

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

Paula Virginia SUBIRADA CALDARONE



Departamento de Bioquímica Clínica

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

CIBICI-CONICET

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, 9 de Abril de 2020.-

ESTUDIOS SOBRE EL EFECTO DE HIPOXIA EN ENFERMEDADES NEOVASCULARES Y NEURODEGENERATIVAS RETINALES.

MECANISMOS DE AUTOFAGIA Y SU RELACION CON LA MUERTE NEURONAL.



DIRECTOR DE TESIS

Prof. Dra. María Cecilia Sánchez

COMISION ASESORA

Prof. Dra. María Ana Contín

Prof. Dr. Pablo Iribarren

Prof. Dr. Claudio Fader Kaiser

EVALUADOR EXTERNO

Prof. Dra. Nora Rotstein

Este trabajo de tesis fue realizado con la ayuda
económica obtenida a través de becas y subsidios de

FONCyT, CONICET, SECyT-UNC, IBRO.

A Daniel, León y Joaquín, mis tres grandes amores

A Alicia y Aldo, mis mentores

A Manuel, mi compañero

AGRADECIMIENTOS

Han sido los seis años más divertidos, sin lugar a dudas! Para mí, la tesis es un compendio de momentos: algunos de intensa actividad experimental, otros de introspección y lectura, todos aglutinados por la calidez de los instantes compartidos en grupo. Tengo la sensación de que llegó el momento de crecer e irse de casa, volar para seguir creciendo. Aunque los recuerdos tienen sabor a melancolía, creo que fue una etapa de muchísimo crecimiento y eso se debe en gran parte a toda la gran familia del laboratorio 8. Me llevo de cada uno lo mejor, por eso a todos les digo: GRACIAS TOTALES!!!

Ceci: Desde aquel primer día que me recibiste en la salita, me enamoraste de la retina!!! Gracias por aceptarme en el grupo a pesar de venir con el combo familiar, tu comprensión y apoyo han sido fundamentales para seguir tirando siempre para adelante. Gracias por darme la oportunidad de cumplir mi sueño de hacer investigación, cada día que vine al laboratorio me sentí dentro de una película donde era la protagonista y lo disfruté enormemente. Has estado a mi lado en los momentos más hermosos y en los más tristes también, acompañándome incondicionalmente. Son cosas que no tienen valor y por lo que estaré eternamente agradecida, van más allá de lo que cualquier becario pueda pedirle a un jefe. Extrañaré el modo cariñoso con el que nos tratás a todas, sabemos que somos como tus hijas y nuestros pequeños como tus nietos. Estás siempre en los detalles, recordando las fechas de los cumpleaños o trayéndonos alguna cosita, mimándonos a pesar de que ya estamos todos grandes.

Me diste el espacio para que descubriera quien soy, en el laboratorio, el aula de prácticos y teóricos. Gracias por dejarme experimentar en el ámbito docente, hay algunas ideas que salieron bien y otras no tanto jaja, jamás me dijiste nada... Y como no nos podíamos quedar dentro del CIBICI, a las escuelas también fuimos!!! Con proyectos propios o ajenos, divulgamos un poquito. Una de las experiencias más hermosas que me llevo, la más noble y desinteresada. Quién sabe, quizás hayamos sembrado la curiosidad y el amor por la ciencia en algún niño/a que sea el próximo Houssay o Lelior. Aprendí con vos que hay que mirar todo con positivismo, incluso a los experimentos fallidos o incongruentes. Creo que es tu filosofía de vida y que funciona muy bien, las buenas vibras atraen buenas vibras. Gracias por creer en nosotras, darnos el espacio para colaborar en todas tus actividades y hacer de este grupo un equipo con empuje. Tenés la habilidad de develar cuales son nuestras mejores aptitudes y ayudarnos a coordinarnos entre nosotras para que crezcamos todas juntas, aptitud de un líder neto. Pienso que sos como el "Chapo Guzman" de la retina: una vez entrando en la red de Sánchez es difícil salir, nos vamos ubicando en distintos lugares y expandiéndonos pero siempre bajo tu ala y eso nos reconforta y da seguridad. Gracias por ser jefe pero también amiga y mamá!!!

Chiab, no conozco a nadie que tenga tantas historias divertidas en su haber, gracias por compartirlas y aconsejarnos a través de ellas. Llevás puesta la camiseta de la facu y me siento orgullosa de haber visto cómo creció la FCQ estos años, los buenos proyectos se concretan trabajando con esfuerzo y proyección a futuro. Gracias por las preguntas certeras que son fundamentales para pegar un giro en un estudio, la buena onda e imaginación para interpretar un resultado complejo. Sos un apasionado de tu labor y un soñador neto. Al final, ¿qué somos sin utopías?

Gus, pelado, gracias por acompañarme en los primeros pasos, por estar atento a lo que necesitamos todos en lo laboral y en lo personal. Gracias por las múltiples albahacas, los mates **bien** cebados y los chistes malos que nos hacen reír a todos!! De vos aprendí a que no hay que rendirse, y si un experimento no salió hay que buscarle la vuelta. Analítico y puntilloso como pocos, el libro de Petete del lab 8, pero también el gurú de la limpieza del box. No voy a olvidar tus experimentos sociales con las bolsas de basura llena.

Pablo, gordooo, dónde quedó el respeto por el jefe? Con tus ocurrencias, no hay momento que pase desapercibido. Desconocemos cuáles son tus fuentes de información, pero siempre llegas al lab con las últimas novedades. Me enseñaste a ahorrar materiales y a aprovechar al máximo cada experimento in vivo. Gracias por las buenas vibras y por motivarme a trabajar por más!!

A mis compañeros del lab, que hicieron que el doctorado fuese divertido y ameno. Voy a deberles un millón de cervezas y meriendas, pero me llevo muchísimos hermosos recuerdos. En especial al grupo Retina, que es bello en esencia porque la gente que lo forma es única y maravillosa!

Coti, agradezco a Dios que haya cruzado nuestros caminos, por regalarme tu amistad. Gracias por estar, por permitirme equivocarme y prestarme un hombro para llorar a veces también. Por no dejar de creer en mí cuando no salían los experimentos y recordarme que las cosas más importantes son las del corazón. Por transformar los ambientes y los momentos con palabras, es tu super-poder!

Vachu, mi primera teacher! Hubo que remar un poco con ésta aprendiz jaja. En el corto tiempo que compartimos me enseñaste casi todo lo que sé experimentalmente. Gracias por tu tiempo y dedicación!

Magui, nuestras miradas de la vida dependen mucho del camino que transitamos. Gracias por mostrarme otra mirada, me hizo pensar mucho y crecer como persona. Gracias por cuidarnos en las evacuaciones y mantener al grupo actualizado de los eventos internacionales jaja.

Vicky V., qué personaje!!!! Llegaste llena de vitalidad y alegría, con tus múltiples TOCs que nos hacen llorar de la risa. Gracias por tu amistad espontánea, por ser tan cariñosa y mimarnos con las maravillas dulces que prepararás. Siempre dispuesta a discutir y colaborar para crecer en equipo, vas a ser grande pichona, no lo dudes!! Has sido un excelente Uber de ratones, te lo agradezco INFINITAMENTE!!!! Gracias por tu compañía y complicidad.

Al Dr. Luna, una parte esencial de este grupo porque es nuestro link con el paciente. Gracias por enriquecernos con todos sus conocimientos, aportar ideas de las que surgen excelentes proyectos y trabajar codo a codo en múltiples modelos animales para seguir indagando en las retinopatías. Al grupo de residentes que dedican horas extras para colaborar activamente con nosotros, mil gracias!!!!

Al team Nitrolipidos que desborda energía tanto dentro como fuera del lab. Qué equipazo! Maxi, para mí sos un crack pero más importantemente buen compañero y excelente musicalizador jaja. Gracias por contestar mis dudas y ofrecer siempre las herramientas que

tenés a mano. Por ser transparente, decir lo que pensás y actuar en consecuencia, es una gran virtud.

Vicky G!!!! Pequeña, cuantos hermosos momentos hemos compartido. Te adoro porque sos buena mina, honesta y fiel a tus creencias. Gracias por los miles de maternos, por tu compañía incondicional y tenerme siempre en cuenta. Voy a extrañar las charlas contigo! ¿Quién me va a actualizar en los nuevos productos que salgan al mercado ahora?

Al equipo LRP-1, que es una locomotora con destino al “éxito”!!! A Darío y Javier, dos maestros de la ciencia en época de vacas flacas. A Dari, por su calidez y la buena onda que irradia, por ser un luchador. A Jaldín por enseñarnos a ser estrictos en nuestros experimentos, por la paciencia para enseñarnos cultivo.

A Vicky A., gracias por la compañía desde el comienzo del doctorado. Sos ejemplo de trayectoria impecable, una genia!!! Quedarán grabados en mi paladar las múltiples tortas de galletitas!

A Nico, por ser un gran amigo! Aunque corto, tu paso por el lab no pasó desapercibido. Gracias por ayudarme a enfocar, a visualizar un objetivo a futuro y animarme a soñar en grande. Por compartir alegrías y penurias, tenés un corazón enooooorme!

A Danilo y Pablo Romagnoli, excelentísimas personas, parte del grupo científico del lab pero también de la gran familia, piezas clave en los seminarios y en las juntadas en Los Aromos!

A las personas que conocí por proyectos en conjunto pero que hoy son más que colegas! A Lina, una divina, con tantas pilas para laburar que contagia. Gracias por tu buena onda y positivismo, por permitirme trabajar en tus proyectos, aprendí mucho a tu lado!

A los mendocinos, Rubén y Carolina, dos bellas personas!!!! Rubén sos un personaje único, de cada momento compartido tengo una anécdota que contar! Gracias por los chistes ingeniosos y por tu buena onda. Caro, gracias por ser tan piola, por ofrecerme tu compañía y alojamiento sin pedir nada a cambio!

A todas las personas de bioterio, microscopía confocal, cultivo, criostato y secretaria. Son una pieza clave en el desarrollo de esta tesis, por su ayuda permanente en cada experimento/trámite. Ha sido un placer conocerlas desde lo laboral, pero también en lo personal. Esta institución no sería lo que es sin las excelentes personas que lo conforman!

Al Consejo Departamental, que trabajó incansablemente por el CIBICI. A los profes, por enseñarme cómo funciona por dentro el departamento y por darme la oportunidad de trabajar un año más aquí. A mis compañeros consejeros: Luci, Facu y Jime, un equipazo! Fue hermoso transitar esa etapa con ustedes!!!

A todos los becarios y jefes del CIBICI!!!! Por generar un flujo de aprendizajes, reactivos y equipos entre los distintos grupos. Se pone todo sobre la mesa para que podamos crecer, especialmente en períodos de crisis. A mis mayores sponsors: Dra. Canavoso, Dra. Panzetta y Dr. Iribarren por proveerme múltiples veces de material para trabajar!!!!

A mi familia y amigos, mis pilares, las personas que llenan mi corazón!!

Mamá: Sos mi ejemplo de mujer empoderada y mamá cariñosa. Nunca supe cuando podías hacer tantas cosas juntas. Te agradezco TODO: tu apoyo y amor incondicional (para con nosotros y ahora mi pequeña familia), por tener visión a futuro, asegurándonos una educación fructífera y un techo, por pelearla incansablemente sorteando mil obstáculos, por darme oportunidades y permitirme elegir, por enseñarme a ser libre, empática con quienes menos tienen y a amar nuestro país.

Papá, pajarito, gracias por enseñarme a amar el mundo microscópico y la naturaleza, si no fuera por eso hoy no estaría acá. Gracias por mostrarme que no hace falta mucho para vivir, pero que puede hacerse un montón por el otro. Que lo más significativo de la vida está en los momentos simples. Vas a ser siempre para mí el epítome de paciente rebelde y mi motivación por trabajar por ellos. Sé que hoy estarías muy orgulloso de mí, ahora comprendo cuántas dimensiones pueden ser trascendidas por el amor.

Manu, no se le puede pedir a la vida un mejor hermano. Gracias por estar presente en cada paso que damos, por apoyarnos incondicionalmente y brindarnos una mano cuando lo necesitamos. Por el cariño y la compañía, los juegos y chistes con los chicos, por estar pendiente la familia y cuidarnos a todos!!!

A mis abuelos maternos y paternos, que con paciencia infinita me dedicaron horas durante la infancia y adolescencia. Gracias por tanto amor puro, haberlos disfrutado hasta de grande ha sido uno de mis máximos placeres. Han sido mis mentores y ejemplos de vida!

Muy especialmente, a mi clan de muchachos: Dani, qué afortunada me siento de haberte conocido! Tu amor me transformó en miles de aspectos y creo que juntos hacemos un equipo invencible. Adoro nuestros proyectos, las fantasías de viajar de jubilados y la hermosa familia que construimos. Gracias por escucharme, aconsejarme, por tu constante apoyo, por estar en los detalles sumándole lo inesperado a lo cotidiano. A tu lado soy muy feliz!

A mis dos pequeños indiecitos: León y Joaquín, mis mayores maestros de la vida. Aprendí con ustedes el poder de un abrazo y una sonrisa, su amor infinito pinta de colores brillantes mis días. Gracias por regalarme los momentos más felices e insólitos, cada etapa vivida es un mundo nuevo y apasionante. Por permitirme revivir la magia de la infancia a través de sus miradas cuando leemos un cuento o hacemos experimentos. Los amo con todo el corazón!!!

A mis amigas del alma: Carla, Celeste y Davina, mis confidentes y consejeras. Gracias por estar presentes a lo largo de tantos años, compartiendo momentos inolvidables. Por creer en mí más que yo, por acompañarme en cada paso incondicionalmente. Las quiero!

