión se define apoptosis como la muerte de una célula en la que se producen las siguientes manifestaciones morfológicas: redondeo de la célula, retracción de seudópodos, reducción del volumen, condensación de la cromatina (picnosis), fragmentación nuclear (cariorrexis), escasa modificación ultraestructural de organelos citoplásmicos, formación de protuberancias de la membrana plasmática en forma de

ampolla o "blebbing" (por el término en inglés) y mantenimiento de la integridad de dicha membrana (ibídem). En condiciones in situ el proceso de apoptosis clásico incluye la señalización de los cuerpos apoptóticos para su fagocitosis y eliminación por células especializadas como los macrófagos o incluso por células vecinas que adquieren actividad fagocítica (Green et al., 2016). Sin embargo, ha habido una tendencia importante para tratar de definir los diferentes tipos de apoptosis en términos bioquímicos, en especial en vista de que existen RCD con características mixtas (Galluzzi et al., 2018). Por otra parte, históricamente se han utilizado clasificaciones de la apoptosis de acuerdo a diferentes aspectos moleculares de interés como por ejemplo una clasificación según las proteasas que intervienen (apoptosis caspasa dependiente o independiente), o según el estímulo de iniciación (apoptosis extrínseca o intrínseca).

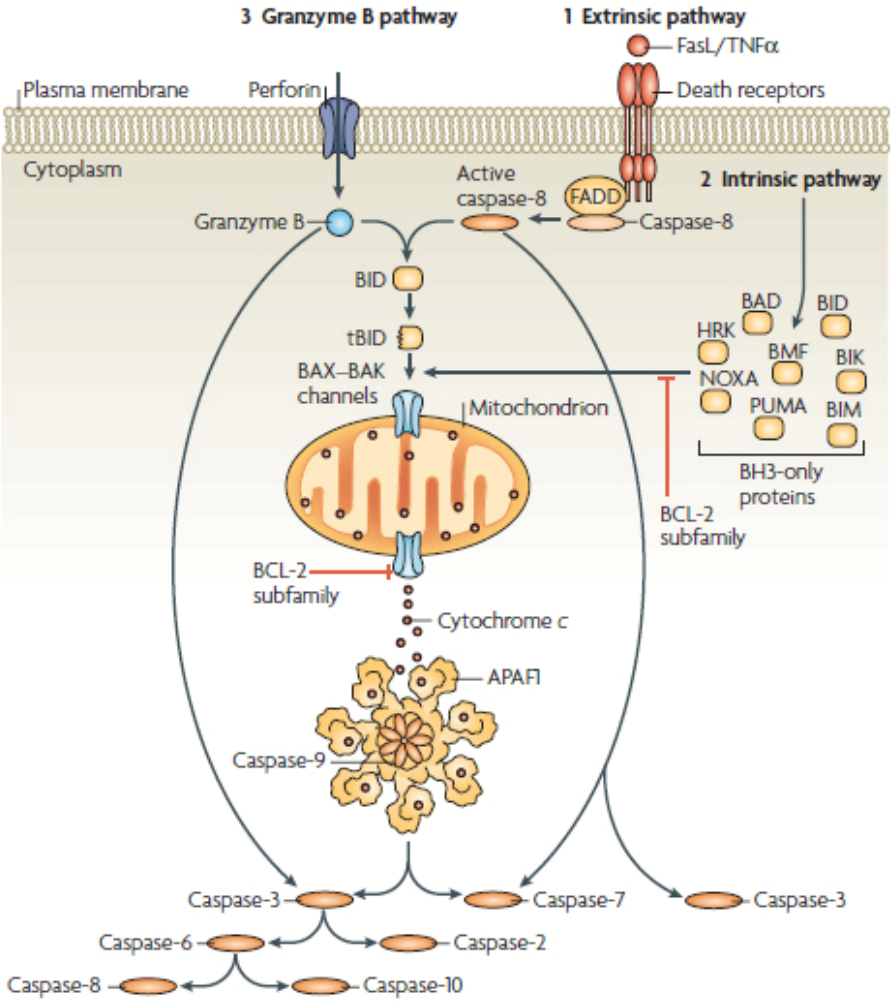


Figura 1.16. Esquema de los mecanismos moleculares que median la apoptosis extrínseca (1) e intrínseca (2). Extraído de (Taylor et al., 2008)

Apoptosis intrínseca

La apoptosis intrínseca es una forma de RCD iniciada por una variedad de perturbaciones del microambiente que incluyen falta de factores de crecimiento, daño de DNA, estrés del retículo endoplásmico, sobrecarga de especies reactivas de oxígeno, alteraciones del citoesqueleto o defectos mitóticos, entre otras (Figura 1.16) (Galluzzi et al., 2018).

El paso crítico de la apoptosis intrínseca es la permeabilización generalizada e irreversible de la membrana mitocondrial externa (MOMP, "Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization") (Tait and Green, 2010). Este proceso es regulado por un conjunto de proteínas pro y anti apoptóticas pertenecientes a la familia de proteínas reguladoras de apoptosis BCL2 (Moldoveanu et al., 2014). Tres miembros de esta familia de proteínas, BAX, BAK y BOK, son capaces de formar un poro en la membrana mitocondrial externa ante estímulos iniciadores de la apoptosis (Czabotar et al., 2014). Otras proteínas de la familia BCL2 modulan la formación del poro activándolo, en respuesta a diferentes perturbaciones de la homeostasis celular, en forma directa o indirecta (BIM, BID, BMF, BAD, HRK, PUMA y Noxa), o inhibiéndolo (BCL2, BCL-XL, MCL1 y BCL2L2) (ibídem).

La MOMP permite la difusión al citosol de varios factores apoptóticos que en condiciones homeostáticas residen en el espacio intermembrana de la mitocondria. Estas proteínas mitocondriales incluyen al citocromo C (CitC), que en las mitocondrias intactas actúa como transportador de electrones en la cadena respiratoria y a la proteína SMAC/DIABLO que antagoniza los proteínas inhibidoras de apoptosis (IAPs, "Inhibitor of Apoptosis Protein") que tienen actividad ubiquitin-ligasa marcando proteínas pro-apoptóticas como las caspasas ejecutoras para su degradación en el proteosoma (Li et al., 1997) (Chai et al., 2000).

En el citosol, el CitC interacciona con un conjunto de proteínas para formar la plataforma molecular denominada apoptosoma, que incluye el factor activador de proteasas de la apoptosis 1 (APAF1, "Apoptosis Proteases - Activating Factor - 1") y que es capaz de unir y activar procaspasa 9 (Figura 1.17) En ausencia del estímulo pro-

apoptótico adecuado APAF1 se encuentra en estado monomérico inactivo unido a dATP. La unión del CitC al dominio C-terminal de APAF1 induce la hidrólisis del dATP que provee de la energía para el cambio a la conformación abierta de APAF1. A continuación un complejo proteico factor intercambiador de nucléotidos facilita el recambio del dADP por nuevo dATP lo que permite la exposición del dominio NBD ("Nucleotide Binding Domain"). Esta sucesión de cambios conformacionales activan APAF1 que se oligomeriza en un complejo heptamérico con forma de rueda de carro, con los dominios CARD ("Caspase activation and recruitment domain") agrupados en el centro (ibídem). Una vez formado el apoptosoma, une y activa la procaspasa 9. La asociación con el apoptosoma conduce a la activación estable de la caspas 9 que une y activa las caspasas ejecutoras 3 y 7 (Riedl and Salvesen, 2007) (Li et al., 2017).

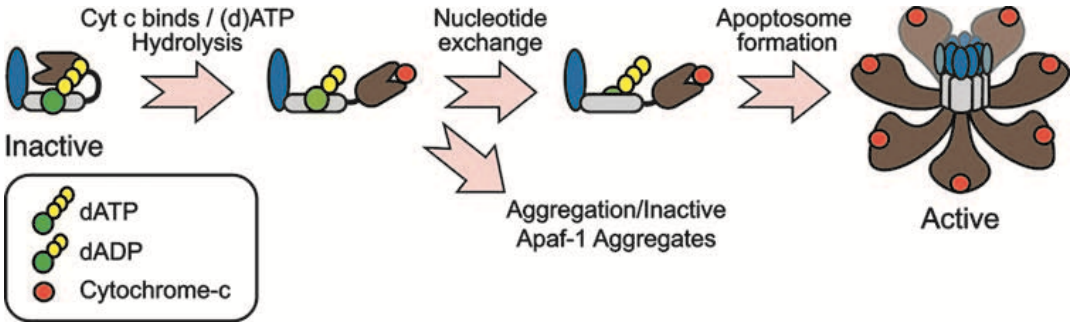


Figura 1.17. Formación del apoptosoma a partir de Apaf1 mediada por su interacción con el Citocromo C y ATP. La unión con el citocromo C causa la hidrólisis del dATP/ATP en dADP/ADP generando un cambio conformacional de Apaf1 a la forma abierta. Si se produce intercambio del dinucleótido por un nuevo trinucleótido Apaf1 se oligomeriza formando el apoptosoma activo. Si no se produce el intercambio de nucleótidos se genera una oligomerización no funcional. Extraído de (Wu and Bratton, 2013).

Apoptosis extrínseca

La apoptosis extrínseca es una modalidad de RCD iniciada por perturbaciones provenientes del ambiente extracelular. Este tipo de muerte celular está modulado principalmente por dos clases de receptores de membrana plasmática: 1) receptores de muerte celular, cuya activación depende de la unión a su ligando y 2) receptores de dependencia, cuya activación ocurre cuando el nivel de su ligando específico desciende por debajo de un determinado umbral (Aggarwal et al., 2012) (Gibert and Mehlen, 2015).

Los receptores de muerte son proteínas transmembranarias pertenecientes a la superfamilia de receptores TNF ("Tumor Necrosis Factor"), cada uno de los cuales cuenta con un ligando específico cuya unión desencadena la señal de muerte celular (Huang et al., 2015). Entre estos se incluyen el ligando de FAS (FASL) y su receptor (FAS o FASR, "First Apoptosis Signal Receptor"); el TNF y su receptor (TNFR1 o TNFSF1A) y el ligando inductor de apoptosis relacionado a TNF (TRAIL, "TNF-Related Apoptosis Inducing Ligand") y sus receptores (TRAILR1 o TNFSF10A y TRAILR2 o TNFSF10B) (ibídem). La activación de estos receptores conduce al ensamblaje sobre el dominio citosólico del receptor, de un complejo multiproteico dinámico que media la activación de la procaspasa 8 y en ocasiones de la procaspasa 10, denominado complejo de señalización inductor de muerte celular (DISC, "Death-Inducing Signaling Complex") (Yang, 2015).

La activación autocatalítica de la caspasa 8 depende de la oligomerización en las plataformas moleculares DISC. Una vez activada la caspasa iniciadora la ejecución de la apoptosis puede ocurrir siguiendo dos vías de señalización diferentes de acuerdo al rol de la mitocondria y de las proteínas de la familia BCL2.

De este modo, en algunas células, la apoptosis extrínseca se desarrolla sin necesidad de que ocurra la MOMP (e.g. timocitos y linfocitos maduros), a través de la activación de las caspasas ejecutoras 3 y 7 en forma directa por la caspasa 8 (Ozoren and El-Deiry, 2002) (Hao and Mak, 2010). Por otro lado, en otras células la activación de las caspasas ejecutoras se ve reducida por la actividad ubiquitin-ligasa de las IAPs (e.g., hepatocitos, células beta pancreáticas y la mayoría de las células cancerígenas), por lo que en este tipo de RCD se requiere de una cascada adicional de señales (Scaffidi et al., 1999). En dichas células la caspasa 8 escinde proteolíticamente a BID generando la forma truncada de BID (tBID) que es activa y se transloca a la membrana mitocondrial externa donde promueve la MOMP en forma dependiente de BAX/BAK. En este tipo de apoptosis extrínseca la ejecución es modulable por intervención genética de proteínas de la familia BCL2 y proteínas que intervienen en la MOMP. Esta ocasiona la liberación ya mencionada de proteínas del espacio intermembrana al citosol, que median la formación del apoptosoma e inhiben a las IAPs (como SMAC/DIABLO), así como otras proteínas con función ejecutora directa que pueden conducir a la degradación del

DNA y activación de proteasas, facilitando la RCD aún en condiciones con baja actividad de caspasa 3 y 7 (ibídem).

1.4.4. Apoptosis caspasa dependiente e independiente

Durante la RCD se requiere de la actividad de proteasas como parte de los mecanismos de desencadenamiento del proceso y la demolición celular. Las proteasas son enzimas con la capacidad de hidrolizar enlaces peptídicos que se clasifican fundamentalmente en dos grandes grupos, exopeptidasas y endopeptidasas, según si el enlace hidrolizado está en los extremos del polipéptido (carboxi y aminopeptidasas) o si se hidroliza un enlace interno de la cadena, respectivamente. Una clasificación más exhaustiva se basa en el mecanismo de catálisis, y se destacan las cisteína, treonina, serina, metalo, aspartato y glutamato proteasas (Moffitt et al., 2010).

La apoptosis es sin duda el tipo de RCD que más interés ha suscitado entre la comunidad científica. En este sentido las caspasas son las proteasas protagonistas en muchos de los escenarios de muerte celular, sin embargo la apoptosis puede ocurrir sin su intervención. De este modo, la apoptosis puede ser dividida también según si ocurre en forma dependiente o independiente de caspasas. En esta sección, se hará una mención a proteasas que pueden intervenir en los procesos de RCD, en especial en la apoptosis.

Caspasas

Las caspasas son una familia de cisteína proteasas cuyos miembros participan de la propagación de señales y ejecución de procesos inflamatorios o en la RCD. Su activación es fundamental en la apoptosis caspasa dependiente (Ramirez and Salvesen, 2018). Estas enzimas catalizan la hidrólisis de enlaces peptídicos contiguos a residuos de aspartato mediante un ataque nucleofílico por un residuo de cisteína y de allí deriva su nombre ("cysteine-dependent aspartate-specific proteases") (ibídem). Las caspasas se dividen en dos grandes grupos, las caspasas apoptóticas (2, 3, 6, 7, 8, 9 y 10) y las inflamatorias (1, 4, 5, 11, 12 y 13) y a su turno las primeras se dividen en iniciadoras (2, 8, 9 y 10) o ejecutoras (3, 6 y 7) (ibídem). La caspasa 14 no es considerada ni apoptótica

ni inflamatoria y parece tener una función altamente especializada en el proceso de queratinización de la piel (Denecker et al., 2008).

Estas proteasas son sintetizadas como zimógenos inactivos monoméricos denominados procaspasas, que constan de tres dominios: un prodominio que puede incluir motivos de unión a complejos moleculares y dos subunidades catalíticas una grande y otra pequeña (Figura 1.18).

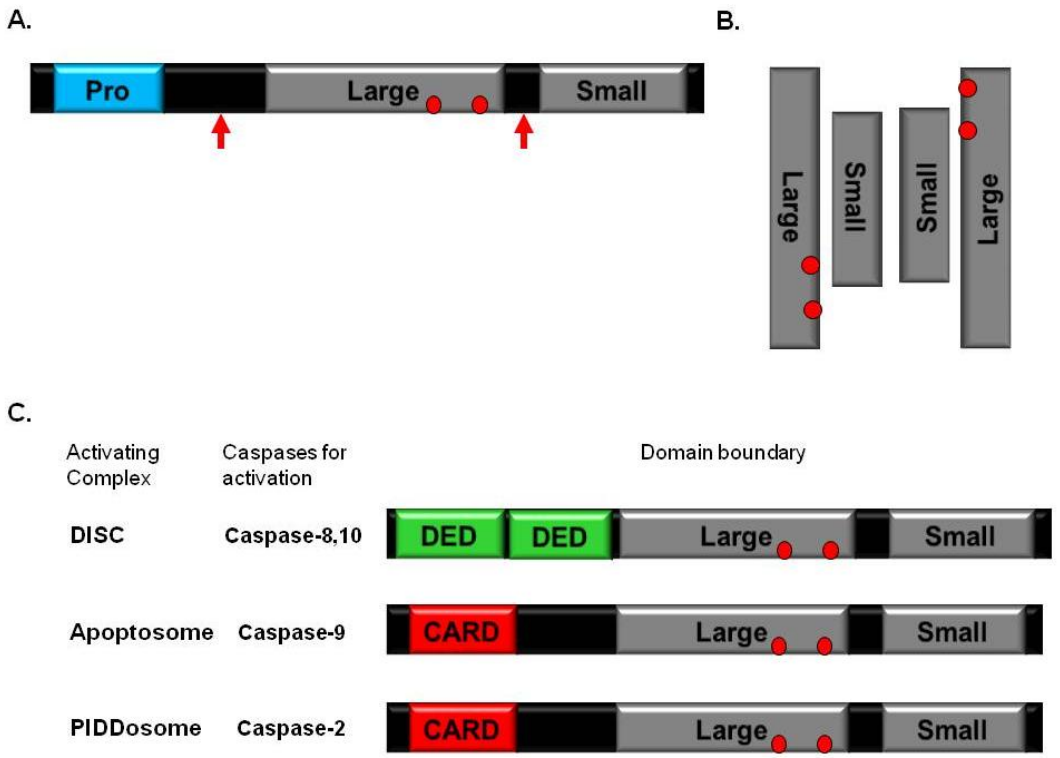


Figura 1.18. Esquema de estructura de procaspasas iniciadoras y ejecutoras. A) Procaspasa ejecutora. B) Caspasa ejecutora activa, los círculos rojos simbolizan los sitios activos. C) Procaspasas iniciadoras. Extraído de (Park, 2012).

Las formas completamente activas son diméricas y requieren de la escisión del prodominio y la hidrólisis del segmento bisagra que separa la subunidad mayor de la menor. El prodominio de las caspasas ejecutoras es muy pequeño, carece de motivos de muerte celular aunque es importante para mantener la procaspasa completamente inactiva a través de su interacción con la proteína de shock térmico HSP27 (Meergans et al., 2000) (Voss et al., 2007). Los prodominios de las caspasas iniciadoras son más largos y tienen motivos conservados de interacción homotípica entre proteínas,

pertenecientes a la superfamilia de dominios de muerte (DD "Death Domain") (Park et al., 2007). Su función es servir de adaptador entre proteínas mediante interacción de dominios homologos (Park, 2012).

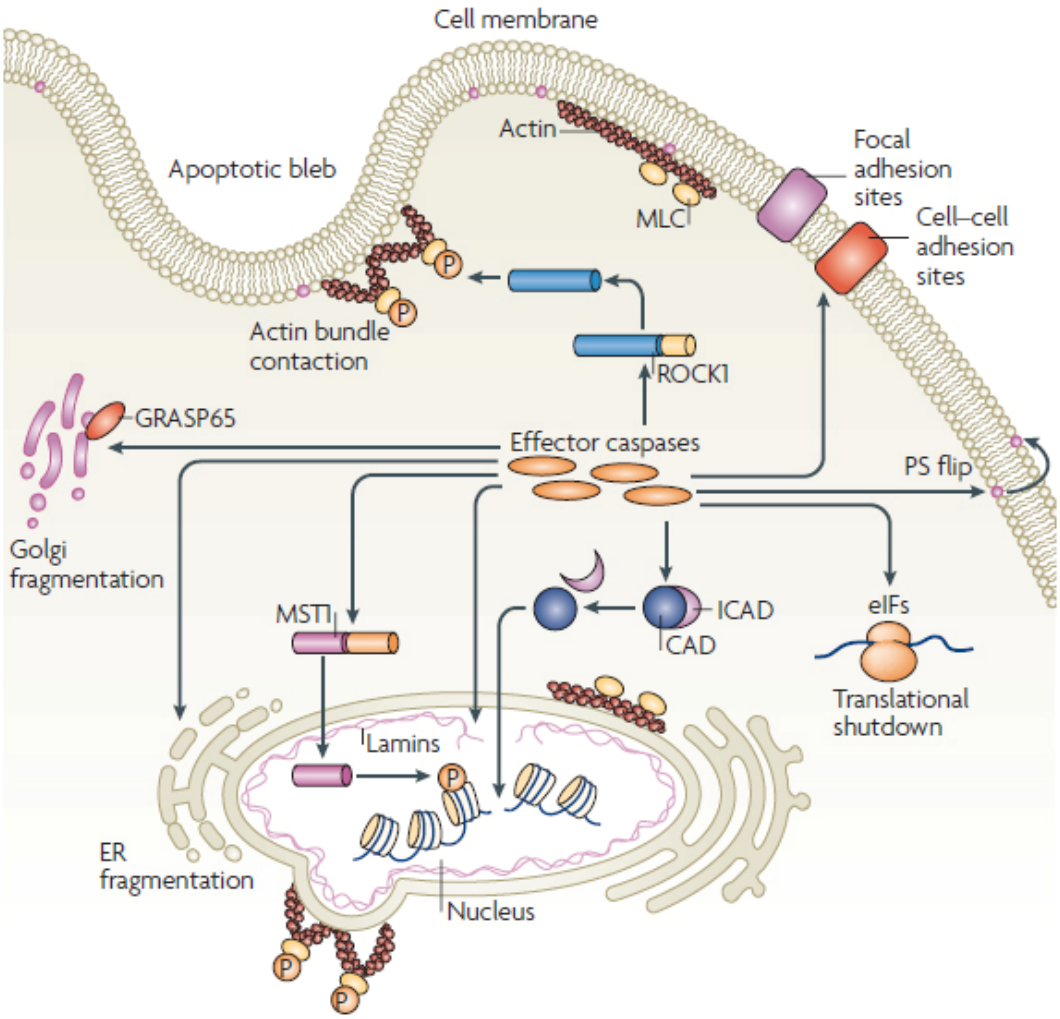


Figura 1.19. Resumen de la acción de las caspasas ejecutoras durante la "demolición controlada" de la apoptosis. Se describe en el texto (Taylor et al., 2008).

Durante el proceso de RCD, sólo una fracción de todo el proteoma celular es hidrolizado por las caspasas ejecutoras, se estima que en el orden de 200 cadenas polipeptídicas (Nicholson, 1999). Los sustratos de mayor afinidad corresponden fundamentalmente a proteínas que intervienen en procesos que definen la RCD así como aquellas proteínas que podrían revertir o reparar los efectos de la maquinaria de ejecución. Por ejemplo, uno de los sustratos de mayor afinidad de las caspasas es ICAD, proteína inhibidora de la DNAsa activada por caspasas (CAD, "Caspase Activated

DNAse"), cuya degradación permite la traslocación de CAD desde el citosol al núcleo (Larsen and Sorensen, 2017). Asimismo, otro sustrato muy importante para las caspasas es una proteína de reparación del DNA denominada PARP1 (poly (ADP-ribose) polymerase-1), cuya degradación evita la reparación del ácido nucleico (Pascal, 2018). De este modo, las caspasas ejecutoras median el inicio de la degradación del DNA al mismo tiempo que inhiben su reparación evitando el consumo innecesario de ATP que es crucial en el proceso de la RCD. Los efectos acumulativos de la hidrólisis catalizada por las caspasas son: a) la inhabilitación de los procesos de reparación y de mantenimiento de la homeostasis celular, b) la interrupción de la progresión del ciclo celular, c) la inactivación de los inhibidores de apoptosis, d) la mediación del desensamble estructural y morfológico (degradación del citoesqueleto y fragmentación de la membrana nuclear), y e) el marcado de la célula para fagocitosis (Figura 1.19) (Taylor et al., 2008).

Otras proteasas que intervienen en la muerte celular

Además de las caspasas muchas otras proteasas pueden modular la RCD, entre las que se destacan las calpaínas, catepsinas, granzimas y serina proteasas tanto citosólicas como mitocondriales.

Las calpaínas son cisteína-proteasas dependientes de calcio, existen 15 miembros de esta familia de endopeptidasas de los cuales 14 son subunidades grandes y una es pequeña. Las calpaínas 1 y 2 son conocidas como μ y m-calpaína respectivamente en referencia al rango de concentraciones de calcio que se requiere in vitro para su activación, aunque resultados in situ muestran que estos requerimientos pueden ser menores como consecuencia de otros mecanismos regulatorios (Curcio et al., 2016). Los sustratos de las calpaínas son muy variados y estas proteasas participan de una gran variedad de procesos celulares como proliferación, diferenciación, envejecimiento y muerte celular (Lopatniuk and Witkowski, 2011). La relación de las calpaínas con la RCD y las caspasas es compleja. Ambos grupos de proteasas son sustratos mutuos y al mismo tiempo muchos de los sustratos de las caspasas son compartidos por las calpaínas (ibídem). En diversos modelos sus funciones se superponen o se contraponen según el tipo celular y el estímulo. Las calpaínas pueden promover la muerte celular al escindir a BID en una forma similar a tBID con idéntica actividad (Mandic et al., 2002).

Asimismo, se ha encontrado en varios modelos que las calpaínas pueden escindir a la proteína nativa BAX de 20 kDa en una forma truncada de 18 kDa que carece de la capacidad de interaccionar con las proteínas anti-apoptóticas BCL2 y BCL-X_L, de modo tal que se promueve la MOMP (Cao et al., 2003) (Altznauer et al., 2004). Por otra parte, en otros sistemas las calpaínas pueden tener un rol de inhibición de la apoptosis al mediar la hidrólisis e inactivación de las caspasas 7, 8 y 9, o al degradar el inhibidor de NF-κB (IκB) que permite la traslocación nuclear de dicho factor de transcripción que activa varios genes relacionados a la sobrevivencia celular (Demarchi et al., 2005) (Wang et al., 2012).

Otras proteasas involucradas en la modulación de la RCD son las catepsinas. Estas endopeptidasas poseen variados mecanismos de catálisis y son activadas al alcanzar el ambiente ácido de la luz lisosomal. Su participación en la muerte celular requiere de la salida de estas enzimas al citosol, debido a la permeabilización de la membrana lisosomal (LMP, "Lysosome Membrane Permeabilization") en forma parcial o completa. La LMP puede ser provocada por diversos estímulos como la producción de ROS tanto en la luz lisosomal, como consecuencia de la oxidación generada por acumulación de hierro o fuentes de ROS externas (Boya and Kroemer, 2008). También son causantes de LMP la activación de la fosfolipasa A2 (PLA, "Phospholipase A2") que media la degradación progresiva de los fosfolípidos de membrana, la acción detergente mediada por la acumulación de esfingosina, la formación de poros por BAX o la acción directa e indirecta de proteasas como caspasas, calpaínas o las propias catepsinas desde el citosol (Johansson et al., 2010). Esta LMP puede ser parcial, no comprometiendo la integridad de la membrana ni el gradiente de pH (Bidere et al., 2003) (Oberle et al., 2010). Una vez libres en el citosol, las catepsinas regulan la muerte celular de formas variadas. En algunos modelos, las catepsinas B, D, H, K, L y S escinden a BID en una forma similar a tBID con la misma capacidad de mediar la MOMP (Heinrich et al., 2004) (Yacoub et al., 2008). Otro mecanismo de acción es la activación de la procaspasa 2 mediada por la catepsina B, que permite el desencadenamiento de la MOMP (Guicciardi et al., 2005). Asimismo, algunos trabajos sugieren que la catepsina B podría ser responsable de la hidrólisis de DNA en algunos modelos, en forma directa o indirecta a través de caspasas (Vancompernolle et al., 1998). Por otra parte, se ha encontrado en múltiples sistemas que las catepsinas B, D y L pueden activar las procaspasa 3 (Boya and Kroemer, 2008).

Las granzimas son otras endopeptidasas que pueden desencadenar la muerte celular sobre células infectadas por virus. La fusión mediada por receptor de las células infectadas con las células Natural Killer (NK) y los linfocitos T citotóxicos (CTL, "Cytotoxic T Lymphocytes") permite la difusión de granzimas en las células objetivo a través de perforinas, donde ejercen varios efectos promotores de la muerte celular (Moffitt et al., 2010). La granzima B es una serina proteasa cuya liberación en el citosol cataliza la hidrólisis de BID en tBID, proceso que desencadena la MOMP con la consecuente liberación de citocromo C y formación del apoptosoma (Hlongwane et al., 2018). Asimismo, induce la fragmentación del DNA mediante la degradación de ICAD y es capaz de activar por hidrolisis a varias procaspasas tanto iniciadoras como ejecutoras, e incluso se ha reportado que puede hidrolizar directamente sustratos de las caspasas como PARP1 y laminina B (Martinvalet, 2015). Asimismo, la granzima A también media la fragmentación del DNA por degradación directa de la histona H3 y H4, de la fosfoproteína nucleolar "nucleolina" y por hidrólisis del complejo SET asociado a retículo endoplásmico que permite la liberación de la DNasa activada por granzima A (GAAD, "Granzyme A-Activated DNase") (Lieberman and Fan, 2003) (Moffitt et al., 2010) (Lee et al., 2016). Finalmente, la granzima M es capaz de escindir ICAD liberando CAD y facilitando la fragmentación del DNA al tiempo que hidroliza directamente PARP1 para evitar la reparación del genoma (Lu et al., 2006) (de Poot and Bovenschen, 2014).

Además de las proteasas antes mencionadas también se ha encontrado que existen diversas serina proteasas que pueden participar en sistemas de apoptosis caspasa dependiente, independiente y otros tipos de RCD. Entre estas serina proteasas se incluyen las proteasas tipo tripsina como la trombina y EOS, tipo quimiotripsina, tipo elastasa como AP24 y otras como Omi/HtrA2 (Chen et al., 2003) (Egger et al., 2003) (Murn et al., 2004) (Yang et al., 2016) . Existe múltiple evidencia de la participación de varias proteasas tipo quimiotripsina en sistemas de RCD sin embargo, aún no se han logrado identificar pese a que se han realizado importantes esfuerzos (Moffitt et al., 2010).

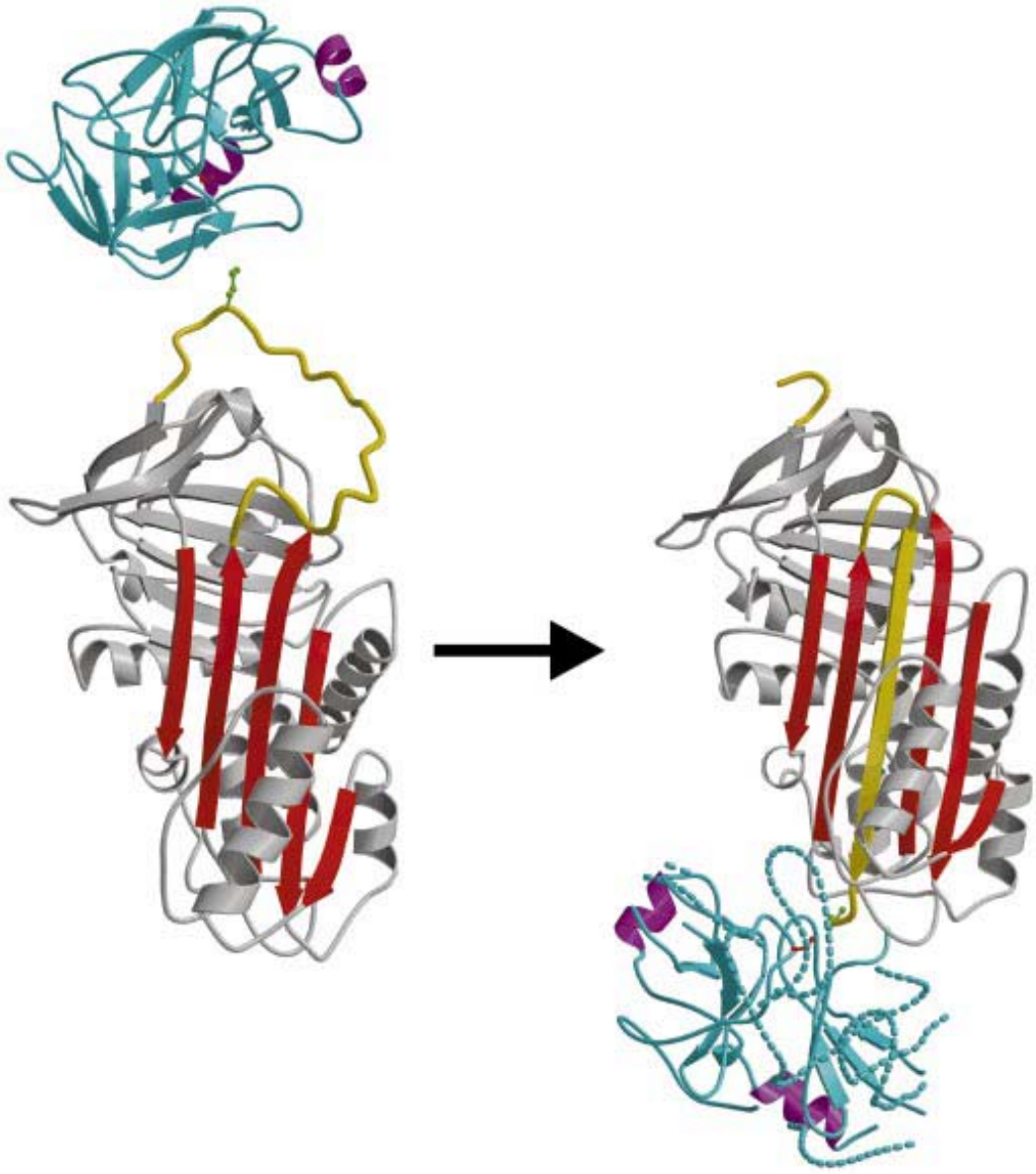


Figura 1.20. Formación del complejo entre la alfa1-antitripsina (gris, rojo y amarillo) y la tripsina (azul y violeta). La proteasa es atrapada por una interacción covalente con la serpina al escindir el bucle reactivo de la misma (amarillo). La hidrólisis de este enlace peptídico libera a la enzima que se encuentra en un estado metaestable provocando un cambio conformacional que determina la inserción del bucle reactivo en la estructura de laminas beta (rojo), la relocalización de la proteasa en el polo opuesto al inicial y su desnaturalización parcial (azul punteado). Extraído de (Huntington et al., 2000).

1.4.5. Rol del Inhibidor de la Elastasa Leucocitaria sobre la apoptosis.

En diversos sistemas biológicos se ha observado que pueden existir modalidades de apoptosis caspasa independiente donde interviene en forma protagonista una proteína

multifuncional denominada inhibidor de la elastasa leucocitaria (LEI, "Leucocyte Elastase Inhibitor"). La LEI, también denominada Serpina B1 pertenece al grupo B de la superfamilia de inhibidores de proteasas de serinas (serpinas, "Serine Protease Inhibitors"). Las serpinas son una superfamilia ampliamente distribuida en la evolución, todos los organismos eucariotas multicelulares cuentan con varios genes de diferentes serpinas (36 en el ser humano), mientras que la mayoría de los procariotas cuentan con un solo gen. La mayoría de las serpinas inhiben serina-proteasas sin embargo, existen varias serpinas capaces de inhibir cisteínas-proteasas como las caspasas o cisteín-proteasas tipo papaína.

Todas las serpinas inhibitorias poseen el mismo mecanismo de acción denominado "suicida" o de "único uso", donde la proteína actúa como inhibidor irreversible. Las serpinas nativas, se encuentran en una conformación metaestable de mayor nivel energético S y cuentan con uno o varios sitios de corte por las proteasas específicas ubicados en un bucle reactivo (Huntington et al., 2000). Cuando la proteasa escinde el enlace peptídico, queda unida covalentemente al bucle reactivo de la serpina y esta sufre una transición del estado estresado S al relajado R de menor energía, provocando la asociación de la proteasa en el otro extremo de la serpina. Esta transición establece un cambio conformacional sobre la proteasa desnaturalizándola y exponiendo secuencias de reconocimiento para otras endopeptidasas que la degradan. En la Figura 1.20 se observa una representación de cintas de una serpina arquetípica como la alfa-1-antitripsina en la configuración nativa y su configuración unida a la tripsina (ibídem).

El principal rol de la Serpina B1 (expresada en altos niveles en neutrófilos y granulocitos pero presente en diferentes concentraciones en todos los tejidos) es la protección celular mediante inhibición de las proteasas liberadas desde lisosomas y gránulos secretorios en condiciones de estrés (Benarafa et al., 2011). Otro rol, mucho menos conocido de esta proteína, aunque posiblemente no menos importante, se encuentra vinculado a modificaciones postraduccionales que le confieren actividad DNAsa II (Torriglia et al., 2017).

La primera evidencia de la actividad DNAsa II asociada a la Serpina B1 fue encontrada estudiando el proceso de diferenciación del cristalino, donde se observa un proceso de degeneración nuclear similar al observado durante la apoptosis (Torriglia et al., 1995).

Trabajos posteriores demostraron que la LEI puede ser escindida en una forma de menor tamaño como resultado de un tratamiento acídico o por acción de la elastasa (u otras proteasas) generando una proteína con función DNAsa II que se denominó L-DNAsa II para diferenciarla de otras nucleasas con actividad similar (Torriglia et al., 1998) (Altairac et al., 2003b). Para comprender el mecanismo de este proceso Torriglia y colaboradores realizaron estudios que demostraron que la transición estresado-relajado generada por el mecanismo de acción anti-proteasa "suicida" en la Serpina B1, conduce a la inserción del bucle del sitio reactivo en la lámina beta principal (como el observado para la alfa1-antitripsina en la Figura 1.20) (Padron-Barthe et al., 2007). Dicho cambio conformacional expone una zona en el polo del bucle reactivo con alto número de cargas positivas, necesarias para la interacción con las cargas negativas del DNA, y libera el residuo de His368 responsable del mecanismo de catálisis de la nucleasa (Figura 1.21). Asimismo, el bucle reactivo también enmascara una secuencia bipartita de localización nuclear (NLS), que permite una vez expuesto, la traslocación al núcleo de esta proteína (ibídem). En contrapartida de dicha secuencia, la L-DNAsa II posee también una secuencia de exportación nuclear (NES) cuya interacción con la exportina 1 permite su devolución al citosol favoreciendo la sobrevivencia celular (Lepretre et al., 2008).

Los cambios morfológicos a nivel nuclear observados durante la diferenciación del cristalino son indistinguibles de los observados durante una apoptosis caspasa dependiente clásica. Esto llevó al estudio de la L-DNAsa II en el contexto de la muerte celular. En publicaciones posteriores, Torriglia y colaboradores han encontrado que en extractos nucleares in vitro de diferentes tejidos la L-DNAsa II provoca el proceso de picnosis característico de la formación de cuerpos apoptóticos y se observa degradación del DNA en fragmentos oligonucleosomales que generan un patrón de "laddering" en Southern blot (Torriglia et al., 1998). Es importante destacar que, en virtud de que la hidrólisis del DNA catalizada por la DNAsa II produce fragmentos con extremos 3'-fosfato (a diferencia de la DNAsa I que produce extremos 3'-OH), este tipo de apoptosis es negativa para el ensayo TUNEL (Bourges et al., 2004). Asimismo, se ha evidenciado la traslocación de la L-DNAsa II desde el citosol al núcleo en modelos como la RCD inducida por 5-(N,N-hexamethylene)amiloride en células BHK y en transplantes de córnea en rata (Altairac et al., 2003b) (Bourges et al., 2004). Por otra parte, se ha constatado que la L-DNAsa II, una vez en el núcleo, es capaz de catalizar la

fragmentación del DNA en apoptosis de células en cultivo, en condiciones patológicas (como la degeneración retiniana inducida por luz) o incluso en condiciones fisiológicas (en células neuronales durante el desarrollo de la retina) (Torriglia et al., 2001) (Altairac et al., 2003a) (Torriglia et al., 2016). En la mayoría de los casos la activación de esta vía depende del estrés metabólico y no de daño genotóxico. Dicha vía suele activarse en células altamente diferenciadas o en células tumorales en las que se encuentran inhibidas las vías de apoptosis caspasa dependiente (ibídem). En todos estos sistemas biológicos se han observado diferentes proteasas responsables de la transformación de la LEI en L-DNAsa II, estas incluyen la elastasa intracelular, catepsina D, AP24 y otras proteasas de serina (Belmokhtar et al., 2000) (Altairac et al., 2003a) (Chahory et al., 2010).

1.4.6. Muerte celular regulada durante la cicatrización

Existe evidencia de que la RCD puede estar involucrada en diferentes etapas de la cicatrización. Se han encontrado señales de apoptosis desde tan temprano como 2 horas luego de realizada la herida en piel de ratón hasta etapas finales en la resolución de la cicatrización, donde se produce remodelación del tejido (Abe et al., 2012) (Tan et al., 2013) (Wu and Chen, 2014).

Existen varias evidencias in situ, que sugieren que un rol fundamental de la apoptosis es la eliminación de diferentes poblaciones celulares una vez que estas cumplen con su objetivo y ya no son necesarias, en especial las células vinculadas al proceso inflamatorio como neutrófilos y macrófagos (Greenhalgh, 1998) (Wu and Chen, 2014).

A fines de la década de los noventa, Brown y colaboradores encontraron que se produce apoptosis durante la cicatrización de piel de ratón, puesta en evidencia mediante marcado con dUTP de extremos de DNA, por reacción enzimática de transferasa terminal (TUNEL, Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling) (Brown et al., 1997). Sus resultados sugieren que existe una correlación positiva entre el nivel de apoptosis y la tasa de re-epitelización, que se mantiene incluso en modelos de cicatrización en piel de ratón diabético. En estos ratones se observa disminución de la tasa de cierre de la herida acompañada de una disminución del nivel

de apoptosis, que puede ser recuperada en forma parcial por incubación con la combinación de factores de crecimiento IGF-II y PDGF (ibídem).

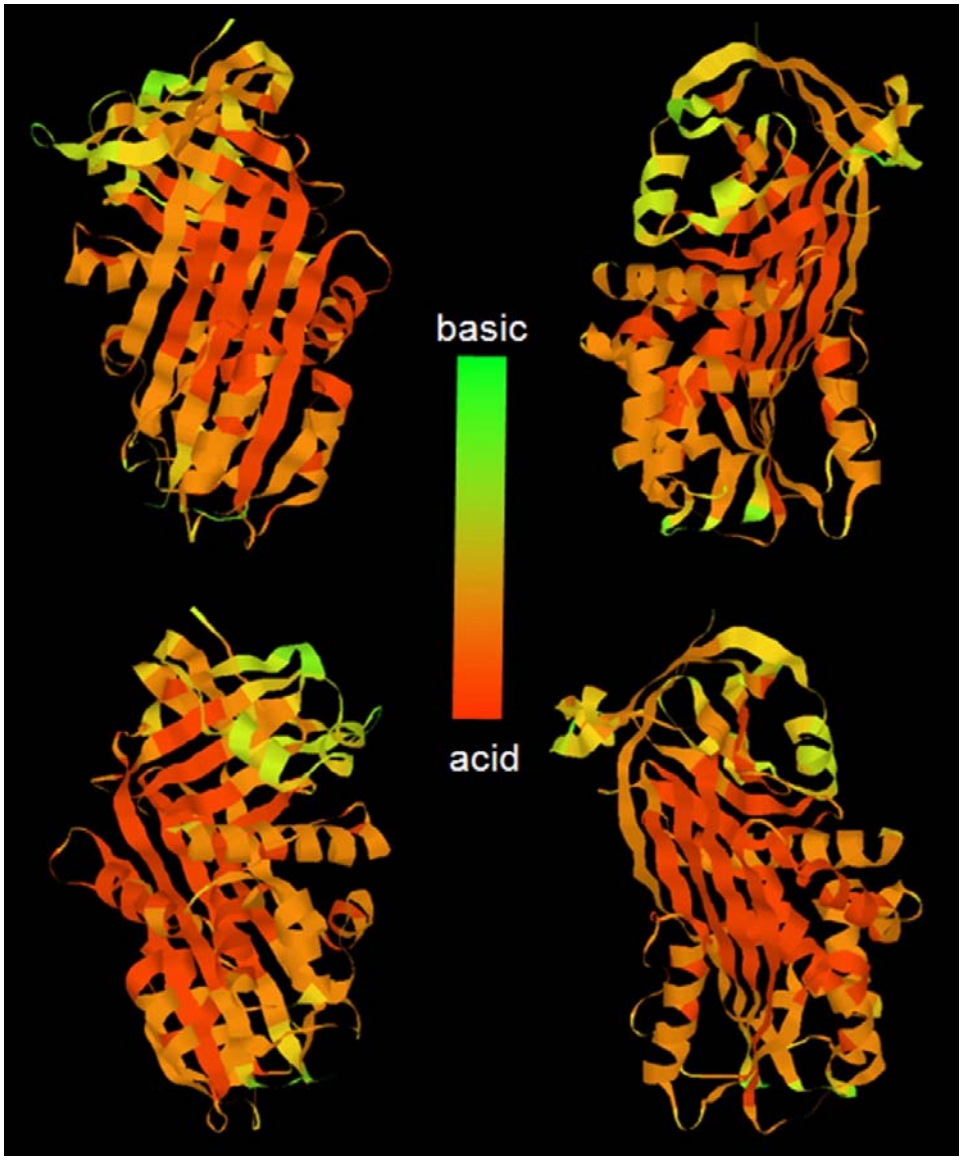


Figura 1.21. Estructura molecular de la LEI escindida por la elastasa. Cuatro visiones diferentes de la misma molécula, los colores corresponden a la carga de la molécula. Se observa una zona básica en el polo superior de la molécula. Extraído de (Torriglia et al., 2017).

Asimismo, el grupo de Li y colaboradores ha encontrado que durante la cicatrización y regeneración en el ratón, la muerte celular regulada es esencial para la proliferación. Sus resultados sugieren que durante la cicatrización de la piel así como en la regeneración del hígado en el ratón, una subpoblación de células muere por apoptosis caspasa dependiente con activación de caspasa 3 y 7 (Li et al., 2010). Estas caspasas ejecutoras

activan la fosfolipasa A2 (PLA2) mediante escisión proteolítica que cataliza la liberación de ácido araquidónico de la membrana. Dicho ácido poli-insaturado es convertido en prostaglandina H2 por acción de la ciclooxigenasa 1 y 2, el cual es luego transformado en prostaglandina E2 (PGE2) por la PGE2 sintasa, siendo liberado al medio extracelular donde actúa como factor inductor de la proliferación (Figura 1.22) (ibídem).

Por otra parte, el estudio de la RCD durante la cicatrización por quemaduras es de gran relevancia médica debido a que durante las primeras 48 horas la hipoxia e isquemia pueden provocar mayor muerte celular que puede ser causante de la formación de cicatrices hipertróficas o incremento de la morbilidad por infección. Los estudios de Tran y colaboradores en quemaduras de piel de rata revelan que en este modelo de cicatrización ocurren dos tipos de RCD, apoptosis y autofagia (Tan et al., 2013). Ambos tipos de muerte celular son detectables desde las dos horas de realizada la herida, sin embargo, la autofagia alcanza su máximo nivel a las 6 horas de la lesión para luego disminuir, mientras que el nivel de apoptosis incrementa progresivamente hasta por lo menos las 48 horas. Asimismo, sus estudios muestran que la expresión de las proteínas pro y anti apoptóticas BAX y BCL2, incrementan y disminuyen respectivamente en el tiempo luego de provocado el daño al tejido, sugiriendo que estas vías podrían estar afectadas en la RCD que ocurre durante la progresión de la cicatrización por quemaduras (ibídem).

En un esfuerzo por comprender mejor las vías de muerte celular que participan durante la cicatrización, el grupo de Song y colaboradores encontraron que tanto en epitelio de córnea de ratón in situ como en células de epitelio de córnea humano (HCEC) en cultivo se produce un incremento de la fosforilación de la proteína de shock térmico 27 (HSP27, "Heat Shock Protein 27") (Song et al., 2014). Los investigadores encontraron que el nivel de fosforilación de HSP27 en HCEC en cultivo incrementa hasta los 10 a 30 min luego de realizada la herida y disminuye a hasta su nivel basal después de transcurrida una hora. El silenciamiento de HSP27 en HCEC en cultivo provoca disminución del nivel de fosforilación de HSP27 así como de Akt/PKB (una quinasa que modula positivamente MCL1 inhibiendo la apoptosis dependiente de BAX), y un incremento de la expresión de BAX. Asimismo, el silenciamiento provoca una disminución de la migración y un incremento de la apoptosis significativos durante la

cicatrización, pero a diferencia del modelo estudiado por Li y colaboradores este incremento de apoptosis no se acompaña de cambios en el nivel de proliferación (ibídem).

Si bien en varios trabajos se describe la RCD durante la cicatrización, así como algunos componentes de las vías moleculares que intervienen en su ejecución, existe escasa información acerca de las señales que desencadenan la muerte en estas condiciones. Es posible que una señal tan temprana como la FCW module la RCD, sin embargo, hasta donde conocemos, ningún grupo de investigación ha evaluado el rol de la onda sobre la muerte celular durante la cicatrización.

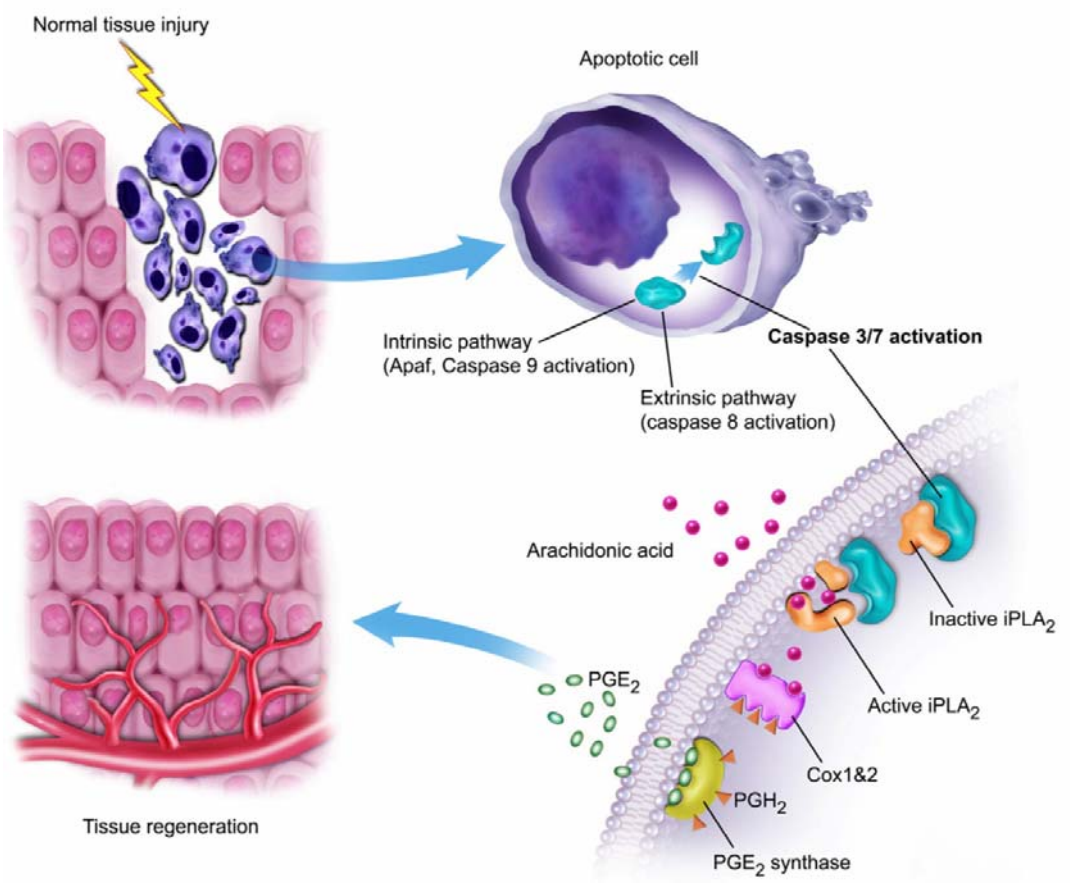


Figura 1.22. Representación esquemática de las vías de señalización activadas por las caspasas 3 y 7 durante la cicatrización de piel y regeneración de hígado en ratón. Extraído de (Li et al., 2010).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos generales

Profundizar el conocimiento sobre las vías de señalización que modulan la migración, proliferación y muerte celular regulada durante la cicatrización.

2.2. Objetivos específicos

1- Determinar el rol de la FCW sobre la migración, la onda de sodio y la onda lenta de calcio durante la cicatrización de células de BCE en cultivo.

2- Determinar si se produce muerte celular regulada durante la cicatrización de células de BCE en cultivo y qué características moleculares definen dicha muerte. Revelar el rol de la FCW sobre la RCD y la proliferación durante la cicatrización de células de BCE en cultivo.

3- Analizar los cambios temporales de expresión de la LEI durante la cicatrización.

4- Caracterizar las oscilaciones de calcio celular que ocurren durante la FCW, explorar formas de alterar la frecuencia de las mismas sin afectar otros parámetros de la onda y determinar su rol sobre la migración, proliferación y muerte celular en la cicatrización de células de BCE en cultivo.

5- Realizar la caracterización de un modelo de cicatrización sin daño celular ni estímulo mecánico, y determinar el rol de la pérdida de restricciones espaciales sobre la migración, proliferación y muerte celular durante el cierre de la brecha.

6- Determinar si la activación de receptores purinérgicos tiene efecto sobre la RCD en monocapas indemnes de células de BCE en cultivo.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos y soluciones

Reactivos obtenidos de SIGMA Chemical Co. (Munich, Alemania): metanosulfonato de fenamil (fenamil); clorhidrato de amiloride (amiloride); tapsigarguina (Tg); 5-(N,N-hexametilene)amiloride (HMA); ácido plurónico F-127, dimetil sulfóxido (DMSO); 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU); trifosfato de adenosina trisódica (ATP); 6-N,N-Dietil-β-γ-dibromometilen-D-adenosina-5′-trifosfato trisódico (ARL-67156); apirasa ATPasa y ADPasa A7646; Piridoxalfosfato-6-azofenil-2',4'-disulfonato tetrasódico (PPADS); α,β-Metilenadenosina 5′-trifosfato de litio (α,β-MeATP); 1-[6-[((17β)-3-Metoxiestra-1,3,5[10]-trien-17-il)amino] hexil]-1H-pirrol-2,5-diona (U73122); o-fenilendiamina (OPDA).

Reactivos obtenidos de Tocris Bioscience (Ellisville, MO): (2-[2-[4-(4-Nitrobenziloxi) fenil] etil] isotiourea mesilato) (KB-R7943); ester etílico del ácido (2-[[4-[(4-Nitrofenil) metoxi] fenil] metil]-4-tiazolidincarboxilico) (SN-6).

Reactivos obtenidos de Molecular Probes (Eugene, Ore., USA): ácido ciclopiazónico (CPA); (bis-(3-fenil-5-oxoisoxazol-4-il)pentametina oxonol) (oxonol-V); Fluo-4 AM; CoroNaGreen AM.

Reactivos obtenidos de Thermo Fisher Scientific: kit de transferasa terminal.

Reactivos obtenidos de Biovision (Mountain View, Calif., USA): N-Benzil oxicarbonil-Val-Ala-Asp(O-Me) fluorometil cetona (Z-VAD-FMK).

Reactivos obtenidos de Jena Bioscience (Jena, Alemania): 5-Bromo-2'deoxi-uridina-5'-trifosfato de trietilamino (Br-dUTP).

Reactivos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, Calif., USA): anexina V-fluoresceina-isotiocianato (FITC).

Las soluciones stock fueron preparadas 1000X en DMSO, alicuotadas y mantenidas a -20 °C excepto se declare lo contrario: fenamil 33 mM, KB-R7943 10 mM, SN-6 30 mM, tapsigarguina 10 mM, CPA 10 mM, HMA 80 mM, Z-VAD-FMK 2 mM, Fluo4 AM 1.7 mM, CoroNaGreen AM 1 mg/ml, ácido plurónico 20 %w/v, U73122 50 mM, amiloride 10 mM (disuelto en agua), BrdU 30 mg/ml (disuelto en PBS), PPADS 20 mM (disuelto en agua), ab-mATP (disuelto en agua) ATP 200 mM (200X disuelto en PBS), apirasa 1000 U/ml (100X disuelto en PBS), ARL-67156 5 mM (100X, disuelto en agua), Oxonol V 300 μM (disuelto en etanol y mantenido a 4 °C).

Solución control (CS): 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.02 mM NaH_2PO_4, 3.6 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$, y HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico) 10 mM pH 7.4.

3.2. Cultivos celulares

Los cultivos celulares primarios de fueron generados a partir de córneas de bovino con no más de 5 horas de extraídas, y procesadas para cultivo como se ha descripto previamente (Chifflet et al., 2003). Brevemente, las córneas fueron tratadas durante 20 a 30 min con tripsina 0.25% y EDTA 0.02% en ausencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} en buffer fosfato salino (PBS), luego de lo cual el endotelio fue raspado y cultivado. Se emplearon células del 1ro al 5to pasaje, cultivadas por lo menos 5 días luego de alcanzada la confluencia visual.

Todas las células fueron incubadas en medio de cultivo MEM suplementado con suero fetal bovino 10%, gentamicina 50 μg/ml y anfotericina B 0.25 μg/ml. Para las células de BCE en cultivo se adicionó además extracto de retina 50 μg/ml como se describió en trabajos previos (Chifflet et al., 2003). Las células utilizadas para microscopía fueron cultivadas sobre láminas preparadas a partir de cubreobjetos de aproximadamente 1 cm^2 mientras que las células utilizadas para Western blot fueron cultivadas directamente en placas de Petri de plástico.

3.3. Procedimientos experimentales

Realización de heridas

Para realizar heridas lineales se utilizó principalmente una aguja de jeringa 21G o puntas de pipeta para la obtención de heridas más anchas. Para mantener la ECM en los modelos de cicatrización de células de BCE en cultivo, se hicieron las heridas usando una aguja con recubrimiento de silicona en la punta como se ha descrito previamente (Grasso et al., 2007).

Para la evaluación del efecto de factores solubles liberados al medio extracelular sobre la FCW se realizaron experimentos de doble herida. En los mismos se efectuaron dos heridas, a las que nos referimos como vieja y nueva, OW y NW respectivamente. La primera herida fue realizada 10 a 20 min previo a la segunda, de modo de permitir la extinción completa de la FCW. Se utilizaron los preparados donde la separación entre las lesiones fue de 3 a 5 filas de células de distancia. El ancho de las heridas fue de 100 a 150 μm y se realizaron en forma ligeramente oblicua de modo tal de favorecer que en ambas márgenes de la OW estuviesen representadas las mismas filas de células respecto al borde de la NW. Los experimentos que no cumplían con los requisitos anteriores fueron descartados.

En los experimentos para Western blot, las células fueron incubadas en placas de Petri de 35 mm y una vez transcurrido el tiempo de cultivo necesario, se realizaron 10 heridas lineales paralelas entre sí y otras 10 heridas lineales también paralelas entre sí pero perpendiculares a las anteriores.

Velocidad media de cicatrización

Al inicio y final de cada experimento de cicatrización se tomaron imágenes de microscopía de fase de la herida en su totalidad. Dichas fotografías fueron procesadas utilizando el programa Adobe Photoshop CS6 Extended. Para cada herida se hizo un collage con las imágenes obtenidas en el microscopio, generando un montaje completo de la lesión. A continuación, se delimitaron los bordes de la herida utilizando la herramienta Pencil Tool y se definió el largo y área de la lesión con las herramientas de

selección y medida. La distancia entre los bordes fue calculada como el cociente entre el área y el largo de la herida. La distancia migrada (△L) fue calculada como la diferencia de la distancia entre bordes del inicio respecto al final de la cicatrización. La distancia de cierre de la herida fue transformada de pixeles a micrómetros utilizando la escala micrométrica. Se determinó la velocidad como el cociente entre dicha distancia y el tiempo de cicatrización.

Agotamiento de las reservas de calcio durante la FCW

Para lograr el agotamiento de las reservas de calcio en el retículo endoplásmico, las células fueron preincubadas durante 30 min con ácido ciclopiazónico o tapsigarguina 10 μM (inhibidores de la bomba de calcio del retículo endoplásmico en forma reversible e irreversible respectivamente). Se realizaron las heridas, y luego de transcurridos dos minutos se realizaron tres lavados. Para evitar la entrada de calcio extracelular durante la FCW las células se incubaron desde 30 s antes hasta 2 minutos después de realizar la herida en PBS sin calcio con 100 μM de EGTA. Para la inhibición completa de la FCW se utilizaron ambas estrategias combinadas. En los controles lavados se realizaron los procedimientos de agotamiento de calcio seguidos de tres lavados finalizando 30 min antes de realizar la herida. En los experimentos en los que se indica, se indujo incremento de la $[Ca^{2+}]_c$ mediante incubación durante 2 min con ATP 100 μM, 30 min después de inhibida la FCW de forma reversible (combinación de estrategias utilizando CPA y EGTA). La fosfolipasa C fue inhibida mediante incubación durante 10 min con U73122 50 μM.

Estrategias para la evaluación del rol del ATP y los receptores purinérgicos

Con el propósito de consumir el ATP liberado al medio extracelular durante la FCW las células fueron incubadas con apirasa 10 U/ml desde 10 min antes hasta 5 min después de realizada la herida. Las ecto-nucleotidasas fueron inhibidas por incubación con el inhibidor competitivo ARL-67156 50 μM desde 10 min antes, hasta 5 min después de realizada la herida.

Se inhibieron los receptores purinérgicos mediante varias estrategias de incubación previas a la realización de la herida. 1) Mediante de-sensibilización por incubación con

ATP 10 μM durante 30 min. 2) Por incubación con suramina 200 μM durante 60 min. 3) Mediante incubación con PPADS 20 μM durante 30 min (a la concentración utilizada, inhibidor no selectivo de receptores purinérgicos, principalmente $P2X_{1, 2, 3 y 5}$ y los $P2Y_{1 y 13}$) (Coddou et al., 2011b) (von Kugelgen and Hoffmann, 2016).

Modelo de cicatrización sin daño celular

Con el objetivo de evaluar el rol de la falta de contacto intercelular en ausencia de las señales generadas por el daño celular y el estímulo mecánico, desarrollamos un modelo de cicatrización en el que se creó una barrera de Parafilm, que al ser removida genera una brecha equivalente a una herida. Para esto, se cortaron bandas de Parafilm de hasta 1 mm de ancho y se adhirieron a la laminilla de cultivo mediante presión y calor. A continuación se esterilizaron las laminillas en etanol 70° durante 30 min. Luego de removido el alcohol se sembraron las células y se cultivaron de acuerdo al protocolo previamente descripto. En los experimentos que se indica, la banda fue cuidadosamente removida utilizando pinzas estériles, se cambiaron las células a medio de cultivo fresco sin suero y se permitió a las células migrar.

Modelo de inhibición de la RCD por incubación con ATP en monocapas indemnes

En este modelo se realizó una pre-incubación de las monocapas indemnes durante 2 min en medio de cultivo con ATP 100 μM, seguido de lavado con medio de cultivo e incubación por 24 horas con un agente inductor de RCD. Para ello se usaron diferentes agentes: etoposido 150 μM (induce apoptosis por daño al DNA), HMA 80 μM (induce RCD vinculada a la disminución del pH citosólico), etanol 2.5 %v/v (inductor de RCD por estrés oxidativo). Para evaluar el rol del calcio en este modelo se combinó el tratamiento con ATP con las estrategias de agotamiento de reservas de calcio mencionadas previamente. Se evaluó el rol de receptores P2X por dos estrategias: sustitución del ATP por el agonista de receptores $P2X_{1 y 3}$, el α,β-MeATP o mediante inhibición de los P2X por incubación durante 30 min previo al agregado de ATP con PPADS 20 μM.