A mi querido pueblo Argentino. Porque con su esfuerzo colectivo me dio la posibilidad de educarme en todos los niveles y hacer un doctorado. Salud y educación pública de calidad, dos virtudes que nos distinguen en el mundo. Elijo todos los días, con orgullo y convicción, trabajar fuertemente para seguir construyendo un futuro próspero para nuestra gente. Porque solo lo que se quiere puede cuidarse, porque deseo que los que vengan tengan iguales oportunidades que yo, porque no dudo ni un segundo que tenemos un gran potencial para hacer cosas maravillosas, vale la pena aunar nuestras fuerzas y trabajar en equipo para nuestra Nación.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	1
Resumen.....	3
Summary.....	6
I. Introducción.....	8
I.I. Retinopatías isquémicas neovasculares: contextualización	9
I.II. Fisiopatología de la ROP y la RD.	10
I.III. Autofagia: Mecanismo	17
I.IV. Autofagia en el desarrollo retinal	21
I.V. Autofagia en las retinopatías isquémicas	22
I.VI. Células de Müller como moduladoras de los eventos retinales	25
I.VII. CGM en la respuesta inflamatoria	27
I.VIII. Gliosis	27
I.IX. Factores Tróficos	28
II. Objetivos.....	31
Objetivo General	32
Objetivos Específicos	32
III. Resultados Modelo <i>In Vivo</i>.....	33
III.I. Hipoxia induce el flujo autofágico durante la etapa de neovascularización en el modelo de Retinopatía Inducida por Oxígeno (OIR)	34
III.II. 3 Metiladenina afecta la vascularización fisiológica retinal	44
III.III. 3MA incrementa el stress glial y la neurodegeneración	47
III.IV. Spautin-1 reduce la neovascularización pero no previene la neurodegeneración	55
III.V. Rapamicina previno la neovascularización y mejoró la gliosis reactiva	62
III.VI. El tratamiento con anti VEGF incrementa el flujo autofágico	69
IV. Resultados Modelo <i>In Vitro</i>.....	72
IV.I. La hipoxia incrementa el flujo autofágico en células gliales de Muller MIO-M1 a tiempos cortos.	73
IV.II. El estrés glial de las CGM puede ser disminuido por inductores del flujo autofágico.	85
IV.III. Las CGM modulan la angiogénesis en presencia de inductores/inhibidores del flujo autofágico.	88

V.	Discusión.....	91
	V.I. Conclusiones del modelo <i>in vivo</i>	92
	V.II. Conclusiones del modelo <i>in vitro</i>	97
VI.	Perspectivas Futuras.....	102
VII.	Materiales y Métodos.....	105
	VII.I. Modelo <i>in vivo</i>	106
	VII.II. Modelo <i>in vitro</i>	112
VIII.	Bibliografía.....	117
IX.	Producción Científica.....	127

Abreviaturas

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ATG: proteínas de la vía autofágica (por AuTophagy related genes)

CD31: (PECAM-1).

CEs: Células endoteliales

CGM: Células gliales de Müller

DQ-BSA: Albúmina sérica bovina conjugada al colorante BODIPY (por Self-Quenched BODIPY Dye Conjugates of Bovine Serum Albumin)

CoCl₂: Cloruro de Cobalto

CQ: Cloroquina

ERG: Electrorretinograma

Gal-1: galectina 1

GCL: Capa de células ganglionares (por ganglion cell layer)

GFAP: Proteína ácida fibrilar glial (por glial fibrillar acid protein)

Glut-1: Transportador de glucosa 1 (por Glucose transporter 1)

GS: glutamina sintetasa

GSA-IB4: Lectina *Griffonia Simplicifolia* IB4

HIF: Factor inducible por hipoxia (por hipoxia inducible factor)

ILM: Membrana limitante interna (por inner limitant membrane)

INL: Capa nuclear interna (por inner nuclear layer)

i.p.: intraperitoneal

LAMP1: Proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (por lysosomal associated membrane protein 1)

LC3B: Cadena liviana 3B de la proteína asociada a membrana 1A/1B

mTOR: Complejo sensible a Rapamicina de mamíferos (por mammalian Target of Rapamycin).

NG-2: marcador Neuronal-glial 2

NV: Neovascularización

OIR: Retinopatía inducida por oxígeno (por Oxygen-induced retinopathy)

ONL: Capa nuclear externa (por outer nuclear layer)

O₂: Oxígeno

P: Día post natal

PHD: enzimas prolil hidroxilasas

PI3K: Fosfatidil inositol 3 cinasa (por Phosphatidylinositol 3 Kinase)

RA: Oxígeno ambiental (por Room Air)

RD: Retinopatía diabética

ROP: Retinopatía del prematuro (por Retinopathy of Prematurity)

TNF α : Factor de necrosis tumoral α

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (por vascular endothelial growth factor)

VO: Vaso-obliteración

3MA: 3 metiladenina

RESUMEN

Es sabido que uno de los principales insultos causante de las retinopatías proliferativas es la hipoxia, la cual es capaz de inducir neovascularización (NV) y neurodegeneración. Para mantener la homeostasis las neuronas requieren eficientes sistemas de degradación y reciclado, como la autofagia. Esta vía constituye un mecanismo de supervivencia que incrementa su flujo ante diversos estresores, aunque también puede participar en la muerte de células retinales.

En este trabajo, analizamos el rol de la autofagia en tres puntos claves del modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) y determinamos si su modulación puede mejorar las alteraciones vasculares y no vasculares retinales. Como herramienta para determinar el flujo autofágico, los experimentos fueron llevados a cabo con cloroquina (CQ), lo cual permitió monitorear la acumulación de autofagosomas, en el tiempo, por bloqueo lisosomal. Nuestros experimentos mostraron que retinas murinas OIR extraídas en el día posnatal (P) 17 presentaron un incremento significativo en el flujo autofágico. En particular, se observó una intensa marca de LC3B y p62 en las capas internas de la retina, principalmente en células endoteliales (CEs).

Con el objetivo de develar cómo el proceso autofágico participa en las distintas etapas del modelo OIR, nos propusimos inhibir la vía autofágica mediante una inyección intraocular de 3 metiladenina (3MA) a dos tiempos característicos: P12 (coincidente con la salida de la cámara de hiperoxia) y P17 (punto máximo de NV). Nuestros resultados mostraron que 3MA logró reducir los niveles de LC3B II luego de 24 horas de la inyección intraocular. Interesantemente, la inyección de 3MA en P12 incrementó la gliosis y el número de células TUNEL positivas y tendió a disminuir la funcionalidad retinal a P17. Resultados similares se obtuvieron a P26 OIR en aquellos ratones que recibieron la inyección de 3MA en P12. En referencia a las alteraciones vasculares, el tratamiento con 3MA en P12 redujo el área avascular y neovascular significativamente. En contraposición, la administración de 3MA en P17 no afectó ninguno de los parámetros anteriormente determinados, evidenciando que el bloqueo de la autofagia en etapas más tardías no afecta significativamente a la retina neural.

Los efectos a nivel vascular, glial y neuronal de disrupción del flujo autofágico fueron corroborados con Spautin-1, un inhibidor específico de la vía. Una única dosis de Spautin-1 administrada a P12 logró disminuir significativamente la expresión proteica de LC3B II, restableciéndose a los niveles del control OIR a P17. Además, el tratamiento no logró atenuar la gliosis ni las alteraciones funcionales. En línea con estos resultados, el ensayo de TUNEL evidenció un ligero incremento en el número de células positivas en la capa de células fotorreceptoras (ONL) a P17 OIR.

Posteriormente, evaluamos si la inducción del flujo autofágico producía cambios en el modelo de OIR. Luego de una única inyección intraocular de Rapamicina a P12 OIR, se observó una disminución significativa en el área neovascular retinal, así como una menor expresión proteica del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a P17. Adicionalmente, el tratamiento con Rapamicina disminuyó la expresión de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) a P26 OIR, sin embargo, las alteraciones funcionales persistieron. Empleando un esquema terapéutico similar, analizamos el efecto de la terapia anti-VEGF sobre el flujo autofágico. Al igual que Rapamicina, el tratamiento con inhibidor de VEGF no solo disminuyó el número de ovillos neovasculares, sino que también activó el flujo autofágico a P17 OIR, principalmente en la capa de células ganglionares (GCL) y la capa nuclear interna (INL).

En conjunto nuestros resultados demuestran que todos los tratamientos de inducción e inhibición del flujo autofágico fueron capaces de reducir el área neovascular pero no lograron revertir el daño neuronal. Asimismo, comparado con los actuales tratamientos oftalmológicos, Rapamicina constituye una estrategia terapéutica más prometedora ya que reduce tanto la NV como el estrés glial persistente.

En función de los cambios vasculares y neuro-gliales observados en el modelo murino de OIR, decidimos indagar si las células gliales de Müller (CGM) participan regulando dichos eventos. Para ello se realizaron ensayos *in vitro* exponiendo las células de la línea humana inmortalizada MIO-M1 a condiciones de normoxia, hipoxia gaseosa o hipoxia química (con Cloruro de Cobalto). Confirmamos por *Western blot* e inmunofluorescencia un incremento en el flujo autofágico a 4 horas de estímulo con hipoxia gaseosa, observándose el restablecimiento de los niveles de LC3B II y p62 hasta niveles controles a tiempos más prolongados (24 horas). Por otra parte, se observaron niveles elevados de LC3B II a 4 y 24 horas en presencia de hipoxia química inducida por Cloruro de Cobalto.

En nuestro sistema celular, la hipoxia gaseosa incrementó los niveles proteicos de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), sin modificar los niveles de la enzima glutamina sintetasa (GS) y vimentina. Análogamente a lo observado en el modelo animal, Rapamicina (y en menor medida otro inductor autofágico, Resveratrol) disminuyeron la expresión proteica de GFAP. La participación de las CGM en eventos proliferativos vasculares fue evaluada incubando CE's con sobrenadantes de MIO-M1 expuestos a normoxia o hipoxia y en presencia o ausencia de moduladores del flujo autofágico. En ensayos de tubulogénesis observamos que los sobrenadantes hipóxicos de CGM en presencia de Rapamicina y Spautin-1 disminuyeron significativamente la formación de estructuras tubulares vasculares, en tanto que Resveratrol inhibió la tubulogénesis tanto en normoxia como en hipoxia.

En suma, ambos abordajes (*in vitro* e *in vivo*) refuerzan nuestras observaciones y vislumbran potenciales agentes terapéuticos con principal efecto sobre los componentes vasculares y gliales. Más aún, estas mejoras retinales podrían ser alcanzadas mediante la modulación específica de las funciones de las CGM, previniendo efectos secundarios de las drogas sobre otras células retinales.

Esperamos que nuestros aportes inspiren nuevas preguntas en este y otros campos de investigación, y se traduzcan en un progreso para el tratamiento de las retinopatías isquémicas proliferativas.

SUMMARY

Hypoxia is one of the main insults in proliferative retinopathies, leading to neovascularization and neurodegeneration. To maintain homeostasis, neurons require efficient degradation and recycling systems. Autophagy participates in retinal cell death, but it is also a cell survival mechanism. Here, we analysed the role of autophagy at the three characteristic time periods in the oxygen-induced retinopathy (OIR) mouse model and determined if its modulation can improve vascular and non-vascular alterations. Experiments were performed with chloroquine (CQ) in order to monitor autophagosome accumulation by lysosomal blockade. Postnatal day (P)17 OIR mouse retinas showed a significant increase in autophagy flux. In particular, an intense LC3B and p62 staining was observed in inner layers of the retina, mainly proliferating endothelial cells.

In order to unravel how autophagy participates in each stage of OIR mouse model, we inhibited the autophagy flux at two important time points: P12 (coincident with the return of the mice to room air) and P17 (time point of maximum neovascularization). Our results showed that 3MA decreased LC3B II protein levels after 24 hours of an intraocular injection. Interestingly, the injection of 3MA in P12 increased gliosis and the number of TUNEL positive cells and tended to decrease the retinal functionality at P17. Similar results were obtained at P26 OIR in those mice that received 3MA treatment at P12. Regarding vascular alterations, we observed that 3MA treatment at P12 reduced both the avascular and neovascular area significantly. On the other hand, the administration of 3MA in P17 did not affect the above mentioned parameters, indicating that the blockade of autophagy flux at later stages does not alter the neural retina significantly.

The effects of the disruption of autophagy at vascular, glial and neuronal levels were corroborated by Spautin-1, a specific inhibitor of the pathway. After a single dose of Spautin-1, *Western blot* analysis showed a significant decrease in LC3B II protein expression at P13 OIR, returning the autophagy marker to OIR control levels at P17. In addition, neither gliosis nor functional alterations were attenuated. In line with these results, TUNEL staining showed a slight increase in the number of positive cells in the outer nuclear layer (ONL) at P17 OIR.

Later, we evaluated if the induction of the autophagy flux generated changes in the OIR mouse model. After a single intraocular injection of Rapamycin at P12 OIR, a decreased neovascular area and vascular endothelial growth factor (VEGF) protein expression were observed at P17 OIR. In addition, whereas the increased expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP) was reversed at P26 OIR, the functional alterations persisted. Using a similar therapeutic schedule, we analyzed the effect of anti-VEGF therapy on autophagy flux. Like Rapamycin, VEGF inhibitor

treatment not only reduced the amount of neovascular tufts, but also activated autophagy flux at P17 OIR, mainly in ganglion cell layer (GCL) and inner nuclear layer (INL).

Overall, our results demonstrate that all treatments of induction or inhibition of the autophagic flux reduced neovascular area but were unable to completely reverse the neuronal damage. Besides, compared to current treatments, Rapamycin provides a more promising therapeutic strategy as it reduces both neovascular tufts and persistent gliosis.

According to vascular and neuro-glial alterations observed in OIR mice model, we decided to find out if Müller glial cells (MGC) participate in the regulation of those events. For that purpose, we carried out *in vitro* experiments by incubating MIO-M1 human cells in normoxic, hypoxic environment and with Cobalt Chloride (chemical hypoxia). We confirmed by *Western blot* and immunofluorescence assays an increase in autophagy flux at 4 hours of stimulus, and we further observed that LC3B II and p62 protein levels returned to control levels by 24 hours of hypoxia. In contrast, we detected increased protein levels of LC3B II in MIO-M1 cells when incubated with Cobalt Chloride.

In our cellular system, hypoxia increased protein levels of glial fibrillary acid protein (GFAP), without modifying glutamine synthetase and vimentin protein levels. Analogously to the observations in the animal model, Rapamycin (and in a minor magnitude Resveratrol) decreased the protein expression of GFAP. The participation of MGCs in vascular proliferative events was evaluated by incubation endothelial cells with MIO-M1 supernatants exposed to normoxia or hypoxia and modulators of the autophagy flux. In tubulogenesis assays we observed that supernatants of hypoxic MGCs in presence of Rapamycin and Spautin-1 significantly diminished the formation of tubular vascular structures, whereas Resveratrol inhibited the tubulogenesis in both experimental conditions.

In sum, both approaches (*in vitro* and *in vivo*) reinforce our observations and identify new potential therapeutic agents with effects mainly on vascular and glial components. Moreover, these retinal improvements could be reached by modulating MGCs' functions specifically, preventing secondary effects of the drugs over other cells.

We hope that our contributions inspire new questions in this and other research fields and they turn in a progression for the treatment in ischemic proliferative retinopathies.

I. Introducción

“Es lo que siempre digo, hay que ir hacia la interdisciplina”

María Cecilia Sánchez

I.I. Retinopatías isquémicas neovasculares: contextualización

Las patologías neovasculares retinales constituyen la principal causa de ceguera en la población trabajadora (Retinopatía Diabética, RD) e infantil (Retinopatía del Prematuro, ROP) (1, 2). Si bien no todos los casos producen la pérdida total de la visión, su disminución impacta directamente en la calidad de vida de los pacientes y en su desempeño laboral. Dado que estas patologías oculares son prevenibles, se han establecido programas latinoamericanos con el objetivo de constituir protocolos que normalicen los procedimientos de acción en la región (3). Estudios longitudinales muestran que el porcentaje de incidencia no ha mejorado a pesar de la puesta en acción de estos programas, en parte por la baja adherencia al esquema de tratamiento, pero también porque los sectores más afectados son aquellos de menores recursos (4). Por lo tanto: *la ceguera constituye un grave problema de salud y socio-económico en Argentina.*

El abordaje debería llevarse a cabo desde la prevención y los controles periódicos, a fin de evitar que el paciente evolucione hacia estadios más avanzados. Actualmente, existe un amplio espectro de tratamientos disponibles para estas patologías incluyendo la fotocoagulación láser, vitrectomía y más recientemente, inyecciones intraoculares con agentes anti-angiogénicos (5, 6). Dichos tratamientos son costosos e invasivos, restringiendo la accesibilidad a todos los estratos sociales. Aun así, es posible que la inversión en campañas de prevención y tratamiento no sea suficiente para asegurar la disminución de la visión en la población afectada. Una mayor limitación estaría dada por el conocimiento incompleto de los mecanismos que participan en el origen y desarrollo de las retinopatías isquémicas. En pacientes prematuros sin ROP también se ha observado una disminución de la agudeza visual durante la adultez (7). Además, estos grupos de pacientes muestran alteraciones en fotorreceptores de la fóvea y su periferia, disminuyendo la capacidad de adaptación a la oscuridad (8). Los tratamientos anti-angiogénicos y la ablación de porciones de la retina con láser son efectivas inhibiendo la neovascularización (NV), sin embargo, existen múltiples casos de recidiva posteriores a las intervenciones e incluso desprendimiento de retina (9, 10).

En RD, el tratamiento es aún más complejo, particularmente en las etapas tempranas, donde no hay una terapia efectiva y los signos pueden confundirse con otras alteraciones retinales no diabéticas (11). En la etapa proliferativa, un porcentaje significativo de pacientes es refractario al tratamiento con anti-angiogénicos, siendo las terapias alternativas capaces de mejorar ligeramente la agudeza visual (12).

En conclusión, sólo avances en el entendimiento de los mecanismos subyacentes a los eventos neurodegenerativos, pro-inflamatorios y pro-angiogénicos de las retinopatías isquémicas pueden asegurar la identificación de las poblaciones de pacientes a tratar, tanto como la definición de una terapia efectiva. En esta tesis profundizaremos sobre la autofagia, un mecanismo de degradación intracelular que tiene demostrada relación con eventos proliferativos endoteliales y neuro-inflamatorios.

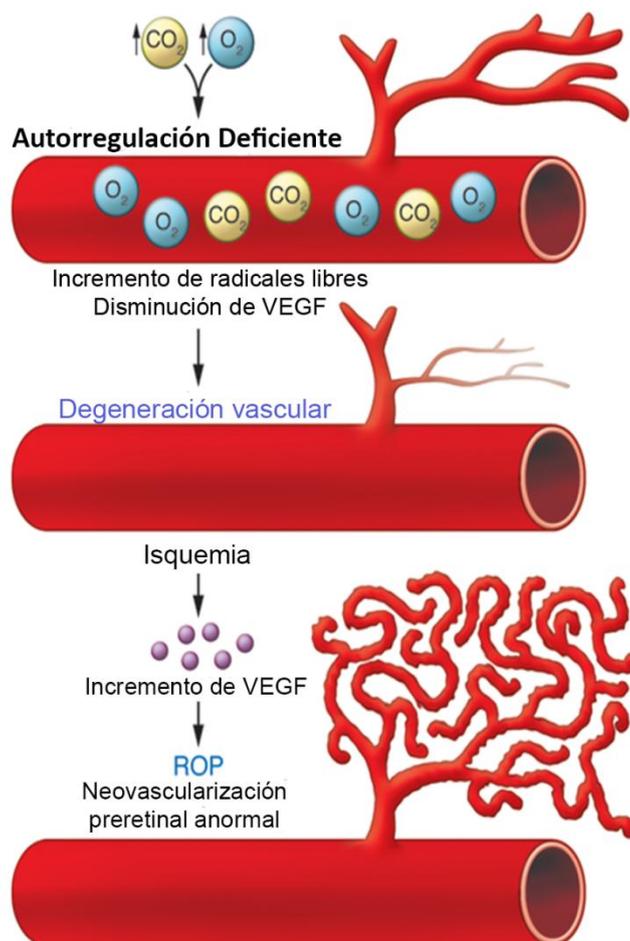
I.II. Fisiopatología de la ROP y la RD.

Las retinopatías isquémicas incluyen un conjunto de afecciones que cursan con concentraciones de oxígeno disminuidas en el tejido neurosensorial del ojo. Entre ellas se encuentran: Oclusión de la vena central de la retina, retinopatía por anemia falciforme, RD y ROP.

La fisiopatología de la ROP está asociada a la percepción de bajos niveles de oxígeno en la retina aún inmadura. Frecuentemente se presenta en neonatos nacidos antes de la semana 30 y de bajo peso (menor a 1,5kg), quienes permanecen en incubadora hasta que su sistema respiratorio madure y asegure un correcto intercambio gaseoso (13). Niveles elevados de oxígeno, mayores a 80%, se han correlacionado con incrementada tasa de supervivencia de los prematuros ya que previenen complicaciones derivadas de insuficiencia respiratoria. Sin embargo, a esta edad gestacional, la vasculatura retinal es aún inmadura y su desarrollo está comandado por un gradiente de hipoxia. Por ende, el ambiente hiperóxico de la incubadora inhibe el crecimiento vascular fisiológico, produciendo la obliteración de los vasos en proliferación. Cuanto más prematuro sea el neonato, menor será el área vascularizada al momento de ingresar a la incubadora. Al finalizar el tratamiento y ser devuelto a un ambiente de menores niveles de oxígeno (O_2 ambiental=21%), las regiones avasculares de la retina perciben la falta de oxígeno relativa a las condiciones de la incubadora, gatillando señales de supervivencia y pro-angiogénicas. En un intento de establecer los plexos vasculares ausentes, las células retinales, principalmente las células gliales de Müller (CGM), secretan grandes cantidades de factores tróficos que inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos en forma desordenada hacia la cavidad vítrea (ovillos neovasculares). Los ovillos constituyen vasos inmaduros, carentes de células murales, siendo más propensos a romperse y producir hemorragias. Además, pueden generar fuerzas traccionales en el tejido, causando desprendimiento de la retina. La NV *per se* es un impedimento físico para la visión, aunque es

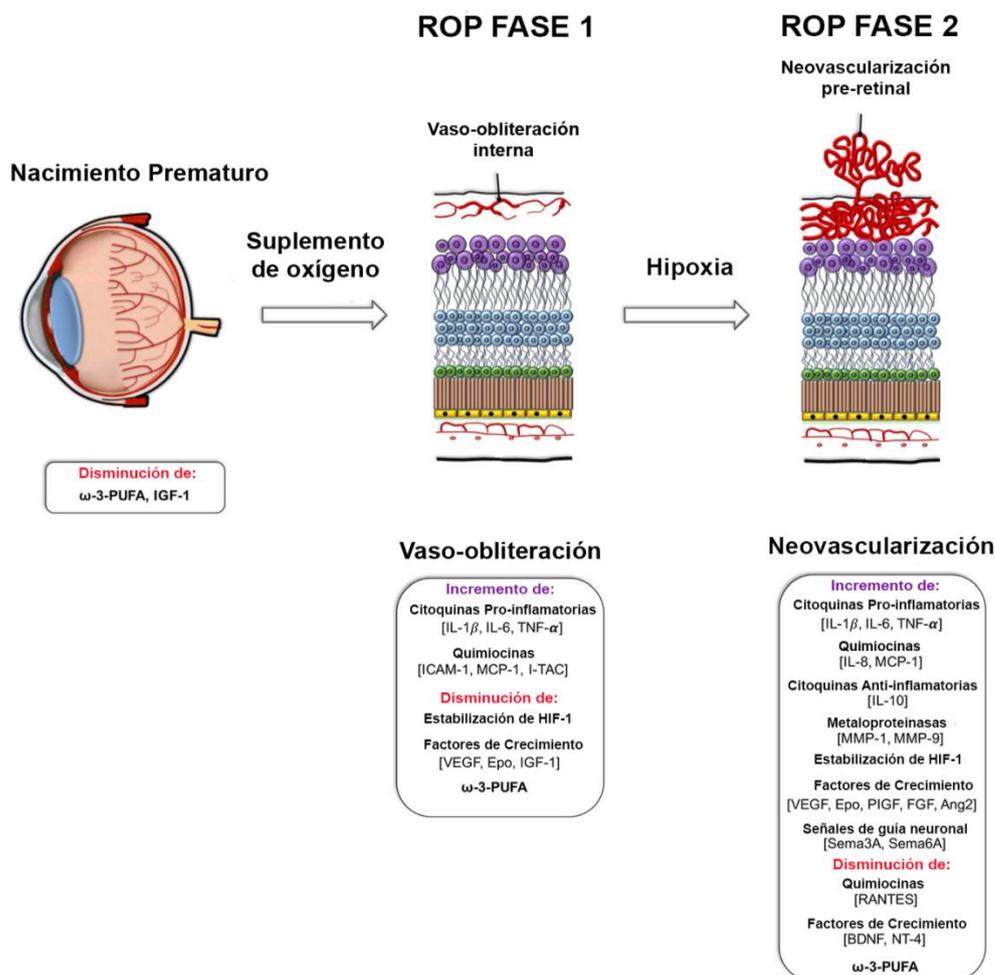
sabido que la neurodegeneración inicia mucho antes de que se detecten las alteraciones vasculares.

La primera fase de la patología comienza en la incubadora, donde la hiperoxia sería la responsable de incrementar el estrés oxidativo, el estrés glial y causar daño en las células que transducirán la señal visual. El grado de estrés oxidativo también estará ligado a la inmadurez de la vasculatura. Generalmente, en prematuros se ha observado una disminución de la autorregulación vascular, es decir, su capacidad de regular el flujo sanguíneo en función de la demanda de oxígeno y metabolitos (Esquema 1) (14). Por ende, al incrementar la presión parcial de oxígeno, se distribuye más cantidad de oxígeno del necesario, actuando como un agente tóxico en la retina y favoreciendo la producción de radicales libres que inducen estrés oxidativo.



Esquema 1: Autorregulación deficiente en la retina prematura. La autorregulación deficiente en la retina en niños prematuros impide la correcta oxigenación tisular, lo cual resulta en excesivo ingreso de oxígeno. La elevada tensión de dióxido de carbono incrementa el flujo sanguíneo ocular a fin de compensar la deficiente autorregulación. Los elevados niveles de oxígeno generan un incremento en los radicales libres y suprimen la expresión de VEGF. Esto induce arresto vascular y degeneración microvascular. La incipiente isquemia gatilla la neovascularización prerretinal. Adaptado de Sapieha y col., The Journal of Clinical Investigation 2010.

En una segunda etapa, la hipoxia relativa induce NV patológica y contribuye al incremento en la muerte celular de neuronas y al estrés glial persistente. Las alteraciones observadas y las secuelas correspondientes a la fase isquémica están relacionadas tanto al estímulo hipóxico como al establecimiento de una respuesta compensatoria exacerbada. El aspecto más ampliamente estudiado en la patogénesis de la ROP es el complejo desbalance en los niveles de factores tróficos del neonato (Esquema 2) (15). La síntesis del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), de eritropoyetina, del factor de crecimiento placentario (PIGF), del factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1), de angiopoyetina 2 y del factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF) se encuentra fuertemente incrementada en la retina con el objetivo de establecer los plexos vasculares ausentes. En contraposición, los niveles de algunos factores neurotróficos como el factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y la neurotrofina 4 (NT-4) se encuentran disminuidos en las retinas de pacientes con ROP, afectando directamente a la neurogénesis y la funcionalidad de las neuronas residentes en las distintas capas retinales (16).



Esquema 2: Factores inflamatorios y tróficos involucrados en la patogénesis de ROP. Al nacer, los neonatos prematuros son deficientes en factores tróficos necesarios para el desarrollo vascular. La suplementación excesiva con oxígeno contribuye a la vaso-obliteración debido al estrés oxidativo, a la deficiencia de factores pro-angiogénicos e incremento de la producción de proteínas pro-inflamatorias. Como consecuencia del arresto vascular, en la segunda fase se desarrollan neovasos aberrantes, comandados por un aumento abrupto de factores pro-angiogénicos inducidos por la hipoxia relativa. Adaptado de Riera y col. *Journal of Neuroinflammation*, 2017.

Por otro lado, los pacientes prematuros son más susceptibles a sufrir infecciones durante las primeras semanas de vida debido a que su sistema inmune se encuentra aún inmaduro. Evidencias clínicas muestran que infecciones intrauterinas o post natales en prematuros incrementan la probabilidad de desarrollar ROP pues las citocinas y quimiocinas liberadas en la respuesta pro-inflamatoria participan en eventos angiogénicos. Estos hallazgos demuestran la complejidad de la patología, en la cual se destacan los desbalances en factores tróficos y participación de la respuesta pro-inflamatoria (17, 18).