3.4. Determinación del potencial de membrana plasmática, sodio y calcio citosólico

Los cambios en el potencial de membrana plasmática PMP fueron revelados por incubación durante 30 min a 37 °C en solución control con 0.3 µM de la sonda potenciométrica oxonol V.

Las alteraciones de la $[Na^+]_c$ y $[Ca^{2+}]_c$ se evaluaron utilizando las sondas específicas CoroNaGreen AM y Fluo-4 AM respectivamente. En ambos casos las sondas fueron mezcladas en relación 1:1 con ácido plurónico 20% w/v inmediatamente antes de su uso. Las monocapas celulares fueron incubadas en medio de cultivo o solución control a 37 °C durante 45 min con CoroNaGreen AM 1 µg/ml o durante 15 min con Fluo-4 AM 1.7 µM, seguido de un lavado con solución control.

Las láminas de monocapas celulares incubadas con estas sondas (oxonol V, CoroNaGreen AM y Fluo-4 AM) fueron montadas en una cámara casera para su visualización en microscopio de fluorescencia y realización de heridas in situ de acuerdo a los protocolos utilizados en publicaciones previas (Figura 3.1) (Chifflet et al., 2003) (Chifflet et al., 2012). En todos los casos se agregó ioduro de propidio 1 µg/ml en la cámara de montaje para revelar las células muertas.

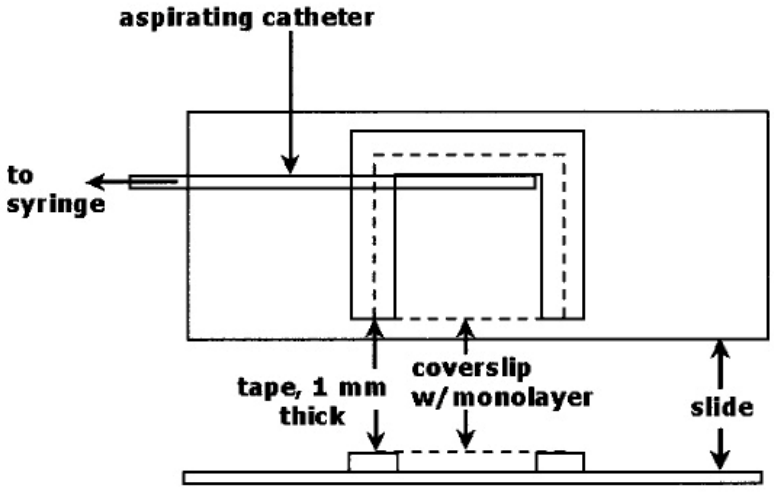


Figura 3.1. Esquema de cámara de montaje casera, desarrollada para la visualización de las sondas oxonol V, CoroNaGreen AM y Fluo-4 AM. Imagen extraída de (Chifflet et al., 2003)

3.5. Dinámica de calcio

Con el propósito de estudiar la dinámica de calcio durante la FCW se realizaron los siguientes procedimientos utilizando el programa Adobe Photoshop Extended. i) Para apreciar mejor los límites celulares se combinaron dos a tres imágenes de Fluo-4 AM de la misma secuencia de forma arbitraria. ii) En la imagen resultante se delimitaron de forma manual los bordes y se identificó cada célula fila por fila utilizando las herramientas "Pencil tool" y "Count tool" respectivamente. La primera fila fue definida como la constituida por aquellas células vivas que se encontraban directamente en el borde de la herida. Cada fila subsiguiente fue definida como el conjunto de células en contacto directo con la fila previa. iii) Se diseñó un programa con la función "Action" de Photoshop para registrar la densidad integrada (F) de cada célula del campo (400 a 800 células por campo) y se corrió el programa para cada imagen del curso temporal analizado. iv) Se recopilaron los datos de cada célula y se determinaron los parámetros de estudio a partir de cada gráfico de intensidad relativa ($\triangle F/F_0$) en función del tiempo.

En cada registro se observó un primer pico pequeño correspondiente al paso de la aguja, que se usó para definir el tiempo cero de la FCW y no fue tenido en cuenta como parte de la respuesta. Por cada registro se obtuvieron cuatro diferentes parámetros: la amplitud del primer pico (Amp), el tiempo necesario para alcanzar el primer pico (TFP, "Time of the First Peak"), la velocidad de la onda (V) y el número de picos (NP). La velocidad de la onda en cada célula fue definida como el cociente de la distancia desde el borde de la herida (calculado como el diámetro promedio de las células "D" multiplicado por el número de fila "n") y el tiempo para alcanzar el primer pico (V = n.D/TFP). El número de picos fue determinado por observación directa. La fracción de células que responden fue calculada como el porcentaje de células con uno o más picos respecto al total (todas las células incluidas desde un borde de la herida hasta el final del campo). La fracción de células con comportamiento oscilatorio fue calculada como el porcentaje de células con más de un pico respecto a las células que responden.

En los experimentos de inducción de incremento de calcio por incubación con ATP, la dinámica de calcio fue analizada de igual modo que para la FCW. Se procesaron las imágenes con el mismo procedimiento y se obtuvieron los mismos parámetros exceptuando velocidad (al agregar el ATP a toda la monocapa, todas las células fueron

estimuladas en forma simultánea, como resultado no existe una distancia recorrida, y por definición no es posible calcular V). En todos los experimentos se analizaron todas las células encontradas en un área de 150x150 µm centrada en el campo.

3.6. Apoptosis y proliferación

Se utilizaron tres estrategias para revelar la apoptosis: detección de exposición de fosfatidilserina mediante ensayo de anexina V – FITC, degradación de DNA mediante ensayo de TUNEL ("Transferase-mediating dUTP Nick-End Labeling") y activación de caspasa 3 por inmunofluorescencia indirecta. La proliferación fue puesta en evidencia por marcado de células en fase de síntesis.

Ensayo de anexina V – FITC

Las monocapas celulares con diferentes tiempos de cicatrización fueron incubadas con anexina V – FITC de acuerdo a las instrucciones del fabricante en presencia de ioduro de propidio 1 µg/ml. Luego de la incubación con ambos marcadores, las monocapas fueron montadas en la cámara bajo microscopio. Una vez localizadas las células marcadas con anexina V - FITC se obtuvieron imágenes de ambas señales. Con cuidado de no modificar la posición del campo, se procedió con el protocolo de tinción nuclear que se describe a continuación. Las células fueron fijadas durante 15 min a temperatura ambiente con PFA 4 % en PBS, permeabilizadas durante 5 min con Triton X-100 0.1 % e incubadas durante 20 min con Hoechst 33258 50 µM. Se obtuvieron las imágenes de esta tinción y se procesaron junto con las imágenes de ioduro de propidio y anexina - V.

Ensayo de TUNEL

Previamente al ensayo las células fueron fijadas, permeabilizadas y sometidas a digestión proteica. Fijación: incubación durante 15 min a temperatura ambiente con paraformaldehído (PFA) 4 % en PBS. Permeabilización: incubación durante 1 hora a 4 °C con etanol 70 % seguido de incubación durante 30 min con Tritón X-100 0.5 % en PBS. Digestión proteica: incubación durante 15 min a 37 °C con Pronasa 2.23 U/ml en

PBS (Proteasa tipo XIV de Bacillus Subtilis, concentración stock: 23 mg/ml, 9.7 U/mg). Posterior a cada incubación se hicieron cinco lavados con PBS.

Ensayo de TUNEL. Se utilizó la transferasa terminal (TdT, "Terminal Transferase") de Thermo Scientific F-203L (cataliza la adición de desoxinucleótidos a los extremos 3' hidroxilos libres en cadenas de DNA). Las células fueron incubadas durante 1 hora a 37 °C con la mezcla de reacción (de acuerdo a las instrucciones de la TdT provista por Thermo Scientific) incluyendo TdT 0.75 U/µl, 5-Br-dUTP 100 µM y $CoCl_2$ 1.5 mM. La señal fue revelada por inmunofluorescencia indirecta incubando a 37 °C durante 1 hora con anticuerpo primario específico para BrdU seguido de 1 hora con secundario anti-mouse conjugado a Alexa Fluor 594. Los núcleos se tiñeron con Hoechst 33258 50 µM, en simultáneo al anticuerpo secundario.

Índice de apoptosis

El índice de apoptosis (AI, "Apoptotic Index") en los experimentos de cicatrización se definió como el número de condensaciones nucleares (correspondientes a cuerpos apoptóticos) (AB, "Apoptotic Bodies") en las primeras 10 filas de células por mm de largo de herida (AI = AB/mm). El AI en los experimentos de inhibición de la RCD por incubación con ATP, se definió como el porcentaje de condensaciones nucleares por campo respecto al control de monocapa indemne.

Proliferación

Para analizar los cambios en la proliferación celular durante la cicatrización se estudió el nivel de incorporación de BrdU durante la fase de síntesis. El BrdU fue adicionado al medio de cultivo 3 horas antes de finalizar la incubación a una concentración final de 30 µg/ml. Las células fueron fijadas durante 30 min a 4 °C con etanol 96 % y permeabilizadas durante 30 min a temperatura ambiente con HCl 4 N, seguido de inmunofluorescencia específica para BrdU. Luego de cada incubación se hicieron tres lavados con PBS.

Índice de proliferación

El índice de proliferación (PI, "Proliferation Index") se definió como el número de núcleos que incorporaron BrdU (NBrdU) en las primeras 20 filas de células por mm de largo de herida (PI = NBrdU/mm).

Inducción de RCD en monocapas indemnes

Las células fueron incubadas durante 24 horas en presencia de etoposido 150 μM, HMA 80 μM o etanol 2.5 %v/v. En los casos en que se indica se pre-incubó con CPA y EGTA o con ATP.

3.7. Inmunofluorescencias y Western blot

Inmunofluorescencia y otras marcas fluorescentes

Para la marcación fluorescente se fijaron las células durante 15 min a temperatura ambiente con PFA 4 % en PBS y se permeabilizó durante 5 min a temperatura ambiente con Tritón X-100 0.1 %. Las incubaciones tanto de anticuerpos primarios como secundarios fueron de 1 hora a 37 °C diluidos en seroalbúmina bovina (BSA) 1 %. Junto con el secundario se incubó en algunos casos con Faloidina-FITC y Hoechst 33258 50 μM para revelar la actina F y los núcleos respectivamente. Las laminillas fueron montadas con glicerol-TRIS (1.5 M pH 8.8) 5:1 para su visualización en el microscopio. Los anticuerpos primarios desarrollados en conejo fueron revelados utilizando anticuerpos anti-rabbit Cy3 (ABCAM) o anti-rabbit Alexa Fluor 488 (ABCAM) y los desarrollados en ratón revelados con anticuerpos anti-mouse Alexa Fluor 594 (Molecular Probes) o anti-mouse FITC (SIGMA).

Western blot

Para los experimentos de Western blot se cultivaron las monocapas celulares en placas de Petri de 35 mm durante el tiempo necesario y se hicieron heridas según los métodos previamente mencionados. Previo a la realización de las heridas el medio de cultivo fue recambiado por medio fresco sin suero. Las monocapas control (sin herida) fueron

mantenidas en medio sin suero por el mismo período que los experimentos con herida. Al finalizar el experimento las células fueron lavadas dos veces con PBS y las muestras fueron obtenidas en baño de agua-hielo por raspado en 200 µl de buffer de lisis (Tritón X-100 1 %, HEPES pH 7.6 10 mM, KCl 40 mM, EGTA 10 mM, fenilmetano sulfonilfluoruro 1 mM). A continuación se agregó buffer Laemmli 4X hasta alcanzar una concentración 1X. Se cuantificaron las proteínas utilizando rojo Ponceau según el método descripto por Morcol o mediante el ensayo de ácido bicinconínico (BCA) dependiendo de si la muestra tenía o no buffer Laemnli respectivamente (Smith et al., 1985) (Akins and Tuan, 1995) (Morcol and Subramanian, 1999). Las muestras fueron sembradas y corridas en gel poliacrilamida-SDS y electrotransferidas a membranas de Immobilon P (Millipore, Bedfords, Mass., USA). Los sitios de reconocimiento inespecífico fueron bloqueados durante 30 min a 37 °C con leche descremada al 5 % en PBS. Los anticuerpos primarios y secundarios fueron incubados durante 1 hora a 37 °C excepto el anti-βENaC que fue incubado toda la noche a 4 °C. Todos los anticuerpos fueron diluidos en leche descremada 1 % en PBS y luego de cada incubación se hicieron 5 lavados con Tween-20 0.05 % en PBS. Los anticuerpos secundarios fueron obtenidos de Sigma conjugados a peroxidasa de rábano. El Western blot fue revelado por desarrollo de quimioluminiscencia aumentada (Haan and Behrmann, 2007) y exposición de placas radiográficas XAR5 (Kodak). Las bandas fueron escaneadas y cuantificadas utilizando el software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, Md., USA; http://imagej.nih.gov/ij/, 1997–2011).

Anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia y Western blot

Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios desarrollados en conejo: anti-αENaC (Sigma), anti-β-ENaC SCNN1B (MyBioSource), anti-LEI (producido y caracterizado en el laboratorio de la Dra. Torriglia) (Torriglia et al., 1995) (Torriglia et al., 1998), anti-caspasa 3 activa (BD Pharmingen). El anticuerpo primario específico para BCL2 (ABCAM) fue desarrollado en ratón.

3.8. ELISA

Para este ensayo se lisaron las células en buffer de lisis [NaCl 150 mM, TRIS (pH 7.2) 50 mM, Tritón X-100 1 %, deoxicolato de sodio 1 %, dodecil sulfato sódico 1 %]. Los antígenos fueron fijados en placas de ELISA durante 1 h a 37 °C con 200 ng de proteínas de lisado diluido en buffer Vollers (carbonato de sodio 0.05 mM, pH 9.6). Las interacciones inespecíficas fueron bloqueadas por incubación durante 1 h a 37 °C con BSA 1 % en buffer Vollers. La incubación con el anticuerpo primario LEI y el secundario anti-rabbit conjugado a peroxidasa fue en ambos casos de 1 h a 37 °C en PBS con Tween-20 0.05 % y BSA 0.1 %. Cada incubación fue seguida de tres lavados durante 5 min en PBS con Tween-20 0.05 %. La actividad peroxidasa fue desarrollada con o-fenilendiamina diluido en buffer citrato de sodio pH 5.0. La reacción se detuvo por adición de ácido sulfúrico 4 N y la absorbancia de las muestras a 495 nm fue determinada en lector BioRadmicroplate. Cada muestra fue determinada por cuadruplicado.

3.9. Análisis estadístico

Todos los datos son presentados como el promedio ± SD (desvío estándar) y corresponden a un mínimo de 3 experimentos realizados por triplicado. Las diferencias significativas fueron determinadas utilizando el test t de Student. Las imágenes de inmunofluorescencia indirecta y sondas fluorescentes son representativas de los resultados obtenidos en los correspondientes experimentos.

4. RESULTADOS

Para la presentación de los resultados se incluirán en esta tesis, los artículos publicados en revistas arbitradas internacionales. En forma previa a cada uno de ellos se realizará un resumen donde además se especificará cuales de los resultados corresponden a mi contribución.

La exposición de resultados seguirá el orden planteado en los objetivos específicos, que no refleja la cronología de publicación sino el orden en que se fueron obteniendo los resultados.

4.1. Rol de la FCW sobre la onda de sodio, la onda lenta de calcio y la velocidad de cicatrización

Artículo I (ANEXO)

Early and late calcium waves during wound healing in corneal endothelial cells. S. Chifflet, C. Justet, J.A. Hernandez, V. Nin, C. Escande, and J.C. Benech. 2012. Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society. 20:28-37. (Chifflet et al., 2012)

El principal propósito de esta publicación fue informar el hallazgo de una onda lenta de calcio en células BCE, su caracterización y su vinculación con la onda de sodio. En este sentido mi participación en el artículo fue la exploración del rol de la FCW sobre la SCW. Mis aportes en este trabajo corresponden a las figuras 4 y 5-B.

Parte de los resultados expuestos en este artículo, relativos al descubrimiento de la onda lenta de calcio (SCW, "Slow Calcium Wave") y su vinculación con la onda de sodio, son antecedentes directos ya presentados en la sección Introducción. Los resultados relativos a la inhibición reversible de la FCW en dicho artículo, fueron obtenidos en el marco de esta tesis durante la etapa de Maestría, previo al pasaje directo a Doctorado.

4.1.1. Resumen de resultados

Para de estudiar el rol de la FCW es necesario inhibirla de forma reversible de modo de analizar sus efectos sobre la cicatrización sin alterar la dinámica de calcio durante toda la duración del experimento. Para lograr esto, tratamos las células de BCE en cultivo combinando el uso de CPA y EGTA como se describe en materiales y métodos. De este modo, el tratamiento con CPA y EGTA inhibe de forma reversible la FCW (Figura 4-A en el artículo I).

Nuestros resultados muestran que la inhibición reversible de la FCW no provoca disminución apreciable en el gradiente de despolarización del PMP, la onda de sodio ni

la SCW (Figura 4-B y C en el artículo I). En concordancia con esto, hemos encontrado que el incremento de expresión del ENaC en el borde de la herida tampoco se ve afectado en las monocapas en que se ha inhibido la FCW de forma reversible (Figura 4-D en el artículo I). Asimismo, la velocidad de cicatrización disminuye sólo 10% aproximadamente en las monocapas en las que se inhibe la FCW.

En su conjunto, los resultados presentados en esta sección sugieren que la FCW carece de efecto sobre la expresión de ENaC, la onda de sodio y la SCW. Es importante resaltar que, a diferencia de lo encontrado en otros modelos (ver Introducción sección 1.2.6), en células de BCE en cultivo la FCW posee un efecto muy limitado sobre la velocidad de migración durante la cicatrización.

4.2. Muerte celular regulada durante la cicatrización de células de BCE en cultivo. Rol de la FCW sobre la apoptosis y la proliferación.

Artículo II (ANEXO)

Fast calcium wave inhibits excessive apoptosis during epithelial wound healing. C. Justet, J.A. Hernandez, A. Torriglia, and S. Chifflet. 2016. Cell and tissue research. 365:343-356. (Justet et al., 2016)

Todos los resultados de esta publicación fueron obtenidos por mí en el marco de esta tesis de doctorado. La totalidad de las figuras en este artículo son de mi autoría y asimismo, he participado en el diseño de los experimentos y en la redacción del texto.

4.2.1. Resumen de resultados

En vista de que, a diferencia de lo observado en otras células, en monocapas de BCE en cultivo la inhibición de la FCW afecta escasamente la migración durante la cicatrización, decidimos explorar otros procesos celulares que podrían ser afectados por esta onda.

Con el fin de comprender mejor la función de la FCW decidimos determinar si se produce muerte celular regulada (RCD, "Regulated Cell Death") durante la cicatrización de células de BCE en cultivo tanto en presencia como en ausencia de matriz extracelular. Encontramos que, tan temprano como una hora y hasta luego de cerrada la herida, se observa la aparición de condensaciones nucleares en el borde de la herida, tanto en presencia como ausencia de ECM (Figura 3-A a C en el artículo II). Nuestros resultados sugieren que dichas condensaciones nucleares se forman en células donde se observa exposición de fosfatilserina (anexina V positivas), presentan activación de caspasa 3 y son positivas para el ensayo de TUNEL, lo cual es indicativo de actividad tipo DNAsa I (Figura 3-D a L en el artículo II). De acuerdo a los criterios propuestos por el Comité de Nomenclatura de Muerte Celular en 2012 y 2018, estas células están en proceso de muerte por apoptosis caspasa dependiente y las condensaciones nucleares

observadas corresponden a cuerpos apoptóticos. El análisis del índice de apoptosis en función del tiempo revela que existen dos etapas de apoptosis. La primera etapa dura hasta 6 a 8 horas luego de realizada la herida, ocurre en forma independiente de la distancia migrada y tiene un máximo a las dos horas para luego disminuir. La segunda etapa es detectable a partir de las 8 horas y es directamente proporcional a la distancia migrada con una tasa de apoptosis de 6.3 cuerpos apoptóticos por mm^2 (Figura 4 en el artículo II).

Nuestros resultados muestran que la inhibición de la FCW provoca una duplicación del índice de apoptosis tanto en la primera como en la segunda etapa de apoptosis y en presencia o ausencia de ECM (Figura 5 en el artículo II). Asimismo, en monocapas donde se ha inhibido la FCW, la inducción de incremento de calcio por incubación con ATP devuelve el valor de índice de apoptosis al observado en el control (Figura 5 en el artículo II).

Por otra parte, los ensayos de proliferación durante la cicatrización de células de BCE en cultivo, tanto en presencia como ausencia de matriz extracelular, revelan que se produce incorporación de BrdU a partir de las 12 horas de realizada la herida alcanzando un máximo a las 20 horas para disminuir posteriormente (Figura 7-A a D en el artículo II). Se puede observar que en monocapas que cicatrizan sobre ECM el índice de proliferación es 5 veces mayor a las que cicatrizan en su ausencia (Figura 7-C y D en el artículo II). A diferencia del índice de apoptosis, no se observa proporción directa del índice de proliferación en relación a la distancia migrada (Figura 7-E en el artículo II). Finalmente, la inhibición reversible de la FCW provoca una disminución de 30 % del índice de proliferación aproximadamente, en forma independiente de la matriz extracelular (Figura 7-F y G en el artículo II).

En su conjunto los resultados expuestos en el artículo referenciado muestran que durante la cicatrización de células de BCE en cultivo ocurren dos etapas de apoptosis, en forma independiente y dependiente de la distancia migrada respectivamente. Asimismo, los resultados sugieren que la FCW tiene un rol moderado sobre la proliferación durante la cicatrización pero tiene un rol preponderante en la protección de la apoptosis excesiva.

4.3. Cambio de expresión de la LEI durante la cicatrización de endotelio de córnea

Artículo III (ANEXO)

Increase in the expression of leukocyte elastase inhibitor during wound healing in corneal endothelial cells. C. Justet, F. Evans, A. Torriglia, and S. Chifflet. 2015. Cell and tissue research. 362:557-568. (Justet et al., 2015)

Este trabajo se centró en el estudio de los cambios de expresión de la LEI durante la cicatrización y el análisis de las señales que desencadenan dichos cambios. En este sentido, mi contribución en el artículo consistió en la realización de los experimentos que se presentan en las Figuras 1a-i, m, n, p, q; 2, 3a-c y 4.

4.3.1. Resumen de resultados

Teniendo en cuenta que durante la cicatrización ocurre RCD, decidimos estudiar la expresión de proteínas que pueden participar de dicho proceso. Considerando que, como se mencionó en la Introducción, la LEI puede inhibir la apoptosis por su actividad como inhibidor anti-proteasas, pero también puede desencadenar la apoptosis al adquirir actividad DNAsa II por una modificación post-traduccional, decidimos estudiar esta proteína. De este modo, encontramos que en células de endotelio de córnea de bovino y de cerdo en cultivo se observa incremento de expresión de la LEI en el borde de la monocapa desde 1 h luego de realizada la herida (Figura 1 en el artículo III). Dicho cambio de expresión fue también observado en endotelio de córnea de cerdo *in situ* (Figura 1o, r; en el artículo III). Este incremento es mayor a medida que transcurren las horas hasta por lo menos 12 h, tanto en ausencia como presencia de ECM, aunque en las células que migran por modalidad lamelipódica el incremento es mayor (Figura 1 y 2 en el artículo III). Sin embargo, cuando la herida se cierra la expresión de LEI disminuye a niveles similares al resto de la monocapa (Figura 2 en el artículo III). Los ensayos de ELISA y Western blot en monocapas con 4 h de cicatrización sugieren que se produce un incremento de la expresión de LEI, como es esperado por los resultados de inmunofluorescencia. Este incremento es de aproximadamente 30 % en monocapas que

cicatrizan en ausencia de ECM y de 200% en presencia de ECM, como demuestran los resultados de ELISA (Figura 3-A a C en el artículo III). En las monocapas en cultivo en las que se inhibe la FCW se observa incremento de la expresión de LEI mediante inmunofluorescencia de magnitud y extensión similares a las observadas en el control (Figura 4 en el artículo III).

En forma consistente con el aumento de expresión de LEI, otros coautores del artículo han obtenido resultados de qPCR que revelan que el mRNA también se incrementa durante la cicatrización de monocapas en cultivo, tanto en la cicatrización por modalidad lamelipódica como con formación de cordón de actina (Figura 2-F en el artículo III). Por otra parte, considerando que otra señal temprana durante la cicatrización es la liberación de ROS en el borde de la herida, se evaluó la expresión de la LEI en monocapas incubadas con el scavenger de ROS, N-acetil-cisteína (NAC). Estos hallazgos sugieren que la liberación de ROS promueve el aumento de expresión de LEI. Asimismo, se encontró que en el borde de la herida disminuye el pH citosólico, sin embargo no se observa traslocación de LEI al núcleo, sugiriendo que la función de LEI no está vinculada a la inducción de la apoptosis en este sistema.

En su conjunto los resultados presentados sugieren que durante la cicatrización se produce incremento de la expresión de LEI en el borde de la herida en forma independiente de la FCW pero inducida por la liberación de ROS. Asimismo, los resultados sugieren que la función de LEI en este sistema no es pro-apoptótica.

4.4. Caracterización de las oscilaciones de calcio durante la FCW y su rol en la apoptosis

Artículo IV (ANEXO)

Calcium oscillatory behavior and its possible role during wound healing in bovine corneal endothelial cells in culture. C. Justet, S. Chifflet, J.A. Hernández. 2018. BioMed Research International.

Todos los resultados de esta publicación fueron obtenidos en el marco de esta tesis de doctorado. La totalidad de las figuras en este artículo son de mi autoría y asimismo, he participado en el diseño de los experimentos y en la redacción del texto.

4.4.1 Resumen de resultados

Considerando que, como se mencionó en la Introducción, sección 1.2.5, las señales oscilantes de calcio pueden activar diferentes objetivos de acuerdo a la frecuencia, decidimos estudiar las oscilaciones de calcio en la FCW. En particular, buscamos encontrar una metodología que permitiera alterar la frecuencia oscilatoria sin modificar significativamente la amplitud de la señal de calcio, para poder estudiar el rol de este fenómeno sobre la apoptosis durante la cicatrización.

Con el objetivo de caracterizar el comportamiento oscilatorio de la FCW en células de BCE en cultivo se estudió la dinámica de calcio de cada célula en forma individual. Para esto, durante la FCW, se determinaron los cambios de $[Ca^{2+}]_c$ en forma relativa mediante incubación con Fluo-4 AM (Figura 1 en el artículo IV). En cada experimento se estudiaron las primeras 15 filas de células desde el borde de la herida. Para cada célula se determinaron cuatro parámetros: el tiempo de aparición del primer pico (TFP), la amplitud (Amp, definida como la fluorescencia relativa en el primer pico) la velocidad de la onda (V) y el número de picos (NP) (Figura 1-E en el artículo IV).

Se observaron diversas dinámicas de calcio, entre las que se destacan células que presentaron un incremento de la concentración de calcio seguido de una relajación monotónica y células en las que se produjo la aparición de sucesivos picos revelando un comportamiento oscilatorio (Figura 1 en el artículo IV). Para analizar los datos se promediaron los parámetros por fila. Nuestros resultados muestran que el TFP disminuye a medida que aumenta la distancia desde el borde de la herida, mientras que la amplitud disminuye, en una forma que es consistente, al menos en forma parcial, con la difusión de una señal (Figura 2-A y B en el artículo IV). Asimismo, tanto la V como el NP incrementa hasta la décima fila aproximadamente, para disminuir más allá de ésta, manteniendo ambos parámetros una relación lineal (Figura 2-C a E en el artículo IV). Por otra parte, nuestros resultados muestran que al igual que la señal global de la FCW, la respuesta oscilatoria depende de la difusión de una señal, como lo demuestran los resultados en experimentos de doble herida (Figura 3 en el artículo IV).

Para comenzar a entender los mecanismos que median las oscilaciones durante la FCW realizamos experimentos bloqueando la salida de calcio desde el retículo endoplásmico y la entrada desde el medio extracelular, utilizando las estrategias previas con CPA y EGTA (Figura 4 y 5 en el artículo IV). Teniendo en cuenta que nuestros resultados sugieren un importante rol del ATP en la propagación de la onda, realizamos experimentos utilizando ARL-67156 un inhibidor de ecto-nucleotidasas (Figura 4 y 5 en el artículo IV), y PPADS un inhibidor de varios receptores purinérgicos P2 como se describió en la Introducción (Figura 6 en el artículo IV). Con el propósito de evaluar el rol de la fosfolipasa C y de la entrada de calcio operada por reservas (SOCE, Store-Operated Calcium Entry) utilizamos los inhibidores U73122 y La^{3+} (Figura 6 en el artículo IV). En conjunto, nuestros resultados sugieren que las oscilaciones durante la FCW dependen del ATP liberado en el borde de la herida que actúa sobre receptores P2Y y P2X para permitir la salida de calcio desde el retículo endoplásmico en forma dependiente de IP3 y la entrada del catión desde el medio extracelular. Asimismo, encontramos que el tratamiento con EGTA y con ARL-67156 disminuye y aumenta la frecuencia de oscilación respectivamente, sin alterar en forma significativa la Amp, permitiéndonos utilizar estas drogas como herramientas para estudiar el rol de estas oscilaciones (Figura 5 en el artículo IV).

Con el objetivo de determinar el rol de las oscilaciones en la FCW sobre la apoptosis durante la cicatrización, utilizamos el EGTA y ARL-67156 para modificar la frecuencia oscilatoria pero no el CPA debido a que, como se demostró previamente, esta droga altera la Amp de la respuesta. Encontramos que la disminución de la frecuencia oscilatoria por tratamiento con EGTA provoca incremento del índice de apoptosis en la primera etapa, mientras que el incremento de dicha frecuencia mediante incubación con ARL-67156 lo disminuye (Figura 8 en el artículo IV). Sin embargo, la segunda etapa de apoptosis no es afectada por ninguno de estos dos tratamientos. Esto sugiere que la FCW modula ambas etapas de apoptosis por mecanismos al menos parcialmente diferentes.

4.5. Migración, proliferación y apoptosis en un modelo de cicatrización sin daño celular.

Como se ha mostrado en trabajos previos y en esta tesis, las células en cultivo que sufren una lesión son capaces de responder a los diferentes estímulos que esta produce (necrosis, liberación de factores solubles con acción parácrina, estímulo mecánico y pérdida de contactos intercelulares, entre otros). Esto ocurre de tal modo que durante la cicatrización se desencadenan procesos celulares como migración, proliferación y apoptosis. En esta sección, realizamos estudios para discriminar cuales procesos celulares están influenciados exclusivamente por la falta de contacto intercelular. Para ello desarrollamos un método para generar una brecha equivalente a la herida, en ausencia de las señales provocadas por el daño celular o el estímulo mecánico.

El mencionado modelo de cicatrización sin daño celular (HWCD, "Healing Without Cell Damage") consiste en hacer crecer a las células sobre láminas en las que se ha adherido una banda de Parafilm, el cual al ser removido genera una brecha en la monocapa equivalente a la lesión, donde las células pueden migrar (Figura 4.1). En esta figura se observa como la monocapa celular crece hasta casi hacer contacto con el Parafilm pero no se adhiere a éste en prácticamente toda la frontera entre ambos (Figura 4.1-A y B). Para evaluar si existe daño celular durante la remoción de la banda se incubó con ioduro de propidio (IP) (Figura 4.1-C y D). La utilización de este marcador in vivo permite reconocer a las células que han perdido la integridad de la membrana plasmática, evidenciada por el ingreso del IP que genera una marca nuclear. Se puede apreciar que en las heridas control existe pérdida de la integridad de la membrana plasmática en las células del borde de la herida (Figura 4.1-C), mientras que en el modelo de cicatrización sin daño celular no se observa incorporación de ioduro de propidio luego de la remoción de Parafilm (Figura 4.1-D). Asimismo, al retirar la banda de Parafilm no se provocan cambios significativos en la concentración de calcio citosólico, como revelan las imágenes de pseudo-color de la Figura 4.1-E.

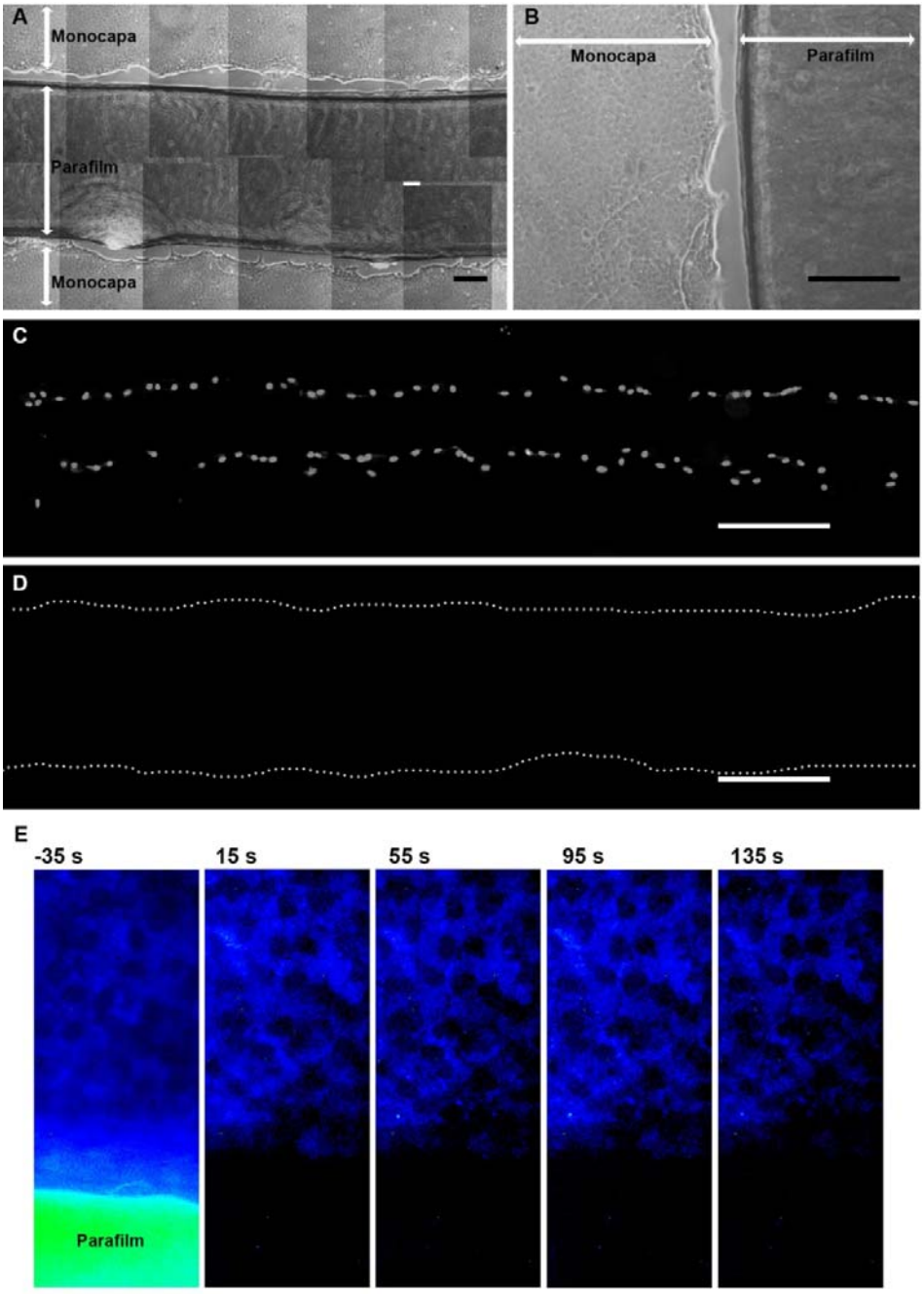


Figura 4.1. Modelo de cicatrización sin daño celular (HWCD model). (A) Montaje de imágenes obtenidas por microscopía de fase, de una monocapa confluente de células de BCE en cultivo en presencia de una banda de Parafilm. (B) Imagen a mayor aumento de la frontera entre la monocapa y el Parafilm (las líneas punteadas indican el borde de la brecha generada por el Parafilm). (C) Montaje de imágenes de células ioduro de propidio positivas en heridas y (D) en modelo de Parafilm. (E) Imágenes de pseudo-color de calcio citosólico del modelo de cicatrización sin daño celular antes (-35s) y después de remover la banda de Parafilm. Nótese que la remoción del Parafilm no provoca FCW. La imagen con Parafilm (-35 s) corresponde a un campo diferente al resto debido a que al remover la banda el campo se desplaza. Barras 200 μm en A - D y 100 μm en E.

Para evaluar las condiciones iniciales de este modelo se estudió el potencial de membrana plasmática (PMP), el calcio y el sodio citosólicos (utilizando Oxonol V, Fluo-4 AM y CoroNaGreen respectivamente) antes e inmediatamente después de remover el Parafilm (Figura 4.2-A). En la herida control no se observa despolarización del PMP ni incremento de la concentración de sodio o calcio citosólicos. Sin embargo, se puede apreciar que en las monocapas con Parafilm las células del borde de la herida presentan despolarización del PMP e incremento de la concentración de ambos cationes, sugiriendo que estas células se encuentran preparadas para migrar.

Por otro lado, en virtud de que la onda de sodio durante la cicatrización es generada por el aumento del ENaC en el borde de la lesión, evaluamos la expresión de este canal en el modelo de cicatrización sin muerte celular al inicio del cierre de la brecha (Figura 4.2-B). En forma consistente con los resultados de concentración de sodio y PMP, se puede observar que las células del borde de la monocapa presentan incremento de expresión de ENaC desde el inicio del proceso de migración, sugiriendo que las células se encuentran en condiciones propicias para la migración.

Considerando que durante la cicatrización de células de BCE, de RCEP y MDCK en cultivo se produce la onda de sodio con despolarización del PMP simultáneamente con la onda lenta de calcio (como se menciona en la Introducción), exploramos si estos fenómenos ocurren durante el cierre de la brecha generada por el Parafilm. Como forma representativa de la cicatrización estudiamos dos tiempos luego de realizada la herida, a las 4 y 24 horas de cicatrización. Las heridas control fueron realizadas de modo de remover la ECM para obtener una modalidad de migración equivalente al modelo, donde las células migran en forma directa sobre el vidrio en ausencia de ECM. Encontramos que, a las 4 horas de cicatrización en el control ya se ha desarrollado en forma notoria la onda de sodio y la SCW sin embargo, en el modelo de cicatrización sin daño celular el incremento de sodio y calcio en el borde de la herida es discreto (Figura 4.3 primeras dos columnas). Asimismo, a las 24 horas tanto en la herida control como en el modelo de cicatrización sin daño celular se observa incremento de sodio y calcio citosólico abarcando varias filas de células desde el borde de la monocapa (Figura 4.3 últimas dos columnas). Se puede apreciar en la figura, que las células de la herida control están más explayadas a las 24 horas a diferencia de las células en el modelo de

cicatrización sin daño celular, señal de que en el primer caso las células han migrado mayor distancia.

Como se menciona en la Introducción (sección 1.3), nuestros resultados previos sugieren que la onda de sodio es provocada por el incremento de expresión de ENaC, mientras que la SCW es generada por la acción en modo reverso del NCX, inducida por la despolarización del PMP y el incremento de sodio citosólico (Chifflet et al., 2005) (Chifflet et al., 2012). En virtud de esto, y considerando que en el modelo de cicatrización sin daño celular ocurren ambas ondas, estudiamos la expresión del ENaC en dicho modelo. Encontramos que, en forma similar a lo observado para el sodio y calcio, en el modelo de cicatrización sin daño celular luego de 4 horas de retirado el Parafilm, se produce un incremento de la expresión de ENaC de menor intensidad en comparación con la lesión, mientras que abarca varias filas de células a las 24 horas y en general parece estar más retrasado al incremento observado para la herida control (Figura 4.4).

Por otro lado, considerando que, como muestran las figuras 4.3 y 4.4 se produce la onda lenta de calcio y sodio con incremento del ENaC en el borde de la herida, estudiamos la tasa de cierre de la brecha en la herida control y el modelo de cicatrización sin daño celular (Figura 4.5-A). Como se puede observar en dicha figura, en las primeras 8 horas existe un retraso en la migración en el modelo HWCD respecto a la herida control. Sin embargo, entre 8 y 48 horas, las velocidades de migración de la lesión control y el modelo sin herida son similares (1.95842 ± 0.60236 $R^2 = 0.975$ y 1.4864 ± 0.37609 $R^2 = 0.758$ μm/h respectivamente). Este retraso en la migración puede deberse a que en la herida control no es posible remover por completo la ECM, expuesta al desprenderse las células que mueren en forma directa como resultado de la injuria inicial (Grasso et al., 2007). De este modo las células de la monocapa control migran inicialmente sobre ECM, desarrollando mayor velocidad hasta alcanzar el límite con el vidrio, donde migran con formación de cordón de actina a una velocidad entre 3 y 5 veces menor.

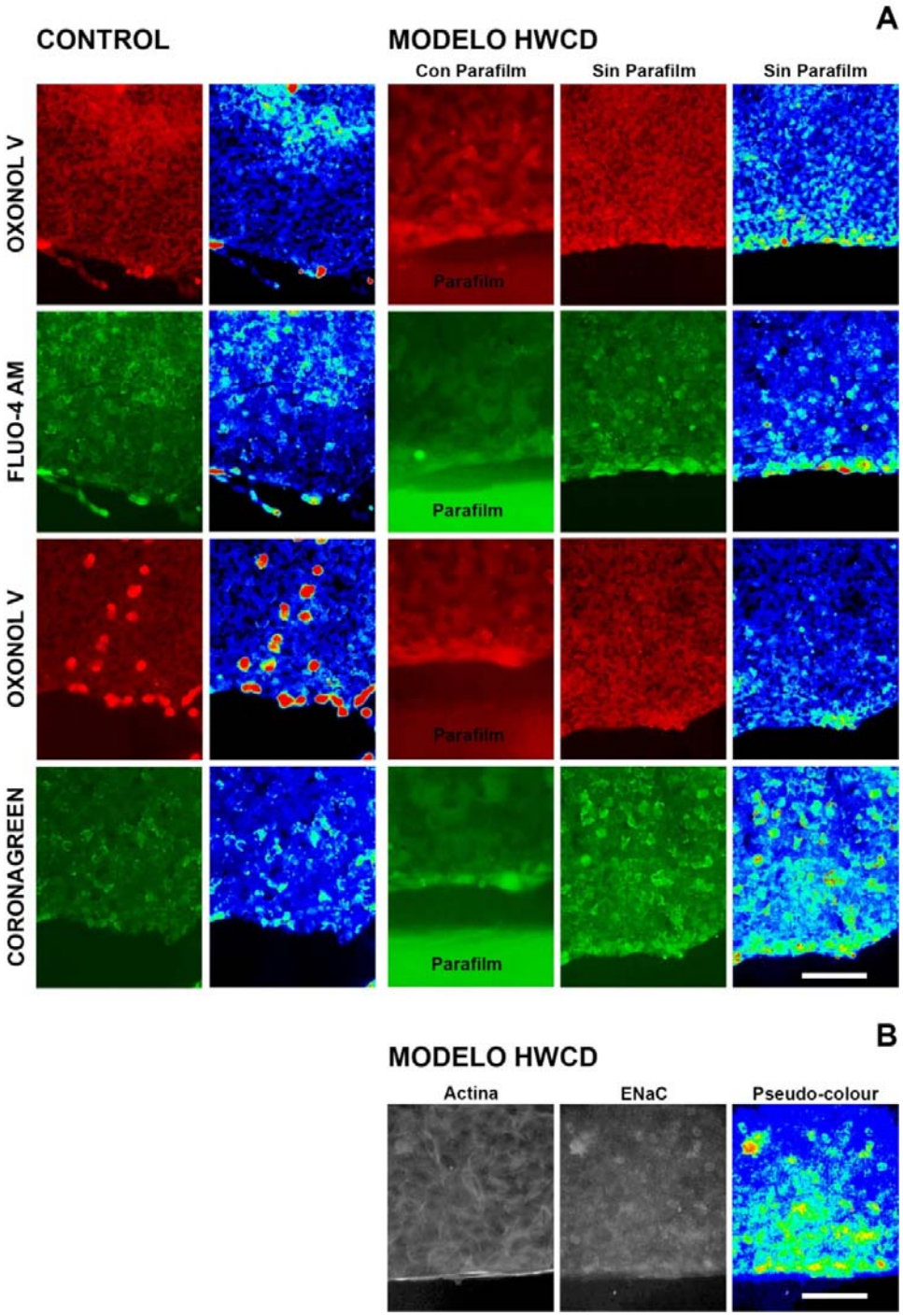


Figura 4.2. Condiciones iniciales del modelo de cicatrización sin daño celular (HWCD model). (A) PMP, calcio y sodio citosólicos en herida control (10 min luego de realizada la herida para no registrar la FCW) (primeras dos columnas) y en el modelo de cicatrización sin daño celular antes (columna central) y luego (últimas dos columnas) de remover el Parafilm. Se observan las imágenes de las sondas originales junto con sus correspondientes imágenes de pseudo-color. Barra equivalente a 100 µm para la columna central, y 200 µm para el resto. **(B)** Imágenes de actina (izquierda), ENaC (medio) y su correspondiente imagen de pseudo-color (derecha).

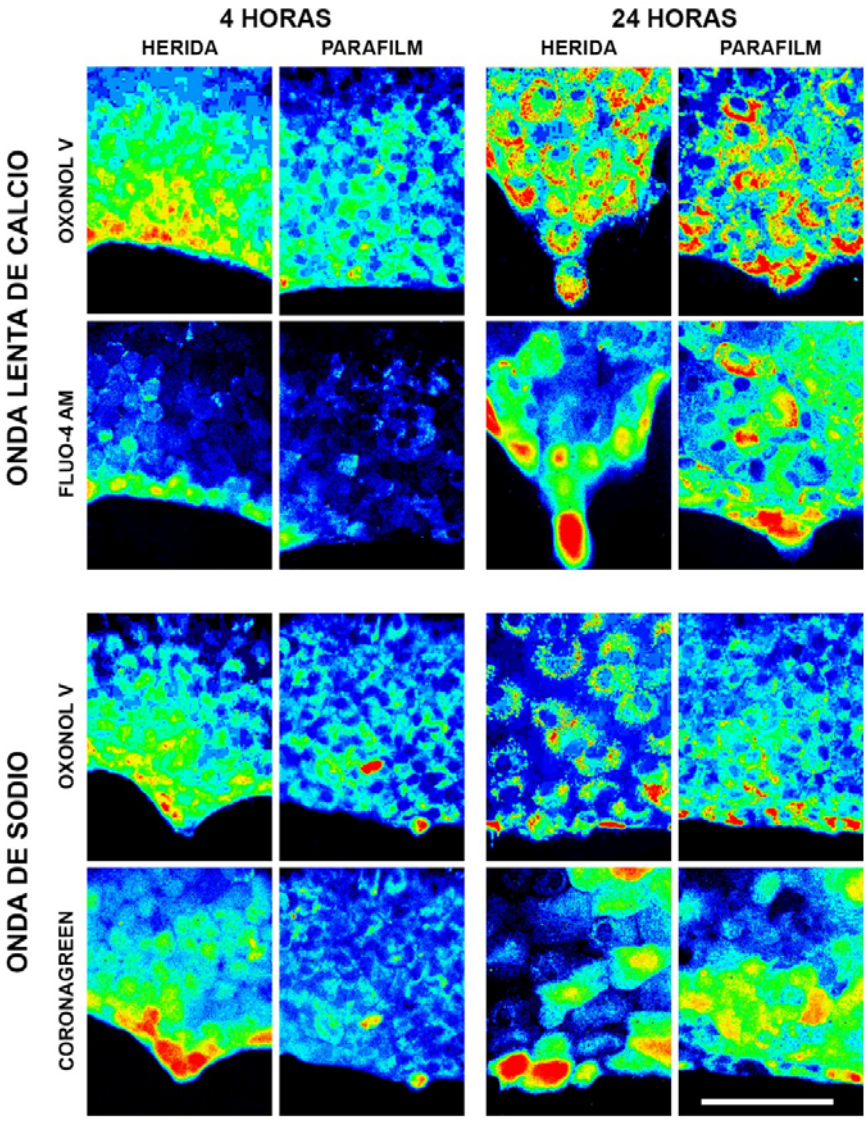


Figura 4.3. Onda lenta de calcio (SCW) y onda de sodio a las 4 y 24 horas en la herida control y el modelo de cicatrización sin daño celular por remoción de Parafilm. Se observan imágenes en pseudo-color de monocapas de células de BCE en cultivo incubadas con las sondas Oxonol V, Fluo-4 AM y CoroNaGreen. Barra 200 µm.

En virtud de que en el modelo de cicatrización sin daño celular no se produce la FCW, es esperable que se observen cambios en el índice de proliferación y apoptosis en este sistema respecto a una herida control. En la Figura 4.5-B se observa que en el modelo de cicatrización sin daño celular el índice de proliferación máximo, evidenciado por incorporación de BrdU, sólo incrementa ~22% respecto al control. Es importante señalar, que al igual que en la herida control, el valor de índice de proliferación máximo

se observa a las 20 horas de cicatrización. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos previamente en los experimentos de inhibición de la FCW (Sección 4.2).

Por otra parte, en el modelo de cicatrización sin daño celular, al igual que en la herida control, también se observan condensaciones nucleares TUNEL positivas lo que sugiere que se trata de cuerpos apoptóticos (imagen no mostrada). En la Figura 4.5-C se observa el índice apoptótico en función de la distancia. Si bien los ajustes lineales presentan coeficientes de correlación R^2 bajos (0.641 y 0.737 para el control y el modelo de HWCD respectivamente) podemos considerar que estos resultados presentan una tendencia de correlación directa teniendo en cuenta el trabajo presentado en la Sección 4.2 donde se muestra que el AI es directamente proporcional a la distancia migrada (Figura 4 en el artículo II). Debido a la importante variabilidad de este sistema es necesario incrementar el número de experimentos para poder confirmar esta correlación de forma confiable. Sin embargo, en la Figura 4.5-C se observa que el índice de apoptosis en relación a la distancia migrada es inferior en la herida control respecto al modelo de HWCD (48.3 ± 11.101 y 105.642 ± 12.59459 AB/mm^2 respectivamente).

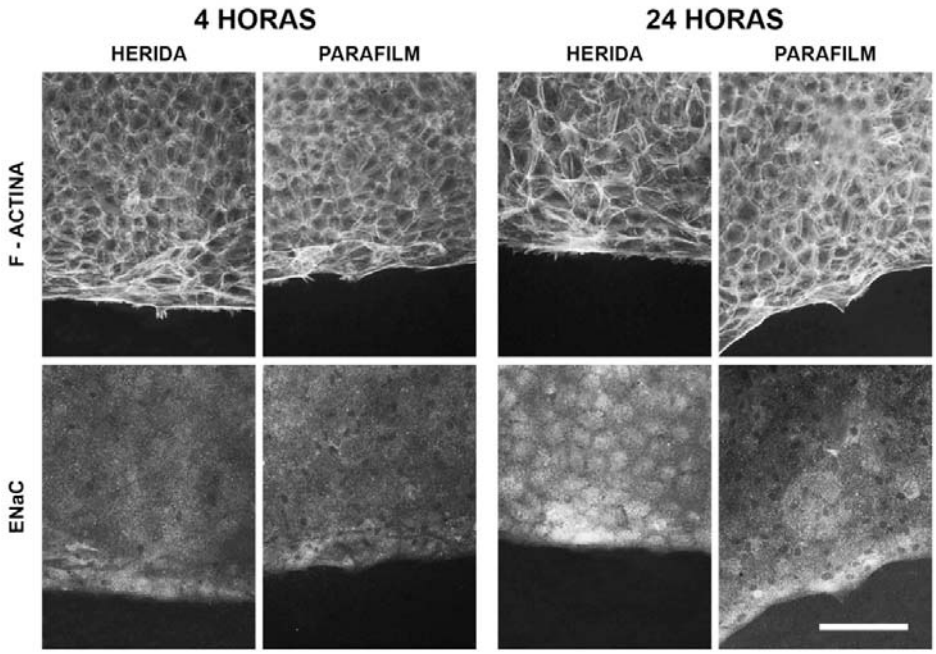


Figura 4.4. Imágenes de fluorescencia de F-actina y ENaC a las 4 y 24 horas de realizada la herida en el control, o de removido el Parafilm en el modelo de cicatrización sin daño celular. Barra 200 μm.

Es importante tener en cuenta que, en este modelo no se produce FCW y por lo tanto no ocurre el efecto anti-apoptótico generado por esta señal. De este modo, el índice apotótico observado en el modelo de HWCD del doble respecto a la herida control es consistente con nuestros resultados previos expuestos en la sección 4.2. Como es de esperar el índice de apoptosis a distancia 0 mm (intersección con ordenadas) es similar en ambos sistemas (2.63531 ± 1.19465 y 2.60845 ± 0.7205 AB/mm respectivamente).

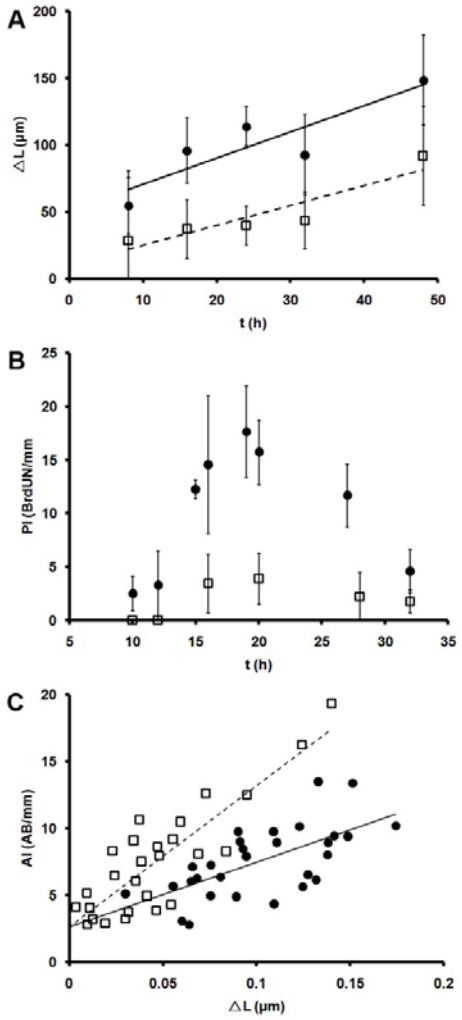


Figura 4.5. Migración, proliferación y apoptosis durante el cierre de la brecha en el modelo de cicatrización sin daño celular (A, B y C respectivamente). Se comparan los valores obtenidos en heridas control (●) (ajuste, línea sólida) y en el modelo de cicatrización sin daño celular (□) (ajuste, línea punteada). △L corresponde a la distancia migrada, como se define en Materiales y métodos, sección 3.3. El índice de proliferación (PI) es definido como la cantidad de núcleos que incorporan BrdU por mm de herida. El índice de apoptosis (AI) es definido como la cantidad de cuerpos apoptóticos (AB) por mm de lesión. En **A** y **B** se presentan los resultados promedio ± SD. En **C** se presentan los resultados individuales sin promediar.

En su conjunto, estos resultados son consistentes con los presentados anteriormente en la sección 4.3, reafirmando que en células de BCE en cultivo la FCW tiene escasa o nula participación en la migración durante la cicatrización pero cumple un rol fundamental en el desencadenamiento de la proliferación y la inhibición de la apoptosis.

4.6. Inhibición de la apoptosis en monocapas indemnes mediante incubación con ATP

En diversos trabajos se ha relacionado a la activación de receptores purinérgicos (tanto metabotrópicos como inotrópicos) con la inducción de la muerte celular regulada, como por ejemplo en la degeneración macular donde la liberación masiva de ATP activa los receptores $P2X_7$ induciendo apoptosis dependiente de activación de caspasa 9 y traslocación de AIF al núcleo, o en co-cultivos de microglía y astrocitos, en los que la activación de receptores $P2Y_6$ en la microglía induce la liberación de óxido nítrico que provoca la apoptosis en astrocitos (Notomi et al., 2013) (Quintas et al., 2014). Sin embargo, otras publicaciones sugieren que la activación de este tipo de receptores puede inhibir la muerte celular, como por ejemplo en plaquetas de ratón, en las que la estimulación del $P2Y_{12}$ inhibe la apoptosis por inactivación de BAK/BAX en forma dependiente de PI3K, o en cáncer colorrectal de ratón donde la acción de los agonistas sobre $P2Y_6$ provoca estabilización de la fosforilación de XIAP mediada por AKT/PKB (Zhang et al., 2013) (Placet et al., 2018).

Asimismo, como se menciona en la Introducción (sección 1.2.2) existe amplia evidencia de que la propagación de la FCW depende de la liberación de ATP para activar de forma autócrina y parácrina los receptores purinérgicos, tanto en cicatrización de células en cultivo, en tejidos como el endotelio de aorta o incluso en la regeneración de hígado de rata (Hinman et al., 1997) (Klepeis et al., 2001) (Sung et al., 2003) (Weinger et al., 2005) (Leiper et al., 2006) (Shabir and Southgate, 2008) (Berra-Romani et al., 2008) (Block et al., 2010) (Handly and Wollman, 2017). Como se muestra en las secciones 4.1, 4.2 y 4.4 en heridas en células de BCE en cultivo la FCW también depende de la liberación de ATP (Chifflet et al., 2012) (Justet et al., 2016) (Justet et al., 2019). De este modo, decidimos estudiar si la activación de receptores purinérgicos con ATP en forma aislada de otras señales que ocurren durante la cicatrización, es capaz de generar un efecto preventivo para diferentes estímulos de RCD.

Para emular el estímulo protector de la apoptosis generado por la FCW incubamos las monocapas de BCE en cultivo confluentes e indemnes durante 2 min con ATP 100 μM como se describe en Materiales y métodos. Considerando que resulta difícil generar un

estímulo de apoptosis de características moleculares idénticas o muy similares a las desarrolladas durante la cicatrización, optamos por probar con tres diferentes métodos de inducir muerte por apoptosis: 1) inducción de apoptosis caspasa dependiente generado mediante daño genotóxico por incubación con etoposido, 2) inducción de apoptosis caspasa independiente mediante reducción del pH citosólico por incubación con HMA y 3) inducción de apoptosis provocada por daño oxidativo mediante incubación con etanol. En los tres procedimientos, seguido al tratamiento con ATP se incubó durante 24 horas con los agentes inductores de apoptosis, etoposido 150 μM, HMA 80 μM o etanol 2.5 %v/v.

Como se observa en las Figuras 4.6 y 4.8, las monocapas incubadas con agentes apoptóticos presentan índices de apoptosis (AI, Apoptotic Index) que triplican o cuadruplican lo observado en monocapas control. Sin embargo, la pre-incubación con ATP provoca una reducción significativa en el AI, de aproximadamente 50% para las monocapas tratadas con etoposido (Figura 4.6-A y B). Para evaluar el rol del calcio en el estímulo anti-apoptótico generado por el ATP, se inhibió el incremento de calcio utilizando la misma estrategia que para la FCW, combinando el uso de CPA y EGTA como se describe en Materiales y Métodos. Como se puede observar, la inhibición del incremento de calcio citosólico revierte por completo el efecto protector del ATP (Figura 4.6-A). Por otra parte, la incubación con PPADS (a la concentración utilizada, inhibidor de $P2X_{1,\ 2,\ 3\ y\ 5}$ y los $P2Y_{1\ y\ 13}$) no provoca cambios significativos en el nivel del AI respecto a la incubación con ATP sin el inhibidor (Figura 4.6-B).

Con el propósito de comprender mejor la cinética de inhibición de la apoptosis provocada por la activación de receptores purinérgicos se realizó una dosificación del efecto con ATP y con un agonista de los receptores P2X, el alfa-beta-metilen-ATP (α,β-MeATP). Para esto se incubaron las monocapas con diferentes concentraciones de ATP o α,β-MeATP seguido del tratamiento con etoposido (Figura 4.7). La concentración efectiva media máxima (EC_{50}) (definida como la concentración de droga a la cual se obtiene una respuesta del 50% respecto al máximo y mínimo) calculado para ambos agonistas, ATP y α,β-MeATP, es de 19.19 y 112.44 μM respectivamente. Asimismo, como se observa en el gráfico de la Figura 4.7, el efecto inhibitorio máximo del α,β-MeATP puede alcanzar sólo un ~50% de la inhibición de la apoptosis que produce el

ATP, lo que sugiere que por lo menos la mitad del fenómeno provocado por dicho nucleótido es atribuible a receptores metabotrópicos.