Un porcentaje de neonatos presenta regresión espontánea de los neovasos, mientras que el resto necesitará tratamiento (< del 10%), siendo analizado cada ojo en particular. Cabe aclarar que el tratamiento estándar es la terapia con láser mientras que el uso de inhibidores farmacológicos de la angiogénesis es riesgoso pues parte de la droga puede pasar al torrente sanguíneo, afectando el desarrollo de otros órganos. A pesar de las preocupaciones por los efectos sistémicos a largo plazo, en la última década, las inyecciones intravítreas de agentes anti-VEGF se han vuelto cada vez más populares (19).

Otra retinopatía isquémica de gran incidencia en la población es la RD, la cual es consecuencia de una patología metabólica, la Diabetes Mellitus (DM). Los pacientes diabéticos presentan elevados niveles de glucemia como consecuencia de una disfunción pancreática primaria o una reducción en la sensibilidad de las células blanco de insulina. La hiperglucemia sostenida durante largos períodos de tiempo genera alteraciones macro- y micro-angiopáticas en una gran variedad de órganos. En la retina, la alteración de vasos de pequeño calibre conduce a RD. Dos estadios principales pueden ser claramente identificados (20):

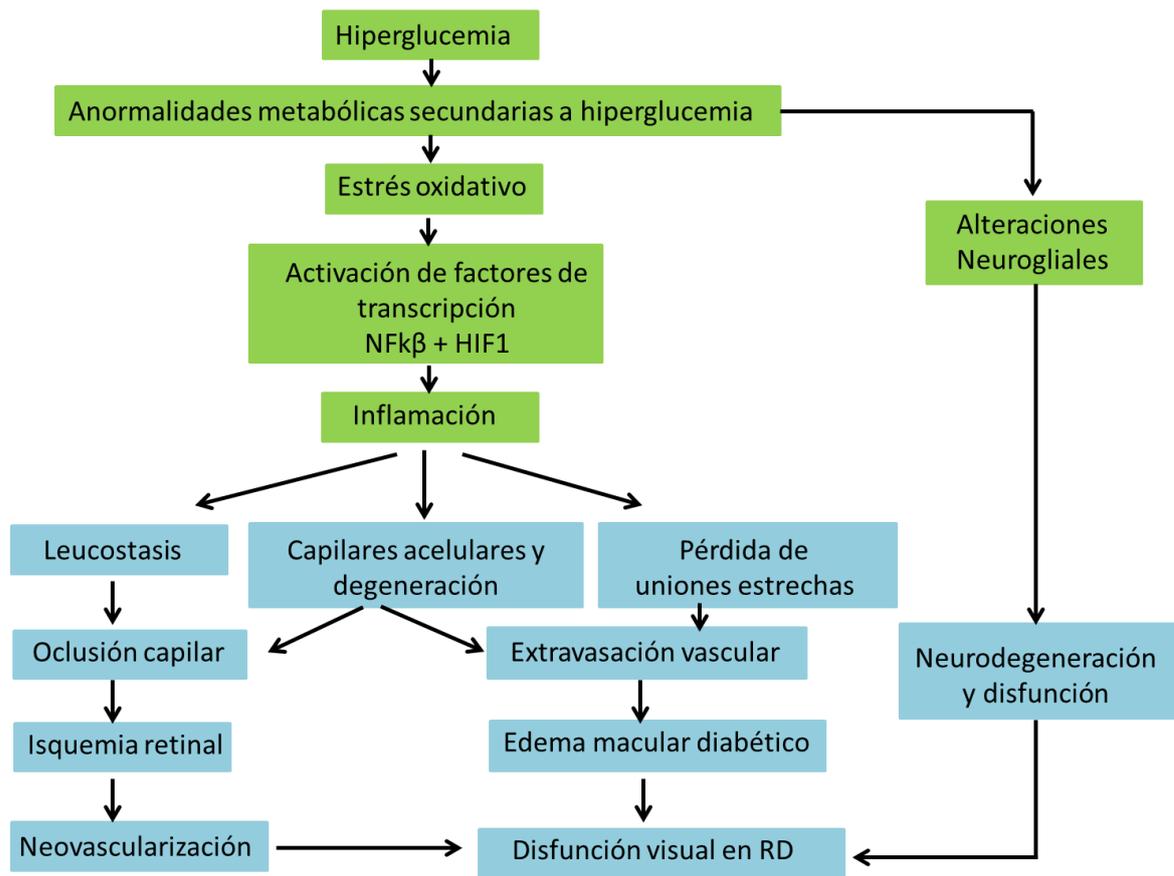
- RD no proliferativa: caracterizado por microaneurismas, dilatación venosa, hemorragia intravítrea y exudados lipídicos.
- RD proliferativa: caracterizada por la formación de vasos anormales nuevos (neovasos) hacia la cavidad vítrea, hemorragias pre-retinales y desprendimiento de retina además de las alteraciones observadas en la etapa no proliferativa.

A diferencia de la ROP, la RD es una retinopatía isquémica lenta y progresiva, muy dependiente del control metabólico del paciente. Inicialmente fue descrita como una patología netamente vascular. Luego, estudios adicionales revelaron que previo a la aparición de los cambios vasculares podían detectarse disminuciones en la funcionalidad retinal y variaciones en los patrones de expresión de proteínas en las células neuronales y gliales (21). El origen de los cambios vasculares en la RD está dado por:

- La acción directa de la hiperglucemia y los productos finales de la glicosilación avanzada sobre el endotelio y otras células de la barrera hemato-retiniana. Los cambios más tempranos incluyen pérdida en las uniones estrechas de las CEs, alteración de la malla astrocitaria que recubre la vasculatura y disfunción de pericitos.
- Incremento del estado pro-inflamatorio sistémico y local retinal. El aumento en la expresión y actividad de diversos mediadores de la respuesta pro-inflamatoria favorece los cambios estructurales y la disfunción de las células constituyentes de la barrera hemato-retiniana (22).
- La leucostasis, que puede generar acúmulos de células circulantes en los capilares retinales, ocluyéndolos. La permanencia de leucocitos adheridos a la pared vascular también puede favorecer el daño mediado por liberación de citocinas por estas células (23).

Dichos factores son los responsables de alterar el flujo de oxígeno desde el torrente sanguíneo a la retina, creando un microambiente hipóxico (Esquema 3). Durante la etapa proliferativa, el desarrollo de neovasos estaría gobernado por la respuesta de células macrogliales, principales secretoras de VEGF en la retina diabética.

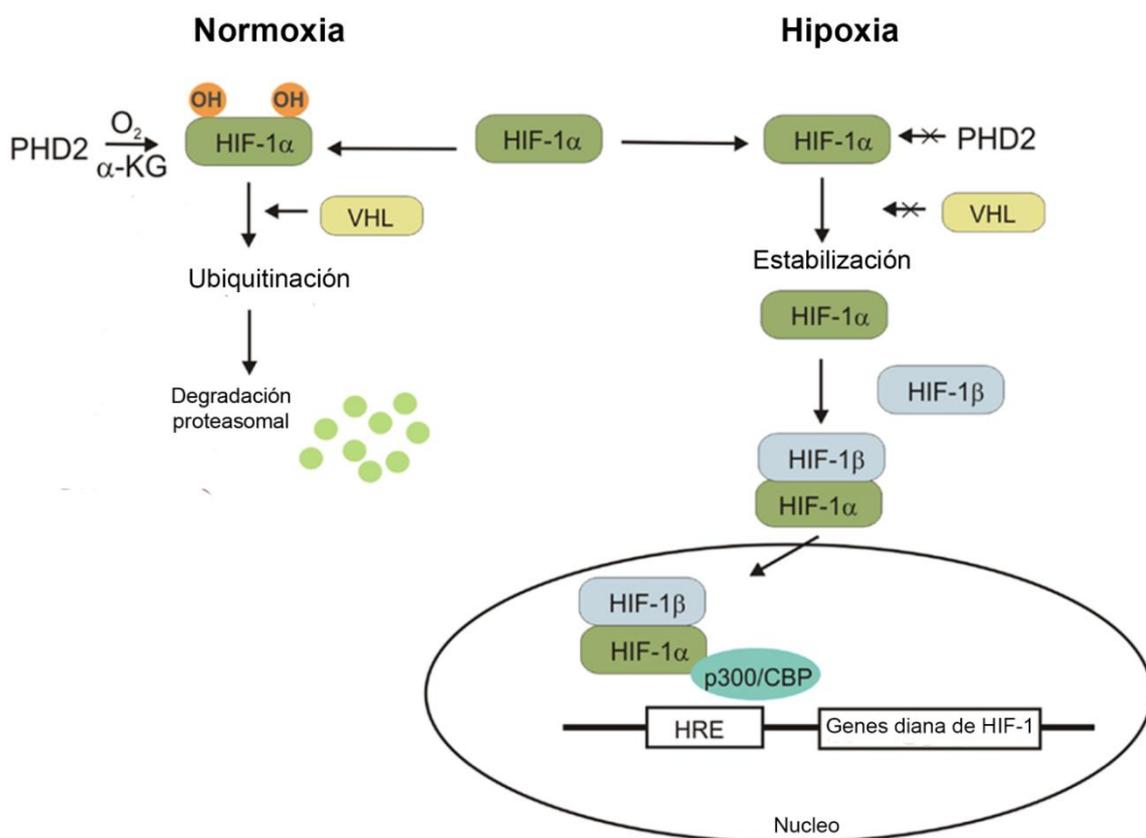
Si bien la hipoxia no es el agente principal que causa la injuria, ambas patologías comparten alteraciones vasculares y neuronales derivadas de una insuficiente provisión de oxígeno.



Esquema 3: Efecto de la hiperglucemia en vías bioquímicas y en inflamación en la patogénesis de la DR. Las anomalías metabólicas secundarias a la hiperglucemia contribuyen a las alteraciones neurogliales que pueden inducir neurodegeneración y disfunción. El incremento en el estrés oxidativo puede promover la activación de factores de transcripción como NF-κB y HIF-1. Adicionalmente, la actividad incrementada de citocinas pro-inflamatorias, quemoquinas y moléculas de adhesión pueden generar la degradación de uniones estrechas y formación de capilares acelulares. La leucostasis contribuye a la oclusión de capilares y puede llevar a isquemia retinal. El edema macular diabético y la NV son eventos patológicos clave en la RD. Adaptado de Roy y col., The American Journal of Pathology 2017.

Independientemente de la etiología, las patologías retinales isquémicas neovasculares están caracterizadas por un incremento de la actividad del factor de transcripción HIF-1 (por sus siglas en inglés Factor Inducible por Hipoxia-1). Éste es un complejo heterodimérico formado por dos subunidades HIF-1α y HIF-1β. La subunidad HIF-1α es sintetizada constitutivamente en los tejidos gracias a factores de crecimiento y otras moléculas que activan la vía de las PI3K-mTOR o la vía RAS-RAF-MEK-ERK. Sin embargo, cuando los niveles de oxígeno son los correspondientes a los ambientales, HIF-1α es degradada rápidamente (24). Más específicamente, en condiciones de normoxia HIF-1α es hidroxilada en sus residuos prolina por las enzimas prolihidroxilasas (PHD). Esta modificación postraduccional le permitirá luego interactuar con la proteína von Hippel-Lindau (VHL), favoreciendo su poliubiquitinación y posterior degradación proteosomal. Paralelamente, se establece un segundo nivel de regulación mediada por el factor inhibidor de HIF (FIH), quien hidroxila un residuo asparraginil

en el segmento C-terminal de HIF, para impedir el reclutamiento de coactivadores transcripcionales (25). Al disminuir los niveles de oxígeno, la actividad de las PHD y FIH se reduce, incrementando la estabilidad de HIF-1 α citoplasmática. Luego, HIF-1 α dimeriza con HIF-1 β y el complejo proteico transloca al núcleo para unirse a los elementos respondedores de oxígeno de las secuencias blanco junto a coactivadores (como CBP/p300) (26)(Esquema 4). Los mecanismos regulatorios de la expresión proteica de HIF-1 α son múltiples y variados, incluyendo regulaciones transcripcionales, post-transcripcionales y postraduccionales, lo cual evidencia la importancia de este factor de transcripción en las funciones celulares en condiciones fisiológicas y patológicas (24, 27).



Esquema 4: Regulación del factor de transcripción HIF-1: Bajo Condiciones de normoxia HIF-1 α es hidroxilado por las PHD y se une a la proteína VHL, quien promueve la poliubiquitinación de HIF-1 α y su degradación. La ausencia de oxígeno previene la hidroxilación de HIF-1 α y su estabilización. Luego HIF-1 α se asocia a HIF-1 β y al cofactor p300/CBP. El complejo HIF-1 induce la transcripción de genes. Adaptado de Józwiak y col. *Frontiers in Endocrinology*, 2014.

HIF-1 regula la transcripción de diversos genes incluyendo eritropoyetina, el transportador de glucosa GLUT-1, adrenomodulina, IGF-2, óxido nítrico sintetasa, VEGF, entre otros. VEGF es uno de los genes diana más relevantes y una pieza clave en los eventos de NV (28).

Este factor trófico tiene múltiples funciones al actuar sobre neuronas y CEs en condiciones de salud y enfermedad (29, 30). En el ambiente hipóxico los niveles de VEGF se encuentran notablemente incrementados, siendo el principal responsable de la supervivencia endotelial, su migración y proliferación (31). Hoy, a pesar de que los tratamientos anti-VEGF presentan mejores resultados clínicos que otros tratamientos alternativos, los oftalmólogos han detectado que cada paciente responde diferencialmente al mismo esquema de administración. Más aún, ellos han observado que algunos pacientes han perdido agudeza visual luego del tratamiento crónico con anti-angiogénicos (32, 33). Dos posibles explicaciones pueden esclarecer estas observaciones: por un lado, otras proteínas involucradas en NV, inflamación, tono vascular y metabolismo tienen roles críticos en el desarrollo de la patología, por lo que la inhibición de VEGF resultaría insuficiente para restablecer la homeostasis retinal y regresar la NV en el ambiente hipóxico. Por otro lado, VEGF también posee receptores sobre neuronas, ejerciendo acciones neurotróficas y, por lo tanto, su depleción tendría efectos nocivos sobre la supervivencia y/o sobre la funcionalidad neuronal (34).

Consecuentemente, muchos investigadores han diseñado nuevas estrategias farmacológicas para abordar la NV a través de la modulación de diferentes proteínas o vías. Basados en múltiples estudios llevados a cabo en el campo de la angiogénesis tumoral, recientemente se ha postulado que la autofagia podría tener un rol importante como herramienta terapéutica en la medicina clínica (35).

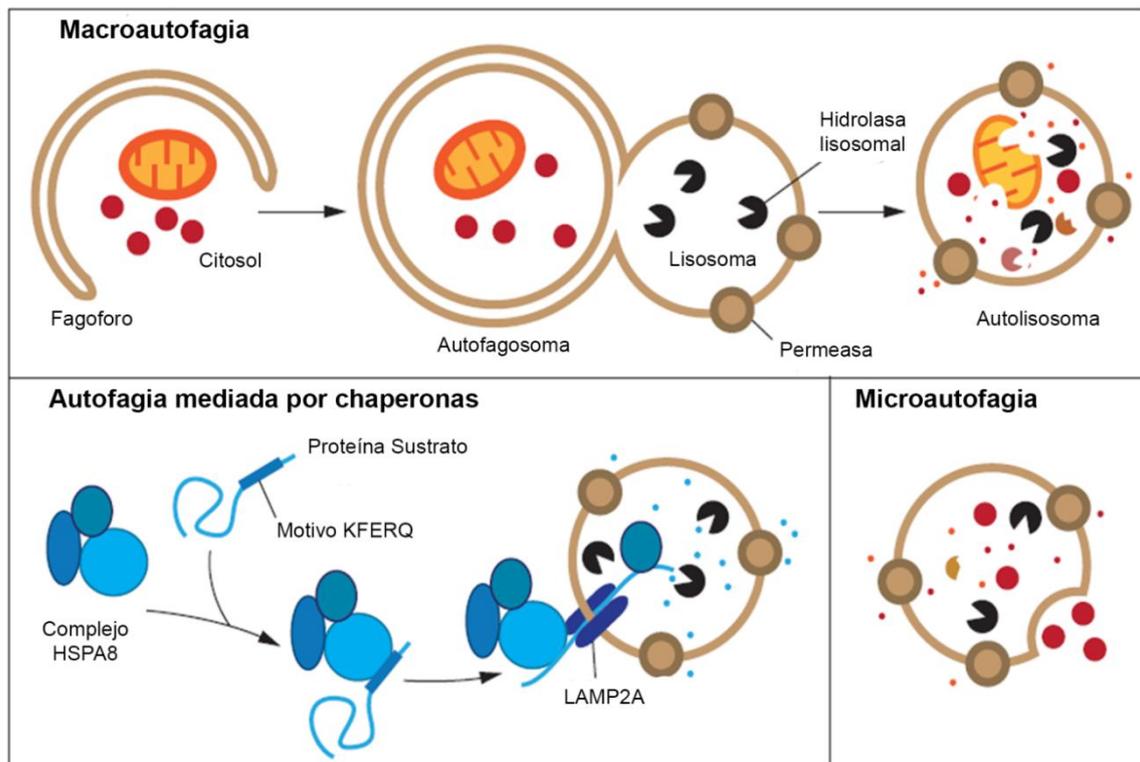
I.III. Autofagia: Mecanismo

El término "autofagia", que proviene del griego y significa "comerse a sí mismo", fue implementado en la biología celular desde mediados de los años 60, de la mano de Christian de Duve. En una primera instancia, la autofagia permitió discriminar a los procesos degradativos de componentes presentes en el citoplasma celular dentro de lisosomas, de aquellos cuyo contenido provenía del espacio extracelular y era incorporado a la vía degradativa por endocitosis (heterofagia) (36). Desde entonces, sucesivos estudios han identificado a las proteínas participantes en este mecanismo y redefinido el concepto de autofagia. En la actualidad, es considerado un sistema de control de calidad que permite mantener la homeostasis celular mediante el reciclado de sus componentes a través de la captación de proteínas, organelas dañadas y otros sustratos que se encuentren eventualmente en el citosol (37). Conjuntamente con el proteosoma, constituyen los dos sistemas catabólicos más importantes, previniendo la acumulación de elementos no deseados en el citoplasma

celular. Si bien cada sustrato frecuentemente es degradado por una de estas vías en particular, las alteraciones en uno de los sistemas catabólicos podrían ser parcialmente compensadas por un aumento en la actividad del otro sistema.

Todas las células poseen un flujo autofágico basal, el cual será dependiente del tipo celular, el estadio del desarrollo y del metabolismo de la célula. Diferentes estresores (ayuno, hipoxia, hiperoxia, hiperglucemia, estrés oxidativo, deprivación de factores tróficos, infecciones intracelulares, entre otros) pueden producir cambios en el flujo autofágico a fin de restablecer la homeostasis (38). Se han definido tres tipos de autofagia, de acuerdo al mecanismo por el cual el cargo es identificado y entregado al compartimento lisosomal para su degradación (Esquema 5) (39):

- Autofagia mediada por chaperonas: participa en la degradación de proteínas citosólicas que posean una secuencia consenso KFERQ a través su incorporación directa al lisosoma. Las proteínas son reconocidas y desplegadas por un complejo formado por las chaperonas de shock térmico de 70KDa 8 (HSC70) y otras co-chaperonas. Las proteínas desplegadas son luego introducidas al lumen de los lisosomas por complejos oligoméricos formados por LAMP-2A. Interesantemente, más de un cuarto de las proteínas que se encuentran en el citosol poseen una secuencia KFERQ (40).
- Microautofagia: proceso por el cual el cargo es incorporado al lisosoma por invaginación de su membrana. Recientemente, se ha descrito una variante de este proceso: la microautofagia endosomal, en la cual el cargo es incorporado a endosomas tardíos (41).
- Macroautofagia: implica la formación *de novo* de una vesícula de doble membrana (denominada autofagosoma) que englobará el cargo a degradar presente en el citoplasma. Luego el autofagosoma puede fusionarse con endosomas tardíos para formar anfisomas, o bien fusionarse a lisosomas constituyendo autolisosomas. En este último estadio, tanto el contenido vesicular, como la membrana interna del autolisosoma serán degradados. En mamíferos, los autofagosomas pueden presentar un tamaño de 0,5 a 1,5µm.



Esquema 5: Tres tipos de autofagia en células de mamíferos. La macroautofagia se basa en la formación *de novo* de vesículas de doble membrana citosólicas, autofagosomas, para secuestrar y transportar el cargo a lisosomas. La autofagia mediada por chaperonas transporta proteínas no plegadas individuales directamente a través de la membrana lisosomal. La microautofagia involucra la captación directa del cargo a través de la invaginación de la membrana lisosomal. Los tres tipos de autofagia degradan el cargo y liberan los productos al citosol celular para su reutilización. Adaptado de Parzych y Klionsky, *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014.

Los tres mecanismos aseguran la completa degradación del cargo a aminoácidos, constituyendo una fuente de energía para la síntesis de nuevos componentes celulares o su reparación. En cuanto a la selectividad de sustrato, la autofagia mediada por chaperonas es la más específica, dado que sólo degradará proteínas que contengan el motivo KFERQ. Por el contrario, la micro- y la macro-autofagia pueden mediar la degradación de un componente citoplasmático específico (autofagia selectiva) o bien de una porción de citoplasma conteniendo diversos elementos (autofagia no selectiva). Cuando la autofagia es selectiva, el proceso será denominado de acuerdo al sustrato objeto de degradación. Ejemplos de ello son: la mitofagia (autofagia específica de mitocondrias), pexofagia (de peroxisomas), agrefagia (agregados proteicos), lisofagia (lisosomas, generalmente dañados), reticulofagia (porciones de retículo endoplasmático), entre otros (38).

Cabe destacar que el único tipo de autofagia que requiere de la formación de una vesícula es la macroautofagia, para lo cual se requerirá de múltiples proteínas que asistan en las distintas etapas de su formación. Importantes contribuciones del biólogo Ohsumi permitieron

identificar algunas de las proteínas de la maquinaria autofágica en levaduras: las ATG (del inglés AuTophagy related genes) (42), luego se identificaron sus homólogos en mamíferos y otros reinos. Notablemente, las proteínas mantenían una elevada similitud, sugiriendo que es un mecanismo altamente conservado durante la evolución. El proceso de formación del autofagosoma comienza con una porción de membrana muy pequeña, cuyo origen puede ser mitocondrial, de la membrana plasmática, Golgi o retículo endoplasmático y un complejo de inducción constituido por las proteínas ULK1, ATG13, RB1CC1/FIP200 y ATG101. En las condiciones óptimas de nutrientes, el complejo de iniciación se mantiene unido a mTOR (del inglés, mammalian target of Rapamycin), quien fosforilará a ULK1 y ATG13, inactivándolo. En condiciones de ayuno, en cambio, mTOR se desvincula del complejo de iniciación y lo deja libre para iniciar la formación de los autofagosomas (43). Similarmente, AMPK pueden activar al complejo de iniciación que contiene ULK1 a través de la inhibición de mTOR o por fosforilación directa a ULK1 (44). En sitios específicos del retículo endoplasmático se conforma la primera estructura, el omegasoma, la cual se expandirá gracias a la incorporación de fosfatidil inositol 3 fosfato (PI3P) por un segundo complejo de proteínas (45). Dicho complejo denominado complejo 1 de PI3K clase 3 está formado por Vsp34, Beclin-1, ATG14L y Vsp15. ULK1 fosforilará a Beclin-1 y ATG14L, incrementando la actividad PI3 quinasa del complejo. La incorporación de PI3P al RE actúa como señal para reclutar a otras proteínas involucradas en el proceso autofágico. A continuación intervienen dos sistemas con actividad similares a ubiquitina. En el primero, las enzimas ATG7 (similar a E1) y ATG10 (similar a E2) catalizarán la unión covalente de ATG12 a ATG5. Luego la unión de ATG16L1 a ATG5 favorece la formación de un homodímero de ATG12-ATG5-ATG16L1 que puede asociarse a la membrana del fagoforo en formación. En el segundo sistema similar a ubiquitina, la proteína precursora de LC3 será sustrato de una serie de reacciones en cadena en las que participan ATG4, ATG7 (similar a E1) y ATG3 (similar a E2) para dar origen a LC3-I. Seguidamente el complejo ATG12-ATG5-ATG16L1 actúa como una E3 ligasa catalizando la incorporación de fosfatidiletanolamina a LC3-I dando como producto LC3-II. LC3-II puede incorporarse a ambas membranas del fagoforo y unirse a receptores que posean una región de unión a LC3 (LIR) (39). Los receptores (o proteínas adaptadoras) serán los encargados de reconocer los elementos a degradar y facilitar su incorporación dentro del autofagosoma. Un ejemplo de receptor es p62, quien es capaz de reconocer proteínas ubiquitinadas. Dado que p62 es degradado conjuntamente con el contenido del autofagosoma, también es frecuentemente empleado como un reportero para indagar cambios en el flujo autofágico (46). Finalmente, una vez englobado el cargo, el fagoforo se cierra conformando el autofagosoma propiamente dicho.

En este apartado hemos destacado las proteínas principales involucradas en la biogénesis del autofagosoma, sin embargo, se han descrito muchas otras que participan tanto en las etapas de formación como en las siguientes hasta alcanzar su fusión con los lisosomas. Además, en mamíferos se han descrito varias isoformas de las proteínas ATG y LC3, sugiriendo que es un mecanismo altamente regulado y redundante, necesario para la vida (47, 48).

En cuanto a los estímulos hipóxicos, existen tres vías de señalización independientes que pueden modificar el flujo autofágico (49):

- Vía HIF-1, quien induce la transcripción de BNIP3. BNIP3 es una proteína que disocia la interacción entre Beclin-1 con BCL-2, induciendo el flujo autofágico.
- Vía PKC γ , que activa la vía de JNK1, también responsable de la desvinculación de BCL-2 y Beclin-1.
- Vía desfosforilación de mTOR.

I.IV. Autofagia en el desarrollo retinal

La importancia del flujo autofágico durante el desarrollo de los mamíferos ha sido claramente evidenciada a través del empleo de ratones KO homocigotas para alguna de las proteínas participantes en la vía. De acuerdo con la proteína eliminada se ha observado muerte intrauterina o perinatal, sugiriendo que la ausencia de autofagia no es compatible con la vida (50). Mediante otras técnicas *in vitro* o *in vivo*, se ha podido develar la participación de la autofagia durante el desarrollo neuro-vascular.

Uno de los principales roles atribuidos a la autofagia durante el desarrollo corresponde a la muerte celular programada que contribuye a una morfogénesis apropiada del tejido. En el sistema nervioso, las células gliales y precursores neuronales proliferan activamente y se diferencian. Luego es necesario que algunas células degeneren a fin de conservar solo aquellas que establezcan conexiones específicas (51). En la retina, Guimaraes y col. evidenciaron que tanto la autofagia como la apoptosis están involucradas en la eliminación de neuronas no requeridas. Notablemente, algunas vías de señalamiento que activan la muerte son comunes para ambos mecanismos, mientras que otras son específicas (52). Aun así, la totalidad de la muerte celular no puede ser explicada únicamente por estos mecanismos descritos, por lo que futuros estudios deberán ahondar en otros procesos de muerte. Una vez que las células degeneran, macrófagos y otros fagocitos se encargan de remover los desechos resultantes. Al respecto, la autofagia asegura la secreción de ATP necesaria para exponer residuos de

fosfatidil-serina en la porción externa de la membrana plasmática, señal requerida para la fagocitosis de los cuerpos apoptóticos (53).

El conjunto de características que define a un tipo celular en particular se adquiere mediante la diferenciación. Las células ganglionares son las primeras en iniciar su diferenciación y para obtener el fenotipo final será esencial que experimenten una reprogramación metabólica, es decir, el cambio de fosforilación oxidativa a glicólisis anaeróbica. Recientes estudios demuestran que el cambio en el metabolismo es gatillado por un incremento en los niveles de mitofagia en condiciones de hipoxia (54). Este novedoso hallazgo denota que la maquinaria autofágica puede vincular la degradación de un sustrato con procesos metabólicos celulares.