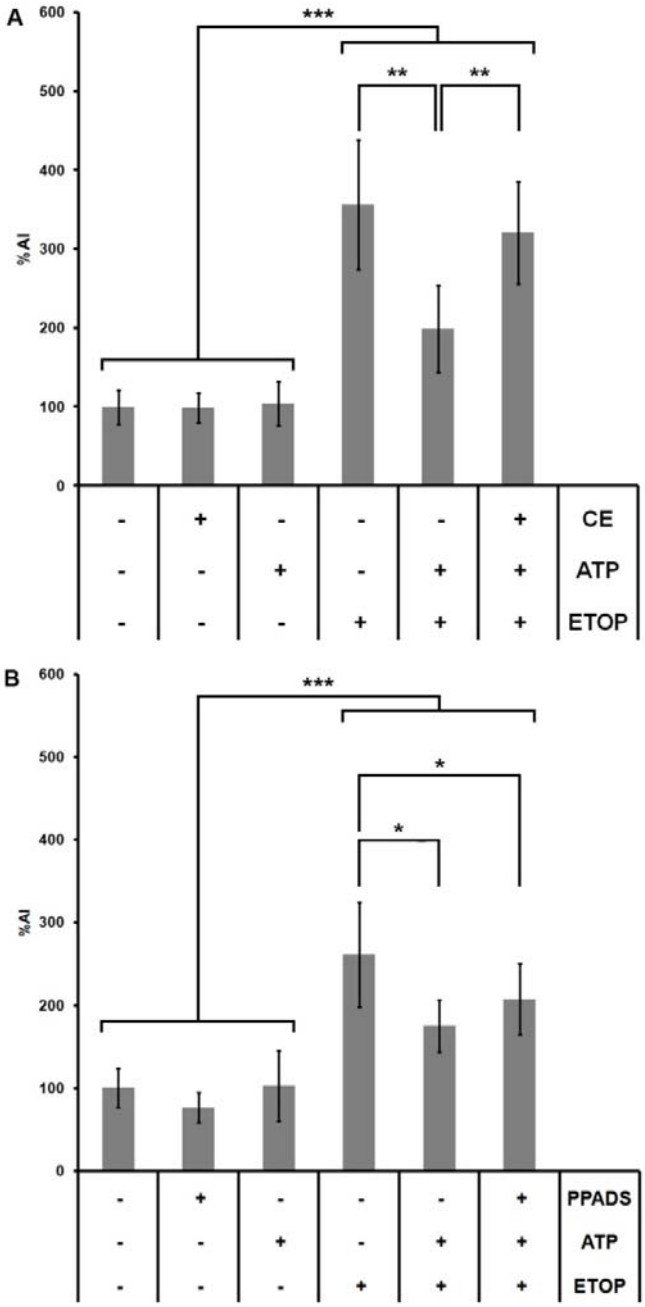
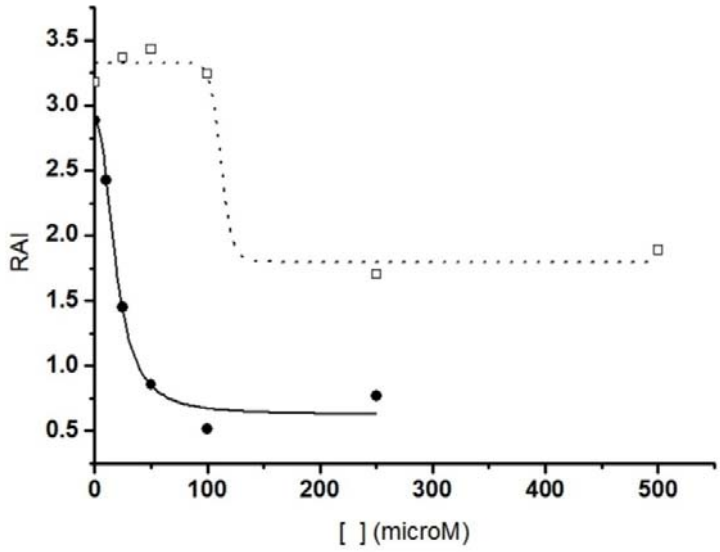


Figura 4.6. Efecto protector de la apoptosis mediado por ATP en monocapas indemnes de células de BCE en cultivo. Modelo de apoptosis caspasa dependiente. La inhibición de la apoptosis fue generada por incubación durante 2 min con ATP 100 μM. La apoptosis caspasa dependiente fue inducida por incubación durante 24 horas con el agente genotóxico etoposido (ETOP) 150 μM. El incremento de calcio fue inhibido utilizando CPA y EGTA (CE) (A) y los receptores purinérgicos $P2X_{1,\ 2,\ 3\ y\ 5}$ y los $P2Y_{1\ y\ 13}$ con PPADS (B). (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.



	Min	Max	EC50	R^2	Inhib. max. (Max - Min)
ATP	0.622±0.121	2.870±0.151	19.19±2.81	0.97513	2.248±0.271
α,β-MeATP	1.798±0.149	3.327±0.100	112.4±1.7x10^{-7}	0.95758	1.529±0.249

Figura 4.7. Dosificación de la respuesta anti-apoptótica por incubación con ATP y α,β-MeATP (● y □ respectivamente). La apoptosis se expresó en forma relativa respecto al control (RAI, Relative Apoptotic Index) ($\frac{AIx-AIcontrol}{AIcontrol}$). Los resultados presentados son los valores promedio de tres experimentos realizados por cuadruplicado. Se incluye una tabla con los parámetros calculados por ajuste a la ecuación siguiente, donde se expresa la inhibición máxima relativa (Inhib. max) definida como la diferencia entre el máximo y mínimo.
$y = Min + \frac{Max-Min}{1+\left(\frac{x}{EC50}\right)^{-HC}}$.

Por otra parte, en los experimentos de apoptosis caspasa independiente y apoptosis por daño oxidativo se observa que la pre-incubación con ATP reduce el AI hasta un 60% para las tratadas con HMA (Figura 4.8-A) y hasta un 100% en las tratadas con etanol que retornan a los valores control (Figura 4.8-B). Sin embargo, a diferencia del modelo de apoptosis caspasa dependiente inducido por etoposido, el efecto de la incubación con CPA y EGTA sobre la apoptosis es parcial en las monocapas tratadas con HMA o con etanol (la diferencia del AI es significativa respecto a las monocapas tratadas exclusivamente con el agente apoptótico). Es decir, que en estos tratamientos el ATP tiene un efecto protector (aunque menor) aún cuando no se desencadena incremento de calcio.

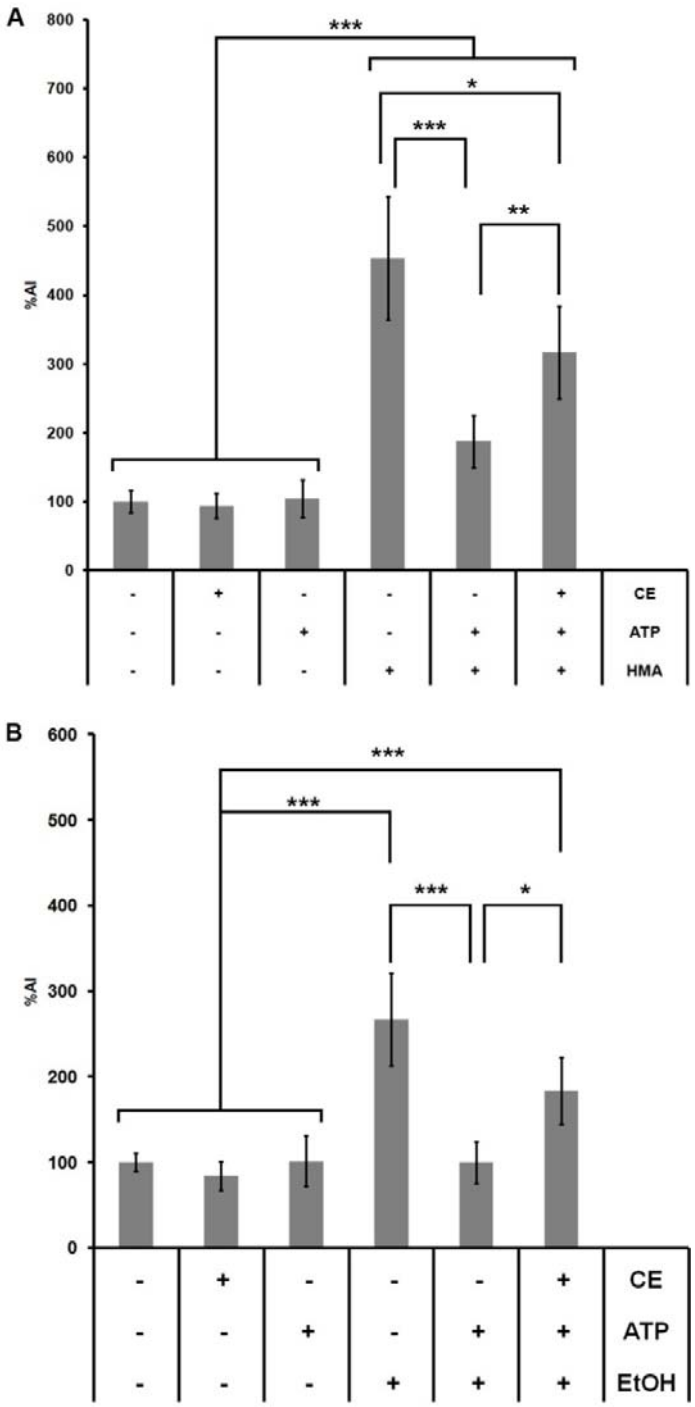


Figura 4.8. Efecto protector de la apoptosis mediado por ATP en monocapas indemnes de células de BCE en cultivo. Modelo de apoptosis caspasa independiente (A) y apoptosis provocada por daño oxidativo (B). La inhibición de la apoptosis fue generada por incubación durante 2 min con ATP 100 μM. La apoptosis caspasa independiente fue inducida por incubación durante 24 horas con el inhibidor del intercambiador Na^+/H^+, el HMA 80 μM. La apoptosis provocada por daño oxidativo fue inducida por incubación durante 24 horas con etanol (EtOH) 2.5%v/v. El incremento de calcio fue inhibido utilizando CPA y EGTA (CE). (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ y (***) $p < 0.001$.

Estos resultados sugieren que en monocapas de células de BCE en cultivo, la estimulación breve de receptores purinérgicos puede desencadenar señales anti-apoptóticas dependientes e independientes del incremento de calcio citosólico que protegen a las células de diferentes tipos de muerte celular incluyendo apoptosis caspasa dependiente e independiente, así como apoptosis inducida por daños genotóxicos, disminución de pH o estrés oxidativo. Asimismo, los resultados sugieren que el efecto anti-apoptótico del ATP es mediado en parte, pero no exclusivamente por el incremento de calcio, que a su vez es provocado por la activación de receptores tanto metabotrópicos como ionotrópicos.

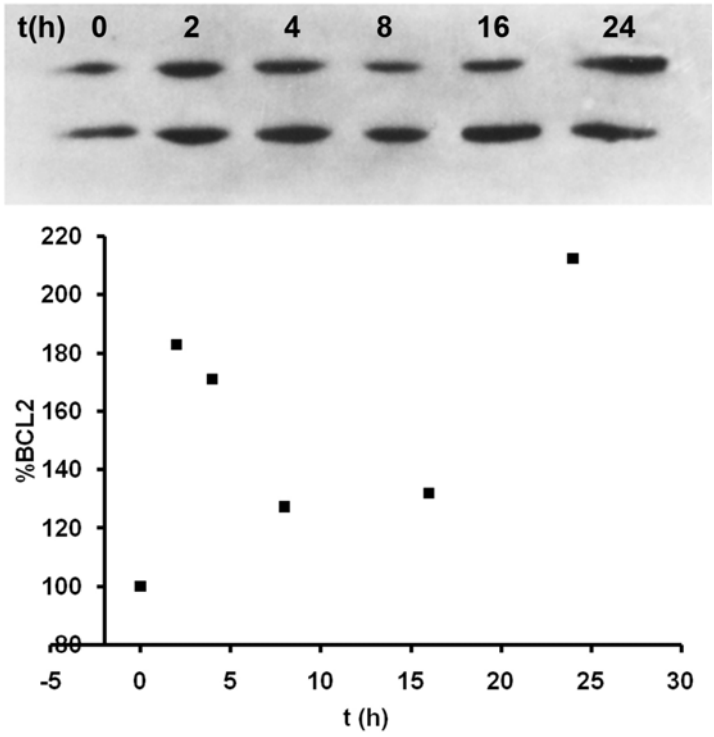


Figura 4.9. Cambios de expresión de BCL2 en monocapas indemnes de células de BCE, inducidos por incubación con ATP 100 µM durante 2 min. Se observa el Western blot específico de BCL2 y el porcentaje de expresión de BCL2 relativa al control (100%) (para cada tiempo se grafica la densidad integrada de ambas bandas sumadas, en relación porcentual al control). La figura corresponde a un experimento individual.

Para comenzar a conocer las vías moleculares moduladas por el efecto anti-apoptótico del ATP, estudiamos mediante Western blot la expresión de la proteína anti-apoptótica BCL2. Para esto incubamos las monocapas indemnes con ATP 100 µM (concentración a la cual se alcanza máxima efectividad según nuestros resultados anteriores

presentados en la Figura 4.7). Observamos que el ATP induce dos etapas de incremento de BCL2 (Figura 4.9). Es importante señalar que estos resultados son preliminares y deben ser repetidos para poder hacer el análisis estadístico correspondiente y determinar si existen diferencias significativas. Inicialmente se observa un rápido incremento de la expresión de BCL2 alcanzando un pico a las 2 horas para luego disminuir hasta las 8 horas, seguido de un nuevo incremento hasta por lo menos 24 horas luego de provocado el estímulo de los receptores purinérgicos. Cabe destacar que la variación de expresión de BCL2 en el tiempo, es similar a la tasa de apoptosis observada durante la cicatrización. Esto es interesante de confirmarse estos resultados porque sugerirían que el ATP que desencadena la FCW podría ser responsable de inhibir la apoptosis a través de la inducción del incremento de expresión de BCL2.

5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En esta tesis hemos presentado resultados que han contribuido a conocer las características de la onda fugaz de calcio y que podrían contribuir a comprender su rol en la cicatrización. Un aspecto particularmente novedoso de estos hallazgos es el efecto inhibidor de la apoptosis que produce la FCW. Como se demuestra en este trabajo, durante la cicatrización de células de BCE en cultivo se producen dos etapas de apoptosis en el borde de la herida, ambas inhibidas por la onda fugaz. Asimismo, hemos encontrado que dicho efecto sobre la apoptosis temprana es dependiente de las oscilaciones de calcio, mientras que la apoptosis tardía es independiente, indicando que la FCW inhibe ambas etapas de muerte celular por mecanismos al menos parcialmente diferentes.

5.1. Rol de la FCW sobre la migración

Teniendo en consideración la gran variedad de respuestas que pueden ser moduladas a través de cambios en la concentración de calcio, el análisis del rol de la FCW requiere de un método por el cual se pueda inhibir el incremento citosólico de calcio de forma reversible, de tal modo de no afectar la homeostasis de dicho catión durante toda la cicatrización. Como se observa en los resultados (Figura 2 en el artículo II), el uso de ácido ciclopiazónico y EGTA permite inhibir la onda de forma reversible, a diferencia de la tapsigarguina, cuyo efecto perdura luego de removida la droga del medio extracelular. De este modo, fue posible estudiar el rol de la FCW sobre diversos aspectos de la cicatrización, como la velocidad de migración, la proliferación y la muerte celular sin alterar la homeostasis del calcio de forma prolongada.

A diferencia de lo observado en células de endotelio de arteria pulmonar de bovino y en epitelio de córnea de ratón (Tran et al., 1998) (Leiper et al., 2006), en células de BCE en cultivo la inhibición reversible de la FCW no provoca grandes cambios en la velocidad de cicatrización (Figura 5 en el artículo I) (Chifflet et al., 2012). En forma consistente, tampoco se ve afectada la onda de sodio, la onda lenta de calcio y el aumento de expresión de ENaC en el borde de la herida (cuya inhibición disminuye un 60% la velocidad de cicatrización), (Figura 4 y 5 en el artículo I). Las diferencias observadas

entre nuestros hallazgos inhibiendo la FCW en forma reversible y los obtenidos por Tran y colaboradores pueden deberse a que en dicho trabajo se evalúa la tasa de cicatrización en un lapso de 2 horas, desde 1 hasta 3 horas luego de realizada la herida (Tran et al., 1999). Este rango de tiempo coincide precisamente con el período de mayor muerte celular regulada (RCD, "Regulated Cell Death") producida en la primera etapa de apoptosis durante la cicatrización de monocapas de BCE en cultivo. Si las etapas de apoptosis observadas en células de BCE también ocurren durante la cicatrización del epitelio de córnea es posible que la diferencia en la tasa de cicatrización durante este período se deba en parte a la muerte y desprendimiento de una sub-población de las células del borde de la herida y no sólo a la migración de las células. Asimismo, en los trabajos de Leiper y colaboradores se utiliza la tapsigarguina para inhibir la SERCA, pero como se mencionó en la Introducción, se trata de un inhibidor irreversible y un inductor de apoptosis (Leiper et al., 2006). Los autores realizan controles de la droga similares a los nuestros, donde se incuban las células previamente a la herida en condiciones idénticas a la inhibición de la FCW, seguidos de lavado. Sin embargo, en nuestros experimentos realizamos esta incubación 30 min antes de realizar la lesión mientras que en el grupo de Leiper y colaboradores se realiza 4 horas antes. Este tiempo podría ser suficiente para la metabolización de la droga o para desarrollar una respuesta compensatoria como la neo-síntesis de bombas y canales de membrana.

Por otra parte, los resultados de migración en el modelo de cicatrización sin daño celular son consistentes con lo anterior. En este modelo, no se produce FCW debido a la falta de daño celular o estímulo mecánico. Sin embargo, cuando se remueve la barrera física, las células de la monocapa migran a una velocidad similar a la observada en la herida en ausencia de ECM a partir de las 8 horas de generada la lesión y también presentan incremento de expresión de ENaC en el borde de la monocapa así como onda de sodio y SCW (Figuras 4.3, 4.4 y 4.5-A). La principal diferencia en relación a la migración entre la herida control y el modelo sin daño celular ocurre desde 0 a 8 horas luego de realizada la lesión. En este período se observa una mayor tasa de cierre de la brecha en el control. Esto podría explicarse porque en el control las células migran inicialmente sobre matriz extracelular cuya presencia puede inducir una velocidad de cicatrización de hasta 3 a 5 veces mayor. Asimismo, en el modelo sin daño celular, antes de la remoción del Parafilm, las células del borde de la herida ya han desarrollado un cordón de actina grueso y están aparentemente preparadas para migrar como lo

sugiere, la despolarización del PMP y el incremento de calcio y de sodio observados en dichas células (Figura 4.2). Sin embargo, al remover el Parafilm las células deben migrar de la matriz al vidrio y la presencia del cordón de actina podría dificultar el proceso y explicar el retraso observado en el modelo.

En conjunto los resultados indican que en células de BCE en cultivo la ausencia de la FCW no es un impedimento para la migración y los fenómenos asociados (despolarización del PMP, onda de sodio, SCW e incremento de la expresión de ENaC). Como se mencionó, la tasa de migración en el modelo de cicatrización sin daño celular sólo difiere a la de la herida en las primeras 8 horas de cierre. Es destacable que, los resultados de Block y colaboradores en células de epitelio de córnea de conejo en cultivo, en un modelo de cicatrización sin daño celular con bandas de agarosa similar al nuestro, no sugieren diferencias en la velocidad de cierre respecto a la herida control (Block et al., 2004). Asimismo, en células de epitelio mamario de ratón en cultivo, Murrell y colaboradores han desarrollado un modelo sin daño celular en base a micro-fluido laminar, donde también se obtienen resultados que sugieren que la tasa de cierre no difiere significativamente respecto a la lesión (Murrell et al., 2011). Como se discutió en el párrafo anterior, estas diferencias entre nuestro trabajo y los de Block y Murrell pueden estar vinculadas a la presencia de la matriz extracelular ("basement membrane") gruesa generada en cultivo por las células de endotelio de córnea de bovino.

5.2. Rol de la FCW sobre la proliferación

En relación a la proliferación durante la cicatrización, se detectan signos de división celular (puesta en evidencia por la incorporación de BrdU durante la fase de síntesis) desde 12 horas luego de realizada la herida, alcanzando un máximo a las 20 horas, en forma independiente de la distancia migrada o la velocidad (Figura 7 en el artículo II y Figura 5.5-B). Sin embargo, en las células que migran sobre matriz se alcanza un índice de proliferación máximo entre 4 y 5 veces superior al observado en las células que migran en ausencia de matriz. Esta diferencia podría explicarse teniendo en cuenta que en algunos tipos celulares la proliferación requiere de que la célula alcance un área límite, por encima de la cual la célula es capaz de proliferar (Streichan et al., 2014).

Como sugieren resultados previos de nuestro laboratorio, en las monocapas que cicatrizan por migración lamelipódica se produce mayor desorganización del citoesqueleto y uniones intercelulares, y las células en presencia de matriz se explayan más que en ausencia de la misma (Grasso et al., 2007). Esta diferencia en el área alcanzada en las células que migran podría explicar las diferencias en el índice de proliferación observado entre la cicatrización con o sin ECM.

Nuestros hallazgos muestran que la inhibición reversible de la FCW provoca una disminución significativa del índice de proliferación de 30 % aproximadamente, tanto en presencia como ausencia de ECM (Figura 7 en el artículo II). En principio, esta disminución sugiere que la FCW es responsable de inducir un tercio de la proliferación durante la cicatrización. Sin embargo, en el método utilizado para evaluar la proliferación se evidencian las células que entran en fase de síntesis de DNA durante una ventana de tiempo de 3 h en cada punto del gráfico, pero no la proliferación acumulada, por lo que se podría estar subestimando el efecto de la FCW sobre la proliferación (Figura 7 en el artículo II). Asimismo, la incubación con CPA provoca en forma instantánea un incremento de la concentración de calcio muy breve, de intensidad menor a la onda fugaz y diferente cinética, que podría generar suficiente estímulo para inducir algo de proliferación, enmascarando de este modo la importancia de la FCW. En forma consistente con lo anterior, en el modelo de cicatrización sin daño celular, donde no se produce la FCW o liberación de factores solubles, se observa un 80% de disminución de la proliferación aproximadamente (Figura 4.5-B). Esta diferencia notoria con respecto a los datos de proliferación inhibiendo la FCW, pueden deberse a las limitaciones técnicas inherentes recién mencionadas, lo que podría sugerir un rol más importante de la FCW sobre este proceso celular. También podría explicarse por la liberación de otros factores desde las células dañadas, que estimulen la proliferación en forma parácrina.

De este modo, al igual que en células de endotelio de arteria pulmonar, la FCW parece ser determinante en el desencadenamiento de la proliferación durante la cicatrización de células de endotelio de córnea (Tran et al., 1998) (Justet et al., 2016). Sin embargo, el análisis de las tasas de proliferación y apoptosis sugieren que los mecanismos que modulan estos procesos celulares en células de BCE, son diferentes a los encontrados en cicatrización de piel y regeneración de hígado en ratón (Li et al., 2010). El grupo de Li y

colaboradores, encuentra que la apoptosis caspasa dependiente media la activación de la PLA2 conduciendo en última instancia a la síntesis y liberación de PGE2 que induce la proliferación. En cambio, nuestros resultados muestran que la duplicación de la apoptosis caspasa dependiente durante la cicatrización, provocada al inhibir la FCW, no conduce al incremento de la proliferación sino que se observa simultáneo a la disminución de la proliferación. Esto sugiere que en células de BCE en cultivo la apoptosis no genera señales que inducen proliferación.

5.3. Muerte celular regulada durante la cicatrización y rol de la FCW

Con el fin de comprender mejor el rol de la FCW, hemos estudiado y caracterizado la muerte celular durante la cicatrización de células de BCE en cultivo. De este modo, encontramos que durante la cicatrización transcurren dos etapas de muerte celular apoptosis caspasa dependiente (Figuras 3 y 4 en el artículo II). La primera ocurre durante las primeras 6 a 8 horas de cicatrización, presenta un máximo a las 2 horas y es independiente de la distancia migrada. La segunda etapa es detectable a partir de las 6 a 8 horas y es directamente proporcional a la distancia migrada. Nuestros resultados sugieren que la inhibición reversible de la FCW provoca una duplicación del índice de apoptosis en ambas etapas, pero es revertida si se incuba la monocapa con ATP provocando un incremento de concentración del calcio citosólico (Figura 5 en el artículo II).

Asimismo, nuestros resultados emulando la FCW en monocapas indemnes mediante incubación durante 2 min con ATP muestran que este estímulo genera un efecto protector de la RCD capaz de inhibir diferentes tipos de estímulos apoptóticos por un lapso de por lo menos 24 horas (Figuras 4.6 a 4.8). La inhibición del incremento de calcio en estos experimentos, revela que los principales mediadores del efecto del ATP como protector de la RCD son las señales dependientes de calcio. Sin embargo, la inhibición del incremento del calcio no es suficiente para evitar por completo el efecto protector del ATP sobre la muerte celular inducida por hexametilen amiloride (HMA), sugiriendo que este nucleótido puede estimular la sobrevivencia celular también por mecanismos independientes de calcio (Figura 4.8).

La dosificación del efecto anti-apoptótico del ATP y del α,β-MeATP (agonista de receptores P2X) revela un efecto máximo para el α,β-MeATP de sólo un 50 % respecto al ATP (Figura 4.7). Estos resultados sugieren que parte del efecto protector del ATP puede ser explicado por la actividad de receptores ionotrópicos y parte por receptores metabotrópicos. Asimismo, los valores de EC_{50} obtenidos para ambos agonistas son de ~20 y ~110 μM respectivamente. Comparando estos valores con los encontrados en la bibliografía se puede observar que el EC_{50} para el α,β-MeATP es consistente únicamente con la participación del receptor $P2X_2$ o $P2X_4$ ($EC_{50\ \alpha,\beta\text{-MeATP}} > 100$ y 4-300 μM respectivamente) el resto de los receptores P2X presentan valores de EC_{50} para el α,β-MeATP de un orden de magnitud inferior como máximo o en el caso de $P2X_7$ un $EC_{50} > 300$ μM (Coddou et al., 2011b). Asimismo, de acuerdo a la bibliografía, los receptores P2 con valores de EC_{50} para el ATP con diferencias no mayores a un orden de magnitud respecto al obtenido experimentalmente ($2 < EC_{50} < 200$ μM) son únicamente los $P2X_{2\ y\ 4}$ y el receptor $P2Y_{11}$ (EC_{50} 2-8, 1-10 y ~15 μM respectivamente) (Jacobson et al., 2009) (Coddou et al., 2011b) (von Kugelgen and Hoffmann, 2016) . Considerando estos resultados y los obtenidos con PPADS que descartan entre otros al $P2X_2$ (Figura 4.6-B), es posible que los receptores $P2X_4$ y $P2Y_{11}$ sean los responsables de mediar el efecto anti-apoptótico del ATP. Sin embargo, son necesarios más estudios para poder llegar a una conclusión sólida al respecto.

Por otra parte, los resultados preliminares expuestos en la sección 4.6 sugieren que la incubación con ATP induce un incremento de expresión de la proteína anti-apoptótica BCL2, en dos etapas de distribución temporal similares a las etapas de muerte celular observadas durante la cicatrización (Figura 4.9). Teniendo en cuenta los hallazgos de apoptosis inhibiendo la FCW y en monocapas indemnes incubadas con ATP, de confirmarse los cambios de expresión de BCL2, podría sugerir que el efecto protector de la onda fugaz es en parte ejercido a través de dicha proteína.

5.4. Cambios de expresión de la LEI durante la cicatrización

Con el propósito de comprender mejor las vías moleculares que participan de la apoptosis durante la cicatrización de células de BCE en cultivo estudiamos la expresión del inhibidor de elastasa leucocitaria (LEI, "Leucocyte Elastase Inhibitor") en este

sistema. Como se expuso en la sección 4.4 de Resultados y en el artículo IV (Justet et al., 2015), durante la cicatrización se produce un incremento de la expresión de la LEI en el borde de la lesión, que luego retorna a su valor basal tras el cierre de la herida (Figura 1 a 3 en el artículo III). Como se aprecia en las imágenes de fluorescencia (Figuras 1, 2 y 6 en el artículo III), a pesar del incremento de su expresión, no se observa traslocación de la LEI desde el citosol al núcleo.

De acuerdo a los antecedentes, el hecho de que no se observe traslocación al núcleo tanto durante la cicatrización como en ninguno de los tratamientos sugiere que no se produce el cambio de función de dicha enzima en L-DNAsa II a pesar de que se determinó que existe disminución del pH_c en el borde de la herida (Figura 6 en el artículo III) (resultados obtenidos por otros coautores). Considerando que la presencia de la LEI en el núcleo sugiere el cambio de actividad de la proteína en L-DNAsa II y una muerte por apoptosis caspasa independiente, TUNEL negativo, la localización citosólica de la LEI es consistente con nuestros hallazgos previos de apoptosis caspasa dependiente durante la cicatrización. De este modo, es posible que la función del incremento de la LEI durante la cicatrización esté vinculado a su actividad como anti-proteasa. Los resultados de inhibición de la FCW sugieren que estas señales de calcio no modulan la expresión de la LEI durante la cicatrización (Figura 4 en el artículo III). Sin embargo, los experimentos utilizando NAC (un "scavenger" de radicales libres) sugieren que el incremento de expresión de LEI es inducido por la formación y liberación de ROS durante los primeros minutos de realizada la herida (Figura 5 en el artículo III) (resultados obtenidos por otros coautores de dicho artículo).

De este modo, los resultados de incremento de expresión de la LEI en el borde de la herida durante la cicatrización, no son sugestivos de su participación como DNAsa en el desencadenamiento de la apoptosis. Se requieren más estudios para determinar qué rol cumple el incremento de expresión de esta proteína. Es posible que la función de la LEI en la cicatrización de células de BCE esté vinculada a la actividad anti-proteasa. En varios trabajos sobre cicatrización de piel, se ha encontrado incremento de serpinas del grupo B que ha sido interpretado como una forma de protección contra la respuesta inflamatoria (Pollins et al., 2007) (Roupe et al., 2010) (Uchiyama et al., 2012). Recientemente se ha encontrado en células de epitelio de colon de ratón en cultivo, que la incubación con H_2O_2 (a concentraciones producidas durante la cicatrización) provoca

un incremento de la expresión de elastasa, una proteasa capaz de ser inhibida por la LEI, y las evidencias sugieren que dicha actividad protege a las células del daño oxidativo (Uchiyama et al., 2012). Asimismo, el grupo de Torriglia y colaboradores ha encontrado evidencia que indica que en modelos de apoptosis caspasa dependiente inducido por etopósido en células BHK-21 en cultivo, la LEI presenta un efecto protector de la muerte celular al inhibir a la catepsina D liberada desde los lisosomas que de otro modo activaría la procaspasa 8 (Padron-Barthe et al., 2008). Como se menciona en el artículo IV, en nuestros resultados de Western blot se obtienen bandas de LEI en pesos moleculares consistentes con su asociación a proteasas como elastasa y posiblemente catepsina D. De este modo, es posible que la función de la LEI en la cicatrización de células de endotelio de córnea sea la protección contra la apoptosis caspasa dependiente vinculada a la actividad de proteasas como la elastasa y catepsina D. Otra posibilidad es que la LEI tenga un rol sobre la migración durante la cicatrización aunque los antecedentes son contradictorios. En varias células cancerígenas se ha obtenido evidencia de que el incremento de expresión de la LEI determina un aumento significativo de la migración celular mientras que en otras líneas se ha obtenido el resultado inverso (Tseng et al., 2009) (Huasong et al., 2015).

5.5. Respuesta oscilatoria durante la FCW y su rol en la apoptosis durante la cicatrización

Considerando que, como se mencionó en la Introducción, se han encontrado respuestas oscilatorias durante la FCW tanto en epitelios in situ como en células en cultivo, hemos caracterizado este fenómeno en monocapas de BCE en cultivo. Es así, que hemos encontrado que en este sistema más del 50 % de las células tienen respuesta oscilatoria durante dicha onda (Figura 4 en el artículo IV). Asimismo, la frecuencia oscilatoria aumenta desde el borde de la lesión hacia el centro de la monocapa, hasta alcanzar un máximo aproximadamente en la décima fila, a ~300 μm (Figura 2 en el artículo IV). Nuestros hallazgos sugieren que la señal que modula las oscilaciones es capaz de difundir a través de una brecha pre-existente en la monocapa (Figura 3, en el artículo IV). Esto es consistente con la liberación de ATP al medio extracelular y su difusión desde el borde de la herida como se ha planteado en nuestros trabajos previos (Figura 2 en el artículo II) (Chifflet et al., 2012) (Justet et al., 2016) y en trabajos de otros autores

(Shabir and Southgate, 2008) (Handly and Wollman, 2017). Como se observa en la Figura 5 del artículo IV, la utilización del inhibidor de ecto-nucleotidasas ARL-67156 no provoca cambios significativos en la amplitud de la señal pero produce una disminución del tiempo de aparición del primer pico así como un incremento significativo en la frecuencia oscilatoria (número de picos) a partir de la sexta fila aproximadamente. Esto sugiere que parte de los mecanismos que median las oscilaciones de la FCW dependen de la activación de receptores purinérgicos por el ATP.

Por otra parte, los resultados con CPA y EGTA revelan que tanto el calcio almacenado en el retículo endoplásmico como el proveniente del medio extracelular son necesarios para la respuesta oscilatoria (Figura 5 en el artículo IV). No obstante, el tratamiento con CPA provoca una disminución de amplitud de la señal, mientras que la incubación con EGTA sólo provoca una disminución significativa del número de picos a partir de la fila 4 hasta aproximadamente la 12. Estos hallazgos son consistentes con los obtenidos por el grupo de Berra-Romani et al., que encuentran que en endotelio de aorta de rata la respuesta oscilatoria también depende del calcio del retículo endoplásmico y del medio extracelular (Berra-Romani et al., 2012). En dicho modelo los investigadores obtienen resultados que sugieren que durante la FCW la apertura de hemicanales libres produce un incremento del sodio citosólico que genera el cambio de actividad del intercambiador NCX a modo reverso, permitiendo la entrada de calcio favorecida por la salida de sodio. Sin embargo, la incubación con sondas específicas para el sodio no ha revelado cambios significativos de la concentración de este catión durante la FCW (datos no mostrados). De este modo, nuestros resultados indican que en monocapas de BCE en cultivo la respuesta oscilatoria se produce por mecanismos similares aunque no completamente idénticos a los obtenidos por el grupo de Berra-Romani en endotelio de aorta de rata.

Por otra parte, como se mencionó previamente, se evaluó el efecto de la incubación con U73122 (inhibidor de la PLC), PPADS (inhibidor de $P2X_{1,2,3\ y\ 5}$ y $P2Y_{1\ y\ 13}$) y La^{3+} (inhibidor de canales ORAI y conexones) sobre las oscilaciones de la FCW. Los resultados con U73122 (Figura 6 en el artículo IV) son consistentes con la participación de receptores P2Y que median la activación de PLC, liberando IP3. La unión de esta molécula de señalización con sus receptores específicos en el retículo endoplásmico conduce a la liberación de calcio desde estas reservas que participan tanto en la señal

sostenida como oscilatoria. Asimismo, la incubación con PPADS no provoca cambios significativos en la amplitud de la señal pero disminuye la frecuencia oscilatoria, lo que sugiere que esta respuesta puede depender de la entrada de calcio extracelular mediada por receptores P2X. Por otro lado, la falta de efecto de la incubación con La^{3+} sobre la FCW, sugiere que la entrada de calcio extracelular no depende de conexones o canales ORAI.

Las estrategias de incubación con EGTA y ARL-67156 permiten estudiar el efecto de alterar la frecuencia oscilatoria (disminuyéndola o incrementándola respectivamente) sobre la apoptosis durante la cicatrización sin afectar en forma significativa la amplitud. Utilizando estos tratamientos hemos encontrado que la frecuencia oscilatoria se correlaciona de forma inversa con la muerte celular durante la primera etapa de apoptosis. Es decir, que la disminución del número de picos mediante incubación con EGTA provoca un aumento del índice apoptótico, mientras que el incremento de la frecuencia oscilatoria mediado por incubación con ARL-67156 tiene el efecto inverso. Sin embargo, la segunda etapa de muerte celular no es afectada por ninguno de los dos tratamientos. Por otra parte, en monocapas indemnes incubadas con diferentes concentraciones de ATP se observa que se alcanza un máximo de número de picos promedio a una concentración de entre 50 y 75 μM (Figura 7 en el artículo IV). En forma consistente, en monocapas donde se inhibe la FCW, la incubación con diferentes concentraciones de ATP revela un efecto anti-apoptótico máximo en ~75 μM, de forma tal que se observa una correlación entre la frecuencia oscilatoria y el efecto anti-apoptótico del ATP sobre la primera etapa de muerte celular (Figura 7-C en el artículo IV). Teniendo en cuenta estos resultados podemos sugerir un modelo que se esquematiza en la Figura 5.1.

Las células dañadas liberan ATP que difunde al medio extracelular actuando de forma parácrina. El ATP podría tener tres destinos: 1) puede ser hidrolizado en ADP, AMP y finalmente adenosina y fosfato por la acción de las ecto-ATPasas (representado en verde); 2) puede activar los receptores purinérgicos metabotrópicos P2Y (representados en rosado) como se ha observado en otros modelos, lo que provoca la activación de la fosfolipasa C, la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato en diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) y la activación de los receptores de IP3 (IP3R) (representados en celeste) en el retículo endoplásmico (ER) que provocan la liberación de calcio hacia el

citosol; 3) puede inducir la apertura de canales de calcio en la membrana plasmática que permitan la entrada de este catión desde el medio extracelular. Este último efecto puede deberse a la activación de los receptores purinérgicos ionotrópicos P2X, varios de los cuales son en sí mismos canales con permeabilidad para el calcio, mientras que otros están asociados a hemicanales de panexina y modulan su apertura. Por otra parte, los resultados de velocidad de propagación de la onda en las primeras filas no pueden ser explicados por un mecanismo exclusivamente difusional. Es posible que exista algún canal de calcio dependiente de estímulo mecánico (representado en azul) que esté contribuyendo con la señal en las células más cercanas al borde de la herida. Se requieren más estudios para poder discriminar en forma precisa cuál es el mecanismo de entrada del calcio extracelular.

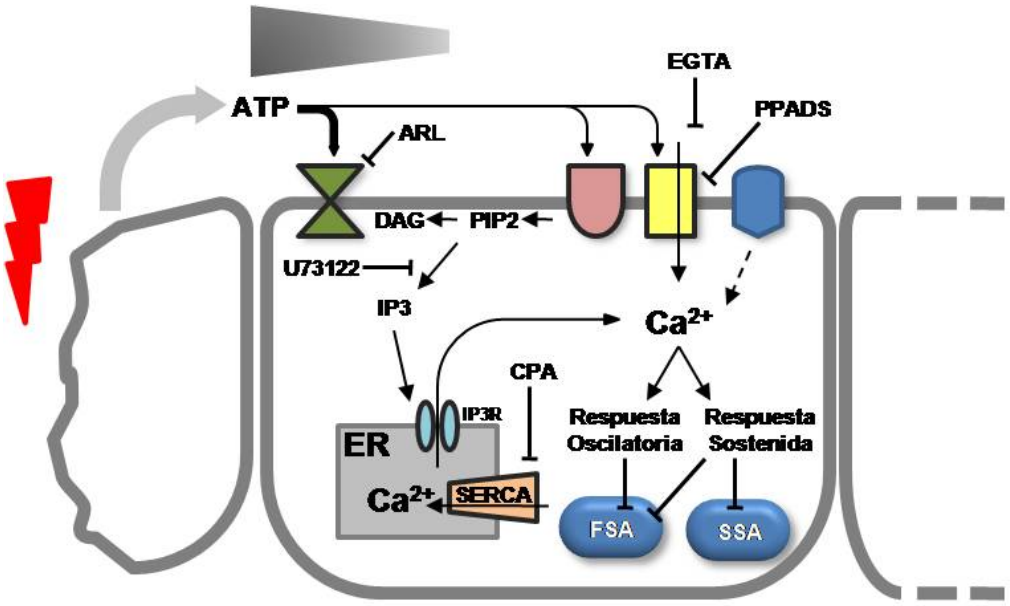


Figura 5.1. Modelo de las oscilaciones de la FCW y su rol sobre la apoptosis durante la cicatrización. El daño mecánico de la herida es representado a la izquierda en rojo. Ecto-nucleotidasas (verde), receptores P2Y (rosado), receptores P2X y canales asociados (amarillo), receptores de IP3 (celeste), otros canales de calcio no determinados (azul). FSA (First Stage of apoptosis), SSA (Second Stage of Apoptosis). Ver texto principal para otros detalles.

Como se esquematiza en el modelo de la Figura 5.1, la FCW presenta una respuesta sostenida y una oscilatoria que están superpuestas. La primera etapa de apoptosis (FSA, "First Stage of Apoptosis") es inhibida por ambos efectos. Sin embargo, la segunda

etapa de apoptosis (SSA, "Second Stage of Apoptosis") no es afectada por la respuesta oscilatoria, sólo por la respuesta sostenida.

La incubación con ARL inhibe las ecto-ATPasas, que en virtud de ser un inhibidor competitivo de baja afinidad sólo es efectivo a concentraciones intermedias. Este efecto provocaría un incremento de la respuesta oscilatoria de la FCW y la disminución del índice de apoptosis durante la FSA. En las células incubadas con EGTA, el gradiente de ATP no cambia, pero la ausencia del calcio extracelular disminuye las oscilaciones provocando incremento del índice de apoptosis durante la FSA. Finalmente, la incubación con CPA inhibe la SERCA (representada en naranja) que termina provocando el vaciamiento del ER, de tal modo que no tiene calcio disponible para responder durante la FCW aún en presencia de un gradiente normal de ATP. Como se menciona previamente en la discusión, dicho tratamiento junto con la incubación con EGTA provoca la inhibición de ambas respuestas, tanto oscilatoria como sostenida, con el consiguiente incremento del índice apoptótico durante la FSA y la SSA.

En conjunto, estos resultados sugieren que en células de BCE en cultivo la frecuencia oscilatoria del incremento de calcio asociado a la FCW determina un efecto anti-apoptótico a corto plazo. Esto es consistente con trabajos previos que muestran que el tratamiento con ARL-67156 inhibe la apoptosis de neutrófilos inducida por linfocitos T (Fabbiano et al., 2015). Asimismo, se ha encontrado que la inducción de oscilaciones de calcio en linfocitos T estimula su proliferación y sobrevivencia a través de un mecanismo que involucra al factor de transcripción NFAT y la IL2 (Randriamampita and Trautmann, 2004) (Harr and Distelhorst, 2010). Existen otros trabajos que vinculan la oscilación de calcio con la inhibición de la RCD (Cuthbertson and Cobbold, 1985) (Eckenrode et al., 2010).

Por otra parte, en varios artículos se presenta evidencia experimental que sugiere que la respuesta oscilatoria de calcio es significativamente más eficiente en la activación de proteína quinasas como la PKC y CaMKII entre otras, comparada con un incremento de calcio constante hasta una concentración igual al promedio (Larsen et al., 2004) (Salazar et al., 2008). Es así que, un incremento oscilante de calcio puede ser responsable de la activación de proteínas quinasas que in vitro requieren de $[Ca^{2+}]_c$ superiores a los compatibles con la sobrevivencia celular, como la m-calpaína (Calpaína-1) (Tompa et

al., 2001). Existen múltiples hallazgos que sugieren que la frecuencia oscilatoria de calcio constituye un código para la activación de diferentes quinasas y factores de transcripción, incluyendo las PKCs, CaMKII, Calpaínas, PhK (Glycogen Phosphorylase Kinase), MAPK, NFAT y NF-κB (Smedler and Uhlen, 2014). De esta manera, la respuesta sostenida y la oscilatoria podrían estar activando dos o más vías parcialmente independientes que favorecen la sobrevivencia celular en diferentes etapas de la cicatrización.

En resumen, en esta tesis se ha encontrado evidencia que indica que durante la cicatrización de células de BCE en cultivo existen dos etapas de apoptosis caspasa dependiente durante la cicatrización. Asimismo, presentamos resultados que indican que, la FCW no es determinante de la migración, pero es un factor muy importante en el desencadenamiento de la proliferación y la inhibición de la apoptosis. Los artículos II y IV publicados en el marco de esta tesis doctoral, sugieren que este efecto depende de la liberación de ATP al medio extracelular y su acción parácrina sobre receptores purinérgicos fundamentalmente metabotrópicos pero también ionotrópicos. La caracterización de la respuesta del calcio durante la FCW revela un comportamiento oscilatorio con una distribución característica relativa al borde de la herida. Nuestros intentos por modular la frecuencia oscilatoria han permitido encontrar dos tratamientos que provocan el incremento o la disminución significativa de la misma sin alterar la amplitud de la señal. Utilizando estas estrategias hemos obtenido resultados que sugieren que el efecto protector de la apoptosis es modulado por dos mecanismos coexistentes. Por otra parte, hemos encontrado que se produce un incremento de la expresión de la LEI en el borde de la herida provocado por la liberación de especies reactivas de oxígeno. Si bien no hemos logrado determinar la función de este incremento de la LEI, nuestra evidencia sugiere que no cumple una función pro-apoptótica.

6. PERSPECTIVAS

A partir de nuestros hallazgos aparecen nuevas interrogantes como es natural en el proceso de investigar una hipótesis. Algunas de las preguntas que nos hacemos son: ¿Cuáles son los mecanismos que desencadenan ambas etapas de apoptosis? ¿Cuál es el rol de la apoptosis durante la cicatrización? ¿Por qué mecanismos moleculares se ejecuta la muerte celular durante la cicatrización? ¿Qué mecanismos moleculares median el efecto anti-apoptótico de la FCW, tanto en forma dependiente como independiente de la respuesta oscilatoria? ¿La onda de sodio y la onda lenta de calcio tienen algún rol sobre la apoptosis durante la cicatrización? ¿Qué rol cumplen las especies reactivas de oxígeno sobre la apoptosis durante la cicatrización? ¿Cuál es el rol del incremento de la expresión de la LEI durante la cicatrización?

En relación a los mecanismos que desencadenan la apoptosis consideramos que en la primera etapa el desencadenante podría estar vinculado a la producción de un estrés intenso en las células cercanas al borde de la herida que provoca una pérdida de la homeostasis más allá de la capacidad de recuperación de la célula. Asimismo, considerando que varios autores han demostrado que durante la cicatrización se producen especies reactivas de oxígeno con funciones de señalización, es posible que el estrés oxidativo provoque la apoptosis de algunas células que circunstancialmente no tengan suficientes señales de supervivencia (Huo et al., 2009) (Niethammer et al., 2009) (van der Vliet and Janssen-Heininger, 2014) (Janda et al., 2016).

En relación a la segunda etapa de apoptosis, la proporción directa de su tasa de aparición con la distancia migrada es sugestiva de un proceso de anoikis. Este es un tipo de apoptosis intrínseca particular, desencadenada por la pérdida de contactos focales e intercelulares, así como por la remodelación del citoesqueleto de actina y microtúbulos (Pinon et al., 2008) (Cao et al., 2016). En las células inmóviles y adheridas al sustrato, las proteínas de la familia BCL2, BMF y BIM, se encuentran inactivas por su asociación al citoesqueleto de actina y microtúbulos. La remodelación de los contactos focales y uniones intercelulares provoca la disociación de estas proteínas BH3-only, que son capaces de interaccionar con BCL2 y MCL1, promoviendo su disociación de BAX y BAK lo que les permite su asociación a la membrana mitocondrial externa y el

desencadenamiento de la apoptosis mediada por MOMP (ibídem). Es esperable que cuanto mayor distancia recorra la célula, más disociación de BMF y BIM ocurra. Durante la realización de esta tesis hemos obtenido algunos resultados preliminares que sugieren muy bajo nivel de expresión de estas proteínas. Asimismo, en las imágenes de fluorescencia no se observan cambios de expresión o localización, sugiriendo que durante la cicatrización del endotelio de córnea no ocurre apoptosis de tipo anoikis, aunque se requieren más estudios para descartar esta hipótesis.

Como se mencionó en la Introducción, en diferentes tejidos y células en cultivo se ha encontrado que varias proteínas pro y anti apoptóticas cambian su nivel de expresión o fosforilación durante la cicatrización. Entre ellas se encuentran BCL2, BAX, SMAC/DIABLO, HSP27 y Akt/PKB. Asimismo, varias proteínas con sitios de fosforilación para las PKC clásicas incluyen a las proteínas anti-apoptóticas BCL2 y XIAP. Sería de gran interés determinar si existen cambios en el nivel de expresión, localización y fosforilación de varias de estas proteínas. Los análisis preliminares no sugieren cambios en BAX pero sí cambios en el nivel de expresión en BCL2 y SMAC/DIABLO, y cambios en la fosforilación tanto de BCL2 como XIAP.

En relación a la función anti-apoptótica de la FCW y su respuesta oscilatoria, se ha observado que diferentes quinasas y factores de transcripción modulados por el calcio citosólico pueden ser activados por variaciones oscilantes de calcio de forma dependiente de la frecuencia de oscilación (Smedler and Uhlen, 2014). Entre ellos se encuentran la CaMKII, calpaínas, Glicógeno Fosforilasa Quinasa, NFAT, MAPK o NF-κB. Uno de nuestros objetivos a corto plazo es determinar el rol sobre la apoptosis durante la cicatrización epitelial de algunas de las quinasas moduladas por el calcio como las PKC clásicas, la CaMKII y las calpaínas, y factores de trasncripción como NF-κB y NFAT. Tenemos resultados preliminares que sugieren que no hay cambios de expresión o localización de NF-κB durante la cicatrización, pero sí existe activación de las PKC clásicas. En particular hemos observado que en los primeros 5 minutos se observa fosforilación de sustratos de PKC en la periferia de las células del borde de la herida, mientras que desde los 5 a 20 minutos se observa localización nuclear de sustratros de PKC fosforilados.

Por otra parte, una proporción importante de los ROS producidos en la célula son generados a nivel de la cadena respiratoria en la mitocondria (mtROS). Este proceso puede ser modulado por el incremento de la concentración de calcio dependiendo del estado metabólico de la mitocondria (Gorlach et al., 2015). Cuando el potencial de membrana mitocondrial es alto, el incremento de calcio induce la disminución de la generación de ROS. Cuando el potencial de membrana mitocondrial es bajo, el incremento de calcio induce el aumento de la formación de ROS. Cuando la mitocondria es sobrecargada de calcio se produce incremento de la producción de ROS en forma independiente del estado metabólico de la mitocondria (ibídem). De este modo, es posible que tanto la FCW como la SCW estén vinculadas a la formación de ROS durante la cicatrización. Sin embargo, en el caso de la FCW nuestros resultados descartan una función pro-apoptócia, mientras que es posible que la SCW genere en parte un efecto promotor de la RCD mediado por ROS. Los ensayos preliminares sugieren que las células ubicadas en bordes (ya sean de la herida u otros, como los bordes de la laminilla) presentan mayor susceptibilidad al estrés oxidativo que el resto de la monocapa. Actualmente, tenemos como objetivo realizar estudios que nos permitan determinar si la SCW presenta algún rol sobre la apoptosis.

Finalmente, como se mencionó previamente en la Discusión, la evidencia sugiere que durante la cicatrización de células de endotelio de córnea, la LEI no cumple funciones pro-apoptóticas y podría estar inhibiendo a proteasas como la elastasa y la catepsina D. Como parte de nuestros esfuerzos a corto plazo, tenemos como objetivo determinar el rol de la LEI sobre la apoptosis y migración durante la cicatrización. En este sentido, los primeros experimentos de silenciamiento de LEI que hemos realizado, sugieren que la disminución de expresión de dicha proteína provoca un incremento del nivel de apoptosis y una reducción de la tasa de cicatrización. Asimismo, nuestras imágenes de fluorescencia sugieren un incremento de expresión de la catepsina D en el borde de la herida con una importante co-localización con LC3 (proteína que interviene en la autofagia) que incrementa y abarca más filas de células en monocapas con silenciamiento de LEI.

De este modo, esta tesis de Doctorado da continuación a una línea de investigación con múltiples e interesantes interrogantes, que esperamos comenzar a explorar.

7. BIBLIOGRAFÍA

Abe, M., Y. Yokoyama, and O. Ishikawa. 2012. A possible mechanism of basic fibroblast growth factor-promoted scarless wound healing: the induction of myofibroblast apoptosis. *European journal of dermatology : EJD*. 22:46-53.

Abreu-Blanco, M.T., J.J. Watts, J.M. Verboon, and S.M. Parkhurst. 2012. Cytoskeleton responses in wound repair. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 69:2469-2483.

Aggarwal, B.B., S.C. Gupta, and J.H. Kim. 2012. Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*. 119:651-665.

Akins, R.E., and R.S. Tuan. 1995. Ultrafast protein determinations using microwave enhancement. *Molecular biotechnology*. 4:17-24.

Altairac, S., S.C. Wright, Y. Courtois, and A. Torriglia. 2003a. L-DNase II activation by the 24 kDa apoptotic protease (AP24) in TNFalpha-induced apoptosis. *Cell death and differentiation*. 10:1109-1111.

Altairac, S., S. Zeggai, P. Perani, Y. Courtois, and A. Torriglia. 2003b. Apoptosis induced by Na+/H+ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway. *Cell death and differentiation*. 10:548-557.

Altznauer, F., S. Conus, A. Cavalli, G. Folkers, and H.U. Simon. 2004. Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 279:5947-5957.

Aoki, K., Y. Kondo, H. Naoki, T. Hiratsuka, R.E. Itoh, and M. Matsuda. 2017. Propagating Wave of ERK Activation Orients Collective Cell Migration. *Developmental cell*. 43:305-317 e305.

Appleby, P.A., S. Shabir, J. Southgate, and D. Walker. 2015. Sources of variability in cytosolic calcium transients triggered by stimulation of homogeneous uro-epithelial cell monolayers. *Journal of the Royal Society, Interface*. 12.

Arends, M.J., R.G. Morris, and A.H. Wyllie. 1990. Apoptosis. The role of the endonuclease. *The American journal of pathology*. 136:593-608.

Baroja-Mazo, A., M. Barbera-Cremades, and P. Pelegrin. 2013. The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling. *Biochimica et biophysica acta*. 1828:79-93.

Belmokhtar, C.A., A. Torriglia, M.F. Counis, Y. Courtois, A. Jacquemin-Sablon, and E. Segal-Bendirdjian. 2000. Nuclear translocation of a leukocyte elastase Inhibitor/Elastase complex during staurosporine-induced apoptosis: role in the generation of nuclear L-DNase II activity. *Experimental cell research*. 254:99-109.

Benarafa, C., T.E. LeCuyer, M. Baumann, J.M. Stolley, T.P. Cremona, and E. Remold-O'Donnell. 2011. SerpinB1 protects the mature neutrophil reserve in the bone marrow. *Journal of leukocyte biology*. 90:21-29.

Berra-Romani, R., A. Raqeeb, J.E. Avelino-Cruz, F. Moccia, A. Oldani, F. Speroni, . . . F. Tanzi. 2008. Ca2+ signaling in injured in situ endothelium of rat aorta. *Cell calcium*. 44:298-309.

Berra-Romani, R., A. Raqeeb, J. Torres-Jacome, A. Guzman-Silva, G. Guerra, F. Tanzi, and F. Moccia. 2012. The mechanism of injury-induced intracellular calcium concentration oscillations in the endothelium of excised rat aorta. *Journal of vascular research*. 49:65-76.

Berridge, M.J. 2016. The Inositol Trisphosphate/Calcium Signaling Pathway in Health and Disease. *Physiological reviews*. 96:1261-1296.

Bidere, N., H.K. Lorenzo, S. Carmona, M. Laforge, F. Harper, C. Dumont, and A. Senik. 2003. Cathepsin D triggers Bax activation, resulting in selective apoptosis-inducing factor

(AIF) relocation in T lymphocytes entering the early commitment phase to apoptosis. *The Journal of biological chemistry*. 278:31401-31411.

Blaustein, M.P., and W.J. Lederer. 1999. Sodium/calcium exchange: its physiological implications. *Physiological reviews*. 79:763-854.

Block, E.R., A.R. Matela, N. SundarRaj, E.R. Iszkula, and J.K. Klarlund. 2004. Wounding induces motility in sheets of corneal epithelial cells through loss of spatial constraints: role of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor signaling. *The Journal of biological chemistry*. 279:24307-24312.

Block, G.J., G.D. DiMattia, and D.J. Prockop. 2010. Stanniocalcin-1 regulates extracellular ATP-induced calcium waves in human epithelial cancer cells by stimulating ATP release from bystander cells. *PloS one*. 5:e10237.

Boitano, S., M.J. Sanderson, and E.R. Dirksen. 1994. A role for Ca(2+)-conducting ion channels in mechanically-induced signal transduction of airway epithelial cells. *Journal of cell science*. 107 (Pt 11):3037-3044.

Borena, B.M., A. Martens, S.Y. Broeckx, E. Meyer, K. Chiers, L. Duchateau, and J.H. Spaas. 2015. Regenerative Skin Wound Healing in Mammals: State-of-the-Art on Growth Factor and Stem Cell Based Treatments. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 36:1-23.

Bourges, J.L., F. Valamanesh, A. Torriglia, J.C. Jeanny, M. Savoldelli, G. Renard, . . . F. Behar-Cohen. 2004. Cornea graft endothelial cells undergo apoptosis by way of an alternate (caspase-independent) pathway. *Transplantation*. 78:316-323.

Bouron, A., K. Kiselyov, and J. Oberwinkler. 2015. Permeation, regulation and control of expression of TRP channels by trace metal ions. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 467:1143-1164.

Boya, P., and G. Kroemer. 2008. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. *Oncogene*. 27:6434-6451.

Brenner, C., L. Galluzzi, O. Kepp, and G. Kroemer. 2013. Decoding cell death signals in liver inflammation. *Journal of hepatology*. 59:583-594.

Brini, M., D. Ottolini, T. Cali, and E. Carafoli. 2013. Calcium in health and disease. *Metal ions in life sciences*. 13:81-137.

Briquez, P.S., J.A. Hubbell, and M.M. Martino. 2015. Extracellular Matrix-Inspired Growth Factor Delivery Systems for Skin Wound Healing. *Advances in wound care*. 4:479-489.

Brown, D.L., W.W. Kao, and D.G. Greenhalgh. 1997. Apoptosis down-regulates inflammation under the advancing epithelial wound edge: delayed patterns in diabetes and improvement with topical growth factors. *Surgery*. 121:372-380.

Burnstock, G. 2002. Purinergic signaling and vascular cell proliferation and death. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 22:364-373.

Burnstock, G. 2006. Pathophysiology and therapeutic potential of purinergic signaling. *Pharmacological reviews*. 58:58-86.

Burnstock, G., and F. Di Virgilio. 2013. Purinergic signalling and cancer. *Purinergic signalling*. 9:491-540.

Burnstock, G., and G.E. Knight. 2004. Cellular distribution and functions of P2 receptor subtypes in different systems. *International review of cytology*. 240:31-304.

Cao, X., X. Deng, and W.S. May. 2003. Cleavage of Bax to p18 Bax accelerates stress-induced apoptosis, and a cathepsin-like protease may rapidly degrade p18 Bax. *Blood*. 102:2605-2614.

Cao, Z., T. Livas, and N. Kyprianou. 2016. Anoikis and EMT: Lethal "Liaisons" during Cancer Progression. *Critical reviews in oncogenesis*. 21:155-168.

Capiod, T. 2016. Extracellular Calcium Has Multiple Targets to Control Cell Proliferation. *Advances in experimental medicine and biology*. 898:133-156.

Clark, A.G., A.L. Miller, E. Vaughan, H.Y. Yu, R. Penkert, and W.M. Bement. 2009. Integration of single and multicellular wound responses. *Current biology : CB*. 19:1389-1395.

Coddou, C., S.S. Stojilkovic, and J.P. Huidobro-Toro. 2011a. Allosteric modulation of ATP-gated P2X receptor channels. *Reviews in the neurosciences*. 22:335-354.

Coddou, C., Z. Yan, T. Obsil, J.P. Huidobro-Toro, and S.S. Stojilkovic. 2011b. Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels. *Pharmacological reviews*. 63:641-683.

Cotrina, M.L., J.H. Lin, A. Alves-Rodrigues, S. Liu, J. Li, H. Azmi-Ghadimi, . . . M. Nedergaard. 1998. Connexins regulate calcium signaling by controlling ATP release. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95:15735-15740.

Curcio, M., I.L. Salazar, M. Mele, L.M. Canzoniero, and C.B. Duarte. 2016. Calpains and neuronal damage in the ischemic brain: The swiss knife in synaptic injury. *Progress in neurobiology*. 143:1-35.

Cuthbertson, K.S., and P.H. Cobbold. 1985. Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca2+. *Nature*. 316:541-542.

Czabotar, P.E., G. Lessene, A. Strasser, and J.M. Adams. 2014. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 15:49-63.

Chahory, S., N. Keller, E. Martin, B. Omri, P. Crisanti, and A. Torriglia. 2010. Light induced retinal degeneration activates a caspase-independent pathway involving cathepsin D. *Neurochemistry international*. 57:278-287.

Chai, J., C. Du, J.W. Wu, S. Kyin, X. Wang, and Y. Shi. 2000. Structural and biochemical basis of apoptotic activation by Smac/DIABLO. *Nature*. 406:855-862.

Chemaly, E.R., L. Troncone, and D. Lebeche. 2018. SERCA control of cell death and survival. *Cell calcium*. 69:46-61.

Chen, C., A.L. Darrow, J.S. Qi, M.R. D'Andrea, and P. Andrade-Gordon. 2003. A novel serine protease predominately expressed in macrophages. *The Biochemical journal*. 374:97-107.

Chen, Z., L. Atchison, H. Ji, and K.W. Leong. 2014. Nanograting structure promotes lamellipodia-based cell collective migration and wound healing. *Conference proceedings : ... Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Annual Conference*. 2014:2916-2919.

Chifflet, S., J.A. Hernandez, and S. Grasso. 2005. A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *American journal of physiology. Cell physiology*. 288:C1420-1430.

Chifflet, S., J.A. Hernandez, S. Grasso, and A. Cirillo. 2003. Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. *Experimental cell research*. 282:1-13.

Chifflet, S., C. Justet, J.A. Hernandez, V. Nin, C. Escande, and J.C. Benech. 2012. Early and late calcium waves during wound healing in corneal endothelial cells. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 20:28-37.

Childs, D.R., and A.S. Murthy. 2017. Overview of Wound Healing and Management. *The Surgical clinics of North America*. 97:189-207.

Chung, W.C., and J.C. Kermode. 2005. Suramin disrupts receptor-G protein coupling by blocking association of G protein alpha and betagamma subunits. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 313:191-198.

D'Hondt, C., B. Himpens, and G. Bultynck. 2013. Mechanical stimulation-induced calcium wave propagation in cell monolayers: the example of bovine corneal endothelial cells. *Journal of visualized experiments : JoVE*:e50443.

D'Hondt, C., J. Iyyathurai, B. Himpens, L. Leybaert, and G. Bultynck. 2014. Cx43-hemichannel function and regulation in physiology and pathophysiology: insights from the bovine corneal endothelial cell system and beyond. *Frontiers in physiology*. 5:348.

D'Hondt, C., R. Ponsaerts, S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens. 2007a. Thrombin inhibits intercellular calcium wave propagation in corneal endothelial cells by modulation of hemichannels and gap junctions. *Investigative ophthalmology & visual science*. 48:120-133.

D'Hondt, C., R. Ponsaerts, S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens. 2009. Reduced intercellular communication and altered morphology of bovine corneal endothelial cells with prolonged time in cell culture. *Current eye research*. 34:454-465.

D'Hondt, C., S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens. 2007b. Adenosine opposes thrombin-induced inhibition of intercellular calcium wave in corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 48:1518-1527.

Danjo, Y., and I.K. Gipson. 1998. Actin 'purse string' filaments are anchored by E-cadherin-mediated adherens junctions at the leading edge of the epithelial wound, providing coordinated cell movement. *Journal of cell science*. 111 (Pt 22):3323-3332.

De Bock, M., N. Wang, M. Bol, E. Decrock, R. Ponsaerts, G. Bultynck, . . . L. Leybaert. 2012. Connexin 43 hemichannels contribute to cytoplasmic Ca2+ oscillations by providing a bimodal Ca2+-dependent Ca2+ entry pathway. *The Journal of biological chemistry*. 287:12250-12266.

de Poot, S.A., and N. Bovenschen. 2014. Granzyme M: behind enemy lines. *Cell death and differentiation*. 21:359-368.