Hacia el final de la maduración retinal, se distinguen dos sucesos vasculares simultáneos: la involución de la vasculatura hialoidea y el establecimiento de los plexos definitivos. La regresión de la vasculatura inicial provisoria deberá estar regulada por mecanismos de muerte celular programada que remuevan el tejido excedente sin afectar la homeostasis retinal. Se ha observado elevados niveles de LC3B II acompañados de caspasa 3 clivada en la vasculatura hialoidea durante el período de involución. Dado que Rapamicina acelera la regresión de la estructura vascular transiente, es factible que la autofagia colabore en la muerte de dichas células endoteliales (55). Paralelamente, en embriones de pollo se ha demostrado que la inducción o inhibición farmacológica de la autofagia altera las uniones intercelulares entre células endoteliales, afectando la vasculogénesis retinal (56). En consonancia, ATG7 sería determinante en la tubulogénesis, debido a que regula la expresión de laminina 5 en la matriz extracelular (57).

La arquitectura y funcionalidad retinal es alcanzada luego de una serie de etapas finamente reguladas durante el desarrollo. De acuerdo a los antecedentes anteriormente expuestos, la autofagia podría modular diversos procesos, dependiendo del tipo celular y el estadio madurativo analizado.

I.V. Autofagia en las retinopatías isquémicas

En condiciones fisiológicas, la autofagia cumple funciones como mecanismo de control de calidad eliminando proteínas mal plegadas, agregados proteicos y organelas dañadas. Metabólicamente, asegura la provisión de energía necesaria para la célula ya que los productos obtenidos de la degradación lisosomal pueden ser reutilizados para la síntesis de nuevos compuestos. Cuando una injuria sobreviene, frecuentemente se observa un

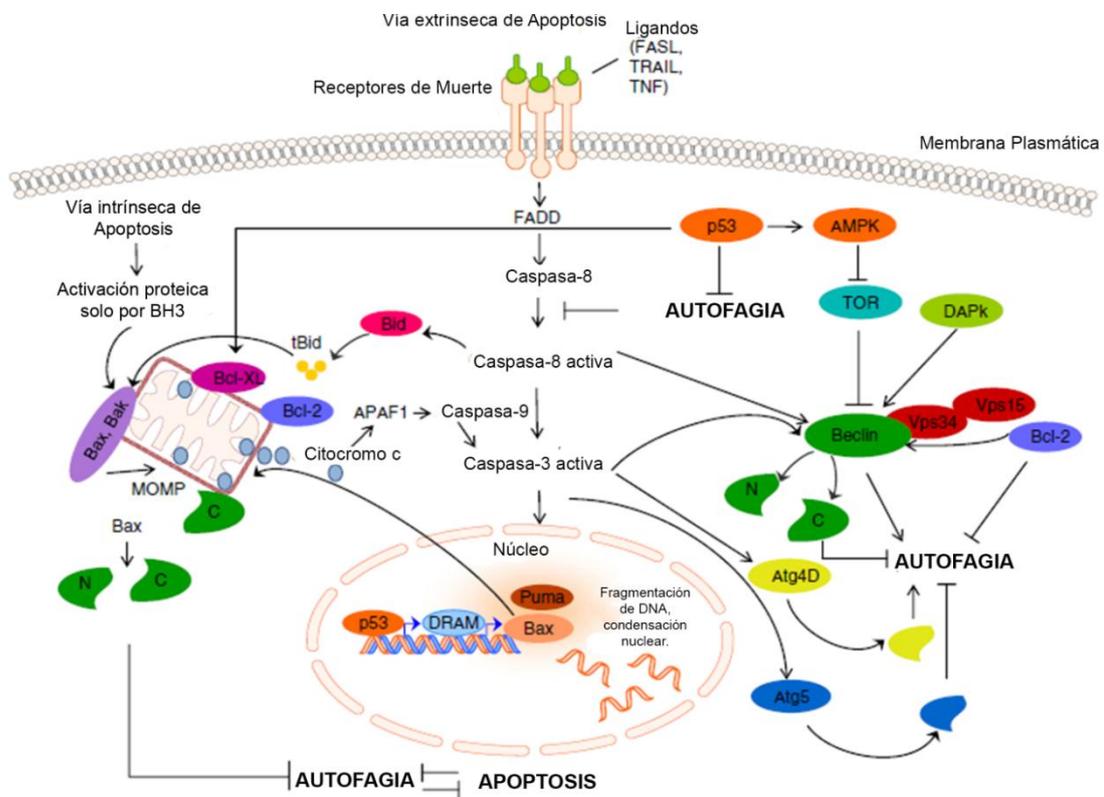
incremento en el flujo autofágico como medida protectora, a fin de restablecer la homeostasis y proveer nutrientes para cubrir las demandas celulares. Sin embargo, esta respuesta no es ubicua a todas las condiciones patológicas retinales, y bajo ciertas condiciones, el incremento en los niveles proteicos de LC3B II podrían correlacionarse con muerte celular. De hecho, se define como *muerte celular dependiente de autofagia* al proceso por el cual la maquinaria autofágica contribuye a la pérdida de viabilidad celular (58). Es por ello que los estudios no sólo deben indagar acerca de los cambios en el flujo autofágico, sino que también a determinar el rol de la autofagia en el contexto analizado. Distintos modelos animales y celulares de retinopatías isquémicas han mostrado variaciones diferentes en las proteínas de la vía autofágica, indicando que la respuesta retinal dependerá del estímulo.

En un modelo *in vivo* de isquemia-reperfusión, se ha observado que la activación de calpaínas escinde a beclin-1, disminuyendo por ende los niveles de LC3B II y ese decrecimiento en el flujo se ha correlacionado con un aumento en la muerte en células ganglionares (59). Ratas Sprague–Dawley inyectadas con estreptozotocina han mostrado incremento en los niveles de LC3B II las primeras semanas de diabetes, mientras que a tiempos más largos evidencian una disminución en dicha proteína (60). Similarmente, el mismo modelo de diabetes tipo I, en ratones, mostró un incremento progresivo de LC3A II, ATG5 y Beclin-1 en las capas plexiformes y segmentos externos de fotorreceptores hasta la semana 12 post inyección con estreptozotocina. Los cambios progresivos en las proteínas autofágicas acompañaron a cambios morfológicos y funcionales deletéreos para las neuronas de la retina (61). En el modelo murino de ROP, se registró una disminución significativa de los niveles de LC3B II e incremento de p62 entre P13 y P15 OIR, correspondiente al período de hipoxia relativa (62). En modelos de glaucoma *in vivo*, se ha observado incremento de LC3B II y el empleo de inhibidores de la vía previno, en parte, la muerte de células ganglionares, sugiriendo que el aumento en el flujo es deletéreo para la supervivencia neuronal (60, 63).

No obstante, el incremento en el número de autofagosomas en el citoplasma celular no siempre es indicativo de *muerte celular dependiente de autofagia*. Es posible que ante un estímulo se activen varios procesos simultáneamente, observándose a un dado tiempo mecanismos de muerte y supervivencia. Además, existe un entrecruzamiento entre autofagia y otras vías de muerte, complejizando aún más el análisis. La apoptosis y la autofagia mantienen una comunicación constante, pudiéndose antagonizar, cooperar o activarse independientemente (Esquema 6). Beclin-1 es una de las proteínas autofágicas más estudiadas en dicha interacción. Beclin-1 posee un dominio BH3 capaz de interactuar con BCL-2 o BCL-X_L favoreciendo la apoptosis; o bien interacciona con BAX y BAK a fin de inhibir la apoptosis. En

ambos casos, la capacidad de beclin-1 de inducir el flujo autofágico se observa disminuida. Adicionalmente, se ha demostrado que las caspasas escinden a proteínas de la maquinaria autofágica, entre ellas beclin-1, ATG4 y ATG5. Los fragmentos resultantes (el extremo C-terminal de beclin-1 y segmentos de ATG5) pueden migrar a las mitocondrias e inducir apoptosis (58). Adicionalmente, se ha descrito que la proteína p53 no sólo es capaz de activar apoptosis, sino también autofagia vía inhibición de mTOR (64).

La interacción entre la vía autofágica y necrosis todavía no ha sido completamente dilucidada. Una molécula clave en ambas vías parece ser PARP1, quien puede activar ambos procesos ante una injuria (65).



Esquema 6: Compleja interacción entre las vías de autofagia y apoptosis. Representación esquemática de algunos de las vías de señalización y los efectores involucrados en la activación de apoptosis y autofagia. Muchas de ellas constituyen vías comunes a ambos mecanismos, otras son específicas y pueden funcionar como puntos estratégicos, permitiendo a la célula decidir acerca de su destino en un contexto determinado. Adaptado de Nikolettou y col. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013.

Dado el rol dual de la autofagia, su modulación podría tener tanto efectos benéficos como deletéreos dependiendo del tipo celular retinal involucrado o el contexto de la enfermedad (50, 66, 67). Rapamicina y Resveratrol, dos inductores del flujo autofágico, son capaces de inhibir la NV retinal en modelos murinos vasoproliferativos (68, 69).

Por otro lado, fármacos actualmente empleados para tratar DM o las retinopatías isquémicas *per se* han demostrado tener efectos moduladores sobre la vía autofágica. Metformina, un hipoglucemiante comúnmente recetado a pacientes diabéticos, puede restaurar el flujo autofágico normal en CEs expuestas a niveles elevados de glucosa, mediante la modulación de la vía de Hedgehog (70). En la misma línea, a Atorvastatina se le adjudican efectos hipocolesterolémicos sistémicos y más recientemente, la capacidad de inducir el flujo autofágico y reducir la apoptosis (71). Además, dos inhibidores de la angiogénesis con usos *off-label* para retinopatías, Ranibizumab y Bevacizumab, incrementaron los niveles de LC3B-II en fibroblastos, aunque todavía no se conoce si dicho efecto también se replica en CEs (72). En resumen, es muy factible que los medicamentos que empleamos para un dado fin, también tengan efectos sobre otros mecanismos, incluida la autofagia. Resulta de gran interés y utilidad clínica develar los múltiples efectos de los fármacos, y más aún, estudiar qué eventos modulan en cada tipo celular. En las retinopatías isquémicas proliferativas, las CEs proliferan activamente, mientras que el componente neuronal degenera. Entonces, ¿ante el estímulo hipóxico, todos los tipos celulares modifican su flujo autofágico de igual manera?, ¿la administración de un inductor o inhibidor del flujo tendrá efectos benéficos sobre todas las células? Dado que las CGM son moduladoras de procesos neuronales y vasculares, en esta tesis estudiaremos cómo los cambios en su flujo autofágico impactan sobre los otros componentes celulares.

I.VI. Células gliales de Müller como moduladoras de los eventos retinales

En la retina madura, las CGM están situadas transversalmente a todas las capas nucleares y plexiformes, contactando sus pies (*endfeet*) con la cavidad vítrea y proyectando sus microvellosidades hacia el espacio subretinal. Estas células emiten proyecciones citoplasmáticas longitudinales que envuelven a otros tipos celulares como neuronas y vasos. Reichenbach y col. (73) describieron a las CGM como el centro de una subunidad columnar, la estructura anatómica y funcional más pequeña necesaria para la transducción de la señal visual. Las interacciones establecidas entre las células de una subunidad columnar garantizan la mantención de la homeostasis y la iniciación de una respuesta protectora en caso de generarse una injuria localizada.

La interacción entre neuronas y CGM es considerada una relación de beneficio mutuo. Esa aseveración se basa en el hecho de que ciertos procesos bioquímicos están regulados por algunas enzimas presentes en CGM y otras en neuronas. Adicionalmente, ciertas señales

necesitan una respuesta de retroalimentación proveniente de otros grupos de células. A pesar de que no todas las acciones de las CGM implican esta íntima interacción, se ha consensado que estas células cooperan en el procesamiento neuronal y su metabolismo, como se describe en los siguientes ejemplos:

- ❖ Proveen metabolitos energéticos a neuronas ya que sintetizan glicógeno por gluconeogénesis (74, 75).
- ❖ Recaptan y reciclan el glutamato a glutamina, devolviendo a las neuronas este sustrato necesario para la síntesis del neurotransmisor. Además, las CGM degradan GABA vía el ciclo del ácido cítrico (76).
- ❖ Sintetizan factores neurotróficos y factores de crecimiento que ejercen efectos proliferativos y aseguran la supervivencia de las neuronas y las células gliales (77).
- ❖ Mantienen el balance hidroelectrolítico del tejido retinal a través de la regulación de la concentración de iones y el pH del espacio extracelular (78).
- ❖ Participan en el reciclado de fotorpigmentos de fotorreceptores necesarios para llevar a cabo el ciclo visual (79).
- ❖ Guían el haz de luz, como una fibra óptica, directamente hacia conos y bastones, mejorando la agudeza visual (80).

Además, las CGM mantienen comunicación constante con otras células gliales. Las células de la microglia y las CGM conjuntamente son las encargadas de establecer una respuesta pro-inflamatoria en situaciones patológicas crónicas o agudas, incluyendo la síntesis de factores tróficos necesarios para la sobrevivencia neuronal luego de la injuria (81). Por otro lado, junto a pericitos, astrocitos y CEs, las CGM constituyen parte de la barrera hemato-retiniana, una estructura que le provee protección a la retina.

Paralelamente, se establece una interacción interesante entre las CGM y el endotelio. La disposición radial de las CGM facilita el contacto con la vasculatura en todos sus plexos, ya que sus proyecciones citoplasmáticas envuelven vasos de diferentes calibres. Durante la regresión de la vasculatura hialioidea, las CGM y las CEs cooperan remodelando la matriz extracelular mediante la secreción de metaloproteinasas y de factores tróficos requeridos para la angiogénesis de los plexos permanentes (82, 83). Una vez finalizado el proceso de formación de la vasculatura, las CGM secretan trombospondina-1 para arrestar la proliferación endotelial (84). La interacción glía-endotelio persiste en la madurez, con la principal función de regular el tono vascular, ya que la retina carece de inervación autónoma. Tanto CGM como astrocitos liberan sustancias bioactivas que contraen/dilatan los vasos (85, 86).

La evidencia anteriormente expuesta claramente demuestra que las funciones cumplidas por las CGM son necesarias para el correcto desarrollo y funcionamiento de la retina. Sin embargo, múltiples procesos que se llevan a cabo en las CGM son alterados en las retinopatías isquémicas.

I.VII. CGM en la respuesta inflamatoria

Las células gliales son capaces de detectar sutiles modificaciones en el microambiente retinal y comunicar mensajes de alarma a células distantes a través de citocinas y quemocinas. Las CGM son inmunocompetentes y junto a la microglia y los astrocitos, están a cargo de la defensa de la retina y de mantener el balance de las respuestas pro- y anti-inflamatorias. Muchos investigadores han descrito que las interacciones entre los monocitos residentes, CGM y astrocitos son esenciales para la modulación de la expresión de genes y para mediar las distintas respuestas de las células gliales. Las CGM secretan el factor neurotrófico derivado de la glía (GDNF), factor inhibidor de leucemia (LIF) y citocinas, y además experimentan cambios morfológicos cuando son cultivados con la microglía activada (87). Adicionalmente, estudios *in vitro* han revelado que niveles elevados de glucosa inducen la síntesis y secreción de IL-1 β por CE y ésta molécula luego incrementa la expresión de IL-1 β de manera autócrina pero también parácrina en CGM y astrocitos (88). Muchos investigadores postulan que esta citocina es un regulador clave en la respuesta inflamatoria, pero también en la recaptación de glutamato por parte de las CGM. Bajo condiciones hipóxicas, IL-1 β mediaría la disminución de la expresión del transportador de glutamato-aspartato (GLAST) en CGM a fin de prevenir la excesiva transformación del glutamato liberado por las neuronas en degeneración a glutamina (89). Por otro lado, nuevos estudios demuestran que las células microgliales, pero no CGM ni astrocitos, sintetizan y secretan IL-17A cuando son expuestas a hipoxia. En tanto, las CGM expresan el receptor para dicha citocina, y su interacción induce la secreción de VEGF (90).

I.VIII. Gliosis

Las CGM tienen una sorprendente resistencia a las injurias debido a su activo metabolismo, el cual facilita la depuración de proteínas y organelas alteradas, la reparación de estructuras dañadas y la neutralización de ROS. La primera respuesta a un estímulo externo es la gliosis reactiva. Este proceso se lleva a cabo en estadios tempranos de las patologías, cuando las primeras alteraciones retinales son detectadas por las CGM, y se considera una respuesta

protectora. La gliosis reactiva es definida como cambios bioquímicos y morfológicos que las células gliales experimentan en la zona de daño. Específicamente, en las GCM los cambios incluyen hipertrofia, aumento de la expresión de filamentos intermedios y en algunos casos proliferación (91). Un evento clave en la gliosis es el aumento en la expresión de GFAP y vimentina. El incremento en filamentos intermedios es una respuesta inespecífica a una gran variedad de estímulos y es acompañada por otros eventos que reflejan un cambio en el estado de las células gliales. En particular, el incremento en los filamentos intermedios es una estrategia para prevenir lesiones mecánicas en la neuroretina (92). En modelos animales de ROP y edema retinal inducido por hipoxia, se observó un incremento de los niveles de GFAP en astrocitos y CGM (93). Similarmente, las CGM incrementan la expresión de nestina cuando se expone la retina a bajos niveles de oxígeno (94).

La gliosis constituye una respuesta beneficiosa en presencia de daño reducido pues las células gliales pueden activar mecanismos protectores para las neuronas. En este caso, no se observan grandes cambios en las CGM, y por lo tanto, a esta condición se la refiere como gliosis “conservativa”. Sin embargo, la gliosis persistente (denominada “gliosis masiva”) es considerada un signo de daño extenso y una respuesta excesiva al estímulo, pudiendo ser perjudicial para el tejido retinal. Por ejemplo, un daño severo causado por hipoxia induce un incremento en GFAP y reducción de la expresión de GS durante la progresión de la patología del modelo murino de OIR. Este resultado se correlaciona con un aumento en el número de células TUNEL positivas a lo largo del tiempo, sugiriendo una contribución de la gliosis reactiva en la neurodegeneración (95). Por lo tanto, la respuesta de la macroglia será protectora siempre que los mecanismos relacionados a la actividad glial den origen a señales de rescate/reparación. Sin embargo, la respuesta debe ser silenciada eventualmente, de lo contrario la misma contribuirá al daño retinal.

I.IX. Factores Tróficos

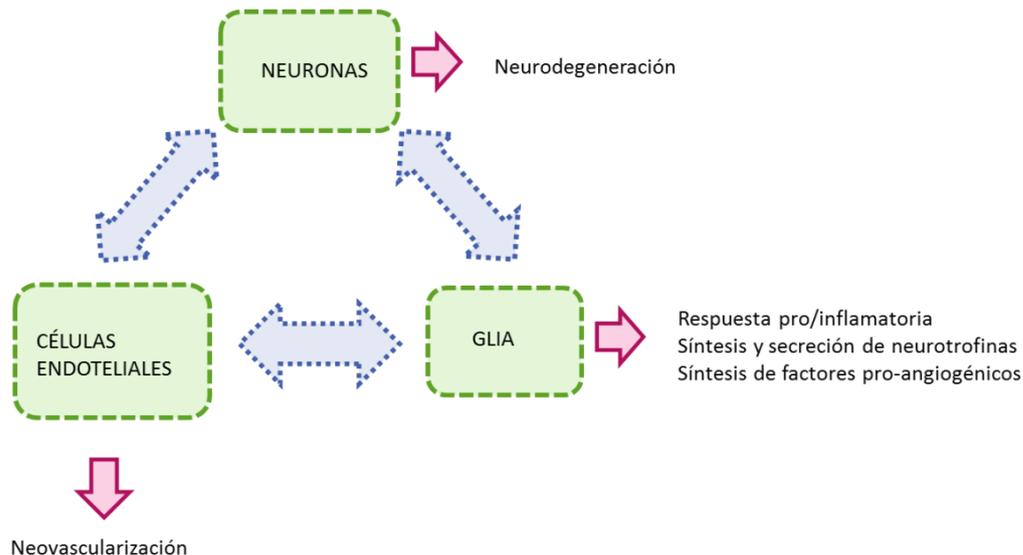
La supervivencia y el buen desempeño de las células nerviosas en la retina adulta está supeditada a la presencia de pequeñas cantidades de factores tróficos, principalmente secretados por células de la macroglia y de la microglia. Las acciones ejercidas por estas moléculas en neuronas y CEs pueden ser directas o indirectas, mediante su interacción con diferentes receptores. Sin embargo, concentraciones anormales de las formas maduras de los factores tróficos, así como la presencia de pro-formas o variaciones en la expresión de sus receptores pueden cooperar en el desarrollo de las patologías oculares isquémicas. Las CGM

son capaces de sintetizar factores tróficos y de regular su disponibilidad en el espacio extracelular. El más estudiado hasta el momento es VEGF, una glicoproteína unidora de heparina, la cual posee 5 isoformas (VEGF-A, -B, -C, -D y -E) originadas por *splicing* alternativo de un gen común. Estas moléculas interactúan con receptores de membrana (principalmente VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3) y co-activadores para transducir señales intracelulares, las cuales median distintos efectos dependiendo de la isoforma de VEGF y el receptor involucrado (96).

En la vida intrauterina, VEGF comanda la vasculogénesis sistémica mediante la inducción de la proliferación y diferenciación de las CEs para establecer los plexos arteriales y venosos. La adquisición de la arquitectura vascular correcta depende de la expresión espacio temporal del VEGF y su concentración. Altos niveles de VEGF estimulan la diferenciación arterial, mientras que niveles bajos están involucrados en la formación de los vasos venosos. Más aún, una fuerte reducción del señalamiento de VEGF mediante bloqueo de su receptor genera muerte de CEs o arresto del crecimiento vascular (97). En la retina, la vasculatura hialoidea primaria es reemplazada por la definitiva siguiendo un gradiente de hipoxia generado por el incremento en la actividad metabólica. Las células macrogliales detectan la baja concentración de oxígeno y secretan transientemente esta molécula vasoformativa en respuesta a la demanda de oxígeno (98). Además de las CGM, otras células que contribuyen a la síntesis y liberación de VEGF son las CEs, astrocitos, el epitelio pigmentario y las células ganglionares (99).

El señalamiento autócrino y parácrino de VEGF ha sido descrito como un factor clave en el desarrollo y la progresión de múltiples patologías. En las retinopatías isquémicas, VEGF constituye la proteína que más daño puede inducir debido a sus propiedades pro-angiogénicas. Resultados de nuestro grupo mostraron que, en el modelo OIR, las terapias anti-VEGF controlan selectivamente la NV sin mejorar otras alteraciones como el daño neuronal, la gliosis reactiva o la funcionalidad retinal (95). Sin embargo, a concentraciones fisiológicas VEGF constituye un factor neuroprotector frente a potenciales injurias (67). Por lo que surge el siguiente dilema: ¿cómo modular correctamente los niveles de VEGF en cada paciente para favorecer la regresión de la NV sin inducir daño neuronal? Algunos investigadores han propuesto como estrategia suprimir o reducir el VEGF secretado específicamente por las CGM, ya que podría estar involucrado en la expresión de factores pro-inflamatorios incluyendo TNF- α y moléculas de adhesión intercelular (ICAM-1) (99, 100). La contribución minoritaria de otras células retinales es insuficiente para gatillar las alteraciones anteriormente mencionadas.

Los estudios en tejidos, ya sea *in vivo* o *ex vivo*, poseen la ventaja de poder indagar las respuestas celulares en un contexto donde se establecen múltiples interacciones intercelulares. El diálogo entre células de igual o distinto tipo puede condicionar la respuesta al estímulo estudiado. Como mencionamos anteriormente, la disposición transversal de las CGM les permite interactuar con células presentes en todas las capas de la retina neural, modulando procesos de distinta índole. Es por ello que cambios en las respuestas de las CGM pueden modificar eventos que ocurran a nivel vascular, neuronal o glial (Esquema 7).



Esquema 7: Esquema representativo de los eventos que se llevan a cabo durante las retinopatías isquémicas. Las flechas rosadas indican procesos que suceden en cada tipo celular en particular. Las flechas celestes denotan que dichos eventos pueden ser modulados o tienen impacto sobre los demás componentes celulares.

Dado que la autofagia es un mecanismo de reciclado activado en condiciones de hipoxia, y que variaciones en el flujo se relacionan directamente con la supervivencia celular, es posible que la inducción o inhibición de este proceso en las CGM tenga efecto sobre los eventos vasoproliferativos y neurodegenerativos retinales. A lo largo de esta tesis intentaremos dar respuesta a algunos interrogantes relacionados al rol de la autofagia en el modelo murino de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) y determinar si su modulación podría mejorar la funcionalidad retinal, la gliosis y prevenir la muerte neuronal. Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra hipótesis es que el flujo autofágico participa en eventos proliferativos (NV), de estrés glial y neurodegenerativos en retinopatías isquémicas y su modulación, específicamente en las CGM, tiene un rol relevante en la reversión de alteraciones vasculares y no vasculares en condiciones de hipoxia.

II. Objetivos

Objetivo General:

Analizar el rol de la autofagia durante la NV y neurodegeneración retinal en un modelo experimental de retinopatía inducida por oxígeno (OIR), el cual reproduce la Retinopatía del Prematuro y algunos aspectos de la Retinopatía Diabética Proliferativa.

Específicos:

II.I. En el modelo *in vivo* (OIR) se propone:

- a) Investigar la expresión, localización y distribución de marcadores de autofagia, en el tejido retinal;
- b) Correlacionar el proceso autofágico con la NV, estrés glial y funcionalidad neuronal;
- c) Modular el proceso de autofagia a través de la administración intravítrea de inductores e inhibidores farmacológicos de autofagia evaluando los procesos neovasculares, el estrés glial y la neurodegeneración retinal;
- d) Investigar el efecto de inhibidores de VEGF sobre el mecanismo de autofagia, luego de la administración por vía intravítrea.

II.II. En el modelo *in vitro*: empleando principalmente la línea de células gliales humanas de Müller, MIO-M1, en condiciones de normoxia e hipoxia y bajo estímulo con Cloruro de Cobalto (hipoxia química).

- a) Investigar el efecto de hipoxia así como de hipoxia química sobre la vía autofágica evaluando los niveles de expresión de las proteínas citosólicas LC3/Atg8, p62, entre otras;
- b) Determinar si la modulación del flujo autofágico en las CGM afecta su viabilidad celular, el estrés glial y su capacidad de inducir NV en condiciones de hipoxia.

III. Resultados

Modelo IN VIVO

“Investigar implica desafiarse constantemente” María C. Paz

III.I. Hipoxia induce el flujo autofágico durante la etapa de NV en el modelo de OIR

La autofagia es un proceso estrictamente regulado que juega un rol esencial en el desarrollo, crecimiento y muerte (101). En el sistema nervioso este proceso ha sido ampliamente estudiado debido a que se encuentra frecuentemente desregulado durante eventos de neurodegeneración y NV (102-104). Al respecto, el modelo de OIR constituye una plataforma experimental para examinar el rol de la hipoxia en la patogénesis de la NV, neuroinflamación, estrés oxidativo y respuesta neurovascular (105). Por lo tanto, con el objetivo de estudiar el flujo autofágico, determinamos la expresión de los marcadores clásicos de autofagia a tres tiempos relevantes en el modelo murino OIR (Figura 1A). Dado que el modelo presenta un período hiperóxico y otro de hipoxia relativa, y que asociados a estos eventos se observan procesos de NV y neurodegeneración, el análisis cronológico será importante para determinar en qué procesos participa activamente la autofagia. Los tiempos evaluados fueron:

- ❖ P12: salida de la cámara de hiperoxia (momento en el que se sensa la hipoxia relativa).
- ❖ P17: máxima NV.
- ❖ P26: regresión de la NV.

Además, nuestro grupo ha demostrado previamente un incremento en el número de células TUNEL positivas desde P12 hasta P26 en ratones OIR (95), evidenciando que en ambas etapas del modelo existe un marcado daño neuronal.

Cómo se ha descrito previamente, la inmunomarcación de vasos sanguíneos con lectina GSA-IB4 muestra, a P17 OIR, una zona central avascular (VO) además de los típicos ovillos neovasculares vitreoretinales, los cuales no se observaron en los controles P17 mantenidos en oxígeno ambiental (RA) (Figura 1B). La formación de los ovillos capilares está regida por los elevados niveles de VEGF secretado por las células retinales en condiciones hipóxicas (6). En nuestras condiciones experimentales confirmamos el incremento en la expresión proteica de VEGF a P17 OIR, durante el pico de NV (Figura 1C). Otra proteína cuya expresión es modulada por el factor de transcripción HIF-1 es Glut-1, un transportador vitamina C y de glucosa independiente de insulina. Este receptor es expresado en múltiples células de la retina, principalmente en la vasculatura madura y en CGM (106). Por ensayos de Western blot e inmunofluorescencia observamos un aumento significativo en los niveles proteicos de Glut-1 a P17 OIR (Figura 1D), principalmente en CEs y de la neuroretina (Figura 1 E).