Demarchi, F., C. Bertoli, P.A. Greer, and C. Schneider. 2005. Ceramide triggers an NF-kappaB-dependent survival pathway through calpain. *Cell death and differentiation*. 12:512-522.

Denecker, G., P. Ovaere, P. Vandenabeele, and W. Declercq. 2008. Caspase-14 reveals its secrets. *The Journal of cell biology*. 180:451-458.

Dou, L., Y.F. Chen, P.J. Cowan, and X.P. Chen. 2017. Extracellular ATP signaling and clinical relevance. *Clin Immunol*.

Dupont, G., and L. Combettes. 2016. Fine tuning of cytosolic Ca (2+) oscillations. *F1000Research*. 5.

Eckenrode, E.F., J. Yang, G.V. Velmurugan, J.K. Foskett, and C. White. 2010. Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca2+ signaling. *The Journal of biological chemistry*. 285:13678-13684.

Egger, L., J. Schneider, C. Rheme, M. Tapernoux, J. Hacki, and C. Borner. 2003. Serine proteases mediate apoptosis-like cell death and phagocytosis under caspase-inhibiting conditions. *Cell death and differentiation*. 10:1188-1203.

Erb, L., Z. Liao, C.I. Seye, and G.A. Weisman. 2006. P2 receptors: intracellular signaling. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 452:552-562.

Evans, J.H., and M.J. Sanderson. 1999. Intracellular calcium oscillations induced by ATP in airway epithelial cells. *The American journal of physiology*. 277:L30-41.

Fabbiano, S., M. Menacho-Marquez, J. Robles-Valero, M. Pericacho, A. Matesanz-Marin, C. Garcia-Macias, . . . X.R. Bustelo. 2015. Immunosuppression-Independent Role of Regulatory T Cells against Hypertension-Driven Renal Dysfunctions. *Molecular and cellular biology*. 35:3528-3546.

Galluzzi, L., J.M. Bravo-San Pedro, I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, . . . G. Kroemer. 2015. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. *Cell death and differentiation*. 22:58-73.

Galluzzi, L., M.C. Maiuri, I. Vitale, H. Zischka, M. Castedo, L. Zitvogel, and G. Kroemer. 2007. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell death and differentiation*. 14:1237-1243.

Galluzzi, L., I. Vitale, S.A. Aaronson, J.M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, . . . G. Kroemer. 2018. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*.

Galluzzi, L., I. Vitale, J.M. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, . . . G. Kroemer. 2012. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*. 19:107-120.

Geyti, C.S., E. Odgaard, M.T. Overgaard, M.E. Jensen, J. Leipziger, and H.A. Praetorius. 2008. Slow spontaneous [Ca2+] i oscillations reflect nucleotide release from renal epithelia. *Pflugers Archiv : European journal of physiology*. 455:1105-1117.

Giannone, G., P. Ronde, M. Gaire, J. Haiech, and K. Takeda. 2002. Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells. *The Journal of biological chemistry*. 277:26364-26371.

Gibert, B., and P. Mehlen. 2015. Dependence Receptors and Cancer: Addiction to Trophic Ligands. *Cancer research*. 75:5171-5175.

Gomes, P., S.P. Srinivas, W. Van Driessche, J. Vereecke, and B. Himpens. 2005a. ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 46:1208-1218.

Gomes, P., S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens. 2005b. ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 46:104-113.

Gomes, P., S.P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens. 2006. Gap junctional intercellular communication in bovine corneal endothelial cells. *Experimental eye research*. 83:1225-1237.

Gordo, A.C., P. Rodrigues, M. Kurokawa, T. Jellerette, G.E. Exley, C. Warner, and R. Fissore. 2002. Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs. *Biology of reproduction*. 66:1828-1837.

Gorlach, A., K. Bertram, S. Hudecova, and O. Krizanova. 2015. Calcium and ROS: A mutual interplay. *Redox biology*. 6:260-271.

Grafe, P., V. Schaffer, and F. Rucker. 2006. Kinetics of ATP release following compression injury of a peripheral nerve trunk. *Purinergic signalling*. 2:527-536.

Grasso, S., J.A. Hernandez, and S. Chifflet. 2007. Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture. *American journal of physiology. Cell physiology*. 293:C1327-1337.

Green, D.R., T.H. Oguin, and J. Martinez. 2016. The clearance of dying cells: table for two. *Cell death and differentiation*. 23:915-926.

Greenhalgh, D.G. 1998. The role of apoptosis in wound healing. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 30:1019-1030.

Grygorczyk, R., K. Furuya, and M. Sokabe. 2013. Imaging and characterization of stretch-induced ATP release from alveolar A549 cells. *The Journal of physiology*. 591:1195-1215.

Guicciardi, M.E., S.F. Bronk, N.W. Werneburg, X.M. Yin, and G.J. Gores. 2005. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis. *Gastroenterology*. 129:269-284.

Guo, S., and L.A. Dipietro. 2010. Factors affecting wound healing. *Journal of dental research*. 89:219-229.

Haan, C., and I. Behrmann. 2007. A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. *Journal of immunological methods*. 318:11-19.

Handly, L.N., and R. Wollman. 2017. Wound-induced Ca(2+) wave propagates through a simple release and diffusion mechanism. *Molecular biology of the cell*. 28:1457-1466.

Hao, Z., and T.W. Mak. 2010. Type I and type II pathways of Fas-mediated apoptosis are differentially controlled by XIAP. *Journal of molecular cell biology*. 2:63-64.

Harr, M.W., and C.W. Distelhorst. 2010. Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2:a005579.

Heinrich, M., J. Neumeyer, M. Jakob, C. Hallas, V. Tchikov, S. Winoto-Morbach, . . . S. Schutze. 2004. Cathepsin D links TNF-induced acid sphingomyelinase to Bid-mediated caspase-9 and -3 activation. *Cell death and differentiation*. 11:550-563.

Hill, A.P., O. Kingston, and R. Sitsapesan. 2004. Functional regulation of the cardiac ryanodine receptor by suramin and calmodulin involves multiple binding sites. *Molecular pharmacology*. 65:1258-1268.

Hinman, L.E., G.J. Beilman, K.E. Groehler, and P.J. Sammak. 1997. Wound-induced calcium waves in alveolar type II cells. *The American journal of physiology*. 273:L1242-1248.

Hiratsuka, T., Y. Fujita, H. Naoki, K. Aoki, Y. Kamioka, and M. Matsuda. 2015. Intercellular propagation of extracellular signal-regulated kinase activation revealed by in vivo imaging of mouse skin. *eLife*. 4:e05178.

Hlongwane, P., N. Mungra, S. Madheswaran, O.A. Akinrinmade, S. Chetty, and S. Barth. 2018. Human Granzyme B Based Targeted Cytolytic Fusion Proteins. *Biomedicines*. 6.

Hochreiter-Hufford, A., and K.S. Ravichandran. 2013. Clearing the dead: apoptotic cell sensing, recognition, engulfment, and digestion. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 5:a008748.

Holl, R.W., M.O. Thorner, G.L. Mandell, J.A. Sullivan, Y.N. Sinha, and D.A. Leong. 1988. Spontaneous oscillations of intracellular calcium and growth hormone secretion. *The Journal of biological chemistry*. 263:9682-9685.

Hou, X., L. Pedi, M.M. Diver, and S.B. Long. 2012. Crystal structure of the calcium release-activated calcium channel Orai. *Science*. 338:1308-1313.

Huang, J., S. Yu, C. Ji, and J. Li. 2015. Structural basis of cell apoptosis and necrosis in TNFR signaling. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 20:210-215.

Huasong, G., D. Zongmei, H. Jianfeng, Q. Xiaojun, G. Jun, G. Sun, . . . Z. Jianhong. 2015. Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 suppresses cell migration and invasion in glioma cells. *Brain research*. 1600:59-69.

Huntington, J.A., R.J. Read, and R.W. Carrell. 2000. Structure of a serpin-protease complex shows inhibition by deformation. *Nature*. 407:923-926.

Huo, Y., W.Y. Qiu, Q. Pan, Y.F. Yao, K. Xing, and M.F. Lou. 2009. Reactive oxygen species (ROS) are essential mediators in epidermal growth factor (EGF)-stimulated corneal epithelial cell proliferation, adhesion, migration, and wound healing. *Experimental eye research*. 89:876-886.

Ishimaru, M., N. Yusuke, M. Tsukimoto, H. Harada, T. Takenouchi, H. Kitani, and S. Kojima. 2014. Purinergic signaling via P2Y receptors up-mediates IL-6 production by liver macrophages/Kupffer cells. *The Journal of toxicological sciences*. 39:413-423.

Jacinto, A., A. Martinez-Arias, and P. Martin. 2001. Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nature cell biology*. 3:E117-123.

Jacobson, K.A., A.A. Ivanov, S. de Castro, T.K. Harden, and H. Ko. 2009. Development of selective agonists and antagonists of P2Y receptors. *Purinergic signalling*. 5:75-89.

Janda, J., V. Nfonsam, F. Calienes, J.E. Sligh, and J. Jandova. 2016. Modulation of ROS levels in fibroblasts by altering mitochondria regulates the process of wound healing. *Archives of dermatological research*. 308:239-248.

Johansson, A.C., H. Appelqvist, C. Nilsson, K. Kagedal, K. Roberg, and K. Ollinger. 2010. Regulation of apoptosis-associated lysosomal membrane permeabilization. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 15:527-540.

Justet, C., S. Chifflet, and J.A. Hernandez. 2019. Calcium Oscillatory Behavior and Its Possible Role during Wound Healing in Bovine Corneal Endothelial Cells in Culture. *BioMed research international*. 2019:8647121.

Justet, C., F. Evans, A. Torriglia, and S. Chifflet. 2015. Increase in the expression of leukocyte elastase inhibitor during wound healing in corneal endothelial cells. *Cell and tissue research*. 362:557-568.

Justet, C., F. Evans, E. Vasilskis, J.A. Hernandez, and S. Chifflet. 2013. ENaC contribution to epithelial wound healing is independent of the healing mode and of any increased expression in the channel. *Cell and tissue research*. 353:53-64.

Justet, C., J.A. Hernandez, A. Torriglia, and S. Chifflet. 2016. Fast calcium wave inhibits excessive apoptosis during epithelial wound healing. *Cell and tissue research*. 365:343-356.

Kerr, J.F., A.H. Wyllie, and A.R. Currie. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British journal of cancer*. 26:239-257.

Klepeis, V.E., A. Cornell-Bell, and V. Trinkaus-Randall. 2001. Growth factors but not gap junctions play a role in injury-induced Ca2+ waves in epithelial cells. *Journal of cell science*. 114:4185-4195.

Kobayashi, Y., Y. Sanno, A. Sakai, Y. Sawabu, M. Tsutsumi, M. Goto, . . . M. Nagayama. 2014. Mathematical modeling of calcium waves induced by mechanical stimulation in keratinocytes. *PloS one*. 9:e92650.

Kono, T., T. Nishikori, H. Kataoka, Y. Uchio, M. Ochi, and K. Enomoto. 2006. Spontaneous oscillation and mechanically induced calcium waves in chondrocytes. *Cell biochemistry and function*. 24:103-111.

Kroemer, G., W.S. El-Deiry, P. Golstein, M.E. Peter, D. Vaux, P. Vandenabeele, . . . G. Melino. 2005. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell death and differentiation*. 12 Suppl 2:1463-1467.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, . . . G. Melino. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. *Cell death and differentiation*. 16:3-11.

Krysko, D.V., T. Vanden Berghe, K. D'Herde, and P. Vandenabeele. 2008. Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*. 44:205-221.

Larsen, A.Z., L.F. Olsen, and U. Kummer. 2004. On the encoding and decoding of calcium signals in hepatocytes. *Biophysical chemistry*. 107:83-99.

Larsen, B.D., and C.S. Sorensen. 2017. The caspase-activated DNase: apoptosis and beyond. *The FEBS journal*. 284:1160-1170.

Lee, P.Y., B.C. Park, S.W. Chi, K.H. Bae, S. Kim, S. Cho, . . . S.G. Park. 2016. Histone H4 is cleaved by granzyme A during staurosporine-induced cell death in B-lymphoid Raji cells. *BMB reports*. 49:560-565.

Leiper, L.J., P. Walczysko, R. Kucerova, J. Ou, L.J. Shanley, D. Lawson, . . . J.M. Collinson. 2006. The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6+/- mouse model of epithelial wound-healing delay. *BMC biology*. 4:27.

Lembong, J., B. Sabass, and H.A. Stone. 2017. Calcium oscillations in wounded fibroblast monolayers are spatially regulated through substrate mechanics. *Physical biology*. 14:045006.

Lepretre, C., Y. Fleurier, E. Martin, and A. Torriglia. 2008. Nuclear export of LEI/L-DNase II by Crm1 is essential for cell survival. *Biochimica et biophysica acta*. 1783:1068-1075.

Li, F., Q. Huang, J. Chen, Y. Peng, D.R. Roop, J.S. Bedford, and C.Y. Li. 2010. Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. *Science signaling*. 3:ra13.

Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S.M. Srinivasula, M. Ahmad, E.S. Alnemri, and X. Wang. 1997. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*. 91:479-489.

Li, P., L. Zhou, T. Zhao, X. Liu, P. Zhang, Y. Liu, . . . Q. Li. 2017. Caspase-9: structure, mechanisms and clinical application. *Oncotarget*. 8:23996-24008.

Lieberman, J., and Z. Fan. 2003. Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Current opinion in immunology*. 15:553-559.

Lockshin, R.A., and C.M. Williams. 1965. Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkmoth. *Journal of insect physiology*. 11:123-133.

Lohman, A.W., and B.E. Isakson. 2014. Differentiating connexin hemichannels and pannexin channels in cellular ATP release. *FEBS letters*. 588:1379-1388.

Lopatniuk, P., and J.M. Witkowski. 2011. Conventional calpains and programmed cell death. *Acta biochimica Polonica*. 58:287-296.

Lu, H., Q. Hou, T. Zhao, H. Zhang, Q. Zhang, L. Wu, and Z. Fan. 2006. Granzyme M directly cleaves inhibitor of caspase-activated DNase (CAD) to unleash CAD leading to DNA fragmentation. *J Immunol*. 177:1171-1178.

Lytton, J., M. Westlin, and M.R. Hanley. 1991. Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. *The Journal of biological chemistry*. 266:17067-17071.

Mandic, A., K. Viktorsson, L. Strandberg, T. Heiden, J. Hansson, S. Linder, and M.C. Shoshan. 2002. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 22:3003-3013.

Martinvalet, D. 2015. ROS signaling during granzyme B-mediated apoptosis. *Molecular & cellular oncology*. 2:e992639.

Matsubayashi, Y., M. Ebisuya, S. Honjoh, and E. Nishida. 2004. ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing. *Current biology : CB*. 14:731-735.

Meergans, T., A.K. Hildebrandt, D. Horak, C. Haenisch, and A. Wendel. 2000. The short prodomain influences caspase-3 activation in HeLa cells. *The Biochemical journal*. 349:135-140.

Mellott, A.J., D.S. Zamierowski, and B.T. Andrews. 2016. Negative Pressure Wound Therapy in Maxillofacial Applications. *Dentistry journal*. 4.

Michelangeli, F., and J.M. East. 2011. A diversity of SERCA Ca2+ pump inhibitors. *Biochemical Society transactions*. 39:789-797.

Midwood, K.S., L.V. Williams, and J.E. Schwarzbauer. 2004. Tissue repair and the dynamics of the extracellular matrix. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 36:1031-1037.

Moffitt, K.L., S.L. Martin, and B. Walker. 2010. Proteases implicated in apoptosis: old and new. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 62:563-576.

Moldoveanu, T., A.V. Follis, R.W. Kriwacki, and D.R. Green. 2014. Many players in BCL-2 family affairs. *Trends in biochemical sciences*. 39:101-111.

Morcol, T., and A. Subramanian. 1999. A red-dot-blot protein assay technique in the low nanogram range. *Analytical biochemistry*. 270:75-82.

Murn, J., U. Urleb, and I. Mlinaric-Rascan. 2004. Internucleosomal DNA cleavage in apoptotic WEHI 231 cells is mediated by a chymotrypsin-like protease. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 9:1103-1111.

Murrell, M., R. Kamm, and P. Matsudaira. 2011. Tension, free space, and cell damage in a microfluidic wound healing assay. *PloS one*. 6:e24283.

Narciso, C., Q. Wu, P. Brodskiy, G. Garston, R. Baker, A. Fletcher, and J. Zartman. 2015. Patterning of wound-induced intercellular Ca(2+) flashes in a developing epithelium. *Physical biology*. 12:056005.

Nicholson, D.W. 1999. Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell death and differentiation*. 6:1028-1042.

Niethammer, P., C. Grabher, A.T. Look, and T.J. Mitchison. 2009. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. *Nature*. 459:996-999.

Notomi, S., T. Hisatomi, Y. Murakami, H. Terasaki, S. Sonoda, R. Asato, . . . T. Ishibashi. 2013. Dynamic increase in extracellular ATP accelerates photoreceptor cell apoptosis via ligation of P2RX7 in subretinal hemorrhage. *PloS one*. 8:e53338.

Oberle, C., J. Huai, T. Reinheckel, M. Tacke, M. Rassner, P.G. Ekert, . . . C. Borner. 2010. Lysosomal membrane permeabilization and cathepsin release is a Bax/Bak-dependent, amplifying event of apoptosis in fibroblasts and monocytes. *Cell death and differentiation*. 17:1167-1178.

Overholtzer, M., A.A. Mailleux, G. Mouneimne, G. Normand, S.J. Schnitt, R.W. King, . . . J.S. Brugge. 2007. A nonapoptotic cell death process, entosis, that occurs by cell-in-cell invasion. *Cell*. 131:966-979.

Ozoren, N., and W.S. El-Deiry. 2002. Defining characteristics of Types I and II apoptotic cells in response to TRAIL. *Neoplasia*. 4:551-557.

Padron-Barthe, L., J. Courta, C. Lepretre, A. Nagbou, and A. Torriglia. 2008. Leukocyte Elastase Inhibitor, the precursor of L-DNase II, inhibits apoptosis by interfering with caspase-8 activation. *Biochimica et biophysica acta*. 1783:1755-1766.

Padron-Barthe, L., C. Lepretre, E. Martin, M.F. Counis, and A. Torriglia. 2007. Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis. *Molecular and cellular biology*. 27:4028-4036.

Palmer, A.E., C. Jin, J.C. Reed, and R.Y. Tsien. 2004. Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca2+ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:17404-17409.

Pandolfi, F., S. Altamura, S. Frosali, and P. Conti. 2016. Key Role of DAMP in Inflammation, Cancer, and Tissue Repair. *Clinical therapeutics*. 38:1017-1028.

Park, H.H. 2012. Structural features of caspase-activating complexes. *International journal of molecular sciences*. 13:4807-4818.

Park, H.H., Y.C. Lo, S.C. Lin, L. Wang, J.K. Yang, and H. Wu. 2007. The death domain superfamily in intracellular signaling of apoptosis and inflammation. *Annual review of immunology*. 25:561-586.

Pascal, J.M. 2018. The comings and goings of PARP-1 in response to DNA damage. *DNA repair*. 71:177-182.

Pearson, R.A., N. Dale, E. Llaudet, and P. Mobbs. 2005. ATP released via gap junction hemichannels from the pigment epithelium regulates neural retinal progenitor proliferation. *Neuron*. 46:731-744.

Pinon, J.D., V. Labi, A. Egle, and A. Villunger. 2008. Bim and Bmf in tissue homeostasis and malignant disease. *Oncogene*. 27 Suppl 1:S41-52.

Placet, M., G. Arguin, C.M. Molle, J.P. Babeu, C. Jones, J.C. Carrier, . . . F.P. Gendron. 2018. The G protein-coupled P2Y(6) receptor promotes colorectal cancer tumorigenesis by inhibiting apoptosis. *Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease*. 1864:1539-1551.

Pogoda, K., P. Kameritsch, M.A. Retamal, and J.L. Vega. 2016. Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision. *BMC cell biology*. 17 Suppl 1:11.

Pollins, A.C., D.B. Friedman, and L.B. Nanney. 2007. Proteomic investigation of human burn wounds by 2D-difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *The Journal of surgical research*. 142:143-152.

Potter, G.D., T.A. Byrd, A. Mugler, and B. Sun. 2016. Communication shapes sensory response in multicellular networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 113:10334-10339.

Quintas, C., D. Pinho, C. Pereira, L. Saraiva, J. Goncalves, and G. Queiroz. 2014. Microglia P2Y(6) receptors mediate nitric oxide release and astrocyte apoptosis. *Journal of neuroinflammation*. 11:141.

Ramirez, M.L.G., and G.S. Salvesen. 2018. A primer on caspase mechanisms. *Seminars in cell & developmental biology*.

Randriamampita, C., and A. Trautmann. 2004. Ca2+ signals and T lymphocytes; "New mechanisms and functions in Ca2+ signalling". *Biology of the cell*. 96:69-78.

Razzell, W., I.R. Evans, P. Martin, and W. Wood. 2013. Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. *Current biology : CB*. 23:424-429.

Riahi, R., M. Long, Y. Yang, Z. Dean, D.D. Zhang, M.J. Slepian, and P.K. Wong. 2014. Single cell gene expression analysis in injury-induced collective cell migration. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. 6:192-202.

Riedl, S.J., and G.S. Salvesen. 2007. The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:405-413.

Roach, H.I., and N.M. Clarke. 2000. Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*. 82:601-613.

Roupe, K.M., P. Alberius, A. Schmidtchen, and O.E. Sorensen. 2010. Gene expression demonstrates increased resilience toward harmful inflammatory stimuli in the proliferating epidermis of human skin wounds. *Experimental dermatology*. 19:e329-332.

Rousselle, P., M. Montmasson, and C. Garnier. 2018. Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*.

Saez, P.J., P. Vargas, K.F. Shoji, P.A. Harcha, A.M. Lennon-Dumenil, and J.C. Saez. 2017. ATP promotes the fast migration of dendritic cells through the activity of pannexin 1 channels and P2X7 receptors. *Science signaling*. 10.

Saikia, P., C.S. Medeiros, S. Thangavadivel, and S.E. Wilson. 2018. Basement membranes in the cornea and other organs that commonly develop fibrosis. *Cell and tissue research*. 374:439-453.

Salazar, C., A.Z. Politi, and T. Hofer. 2008. Decoding of calcium oscillations by phosphorylation cycles: analytic results. *Biophysical journal*. 94:1203-1215.

Sammak, P.J., L.E. Hinman, P.O. Tran, M.D. Sjaastad, and T.E. Machen. 1997. How do injured cells communicate with the surviving cell monolayer? *Journal of cell science*. 110 (Pt 4):465-475.

Saunders, J.W., Jr. 1966. Death in embryonic systems. *Science*. 154:604-612.

Scaffidi, C., I. Schmitz, J. Zha, S.J. Korsmeyer, P.H. Krammer, and M.E. Peter. 1999. Differential modulation of apoptosis sensitivity in CD95 type I and type II cells. *The Journal of biological chemistry*. 274:22532-22538.

Schwaller, B. 2012. The regulation of a cell's Ca(2+) signaling toolkit: the Ca (2+) homeostasome. *Advances in experimental medicine and biology*. 740:1-25.

Schweichel, J.U., and H.J. Merker. 1973. The morphology of various types of cell death in prenatal tissues. *Teratology*. 7:253-266.

Shabir, S., and J. Southgate. 2008. Calcium signalling in wound-responsive normal human urothelial cell monolayers. *Cell calcium*. 44:453-464.

Smedler, E., and P. Uhlen. 2014. Frequency decoding of calcium oscillations. *Biochimica et biophysica acta*. 1840:964-969.

Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, . . . D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical biochemistry*. 150:76-85.

Song, I.S., S.S. Kang, E.S. Kim, H.M. Park, C.Y. Choi, H. Tchah, and J.Y. Kim. 2014. Heat shock protein 27 phosphorylation is involved in epithelial cell apoptosis as well as epithelial migration during corneal epithelial wound healing. *Experimental eye research*. 118:36-41.

Sosinsky, G.E., D. Boassa, R. Dermietzel, H.S. Duffy, D.W. Laird, B. MacVicar, . . . G. Dahl. 2011. Pannexin channels are not gap junction hemichannels. *Channels (Austin)*. 5:193-197.

Soto, X., J. Li, R. Lea, E. Dubaissi, N. Papalopulu, and E. Amaya. 2013. Inositol kinase and its product accelerate wound healing by modulating calcium levels, Rho GTPases, and F-actin assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 110:11029-11034.

Stanisstreet, M. 1982. Calcium and wound healing in Xenopus early embryos. *Journal of embryology and experimental morphology*. 67:195-205.

Streichan, S.J., C.R. Hoerner, T. Schneidt, D. Holzer, and L. Hufnagel. 2014. Spatial constraints control cell proliferation in tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 111:5586-5591.

Strudwick, X.L., and A.J. Cowin. 2012. Cytoskeletal regulation of dermal regeneration. *Cells*. 1:1313-1327.

Sun, B., J. Lembong, V. Normand, M. Rogers, and H.A. Stone. 2012. Spatial-temporal dynamics of collective chemosensing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:7753-7758.

Sung, Y.J., Z. Sung, C.L. Ho, M.T. Lin, J.S. Wang, S.C. Yang, . . . C.H. Lin. 2003. Intercellular calcium waves mediate preferential cell growth toward the wound edge in polarized hepatic cells. *Experimental cell research*. 287:209-218.

Tait, S.W., and D.R. Green. 2010. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:621-632.

Takada, H., K. Furuya, and M. Sokabe. 2014. Mechanosensitive ATP release from hemichannels and Ca(2)(+) influx through TRPC6 accelerate wound closure in keratinocytes. *Journal of cell science*. 127:4159-4171.

Takahashi, K., S. Ito, K. Furuya, S. Asano, M. Sokabe, and Y. Hasegawa. 2017. Real-time imaging of mechanically and chemically induced ATP release in human lung fibroblasts. *Respiratory physiology & neurobiology*. 242:96-101.

Tan, J.Q., H.H. Zhang, Z.J. Lei, P. Ren, C. Deng, X.Y. Li, and S.Z. Chen. 2013. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. *Burns : journal of the International Society for Burn Injuries*. 39:1551-1556.

Tang, H.L., H.M. Tang, J.M. Hardwick, and M.C. Fung. 2015a. Strategies for tracking anastasis, a cell survival phenomenon that reverses apoptosis. *Journal of visualized experiments : JoVE*.

Tang, H.L., H.M. Tang, K.H. Mak, S. Hu, S.S. Wang, K.M. Wong, . . . M.C. Fung. 2012. Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Molecular biology of the cell*. 23:2240-2252.

Tang, Y., Y. Yin, L. Miao, B. Wei, K. Zhai, and G. Ji. 2015b. Nitric oxide enhances extracellular ATP induced Ca(2)(+) oscillation in HeLa cells. *Archives of biochemistry and biophysics*. 565:68-75.

Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:231-241.

Tomic, M., R.M. Jobin, L.A. Vergara, and S.S. Stojilkovic. 1996. Expression of purinergic receptor channels and their role in calcium signaling and hormone release in pituitary gonadotrophs. Integration of P2 channels in plasma membrane- and endoplasmic reticulum-derived calcium oscillations. *The Journal of biological chemistry*. 271:21200-21208.

Tompa, P., R. Toth-Boconadi, and P. Friedrich. 2001. Frequency decoding of fast calcium oscillations by calpain. *Cell calcium*. 29:161-170.

Torriglia, A., E. Chaudun, F. Chany-Fournier, Y. Courtois, and M.F. Counis. 2001. Involvement of L-DNase II in nuclear degeneration during chick retina development. *Experimental eye research*. 72:443-453.

Torriglia, A., E. Chaudun, F. Chany-Fournier, J.C. Jeanny, Y. Courtois, and M.F. Counis. 1995. Involvement of DNase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation. *The Journal of biological chemistry*. 270:28579-28585.

Torriglia, A., I. Jaadane, and C. Lebon. 2016. Mechanisms of cell death in neurodegenerative and retinal diseases: common pathway? *Current opinion in neurology*. 29:55-60.

Torriglia, A., E. Martin, and I. Jaadane. 2017. The hidden side of SERPINB1/Leukocyte Elastase Inhibitor. *Seminars in cell & developmental biology*. 62:178-186.

Torriglia, A., P. Perani, J.Y. Brossas, E. Chaudun, J. Treton, Y. Courtois, and M.F. Counis. 1998. L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. *Molecular and cellular biology*. 18:3612-3619.

Tran, P.O., L.E. Hinman, G.M. Unger, and P.J. Sammak. 1999. A wound-induced [Ca2+]i increase and its transcriptional activation of immediate early genes is important in the regulation of motility. *Experimental cell research*. 246:319-326.

Tran, P.O., Q.H. Tran, L.E. Hinman, and P.J. Sammak. 1998. Co-ordination between localized wound-induced Ca2+ signals and pre-wound serum signals is required for proliferation after mechanical injury. *Cell proliferation*. 31:155-170.

Tseng, M.Y., S.Y. Liu, H.R. Chen, Y.J. Wu, C.C. Chiu, P.T. Chan, . . . J.Y. Chen. 2009. Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 promotes oral cancer cell motility and is over-expressed in invasive oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology*. 45:771-776.

Uchiyama, K., Y. Naito, T. Takagi, K. Mizushima, Y. Hirai, N. Hayashi, . . . T. Yoshikawa. 2012. Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*. 302:G1163-1170.

Underhill, D.M., and H.S. Goodridge. 2012. Information processing during phagocytosis. *Nature reviews. Immunology*. 12:492-502.

van der Vliet, A., and Y.M. Janssen-Heininger. 2014. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *Journal of cellular biochemistry*. 115:427-435.

Vancompernolle, K., F. Van Herreweghe, G. Pynaert, M. Van de Craen, K. De Vos, N. Totty, . . . J. Grooten. 1998. Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS letters*. 438:150-158.

Vandenabeele, P., L. Galluzzi, T. Vanden Berghe, and G. Kroemer. 2010. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 11:700-714.

von Kugelgen, I., and K. Hoffmann. 2016. Pharmacology and structure of P2Y receptors. *Neuropharmacology*. 104:50-61.

Voss, O.H., S. Batra, S.J. Kolattukudy, M.E. Gonzalez-Mejia, J.B. Smith, and A.I. Doseff. 2007. Binding of caspase-3 prodomain to heat shock protein 27 regulates monocyte apoptosis by inhibiting caspase-3 proteolytic activation. *The Journal of biological chemistry*. 282:25088-25099.

Wang, F., D.Z. Liu, H. Xu, Y. Li, W. Wang, B.L. Liu, and L.Y. Zhang. 2014. Thapsigargin induces apoptosis by impairing cytoskeleton dynamics in human lung adenocarcinoma cells. *TheScientificWorldJournal*. 2014:619050.

Wang, Y., J.W. Zyskind, D.J. Colacurcio, K.A. Lindl, J.H. Ting, G. Grigoriev, and K.L. Jordan-Sciutto. 2012. Differential roles for caspase-mediated and calpain-mediated cell death in 1- and 3-week-old rat cortical cultures. *Neuroreport*. 23:1052-1058.

Warren, N.J., M.H. Tawhai, and E.J. Crampin. 2010. Mathematical modelling of calcium wave propagation in mammalian airway epithelium: evidence for regenerative ATP release. *Experimental physiology*. 95:232-249.

Waters, C.M., P.H. Sporn, M. Liu, and J.J. Fredberg. 2002. Cellular biomechanics in the lung. *American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology*. 283:L503-509.

Weinger, I., V.E. Klepeis, and V. Trinkaus-Randall. 2005. Tri-nucleotide receptors play a critical role in epithelial cell wound repair. *Purinergic signalling*. 1:281-292.

Wu, C.C., and S.B. Bratton. 2013. Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxidants & redox signaling*. 19:546-558.

Wu, Y.S., and S.N. Chen. 2014. Apoptotic cell: linkage of inflammation and wound healing. *Frontiers in pharmacology*. 5:1.

Yacoub, A., M.A. Park, P. Gupta, M. Rahmani, G. Zhang, H. Hamed, . . . P. Dent. 2008. Caspase-, cathepsin-, and PERK-dependent regulation of MDA-7/IL-24-induced cell killing in primary human glioma cells. *Molecular cancer therapeutics*. 7:297-313.

Yang, J.K. 2015. Death effecter domain for the assembly of death-inducing signaling complex. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 20:235-239.

Yang, L., D. Cranson, and V. Trinkaus-Randall. 2004. Cellular injury induces activation of MAPK via P2Y receptors. *Journal of cellular biochemistry*. 91:938-950.

Yang, R., L. Zhong, X.Q. Yang, K.L. Jiang, L. Li, H. Song, and B.Z. Liu. 2016. Neutrophil elastase enhances the proliferation and decreases apoptosis of leukemia cells via activation of PI3K/Akt signaling. *Molecular medicine reports*. 13:4175-4182.

Yule, D.I., and D.V. Gallacher. 1988. Oscillations of cytosolic calcium in single pancreatic acinar cells stimulated by acetylcholine. *FEBS letters*. 239:358-362.

Zakeri, Z.F., D. Quaglino, T. Latham, and R.A. Lockshin. 1993. Delayed internucleosomal DNA fragmentation in programmed cell death. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 7:470-478.

Zhang, M., N.A. Piskuric, C. Vollmer, and C.A. Nurse. 2012. P2Y2 receptor activation opens pannexin-1 channels in rat carotid body type II cells: potential role in amplifying the neurotransmitter ATP. *The Journal of physiology*. 590:4335-4350.

Zhang, S., J. Ye, Y. Zhang, X. Xu, J. Liu, S.H. Zhang, . . . Z. Ding. 2013. P2Y12 protects platelets from apoptosis via PI3k-dependent Bak/Bax inactivation. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH*. 11:149-160.

ANEXO

PUBLICACIONES

Artículo I

Chifflet, S., C. Justet, J.A. Hernandez, V. Nin, C. Escande, and J.C. Benech. 2012. Early and late calcium waves during wound healing in corneal endothelial cells. *Wound repair and regeneration : official publication of the Wound Healing Society [and] the European Tissue Repair Society*. 20:28-37.

Early and late calcium waves during wound healing in corneal endothelial cells

Silvia Chifflet, MD, PhD[1]; Cristian Justet, BSc[1]; Julio A. Hernández, MD[2]; Verónica Nin, MSc[3,†]; Carlos Escande, PhD[4,†]; Juan C. Benech, PhD[4]

1. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
2. Sección Biofísica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
3. Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay
4. Laboratorio de Señalización Celular y Nanobiología, IIBCE, Montevideo, Uruguay

Reprint requests:
Dr. S. Chifflet, Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Gral, Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay.
Tel: +598 2 924 3414;
Fax: +598 2 924 9563;
Email: schiffle@mednet.org.uy

†Present address: Anesthesiology Department, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA.

Manuscript received: February 20, 2011
Accepted in final form: September 12, 2011

DOI:10.1111/j.1524-475X.2011.00749.x

ABSTRACT

Immediately after wounding, bovine corneal endothelial cells develop a fast calcium wave that propagates from the wound border to the rest of the monolayer and extinguishes in approximately 5 minutes. One hour after wounding, a late, slow calcium wave (SCW) develops concomitantly to the depolarization of the plasma membrane potential of the border cells. The incorporation of inhibitors of the epithelial sodium channel and of the sodium-calcium exchanger produces inhibition of the membrane depolarization and the SCW, and diminishes the rate of wound healing. The L-type calcium channel blocker nimodipine does not have any effect on the SCW. The reversible inhibition of the fast calcium wave does not affect the SCW and only slightly decreases the velocity of healing. Our results suggest that the SCW is at least partially produced by the coupling of the epithelial sodium channel and the sodium-calcium exchanger functioning in reverse mode. They also suggest that the SCW may play a role in the overall healing process.

The corneal endothelium lines the posterior surface of the cornea, where it plays a critical role in the maintenance of the transparency of the organ.[1] The healing responses of this tissue are relevant to diverse pathological circumstances. Thus, corneal endothelium injuries are common complications of penetrating keratoplasty and cataract and glaucoma surgery.[2] In Fuchs disease, the uncontrolled healing responses of corneal endothelial cells underlie structural and functional alterations.[3] In addition to these pathological implications and in view of its physiological and structural characteristics, corneal endothelium has constituted a widespread experimental model for the study of wound healing, employing both in vivo and ex vivo preparations from rabbit, bovine, and human origin.[4]

In bovine corneal endothelial (BCE) cells in culture, the cells at the borders of experimental wounds may develop an actin cable at their free edge that connects neighboring cells and permits their coordinated migration into the injury zone.[5] In this system, we have determined that the border cells gradually and slowly (i.e., in hours) develop a depolarization of the plasma membrane potential (PMP) that extends toward the rest of the monolayer. This depolarization is a consequence of the increase in the intracellular concentration of sodium, in turn provoked by an augmented expression of the epithelial sodium channel (ENaC).[6] Moreover, we found that ENaC inhibition abolishes membrane depolarization and intracellular sodium increase, decreases the amount of actin cable developed at the wound borders, and, ultimately, greatly diminishes the rate of wound healing.[6]

The signals that trigger the epithelial healing responses are still a matter of active investigation. It has been proposed that the fast calcium wave (FCW) developed immediately after the production of a wound is a decisive factor to trigger the healing mechanisms.[7–10] This early calcium wave of short duration propagates from the wound edge toward the center of the monolayer and was found to be responsible for activating the transcription of immediate early genes, necessary to initiate the healing response.[10] In this work, we report the novel finding that in confluent monolayers of BCE cells, a late slow calcium wave (SCW) develops concomitantly to the plasma membrane depolarization and sodium increase in the cells of the wound border. The SCW exhibits a similar time course and spatial propagation to these phenomena. We also demonstrate here that the SCW is linked to the ENaC-dependent potential depolarization and sodium increase of the border cells. Our results strongly suggest that the SCW is a consequence of the increase in sodium experienced by the border cells. We also investigate the possible participation of the Na-Ca exchanger (NCX) as a mediator. Lastly, we explore the role of the FCW in the generation of the SCW and evaluate the effects of the inhibition of the FCW and SCW on the velocity of wound healing.

MATERIALS AND METHODS

Reagents and solutions

All the chemicals and drugs were from Sigma Chemical Co. (Munich, Germany) unless otherwise specified. Control solution (CS): 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.02 mM NaH_2PO_4, 3.6 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$, and HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid) 10 mM pH

7.4. KB-R7943 mesylate (2-[2-[4-(4-Nitrobenzyloxy)phenyl] ethyl]isothiourea mesylate) and SN-6 (2-[[4-[(4-Nitrophenyl) methoxy]phenyl]methyl]-4-thiazolidinecarboxylic acid ethyl ester) were from Tocris Bioscience (Ellisville, MO). All drugs were prepared as 1,000 X stock solutions: (1) phenamil (33 mM), KB-R7943 (KBR) (10 mM), SN-6 (30 mM), thapsigargin (1 mM), nimodipine (10 mM), and cyclopiazonic acid (CPA) (10 mM) in dimethyl sulfoxide (DMSO) and (2) amiloride (10 mM) in water. These solutions were stored aliquoted at −20 °C and diluted to the final concentration immediately before use. DMSO alone (0.1%) had no effect on cell viability or on any of the properties investigated in this work.

Cell cultures and general experimental procedures

No special permission to handle the biological material utilized in this work was required from the participating institutions because it was obtained from a certified local slaughterhouse under veterinary supervision (see Acknowledgments). The slaughterhouse provided us with fresh bovine corneas that were processed within 5 hours of enucleation. The endothelial cells were obtained and cultured as in Chifflet et al.[11] Briefly, the corneas were treated with trypsin (0.25%)—EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid) (0.02%) in Ca^{2+} and Mg^{2+}-free phosphate buffered saline solution (PBS) for 20–30 minutes in the tissue culture incubator. The endothelium was scraped with a blunt spatula, gently aspirated with a micropipette and the cells plated in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% serum, 50 μg/mL gentamicin, 0.25 μg/mL amphotericin B, and 50 μg of total protein/mL of retinal extract. We employed cells from the first to the fifth passages, grown on glass coverslips, which had achieved visual confluence at least 5 days before the experiments.

Linear wounds were made using a 21-gauge syringe needle or a pipette tip. The wounded monolayers were incubated in medium without serum or in the appropriate solutions for the corresponding periods of time, either at room temperature or in the tissue culture incubator, according to the requirement of the experiment.

The rate of wound healing was determined as follows. The coverslips containing the confluent BCE monolayers were placed in culture media without serum and with the appropriate drug. Linear wounds extending from side to side of the coverslip (approximately 1 cm long) were performed as described earlier. Immediately after the injury, phase contrast micrographs of the whole length of the discontinuity were taken. Afterwards, the wounded monolayers were placed in the tissue culture incubator for 24 hours and the whole length of the injured area photographed once again. The images obtained were processed utilizing the Adobe PhotoShop software (Adobe Systems, Mountain View, CA) as follows: (1) the denuded area was selected with the Magic Wand Tool, and the total number of pixels contained in this area was determined using the Histogram command; (2) the quotient between this value and the wound length (expressed in pixels), obtained using the Rule Tool, was determined and considered to represent the average width of the wound; and (3) the micrometric scale of the corresponding image was used to convert the width value in pixels to micrometers. For each condition (i.e., control or treated), the difference between the initial wound width and the one at 24 hours was employed as a measurement of the mean velocity of healing. To be noted, the wounds obtained employing the procedures described earlier are roughly rectangular.[6,12] Hence, the quotient between the wound area and length represents a good measure of the average wound width.

Determination of PMP and cytosolic calcium and sodium modifications

Modifications in the PMP were determined on cells grown on glass coverslips employing the anionic dye oxonol V (bis-[3-phenyl-5-oxoisoxazol-4-yl]pentamethine oxonol, Molecular Probes Inc., Eugene, OR) and fluorescence microscopy as in previous work.[11] The fluorescent signal of this probe can be employed as an indicator of PMP modifications, an increase in intensity corresponding to depolarization. For the experiments, 0.7 mM stock solutions of oxonol V in ethanol were kept at 4 °C and diluted to 0.3 μM in the incubation media. After 30 minutes at room temperature the coverslips were mounted in a custom-made chamber, placed under the fluorescence microscope, and viewed with a rhodamine filter set. The media in the chamber were supplemented with 1 μg/mL propidium iodide (PI) in order to reveal dead cells. Although the same filter set is employed to visualize PI and oxonol, the emission fluorescence between the two probes can be clearly distinguished (PI fluorescence is orange-red and oxonol is crimson). Pictures were taken with a Kodak MDS120 digital camera (Kodak, Emeryville, CA) and Adobe PhotoShop software as parent application. For the case of studies done to describe the early events following wound healing (i.e., up to 30 minutes after wounding), the cells were previously incubated in the oxonol-containing solutions and then injured. For studies performed 4 hours after wounding, the incubation in oxonol V was performed 30 minutes before photography.

Modifications in cytosolic calcium were revealed employing the fluorescent calcium indicators Fluo-4 AM and Fura-2 AM (Molecular Probes Inc.). Fluo-4 was kept at a 1.7 mM stock solution in DMSO at −20 °C, mixed with 20% pluronic acid (Molecular Probes Inc.) in DMSO and diluted 1/1,000 in the corresponding solution. The coverslips were incubated in this solution at room temperature for 15 minutes. After washing, they were kept for an extra 15 minutes in the corresponding solution and mounted in the same solution and chamber employed for the oxonol visualization in order to perform the double fluorescence studies. The fluorescent signals were photographed as described for the oxonol studies (see above), but employing a fluorescein filter set. Similarly to the case of PMP determinations, for studies done shortly after wounding, the cells were incubated with the probe before producing the injury, whereas for the 4-hour studies, the loading was done 30 minutes before photography.

Fura-2 AM was freshly prepared in DMSO and used at a final concentration of 5 μM in MEM. The coverslips were incubated in this solution for 45 minutes in the tissue culture incubator. After washing with MEM supplemented with 25 mM HEPES pH 7.4, the coverslips were incubated for additional 30 minutes at 37 °C. For the experiments, the coverslips were mounted on a custom-made chamber on a Nikon Diaphot 300 epifluorescence microscope coupled to a monochromatic light generator (Optoscan) and a photometric measurement system, both from CAIRN Research Limited (Kent, UK). Calcium measurements were performed as in Benech

et al.[13] The Fura-2 AM-loaded cells were excited at 340, 360, and 380 nm employing a computer-driven rotor and the intensity of light emission measured at 510 nm. Ca^{2+}-free Fura-2 was monitored at 380 nm and Ca^{2+}-bound dye at 340 nm. Excitation at 360 nm was used to control Ca^{2+}-independent fluorescence. For the calibration curves, the minimum fluorescence intensity corresponded to the signal obtained with a calcium-free CS with 10 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), whereas the maximum was determined for a CS (see Reagents and solutions) supplemented with 10 μM ionomycin and 3.6 mM of Ca^{2+}.

To evaluate the relative modifications determined by the different treatments on the SCW, we defined the parameter $\Delta_{1,8}$ as $(\phi_1 - \phi_8)/\phi_8$, where ϕ_1 and ϕ_8 are the average fluorescence intensities of the Fluo-4 signal at the first and eighth cell rows from the wound border, respectively. The choice of the eighth cell row was based upon the fact that, by the time of measurement (i.e., 4 hours of wounding), the SCW had not yet reached this cell row in any of the experimental conditions. The quantitative value of the fluorescence intensity was obtained from the recorded images using the Histogram tool of Adobe Photoshop software. For this purpose, the corresponding cell row was selected. The mean value was obtained from the Histogram tool for the green channel.

The changes in intracellular sodium were revealed using the fluorescent intracellular indicator CoroNa Green tetraacetate (Molecular Probes Inc.), maintained as a 1 mg/mL stock solution in DMSO at −20 °C. At the corresponding experimental times, the cells were incubated for 45 minutes at 37 °C with 1 μg/mL CoroNa Green. After a brief washing, the coverslips were mounted in a similar chamber to the one used for PMP determinations (see above) in CS containing 1 μg/mL PI and observed in the microscope using a fluorescein filter set.

ENaC and F-actin visualization

For ENaC and F-actin visualization, the wounded monolayers were fixed for 15 minutes at room temperature with 4% paraformaldehyde in Dulbecco's phosphate-buffered saline (pH 7.4). The corresponding $CaCl_2$ and $MgCl_2$ were added immediately before use. After permeabilization with 0.1% (vol/vol) Triton X-100 in PBS for 2 minutes, the cells were incubated for 1 hour at 37 °C with an anti-β-ENaC primary antibody (Sigma Chemical Co.) at 1/300 dilution. The monolayers were washed with PBS and incubated with an anti-rabbit Cy3-conjugated antibody (Jackson Laboratories, West Grove, PA) at 1/1,000 dilution and fluorescein isothiocyanate (FITC)-phalloidin (Sigma Chemical Co.) for an additional hour. The coverslips were then washed and mounted in 5 : 1 glycerol-Tris (1.5 M pH 8.8). All the antibodies were diluted in 1% bovine serum albumin in PBS and the incubations carried out in a humid chamber.

Statistical analysis

The quantitative results and images shown are representative of, at least, three independent experiments performed in duplicate. Results were expressed as mean ± standard deviation and the statistical significance evaluated employing Student's *t*-test.

RESULTS

Early and late calcium waves in healing BCE monolayers

In BCE monolayers, a FCW develops immediately after wounding and propagates from the wound border up to at least 10 cell rows toward the unwounded area (Figure 1A). Similarly to other epithelia,[7,9,14] this calcium wave quickly achieves its maximum (i.e., 10–15 seconds after the onset) and rapidly diminishes (Figure 1A). By approximately 3 minutes, only few cells at the wound border maintain an increased calcium signal (Figure 1A). Most of these cells are already dead or will eventually die, as revealed by PI staining (Figure 1A and B, arrowheads), and will progressively detach form the monolayer (Figure 1B). As early as 5 minutes after injury, the wound border free from dead cells shows that the living cells at the wound edge display calcium and oxonol signals similar to those of the remaining monolayer, i.e., at basal nonactivated levels (Figure 1B). Approximately 30 minutes after the injury, the calcium signal again increases in some border cells (Figure 1C). This increased signal has a similar spatial distribution to the augmented oxonol signal (Figure 1C) that, as reported by us,[6] gradually develops in the healing edge cells as a consequence of the increase in ENaC expression. Both the calcium and oxonol signals progressively extend inwardly to the center of the monolayer, maintaining the superposed spatial distribution (Figure 1D). By 4 hours, the calcium concentration of the border cells reaches an approximately fourfold increase with respect to the center of the monolayer (Figure 1E). As shown previously,[6] the rise in the oxonol signal is in turn associated with an increase in intracellular sodium. By 24 hours, the oxonol signal remains augmented, as previously reported by us.[6] The calcium signal also remains increased, although it is mainly observed at the level of the first cell rows (not shown).

Mechanism of generation of the SCW

As shown, the SCW develops concomitantly to the plasma membrane depolarization at the cells of the wound borders (Figure 1B–D). Because this depolarization is in turn due to the ENaC-dependent intracellular sodium increase,[6] we investigated whether the SCW also depends on the ENaC increase. Figure 2A shows that both amiloride and phenamil, which are two blockers of ENaC activity, inhibit the SCW as well as the plasma membrane depolarization (see Figure 5A for quantitative analysis). These results suggest that the increase in intracellular sodium and/or the membrane depolarization are determinants for the generation of the SCW. Based on this finding, we explored the possible involvement of the NCX in the SCW. At the depolarization levels achieved at the wound borders (i.e., below −30 mV),[6] the NCX may predominantly operate under the "reverse mode." It has been well established that the two conditions met under our experimental circumstances, membrane depolarization and intracellular sodium increase, may independently induce the transition of the NCX from the direct to the reverse operation mode.[15] It must be noted that both amiloride and phenamil have been reported to inhibit the NCX.[16] However, the concentrations employed in this study are approximately one order of magnitude below the 50% inhibition (IC_{50}) for the NCX in epithelial cells, while they are well above the corresponding ones for ENaC.[16] In

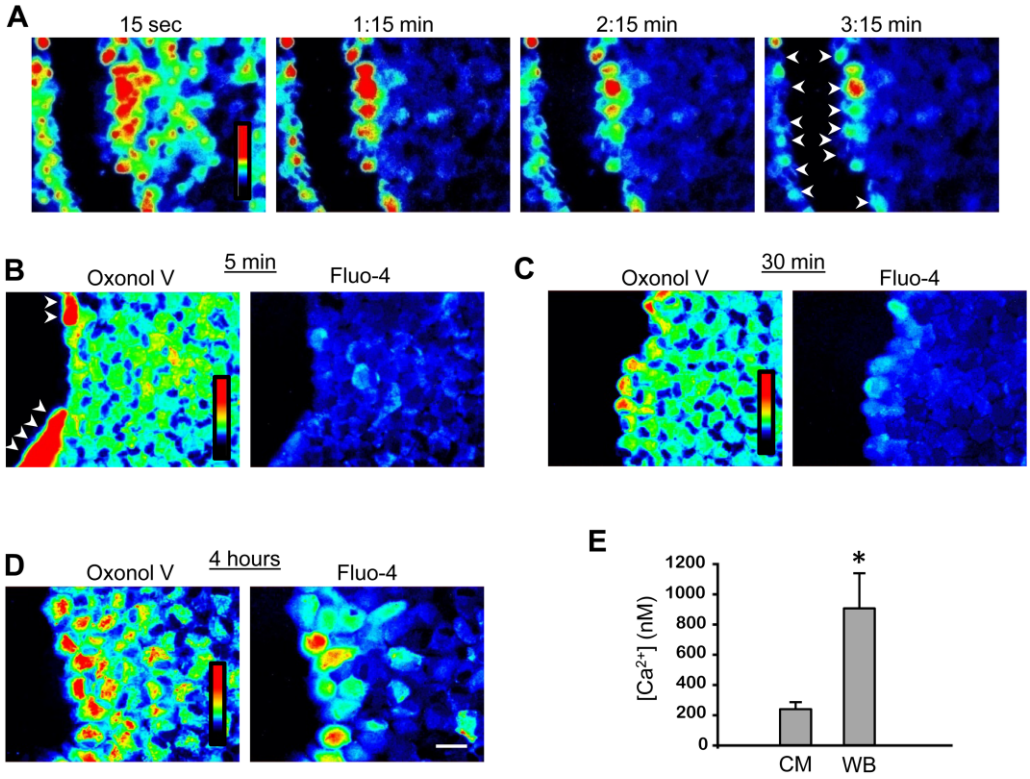


Figure 1. Early and late calcium increases in healing bovine corneal endothelial monolayers. (A) Fluo-4-loaded cells were wounded under the microscope and photographed at the indicated times (see Materials and methods). The arrowheads point to cells with propidium iodide (PI)-stained nuclei. (B–D) Double fluorescence images of oxonol V and Fluo-4-loaded cells taken at the indicated times. The arrowheads (B) point to dead cells, intensely stained by PI. Because they are partially detached, these cells are out of focus. Notice that, by 5 minutes, the live cells at the leading edge do not exhibit any increase in fluorescence while, beginning at 30 minutes, there is a concomitant increase of both the oxonol V and Fluo-4 signals. (E) Fura-2 measurements of cytosolic calcium at the wound border (WB) and center of the monolayer (i.e., more than 20 cell rows from the wound border, CM) at 4 hours after wounding. The asterisk (*) indicates significant difference ($p < 0.05$) with respect to control. (A–D) The inserts show the pseudocolor scale for each experiment, where black represents no or low signal and red represents the maximum intensity. Bar: 60 μm (A); 30 μm (B–D).

Figure 2B, we show the effect of two NCX inhibitors, KBR and SN-6, on the SCW and plasma membrane depolarization. As can be seen, both blockers produce significant inhibition of the SCW, although not its complete suppression. Figure 5A displays the quantitative analysis of the effects of these drugs on the SCW. Also, the inhibitors determined a decrease in the depolarization signal (Figure 2B), probably due to the inhibition of the calcium entry via the electrogenic NCX.

The extracellular origin of calcium in the SCW is supported by experiments performed depleting endoplasmic reticulum calcium stores in the course of the healing response. This was achieved by performing long-term (i.e., over 30 minutes) incubations with thapsigargin, a blocker of the endoplasmic reticulum calcium pump,[17] proved to be effective in corneal endothelial cells.[18] As shown in Figures 2C and 5A, thapsigargin did not inhibit the SCW and membrane depolarization. It is to be noted that monolayers of BCE cells in culture cannot tolerate the absence of extracellular calcium for the necessary experimental periods because this condition produces loss of cell junctions and eventual cell detachment.[19]

Because the calcium signal was not completely abolished either by the ENaC or the NCX inhibitors, we also evaluated the possibility that L-type calcium channels could be involved in the SCW, in view that these channels are activated by membrane depolarization.[20] To assess their possible participation, we first explored the effect of membrane depolarization on intracellular calcium in noninjured BCE monolayers. Figure 3A and B shows that only at the onset of a sustained membrane depolarization a transient increase in intracelular calcium occurs, which is greatly inhibited by the incorporation of nimodipine, a blocker of L-type calcium channels. Consistently, nimodipine did not produce any modification in the SCW in healing BCE monolayers (Figure 3C).

The relative effects of the different treatments on the SCW are summarized in Figure 5A. From its definition (see Materials and methods), the parameter $\Delta_{1,8}$ represents a measurement of the average slope of the calcium increase in the direction of the border to the center of the monolayer. In general, the numerical results shown in Figure 5A, showing the relative effects on $\Delta_{1,8}$ with respect to the corresponding

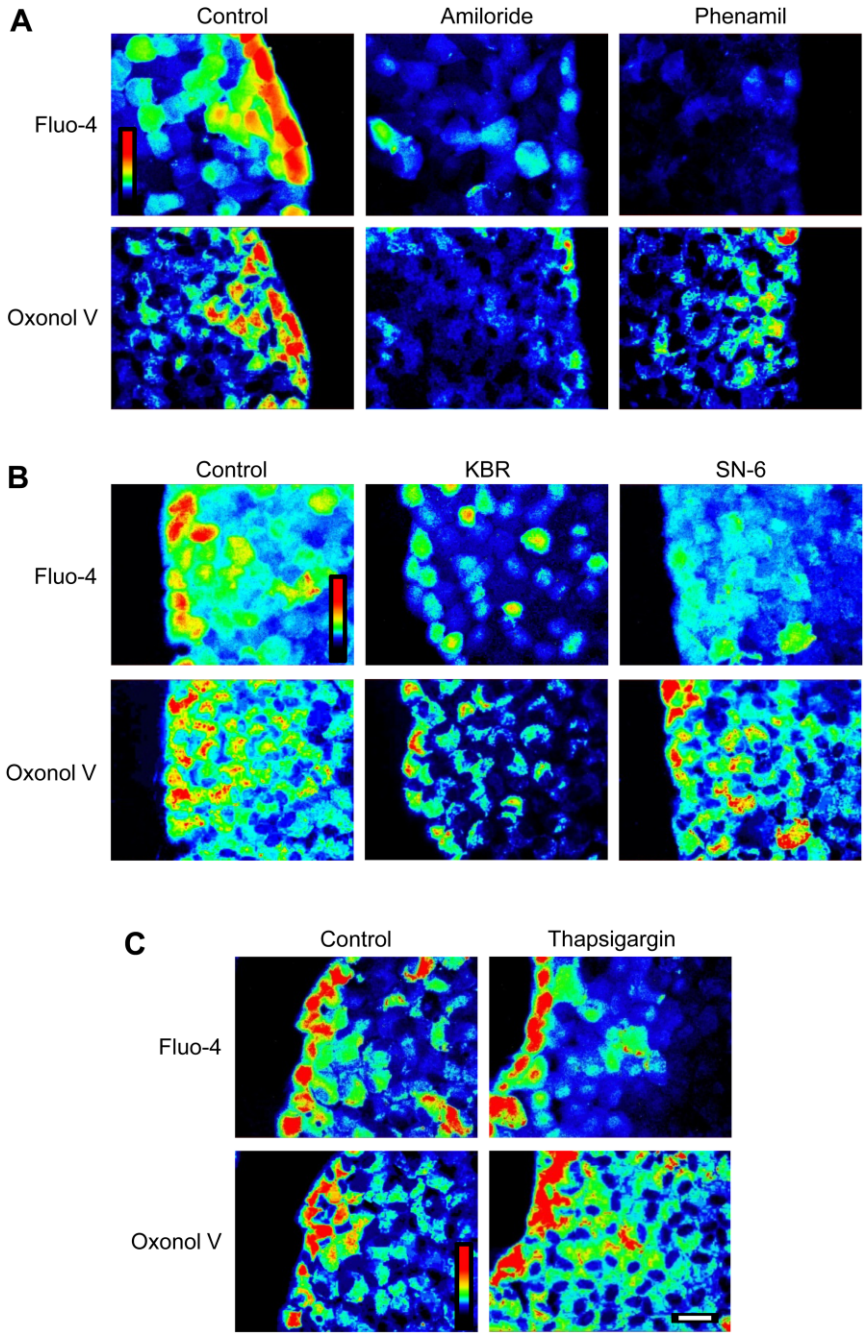


Figure 2. Effect of epithelial sodium channel and sodium-calcium exchanger inhibitors on the late calcium increase of healing bovine corneal endothelial (BCE) monolayers. Pseudocolor images showing the effect of different drugs on the plasma membrane depolarization and calcium increase of the wound border cells in BCE monolayers after 4 hours of wounding. (A–C) The wounded monolayers were incubated for 4 hours in minimal essential medium. The corresponding drugs ([A] 10 μM amiloride, 33 μM phenamil; [B] 10 μM KBR, 30 μM SN-6; and [C] 1 μM thapsigargin) were incorporated 1 hour immediately before obtaining the images. The inserts show the pseudocolor scale for each experiment (cf. Figure 1). Bar: 30 μm. KBR, KB-R7943.

controls, are in agreement with the conclusions that can be drawn from the observation of the fluorescence images (Figure 2). Some comments should be made for the particular case of KBR. From the images, KBR may seem to produce a somewhat larger inhibitory effect on the SCW than SN-6 (Figure 2B). However, its average effect on the difference in calcium fluorescence between the first cell row and the rest is similar to that of SN-6 (Figure 5A). Taken together, the results of this section suggest that the SCW predominantly originates from extracellular calcium and is at least partially due to the functional coupling between the augmented ENaC activity and the NCX operating in reverse mode. Also, that L-type calcium channels are not involved in this response (Figure 3).

Dependence of the late ionic changes on the FCW

We performed experiments to assess whether the late ionic events undergone by the healing BCE monolayers (i.e., PMP depolarization, and sodium, calcium, and ENaC increases at the wound borders) are triggered by the FCW. Figure 4A

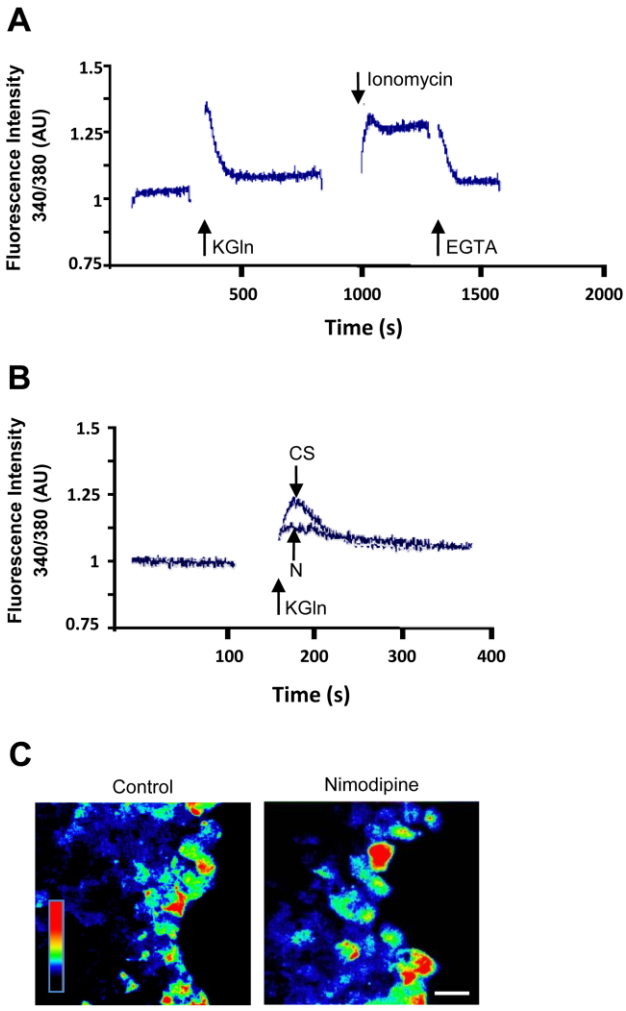


Figure 3. Effect of nimodipine on the plasma membrane potential (PMP) depolarization-dependent calcium transient in intact bovine corneal endothelial (BCE) monolayers and on the slow calcium wave (SCW). (A) Recordings of cytosolic calcium in intact BCE monolayers loaded with Fura-2. The replacement of extracellular NaCl by equimolar potassium gluconate (KGln), a condition shown to produce PMP depolarization (11) provoked a transient increase in calcium. 10 µg/mL gramicidin produced a similar effect (not shown). As control, incorporation of 10 µM ionomycin, a calcium ionophore, produced a sustained calcium increase of similar magnitude. Replacement of the solution by a calcium-free control solution (CS) with 10 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA) abolished the calcium increase. (B) Superposed recordings of control (CS) and nimodipine-treated (N) intact BCE monolayers. As can be seen, 10 µM nimodipine inhibited the occurrence of the transient calcium increase in intact BCE monolayers but did not produce any effect on the SCW of wounded monolayers (C). AU: arbitrary units. Insert as in Figure 1. Bar: 30 µm. For details on the calcium measurements, see Materials and methods.

shows that a combination of CPA (an inhibitor of endoplasmic reticulum calcium pump[17]) and EGTA determined a complete abolition of the FCW. Also, that these drugs could be completely washed and a new FCW obtained afterwards. The blocking of the FCW by this procedure did not produce any effect on the earlier-mentioned late ionic and electrical events that occur in the course of wound healing of BCE monolayers, i.e., PMP depolarization, sodium increase, SCW, and increase in ENaC expression (Figure 4B–D).

Roles of the early and late calcium waves in the healing process

As shown in the previous section, inhibition of the FCW has no consequence on the development of the SCW. Nevertheless, we explored whether inhibition of the FCW would per se determine modifications in the velocity of wound healing. Figure 5B shows that the reversible inhibition of this wave produces an approximately 15% decrease in the healing velocity with respect to the washed control (see legend to Figure 4).

As mentioned earlier, we have previously shown that inhibition of ENaC produces a considerable decrease in wound healing (i.e., approximately 60%) of BCE monolayers.[6] In order to gain some insight on the possible role of the SCW per se in the process of wound healing of BCE monolayers, we explored the effects of KBR and SN-6 on the healing rate. As shown in Figure 5B, the incorporation of these two blockers determines an approximately 40% reduction of the healing rate. These results suggest that the NCX-dependent component of the SCW plays a role in the overall healing process.

DISCUSSION

This work provides new evidence regarding the ionic mechanisms involved in wound healing in corneal endothelium, which may contribute to the overall understanding of the healing processes in epithelia. In this respect, we have reported here that, during wound healing, monolayers of confluent BCE cells in culture slowly develop a late calcium wave that extends from the cells of the wound border toward the center of the monolayer, following a similar pattern to the depolarization of the PMP. This calcium wave must be distinguished from the FCW that occurs immediately after the injury. In BCE cells, this early calcium wave is completely extinguished at approximately 5 minutes of wounding while, as reported here, the SCW starts to develop after 30 minutes of healing, concomitantly to the onset of the depolarization and sodium increases.[6] We give here evidence that the calcium involved in the slow wave is of extracellular origin. The increase in intracellular calcium can be at least partially determined by the activity of the NCX functioning in reverse mode. Figure 6 shows a simple model for the possible contribution of the NCX on the modifications in ionic transport undergone by the border BCE cells during wound healing. Under basal, nonwounded conditions and in the early stages of wound healing (Figure 6A), the sodium conductivity of the border cells is low and the NCX functions in the direct mode. The cytosolic sodium and calcium concentrations are kept at low levels and the membrane potential is dominated by the potassium permeability. As previously demonstrated,[6] one of the main events in healing BCE monolayers consists in the increase in ENaC expression. As a consequence, the membrane potential of the border cells

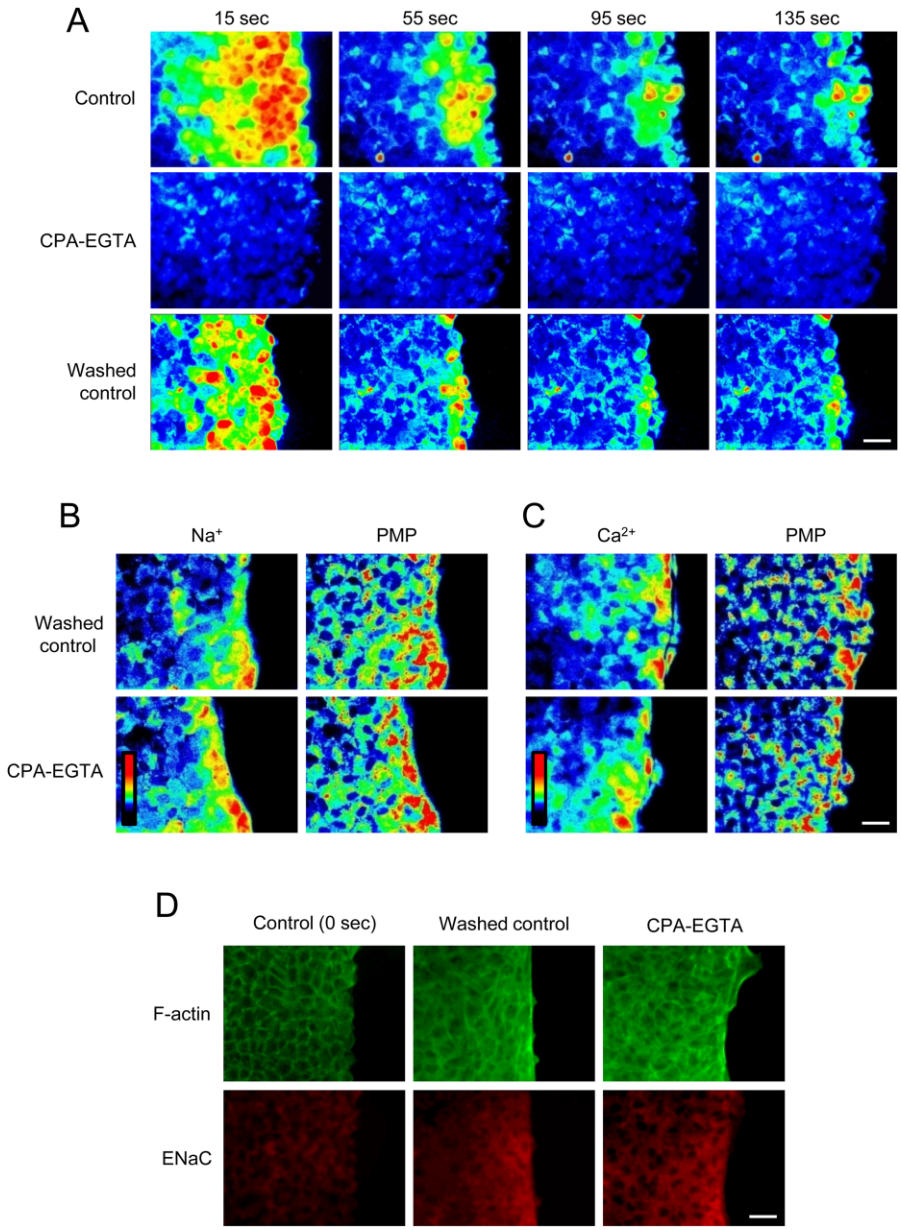


Figure 4. (A) Reversible inhibition of the fast calcium wave. Bovine corneal endothelial monolayers were incubated in minimal essential medium without serum containing 10 μM cyclopiazonic acid (CPA) for 1 hour in the cell culture incubator and then transferred to sterile control solution (CS) without calcium supplemented with 100 μM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA). After 1 minute, linear wounds were produced and photographed (CPA-EGTA), or, after an additional minute, the coverslips were washed with CS, kept in CS for 30 minutes more, wounded, and photographed (washed control). The standard control fast calcium wave (FCW) (control) was performed as in Figure 1A. For all the conditions, Fluo-4 and pluronic acid were added 30 minutes before wounding. As can be observed, treatment with CPA-EGTA determined complete inhibition of the FCW (CPA-EGTA). The washing maneuvers described earlier permitted to obtain a typical FCW after the wound (washed control). (B–D) Effect of the inhibition of the FCW (employing the same procedures as in [A] for the "washed control" and "CPA-EGTA" conditions) on the PMP depolarization (B and C), sodium increase (B), calcium increase (C), and increase in ENaC expression (D). All images correspond to 4 hours of healing except control (D). In this case, the monolayers kept in minimal essential medium (MEM) without serum were processed immediately after wounding. For the washed control experiments, the coverslips were processed as in A and kept for 4 hours in MEM without serum. For the CPA-EGTA experiments, the coverslips were washed 1 minute after performing the wound and then kept in MEM without serum for 4 hours. For B–C, the corresponding fluorochromes were incorporated 30 minutes before photography. In D, F-actin images are included for reference. Inserts as in Figure 1. Bar: 60 μm. ENaC, epithelial sodium channel; PMP, plasma membrane potential.

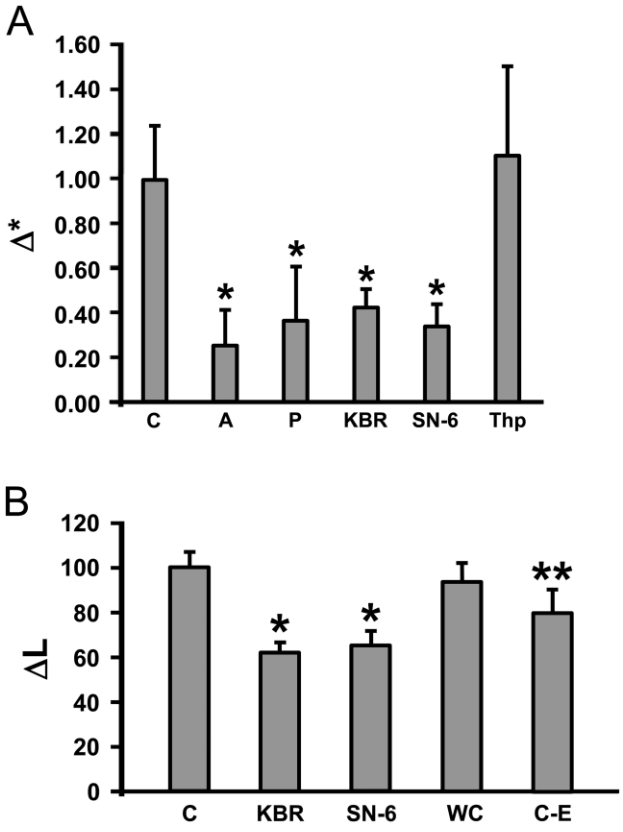


Figure 5. (A) Relative change in average fluorescence produced by epithelial sodium channel and sodium-calcium exchanger (NCX) inhibitors on the late calcium increase of healing bovine corneal endothelia (BCE) monolayers. For each experiment, Δ* for Fluo-4 fluorescence was determined as the ratio between $\Delta_{1,8}$(treatment)/$\Delta_{1,8}$(control), where "treatment" refers to the particular experimental condition (i.e., amiloride [A], phenamil [P], KB-R7943 [KBR], SN-6, and thapsigargin (Thp)] and "control" to the corresponding control. The bar for control (C) corresponds to unity and its standard deviation calculated from the ratio between each individual $\Delta_{1,8}$(control) value and the mean of all the $\Delta_{1,8}$(control) values. (B) Effect of KBR, SN-6, and fast calcium wave (FCW) inhibition on the mean velocity of healing of wounded BCE monolayers. WC: washed control; C-E: cyclopiazonic acid-EGTA. The two NCX blockers determined similar inhibitions (approximately 40%) of the velocity of wound healing, whereas FCW inhibition only slightly decreased it (approximately 15% with respect to washed control). ΔL: difference between the initial wound width and the one at 24 hours, shown as percentage with respect to control. Both for A and B (*) indicates significant difference ($p < 0.01$) with respect to control (C), and (**) significant difference with respect to control ($p < 0.01$) and with respect to washed control ($p < 0.05$). The data were obtained from three independent experiments, each one performed in duplicate, two coverslips analyzed per experimental condition for each experiment. See Materials and methods for further details.

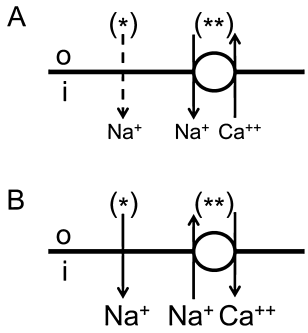


Figure 6. A possible model of the ion transport modifications undergone by the healing bovine corneal endothelial cells. (A) Under basal conditions, the sodium conductance (*) of the plasma membrane is low and the membrane potential is dominated by the potassium conductance. The sodium-calcium exchanger (**) operates in the direct mode and the intracellular calcium concentration is kept at low levels. (B) During the healing process, the border cells increase their sodium conductance (*), as a consequence of the augmented expression of epithelial sodium channel. The intracellular sodium concentration increases and the membrane potential undergoes depolarization. The sodium-calcium exchanger (**) operates in the reverse mode and the intracellular calcium concentration increases. o: external compartment; i: intracellular compartment. See text for further details.

depolarizes and the intracellular sodium concentration rises. Membrane depolarization to significant low levels and increase in cellular sodium, as found in healing BCE monolayers,[6] are per se determinants to switch the NCX operation to the reverse mode.[21] Under these conditions (Figure 6B), both sodium and calcium increase their cytosolic concentrations concomitantly to the membrane depolarization. Although under the reverse mode of operation the NCX extrudes sodium, the intracellular concentration of this ion remains augmented due to the different ranges in concentration changes promoted by the NCX and ENaC. Thus, while ENaC mediates modifications of intracellular sodium in the millimolar range,[6] in our case the reverse mode of operation of the NCX determines modifications in the nano- to micromolar range (cf. Figure 1E). Another finding of this study is that blockage of the NCX only partially inhibits the SCW (Figures 2B and 4A). In this respect, our results using nimodipine also allow us to exclude the possible contribution of L-type calcium channels to the SCW generation (Figure 3). The transient receptor potential (TRP) channels are other possible candidates to mediate the SCW. The incorporation of KBR, which inhibits both NCX and TRPC,[22] in our case fails to abolish the calcium increase completely (Figures 2B and 4A). However, our results do not permit to exclude the participation of other members of the TRP family of cation channels. In addition, we have also shown here that the SCW develops independently of the FCW because inhibition of this wave does not preclude its appearance. Consistently, this inhibition did not have any effect on the intracellular sodium and ENaC increases and on the PMP depolarization.

Different reports show that modifications in the PMP occur in migrating cells during wound healing, either

depolarization[6,23] or hyperpolarization.[24,25] It has been suggested that cytosolic calcium increase could be a common consequence of both types of modifications.[26] Intestinal epithelial cells undergo membrane hyperpolarization associated with increased activity of K^+ channels, which constitutes the driving force for calcium entry from the extracellular compartment toward the cytosol.[25] For the case of depolarization of the PMP, it was proposed that depolarization could promote cytosolic calcium increase via activation of L-type calcium channels.[26] In this work, we demonstrated that, for the border cells of healing wounds in BCE monolayers, the SCW was associated to plasma membrane depolarization. Our results suggest that this increase may at least partially occur by functional coupling between the ENaC augmented activity and the NCX functioning in reverse mode and not mediated by L-type calcium channels. Even though NCX participation in the migration process and wound-healing response has been observed in other tissues, operating either in the direct[27] or reverse mode,[28,29] the present study constitutes, to the best of our knowledge, the first report of a mechanism coupling the NCX functioning in reverse mode to the augmented activity of ENaC to promote calcium increase during wound healing. The reverse mode NCX-mediated cytosolic calcium increase has also been observed in other cell types under physiological circumstances, such as rat cerebellar type I astrocytes[30] and rabbit peripheral sympathetic nerves.[31]

Another result of this study is that the incorporation of KBR and SN-6, two widely employed inhibitors of NCX, ultimately provokes a decrease in the rate of healing of BCE monolayers. Besides the inhibition of the calcium signal, these two NCX inhibitors also caused some degree of inhibition of the membrane depolarization, possibly a consequence of the electrogenic character of the NCX (Figure 2B). As also shown here, the two ENaC inhibitors, phenamil and amiloride, caused inhibition of the depolarization and calcium signals. Correspondingly, both the ENaC inhibitors[6] and the NCX inhibitors (this study) determined decreases in the rate of wound healing of BCE monolayers (Figure 5B). On the other hand, a reversible inhibition of the FCW only produced a slight decrease in the rate of wound healing. Studies in which the FCW was inhibited employing thapsigargin, an irreversible blocker of the endoplasmic reticulum calcium pump,[17] revealed much larger effects on the velocity of healing of other epithelial monolayers.[32,33]

The literature provides examples that modifications in the PMP[11,34–36] and in intracellular calcium[37] can both constitute signals to trigger different cellular responses. In particular, in cell migration and wound healing, several authors[25,28,29] established that modifications in the PMP are linked to calcium entrance to the cytosol and that the increase in cytosolic calcium is relevant to the migration process. Although the role of calcium in the regulation of actin polymerization[38] and different stages of cell migration[39–41] has been well documented, the need for a cytosolic calcium increase in the course of cell migration seems to depend upon the particular cell type. In effect, some cells, such as vascular endothelial cells, exhibit a decrease in cytosolic calcium during migration.[42] Moreover, in these cells, calcium increase inhibits the cell motility.[43] In transformed Mardin-Darby canine kidney-focus (MDCK-F) cells, it has been found that either a decrease or an increase in cytosolic calcium provoked a reduction in the velocity of healing.[27] On the other hand, as mentioned earlier, several studies including the present work have determined that an increase in cytosolic calcium occurs during cell motility and wound healing.[25,28,29]

In summary, this work provides evidence suggesting that a late, sustained increase in intracellular calcium occurs at the border cells of wounds in BCE monolayers concomitantly to membrane depolarization and that this increase could play a role in the overall healing process. Inhibition of these phenomena, the depolarization and calcium waves of the wound border cells, delays the process of wound healing. This result could have significance regarding the design of therapeutic maneuvers to confront pathological conditions associated with healing processes in epithelia. For the case of human corneal endothelium, due to its low mitotic activity, the main mechanism of resurfacing a wound is by cell migration and enlargening.[44] Thus, attempts to improve the healing capacity of human endothelium have mainly focused on stimulating the cell proliferation rate.[44] If the SCW found in BCE cells also represents a contributing signal to the healing process in human corneal endothelia, pharmacological manipulations of the calcium increase could be explored as an additional therapeutic tool.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr. Jorge Fischbarg for fruitful criticisms and suggestions, Susana Tolosa for technical assistance, and Frigorífico Las Piedras for supplying us with fresh bovine eyes. This work received financial support from the following: (1) Comisión Sectorial de Investigación Científica and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Universidad de la República, Uruguay; (2) grant PDT 54/016 (Ministerio de Educación y Cultura, Uruguay); and (3) Premio L'Oreal-UNESCO.

REFERENCES

1. Fischbarg J. *The biology of the eye*, 1st ed. Amsterdam; Boston; Oxford: Elsevier, 2006.
2. Brightbill FS. *Corneal surgery: theory, technique, and tissue*, 4th ed. St. Louis: Mosby/Elsevier, 2009.
3. Arffa RC, Grayson M. *Grayson's diseases of the cornea*, 4th ed. St. Louis: Mosby, 1997.
4. Gordon SR. Cell migration along the basement membrane during wound repair. The corneal endothelium as a model system. In: Gefen A, editor. *Bioengineering research of chronic wounds*. Berlin; Heidelberg: Springer, 2009: 43–84.
5. Grasso S, Hernandez JA, Chifflet S. Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C1327–37.
6. Chifflet S, Hernandez JA, Grasso S. A possible role for membrane depolarization in epithelial wound healing. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 288: C1420–30.
7. Klepeis VE, Cornell-Bell A, Trinkaus-Randall V. Growth factors but not gap junctions play a role in injury-induced Ca2+ waves in epithelial cells. *J Cell Sci* 2001; 114 (Pt 23): 4185–95.
8. Mayo C, Ren R, Rich C, Stepp MA, Trinkaus-Randall V. Regulation by P2X7: epithelial migration and stromal organization in the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008; 49: 4384–91.
9. Sammak PJ, Hinman LE, Tran PO, Sjaastad MD, Machen TE. How do injured cells communicate with the surviving cell monolayer? *J Cell Sci* 1997; 110 (Pt 4): 465–75.

10. Tran PO, Hinman LE, Unger GM, Sammak PJ. A wound-induced [Ca2+]i increase and its transcriptional activation of immediate early genes is important in the regulation of motility. *Exp Cell Res* 1999; 246: 319–26.
11. Chifflet S, Hernandez JA, Grasso S, Cirillo CA. Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. *Exp Cell Res* 2003; 282: 1–13.
12. Chifflet S, Hernandez JA. Use of standard fluorescence microscopy to assess modifications in the plasma membrane potential and in the intracellular concentration of inorganic ions in cultured cells. In: Mendez Vilas A, Diaz Alvarez J, editors. *Modern research and educational topics in microscopy*. Badajoz: Formatex, 2007: 229–36.
13. Benech JC, Lima PA, Sotelo JR, Brown ER. Ca(2+) dynamics in synaptosomes isolated from the squid optic lobe. *J Neurosci Res* 2000; 62: 840–6.
14. Shabir S, Southgate J. Calcium signalling in wound-responsive normal human urothelial cell monolayers. *Cell Calcium* 2008; 44: 453–64.
15. Carafoli E. Calcium-mediated cellular signals: a story of failures. *Trends Biochem Sci* 2004; 29: 371–9.
16. Frelin C, Barbry P, Vigne P, Chassande O, Cragoe EJ Jr, Lazdunski M. Amiloride and its analogs as tools to inhibit Na+ transport via the Na+ channel, the Na+/H+ antiport and the Na+/Ca2+ exchanger. *Biochimie* 1988; 70: 1285–90.
17. Ethier MF, Yamaguchi H, Madison JM. Effects of cyclopiazonic acid on cytosolic calcium in bovine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2001; 281: L126–33.
18. Wu KY, Wang HZ, Hong SJ. Mechanism of unoprostone-induced cytosolic Ca2+ mobility in cultured porcine corneal endothelial cells. *Exp Eye Res* 2007; 85: 185–91.
19. Nin V, Hernandez JA, Chifflet S. Hyperpolarization of the plasma membrane potential provokes reorganization of the actin cytoskeleton and increases the stability of adherens junctions in bovine corneal endothelial cells in culture. *Cell Motil Cytoskeleton* 2009; 66: 1087–99.
20. Dai S, Hall DD, Hell JW. Supramolecular assemblies and localized regulation of voltage-gated ion channels. *Physiol Rev* 2009; 89: 411–52.
21. Carafoli E, Santella L, Branca D, Brini M. Generation, control, and processing of cellular calcium signals. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2001; 36: 107–260.
22. Kraft R. The Na+/Ca2+ exchange inhibitor KB-R7943 potently blocks TRPC channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 361: 230–6.
23. Grifoni SC, Gannon KP, Stec DE, Drummond HA. ENaC proteins contribute to VSMC migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 291: H3076–86.
24. Freeman LC, Narvaez DF, McCoy A, von Stein FB, Young S, Silver K, Ganta S, Koch D, Hunter R, Gilmour RF, Lillich JD. Depolarization and decreased surface expression of K+ channels contribute to NSAID-inhibition of intestinal restitution. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 74–85.
25. Wang JY, Wang J, Golovina VA, Li L, Platoshyn O, Yuan JX. Role of K(+) channel expression in polyamine-dependent intestinal epithelial cell migration. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278: C303–14.
26. Fuller CM, Benos DJ. Putting the brakes on vascular smooth muscle cell migration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008; 294: H1987–8.
27. Dreval V, Dieterich P, Stock C, Schwab A. The role of Ca2+ transport across the plasma membrane for cell migration. *Cell Physiol Biochem* 2005; 16: 119–26.
28. Sakamoto K, Owada Y, Shikama Y, Wada I, Waguri S, Iwamoto T, Kimura J. Involvement of Na(+)/Ca(2+) exchanger in migration and contraction of rat cultured tendon fibroblasts. *J Physiol* 2009; 587 (Pt 22): 5345–59.
29. Tong XP, Li XY, Zhou B, Shen W, Zhang ZJ, Xu TL, Duan S. Ca(2+) signaling evoked by activation of Na(+) channels and Na(+)/Ca(2+) exchangers is required for GABA-induced NG2 cell migration. *J Cell Biol* 2009; 186: 113–28.
30. Rojas H, Ramos M, Dipolo R. A genistein-sensitive Na+/Ca2+ exchange is responsible for the resting [Ca2+]i and most of the Ca2+ plasma membrane fluxes in stimulated rat cerebellar type 1 astrocytes. *Jpn J Physiol* 2004; 54: 249–62.
31. Torok TL, Racz D, Saska Z, David AZ, Tabi T, Zillikens S, Nada SA, Klebovich I, Gyires K, Magyar K. Reverse Na(+)/Ca(2+)-exchange mediated Ca(2+)-entry and noradrenaline release in Na(+)-loaded peripheral sympathetic nerves. *Neurochem Int* 2008; 53: 338–45.
32. Zhao Z, Walczysko P, Zhao M. Intracellular Ca2+ stores are essential for injury induced Ca2+ signaling and re-endothelialization. *J Cell Physiol* 2008; 214: 595–603.
33. Leiper LJ, Walczysko P, Kucerova R, Ou J, Shanley LJ, Lawson D, Forrester JV, McCaig CD, Zhao M, Collinson JM. The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6+/- mouse model of epithelial wound-healing delay. *BMC Biol* 2006; 4: 27.
34. Sundelacruz S, Levin M, Kaplan DL. Role of membrane potential in the regulation of cell proliferation and differentiation. *Stem Cell Rev* 2009; 5: 231–46.
35. Szaszi K, Sirokmany G, Di Ciano-Oliveira C, Rotstein OD, Kapus A. Depolarization induces Rho-Rho kinase-mediated myosin light chain phosphorylation in kidney tubular cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289: C673–85.
36. Waheed F, Speight P, Kawai G, Dan Q, Kapus A, Szaszi K. Extracellular signal-regulated kinase and GEF-H1 mediate depolarization-induced Rho activation and paracellular permeability increase. *Am J Physiol Cell Physiol* 2010; 298: C1376–87.
37. Roderick HL, Cook SJ. Ca2+ signalling checkpoints in cancer: remodelling Ca2+ for cancer cell proliferation and survival. *Nat Rev Cancer* 2008; 8: 361–75.
38. Robinson RC, Mejillano M, Le VP, Burtnick LD, Yin HL, Choe S. Domain movement in gelsolin: a calcium-activated switch. *Science* 1999; 286: 1939–42.
39. Doyle A, Marganski W, Lee J. Calcium transients induce spatially coordinated increases in traction force during the movement of fish keratocytes. *J Cell Sci* 2004; 117 (Pt 11): 2203–14.
40. Lawson MA, Maxfield FR. Ca(2+)- and calcineurin-dependent recycling of an integrin to the front of migrating neutrophils. *Nature* 1995; 377: 75–9.
41. Wei C, Wang X, Chen M, Ouyang K, Song LS, Cheng H. Calcium flickers steer cell migration. *Nature* 2009; 457: 901–5.
42. Kimura C, Oike M, Koyama T, Ito Y. Alterations of Ca2+ mobilizing properties in migrating endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H745–54.
43. Chaudhuri P, Colles SM, Damron DS, Graham LM. Lysophosphatidylcholine inhibits endothelial cell migration by increasing intracellular calcium and activating calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003; 23: 218–23.
44. Tuli S, Goldstein M, Schultz GS. Modulation of corneal wound healing. In: Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ, editors. *Cornea*. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2005: 133–50.

Artículo II

Justet, C., J.A. Hernandez, A. Torriglia, and S. Chifflet. 2016. Fast calcium wave inhibits excessive apoptosis during epithelial wound healing. *Cell and tissue research*. 365:343-356.

Cell Tissue Res
DOI 10.1007/s00441-015-2223-7

REGULAR ARTICLE

Increase in the expression of leukocyte elastase inhibitor during wound healing in corneal endothelial cells

Cristian Justet[1] · **Frances Evans**[1,5] · **Alicia Torriglia**[2,3,4] · **Silvia Chifflet**[1]

Received: 17 August 2014 / Accepted: 22 May 2015
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract Tissue injury triggers a complex network of cellular and molecular responses. Although cell migration and proliferation are the most conspicuous, several other responses, such as apoptosis and increased protease activity, are necessary for a proper restitution of the tissue. In this work, we study the leukocyte elastase inhibitor (LEI) expression during wound healing of bovine corneal endothelial monolayers in culture. LEI is a multifunctional protein with anti-protease and anti-apoptotic activity. When properly cleaved, it is transformed into L-DNase II, a pro-apoptotic enzyme and translocated to the nucleus. We found that early after injury LEI increases its protein and mRNA expressions, without nuclear translocation and returns to basal levels immediately after wound closure. This increase is blocked by N-acetylcysteine, suggesting that production of reactive oxygen species immediately after wounding is involved in the LEI increase. Another finding of this work is that there is an acidification of the cells at the wound border which, in contrast to other cell types, does not determine nuclear translocation of the protein. Taken together, the results of this work suggest that the function of LEI during wound healing is related to its activity as a protease inhibitor and/or to its anti-apoptotic activity.

Keywords Leukocyte elastase inhibitor · Serpin-B1 · Wound healing · Healing modes · Epithelia

✉ Alicia Torriglia
alicia.torriglia@inserm.fr

✉ Silvia Chifflet
schiffle@mednet.org.uy

[1] Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

[2] INSERM U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, Paris, France

[3] Université Paris Descartes, Paris, France

[4] Université Pierre et Marie Curie, Paris, France

[5] Present address: Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

Introduction

Wounding triggers the rapid activation of a complex network of molecular responses. Multiple processes are needed to achieve a quick and proper restitution of the injured tissue. The cells must migrate, proliferate and also die (Fuchs and Steller 2011; King and Newmark 2012). In addition, protein synthesis and degradation are activated in a delicate balance during the healing response (Cauwe and Opdenakker 2010). Leukocyte elastase inhibitor (LEI) is a member of the serpin (serine protease inhibitor) superfamily, a family that contains about 1500 members (Huntington 2011). Human serpins are divided into 9 clades, named from A to I. Most of the members of this family are serine protease inhibitors, although some of them do not have inhibitory activity and others are able to inhibit other proteases, like cystein proteases (Izuhara et al. 2008). Serpins have been involved in cell motility (Tseng et al. 2009), some were shown to increase in a proteomic study of human burn healing (serpin B1, SCCA1 and SCCA2) (Pollins et al. 2007) and in gene expression studies of skin wounds (serpins A1, B1, B3–B6, B9, B13, 1 and 2) (Roupe et al. 2010).

LEI belongs to clade B, an intracellular clade of serpins. It is also known as serpin B1 (Izuhara et al. 2008) and monocyte neutrophil elastase inhibitor (MNEI) (Groutas et al. 2011). We

Published online: 18 June 2015

have shown that LEI is, like other proteins of this family, a multifunctional protein (Torriglia et al. 2008). In its native state, LEI inhibits elastases (Potempa et al. 1988), AP24 (Altairac et al. 2003a) and cathepsin D (Padron-Barthe et al. 2008). We have also shown that the cleavage of LEI by its cognate protease not only induces the loss of the anti-protease activity but also the appearance of DNase activity (the so-called L-DNase II, for LEI-derived DNase II) (Torriglia et al. 1998). The transformation of LEI into L-DNase II is followed by a change in its subcellular location, from cytoplasm to the nucleus (Padron-Barthe et al. 2007). The subcellular location of LEI is strongly related to cell survival, since LEI is able to inhibit caspase-dependent cell death (Padron-Barthe et al. 2008), while L-DNase II induces caspase-independent apoptosis (Torriglia et al. 2008). Thus, the intracellular location of the protein is tightly related to its enzymatic activity and to its pro-survival or pro-apoptotic function. Moreover, we have previously shown that the activation of the caspase-independent pathway of LEI/L-DNase II is strongly related to metabolic stress (Lepretre et al. 2013), oxidative stress (Bourges et al. 2007; Huc et al. 2006) and intracellular acidification (Altairac et al. 2003b).

In this work, we report that LEI increases its expression during wound healing in bovine corneal endothelial cells (BCE) in culture, both in monolayers healing via the formation of an actin cable at the wound borders and by lamellipodial cell crawling. We assess its intracellular localization and the cellular signals that trigger the increase in LEI expression.

Materials and methods

Chemicals

N-acetylcysteine (NAC) and 5-(N,N-hexamethylene)amiloride (HMA, stock solution: 80 mM in DMSO) (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France)

Cell culture, whole corneas and wounding

Bovine eyes were obtained from a local abattoir and primary cultures established as described previously (Chifflet et al. 2003). Cells from the first to the fifth passages were seeded on glass coverslips and grown for 15–25 days. Linear wounds were performed with a nude 21-gauge syringe needle for wounds removing the extracellular matrix (ECM) or a silicone-coated one for those preserving it. For the ELISA assay, western blots and qPCR (see below), cells grown on 35-mm Petri dishes were multiply wounded by performing 5 parallel wounds in one direction and 5 additional ones in the perpendicular direction. After wounding, the monolayers were incubated in MEM without serum in the tissue culture incubator for the appropriate periods of time. The unwounded monolayers used as controls were incubated in the same medium together with the wounded ones. Porcine eyes were also from a local slaughterhouse and porcine corneal endothelial (PCE) cells were obtained and processed in a similar fashion to the BCE cells, except that the retinal extract was omitted.

Fresh pig eyes were dissected and the corneas removed with a scleral rim. After wounding as described above, the corneas were placed in a 24-well culture dish, covered with MEM and placed in the tissue culture incubator for 1 h.

Fluorescence and confocal microscopy

For actin and LEI visualization, cells grown on glass coverslips were fixed with 4 % paraformaldehyde (PFA) in PBS for 15 min, permeabilized with 0.1 % (vol/vol) Triton X-100 in PBS for 15 min and incubated for 1 h at 37 °C with an anti-LEI polyclonal primary antibody (produced in Dr. Torriglia's Laboratory; Torriglia et al. 1995) at a 1:100 dilution in 1 % BSA in PBS. After washing three times with PBS, the coverslips were incubated for 1 h at 37 °C in a solution containing a Cy3-conjugated anti-rabbit antibody (Jackson ImmunoResearch, West Groove, PA, USA), FITC-phalloidin (Sigma-Aldrich, Munich) and 1 % BSA in PBS. Confocal images were obtained with a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

We attempted to reveal LEI in corneal endothelium of bovine whole corneas. We assayed different fixing (between 0,1 and 4 % PFA for 15 min, ice-cold methanol and acetone for 5 min) and permeabilizing (Triton X-100 between 0,05 and 3 % for 5 min to 1 h, SDS 0.5 % for 5 min) protocols. Although most of them allowed us to stain F-actin, none was suitable for LEI. This is not altogether surprising, since it has been reported that staining of corneal endothelial cells in situ is hard to process for immunofluorescence and that each different antibody requires its own protocol (He et al. 2011). However, we found that pig corneal endothelial cells in situ were easily stained by LEI utilizing the following protocol: 4 % PFA for 15 min, 0.3 % Triton X-100 for 15 min and antibody staining as described for cultured cells (see "Results").

ELISA

For this assay, wounded and unwounded monolayers were lysed in lysis buffer [50 mM Tris (pH 7.2), 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % sodium deoxycholate, 1 % sodium dodecyl sulfate]. ELISA plates were coated with 200 ng of the corresponding lysate protein diluted in Vollers buffer (0.05 M carbonate, pH 9.6) and incubated for 1 h at 37 °C. Non-specific binding sites were saturated with 1 % BSA in Vollers buffer for 1 h at 37 °C. The wells were then washed twice with PBS-Tween (0.05 % Tween in PBS) and incubated with anti-LEI antibody

diluted 1/1000 in PBS-Tween containing 0.1 % BSA. After rinsing three times with PBS-Tween, the wells were incubated for an additional hour with peroxydase-conjugated anti-rabbit IgG diluted 1/1000 in PBS-Tween-BSA. The peroxydase activity was developed with OPDA (o-phenylenediamine; Sigma) diluted in a phosphate sodium citrate buffer pH 5.0. The reaction was stopped by the addition of 4 N sulphuric acid before reading at 495 nm with a BioRad microplate reader. Each sample was tested in quadruplicate.

Western blot

Cell monolayers were lysed in SDS-PAGE sample buffer. The same amount of proteins (25 μg; as determined according to Bannur et al. 1999) was loaded in each well of a 12 % SDS-PAGE. The gel was blotted onto a PVDF membrane, stained by Ponceau-S and immunostained with the LEI or elastase (Sigma) primary antibodies and a perxoxydase-conjugated secondary antibody. The immunoreaction was developed by enhanced chemiluminescence (Haan and Behrmann 2007) or by Luminata Forte Western HRP substrate (Millipore, Merck Chimie, Fontenay sous Bois, France) and exposed to XAR5 film (Kodak).

Reverse transcription and real-time PCR (qPCR)

Total RNA was isolated from intact or injured BCE monolayers by using RNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). First-strand cDNA was synthesized by using oligo-dT primers (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) and superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Transcript levels of LEI were analyzed by real-time PCR performed in 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with SYBR Green (Roche, Mannheim, Germany) detection (forward sequence 5′ AACACCCGCTTCGCCG TGG, reverse sequence 5′ ACATTTGCGCCGCGGTGTCG). The HPRT (forward sequence 5CACTGGGAAGACAATG CAGA, reverse sequence GGGCATATCCCACAACAAAC)' gene was used as internal control. Delta-delta cycle threshold calculation was used for relative quantification of the results. Each condition was run in triplicate.

Inhibition of the calcium wave and of the increase of reactive oxygen species (ROS)

For visualization of the scrape-induced calcium wave and its inhibition, we used procedures employed previously (Chifflet et al. 2012; Justet et al. 2013) and briefly described here. Cells were loaded with 1.7 μM Fluo4-AM (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) in saline solution (SS; 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.02 mM NaH_2PO_4, 3.6 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$ and 10 mM HEPES pH 7.4) for 15 min and, after washing with SS, the coverslips were mounted in a custom-made chamber containing SS, placed under a fluorescence microscope and wounded. Photographs were taken at 15 s with a fluorescein filter set. For the inhibition of the calcium wave, cell monolayers were incubated in 10 μM cyclopiazonic acid (CPA) in minimal essential medium (MEM) without serum for 1 h in the cell culture incubator and then transferred to SS without calcium and supplemented with 100 μM EGTA. After 1 min in this solution, the monolayers were wounded, incubated for 1 additional minute in the same solution, transferred to SS in the custom chamber and photographed as above. For the healing studies, the cells were treated with the calcium wave inhibitors as above and, after wounding, rinsed and incubated in MEM in the tissue culture incubator for 4 h. For the inhibition of the increase of ROS, we proceeded as follows. The coverslips were incubated in 10 μM N-acetylcysteine (NAC), a well-known antioxidant molecule (Dekhuijzen 2004), in MEM at 37 °C in the CO_2 incubator for 30 min. After this, the wound was performed and the cells returned to the incubator for the appropriate time period.

Intracellular pH measurements

Cells cultured on glass coverslips were loaded for 30 min with 5 μM carboxyl-SNARF-1 AM (Molecular Probes) in Hepes buffer (20 mM Hepes, 118 mM NaCl, 4.5 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1.2 mM $MgCl_2$, 1.2 mM H_2PO_4, 5 mM glucose, pH 7.4). Once loaded, the cells were visualized and photographed using a confocal laser scanning microscope Zeiss LSM 710 (Oberkochen, Germany). Calibration of the SNARF-1 fluorescence was performed incubating the loaded cells in a high potassium buffer (17.3 mM Hepes, 10 mM Pipes, 30 mM NaCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 mM glucose) in the presence of 10 μM nigericin at pH 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 and 8.0 for 30 min at 37 °C, as described by Thomas et al. (1979).

Results

Unless otherwise specified, all the results presented here are representative of at least three independent experiments, each one performed in duplicate.

LEI expression was analyzed in confluent cultured BCE and PCE monolayers at different times after injury. Figure 1 shows fluorescence images of F-actin and LEI at 30 min, 1 and 4 h after wounding the monolayer with a sharp needle. With this procedure, after 2–4 h of injury, the monolayer develops an actin cable at the wound edge (Fig. 1c, arrowhead), as we described previously (Grasso et al. 2007). LEI staining shows that in BCE cells an increase in the antigen fluorescence in the cells nearest to the border of the injury is already noticeable at 30 min (Fig. 1d, g). In both BCE and PCE cells, at 4 h after wounding, this increase in fluorescent staining becomes more intense and has extended to additional cell rows. The pseudocolor image of LEI immunofluorescence

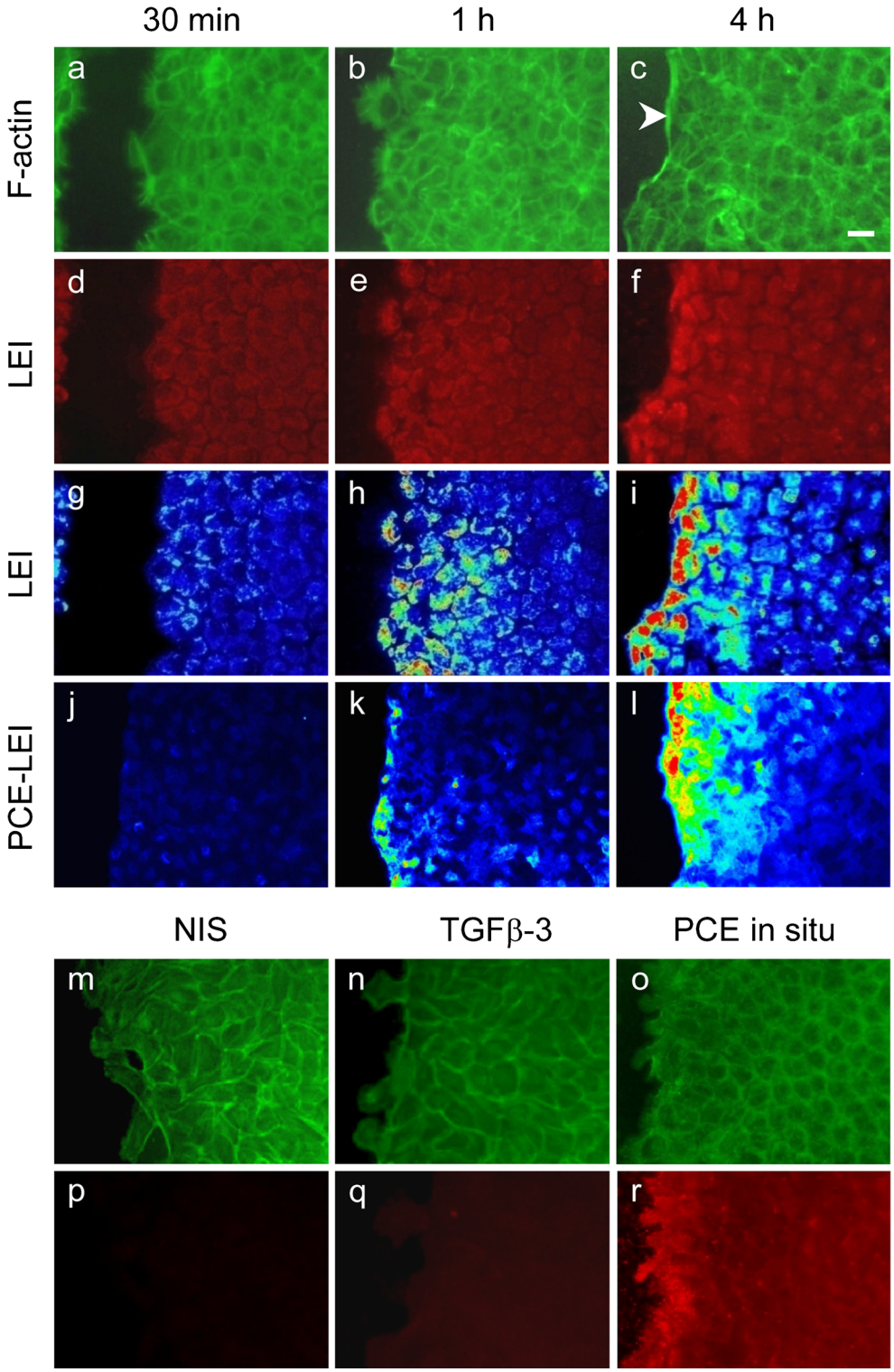


Fig. 1 LEI immunofluorescence during the first 4 h after injury. BCE and PCE cells start to migrate at approximately 30 min to 1 h after wounding the monolayer with a sharp needle. During the first 1–2 h, the leading cells migrate over the ECM left exposed by the cells dead as a consequence of the injury. In this condition, cells migrate by lamellipodial crawling (**b**, **e**, **h**). By 4–6 h, the cells have reached the edge of the ECM and are migrating by actin cable (**c**, *arrowhead*). The increase in LEI immunofluorescence is already noticeable at 1 h of healing (**h**, **k**). Non-immune serum (NIS, **p**) and an irrelevant antibody (**q**, anti-TGFβ-3; Abcam) staining are shown as negative controls. In whole pig corneas (**o**, **r**), there is also an increase in LEI immunofluorescence of endothelial cells after 1 h of healing (**r**). **a**–**c**, **m**–**o** F-actin; **d**–**f**, **r** LEI; **g**–**l** LEI (pseudocolor). Bar: (**a**–**i**, **m**, **n**, **p**, **q**) 20 μm, (**j**–**l**, **o**, **r**) 15 μm

allows for a better appreciation of this increase (Fig. 1g–l). Non-immune serum and an irrelevant antibody were used as negative controls (Fig. 1m, n, p, q). Note that corneal endothelial cells in situ also exhibit a similar increase in LEI immunofluoresence at the wound edge during wound repair (Fig. 1o, r; 1 h of healing).

Epithelial sheets adopt two basic modes of healing, via actin cable formation and by lamellipodial cell crawling (Jacinto et al. 2001). These modalities are triggered by different signaling pathways (Abreu-Blanco et al. 2012; Cordeiro and Jacinto 2013). In previous work, we showed that BCE monolayers can be induced to heal in either of these

modalities, by actin cable or lamellipodial crawling, by removing or preserving the underlying basement membrane, respectively (Grasso et al. 2007). In order to investigate whether the increase in LEI expression depends on the healing mode, we compared BCE monolayers healing by the two modalities. Figure 2 shows that, after 12 h of healing, in the crawling mode the increase of LEI involves several rows of cells, while in the actin cable mode, although the first row remains highly fluorescent, in the neighboring rows the increase is barely noticeable. Interestingly, this increase in LEI expression disappeared after the closure of the injury in both of the modalities (Fig. 2; only the case of lamellipodial closure is shown). To confirm these results, we performed ELISA, western blots and qPCR assays with unwounded (control) and wounded BCE monolayers healing by the two modalities, assessing both protein and mRNA levels (Fig. 3). As expected, an augment in LEI expression was verified in all the assays for either modality of healing and, consistent with the results of the immunofluorescence studies, the increase was larger in cells migrating by lamellipodial crawling (300.2 % of control protein; 4.68-fold of control in mRNA) than by actin cable formation (127.6 % of control in LEI protein expression; 2.86 of control in mRNA). It is interesting to note that, in the western blot studies, besides the increase in the size and intensity of the band corresponding to LEI (Fig. 3b, arrowhead), a second band of 60 kD appears or increases its signal. One of us (A.T.) has previously shown that this band corresponds to a covalent interaction between LEI, acting as an antiprotease, and its cognate protease (Torriglia et al. 1998). A western blot with an anti-elastase shows that, in effect, the 60-kD band is positive for both elastase and LEI (Fig. 3d).

In what follows (Figs. 4, 5, 6), we present the results obtained in wounded BCE monolayers in the absence of ECM. The results were similar in wounds performed in its presence (not shown).

We next addressed the question of what is the cellular event that triggers the LEI increase. Tissue injury induces a multitude of cellular responses. One of the best studied is the appearance of a calcium wave that initiates at the wound border, right after the damage and propagates into the epithelial monolayer (Sammak et al. 1997; Klepeis et al. 2001). In BCE cells, this calcium wave develops immediately after wounding, involves more than 10 rows of cells and lasts about 5 min (Chifflet et al. 2012). Among others, it has been found that this transient increase in cytosolic calcium activates gene transcription (Tran et al. 1999). To determine whether the calcium wave was responsible for the increase in LEI expression, we compared its immunofluorescence signal between untreated and calcium wave-inhibited wounded monolayers (Fig. 4c–h). As can be seen, even though the CPA-EGTA treatment (see "Materials and Methods") effectively inhibited the cytosolic calcium increase (Fig. 4a, b), it did not modify the rise in LEI expression after wounding.

The other well-known early signal activated by an injury is the generation of reactive oxygen species (ROS) (Niethammer et al. 2009; van der Vliet and Janssen-Heininger 2014). The

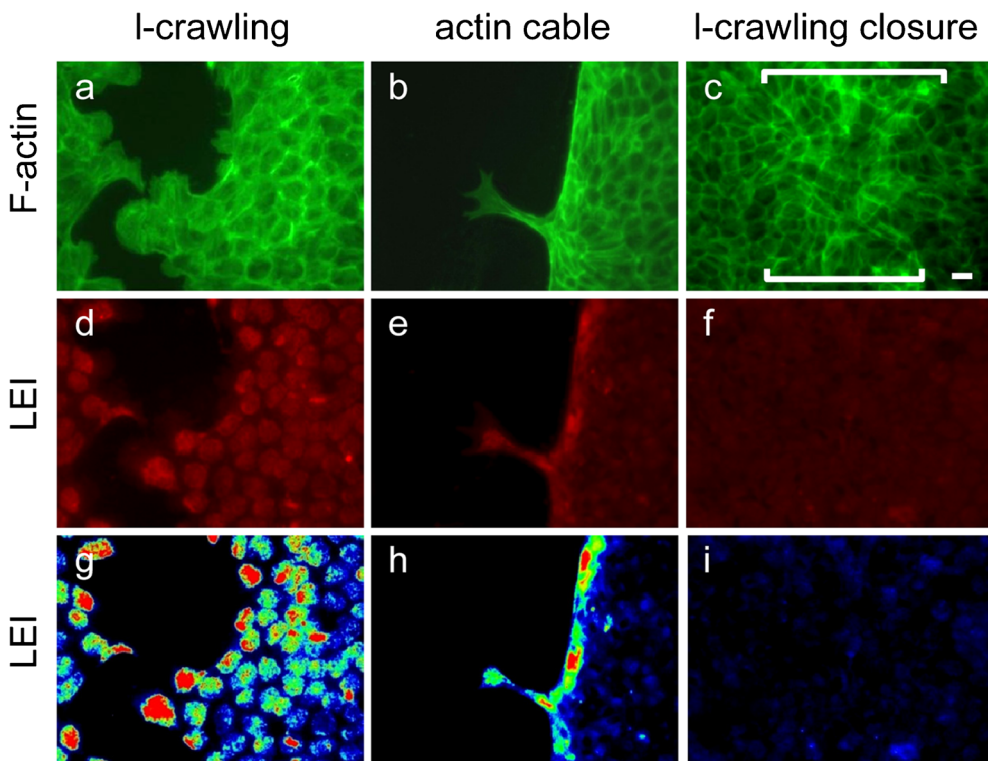


Fig. 2 LEI imunofluorescence in the two modalities of healing and after closure. After approximately 4–6 h of healing, BCE cells heal by lamellipodial crawling or via actin cable formation, depending on whether or not the ECM is present. The pictures in the *left* (**a**, **d**, **g**) and *middle* (**b**, **e**, **h**) *columns* were taken at 12 h after wounding and those in the *right column* (**c**, **f**, **i**) at 24 h, after the wound was closed. The brackets indicate the closed wound area (**c**). **a**–**c** F-actin; **d**–**f** LEI; **g**–**i** LEI (pseudocolor). *Bar* 20 μm

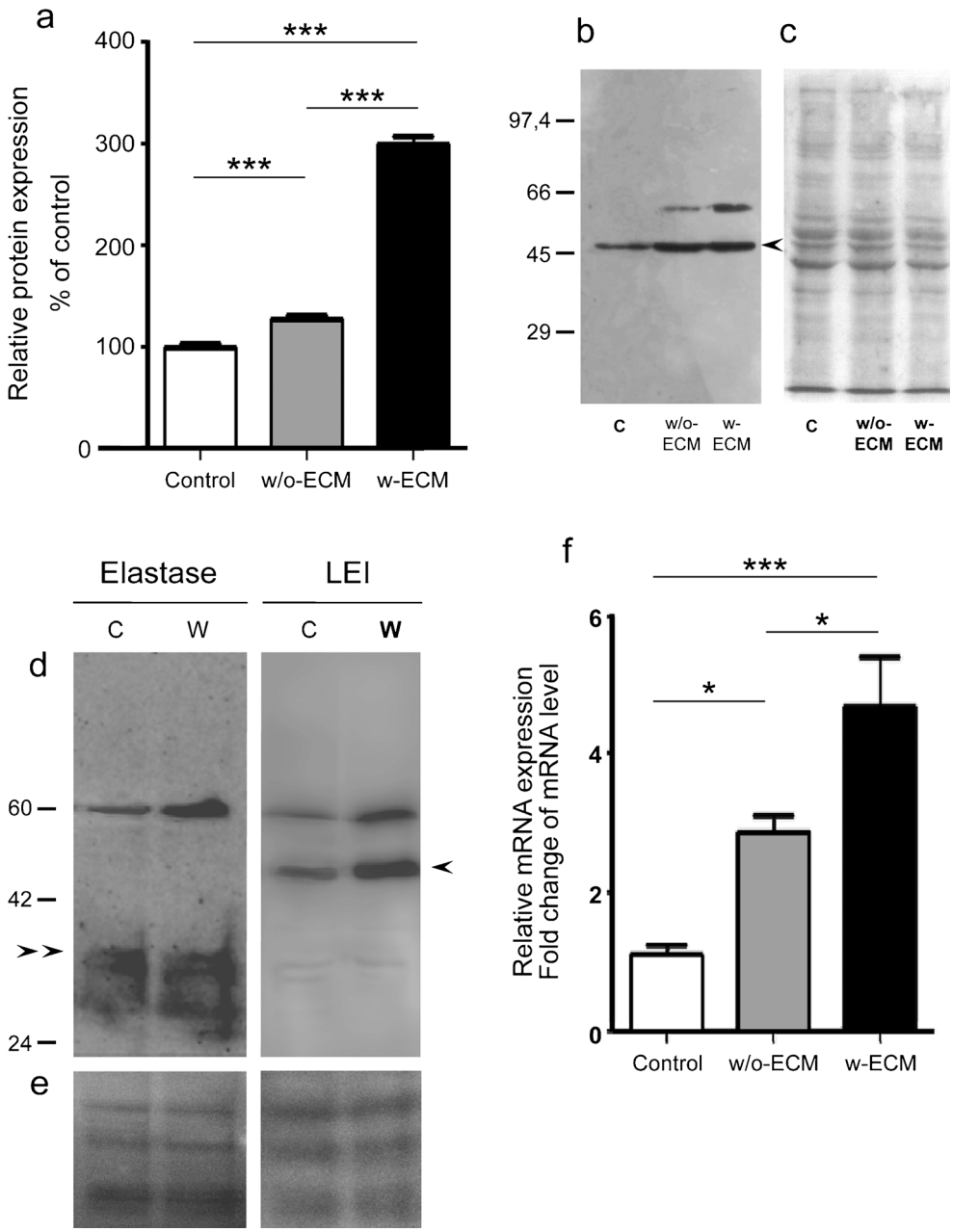


Fig. 3 Analysis of LEI expression during BCE wound healing. Confluent BCE monolayers were wounded either with a sharp needle, in order to provoke an injury of the ECM (*w/o-ECM*), or with a silicone-coated needle, in order to maintain the ECM (*w-ECM*). Four hours after injury, the proteins of the monolayer were extracted and measured by ELISA (**a**) or western blot (**b**, **c**) using an anti-LEI antibody (*arrowhead* unbound LEI). For ELISA the results were expressed as a percent of the expression of the control (unwounded layer). All means are significantly different ($p<0.001$, ANOVA test followed by a Newman-Keuls post-test). **d**, **e** Paired western blots for elastase and LEI. As can be seen, both antibodies recognize a 60-kD band (*arrowhead* unbound LEI, *double arrowhead* unbound elastase). Using the same experimental setup, the expression of LEI was analyzed at the mRNA level (**f**). To do this, mRNA from the different layers was purified, retrotranscribed and measured by relative real time PCR using the bovine HPRT gene as a reference. Data were analyzed as before. *$p<0.05$; ***$p<0.001$. For the western blots, the loading controls (Ponceau S) of the corresponding membranes are shown in (**c**, **e**)

preincubation of the monolayers with the ROS scavenger N-acetyl cysteine almost completely blocked the rise in LEI expression, suggesting that oxidative stress is the main signal for its increase (Fig. 5).

As mentioned above, LEI is a multifunctional protein, having an anti-apoptotic or pro-apopototic function according to its cleavage state and the conformational modification determined by its cleavage exposes a nuclear localization signal (Padron-Barthe et al. 2007, 2008). The results shown in Figs. 1, 2 and 4 suggest a predominant cytoplasmic location of LEI. Since intracellular acidification is a regular stimulus for the transformation of LEI into L-DNase II followed by nuclear translocation (Altairac et al. 2003b), we measured the pH of a wound-healing BCE monolayer by employing the ratiometric pH probe SNARF-1. Figure 6c shows the average pH of rows 1, 3 and 6 from the wound edge, after 5 and 6 h of healing. As shown in this figure, there is a pH gradient, with decreased pH at the wound border and control values at the sixth row. This indicates that the conditions to induce L-DNase II activation are present at the border cells. As a complement to this, we performed confocal microscopy to verify the subcellular location of LEI and the effects of cytosolic acidification on it. We induced a decrease in the intracellular pH of BCE cells by treatment with hexametylene amiloride (HMA), a compound known to inhibit the Na-H exchanger and,

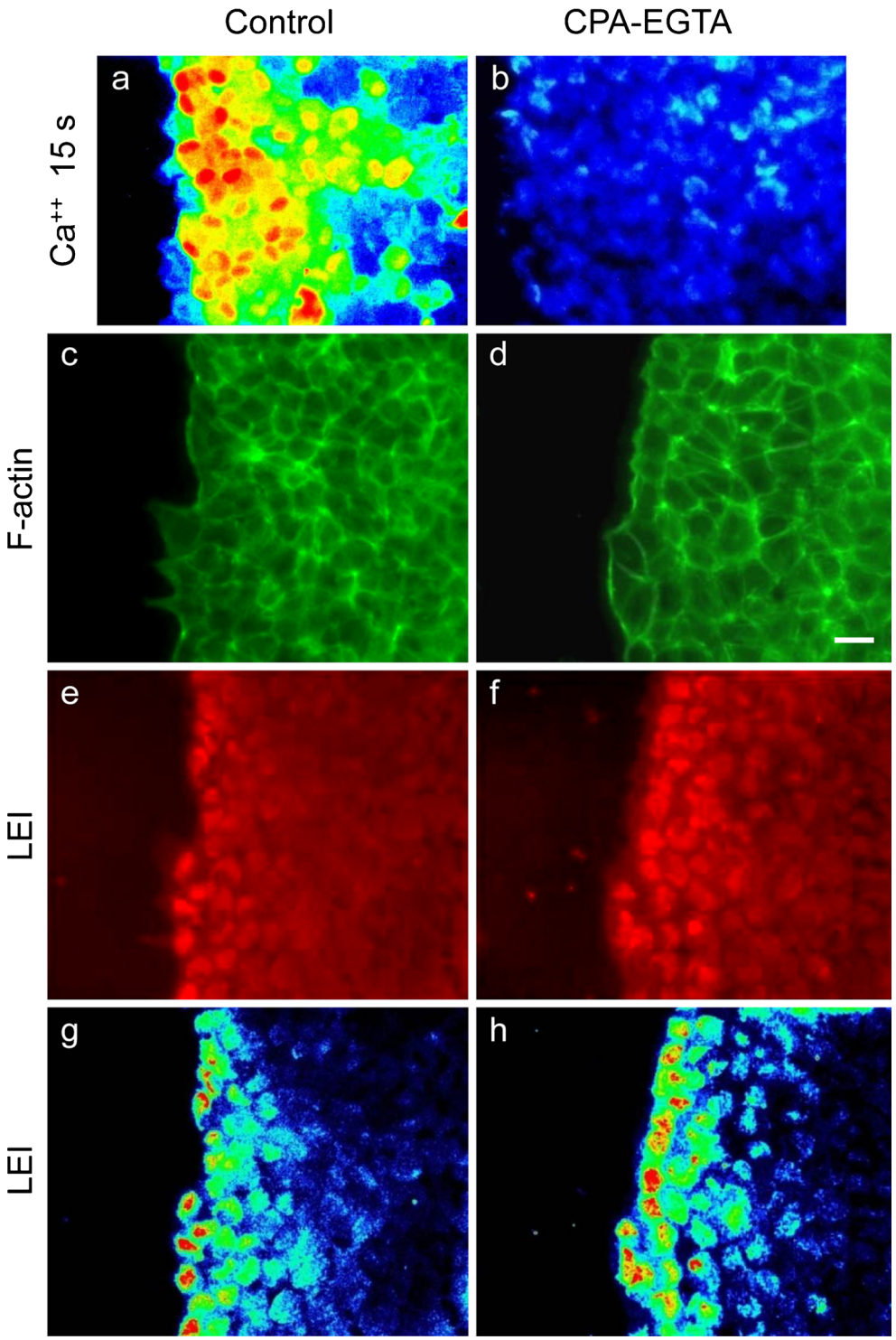


Fig. 4 Effect of calcium wave inhibition on LEI immunofluorescence. Upper panel, pseudocolor images of the calcium wave (**a**) and its inhibition by CPA-EGTA (**b**). *Lower panel* LEI expression in calcium wave-inhibited wounded monolayers after 4 h of healing in the absence of the ECM. **c**, **d** F-actin; **e**, **f** LEI; **g**, **h** LEI (pseudocolor). *Bar* 20 μm

consequently, to produce intracellular acidification (Altairac et al. 2003b). The results are shown in Fig. 6d–f. As expected, the confocal images reveal an increase in LEI fluorescence, both in wounded monolayers (Fig. 6h, e) and after HMA treatment (Fig. 6f). It can be seen that, in the two cases, LEI is mainly confined to the cytoplasmic compartment. It is interesting to note that, even though HMA treatment of BCE cells provoked a substantial increase in LEI expression, there is no evident nuclear translocation of the protein. Taken together, the results shown in Fig. 6 suggest that (1) in BCE cells intracellular acidification does not provoke nuclear translocation of LEI and (2) cytosolic acidification generated at the wound edge may contribute to the increase in LEI expression.

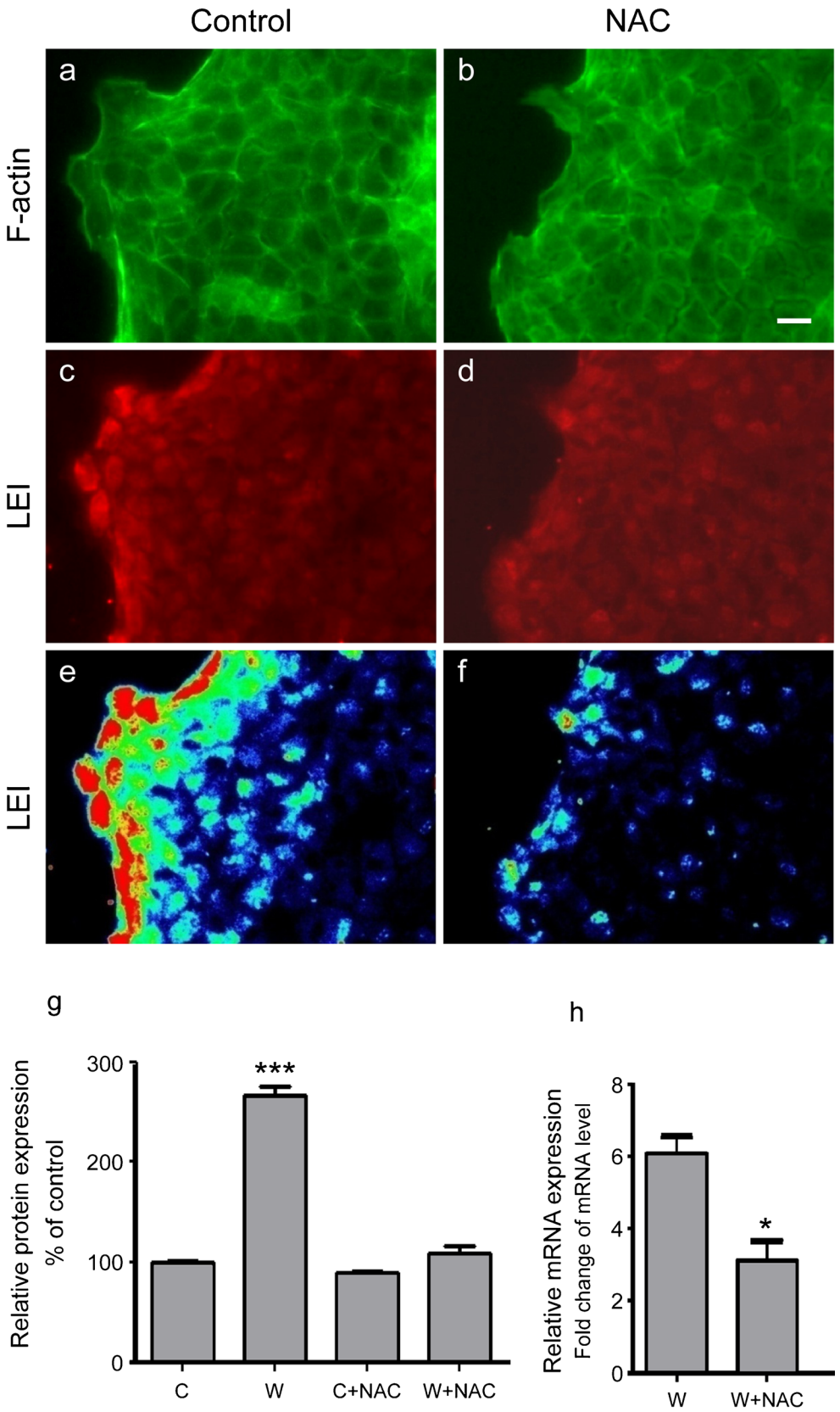


Fig. 5 Effect of ROS inhibition on LEI immunofluorescence. The images show uninhibited (*left column*) and ROS-inhibited (*NAC*, *right column*) BCE monolayers after 4 h of wounding in the absence of the ECM. **a**, **b** F-actin; **c**, **d** LEI; **e**, **f** LEI (pseudocolor). **g**, **h** Measurements of LEI expression in wounds performed, in these cases in the presence of the ECM, since the signals obtained are larger than the ones obtained in its absence (cf. Fig. 3). *Bar* 20 μm. *$p<0.05$; ***$p<0.001$

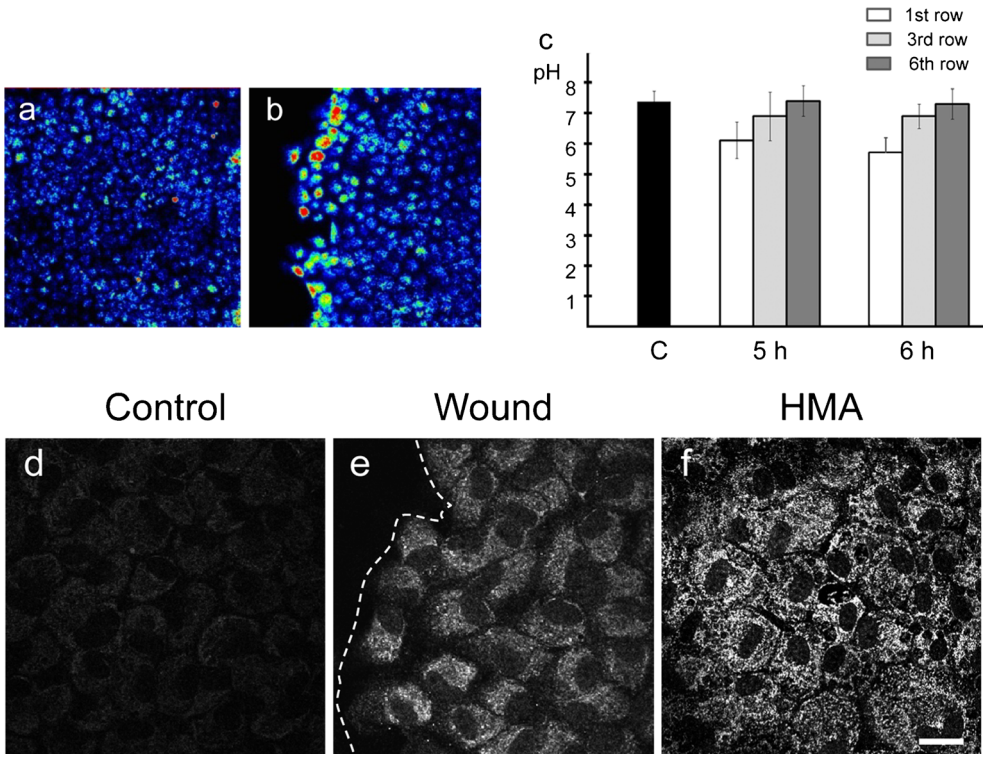


Fig. 6 Intracelular pH and LEI cellular localization during wound healing. **a**–**c** Intracellular pH in healing BCE monolayers. Microscopic images (**a**, **b**): SNARF-1 fluorescence in unwounded (**a**) and wounded (*5 h*, **b**) BCE monolayers in the absence of the ECM (pseudocolor). **c** pH quantification of the cells at the 1st, 3rd and 6th rows from the wound border at *5 h* and *6 h* after wounding. *C* control. **d**–**f** LEI immunofluorescence of control (**d**), wounded (*6 h*, **e**) and HMA-treated unwounded (**f**) monolayers. The images correspond to 0.9-μm-thick confocal sections passing through the nuclei. The *dotted line* delineates the wound border. For HMA treatment, BCE monolayers were incubated in MEM with 20 μM HMA for 20 h. *Bar* 20 μm

Discussion

Epithelial injury represents a serious threat to the integrity of the organism. For this reason, epithelia have developed a quick complex mechanism of tissue restitution. Several tasks have to be performed in order to repair the damage. Although the most conspicuous ones are migration and proliferation of the cells surrounding the injury, several others have to be orchestrated to achieve that goal. The present study shows that, in healing corneal endothelial monolayers, there is a sustained and prolonged increase in LEI expression, both at the protein and mRNA levels, at the cells of the wound edge. This increase is noticeable as early as 1 h after the injury, lasts until the closure of the wound and is independent of the healing mode. However, it is more intense and spatially extended in monolayeres healing by lamellipodial cell crawling. Since the ECM has a well-known signaling function during tissue restitution (Clause and Barker 2013), this difference in LEI expression may be reflecting a positive feedback from the ECM network.

We also explored here which of the initial events that take place during wound healing triggers the increase in expression of the protein. As mentioned above, there are several events that occur immediately after the injury. Two of the better studied ones are the calcium and ROS waves (for a review, see Cordeiro and Jacinto 2013). We showed here that, while the calcium wave inhibition does not alter the LEI increase at the cells of the wound border, ROS scavenging provokes its dramatic reduction.

Since we found that there is an important amount of apoptosis during wound healing in BCE cells (data not shown, manuscript in preparation) we explored whether the increase in LEI expression could be participating in this response. In addition, as we show in this work, there is a significant acidification of the cells of the wound edge, a well-known stimulus for LEI conversion to L-DNAse II. We performed confocal microscopy of LEI in wounded monolayers in order to study whether there is a nuclear translocation of the protein that would indicate its transformation to L-DNase II. We compared its cellular localization with that of HMA-treated intact monolayers. HMA, via a decrease in cellular pH, is a well-known activator of L-DNase II. In all the studies performed so far in different cell types, HMA triggered L-DNase II-dependent apoptosis induced by the nuclear translocation of the LEI/L-DNase II. In most of the cases, this change in cellular localization is not preceded or accompanied by an increase in its expression (Belmokhtar et al. 2000; Bourges et al. 2004; Chahory et al. 2010; Lepretre et al. 2013; O'Connell et al. 2006; Valamanesh et al. 2009). Surprisingly, we showed here that in intact BCE monolayers HMA provoked an increase in the cytoplasmic signal of the enzyme, with no noticeable nuclear translocation, suggesting an increase in enzyme biosynthesis without its transformation into L-DNase II. Consistently, in wounded BCE monolayers, even though there is an important acidification of the edge cells, we found no evidence of nuclear translocation of the enzyme assessed by confocal microscopy, suggesting that it was not cleaved to L-DNase II. Also consistently, western blot analysis of the

wounded monolayers did not show the presence of the cleaved LEI. The fact that in BCE cells the acidification provoked by HMA also determined an increase in the amount of LEI at the cytoplasm suggests that the pH decrease at the cells of the wound border may be contributing to the increase in the expression of the enzyme during wound healing in these cells. Although cytosolic acidification provokes a general decrease in protein synthesis (Busa and Nuccitelli 1984; Chambard and Pouyssegur 1986), some specific proteins have been reported to increase their rate of synthesis under this condition (Isfort et al. 1993; Quednau et al. 1994), particularly some caspases (Aoyama et al. 2005). Taking this into consideration, it is not surprising that the synthesis of LEI, a protein that participates both as an antiprotease and as a proapototic protein, is modulated by pH.

What could be the function of LEI during wound healing? As mentioned, an increase in several protease inhibitors, including clade B serpins, has been reported in skin wounds (Pollins et al. 2007; Roupe et al. 2010) and interpreted as part of a protective mechanism against the inflammatory response. More recently, Uchiyama et al. (2012) showed that H_2O_2, at concentrations usually produced during wound healing (Roy et al. 2006), determines an increase in the expression of neutrophil elastase in mouse colonic epithelial cells in culture, an enzyme strongly inhibited by LEI. When neutrophil elastase was silenced or the cells were transfected with LEI, the cell survival after H_2O_2 treatment was increased, suggesting that LEI inhibition of neutrophil elastase protects the cell against the enzyme damage. Our finding that a band of 60 kD appears in both the LEI and elastase western blots during tissue restitution supports this function of LEI in the healing process. As mentioned, one of us (A.T.) has reported that LEI acting as an antiprotease forms a transient covalent complex with elastase and cathepsin D, both of a similar apparent molecular weight as the one found here. A similar mechanism to the one referred above regarding colonic epithelial cells treated with H_2O_2 (Uchiyama et al. 2012) may be taking place in our system. As remarked, one of the early signals after injury is an increase in ROS, H_2O_2 being one of them. Thus, the increase in LEI expression after wounding may have the role of protecting the healing cells from protease activation, interfering with caspase-independent apoptosis (O'Connell and Stenson-Cox 2007). Moreover, we have previously shown that in some paradigms LEI overexpression inhibits caspase-dependent apoptosis by interfering with the activation of caspase 8 (Padron-Barthe et al. 2008). Another possible function of LEI during the injury response is to participate in cell migration. Tseng and coworkers studied four different oral cancer cell lines and found that an increase in LEI expression determined a significant increase in cell migration (Tseng et al. 2009). However, opposite results have been reported. In other cancer cell lines, LEI was found to inhibit migration and tissue invasion (Ashida et al. 2004; Huasong et al. 2014; Pastor et al. 2013; Chou et al. 2012; Cui et al. 2014).

In summary, in this work, we have shown that there is an increase in LEI expression during wound healing of BCE and PCE cells in culture and in corneal endothelium in situ. In BCE cells, this increase is triggered by the ROS produced as a consequence of the injury. We also demonstrated that a large extent of acidification occurs at the cells of the wound border, a stimulus that usually provokes the transformation of LEI to L-DNase II and its nuclear translocation. Thus, our finding that the enzyme nevertheless maintains its cytoplasmic localization during BCE wound healing and the appearance of a protein complex similar to the ones reported for LEI-protease associations, suggest that the function of LEI in this process is related to its activity as a protease inhibitor and/or to its anti-apoptotic activity. Overexpression and knock-down studies should be performed in order to further evaluate the function of LEI in wound healing.

Acknowledgments The authors thank Frigorífico Las Piedras (Uruguay) and the Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort (France) for supplying us with fresh bovine eyes and Frigorífico Ardistar (Uruguay) for porcine eyes. This work received financial support from the following agencies: Cooperation Program ECOS Sud France-Uruguay (U08H01), Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Universidad de la República, Uruguay. We also wish to thank the anonymous reviewers for helpful comments and suggestions.

References

Abreu-Blanco MT, Watts JJ, Verboon JM, Parkhurst SM (2012) Cytoskeleton responses in wound repair. Cell Mol Life Sci 69: 2469–2483

Altairac S, Wright SC, Courtois Y, Torriglia A (2003a) L-DNase II activation by the 24 kDa apoptotic protease (AP24) in TNFalpha-induced apoptosis. Cell Death Differ 10:1109–1111

Altairac S, Zeggai S, Perani P, Courtois Y, Torriglia A (2003b) Apoptosis induced by Na+/H+ antiport inhibition activates the LEI/L-DNase II pathway. Cell Death Differ 10:548–557

Aoyama K, Burns DM, Suh SW, Garnier P, Matsumori Y, Shiina H, Swanson RA (2005) Acidosis causes endoplasmic reticulum stress and caspase-12-mediated astrocyte death. J Cereb Blood Flow Metab 25:358–370

Ashida S, Nakagawa H, Katagiri T, Furihata M, Iiizumi M, Anazawa Y, Tsunoda T, Takata R, Kasahara K, Miki T, Fujioka T, Shuin T, Nakamura Y (2004) Molecular features of the transition from prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) to prostate cancer: genome-wide gene-expression profiles of prostate cancers and PINs. Cancer Res 64:5963–5972

Bannur SV, Kulgod SV, Metkar SS, Mahajan SK, Sainis JK (1999) Protein determination by ponceau S using digital color image analysis of protein spots on nitrocellulose membranes. Anal Biochem 267:382–389

Belmokhtar CA, Torriglia A, Counis MF, Courtois Y, Jacquemin-Sablon A, Segal-Bendirdjian E (2000) Nuclear translocation of a leukocyte elastase Inhibitor/Elastase complex during staurosporine-induced apoptosis: role in the generation of nuclear L-DNase II activity. Exp Cell Res 254:99–109

Bourges JL, Valamanesh F, Torriglia A, Jeanny JC, Savoldelli M, Renard G, BenEzra D, de Kozak Y, Behar-Cohen F (2004) Cornea graft endothelial cells undergo apoptosis by way of an alternate (caspase-independent) pathway. Transplantation 78:316–323

Bourges JL, Torriglia A, Valamanesh F, Benezra D, Renard G, Behar-Cohen FF (2007) Nitrosative stress and corneal transplant endothelial cell death during acute graft rejection. Transplantation 84:415–423

Busa WB, Nuccitelli R (1984) Metabolic regulation via intracellular pH. Am J Physiol 246:R409–438

Cauwe B, Opdenakker G (2010) Intracellular substrate cleavage: a novel dimension in the biochemistry, biology and pathology of matrix metalloproteinases. Crit Rev Biochem Mol Biol 45:351–423

Chahory S, Keller N, Martin E, Omri B, Crisanti P, Torriglia A (2010) Light induced retinal degeneration activates a caspase-independent pathway involving cathepsin D. Neurochem Int 57:278–287

Chambard JC, Pouyssegur J (1986) Intracellular pH controls growth factor-induced ribosomal protein S6 phosphorylation and protein synthesis in the G0–G1 transition of fibroblasts. Exp Cell Res 164: 282–294

Chifflet S, Hernández JA, Grasso S, Cirillo A (2003) Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modificationsof bovine corneal endothelial cells in culture. Exp Cell Res 282:1–13

Chifflet S, Justet C, Hernandez JA, Nin V, Escande C, Benech JC (2012) Early and late calcium waves during wound healing in corneal endothelial cells. Wound Repair Regen 20:28–37

Chou RH, Wen HC, Liang WG, Lin SC, Yuan HW, Wu CW, Chang WS (2012) Suppression of the invasion and migration of cancer cells by SERPINB family genes and their derived peptides. Oncol Rep 27: 238–245

Clause KC, Barker TH (2013) Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. Curr Opin Biotechnol 24:830–833

Cordeiro JV, Jacinto A (2013) The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. Nat Rev Mol Cell Biol 14:249–262

Cui X, Liu Y, Wan C, Lu C, Cai J, He S, Ni T, Zhu J, Wei L, Zhang Y, Qian H (2014) Decreased expression of SERPINB1 correlates with tumor invasion and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. J Mol Histol 45:59–68

Dekhuijzen PN (2004) Antioxidant properties of N-acetylcysteine: their relevance in relation to chronic obstructive pulmonary disease. Eur Respir J 23:629–636

Fuchs Y, Steller H (2011) Programmed cell death in animal development and disease. Cell 147:742–758

Grasso S, Hernandez JA, Chifflet S (2007) Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture. Am J Physiol Cell Physiol 293:C1327–1337

Groutas WC, Dou D, Alliston KR (2011) Neutrophil elastase inhibitors. Expert Opin Ther Pat 21:339–354

Haan C, Behrmann I (2007) A cost effective non-commercial ECL-solution for Western blot detections yielding strong signals and low background. J Immunol Methods 318:11–19

He Z, Campolmi N, Ha Thi BM, Dumollard JM, Peoc'h M, Garraud O, Piselli S, Gain P, Thuret G (2011) Optimization of immunolocalization of cell cycle proteins in human corneal endothelial cells. Mol Vis 17:3494–3511

Huasong G, Zongmei D, Jianfeng H, Xiaojun Q, Jun G, Sun G, Yan W, Donglin W, Jianhong Z (2014) Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 suppresses cell migration and invasion in glioma cells. Brain Res

Huc L, Rissel M, Solhaug A, Tekpli X, Gorria M, Torriglia A, Holme JA, Dimanche-Boitrel MT, Lagadic-Gossmann D (2006) Multiple apoptotic pathways induced by p53-dependent acidification in benzo[a]pyrene-exposed hepatic F258 cells. J Cell Physiol 208: 527–537

Huntington JA (2011) Serpin structure, function and dysfunction. J Thromb Haemost 9(Suppl 1):26–34

Isfort RJ, Cody DB, Asquith TN, Ridder GM, Stuard SB, LeBoeuf RA (1993) Induction of protein phosphorylation, protein synthesis, immediate-early-gene expression and cellular proliferation by intracellular pH modulation. Implications for the role of hydrogen ions in signal transduction. Eur J Biochem 213:349–357

Izuhara K, Ohta S, Kanaji S, Shiraishi H, Arima K (2008) Recent progress in understanding the diversity of the human ov-serpin/clade B serpin family. Cell Mol Life Sci 65:2541–2553

Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P (2001) Mechanisms of epithelial fusion and repair. Nat Cell Biol 3:E117–123

Justet C, Evans F, Vasilskis E, Hernandez JA, Chifflet S (2013) ENaC contribution to epithelial wound healing is independent of the healing mode and of any increased expression in the channel. Cell Tissue Res 353:53–64

King RS, Newmark PA (2012) The cell biology of regeneration. J Cell Biol 196:553–562

Klepeis VE, Cornell-Bell A, Trinkaus-Randall V (2001) Growth factors but not gap junctions play a role in injury-induced Ca2+ waves in epithelial cells. J Cell Sci 114:4185–4195

Lepretre C, Tchakarska G, Blibech H, Lebon C, Torriglia A (2013) Apoptosis-inducing factor (AIF) and leukocyte elastase inhibitor/L-DNase II (LEI/LDNaseII), can interact to conduct caspase-independent cell death. Apoptosis 18:1048–1059

Niethammer P, Grabher C, Look AT, Mitchison TJ (2009) A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish. Nature 459:996–999

O'Connell AR, Stenson-Cox C (2007) A more serine way to die: defining the characteristics of serine protease-mediated cell death cascades. Biochim Biophys Acta 1773:1491–1499

O'Connell AR, Holohan C, Torriglia A, Lee BW, Stenson-Cox C (2006) Characterization of a serine protease-mediated cell death program activated in human leukemia cells. Exp Cell Res 312:27–39

Padron-Barthe L, Lepretre C, Martin E, Counis MF, Torriglia A (2007) Conformational modification of serpins transforms leukocyte elastase inhibitor into an endonuclease involved in apoptosis. Mol Cell Biol 27:4028–4036

Padron-Barthe L, Courta J, Lepretre C, Nagbou A, Torriglia A (2008) Leukocyte Elastase Inhibitor, the precursor of L-DNase II, inhibits apoptosis by interfering with caspase-8 activation. Biochim Biophys Acta 1783:1755–1766

Pastor MD, Nogal A, Molina-Pinelo S, Melendez R, Salinas A, Gonzalez De la Pena M, Martin-Juan J, Corral J, Garcia-Carbonero R, Carnero A, Paz-Ares L (2013) Identification of proteomic signatures associated with lung cancer and COPD. J Proteomics 89:227–237

Pollins AC, Friedman DB, Nanney LB (2007) Proteomic investigation of human burn wounds by 2D-difference gel electrophoresis and mass spectrometry. J Surg Res 142:143–152

Potempa J, Dubin A, Watorek W, Travis J (1988) An elastase inhibitor from equine leukocyte cytosol belongs to the serpin superfamily. Further characterization and amino acid sequence of the reactive center. J Biol Chem 263:7364–7369

Quednau B, Rosskopf D, Reusch HP, Luft FC, Siffert W (1994) Enhanced Na(+)-H+ exchanger activity and NHE-1 mRNA levels in human lymphocytes during metabolic acidosis. Am J Physiol 266:C480–488

Roupe KM, Alberius P, Schmidtchen A, Sorensen OE (2010) Gene expression demonstrates increased resilience toward harmful inflammatory stimuli in the proliferating epidermis of human skin wounds. Exp Dermatol 19:e329–332

Roy S, Khanna S, Nallu K, Hunt TK, Sen CK (2006) Dermal wound healing is subject to redox control. Mol Ther 13:211–220

Sammak PJ, Hinman LE, Tran PO, Sjaastad MD, Machen TE (1997) How do injured cells communicate with the surviving cell monolayer? J Cell Sci 110(Pt 4):465–475

Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, Racker E (1979) Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. Biochemistry 18:2210–2218

Torriglia A, Chaudun E, Chany-Fournier F, Jeanny JC, Courtois Y, Counis MF (1995) Involvement of DNase II in nuclear degeneration during lens cell differentiation. J Biol Chem 270:28579–28585

Torriglia A, Perani P, Brossas JY, Chaudun E, Treton J, Courtois Y, Counis MF (1998) L-DNase II, a molecule that links proteases and endonucleases in apoptosis, derives from the ubiquitous serpin leukocyte elastase inhibitor. Mol Cell Biol 18:3612–3619

Torriglia A, Lepretre C, Padron-Barthe L, Chahory S, Martin E (2008) Molecular mechanism of L-DNase II activation and function as a molecular switch in apoptosis. Biochem Pharmacol 76:1490–1502

Tran PO, Hinman LE, Unger GM, Sammak PJ (1999) A wound-induced [Ca2+]i increase and its transcriptional activation of immediate early genes is important in the regulation of motility. Exp Cell Res 246: 319–326

Tseng MY, Liu SY, Chen HR, Wu YJ, Chiu CC, Chan PT, Chiang WF, Liu YC, Lu CY, Jou YS, Chen JY (2009) Serine protease inhibitor (SERPIN) B1 promotes oral cancer cell motility and is overexpressed in invasive oral squamous cell carcinoma. Oral Oncol 45:771–776

Uchiyama K, Naito Y, Takagi T, Mizushima K, Hirai Y, Hayashi N, Harusato A, Inoue K, Fukumoto K, Yamada S, Handa O, Ishikawa T, Yagi N, Kokura S, Yoshikawa T (2012) Serpin B1 protects colonic epithelial cell via blockage of neutrophil elastase activity and its expression is enhanced in patients with ulcerative colitis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 302:G1163–1170

Valamanesh F, Berdugo M, Sennlaub F, Savoldelli M, Goumeaux C, Houssier M, Jeanny JC, Torriglia A, Behar-Cohen F (2009) Effects of triamcinolone acetonide on vessels of the posterior segment of the eye. Mol Vis 15:2634–2648

van der Vliet A, Janssen-Heininger YM (2014) Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? J Cell Biochem 115:427–435

Artículo III

Justet, C., F. Evans, A. Torriglia, and S. Chifflet. 2015. Increase in the expression of leukocyte elastase inhibitor during wound healing in corneal endothelial cells. *Cell and tissue research*. 362:557-568.

Cell Tissue Res
DOI 10.1007/s00441-016-2388-8

REGULAR ARTICLE

Fast calcium wave inhibits excessive apoptosis during epithelial wound healing

Cristian Justet[1] · **Julio A. Hernández**[2] · **Alicia Torriglia**[3] · **Silvia Chifflet**[1]

Received: 18 October 2015 / Accepted: 29 February 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract Successful wound closure is mainly the result of two cellular processes: migration and proliferation. Apoptosis has also been suggested to play a role in the mechanisms of wound healing. The fast calcium wave (FCW), triggered immediately after a wound is produced, has been proposed to be involved in determining healing responses in epithelia. We have explored the effects of the reversible inhibition of FCW on the apoptotic and proliferative responses of healing bovine corneal endothelial (BCE) cells in culture. The most important findings of this study are that caspase-dependent apoptosis occurs during the healing process, that the amount of apoptosis has a linear dependence on the migrated distance, and that FCW inhibition greatly increases the apoptotic index. We have further been able to establish that FCW plays a role in the control of cell proliferation during BCE wound healing. These results indicate that one of the main roles of the wave is to inhibit an excessive apoptotic response of the healing migrating cells. This property might represent a basic mechanism to allow sufficient migration and proliferation of the healing cells to assure proper restitution of the injured tissue.

Keywords Wound healing · Calcium wave · Apoptosis · Epithelia · Corneal endothelium

This study was supported by Cooperation Program ECOS Sud France-Uruguay Grant U08H01 (to A. Torriglia and S. Chifflet); Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Uruguay (Proyecto Grupos I+D 2014 to S. Chifflet and Magister and Doctoral Fellowships to C. Justet); and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay (to S. Chifflet and J. A. Hernandez).

✉ Silvia Chifflet
schiffle@mednet.org.uy

[1] Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay

[2] Sección Biofísica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá s/n esq. Mataojo, 11400 Montevideo, Uruguay

[3] INSERM U 1138, Paris Descartes University, Pierre et Marie Curie University, Centre de Recherche des Cordeliers, 15 Rue de l'Ecole de Médecine, 75006 Paris, France

Introduction

Wound healing is a complex process triggered in order to promptly and efficiently restore tissue integrity. Successful wound closure is mainly the result of two cellular processes: cell migration and proliferation. During epithelial wound healing, cell migration adopts one of three different modalities: lamellipodial cell crawling, actin cable development at the wound border, or a combination of both (Bement et al. 1993; Lotz et al. 2000; Waters et al. 2002; Grasso et al. 2007). For bovine corneal endothelial (BCE) cells in culture, we have shown that a specific modality of healing can be induced by removing or maintaining the basement membrane (Grasso et al. 2007). The time course of cell proliferation during epithelial wound healing depends upon the particular tissue. In cat corneal endothelial cells in culture, proliferation becomes significant only after 48 h of healing (Petroll et al. 2001). Once a wound has been closed, the tissue must still be remodeled to recover its characteristic structural and physiological properties. Even under culture conditions, the zone corresponding to the wound remains disorganized and irregular for several days and only gradually recovers the appearance of the uninjured monolayer.

In diverse cellular types, immediately after a wound is produced a fast calcium wave (FCW) has been repeatedly observed to propagate from the wound border toward the rest

Published online: 18 March 2016

of the tissue (Sammak et al. 1997; Klepeis et al. 2001; Sung et al. 2003; Berra-Romani et al. 2008). In the case of BCE monolayers, the FCW has a duration of 2–3 min and propagates up to the 10th to 20th row of cells (Chifflet et al. 2012), as is found in other epithelia (Sammak et al. 1997; Korkiamaki et al. 2005; Shabir and Southgate 2008). Notably, the FCW is different from another calcium wave, the "slow calcium wave" that, in BCE and other epithelial cells in culture, develops later in the healing process and exhibits a slow (i.e., in hours) and sustained propagation toward the unwounded monolayer (Chifflet et al. 2012; Justet et al. 2013). The mechanisms of propagation of the FCW have been extensively investigated. In several cell types, the propagation involves the release and autocrine or paracrine effects of ATP or other nucleotides (Sammak et al. 1997; Klepeis et al. 2004; Gomes et al. 2005a; Gomes et al. 2005b; Berra-Romani et al. 2008; Shabir and Southgate 2008; Sherwood et al. 2011). The binding of ATP to purinergic receptors triggers signals that ultimately liberate calcium from the endoplasmic reticulum (D'Hondt et al. 2011). The extent of the calcium wave propagation on the monolayer seems to depend on ATP diffusion (Klepeis et al. 2004; Shabir and Southgate 2008). However, in some epithelia, the propagation of the calcium wave predominantly occurs via gap junctions with little or no contribution of a diffusible signal (Razzell et al. 2013; Narciso et al. 2015). In monolayers of BCE cells in culture, extracellular release of ATP through hemichannels predominantly mediates calcium wave propagation in response to mechanical stimulus, with a lower contribution of intercellular communication by gap junctions (Gomes et al. 2005a; D'Hondt et al. 2007). Inhibition of the FCW by EGTA and thapsigargin (an inhibitor of the sarcoplasmic and reticulum calcium pump, SERCA) has been shown to significantly reduce the velocity of healing (Kimura et al. 2001; Sung et al. 2003; Leiper et al. 2006). However, we have more recently reported that the reversible inhibition of the FCW (achieved by employing a combination of cyclopiazonic acid and EGTA) only slightly reduces the velocity of closure of the BCE monolayers healing by actin cable formation (Chifflet et al. 2012). Effects of the role of the FCW on cell proliferation during wound healing have also been reported. Thus, in continuous hepatocyte cell lines, FCW inhibition employing thapsigargin has been found to significantly decrease the proliferation index (Sung et al. 2003). In vascular endothelium, the increase in proliferation observed during wound healing depends on preincubation with serum and on the FCW (Tran et al. 1998). In addition to migration and cell proliferation, evidence suggests that apoptotic processes might play a role in the mechanisms of wound healing. For instance, during skin and hepatic regeneration in mice, stem cell proliferation depends upon the release of prostaglandin E2 by cells undergoing apoptosis mediated by caspases 3 and 7 (Li et al. 2010). Apoptotic responses during wound healing have been detected in other tissues (Carter et al. 2009; Abe et al. 2012; Tan et al. 2013). To our knowledge, neither the dynamics of apoptotic processes in cultured healing epithelia nor their relationship to the FCW have previously been reported.

The main aim of this work has been to explore the role of the FCW on apoptosis during wound healing of monolayers of BCE cells in culture. To assess whether differences occur between the two basic healing modes, via lamellipodial cell crawling or actin cable formation, the studies have been performed either by preserving or removing the extracellular matrix (ECM; Grasso et al. 2007).

Materials and methods

Reagents and solutions

All chemicals and drugs were from Sigma Chemical (Munich, Germany) unless otherwise specified. Control solution (CS) was composed of 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.02 mM NaH_2PO_4, 3.6 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$ and 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid) pH 7.4. The following drugs were prepared as 1000× stock solutions: cyclopiazonic acid (CPA, 10 mM; Molecular Probes, Eugene, Ore., USA), thapsigargin (10 mM), and Z-VAD-FMK (2 mM; Biovision, Mountain View, Calif., USA) in dimethylsulfoxide (DMSO). ATP (200×; 20 mM) was dissolved in phosphate-buffered saline (PBS) and stored as one-use aliquots. All drugs were kept at −20 °C until use.

Cell culture

Bovine eyes were obtained fresh from the slaughterhouse and processed to obtain corneal endothelial cells as described in Chifflet et al. (2003). Briefly, the corneal endothelium was treated with trypsin (0.25 %) / EDTA (0.02 %) in Ca^{2+}- and Mg^{2+}-free PBS for 20–30 min in the tissue culture incubator. The endothelial cells were plated in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10 % serum, 50 μg/ml gentamicin, 0.25 μg/ml amphotericin B, and 50 μg total protein/ml of retinal extract. The cells were grown on glass coverslips, and only cells from the 1st to the 5th passages that had achieved visual confluence at least 5 days before the experiments were used.

Experimental procedures

Wounds with removal or maintenence of the ECM were produced as described by Grasso et al. (2007). In short, to remove the ECM, the injury was made by using either a 21-gauge syringe needle or a pipette tip. To keep the ECM, we employed a silicon-coated needle or pipette tip. For this study, we confirmed that, as expected, the maintenance of the ECM

induced the lamellipodial type of migration, whereas its removal provoked collective migration of the cells via actin cable formation (not shown).

The migrated distance and the rate of wound healing were measured as detailed in our previous work (Chifflet et al. 2012; Justet et al. 2013). In short, for this purpose and for the time-course experiments, the BCE monolayers were treated as required by the experiments, and linear wounds approximately 1 cm long and 3 mm wide were made with a pipette tip (nude, to remove the ECM, or silicone coated, to preserve it), as described above. Phase contrast micrographs of the entire wound in each coverslip were immediately taken, and the monolayers were placed in the culture chamber for the appropriate periods of time. Then, micrographs of the whole wounds were again taken. The average width of the wound was determined from measurements of the denuded area and length of the wound, by employing Adobe PhotoShop software (Adobe Systems, Mountain View, Calif., USA) as described in Chifflet et al. (2012). In each case, the migrated distance (ΔL) was calculated as the difference between the average wound width at the beginning and at the end of the corresponding experiment, and the average velocity as the ratio between ΔL and the time elapsed since wounding.

For the experiments requiring visualization of the calcium wave, the wounds were made by employing a syringe needle.

To evaluate the roles of the FCW, the experiments were performed by employing CS or MEM as control media, depending on whether a calcium measurement was going to be performed. For this purpose, four different experimental strategies were followed, as indicated in Fig. 1.

Cytosolic calcium

Cytosolic calcium modifications were assessed by Fluo-4 AM fluorescence (Molecular Probes, Eugene, Ore., USA). The probe was kept as a 1.7 mM stock solution in DMSO at −20 °C and, for the experiments, mixed with 20 % pluronic acid (Molecular Probes) in DMSO and diluted 1/1000 in the corresponding solution. The cells grown on coverslips were incubated in this solution at room temperature (RT) for 15 min. After being washed with CS, the cells on coverslips were mounted in a homemade chamber (Chifflet et al. 2003) containing CS and 1 μg/ml propidium iodide, in order to reveal dead cells, and placed under the fluorescent microscope. Wounds were then made, and micrographs taken by employing a Moticam Pro 282B camera and Moticam Image Advanced 3.2 software. Images were processed for pseudocolor by using Adobe Photoshop CS4 Extended software (Adobe Systems, Mountain View, Calif., USA).

Inhibition of FCW

To obtain satisfactory inhibition of the FCW, we performed the simultaneous blockade of extracellular calcium entry and of the SERCA. For this purpose, we employed a combination of EGTA and the SERCA inhibitor CPA (Fig. 2a, b), following strategy ES-II (Fig. 1). We discarded the use of thapsigargin, a SERCA inhibitor widely employed to block the FCW in other cellular systems, since we determined that, consistent with its irreversible blockade of the enzyme (Lytton et al. 1991), it caused lasting effects on healing BCE cells; this was revealed, among other indicators, by a significant decrease in the production of a new calcium wave in the washout experiments (Fig. 2c) and in the rate of wound healing (Fig. 2d).

ATP stimulation of cytosolic calcium increase

We employed ATP-induced calcium increase as an additional tool to study the role of the FCW in apoptosis and proliferation. As mentioned above, in various cellular systems, the propagation of the FCW (starting from the second row of cells) depends on extracellular ATP signaling. We confirmed that ATP played a similar role in wounded BCE monolayers. For this purpose, apyrase (ATPase and ADPase, Sigma A7646), kept as a 100× stock solution in PBS, was used at a final concentration of 10 U/ml in CS (Fig. 2e, middle row). Moreover, incorporation of exogenous ATP was used to produce a transient calcium increase in BCE cells (Fig. 2e, lower row).

Apoptosis

In order to label apoptotic cells, we employed three different procedures: annexin V staining, active caspase-3 staining, and terminal deoxynucleotidyl transferase-mediating dUTP nick-end labeling (TUNEL) assay. The annexin V-fluorescein-isothiocyanate (FITC) staining kit (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Calif., USA) was used following the manufacturer's instructions; 1 μg/ml propidium iodide was also included. After annexin staining, the cells were mounted on the above-mentioned chamber and placed under the microscope. Once an annexin-V-positive image was localized, it was photographed and immediately processed as follows. With care not to modify the visual field position of the coverslip, the cells were fixed inside the chamber with 4 % paraformaldehyde (PFA) for 15 min, permeabilized with 0.1 % Triton X-100 for 5 min, and incubated with 50 μM Hoechst 33258 for 20 min. Micrographs were taken once again.

To reveal active caspase-3 and F-actin, cells were fixed in 4 % PFA in Dulbecco's PBS (DPBS) for 15 min at RT and permeabilized with 0.1 % Triton X-100 in PBS for 5 min. Afterwards, the cells were incubated with an anti-active

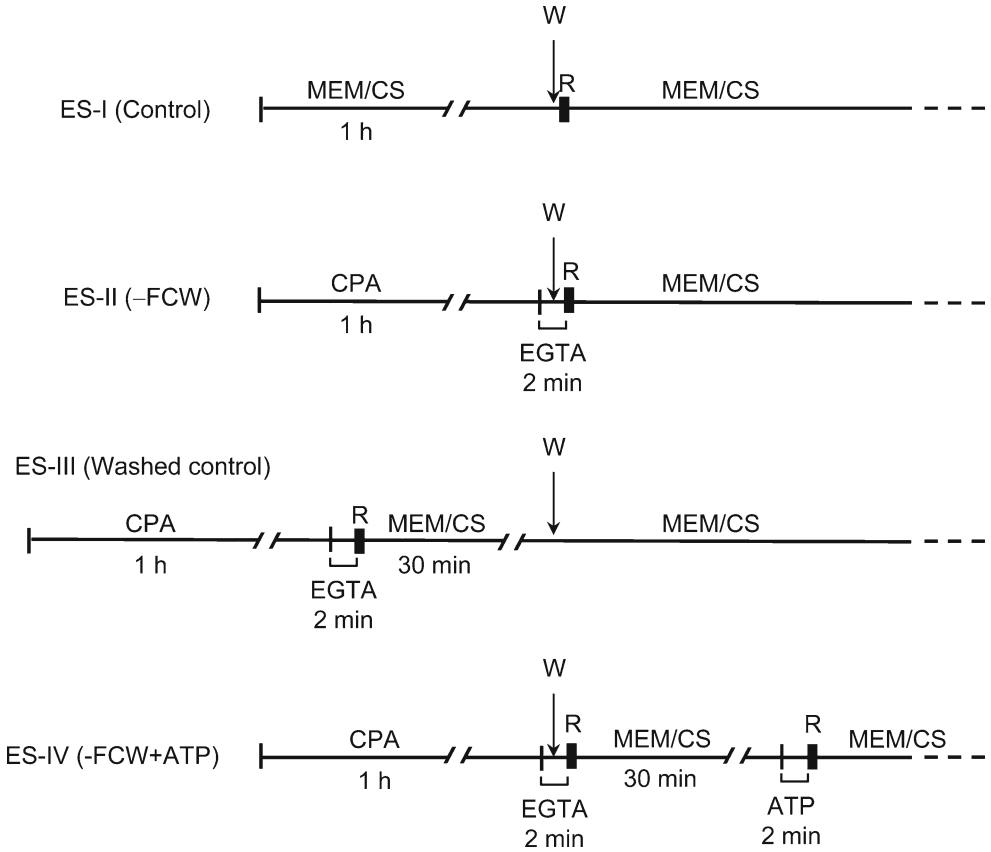


Fig. 1 Experimental strategies (*ES*). Representations of the various strategies employed for the experiments. Bovine corneal endothelial (BCE) monolayers grown on glass coverslips were treated as follows: *ES-I* preincubated in minimal essential medium (*MEM*), or control solution (*CS*) for 1 h, wounded, rinsed three times with CS, and kept in MEM or CS for the appropriate periods of time (*Control*); *ES-II* preincubated in MEM or CS for 1 h with 10 μM cyclopiazonic acid (*CPA*) or 10 μM thapsigargin (Tg), incubated in calcium- and magnesium-free PBS with 100 μM EGTA from 1 min before until 1 min after wounding, rinsed three times with CS, and kept in MEM or CS for the appropriate periods of time (*-FCW*, FCW inhibition); *ES-III* preincubated in MEM or CS for 1 h with 10 μM CPA or 10 μM Tg, kept for 2 min in calcium- and magnesium-free PBS with 100 μM EGTA, rinsed three times with CS, incubated for 30 min in MEM or CS, wounded, rinsed three times with CS, and kept in MEM or CS for the appropriate periods of time (*Washed control*); *ES-IV* preincubated, incubated, wounded, and rinsed as in ES-II, transferred to MEM or CS for 30 min, incubated for 2 min in the same medium with 100 μM ATP, rinsed three times with CS, and kept in MEM or CS for the appropriate periods of time (*-FCW+ATP*, stimulation of calcium wave by ATP).For all theexperiments, "MEM" refers to MEM without serum and antibiotics. Employment of MEM or CS depends on whether the experiment was designed to determine calcium (CS was used) or not (MEM was used). Rinses were made in control experiments with the sole purpose of performing similar procedures to the treated ones (*W* wound, *R* rinses)

caspase-3 polyclonal rabbit antibody (BD Pharmingen, San Diego, Calif., USA; 1/200 dilution) and with a Cy3-conjugated secondary antibody (Jackson Laboratories, West Grove, Pa, USA; 1/1000 dilution) plus FITC-phalloidin. The coverslips were then washed and mounted in 5:1 glycerol:TRIS (1.5 M, pH 8.8). All the antibodies and probes were diluted in 1 % bovine serum albumin (BSA) in PBS and incubated for 1 h at 37 °C.

For the TUNEL assay, the wounded cell monolayers were fixed for 15 min at RT in 4 % PFA in DPBS and permeabilized for 1 h at 4 °C in 70 % ethanol and for 30 min at RT in 0.1 % Triton X-100. After being washed (three times with PBS after each permeabilization stage), the cells were treated for 15 min at 37 °C with 2.23 U/ml pronase (Type XIV protease) from *Bacillus subtilis* and rinsed five times with PBS. Then, the monolayers were incubated with terminal transferase (TdT, Thermo Scientific, Asheville, N.C., USA; F-203L) for 1 h at 37 °C in the reaction buffer, according to the specifications of the manufacturer, with 0.1 mM 5-Br-dUTP (Jena Bioscience, Germany). After being washed, the monolayers were incubated with anti-5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) as described in Cell Proliferation.

Cell proliferation

To reveal cell proliferation during the healing process, BrdU was added to the cells in MEM 3 h before the end of the corresponding experiments (24 h after wounding) at a final concentration of 30 μg/ml. The cells were then fixed for 30 min at 4 °C with 96 % ethanol and permeabilized for 30 min at RT with 4 N HCl. After three rinses with PBS, specific immunofluorescence for BrdU was performed. For this, the monolayers were incubated

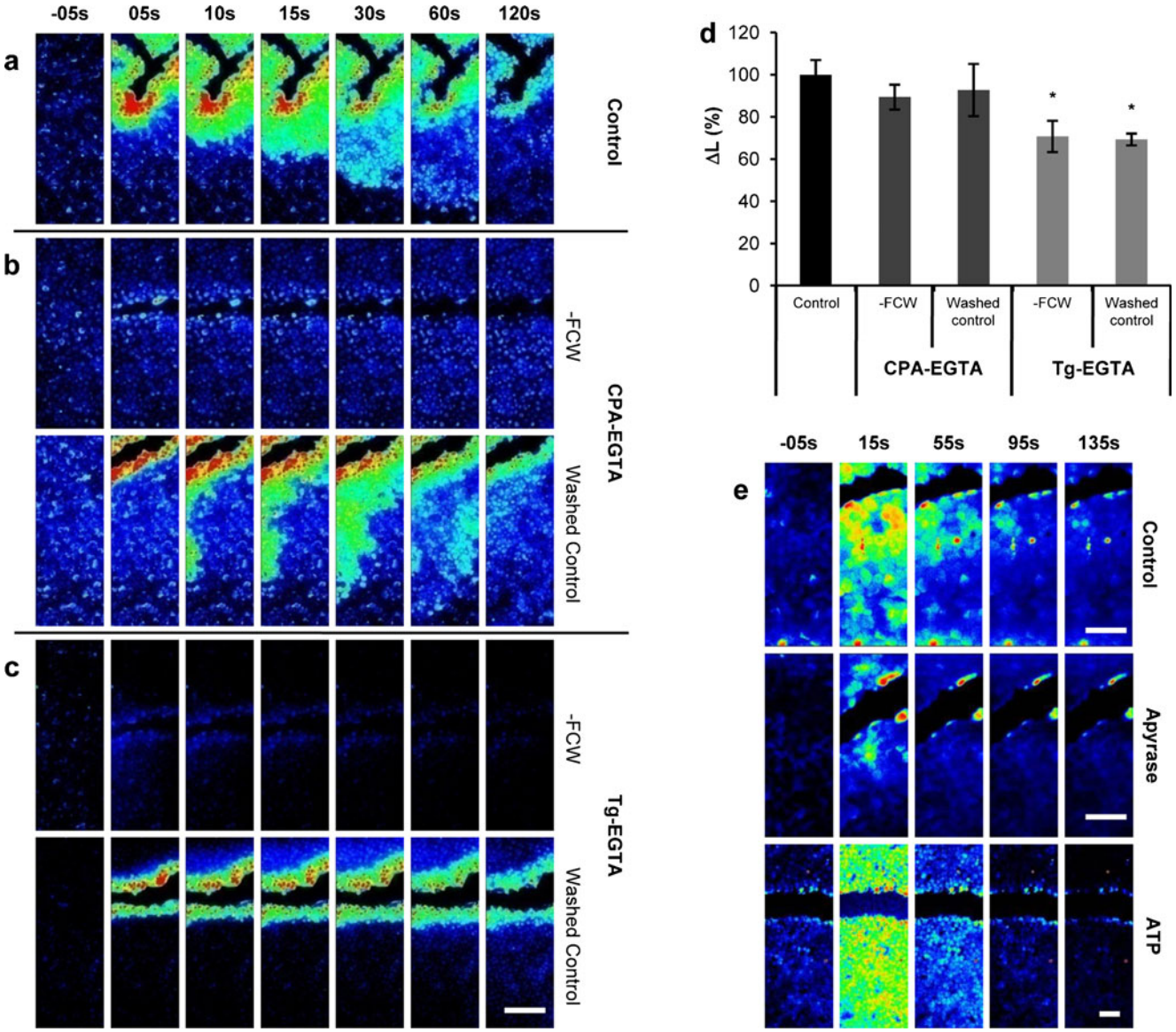


Fig. 2 **a-c** Inhibition of the fast calcium wave (FCW). BCE monolayers were treated following ES-I, ES-II, and ES-III (see Fig. 1) and processed for calcium determination. **a** Control (ES-I). **b** Inhibition with CPA and EGTA (ES-II) and washed control (ES-III). **c** Inhibition with Tg and EGTA (ES-II) and washed control (ES-III). **d** Comparison of CPA and Tg as FCW inhibitors. BCE monolayers were treated following ES-I, ES-II, and ES-III (see Fig. 1), and processed for determination of the healing velocity. The healing velocity with respect to the control was estimated as the mean distance of migration (ΔL) for the first 8 h of healing, expressed as a percentage of the control values. *Significant difference with respect to control; $P \leq 0.05$). **e** ATP-dependent cytosolic calcium increase. Fluo-4-loaded BCE monolayers were wounded under the microscope and photographed at the indicated times. The monolayers were wounded and kept in CS (Control), pre-incubated with apyrase for 10 min, wounded and kept in CS (Apyrase), or wounded following ES-IV (ATP). *Bars* 250 μm (**a-c**), 125 μm (**e**)

for 1 h at 37 °C with a monoclonal anti-BrdU antibody and for an extra hour with an anti-mouse Alexa Fluor 594 antibody (Molecular Probes) and 50 μM Hoechst 33258. The coverslips were subsequently mounted in 5:1 glycerol:TRIS (1.5 M, pH 8.8). All the antibodies were diluted in 1 % BSA in PBS.

Statistical analysis

The quantitative results and images are representative of at least three independent experiments performed in duplicate. Results are expressed as means ± SD. Statistical significance was assessed by employing Student's *t*-test or Welch's *t*-test.

Results

Effect of FCW inhibition on apoptotic response of healing BCE cells

As reported for other tissues (Akasaka et al. 2010; Li et al. 2010; Crosby et al. 2011), BCE monolayers exhibited

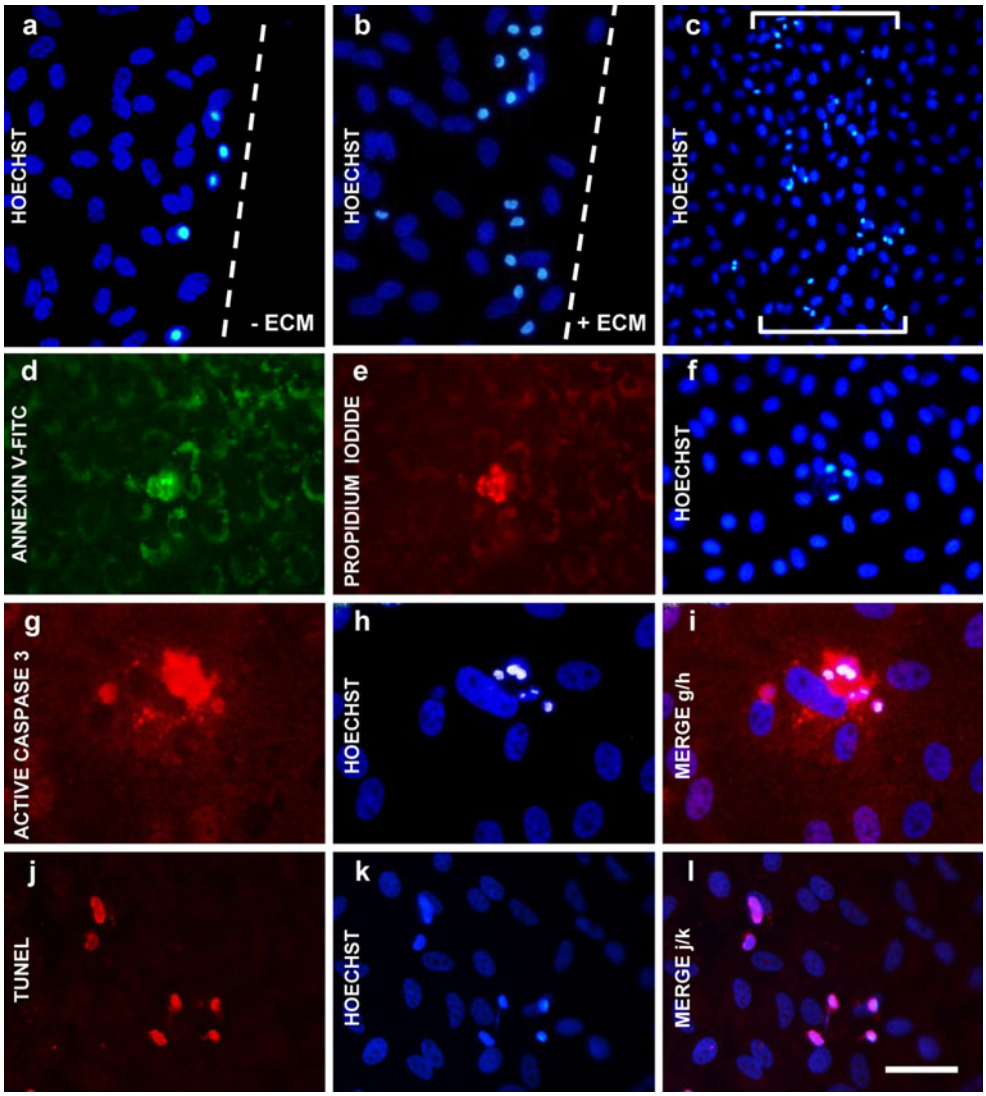


Fig. 3 Cell death during wound healing in BCE cells. BCE monolayers at 8 h (**a**, **b**) or 24 h (**c-l**) after being wounded in the absence (**a**) or presence (**b-l**) of the extracellular matrix (ECM) (*dashed lines* in **a**, **b** wound edges, *brackets* in **c** contact region of the two wound borders). Hoechst (**a-c**, **f**, **h**, **k**), annexin V (**d**), propidium iodide (**e**), active caspase 3 (**g**), TUNEL (**j**), merge of **g** and **h** (**i**), merge of **j** and **k** (**l**). **d-f**, **g-i**, **j-l** images of same fields. The merged images reveal that the nuclear condensations are positive for annexin V, active caspase 3, and TUNEL. *Bar* 30 μm (**g-i**), 40 μm (**a**, **b**, **j-l**), 50 μm (**d-f**), 80 μm (**c**)

apoptosis during wound healing. In this system, we could observe that apoptosis started early after wounding and progressed throughout the healing process. Figure 3 shows that Hoechst-stained nuclear condensations could be observed at the wound edges in wounds made both maintaining (Fig. 3a) or removing (Fig. 3b) the ECM. As shown in Fig. 3c, nuclear condensations were found even after the wound was completely closed. In order to elucidate whether these condensations corresponded to apoptotic bodies, we performed in vivo assays with annexin V-FITC and propidium iodide, followed by under-microscope fixation and nuclear staining with Hoechst (see Materials and Methods), in cultured BCE cells that were wounded and allowed to heal for 24 h in the presence of the ECM. As shown, the nuclear condensations (Fig. 3f) were also positive for annexin V (Fig. 3d) and propidium iodide (Fig. 3e). Similar results were obtained for experiments performed in the absence of the ECM and for other time points (data not shown). Moreover, we found that the nuclear condensations were characterized by an active caspase 3 signal (Fig. 3g–i) and were positive for TUNEL staining (Fig. 3j–l), both in the presence (Fig. 3g–l) or absence (data not shown) of the ECM. Taken together, and following indications from the Nomenclature Committee of Cell Death 2015 (Galluzzi et al. 2015), these results strongly suggest that the nuclear condensations observed during the process of wound healing of BCE monolayers correspond to cells that die by caspase-dependent apoptosis.

Figure 4 shows the evolution of the apoptotic index (AI, defined in the legend to Fig. 4) during the healing process. Apoptotic bodies were rarely observed beyond the tenth row of cells from the wound edge at any time (not shown). From the results of Fig. 4a, two stages of cell death can be distinguished, either in the absence or in the presence of the ECM. In the first stage, a fast increase occurs in cell death that reaches its maximum at approximately 2 h and then gradually decreases until 4–6 h after injury. During this period, the AI

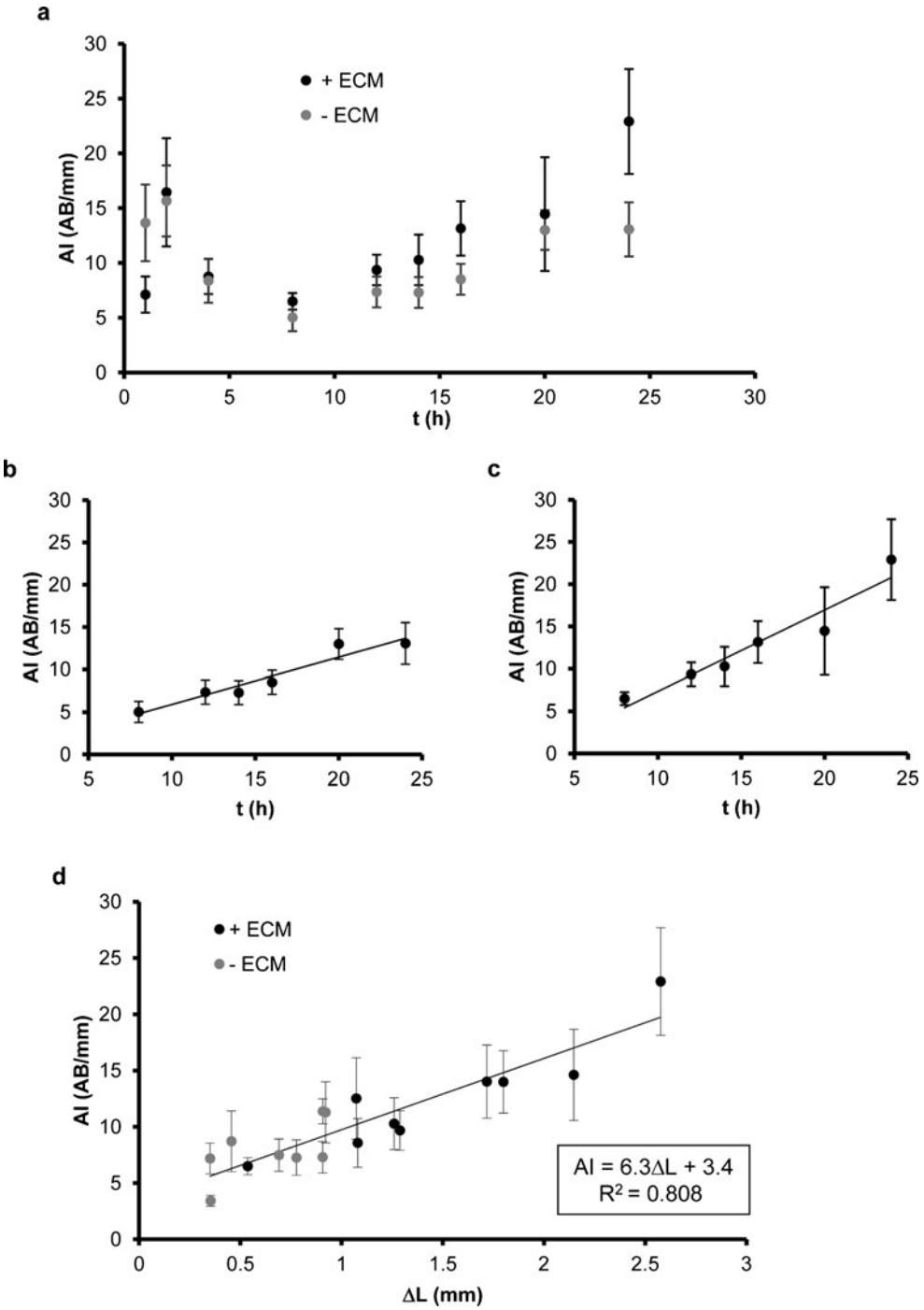


Fig. 4 ECM, time, and distance dependence of the apoptotic response during wound healing. **a** Time course of the apoptotic index (AI, see below) in the absence (*-ECM*) and presence (*+ECM*) of the ECM. Two stages of apoptotic increase are distinguishable. **b**, **c** Dependence of AI with time during the second stage of apoptosis in the absence (**b**) or presence (**c**) of the ECM. **d** Dependence of AI with the migrated distance during the second stage of apoptosis (ΔL mean distance of migration), in the absence (-ECM) and presence (+ECM) of the ECM. The best linear fit yields a slope equal to 6.3 AI/mm^2, corresponding to the (constant) number of apoptotic bodies (*AB*; Hoechst-stained nuclear condensations) produced in the first 20 rows of cells from the wound edge per square millimeter of wound. The *slopes* of the *curves* shown in **b**, **c** are significantly different according to Welch's *t*-test for independent samples ($P < 0.01$)

achieves similar values both in the absence or presence of ECM. This can be interpreted on the basis of our previous findings (Grasso et al. 2007) that, for the procedures employed to select one of the two healing modalities (see Materials and Methods), the healing cells during the first 2–4 h always migrate on the ECM left exposed by the cells that died immediately after the injury, independently of the procedure. In the second stage, which starts approximately 8 h after injury, the AI was found to be directly proportional to the elapsed time of migration (Fig. 4a–c), with a significantly higher proportionality constant when the ECM was present (Fig. 4b, c). The larger AI found in the presence of the ECM suggests that this index depends on the velocity of healing, since this rate is much higher for the monolayers that heal on the ECM, as shown in our previous work (Grasso et al. 2007) and in the present study (cf. Fig. 5d, e). Moreover, the migrated distance is, in healing cultured BCE monolayers,

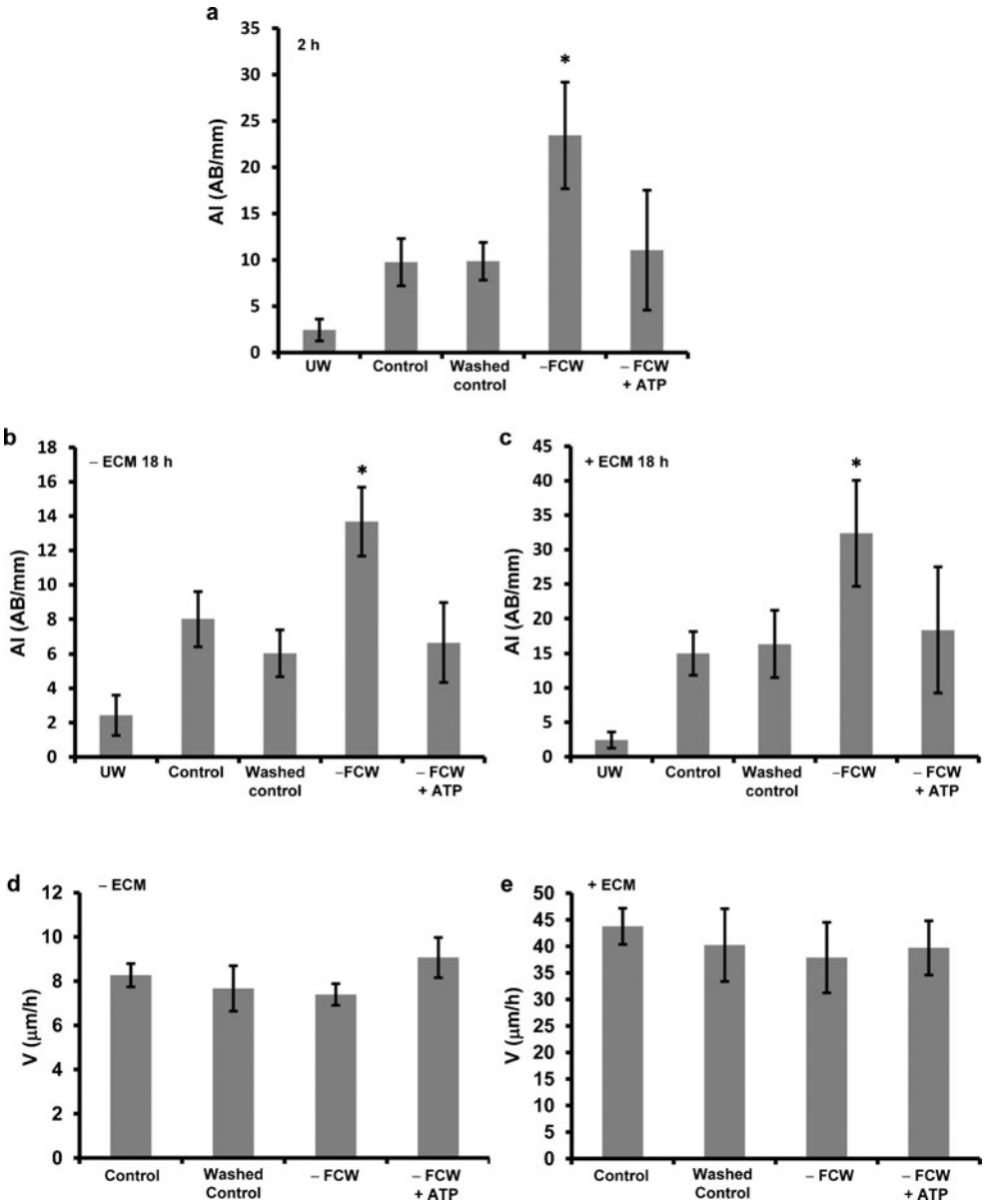


Fig. 5 Effect of FCW inhibition and of ATP-dependent calcium stimulation on apoptosis and on the healing rate. BCE cell monolayers were processed under the corresponding experimental strategies (see Fig. 1). Data taken 2 h (**a**), 18 h (**b, c**), and 8 h (**d, e**) after wounding in the presence (**a**, **c**, **e**) or absence (**b**, **d**) of the ECM (*UW* results from unwounded monolayers processed following strategy ES-I, but without a wound being made). Average velocity of healing (V) was calculated as described. $*P \leq 0.05$ with respect to the corresponding controls. AI was calculated as in Fig. 4

proportional to time in the two modalities of healing (Grasso et al. 2007). Hence, it is reasonable to expect an increase of AI with the migrated distance, independently of whether the ECM is present. In this respect, Fig. 4d shows that the AI is indeed proportional to the migrated distance.

We then studied the effect of FCW inhibition on the AI at times representative of the two stages of apoptosis (2 and 18 h after wounding), either in the presence or in the absence of the ECM. For this purpose, we utilized both standard controls and washed controls (ES-I and ES-III, Fig. 1). As mentioned, the employment of a washed control allowed us to discard residual effects of the experimental procedures, in particular of the inhibitors (see Materials and methods). As can be seen in Fig. 5a–c, for all the conditions, the two types of controls exhibited non-significant differences between them with regard to their AI values. For comparison, Fig. 5 also includes the apoptotic responses of unwounded monolayers following the experimental strategy ES-I. As expected from the results of Fig. 3a, b, very few apoptotic bodies were detected in unwounded BCE monolayers (Fig. 5a–c). We found that, in both stages of apoptosis and independently of the presence of the ECM, FCW inhibition induced an approximately 100 % increase in the AI (Fig. 5a–c). As also shown in Fig. 5, incubation with ATP of wounded monolayers that were pre-treated for FCW inhibition (-FCW+ATP) provoked a decrease in the AI to control values in the two conditions. Figure 5d, e shows that, for the two modalities of healing, the different

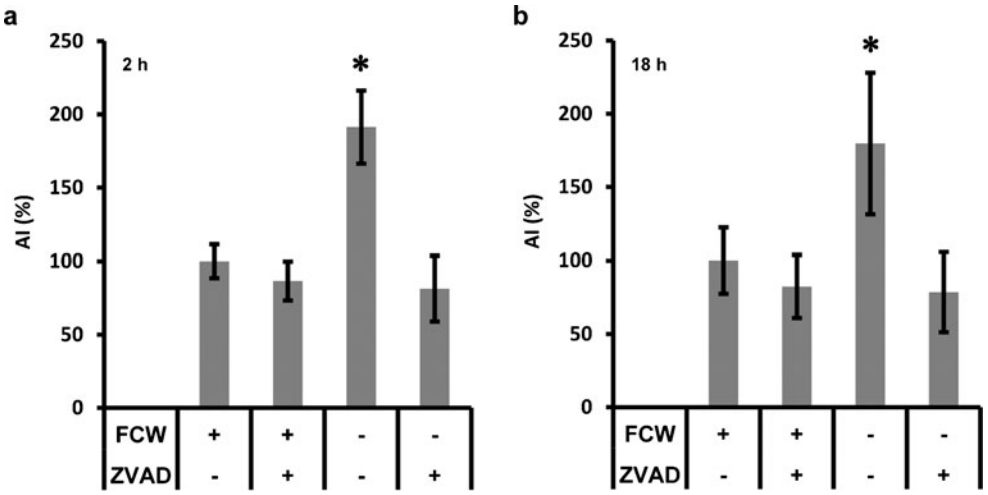


Fig. 6 Effect of the caspase inhibitor Z-VAD-FMK on the apoptotic response during BCE wound healing. The apoptotic index (AI) was determined at 2 h (**a**) and 18 h (**b**) after wounding in the presence of the ECM. Significant difference with respect to control: $*P \leq 0.1$; $**P \leq 0.05$). AI was calculated as in Fig. 4

experimental manipulations did not affect the healing rate. This suggests that the effect of FCW inhibition on the apoptotic response is not via a modulation of the healing velocity.

To further explore the role of the FCW on the apoptotic response of wounded BCE cells in culture, we studied the effect of the caspase inhibitor Z-VAD-FMK on the AI. The studies were carried out at 2 and 18 h after wounding (Fig. 6a, b, respectively), in the presence of the ECM. For both time points, the AI decreased to about 80 % of control values in the presence of Z-VAD-FMK, either in the case of the cells that developed FCW or that had undergone FCW inhibition. Similar results were obtained for studies performed in the absence of the ECM (not shown).

Taken together, the results of this section strongly suggest that one of the main roles of the FCW in the healing process of BCE cells is to determine a partial blockade of the apoptotic response via caspase inhibition. In the following section, we explored whether the FCW also had a role in cell proliferation in this system.

Role of FCW in cell proliferation of wounded BCE monolayers

As mentioned, in cat corneal endothelial cells in culture, proliferation becomes significant only after 48 h of healing (Petroll et al. 2001). However, in BCE cells, we found an important level of BrdU incorporation at 24 h after wounding (Fig. 7a–d). In both modalities of healing, the incorporation of BrdU started to increase approximately 8–10 h after wounding (Fig. 7c, d). As also revealed, the proliferation index (PI, defined in the legend to Fig. 7) was much larger (over four-fold) when the ECM was present (see also Fig. 7f, g), suggesting that, similar to apoptosis, the proliferative response might also depend on the healing velocity (cf. Figs. 4, 5). However, in contrast to the apoptotic response, the dependence of the PI on the migrated distance was not linear (Fig. 7e). The FCW is reported to induce cell proliferation during wound healing in vascular endothelia (Tran et al. 1998). To evaluate whether the wave had a similar role in BCE monolayers, we studied the effect of FCW inhibition on the PI of the migrating cells during wound healing at 24 h of wounding, both in the presence and in the absence of the ECM. Figure 7f, g shows the effect of the reversible inhibition of the FCW on the PI, both in the absence (Fig. 7f) and in the presence (Fig. 7g) of the ECM. As can be seen, the reversible FCW inhibition induced a significant PI decrease, with respect to the washed controls, of about 30 % in the presence and 20 % in the absence of the ECM. Moreover, after-wounding incubation with ATP induced the restoration of the PI to the washed control values in the two cases. The larger PI found for the washed control experiments with respect to the controls can be attributed to the employment in the former of EGTA, a well-known activator of diverse cellular responses either directly (Harris and Hanrahan 1994) or through the depletion of extracellular free calcium (Citi 1992; Quist et al. 2000; Hofer 2005). For comparison, Fig. 7 also includes the proliferation index of unwounded monolayers following ES-I. Consistent with the finding that the monolayers were confluent, almost no BrdU-positive cells could be detected under this condition. Together, the results shown in Fig. 7 suggest that, in addition to its participation in the apoptotic response, the FCW also has a contributing role in cell proliferation during wound healing of BCE monolayers, independently of the presence of the ECM, although with a larger contribution in the case of the lamellipodial mode of wound healing.

Discussion

The FCW has been recognized as one of the earliest signals triggered during the wound healing responses of epithelia (Cordeiro and Jacinto 2013) and has been found to be responsible for the activation of immediate early genes (Tran et al. 1999). In some epithelia, inhibition of the wave by

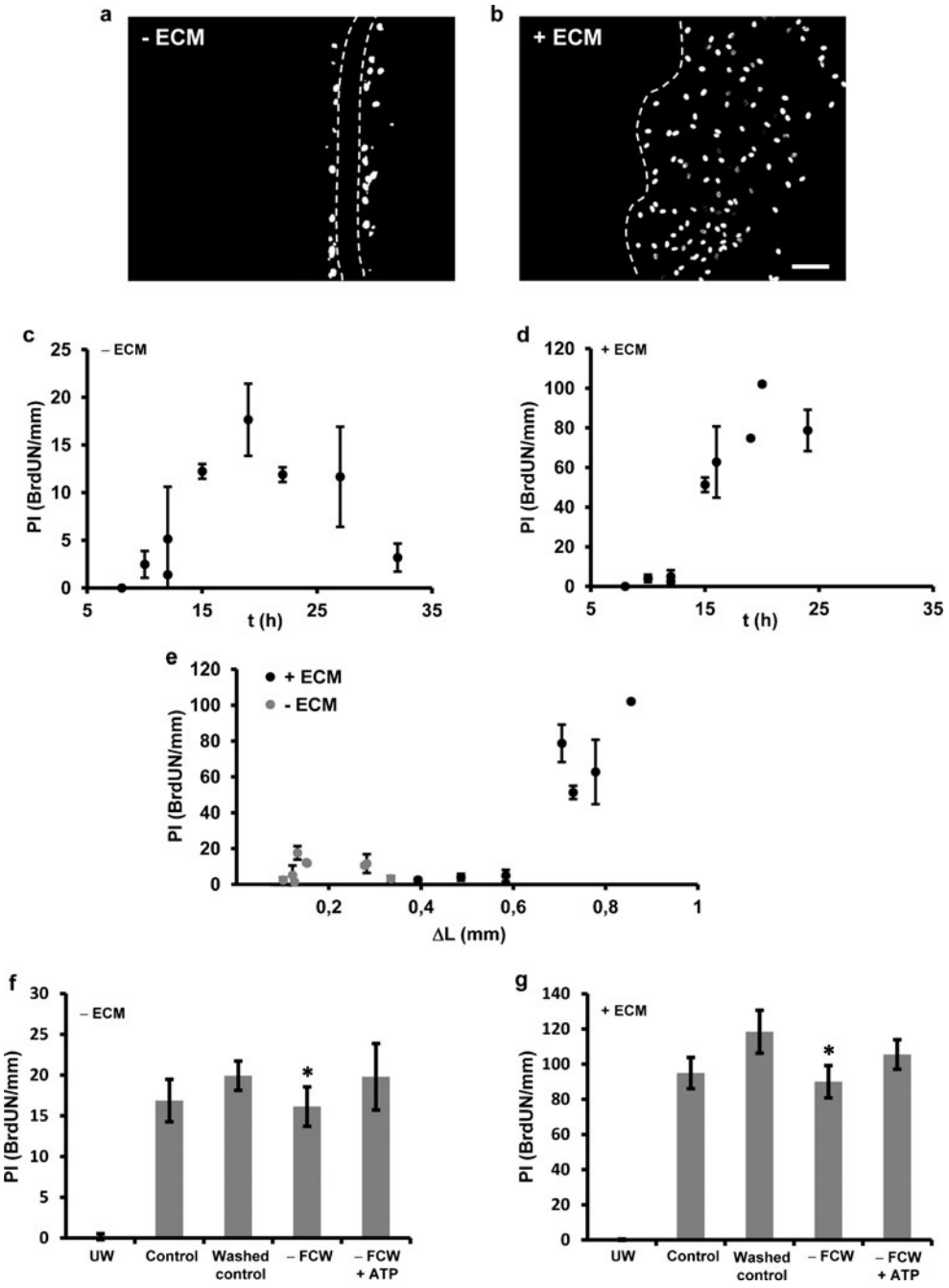


Fig. 7 Effect of FCW on 5-bromo-2′-deoxyuridine (BrdU) incorporation in wounded BCE monolayers. **a**–**g** BCE cells were wounded and incubated for 24 h (**a**, **b**, **f**, **g**) or the corresponding times (**c**-**e**) in the absence (*-ECM*) or presence (*+ECM*) of the ECM. BrdU was added 3 h before the end of each experiment. The monolayers were processed for BrdU immunofluorescence (**a**, **b**) and to determine the proliferation index (*PI* number of BrdU-positive nuclei in the first 30 rows of cells per millimeter of wound edge [no BrdU-positive nuclei were found beyond that row]; **c**-**g**). **a**, **b** *Dotted lines* indicate wound margins. **f**, **g** Monolayers were treated following ES-I (*Control*), ES-III (*Washed control*), ES-II (*-FCW*), and ES-IV (*-FCW+ATP*), in the absence (**f**) or presence (**g**) of the ECM (*UW* unwounded monolayers processed following strategy ES-I but without a wound being made). *Difference with respect to the corresponding washed controls ($P \leq 0.05$). *Bar* 60 μm

thapsigargin causes significant decreases in cell proliferation (Sung et al. 2003) and in the healing rate (Kimura et al. 2001; Leiper et al. 2006). We have found that, although thapsigargin also determines a significant decrease in the healing rate in BCE monolayers (Fig. 2d), the reversible inhibition of the FCW (by CPA-EGTA) does not significantly affect this rate in monolayers healing either by the actin cable modality (Chifflet et al. 2012) or by lamellipodial cell crawling (unpublished results). The wash-out experiments (Fig. 2a–c) allow these findings to be interpreted, since they reveal persistent effects of thapsigargin in BCE cells. In view of the lack of effect of the reversible inhibition of the FCW on the healing velocity, we have searched for other possible roles of the wave in the wound healing process in this system, specifically with regard to the apoptotic and proliferative responses. Since the two modalities of healing in epithelia, namely by actin cable (Kofron et al. 2002) and by lamellipodial crawling

(Henson et al. 2002; Omelchenko et al. 2003), are activated by their own signaling pathways (Sonnemann and Bement 2011), various responses to the FCW inhibition between them can be expected *a priori*. For this reason, the studies shown here were performed for the two modalities.

In this work, we determined that, during wound healing, BCE cells undergo programmed cell death. Our evidence suggests that cell death occurs by caspase-dependent apoptosis, since the dead cells show activation of caspase 3 and are TUNEL-positive. In addition, we have found that programmed cell death in wound healing occurs in two stages during the first 24 h of healing, independently of the modality. The first stage takes place in the first 4–6 h, and the second starts at 6–8 h after wounding. During the first stage, the number of apoptotic cells shows an increase that reaches a maximum at approximately 2 h and is followed by a decrease until 4–6 h after wounding. In the second stage, the AI is larger in the case of cells that heal on the ECM. Since the healing process is faster under this condition, this finding suggests that the apoptotic response depends on the velocity of healing and, thus, for instance, on the metabolic rate. In addition, we have found that the AI is directly proportional to the migrated distance. This dependence might be related to the molecular pathways involved in cell death. The great extent of loss and formation of focal adhesions and disruption of contacts between cells during migration, produced in an amount proportional to the migrated distance, possibly represents the main stimuli to induce the activation of mediators of the apoptotic response (Guadamillas et al. 2011). Support for this hypothesis will require further studies on individual migrating cells in non-injured conditions, for instance, via the employment of microstencils (Poujade et al. 2007) or subconfluent monolayers of BCE cells.

A major finding of this study is that, in cultured BCE cells, a key role of the FCW is to determine a partial inhibition of the apoptotic response of the healing cells. In this respect, we have been able to establish here that the reversible inhibition of the FCW induces an increase of about 100 % of the apoptotic rate during wound repair, for the two modalities of healing. In accordance, the induction of an FCW-mimetic rise of cytosolic calcium by ATP in FCW-inhibited monolayers provokes a reduction to control values of the apoptotic rate. As mentioned, although ATP diffusion is the major determinant of immediate calcium waves in response to mechanical stimulus in BCE monolayers, gap-junction-mediated intercellular communication also has a contributory role (Gomes et al. 2005a; D'Hondt et al. 2007). In this study, we have not explored the possible involvement of the gap-junction-mediated component of the FCW in the apoptotic response. The finding that the FCW inhibits the apoptotic program of only a fraction of the migrating cells might be related to the great variability of calcium responses of cells to wounding (Appleby et al. 2015). Thus, only those cells exhibiting a characteristic pattern of calcium signaling might effectively inactivate the apoptotic process. Our results further suggest that the additional component of the apoptotic response, induced when the FCW is absent, is completely blocked by caspase inhibition. The basal or constitutive apoptotic response (i.e., under control conditions), however, is only slightly modified by direct caspase inhibition. A possible interpretation of the lack of effect of Z-VAD on the basal apoptotic response is that an alternative apoptotic pathway is triggered simultaneously to the caspase pathway and/or as a consequence of caspase inhibition.

How can cytosolic calcium increase induce apoptotic inhibition? As has been classically recognized, a rise in cellular calcium is, among others, a signal for the induction of apoptosis (Orrenius et al. 2015). However, cytosolic calcium increases have also been found to be associated with anti-apoptotic responses. For instance, in a line of thymic T lymphoma cells, intracellular calcium release provokes an activation of the anti-apoptotic activity of CCL1 (Denis et al. 2012). Moreover, regucalcin, which is activated by an increase in cytosolic calcium, provokes the stimulation of anti-apoptotic responses (Yamaguchi 2013). Other possible mechanisms of the inhibition of apoptosis by calcium might be through the activation of protein kinase C. In effect, the activation of this enzyme has been shown to inhibit apoptosis via the phosphorylation of X-linked inhibitor of apoptosis protein (Shi et al. 2005; Kato et al. 2011) and Bcl2 (Jiffar et al. 2004).

Another finding of this research is that, in healing BCE monolayers in culture, the incorporation of BrdU is conspicuous at 24 h after injury, with cells exhibiting a higher proliferation index when the ECM is present. The difference found here between the two healing modalities can be explained by the higher loss of cell-cell contacts that occurs during wound repair in the presence of the ECM (Grasso et al. 2007). As recognized since the pioneering studies of Eagle, Levine and coworkers, confluent cells undergo contact inhibition of growth (Levine et al. 1965; Eagle and Levine 1967). Although the molecular mechanisms that regulate this phenomenon in epithelia are not yet well understood, homophilic cadherin (St Croix et al. 1998) interactions and participation of their complexes with alpha- and beta-catenin have been involved (Kim et al. 2011; Schlegelmilch et al. 2011; McClatchey and Yap 2012). In this respect, we have shown that cadherin is lost from cell junctions and internalized during tissue repair via lamellipodial cell crawling (Grasso et al. 2007). In addition, in confluent epithelial monolayers, cadherin homophilic interactions inhibit the activation of growth factor receptors (Qian et al. 2004; Cole et al. 2008). The loss of adherens junctions and cadherin internalization might therefore constitute major signals involved in the proliferation response during wound healing in the presence of the ECM. As an alternative and/or contributory factor to explain the difference in the proliferation rate between migration

in the presence or absence of the ECM, the effects on cell shape might play a relevant role. Whereas in the absence of the ECM, the cells at the wound border are constricted by the actin cable and, in general, by the conservation of the cytoskeletal organization of the typical epithelial phenotype, the cells fully spread and flatten when the ECM is maintained (Grasso et al. 2007). The role of cell shape in proliferation has long been recognized (Folkman and Moscona 1978). More recently, Ingber and coworkers have elegantly demonstrated the importance of cell spreading in cell proliferation (Chen et al. 1997). As shown here, the effect of FCW inhibition on the BrdU incorporation of healing BCE cells, measured at 24 h after wounding, is important and significant. The differences in the apoptotic and proliferative rates found for the two healing modalities, in the presence or absence of the ECM, might alternatively or concurrently be related to differences in the activity of receptors that transduce signals from the ECM to the cells, such as the integrins, immunoglobulin superfamily receptors, and proteoglycans (Clause and Barker 2013).

In summary, our results allow us to propose a novel role for the FCW triggered after wounding in monolayers of BCE cells in culture: to contribute to the control of the apoptotic response of the healing cells. As discussed above, we have been able to distinguish two apoptotic phases in these cells. The first stage of apoptosis seems to correspond to a "cleaning" phase, in which the programs of cell death are activated for all the cells that have been damaged during injury or in which their homeostatic mechanisms have become affected in such a way as to render an altered behavior during wound healing. Since, during the second stage, the AI is proportional to the migrated distance, this programmed cell death might represent a possible protective mechanism to prevent excessive migration of individual cells. Under physiological conditions, epithelial cells are spatially restricted because of the contact inhibition of proliferation and migration. An uncontrolled migrating epithelial cell possibly constitutes a threat to the homeostasis of the whole organism, the most extreme example being a migrating malignant cell. A reasonable hypothesis is that, under these circumstances, apoptotic processes are triggered to eliminate the potentially harmful migrating cells. However, wound healing is a physiological response that necessarily requires the individual or collective migration of a large number of cells that can establish loose or tight connections between each other (Rorth 2009). In this case, a massive apoptotic response is not desirable, and a certain level of inhibition of this response is naturally needed. This concept is supported by the finding that some proteins simultaneously activate migration and inhibit apoptosis in neural crest cells (Sato et al. 2011; Li et al. 2013). From the results of this study, we suggest that, at least in BCE cells, the FCW represents a survival signal to determine the partial inhibition of the apoptotic response and stimulation of cell proliferation and thus to contribute to ensuring an efficient restitution of the injured tissue.

Acknowledgments We thank Frigorífico Las Piedras, Frigorífico Lorsinal S.A., and the Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort for supplying us with fresh bovine eyes. We are also grateful to the anonymous reviewers for their useful criticisms and suggestions.

Compliance with ethical standards

Disclosures No conflicts of interest, financial or otherwise, are declared by the authors.

References

Abe M, Yokoyama Y, Ishikawa O (2012) A possible mechanism of basic fibroblast growth factor-promoted scarless wound healing: the induction of myofibroblast apoptosis. Eur J Dermatol 22:46–53

Akasaka Y, Ono I, Kamiya T, Ishikawa Y, Kinoshita T, Ishiguro S, Yokoo T, Imaizumi R, Inomata N, Fujita K, Akishima-Fukasawa Y, Uzuki M, Ito K, Ishii T (2010) The mechanisms underlying fibroblast apoptosis regulated by growth factors during wound healing. J Pathol 221:285–299

Appleby PA, Shabir S, Southgate J, Walker D (2015) Sources of variability in cytosolic calcium transients triggered by stimulation of homogeneous uro-epithelial cell monolayers. J R Soc Interface 12: 20141403

Bement WM, Forscher P, Mooseker MS (1993) A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. J Cell Biol 121:565–578

Berra-Romani R, Raqeeb A, Avelino-Cruz JE, Moccia F, Oldani A, Speroni F, Taglietti V, Tanzi F (2008) Ca^{2+} signaling in injured in situ endothelium of rat aorta. Cell Calcium 44:298–309

Carter R, Sykes V, Lanning D (2009) Scarless fetal mouse wound healing may initiate apoptosis through caspase 7 and cleavage of PARP. J Surg Res 156:74–79

Chen CS, Mrksich M, Huang S, Whitesides GM, Ingber DE (1997) Geometric control of cell life and death. Science 276:1425–1428

Chifflet S, Hernandez JA, Grasso S, Cirillo A (2003) Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture. Exp Cell Res 282:1–13

Chifflet S, Justet C, Hernandez JA, Nin V, Escande C, Benech JC (2012) Early and late calcium waves during wound healing in corneal endothelial cells. Wound Repair Regen 20:28–37

Citi S (1992) Protein kinase inhibitors prevent junction dissociation induced by low extracellular calcium in MDCK epithelial cells. J Cell Biol 117:169–178

Clause KC, Barker TH (2013) Extracellular matrix signaling in morphogenesis and repair. Curr Opin Biotechnol 24:830–833

Cole BK, Curto M, Chan AW, McClatchey AI (2008) Localization to the cortical cytoskeleton is necessary for Nf2/merlin-dependent epidermal growth factor receptor silencing. Mol Cell Biol 28:1274–1284

Cordeiro JV, Jacinto A (2013) The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing. Nat Rev Mol Cell Biol 14:249–262

Crosby LM, Luellen C, Zhang Z, Tague LL, Sinclair SE, Waters CM (2011) Balance of life and death in alveolar epithelial type II cells: proliferation, apoptosis, and the effects of cyclic stretch on wound healing. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 301:L536–L546

D'Hondt C, Ponsaerts R, Srinivas SP, Vereecke J, Himpens B (2007) Thrombin inhibits intercellular calcium wave propagation in corneal endothelial cells by modulation of hemichannels and gap junctions. Invest Ophthalmol Vis Sci 48:120–133

D'Hondt C, Ponsaerts R, De Smedt H, Vinken M, De Vuyst E, De Bock M, Wang N, Rogiers V, Leybaert L, Himpens B, Bultynck G (2011) Pannexin channels in ATP release and beyond: an unexpected rendezvous at the endoplasmic reticulum. Cell Signal 23:305–316

Denis C, Deiteren K, Mortier A, Tounsi A, Fransen E, Proost P, Renauld JC, Lambeir AM (2012) C-terminal clipping of chemokine CCL1/I-309 enhances CCR8-mediated intracellular calcium release and anti-apoptotic activity. PLoS One 7:e34199

Eagle H, Levine EM (1967) Growth regulatory effects of cellular interaction. Nature 213:1102–1106

Folkman J, Moscona A (1978) Role of cell shape in growth control. Nature 273:345–349

Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Alnemri ES, Altucci L, Andrews D, Annicchiarico-Petruzzelli M, Baehrecke EH, Bazan NG, Bertrand MJ, Bianchi K, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Campanella M, Candi E, Cecconi F, Chan FK, Chandel NS, Cheng EH, Chipuk JE, Cidlowski JA, Ciechanover A, Dawson TM, Dawson VL, De Laurenzi V, De Maria R, Debatin KM, Di Daniele N, Dixit VM, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Fimia GM, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnoczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Joseph B, Jost PJ, Kaufmann T, Kepp O, Klionsky DJ, Knight RA, Kumar S, Lemasters JJ, Levine B, Linkermann A, Lipton SA, Lockshin RA, Lopez-Otin C, Lugli E, Madeo F, Malorni W, Marine JC, Martin SJ, Martinou JC, Medema JP, Meier P, Melino S, Mizushima N, Moll U, Munoz-Pinedo C, Nunez G, Oberst A, Panaretakis T, Penninger JM, Peter ME, Piacentini M, Pinton P, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Ravichandran KS, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Shi Y, Simon HU, Stockwell BR, Szabadkai G, Tait SW, Tang HL, Tavernarakis N, Tsujimoto Y, Vanden Berghe T, Vandenabeele P, Villunger A, Wagner EF, Walczak H, White E, Wood WG, Yuan J, Zakeri Z, Zhivotovsky B, Melino G, Kroemer G (2015) Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. Cell Death Differ 22:58–73

Gomes P, Srinivas SP, Van Driessche W, Vereecke J, Himpens B (2005a) ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:1208–1218

Gomes P, Srinivas SP, Vereecke J, Himpens B (2005b) ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells. Invest Ophthalmol Vis Sci 46:104–113

Grasso S, Hernandez JA, Chifflet S (2007) Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture. Am J Physiol Cell Physiol 293:C1327–C1337

Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA (2011) Overcoming anoikis—pathways to anchorage-independent growth in cancer. J Cell Sci 124:3189–3197

Harris RA, Hanrahan JW (1994) Effects of EGTA on calcium signaling in airway epithelial cells. Am J Physiol 267:C1426–C1434

Henson JH, Nazarian R, Schulberg KL, Trabosh VA, Kolnik SE, Burns AR, McPartland KJ (2002) Wound closure in the lamellipodia of single cells: mediation by actin polymerization in the absence of an actomyosin purse string. Mol Biol Cell 13:1001–1014

Hofer AM (2005) Another dimension to calcium signaling: a look at extracellular calcium. J Cell Sci 118:855–862

Jiffar T, Kurinna S, Suck G, Carlson-Bremer D, Ricciardi MR, Konopleva M, Andreeff M, Ruvolo PP (2004) PKC alpha mediates chemoresistance in acute lymphoblastic leukemia through effects on Bcl2 phosphorylation. Leukemia 18:505–512

Justet C, Evans F, Vasilskis E, Hernandez JA, Chifflet S (2013) ENaC contribution to epithelial wound healing is independent of the healing mode and of any increased expression in the channel. Cell Tissue Res 353:53–64

Kato K, Tanaka T, Sadik G, Baba M, Maruyama D, Yanagida K, Kodama T, Morihara T, Tagami S, Okochi M, Kudo T, Takeda M (2011) Protein kinase C stabilizes X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) through phosphorylation at Ser(87) to suppress apoptotic cell death. Psychogeriatrics 11:90–97

Kim NG, Koh E, Chen X, Gumbiner BM (2011) E-cadherin mediates contact inhibition of proliferation through Hippo signaling-pathway components. Proc Natl Acad Sci U S A 108:11930–11935

Kimura C, Oike M, Koyama T, Ito Y (2001) Alterations of Ca^{2+} mobilizing properties in migrating endothelial cells. Am J Physiol Heart Circ Physiol 281:H745–H754

Klepeis VE, Cornell-Bell A, Trinkaus-Randall V (2001) Growth factors but not gap junctions play a role in injury-induced Ca^{2+} waves in epithelial cells. J Cell Sci 114:4185–4195

Klepeis VE, Weinger I, Kaczmarek E, Trinkaus-Randall V (2004) P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration. J Cell Biochem 93:1115–1133

Kofron M, Heasman J, Lang SA, Wylie CC (2002) Plakoglobin is required for maintenance of the cortical actin skeleton in early *Xenopus* embryos and for cdc42-mediated wound healing. J Cell Biol 158:695–708

Korkiamaki T, Yla-Outinen H, Leinonen P, Koivunen J, Peltonen J (2005) The effect of extracellular calcium concentration on calcium-mediated cell signaling in NF1 tumor suppressor-deficient keratinocytes. Arch Dermatol Res 296:465–472

Leiper LJ, Walczysko P, Kucerova R, Ou J, Shanley LJ, Lawson D, Forrester JV, McCaig CD, Zhao M, Collinson JM (2006) The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6+/- mouse model of epithelial wound-healing delay. BMC Biol 4:27

Levine EM, Becker Y, Boone CW, Eagle H (1965) Contact inhibition, macromolecular synthesis, and polyribosomes in cultured human diploid fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 53:350–356

Li F, Huang Q, Chen J, Peng Y, Roop DR, Bedford JS, Li CY (2010) Apoptotic cells activate the "phoenix rising" pathway to promote wound healing and tissue regeneration. Sci Signal 3:ra13

Li W, Xiong Y, Shang C, Twu KY, Hang CT, Yang J, Han P, Lin CY, Lin CJ, Tsai FC, Stankunas K, Meyer T, Bernstein D, Pan M, Chang CP (2013) Brg1 governs distinct pathways to direct multiple aspects of mammalian neural crest cell development. Proc Natl Acad Sci U S A 110:1738–1743

Lotz MM, Rabinovitz I, Mercurio AM (2000) Intestinal restitution: progression of actin cytoskeleton rearrangements and integrin function in a model of epithelial wound healing. Am J Pathol 156:985–996

Lytton J, Westlin M, Hanley MR (1991) Thapsigargin inhibits the sarcoplasmic or endoplasmic reticulum Ca-ATPase family of calcium pumps. J Biol Chem 266:17067–17071

McClatchey AI, Yap AS (2012) Contact inhibition (of proliferation) redux. Curr Opin Cell Biol 24:685–694

Narciso C, Wu Q, Brodskiy P, Garston G, Baker R, Fletcher A, Zartman J (2015) Patterning of wound-induced intercellular Ca(2+) flashes in a developing epithelium. Phys Biol 12:056005

Omelchenko T, Vasiliev JM, Gelfand IM, Feder HH, Bonder EM (2003) Rho-dependent formation of epithelial "leader" cells during wound healing. Proc Natl Acad Sci U S A 100:10788–10793

Orrenius S, Gogvadze V, Zhivotovsky B (2015) Calcium and mitochondria in the regulation of cell death. Biochem Biophys Res Commun 460:72–81

Petroll WM, Ma L, Jester JV, Cavanagh HD, Bean J (2001) Organization of junctional proteins in proliferating cat corneal endothelium during wound healing. Cornea 20:73–80

Poujade M, Grasland-Mongrain E, Hertzog A, Jouanneau J, Chavrier P, Ladoux B, Buguin A, Silberzan P (2007) Collective migration of an epithelial monolayer in response to a model wound. Proc Natl Acad Sci U S A 104:15988–15993

Qian X, Karpova T, Sheppard AM, McNally J, Lowy DR (2004) E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. EMBO J 23:1739–1748

Quist AP, Rhee SK, Lin H, Lal R (2000) Physiological role of gap-junctional hemichannels. Extracellular calcium-dependent isosmotic volume regulation. J Cell Biol 148:1063–1074

Razzell W, Evans IR, Martin P, Wood W (2013) Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through DUOX activation and hydrogen peroxide release. Curr Biol 23:424–429

Rorth P (2009) Collective cell migration. Annu Rev Cell Dev Biol 25: 407–429

Sammak PJ, Hinman LE, Tran PO, Sjaastad MD, Machen TE (1997) How do injured cells communicate with the surviving cell monolayer? J Cell Sci 110:465–475

Sato A, Scholl AM, Kuhn EN, Stadt HA, Decker JR, Pegram K, Hutson MR, Kirby ML (2011) FGF8 signaling is chemotactic for cardiac neural crest cells. Dev Biol 354:18–30

Schlegelmilch K, Mohseni M, Kirak O, Pruszak J, Rodriguez JR, Zhou D, Kreger BT, Vasioukhin V, Avruch J, Brummelkamp TR, Camargo FD (2011) Yap1 acts downstream of alpha-catenin to control epidermal proliferation. Cell 144:782–795

Shabir S, Southgate J (2008) Calcium signalling in wound-responsive normal human urothelial cell monolayers. Cell Calcium 44:453–464

Sherwood CL, Lantz RC, Burgess JL, Boitano S (2011) Arsenic alters ATP-dependent Ca(2)+ signaling in human airway epithelial cell wound response. Toxicol Sci 121:191–206

Shi RX, Ong CN, Shen HM (2005) Protein kinase C inhibition and X-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. Cancer Res 65:7815–7823

Sonnemann KJ, Bement WM (2011) Wound repair: toward understanding and integration of single-cell and multicellular wound responses. Annu Rev Cell Dev Biol 27:237–263

St Croix B, Sheehan C, Rak JW, Florenes VA, Slingerland JM, Kerbel RS (1998) E-Cadherin-dependent growth suppression is mediated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p27 (KIP1). J Cell Biol 142: 557–571

Sung YJ, Sung Z, Ho CL, Lin MT, Wang JS, Yang SC, Chen YJ, Lin CH (2003) Intercellular calcium waves mediate preferential cell growth toward the wound edge in polarized hepatic cells. Exp Cell Res 287: 209–218

Tan JQ, Zhang HH, Lei ZJ, Ren P, Deng C, Li XY, Chen SZ (2013) The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. Burns J Int S Burn Inj 39:1551–1556

Tran PO, Tran QH, Hinman LE, Sammak PJ (1998) Co-ordination between localized wound-induced Ca^{2+} signals and pre-wound serum signals is required for proliferation after mechanical injury. Cell Prolif 31:155–170

Tran PO, Hinman LE, Unger GM, Sammak PJ (1999) A wound-induced [Ca2+]i increase and its transcriptional activation of immediate early genes is important in the regulation of motility. Exp Cell Res 246: 319–326

Waters CM, Sporn PH, Liu M, Fredberg JJ (2002) Cellular biomechanics in the lung. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 283:L503–L509

Yamaguchi M (2013) The anti-apoptotic effect of regucalcin is mediated through multisignaling pathways. Apoptosis 18:1145–1153

Artículo IV

Justet, C., S. Chifflet, and J.A. Hernandez. 2019. Calcium Oscillatory Behavior and Its Possible Role during Wound Healing in Bovine Corneal Endothelial Cells in Culture. *BioMed research international*. 2019:8647121.

Hindawi
BioMed Research International
Volume 2019, Article ID 8647121, 16 pages
https://doi.org/10.1155/2019/8647121

Research Article

Calcium Oscillatory Behavior and Its Possible Role during Wound Healing in Bovine Corneal Endothelial Cells in Culture

Cristian Justet,[1] Silvia Chifflet,[1] and Julio A. Hernandez[2]

[1]*Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Gral. Flores 2125, 11800 Montevideo, Uruguay*
[2]*Sección Biofísica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Iguá s/n esq. Mataojo, 11400 Montevideo, Uruguay*

Correspondence should be addressed to Julio A. Hernandez; jahern@fcien.edu.uy

Received 22 August 2018; Revised 29 January 2019; Accepted 6 February 2019; Published 21 February 2019

Academic Editor: Hannes Stockinger

Copyright © 2019 Cristian Justet et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

In epithelial layers in culture, immediately after an injury a fast calcium wave (FCW) propagates from the wound borders toward the rest of the monolayer. We show here that similarly to other tissues, during the FCW in bovine corneal endothelial (BCE) cells in culture many cells exhibit calcium oscillations mediated by IP3 signaling. In this study we perform a detailed characterization of this oscillatory behavior and explore its possible role in the process of wound healing. In previous work we showed that, in BCE cells in culture, the healing cells undergo two stages of caspase-dependent apoptosis, at approximately two and eight hours after wounding. We determined that inhibition of the FCW greatly increases the apoptotic rate of the two stages, suggesting that the wave prevents excessive apoptosis of the healing cells. Taking this into account, we investigated the possible participation of the calcium oscillations during the FCW in apoptosis of the healing cells. For this, we employed ARL-67156 (ARL), a weak competitive inhibitor of ecto-ATPases, and the calcium chelator EGTA. We show here that, in healing BCE cells, ARL enhances cellular calcium oscillations during the FCW, while EGTA decreases oscillations. We found that ARL produces a significant decrease (to about half the control value) in the apoptotic index of the first stage of apoptosis, while EGTA increases it. Neither drug noticeably affects the second stage. We have interpreted the effect of ARL on apoptosis as due to the maintenance of moderately risen ATP levels during the FCW, which is in turn the cause for the enhancement of ATP-dependent calcium oscillations. Correspondingly, EGTA would increase the apoptotic index of the first stage by promoting a decrease in the calcium oscillatory rate. The fact that the second stage of apoptosis is not affected by the drugs suggests that the two stages are at least partially subject to different signaling pathways.

1. Introduction

Wound healing is a property of the utmost importance for organisms. Even under culture conditions, most cellular layers exhibit the capacity to restitute injured areas by migration and proliferation of the border cells. Due to their characteristic functions and localizations, epithelial tissues have been particularly employed as models for the study of the basic aspects of the healing processes, both under in vitro and in vivo conditions. In essence, an experimental wound produced on an epithelial monolayer in culture determines a collective cellular response that, although more conspicuous at the wound borders, nevertheless also involves cells located several rows away [1–3]. Depending on the healing mode, the cells undergo dramatic morphological modifications and perform cohesive and/or individual migration into the denuded area [4, 5]. Later in the healing process, proliferation of the migrating cells contributes to tissue restitution to an extent that depends on the particular cell type [6, 7]. Many cells undergo apoptosis, a process that has been shown to be involved in the control of the migration and proliferation rates of the healing cells [7–10].

Wound healing is triggered and regulated by mechanisms still incompletely understood. In most epithelia, a fast calcium wave (FCW) occurs immediately after the production of a wound, propagating from the border cells toward the rest of the monolayer with a typical duration of several minutes [7, 11–16]. Some epithelia also exhibit another calcium wave that starts to develop approximately one hour after healing and has a slower rate of spreading into the monolayer ("slow calcium wave" [16]). Other phenomena that take place as early consequences of an injury are the establishment of a

hydrogen peroxide gradient [17, 18] and the development of ERK1/2 waves [19]. In particular, the FCW has been suggested to signal different cellular responses that participate in the healing process [6, 12, 18, 20, 21]. Employing a model of mechanical injury in bovine corneal endothelial (BCE) cells in culture, we have shown that the FCW is also involved in the control of the apoptotic response of the healing cells [7]. The increase in extracellular ATP that occurs as a consequence of its release from the damaged cells and by mechanical stimulation of the surviving border cells seems to represent the main signal to trigger the FCW [22–24].

Calcium signaling participates in the regulation of a myriad of physiological processes, such as cell proliferation, migration, survival, and apoptosis [25–28]. Many types of dynamic responses of cellular calcium to diverse stimuli have been observed, from simple transients to more complex behaviors, such as oscillations and even chaos [29]. These behaviors have been interpreted with the aid of mathematical models of varied complexity [30]. For the case of the FCW triggered by a mechanical tissue injury, many cells exhibit oscillations in cytosolic calcium [31–34]. This has also been observed by mechanical stimulation of uninjured monolayers, a procedure that provokes a calcium response similar to the FCW [35–37]. In human urothelial cells in culture, the cells exhibit a very large diversity of dynamic behaviors of the calcium modifications, a property that has been suggested to underlie the vast and complex signaling processes involved in the overall healing response [33]. For this experimental model, the authors made a thorough characterization of the dynamic responses in cytosolic calcium exhibited by the different cells. In imaginal discs of *Drosophila* larvae the variability in the calcium responses to laser ablation was correlated with cell size and mechanical anisotropy [38]. The dynamic complexity of the calcium signals exhibited by epithelia has also been observed in uninjured tissues and suggested to have a genetic basis [39].

We show here that, in BCE cells in culture, many cells also exhibit an oscillatory behavior during the FCW. It has been suggested that calcium oscillations may in general not solely be a contingent consequence of complex dynamic interactions but have specific physiological roles, where the frequency and amplitude of the oscillations possess informational significance [40–42]. In particular, calcium oscillations have been found to promote mouse oocyte activation [43] or apoptosis [44], depending on the oocyte age. It has also been suggested that calcium oscillations could mediate survival responses in neurons and T-lymphocytes [45]. As stated, ATP plays a major role in triggering calcium signals. In uninjured tissue studies, the nucleotide has also been specifically held responsible for the generation of calcium oscillations [36, 46–51] with a strong dependence of the oscillatory frequency on the ATP concentration [46, 52].

As mentioned above, the emergence of cytosolic calcium oscillations during calcium waves triggered by tissue injuries has already been communicated [31–34]. However, to the best of our knowledge, there are no reports regarding the roles of these oscillations in the healing process. The purpose of the present work has therefore been to perform a detailed characterization of the dynamics of the calcium modifications undergone by the healing BCE cells during the FCW and to study the possible role of oscillations in apoptosis.

2. Materials and Methods

2.1. Reagents and Solutions. Chemicals and drugs were from Sigma Chemical Co. (Munich, Germany) unless otherwise specified. Control solution (CS) is as follows: 137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.02 mM NaH_2PO_4, 3.6 mM $CaCl_2$, 0.8 mM $MgSO_4$, and 10 mM HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid) pH 7.4. Final concentrations of the drugs were as follows: cyclopiazonic acid (CPA, Molecular Probes Inc., Eugene, OR), 10 μM; ARL 67156 (ARL) and U73122, 50 μM; pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2′,4′-disulphonic acid (PPADS), 10 μM.

2.2. Cell Culture and Wounding Procedure. Bovine eyes, obtained fresh from certified slaughterhouses under veterinary supervision (see Acknowledgments), were processed as described in [53]. In short, corneal endothelium was treated with trypsin (0.25%)/EDTA (0.02%) in Ca^{2+} and Mg^{2+}-free PBS for 20-30 min in the tissue culture incubator. The endothelial cells were plated in minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% serum, 50 μg/ml gentamicin, 0.25 μg/ml amphotericin B, and 50 μg of total protein/ml of retinal extract and grown on glass coverslips. This study only employed cells from the 1st to the 5th passages that had achieved visual confluence at least five days before the experiments. Linear wounds from side to side of the coverslip were made using a 21-gauge syringe needle [54]. For this, the coverslips were mounted on the experimental chamber, immobilized with tape, and placed under the microscope. The time-lapse photography was initiated and then the wound produced manually at the center of the microscopic field.

2.3. Cytosolic Calcium. Modifications in cytosolic calcium were assessed by Fluo-4 fluorescence (Molecular Probes Inc., Eugene, OR). This probe was kept as a 1.7 mM stock solution in DMSO at -20°C and, for the experiments, mixed with 20% pluronic acid (Molecular Probes Inc.) in DMSO, and diluted to a final concentration of 1.7 μM in the corresponding solution. The cells grown on coverslips were incubated in this solution at room temperature (RT) for 15 min. After washing with CS, the coverslips were mounted on a home-made chamber [53] containing CS and 1 μg/ml propidium iodide to reveal dead cells. Wounds were produced under the fluorescent microscope and photographs taken every 1 second employing a Moticam Pro 282B camera and the Moticam Image Advanced 3.2 software. For the studies we employed a direct Nikon 50i epifluorescence microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with a 10X Plan-Fluor objective and a B-2A Blue Excitation Filter Block (450-490 nm Excitation Filter, 500 nm Dichromatic Mirror Cut and 515 nm Barrier Filter).

2.4. Calcium Dynamics. To perform the studies on calcium dynamics, cells were individualized as follows. To better

appreciate the cell boundaries, two or three images of the same sequence were arbitrarily selected and merged together (Figure 1(a)). In the resulting image, the limits of each cell were drawn using the Pencil Tool of the Adobe Photoshop Software (Adobe Systems Corporation, San Jose, CA, USA) (Figure 1(b)) and the cells were identified by numbering them with the Count Tool in a row-by-row fashion starting from the wound edge. The first row was defined as the one containing all the cells at the wound border, excluding propidium iodide positive cells. Each following row was defined as the group of cells in contact with the previous row (Figure 1(c)). For each cell, the time course of the calcium signal was then assessed by image analysis of the subsequent micrographs. For this, we created an Adobe Photoshop Action to determine the integrated density of each cell in an ordered fashion according to its number and for each time point of the experiment. Data were then stored in a spreadsheet for analysis. A total of 400 to 500 cells were analyzed per image.

Identification of calcium peaks in the dynamic signals was performed by direct observation of the time plots. Two of us (CJ and JAH) independently classified the cells by counting the number of peaks exhibited by their signals during the two-minute interval following injury. Cells displaying more than one calcium peak were considered to be oscillatory. Comparison of the two independent observations revealed a very high level of agreement. In a few cases, discrepancies were set by a third independent observation (by SC). From the data stored in the spreadsheet (see above) four parameters were derived: the amplitude of the first peak (Amp), the time lapse to reach the first peak after injury (TFP), the number of identifiable peaks (NP), and the wave velocity (V) (Figure 1(e)). The amplitude Amp was measured as the difference between the first maximum of integrated density and the basal value, TFP as the time elapsed between the injury and the first maximum. The calcium wave velocity V was defined as the quotient of the distance from the wound edge (calculated as the number of rows, multiplied by the average diameter of the cells (D)) and the TFP (V = number of rows x D/TFP). The fraction of responding cells was calculated as the number of cells exhibiting one or more calcium peak with respect to the total number of cells in the field (i.e., counted from the wound edge to the end of the field).

In order to evaluate whether the calcium signal jumped over discontinuities, double-wounding experiments were performed. For this, cells were loaded with Fluo-4 AM and two wounds were sequentially produced. The first wound was made on the center of the monolayer. After 10 to 20 min the coverslips were mounted on the chamber with the first wound placed at the center of the field. Then, the second wound was made as close as possible to the first wound (cf. Figure 3(a)). Single-wound controls were made as usual in independent coverslips.

To provoke cytosolic calcium increase in uninjured BCE monolayers by stimulation with ATP, the coverslips were mounted in the chamber under the fluorescent microscope and a solution of ATP in CS was added to the chamber. In these experiments, images were similarly processed for calcium as above, but data were collected from all the cells contained in a square of 150 μm side drawn at the center of the field.

2.5. Calcium Depletion and Inhibition of Ecto-ATPases. To produce calcium depletion of the endoplasmic reticulum, 10 μM CPA was added to the culture medium 30 min before wounding. For experiments performed in the absence of extracellular calcium, cells were incubated in CS without calcium in the presence of 100 μM EGTA one min prior to wounding. To study the effect of ATP-induced calcium oscillations on apoptosis, cells were incubated for 2 min in different ATP concentrations and washed twice with culture medium and 10 μM CPA was incorporated. After 30 min of incubation, the culture medium was removed and the cells were kept for 2 min in Ca^{2+} and Mg^{2+}-free PBS with 100 μM EGTA, to achieve FCW abolition [7]. The wounds were performed 30 s after the addition of PBS. The cells were then washed three times with culture medium and maintained for 2 h in the tissue culture incubator.

In order to inhibit ecto-ATPases, 50 μM ARL was added to the medium 10 min before wounding, kept until 5 min after wounding and then the monolayers were washed three times with culture medium.

2.6. Apoptotic Cells. In previous work we demonstrated that all the nuclear condensations observed during wound healing in cultured BCE cells are caspase 3 and TUNEL positive and have thus considered them as apoptotic bodies [7]. Therefore, in this study, to identify apoptotic cells the coverslips were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 5 min, and incubated with 50 μM Hoechst 33258 for 20 min. The apoptotic index (AI) was determined as the percentage of apoptotic bodies with respect to control produced in the first 20 rows of cells from the wound edge per millimeter of wound border.

2.7. Statistical Analysis. The results and images are representative of at least three independent experiments performed in duplicate. Numerical results are expressed as means ± SD. Statistical significance was assessed employing Student's t-test.

3. Results

3.1. Cellular Calcium Dynamics during the Fast Calcium Wave. Calcium dynamics in the individual cells was studied by processing the image sequences of Fluo-4 signals immediately after wounding, as described in Materials and Methods (Figures 1(a)–1(c)). A movie showing the calcium dynamics during the FCW is included (Supplementary Material, movie 1). Figure 1(d) shows examples of relative calcium fluorescent signals of three cells, corresponding to rows 1, 7, and 14. Figure 1(e) and its legend describe the signal parameters determined for each case (see Materials and Methods): the amplitude of the first peak (Amp), the time lapse to reach the first peak after injury (TFP), the number of identifiable

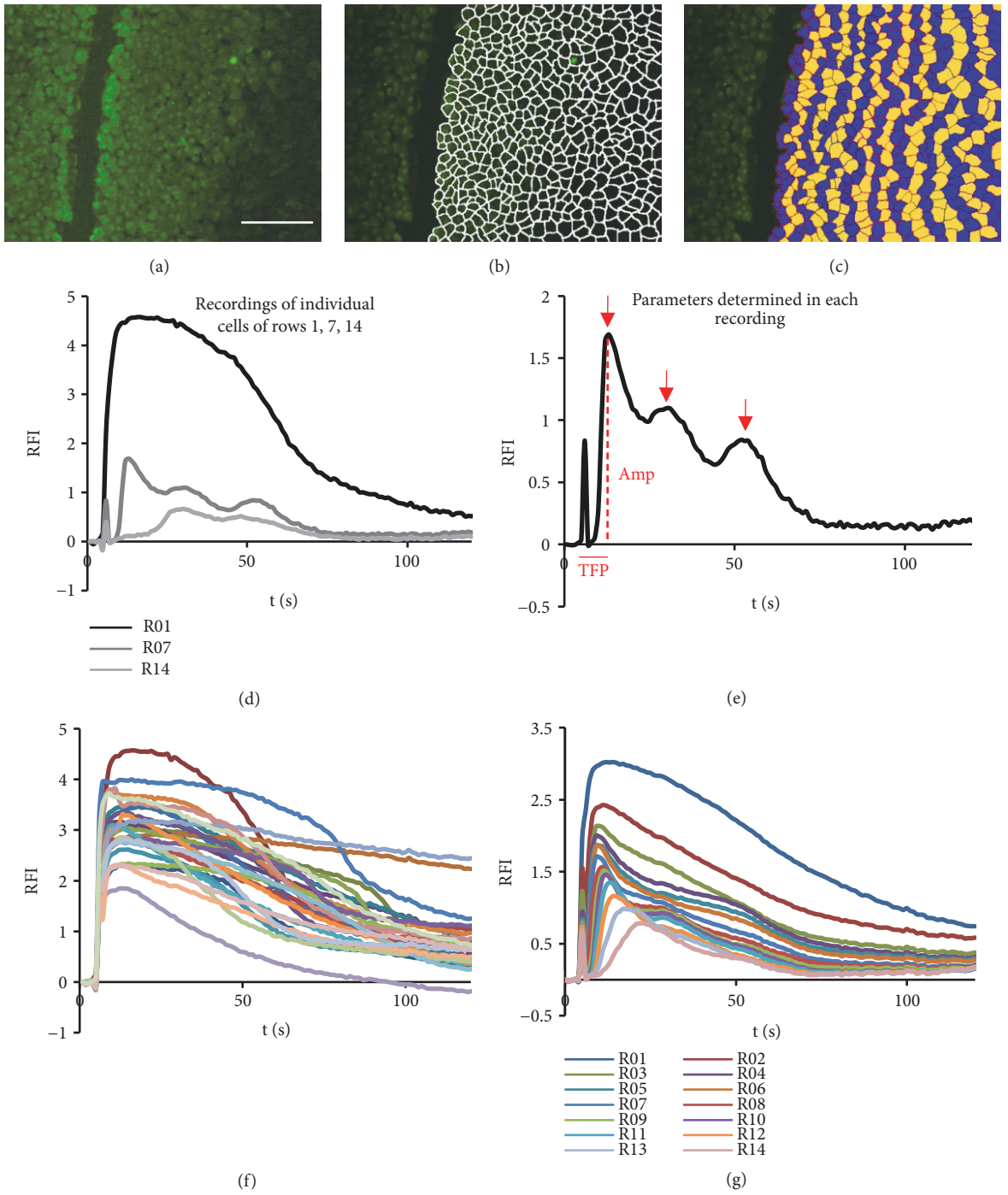


Figure 1: *Characterization of the cellular calcium response during the FCW*. (a-c) Delimitation of the individual cells and classification of the cells into successive rows (see Materials and Methods). (d) Examples of the dynamic behavior of different cells and (e) graphical indication of the signal parameters analyzed in this study. The short peak at the left corresponds to the needle reflection during wounding and sets time zero for the measurements. RFI: relative fluorescence intensity (fold increase over basal value), TFP: time to achieve the maximum fluorescence intensity value of the first peak, and Amp: maximum RFI of the first peak. The arrows indicate the different signal peaks. NP is the total number of peaks in the corresponding trace. For the example shown in (e): row number = 7, TFP = 7s, Amp = 1.69, and NP = 3. We consider the mean cell diameter D to be 35 μm. Therefore V = 35 μm/s (V = row x D/TFP). (f) Dynamic responses of the cells of the first row and (g) average RFI values of the different rows. Bar = 300 μm.

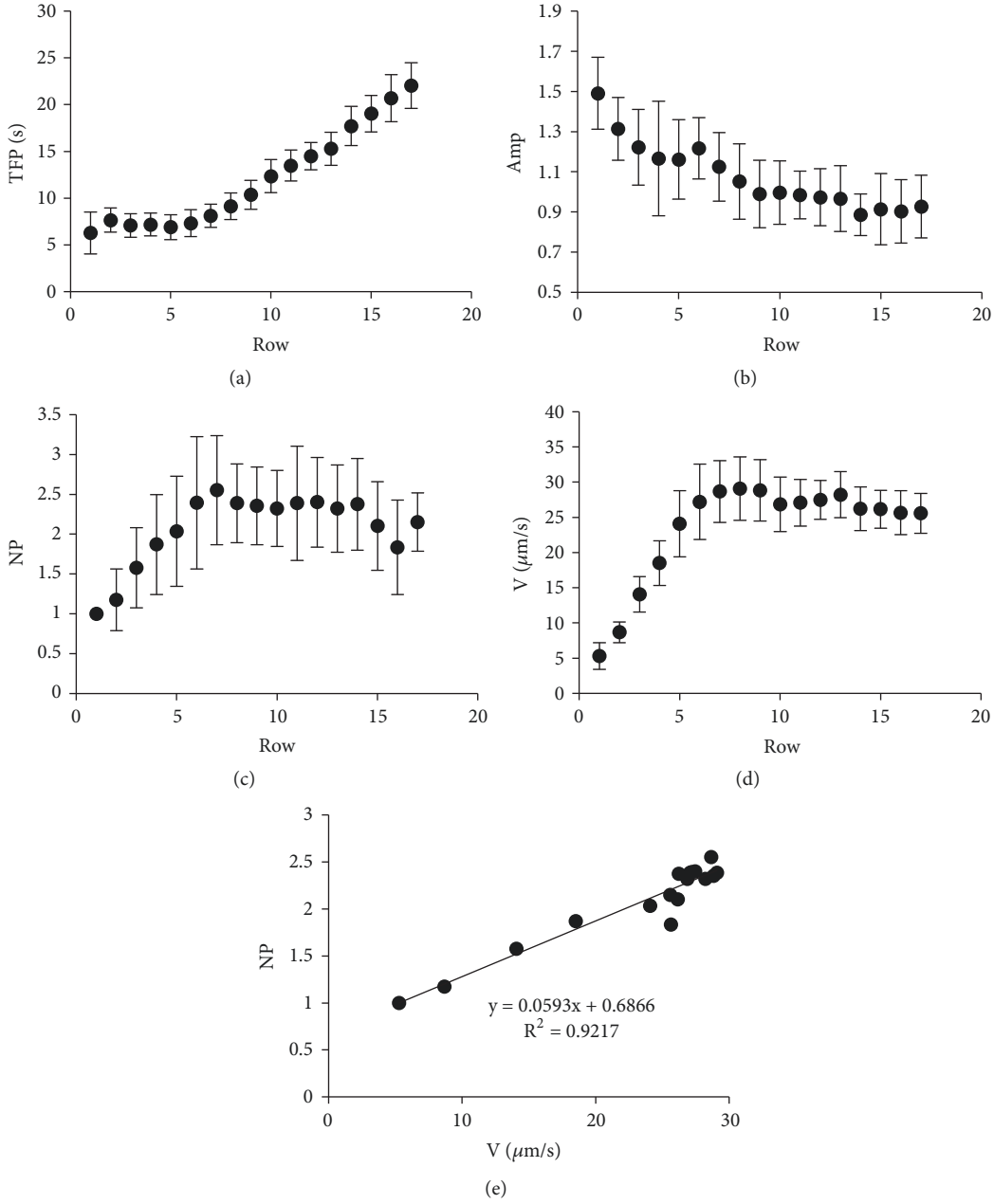


Figure 2: *Average parameter values per row of the dynamic calcium responses under control conditions*. The figure displays the average values and standard deviations for each row of TFP (a), Amp (b), the number of peaks (NP, (c)) and the wave velocity of propagation (V, see legend to Figure 1, (d)). The plot NP vs V (e) reveals a significant linear correlation. The figure shows results obtained from a typical experiment with a total number of analyzed cells equal to 439.

peaks (NP), and the wave velocity (V). Inspection of the calcium signals displayed by all the cells in each experiment reveals that there is a high range of dynamic behaviors in the cellular responses, from cells that exhibit a maximum and then a monotonous relaxation to basal values to cells that display a clear oscillatory behavior, such as the one shown in Figure 1(e). This variability can be observed for the cells in one row (Figure 1(f)) and persists for the average row tracings (Figure 1(g)). This variability in the behavior of the cellular calcium responses of BCE monolayers is analogous to the one found previously in other tissues for wound-triggered calcium waves [32, 33].

Figure 2 shows the average values obtained for Amp, TFP, NP, and V for each row. As can be seen, the time to reach the first peak increases and the signal amplitude decreases with the row number (Figures 2(a)-2(b)). This is analogous to the results described for wounded urothelial layers [33] and is consistent with the idea that a diffusive signal is involved in the calcium response. Both the number of peaks in each tracing and the wave velocity increase

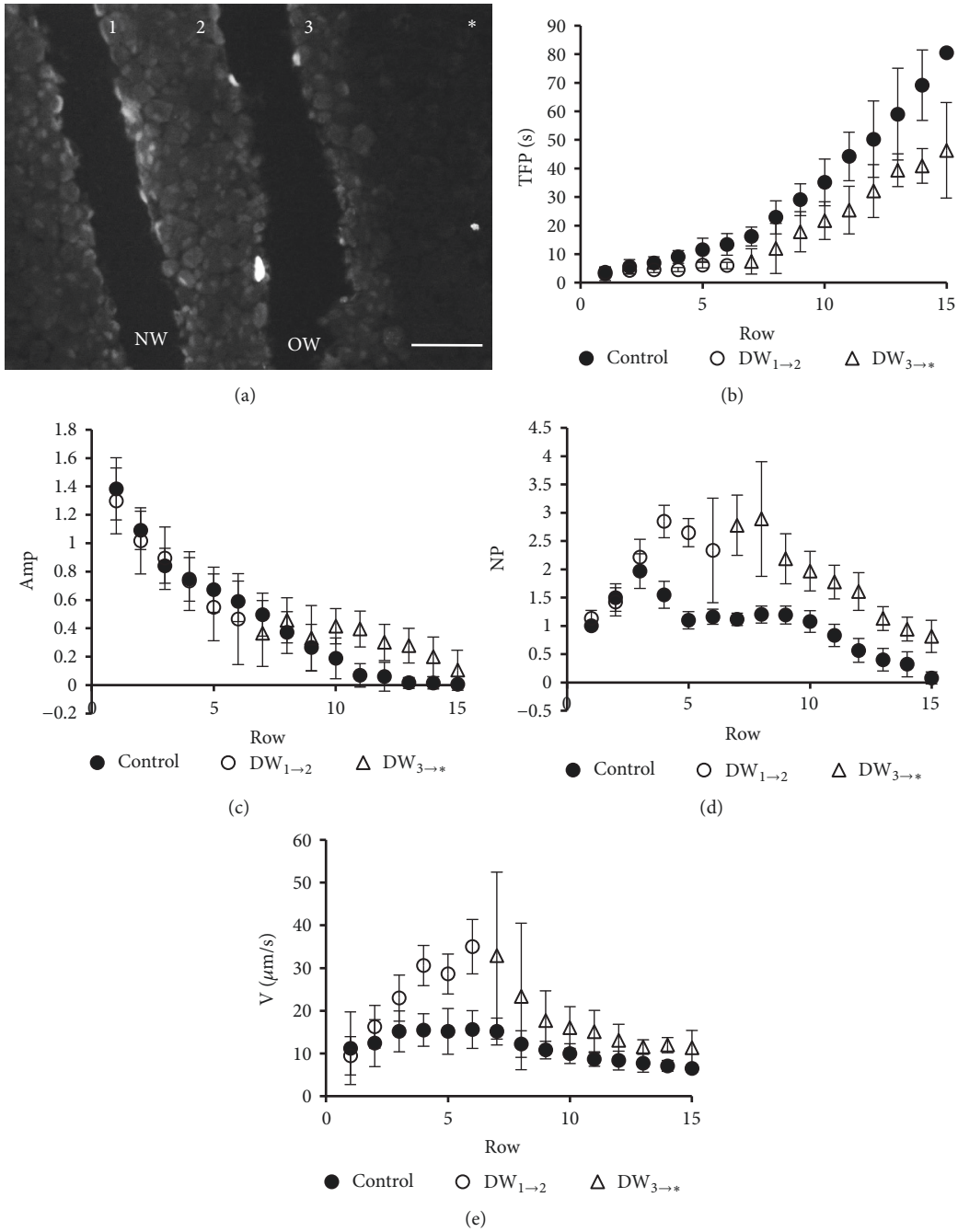


Figure 3: *Average row parameters in double-wounding experiments*. For the double-wounding experiments (a), a first wound (old wound, OW) was performed. A second wound (new wound, NW) was made 10 to 20 min later, to assure complete extinction of the first FCW. In the figure, 1, 2, and 3 designate the wound borders considered for the measurements. The asterisk (∗) indicates the direction of the wave to the uninjured tissue. The plots of TFP (b), Amp (c), NP (d), and V (e) vs the row number show that the curves maintain their characteristics beyond the OW, revealing that the tissue gap has not precluded the propagation and properties of the wave triggered by NW. $DW_{1\to2}$, and $DW_{3\to*}$: fast calcium waves triggered by NW between borders 1 and 2 and between border 3 and the uninjured tissue (∗), respectively. Control parameter values were determined in an independent coverslip. Bar = 200 μm. The figure shows results obtained from typical experiments with total numbers of analyzed cells equal to 465 (control) and 425 (double wounding experiment).

until they reach a maximum between approximately the seventh and the tenth rows (Figures 2(c)-2(d)). A strong linear correlation was found between NP and V (Figure 2(e)), a finding that reveals that both properties simultaneously increase with the distance traveled by the wave. This is consistent with the idea that the calcium oscillations and the wave propagation depend on enhanced IP3 production [39, 55]. A reinforcement of the IP3 signal along the intercellular

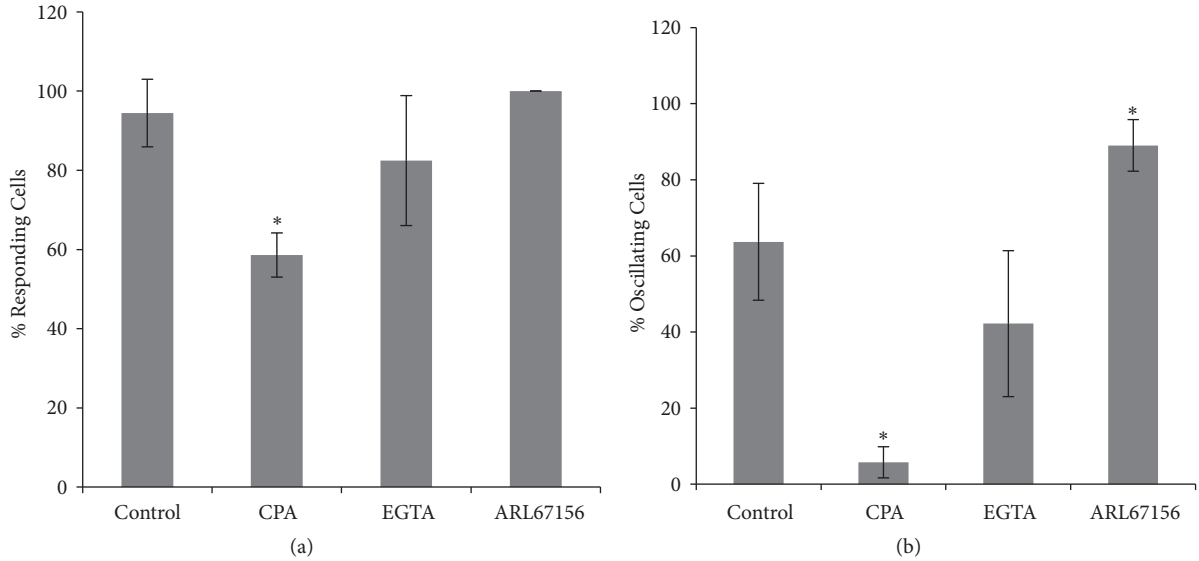


Figure 4: *Percentage of cells exhibiting calcium increase and calcium oscillations during the FCW under different experimental conditions*: (a) Percentage of cells displaying increased cytosolic calcium with respect to the total number of cells in the microscopic field. (b) Percentage of cells displaying calcium oscillations with respect to the total number of cells showing calcium increase. Data correspond to the cells between the 1st and the 15th rows. The asterisk (∗) indicates significant difference with respect to control ($p < 0.05$).

trajectory of the wave could underlie the increment in the number of peaks and in the wave velocity shown in Figures 2(c)-2(d). In the control experiments, about 94% of the cells exhibited cytosolic calcium increase (cf. Figure 4). Out of these, 64% showed oscillatory behavior.

Sammak and coworkers [11] demonstrated that a wound-triggered FCW is able to surpass a previously existing discontinuity in an epithelial monolayer. To evaluate if the signal that provokes calcium oscillations during the FCW is transmitted by the extracellular medium, we performed double-wounding experiments (see Materials and Methods; also Supplementary Material, movie 2). As shown in Figure 3(a), the second wound (new wound, NW) was made three to six rows of cells away from the first wound (old wound, OW), which has a width of three to five cell diameters. The second wounds were made slightly oblique to the first ones to allow that all the cell rows (as defined in Materials and Methods) are present in the image field. Figures 3(b)-3(c) shows that some of the parameter values of the calcium wave obtained for the second wound in the double-wounding experiments exhibit profiles similar to the controls. Interestingly, the oscillatory responses are also conserved, although with a somewhat different pattern to the control (Figure 3(d)). Similar results were obtained for the wave velocity (Figure 3(e)). The results shown in Figure 3 suggest that, for the case of BCE cells, the wound-induced calcium wave ultimately depends on an initial diffusive signal (e.g., ATP) and that this signal is per se capable to transmit information to produce calcium oscillations.

In previous work we showed that, in wounded BCE cells in culture, the FCW can be abolished by pretreating the cells with a combination of CPA, a reversible inhibitor of the sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase (SERCA), and EGTA, an extracellular calcium chelator [7, 16]. In order to further understand the roles of extracellular and intracellular calcium in the generation of the cellular calcium signals during the FCW, we analyzed the calcium dynamics in the presence of each one of these chemicals (Figures 4 and 5). Figure 4 shows the total percentage of cells that increase their cytosolic calcium and the percentage of calcium oscillating cells, and Figure 5 shows the differences in TFP, Amp, V, and NP between CPA and EGTA-treated monolayers with respect to control.

In Figure 4 it can be observed that approximately 59% of the cells of CPA-treated monolayers exhibited a calcium response, with about 10% of them showing oscillatory behavior (around 6% of the total number of cells). These values are significantly different with respect to control. As shown in Figure 5, the drug determines a decrease in the signal amplitude and number of peaks and velocity and provokes a delay in the onset of the first peak. From the 4th row on, all of these parameters become significantly different with respect to control. To be noted, the cells from the tenth row on become unresponsive to CPA treatment.

For the case of EGTA-treated monolayers, about 82% of the cells increased their cytosolic calcium in response to the wound (Figure 4). Out of these, 42% showed oscillatory behavior (34% of the total number of cells). No significant differences were found with respect to control. However, as shown in Figure 5, middle column, EGTA determines a significant reduction in the number of peaks from the 4th to the 11th rows, approximately, without changing the TFP, Amp and V. This is consistent with previous work performed in rat aortic endothelium in situ that suggests that oscillatory changes of calcium concentration during the FCW depend on extracellular calcium influx [56, 57].

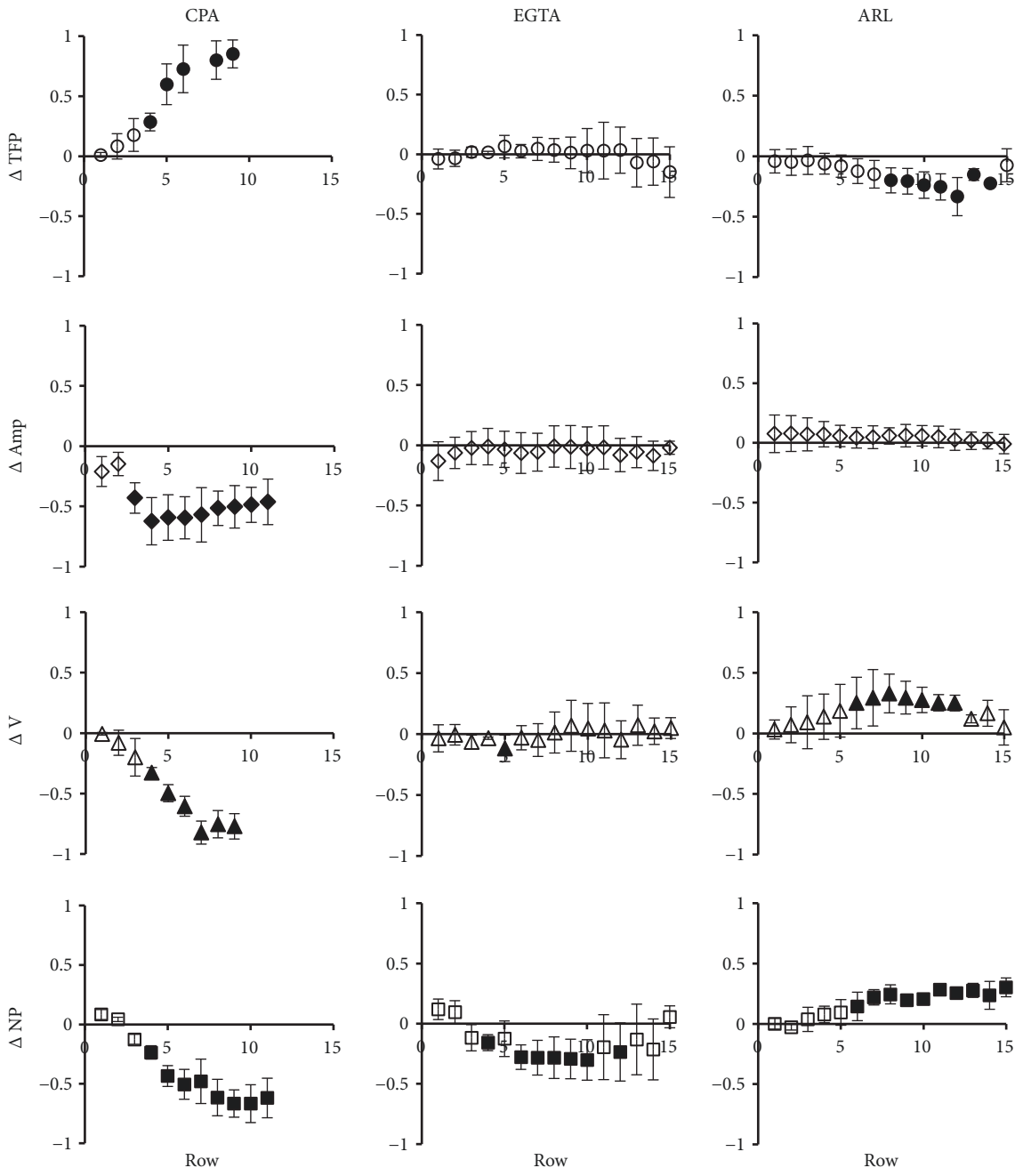


Figure 5: *Effect of CPA, EGTA, and ARL on the dynamic calcium responses.* The figure shows the effects of the Incorporation of 10 μM CPA (left column), 100 μM EGTA (middle column), or 50 μM ARL (right column) on TFP (○), Amp (◇), V (△), and NP (□). For these parameters, the plots display the average differences between the treatments and the corresponding controls (ΔTFP, ΔAmp, ΔV, and ΔNP) and their standard deviations (for each determination n = 3). Within each experiment all of the values were normalized with respect to the highest one. Filled symbols represent values with significant difference with respect to control ($p<0.05$). The average total number of analyzed cells was: 418 for CPA, 459 for EGTA, and 701 for ARL.

To further explore the possible molecular mechanisms involved in the calcium increase during the FCW we performed similar studies to Figure 5 but employing U73122, PPADS, and La^{3+} (Figure 6). As mentioned above, the results shown in Figures 3(c)–3(e) suggest that the IP3 signal could participate in the calcium increase during the FCW. Figure 6 shows that incorporation of U73122, an inhibitor of phospholipase C [58] and hence of IP3 production [59], indeed determined analogous effects to CPA on the characteristics of the FCW (see Figure 5). This suggests that as in other cell systems [14, 38, 39, 60], intercellular calcium propagation in the FCW depends, at least partially, on IP3 signaling.

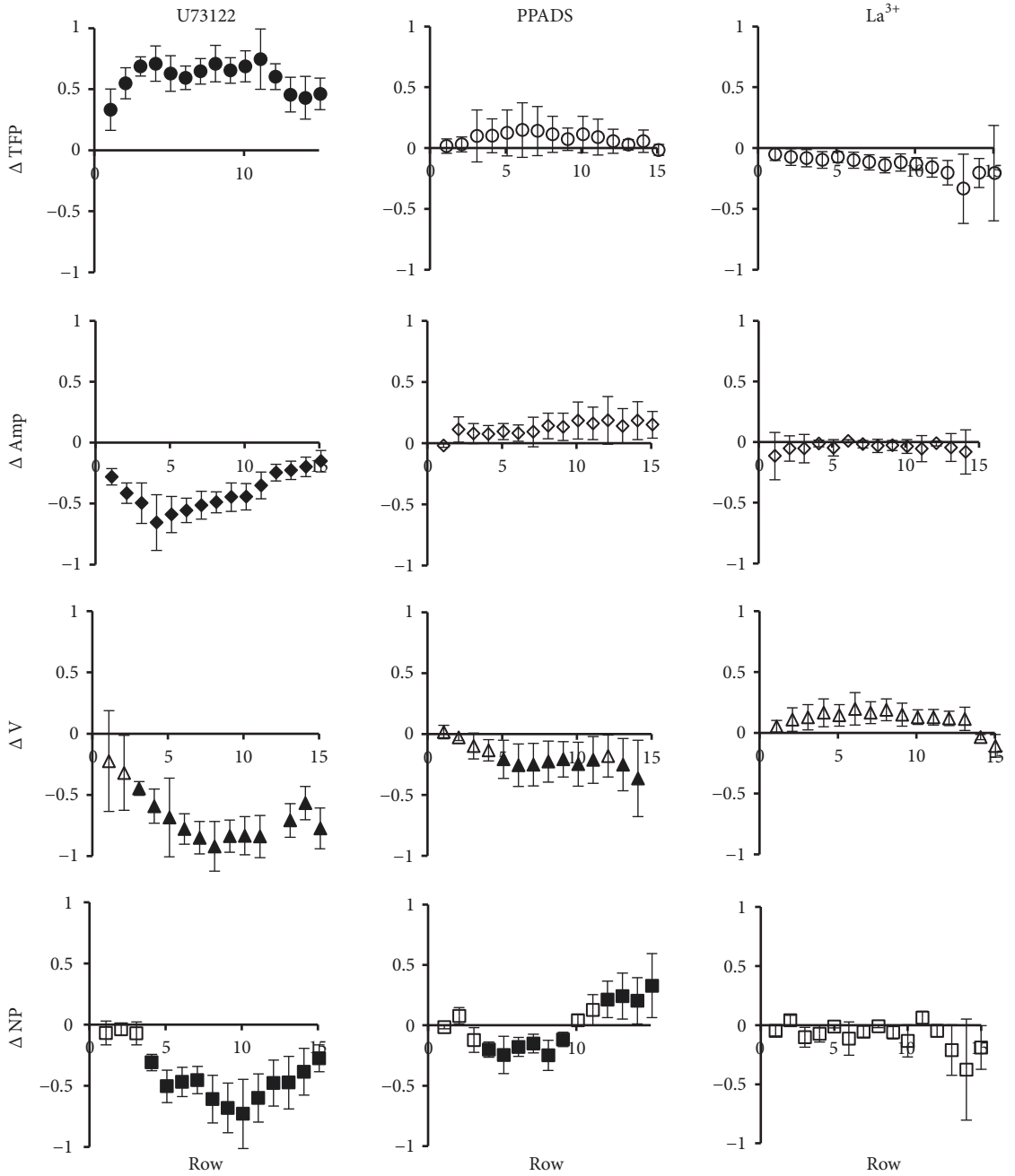


Figure 6: *Effect of U73122, PPADS and La^{3+} on the dynamic calcium responses.* Similar to Figure 5, but for experimental media containing 50 μM U73122, 10 μM PPADS, or 10 μM $LaCl_3$ (La^{3+}). The average total number of analyzed cells was 735 for U73122, 533 for PPADS, and 636 for $LaCl_3$.

The purinergic receptor antagonist PPADS was added at a concentration of 10 μM, far below the ones needed to produce ecto-ATPase inhibition [61]. As can be observed in Figure 6, the drug did not produce significant effects on TFP or Amp but did decrease the wave velocity and the number of peaks up to the tenth cell row. Since PPADS is particularly effective on $P2X_{1,2,3,5}$ [62] and $P2Y_{1,6,13}$ [63], these results suggest that one or more of these specific receptors could also be involved in the oscillatory response. An increase in the number of peaks of the calcium oscillations was observed beyond the tenth row, in principle an effect of complex interpretation, but that could find an explanation in relation with the decrease of ATP with distance. Finally, performance of the wounding experiments in the presence of 10 μM La^{3+}, an agent known to block Store Operated Calcium Entry (SOCE) with high sensitivity [64] and also connexin hemichannels [65] at higher concentrations, did not elicit modifications in the wave properties. Considering the lanthanum concentrations

employed in this study, our results suggest that SOCEs are not significantly involved in the calcium response of healing BCE cells.

In summary, Figure 5 reveals that CPA determined a decrease in the signal amplitude. In addition, both CPA and EGTA decreased NP, more evidently for the case of CPA. The latter drug also reduced the wave velocity (V). Taken together, the results shown in Figures 4 and 5 suggest a preeminent contribution of intracellular calcium stores in the generation of the FCW, similarly to that observed in other tissues [14, 66–68]. Regarding mechanisms, the main results shown in Figure 6 are that mediation of IP3 seems to participate in determining the characteristics and propagation of the FCW and that some specific purinergic receptors may also be involved.

3.2. ATP and Calcium Dynamics. Several works suggest that calcium waves during injury or mechanical stimulation propagate by diffusion of soluble factors released into extracellular medium or via cell to cell through gap junctions [37, 69]. In wing imaginal discs of *Drosophila* larvae, mechanically induced calcium waves depend on cellular prestress and occur via intercellular gap propagation of calcium-induced-calcium-increase signals [70]. As commented above, in many cells types, including corneal endothelial cells, ATP is released during injury and participates in the FCW propagation [22–24]. For the case of BCE cells, we have provided with evidence that the onset and propagation of the FCW depend on extracellular ATP [7], similarly to what was found for other wounded epithelia [14, 66]. In this work we studied the effect of ARL, a weak competitive inhibitor of ecto-ATPases [71], on the characteristics of the calcium response (Figures 4 and 5, right column; also Supplementary Material, movie 3). In uninjured monolayers, ARL has been shown to produce enhancement of the calcium wave propagation in mechanically stimulated BCE cells [72, 73] and increase in oscillatory behavior in MDCK cells [36]. In our system, incorporation of ARL also determined a decrease of TFP and hence an increase in the wave velocity (V). Also, the drug produced a significant increase in the number of peaks (NP) beyond the 5th row, to an extent that becomes larger with the row number, without significant modifications in the amplitude (Figure 5). As shown in Figure 4, in BCE monolayers treated with ARL, 100% of the cells in the field responded to the wound with a cytosolic calcium increase; out of them 92% presented oscillations with significant difference with respect of the control.

The above results are in agreement with the finding that the inhibitory effect of ARL on the ecto-ATPases is negligible at high ATP concentrations [71]. If, in our system, ATP is released mostly by the cells that died as a consequence of the injury and diffuses along the rest of the monolayer, a higher ATP concentration is expected at the border and immediately neighboring cells. Therefore, the effect of ARL on the cells of the first rows is expected to be very small and would become larger with increasing distance from the wound border. At intermediate ATP concentrations, ARL would be an effective inhibitor of the ecto-ATPases and determine a larger persistence of the ATP signal than the control experiments. Correspondingly, the maintained presence of ATP could be involved in the calcium oscillations. To further explore the plausibility of this hypothesis, we performed studies of the dependence of the number of calcium peaks with ATP (Figure 7) in experiments of ATP-induced calcium waves in uninjured BCE monolayers. As shown in Figure 7(a), we found that, in the interval 0–100 μM, the curve displays a maximum between 50 and 80 μM ATP and is asymmetric, with a lower absolute value for the slope at higher ATP concentrations. These results are consistent with the hypothesis posed above and with evidence regarding the role of ATP in the generation of the calcium oscillations [36, 46–49, 52]. At higher, nonphysiological, ATP concentrations (i.e., 100 to 1000 μM) an increase in the frequency of calcium oscillations can also be observed, yielding an overall bimodal response. A possible interpretation of this latter finding could be that such high ATP concentrations could produce complete saturation of the ecto-ATPases, thus determining a situation analogous to the incorporation of ARL. Figure 7(b) shows single cell recordings of calcium dynamics in the presence of different ATP concentrations, for the cases of cells representative of the average behaviors at the corresponding ATP concentrations. Also, the figure includes a representative example of cellular calcium dynamics in the presence of 100 μM ARL.

3.3. Role of Calcium Oscillations in Apoptosis of Healing BCE Cells. To assess the role of calcium oscillations, ATP scavengers, such as apyrase, have been employed [36]. This approach was not feasible in our case, since apyrase produces an overall abolition of the calcium wave [7]. In the preceding sections we showed that the main effects of EGTA and ARL on the healing BCE cells are to decrease and increase the number of peaks, respectively, without significantly affecting the wave amplitude (Figure 5). For these reasons, we employed ARL and EGTA to provoke modifications in the calcium oscillations and to study their effects on the apoptotic rates of healing BCE cells. CPA was not considered for this study since, although it effectively decreased the number of peaks exhibited by oscillatory cells, it also significantly affected all of the other parameters (Figure 5).

In previous work we showed that, during wound healing, BCE monolayers exhibit a high apoptotic rate of the front cells and that this apoptotic response takes place in two well-defined stages [7]. The first stage reaches its maximum at two hours of healing, while the second one starts at about eight hours after the injury and increases linearly with the migrated distance. Hence, for this work we studied the effect of ARL and EGTA on the apoptotic rate at times characteristic of each stage, 2 and 20 hours after wounding. Figure 8 reveals that while EGTA determines a great increase in the apoptotic index of the first stage, ARL provokes a significant reduction (Figure 8(b)). Neither drug affects the apoptotic rate of the second stage (Figure 8(c)).

Although as shown (Figure 5, right column) ARL also decreases the TFP and hence increases the velocity of propagation of the wave, we interpreted its effects on apoptosis as a result of the increase in calcium oscillations, in view

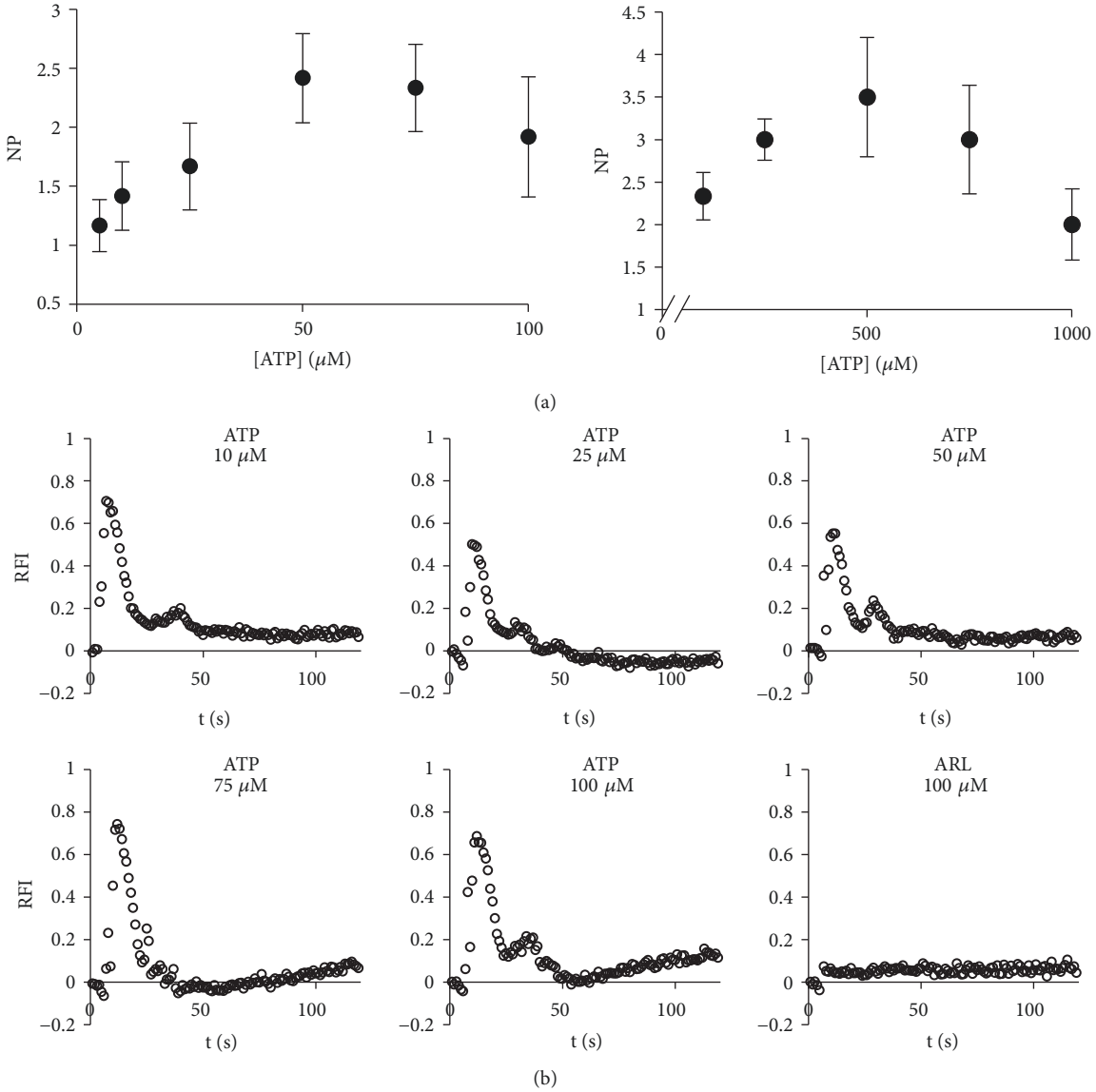


Figure 7: *Oscillatory behavior of cytosolic calcium concentration in uninjured BCE monolayers treated with ATP*. The figure shows the average NP determined for BCE monolayers in the presence of different ATP concentrations (n=3) and single cell recordings of calcium dynamics for the cases of cells representative of the average behaviors at the corresponding ATP concentrations. Also, the figure includes a representative result of calcium dynamics in the presence of 100 μM ARL-67156.

of previous evidence reported for uninjured tissues [44, 45]. To obtain further support for this hypothesis, we performed experiments of wound healing in conditions of complete FCW inhibition (i.e., employing a combination of CPA and EGTA, see Materials and Methods), in order to maintain the first stage of apoptosis and to exclude the influence of the calcium signals. In these experiments, 30 min before the wound, just before the CPA incubation, we preincubated the cells with 10 to 100 μM ATP for 2 min. In this way we were able to induce ATP-dependent calcium responses characterized by different numbers of peaks, in the absence of wound-dependent calcium waves that would propagate at a certain velocity. Figure 8(d) shows the apoptotic indexes relative to controls (RAI), as functions of the exogenous ATP concentration, obtained 2 h after wounding (i.e., first stage of apoptosis). Under these conditions, RAI decreases with the ATP concentration to a minimum of approximately 75 μM, a value in the range of the ATP concentrations that induce the maximum number of peaks (cf. Figure 7). The results shown in Figure 8 suggest that ATP-induced calcium oscillations during the FCW could participate in the modulation of the apoptotic response of healing BCE cells during the first stage of apoptosis.

4. Discussion

In response to a mechanical injury, confluent cultures of bovine corneal endothelial cells develop a calcium wave

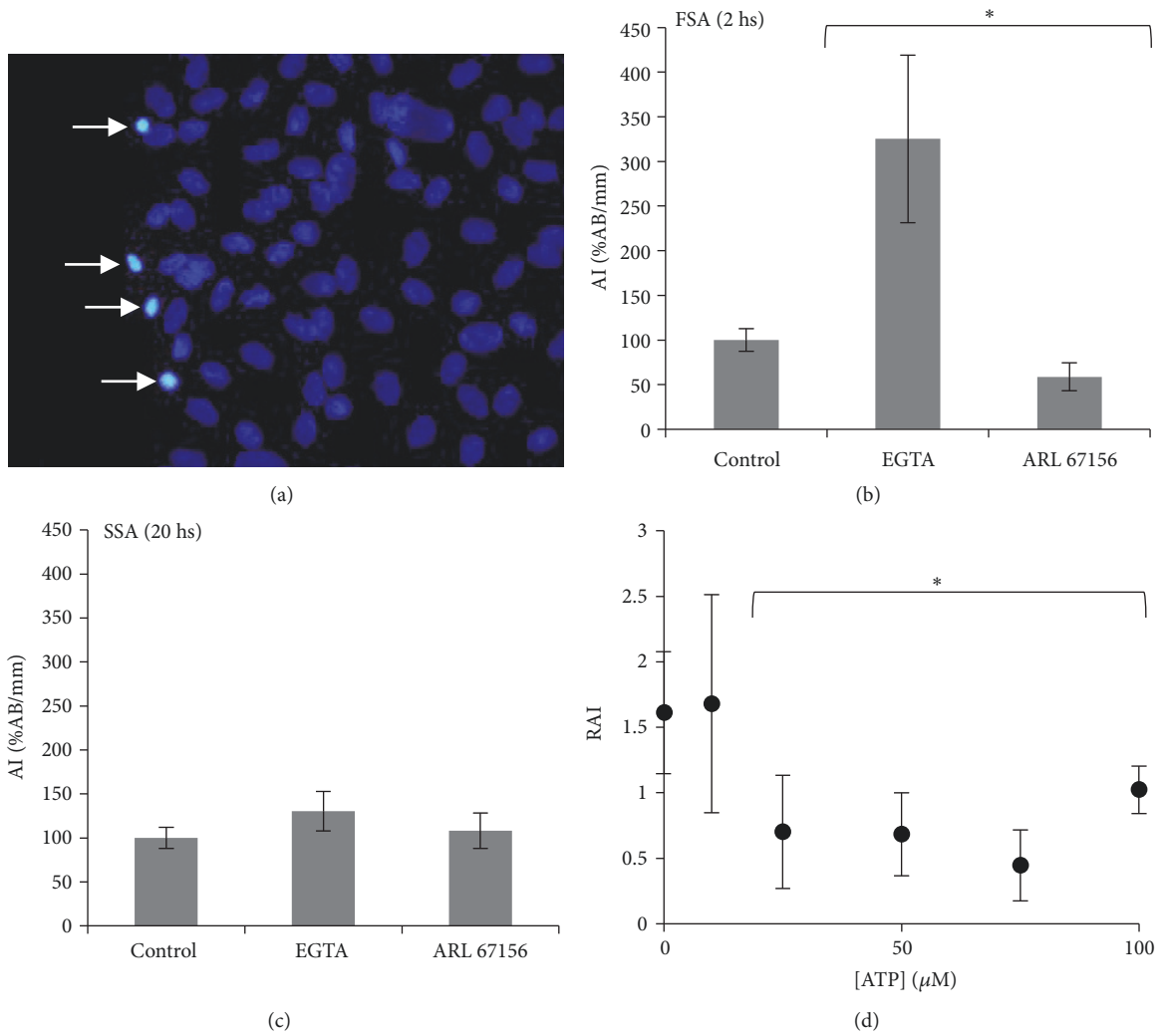


Figure 8: *Effect of EGTA, ARL, and ATP on the apoptotic response during wound healing.* (a) A Hoechst-stained micrograph of a wounded BCE monolayer after 8 hours of healing. The arrows indicate apoptotic bodies at the wound border revealed by intense staining due to nuclei compaction. (b) 2 h after wounding, during the first stage of apoptosis (FSA), incorporation of EGTA determined an approximately 200% increase in the apoptotic index AI (defined as the number of apoptotic bodies AB per millimeter of wound edge, AB/mm). On the contrary, ARL produced a decrease of about 50%. (c) 20 h after wounding, during the second stage of apoptosis (SSA), none of the treatments provoked a significant effect. (d) BCE monolayers were incubated with different ATP concentrations and treated with CPA and EGTA to completely abolish the FCW (see Materials and methods for details). RAI is the corresponding apoptotic index relative to control. The asterisk (∗) indicates significant difference with respect to control ($p < 0.05$).

that propagates from the wound border to the rest of the monolayer and lasts for 3 to 5 min. During this wave, some cells exhibit oscillations in cytosolic calcium. The objectives of this work have been to characterize the cell calcium dynamics during the FCW and to explore the possible role of the calcium oscillations in the healing process. At least for the case of BCE cells, it is methodologically very difficult to specifically modify calcium oscillations without affecting other properties of the overall calcium wave. Ideally, the most conclusive way to study the effect of calcium oscillations would be to completely inhibit them without affecting the other properties of the FCW. ATP scavengers, such as apyrase, or the SERCA inhibitor CPA, decrease calcium oscillations but also the amplitude of the calcium signal [36]. In particular, in wounded BCE monolayers incorporation of apyrase almost completely abolishes the calcium response [7]. We have instead utilized EGTA, an extracellular calcium chelator that in BCE cells significantly decreases calcium oscillations, and ARL, a competitive inhibitor of ecto-ATPases, that determines significant increases in the oscillatory response and also affects the wave velocity. The two drugs do not affect other wave properties.

In the first part of this work we made a characterization of the cellular calcium response during the FCW and the basic mechanisms involved. In particular, this characterization allowed us to select the appropriate drugs to modify calcium

oscillations and study the effects on the apoptotic responses of healing BCE monolayers. For this, our approach consisted in a thorough study of the calcium dynamics of each cell in the microscopic field during the FCW and a classification of the cells in consecutive rows starting from the wound border. The results were represented as the average of the cellular responses per row as functions of the row number. The double-wounding experiments showed that the wave maintains its general characteristics beyond a preexisting gap, suggesting that in BCE cells an extracellular diffusive signal constitutes the main mechanism for its propagation, possibly in a "Release and Diffusion" manner [68]. A large amount of evidence suggests that, in most cell types [13, 14, 23, 68, 74], including BCE cells [7], ATP released from damaged and stressed cells at the wound borders represents the main contributor to this diffusive signal. In addition, evidence from this work showed that in BCE cells calcium from intracellular stores represents a major source for the cytosolic calcium rise during the FCW. Our results also suggest that similarly to other systems, IP3 participates in the propagation of the calcium wave and in the generation of calcium oscillations.

In this work we show that, in monolayers of BCE cells in culture, wounds performed in calcium-free solutions with EGTA elicit an FCW with a significant decrease in the number of calcium peaks, without affecting other parameters of the wave. This finding is consistent with work on endothelium of rat aorta in situ that suggests that the oscillatory behavior of the cells is determined by extracellular calcium influx [56]. The authors also obtained results suggesting that during the FCW the connexin hemichannels are opened, provoking an inward sodium current that induces the reverse mode of operation of the sodium-calcium exchanger, with the consequent calcium influx responsible for the oscillations [57]. Our results do not show evidence of intracellular sodium changes during the FCW (data not shown), suggesting that in BCE cells the mechanism of extracellular calcium entry is different. Taking into account that the purinergic receptors P2X are nonselective cation-conducting channels or are associated with hemichannels in a modulatory way [75, 76], it is possible that in BCE cells the oscillatory behavior during the FCW at least partially depends on the activation of P2X receptors that ultimately allow extracellular calcium influx in a sodium-independent way. This view is consistent with our results concerning the participation of ATP in the calcium responses [7] and with those obtained in this study from employment of PPADS, a blocker of purinergic receptors that suggest that the response could involve receptors $P2X_{1,2,3,5}$ and $P2Y_{1,6,13}$. We did not obtain evidence that other sources of calcium, such as those mediated by SOCEs, could contribute to the generation of the calcium wave in healing BCE cells. In our system, EGTA would decrease calcium oscillations by approximately setting extracellular free calcium concentration to zero and thus preventing calcium influx. As shown in this study, EGTA determined a large increase in the apoptotic index of the first stage of apoptosis, without affecting the apoptotic response during the second stage.

Contrary to EGTA, the most important effect of ARL on the healing process of BCE monolayers was to produce a significant decrease (i.e., to about half the control value) in the apoptotic index of the first stage of apoptosis, also without affecting the second apoptotic stage. We have interpreted the ultimate effect of ARL on apoptosis as due to the maintenance of moderately risen ATP levels during the FCW. ARL has been found to inhibit ecto-ATPase-dependent induction of neutrophil apoptosis by T_{REG} lymphocytes [77]. We are proposing here that the drug affects apoptosis via the enhancement of cytosolic calcium oscillations during the FCW. In uninjured tissues, calcium oscillations have been reported to determine antiapoptotic responses. Thus, in T-lymphocytes, stimulus-induced calcium oscillations promote cell survival and proliferation via a mechanism that involves the transcription factor NFAT and increased expression of IL-2 [45, 78]. In mouse oocytes, oscillations in cytosolic calcium determine survival or apoptotic responses, depending on the oocyte age [43, 44]. In COS-7 cells, the antiapoptotic protein Bcl-2 has been reported to enhance IP3R-mediated calcium oscillations and thus promote cell survival [79].

In this study, the effects of ARL and EGTA on the apoptotic rate of the first stage of apoptosis have been therefore interpreted on the basis of their effects on different properties of the dynamics of the cellular calcium increase during the FCW. We have observed that neither drug significantly modifies the total percentage of cells that exhibit increased calcium. In addition, incorporation of EGTA does not provoke changes on the percentage of cells displaying oscillatory behavior. However, the results are suggestive that EGTA could participate in the apoptotic response via a decrease in the calcium oscillatory frequency, while ARL would have the opposite effect on apoptosis by increasing that frequency. For the case of ARL it cannot be excluded the possibility that the drug could also participate by increasing the percentage of cells displaying calcium oscillations during the FCW.

5. Conclusions

The results of this work show that during the FCW triggered by a mechanical injury of BCE monolayers many cells exhibit oscillatory behavior in response, at least partially, to a diffusive signal, possibly ATP. Manipulation of this behavior with EGTA and ARL shows that the drugs have opposite effects on the oscillatory responses and on the apoptotic index of the first stage of apoptosis. Hence, the results presented here suggest a possible role for the calcium oscillations exhibited by BCE cells in culture during the healing response to mechanical injury, namely, to modulate the apoptotic response of the first stage of apoptosis. Since both stages are caspase-dependent [7], similar basic pathways could a priori be expected to trigger the apoptotic response. The fact that, during wound healing of BCE cells, only the first stage of apoptosis is affected by EGTA and ARL is therefore noteworthy and suggests that the two stages are at least partially subject to independent regulation.

Abbreviations

AB: Apoptotic bodies
AI: Apoptotic index

Amp: Amplitude of the first peak
ARL: ARL 67156
BCE: Bovine corneal endothelial
CPA: Cyclopiazonic acid
CS: Control solution
FCW: Fast calcium wave
FSA: First stage of apoptosis
NP: Number of identifiable peaks
NW: New wound
OW: Old wound
PPADS: Pyridoxalphosphate-6-azophenyl-2′,4′-disulphonic acid
SSA: Second stage of apoptosis
TFP: Time to reach the first peak after injury
V: Calcium wave velocity.

Data Availability

The data used to support the findings of this study are available from the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Acknowledgments

The authors thank Frigorífico Las Piedras and Frigorífico Lorsinal S.A., Uruguay, for supplying them with fresh bovine eyes. This work was supported by Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC), Universidad de la República, Uruguay (Proyecto Grupos I+D 2014), to Silvia Chifflet and Doctoral Fellowships to Cristian Justet, and Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA), Uruguay (to Silvia Chifflet and Julio A. Hernandez).

Supplementary Materials

Movie 1: FCW in control conditions, 1 frame per second, duration 2 min. Movie 2: FCW in double wounding experiments, 1 frame per second, duration 2 min. Movie 3: Effect of ARL on FCW, 1 frame per second, duration 2 min. *(Supplementary Materials)*

References

[1] R. Farooqui and G. Fenteany, "Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement," *Journal of Cell Science*, vol. 118, no. 1, pp. 51–63, 2005.

[2] D. A. Chapnick and X. Liu, "Leader cell positioning drives wound-directed collective migration in TGFβ-stimulated epithelial sheets," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 25, no. 10, pp. 1586–1593, 2014.

[3] B. M. Bleaken, A. S. Menko, and J. L. Walker, "Cells activated for wound repair have the potential to direct collective invasion of an epithelium," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 27, no. 3, pp. 451–465, 2016.

[4] M. T. Abreu-Blanco, J. J. Watts, J. M. Verboon, and S. M. Parkhurst, "Cytoskeleton responses in wound repair," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 69, no. 15, pp. 2469–2483, 2012.

[5] S. Begnaud, T. Chen, D. Delacour, R. M. Mege, and B. Ladoux, "Mechanics of epithelial tissues during gap closure," *Current Opinion in Cell Biology*, vol. 42, pp. 52–62, 2016.

[6] P. O. Tran, Q. H. Tran, L. E. Hinman, and P. J. Sammak, "Co-ordination between localized wound-induced Ca2+ signals and pre-wound serum signals is required for proliferation after mechanical injury," *Cell Proliferation*, vol. 31, no. 3-4, pp. 155–170, 1998.

[7] C. Justet, J. A. Hernandez, A. Torriglia, and S. Chifflet, "Fast calcium wave inhibits excessive apoptosis during epithelial wound healing," *Cell and Tissue Research*, vol. 365, pp. 343–356, 2016.

[8] F. Li, Q. Huang, J. Chen et al., "Apoptotic cells activate the 'phoenix rising' pathway to promote wound healing and tissue regeneration," *Science Signaling*, vol. 3, no. 110, article ra13, 2010.

[9] J. Q. Tan, H. H. Zhang, Z. J. Lei et al., "The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats," *Burns*, vol. 39, no. 8, pp. 1551–1556, 2013.

[10] A. Johnson, M. Francis, and L. A. DiPietro, "Differential apoptosis in mucosal and dermal wound healing," *Advances in Wound Care*, vol. 3, no. 12, pp. 751–761, 2014.

[11] P. J. Sammak, L. E. Hinman, P. O. T. Tran, M. D. Sjaastad, and T. E. Machen, "How do injured cells communicate with the surviving cell monolayer?" *Journal of Cell Science*, vol. 110, part 4, pp. 465–475, 1997.

[12] P. O. Tran, L. E. Hinman, G. M. Unger, and P. J. Sammak, "A wound-induced [Ca2+]i increase and its transcriptional activation of immediate early genes is important in the regulation of motility," *Experimental Cell Research*, vol. 246, no. 2, pp. 319–326, 1999.

[13] V. E. Klepeis, A. Cornell-Bell, and V. Trinkaus-Randall, "Growth factors but not gap junctions play a role in injury-induced Ca2+ waves in epithelial cells," *Journal of Cell Science*, vol. 114, no. 23, pp. 4185–4195, 2001.

[14] S. Shabir and J. Southgate, "Calcium signalling in wound-responsive normal human urothelial cell monolayers," *Cell Calcium*, vol. 44, no. 5, pp. 453–464, 2008.

[15] J. Milara, M. Mata, A. Serrano, T. Peiro, E. J. Morcillo, and J. Cortijo, "Extracellular calcium-sensing receptor mediates human bronchial epithelial wound repair," *Biochemical Pharmacology*, vol. 80, no. 2, pp. 236–246, 2010.

[16] S. Chifflet, C. Justet, J. A. Hernandez, V. Nin, C. Escande, and J. C. Benech, "Early and late calcium waves during wound healing in corneal endothelial cells," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 20, no. 1, pp. 28–37, 2012.

[17] P. Niethammer, C. Grabher, A. T. Look, and T. J. Mitchison, "A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish," *Nature*, vol. 459, no. 7249, pp. 996–999, 2009.

[18] W. Razzell, I. R. Evans, P. Martin, and W. Wood, "Calcium flashes orchestrate the wound inflammatory response through duox activation and hydrogen peroxide release," *Current Biology*, vol. 23, no. 5, pp. 424–429, 2013.

[19] Y. Matsubayashi, M. Ebisuya, S. Honjoh, and E. Nishida, "ERK activation propagates in epithelial cell sheets and regulates their migration during wound healing," *Current Biology*, vol. 14, no. 8, pp. 731–735, 2004.

[20] Y. J. Sung, Z. Sung, C.-L. Ho et al., "Intercellular calcium waves mediate preferential cell growth toward the wound edge in polarized hepatic cells," *Experimental Cell Research*, vol. 287, no. 2, pp. 209–218, 2003.

[21] S. Restrepo and K. Basler, "Drosophila wing imaginal discs respond to mechanical injury via slow InsP3R-mediated intercellular calcium waves," *Nature Communications*, vol. 7, article 12450, 2016.

[22] J. V. Cordeiro and A. Jacinto, "The role of transcription-independent damage signals in the initiation of epithelial wound healing," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 14, no. 4, pp. 249–262, 2013.

[23] H. Takada, K. Furuya, and M. Sokabe, "Mechanosensitive ATP release from hemichannels and Ca(2)(+) influx through TRPC6 accelerate wound closure in keratinocytes," *Journal of Cell Science*, vol. 127, no. 19, pp. 4159–4171, 2014.

[24] B. Enyedi and P. Niethammer, "Mechanisms of epithelial wound detection," *Trends in Cell Biology*, vol. 25, no. 7, pp. 398–407, 2015.

[25] M. J. Berridge, P. Lipp, and M. D. Bootman, "The versatility and universality of calcium signalling," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 1, no. 1, pp. 11–21, 2000.

[26] M. Brini, D. Ottolini, T. Cali, and E. Carafoli, "Calcium in health and disease," *Metal Ions in Life Sciences*, vol. 13, pp. 81–137, 2013.

[27] T. Capiod, "Extracellular calcium has multiple targets to control cell proliferation," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 898, pp. 133–156, 2016.

[28] C. Dubois, N. Prevarskaya, and F. Vanden Abeele, "The calcium-signaling toolkit: Updates needed," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1863, no. 6, pp. 1337–1343, 2016.

[29] G. Dupont and L. Combettes, "Fine tuning of cytosolic Ca2+ oscillations," *F1000Research*, vol. 5, 2016.

[30] S. Schuster, M. Marhl, and T. Höfer, "Modelling of simple and complex calcium oscillations from single-cell responses to intercellular signalling," *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, no. 5, pp. 1333–1355, 2002.

[31] G. Giannone, P. Ronde, M. Gaire, J. Haiech, and K. Takeda, "Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 277, no. 29, pp. 26364–26371, 2002.

[32] G. J. Block, G. D. DiMattia, and D. J. Prockop, "Stanniocalcin-1 regulates extracellular ATP-induced calcium waves in human epithelial cancer cells by stimulating ATP release from bystander cells," *PLoS ONE*, vol. 5, article e10237, 2010.

[33] P. A. Appleby, S. Shabir, J. Southgate, and D. Walker, "Sources of variability in cytosolic calcium transients triggered by stimulation of homogeneous uro-epithelial cell monolayers," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 12, no. 105, Article ID 20141403, 2015.

[34] J. Lembong, B. Sabass, and H. A. Stone, "Calcium oscillations in wounded fibroblast monolayers are spatially regulated through substrate mechanics," *Physical Biology*, vol. 14, no. 4, 2017, https://doi.org/10.1088/1478-3975/aa6b67.

[35] P. Gomes, S. P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens, "ATP-dependent paracrine intercellular communication in cultured bovine corneal endothelial cells," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 46, no. 1, pp. 104–113, 2005.

[36] C. S. Geyti, E. Odgaard, M. T. Overgaard, M. E. Jensen, J. Leipziger, and H. A. Praetorius, "Slow spontaneous [Ca2+] i oscillations reflect nucleotide release from renal epithelia," *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*, vol. 455, no. 6, pp. 1105–1117, 2008.

[37] C. D'Hondt, B. Himpens, and G. Bultynck, "Mechanical stimulation-induced calcium wave propagation in cell monolayers: the example of bovine corneal endothelial cells," *Journal of visualized experiments*, no. 77, article e50443, 2013.

[38] C. Narciso, Q. Wu, P. Brodskiy et al., "Patterning of wound-induced intercellular Ca(2+) flashes in a developing epithelium," *Physical Biology*, vol. 12, no. 5, pp. 056005-056005, 2015.

[39] R. Balaji, C. Bielmeier, H. Harz et al., "Calcium spikes, waves and oscillations in a large, patterned epithelial tissue," *Scientific Reports*, vol. 7, article 42786, 2017.

[40] R. E. Dolmetsch, K. Xu, and R. S. Lewis, "Calcium oscillations increase the efficiency and specificity of gene expression," *Nature*, vol. 392, no. 6679, pp. 933–936, 1998.

[41] P. Uhlen and N. Fritz, "Biochemistry of calcium oscillations," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 396, no. 1, pp. 28–32, 2010.

[42] E. Smedler and P. Uhlen, "Frequency decoding of calcium oscillations," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1840, no. 3, pp. 964–969, 2014.

[43] K. S. Cuthbertson and P. H. Cobbold, "Phorbol ester and sperm activate mouse oocytes by inducing sustained oscillations in cell Ca2+," *Nature*, vol. 316, no. 6028, pp. 541-542, 1985.

[44] A. C. Gordo, P. Rodrigues, M. Kurokawa et al., "Intracellular calcium oscillations signal apoptosis rather than activation in in vitro aged mouse eggs," *Biology of Reproduction*, vol. 66, no. 6, pp. 1828–1837, 2002.

[45] M. W. Harr and C. W. Distelhorst, "Apoptosis and autophagy: decoding calcium signals that mediate life or death," *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, vol. 2, no. 10, article a005579, 2010.

[46] M. Tomic, R. M. Jobin, L. A. Vergara, and S. S. Stojilkovic, "Expression of purinergic receptor channels and their role in calcium signaling and hormone release in pituitary gonadotrophs: integration of P2 channels in plasma membrane- and endoplasmic reticulum-derived calcium oscillations," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 271, no. 35, pp. 21200–21208, 1996.

[47] B. H. Bay, "Extracellular ATP induces cytosolic calcium oscillations associated with an increase in intracellular pH in human Chang liver cells," *Cellular and Molecular Biology (Noisy-le-grand)*, vol. 43, no. 4, pp. 521–528, 1997.

[48] P. J. Hanley, B. Musset, V. Renigunta et al., "Extracellular ATP induces oscillations of intracellular Ca2+ and membrane potential and promotes transcription of IL-6 in macrophages," *Proceedings of the National Acadamy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 25, pp. 9479–9484, 2004.

[49] C. C. Hegg, M. Irwin, and M. T. Lucero, "Calcium store-mediated signaling in sustentacular cells of the mouse olfactory epithelium," *Glia*, vol. 57, no. 6, pp. 634–644, 2009.

[50] Y. Tang, Y. Yin, L. Miao, B. Wei, K. Zhai, and G. Ji, "Nitric oxide enhances extracellular ATP induced Ca(2)(+) oscillation in HeLa cells," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 565, pp. 68–75, 2015.

[51] G. D. Potter, T. A. Byrd, A. Mugler, and B. Sun, "Communication shapes sensory response in multicellular networks," *Proceedings of the National Acadamy of Sciences of the United States of America*, vol. 113, no. 37, pp. 10334–10339, 2016.

[52] A. E. Palmer, C. Jin, J. C. Reed, and R. Y. Tsien, "Bcl-2-mediated alterations in endoplasmic reticulum Ca2+ analyzed with an improved genetically encoded fluorescent sensor," *Proceedings of the National Acadamy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 50, pp. 17404–17409, 2004.

[53] S. Chifflet, J. A. Hernandez, S. Grasso, and A. Cirillo, "Nonspecific depolarization of the plasma membrane potential induces cytoskeletal modifications of bovine corneal endothelial cells in culture," *Experimental Cell Research*, vol. 282, no. 1, pp. 1–13, 2003.

[54] S. Grasso, J. A. Hernandez, and S. Chifflet, "Roles of wound geometry, wound size, and extracellular matrix in the healing response of bovine corneal endothelial cells in culture," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 293, no. 4, pp. C1327–C1337, 2007.

[55] M. J. Berridge, "Inositol trisphosphate and calcium oscillations," *Biochemical Society Symposium*, vol. 74, pp. 1–7, 2007.

[56] R. Berra-Romani, A. Raqeeb, J. E. Avelino-Cruz et al., "Ca^{2+} signaling in injured in situ endothelium of rat aorta," *Cell Calcium*, vol. 44, no. 3, pp. 298–309, 2008.

[57] R. Berra-Romani, A. Raqeeb, J. Torres-Jacome et al., "The mechanism of injury-induced intracellular calcium concentration oscillations in the endothelium of excised rat aorta," *Journal of Vascular Research*, vol. 49, no. 1, pp. 65–76, 2012.

[58] J. E. Bleasdale and S. K. Fisher, "Use of U-73122 as an inhibitor of phospholipase C-dependent processes," *Neuroprotocols*, vol. 3, no. 2, pp. 125–133, 1993.

[59] A. M. Rossi, S. C. Tovey, T. Rahman, D. L. Prole, and C. W. Taylor, "Analysis of IP3 receptors in and out of cells," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1820, no. 8, pp. 1214–1227, 2012.

[60] L. Leybaert and M. J. Sanderson, "Intercellular Ca(2+) waves: mechanisms and function," *Physiological Reviews*, vol. 92, no. 3, pp. 1359–1392, 2012.

[61] G. G. Yegutkin and G. Burnstock, "Inhibitory effects of some purinergic agents on ecto-ATPase activity and pattern of stepwise ATP hydrolysis in rat liver plasma membranes," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1466, no. 1-2, pp. 234–244, 2000.

[62] C. Coddou, Z. Yan, T. Obsil, J. P. Huidobro-Toro, and S. S. Stojilkovic, "Activation and regulation of purinergic P2X receptor channels," *Pharmacological Reviews*, vol. 63, no. 3, pp. 641–683, 2011.

[63] I. von Kugelgen and K. Hoffmann, "Pharmacology and structure of P2Y receptors," *Neuropharmacology*, vol. 104, pp. 50–61, 2016.

[64] C. Tian, L. Du, Y. Zhou, and M. Li, "Store-operated CRAC channel inhibitors: Opportunities and challenges," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 8, no. 7, pp. 817–832, 2016.

[65] J. C. Sáez and L. Leybaert, "Hunting for connexin hemichannels," *FEBS Letters*, vol. 588, no. 8, pp. 1205–1211, 2014.

[66] V. E. Klepeis, I. Weinger, E. Kaczmarek, and V. Trinkaus-Randall, "P2Y receptors play a critical role in epithelial cell communication and migration," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 93, no. 6, pp. 1115–1133, 2004.

[67] L. J. Leiper, P. Walczysko, R. Kucerova et al., "The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6+/- mouse model of epithelial wound-healing delay," *BMC Biology*, vol. 4, article 27, 2006.

[68] L. N. Handly and R. Wollman, "Wound-induced Ca2+ wave propagates through a simple release and diffusion mechanism," *Molecular Biology of the Cell*, vol. 28, no. 11, 2017.

[69] E. K. Shannon, A. Stevens, W. Edrington et al., "Multiple mechanisms drive calcium signal dynamics around laser-induced epithelial wounds," *Biophysical Journal*, vol. 113, no. 7, pp. 1623–1635, 2017.

[70] C. E. Narciso, N. M. Contento, T. J. Storey, D. J. Hoelzle, and J. J. Zartman, "Release of applied mechanical loading stimulates intercellular calcium waves in drosophila wing discs," *Biophysical Journal*, vol. 113, no. 2, pp. 491–501, 2017.

[71] S. A. Levesque, E. G. Lavoie, J. Lecka, F. Bigonnesse, and J. Sevigny, "Specificity of the ecto-ATPase inhibitor ARL 67156 on human and mouse ectonucleotidases," *British Journal of Pharmacology*, vol. 152, no. 1, pp. 141–150, 2007.

[72] P. Gomes, S. P. Srinivas, W. Van Driessche, J. Vereecke, and B. Himpens, "ATP release through connexin hemichannels in corneal endothelial cells," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 46, no. 4, pp. 1208–1218, 2005.

[73] C. D'Hondt, R. Ponsaerts, S. P. Srinivas, J. Vereecke, and B. Himpens, "Thrombin inhibits intercellular calcium wave propagation in corneal endothelial cells by modulation of hemichannels and gap junctions," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 48, no. 1, pp. 120–133, 2007.

[74] S. Shabir, W. Cross, L. A. Kirkwood et al., "Functional expression of purinergic P2 receptors and transient receptor potential channels by the human urothelium," *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, vol. 305, no. 3, pp. F396–F406, 2013.

[75] A. Baroja-Mazo, M. Barbera-Cremades, and P. Pelegrin, "The participation of plasma membrane hemichannels to purinergic signaling," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1828, no. 1, pp. 79–93, 2013.

[76] D. S. Samways, Z. Li, and T. M. Egan, "Principles and properties of ion flow in P2X receptors," *Frontiers in Cellular Neuroscience*, vol. 8, article 6, 2014.

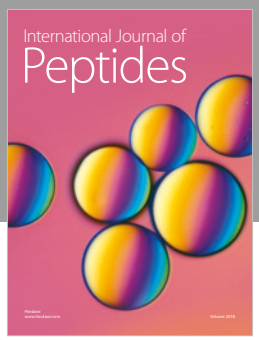
[77] S. Fabbiano, M. Menacho-Marquez, J. Robles-Valero et al., "Immunosuppression-independent role of regulatory T cells against hypertension-driven renal dysfunctions," *Molecular and Cellular Biology*, vol. 35, no. 20, pp. 3528–3546, 2015.

[78] C. Randriamampita and A. Trautmann, "Ca2+ signals and T lymphocytes 'New mechanisms and functions in Ca2+ signalling'," *Biology of the Cell*, vol. 96, no. 1, pp. 69–78, 2004.

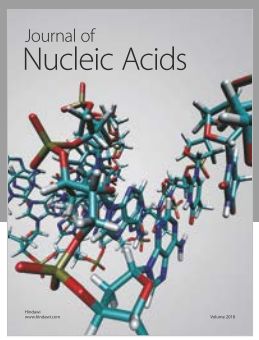
[79] E. F. Eckenrode, J. Yang, G. V. Velmurugan, J. K. Foskett, and C. White, "Apoptosis protection by Mcl-1 and Bcl-2 modulation of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-dependent Ca(2+) signaling," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, no. 18, pp. 13678–13684, 2010.

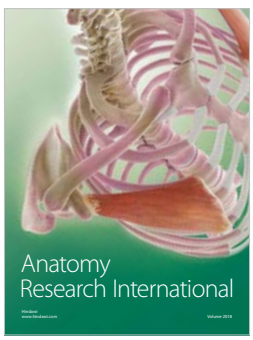




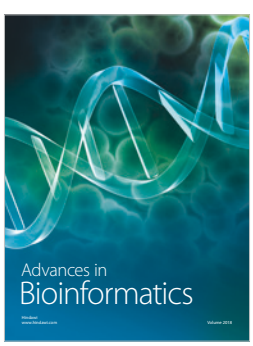


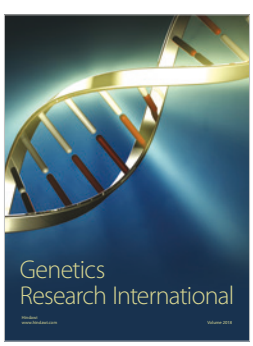




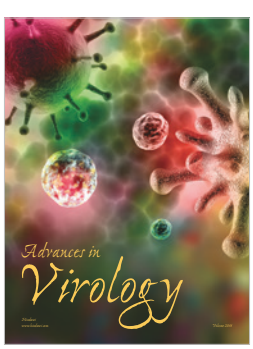


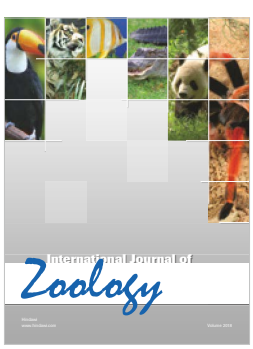


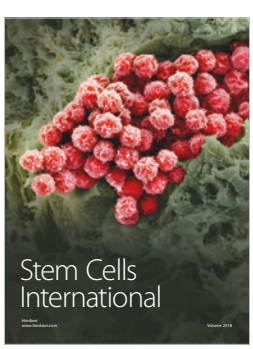




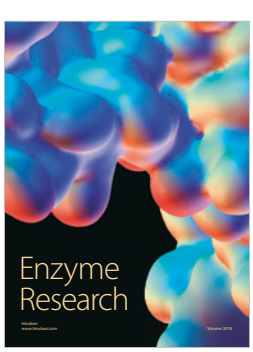








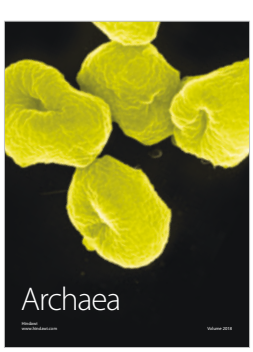













Hindawi

Submit your manuscripts at
www.hindawi.com