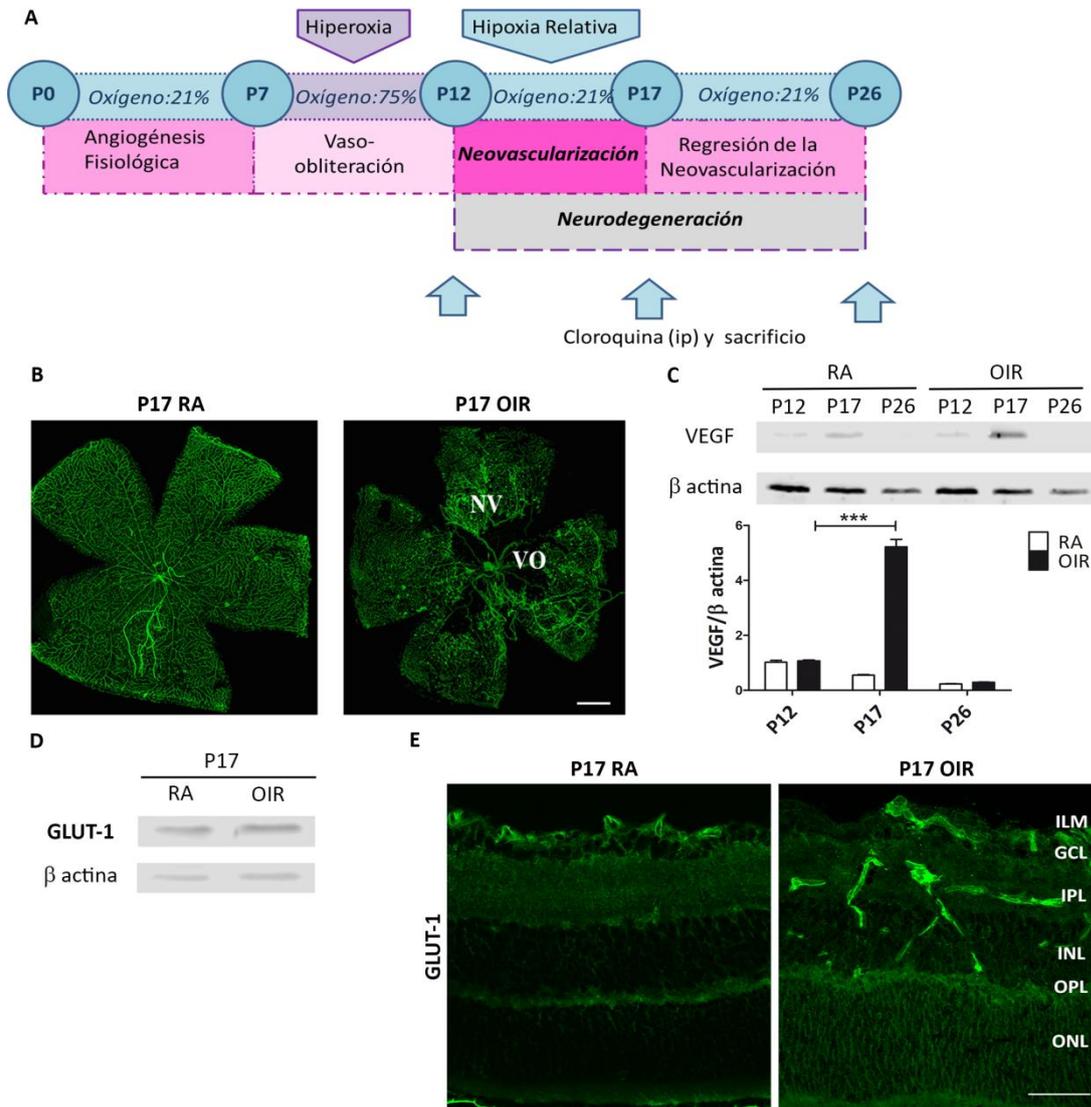


Figura 1: Modelo de Retinopatía inducida por oxígeno: **A)** Esquema representativo del modelo murino de OIR, con los días experimentales distintivos durante el desarrollo de la patología. Ratones neonatos y sus madres fueron mantenidos en condiciones de aire ambiental (RA) desde el nacimiento (P0) hasta P7. A P7 fueron expuestos a 75% de oxígeno, el cual inhibe el crecimiento vascular retinal y genera VO significativa. Luego fueron retornados a RA a P12, tiempo en el cual las retinas vasculares se tornaron hipóxicas, induciendo tanto el crecimiento vascular normal como la respuesta neovascular patológica. NV alcanza su punto máximo a P17. Inmediatamente después, el modelo regresa y los cambios vasculares resuelven hacia P26. **B)** Imágenes representativas de *flat-mount* de retinas a P17 evidenciando la tinción de CE con GSA-IB4 en ratones RA y OIR. Las áreas con VO y NV son indicadas en las imágenes. Escala: 500 μ m. **C)** *Western blot* representativo y correspondiente cuantificación densitométrica de VEGF en extractos de retina neural de ratones RA y OIR. β -actina fue empleada como control de carga. Los gráficos muestran el resultado de 3 experimentos independientes. **D)** *Western blot* de GLUT-1 en extractos de retina neural de ratones RA y OIR a P17. Se empleó β -actina como control de carga. **E)** Inmunofluorescencia representativa de GLUT-1 (verde) en criocortes de ojos de ratones P17 RA y OIR. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa; NV, neovascularización; VO, vasoobliteración. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. *** p < 0.001. Los gráficos muestran el resultado de 3 experimentos independientes.

Las células post mitóticas, particularmente neuronas, son altamente dependientes de sus mecanismos de degradación porque proveen vías de eliminación de sus residuos metabólicos, lo cual asegura la homeostasis celular. En la actualidad se sabe que la retina posee un elevado flujo autofágico debido a la constante exposición a la luz que incrementa la producción de especies reactivas de oxígeno (107). Debido a la rápida degradación vesicular, resulta complejo visualizar los autofagosomas en el citoplasma celular y detectar cambios entre las condiciones. Es por ello, que para facilitar el estudio del flujo autofágico en el modelo OIR, decidimos bloquear la fusión de los autofagosomas con lisosomas y su posterior degradación con una única inyección intraperitoneal de cloroquina (CQ) 4 horas previas al sacrificio. El tratamiento permite acumular en el citoplasma celular los anfisomas formados en dicho período.

Por ensayos de Western blot, se determinaron los niveles proteicos retinales de LC3B y p62 a cada uno de los tiempos evaluados, tanto en ratones OIR como controles RA (Figura 2A). El análisis cuantitativo de las bandas reveló un ligero incremento en los niveles proteicos de LC3B II en ratones OIR, los cuales se vieron marcadamente incrementados a P17 (pico de la NV), retornando a niveles basales a P26. En nuestras condiciones experimentales, el incremento LC3B II en extractos de retina se asoció con un incremento, aunque no estadísticamente significativo, de los niveles proteicos de p62 (Figura 2A y B). A fin de ahondar en la regulación del flujo autofágico en el tiempo en el cual se detectaron los cambios más significativos (P17), se llevaron a cabo *Western blot* adicionales en ratones con y sin CQ (Figura 2C). El análisis cuantitativo reveló un incremento, aunque no estadísticamente significativo, de los niveles proteicos de LC3B II y p62 a P17 OIR inyectados con vehículo, comparado con ratones RA vehículo. Luego del tratamiento con CQ, se observó una diferencia significativa para los niveles de LC3B II a P17 OIR respecto a su control RA (Figura 2D). Nuestros resultados indican que hay un incremento en los niveles de LC3B II por la injuria hipóxica debido a un inducción en el flujo autofágico, más que a una depuración defectuosa de autofagosomas.

A continuación examinamos la expresión transcripcional de moléculas involucradas en la nucleación (Beclin-1), elongación (ATG-5) y estructurales (LC3) de los autofagosomas, así como del sustrato autofágico p62 en el pico de NV (108). Los ARNm de Beclin-1, ATG-5 y LC3 no mostraron cambios a P17, mientras que la expresión de p62 incrementó 1.8 veces al tiempo evaluado (Figura 2E), sugiriendo un incremento en la síntesis de dicha proteína.

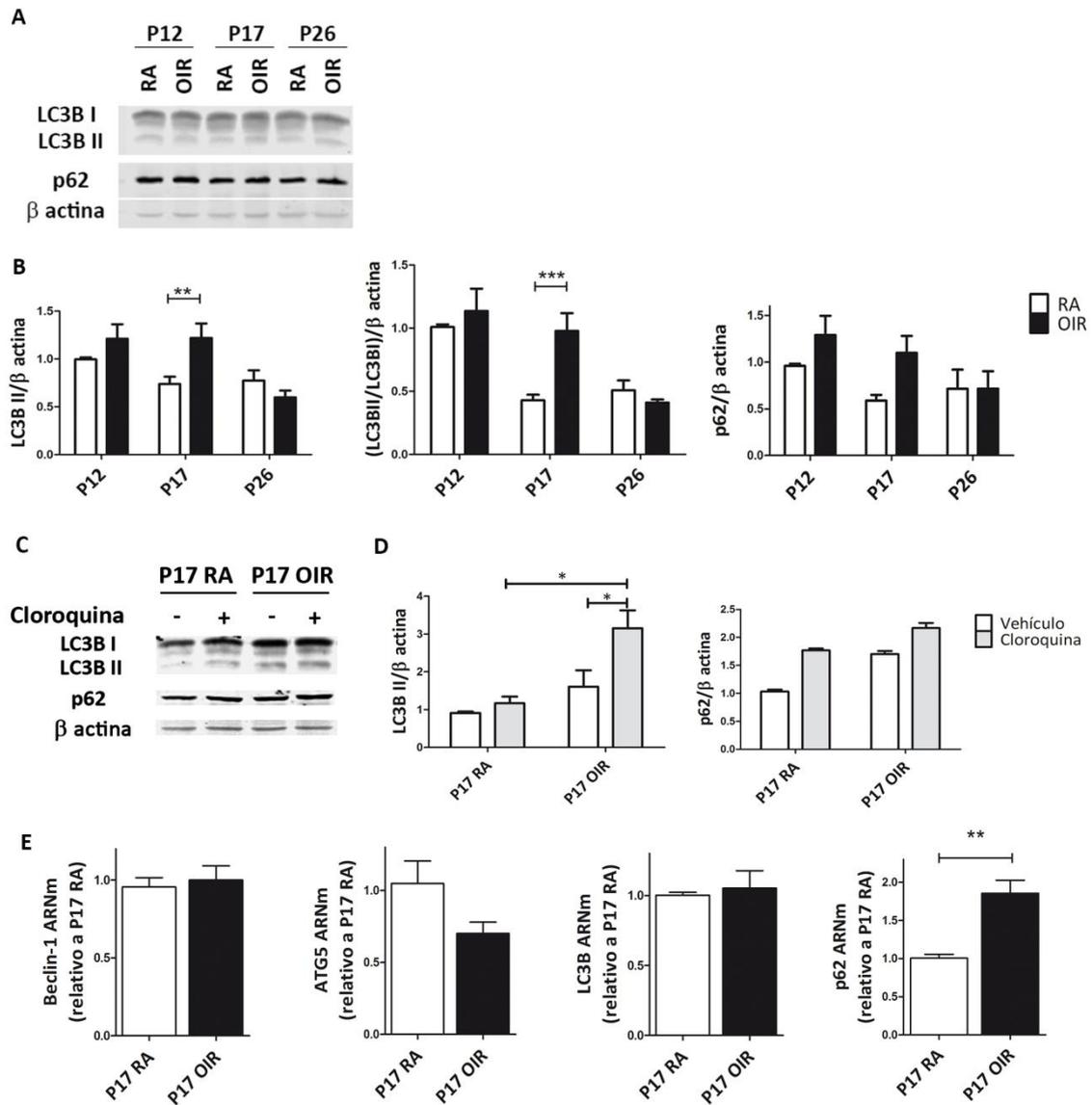


Figura 2: Efecto de la hipoxia sobre el flujo autofágico durante la NV y neurodegeneración en retinas de ratones OIR. A) y B) *Western blot* y cuantificación densitométrica de marcadores de autofagia LC3B II y p62 en extractos de retina neural obtenidos de ratones RA y OIR a P12, P17 y P26. Los ratones fueron inyectados i.p. con CQ 4 horas previas al sacrificio. Se empleó β -actina como control de carga. Los gráficos muestran resultados de 9 experimentos independientes. **C) y D)** *Western blot* y cuantificación densitométrica de marcadores de autofagia (LC3B II y p62) en extractos de retina neural obtenidos de ratones inyectados i.p. con vehículo o CQ a P17, y evaluado 4 horas posteriores a su administración. Se empleó β -actina como control de carga. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **E)** Niveles de ARNm de Beclin-1, ATG5, LC3 y p62 fueron cuantificados por qRT-PCR en retinas neurosensoriales de ratones P17 OIR y RA. Se empleó como control endógeno a β -actina y expresados de acuerdo a el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ empleando como calibrador el nivel de ARNm de retinas de ratón P17 RA.

Por ensayos de inmunofluorescencia realizados en criosecciones retinales, confirmamos el incremento en LC3B y p62 a P17 OIR (Figura 3A). Dado que existe un gradiente de hipoxia en las retinas OIR, a continuación decidimos evaluar si las variaciones en el flujo autofágico eran similares en cada capa retinal (109). Una señal intensa de LC3B y p62 se observó en la membrana limitante interna (ILM) a P17 en ratones OIR. A ese mismo tiempo, se observó un incremento en los puncta de LC3B en la capa nuclear interna (INL) y de células ganglionares (GCL), probablemente debido al hecho de que las neuronas que residen en las capas más internas (INL y GCL) son altamente afectadas por la hipoxia (95). Por el contrario, no se observaron cambios en la ONL para el marcador evaluado (Figura 3B y C).

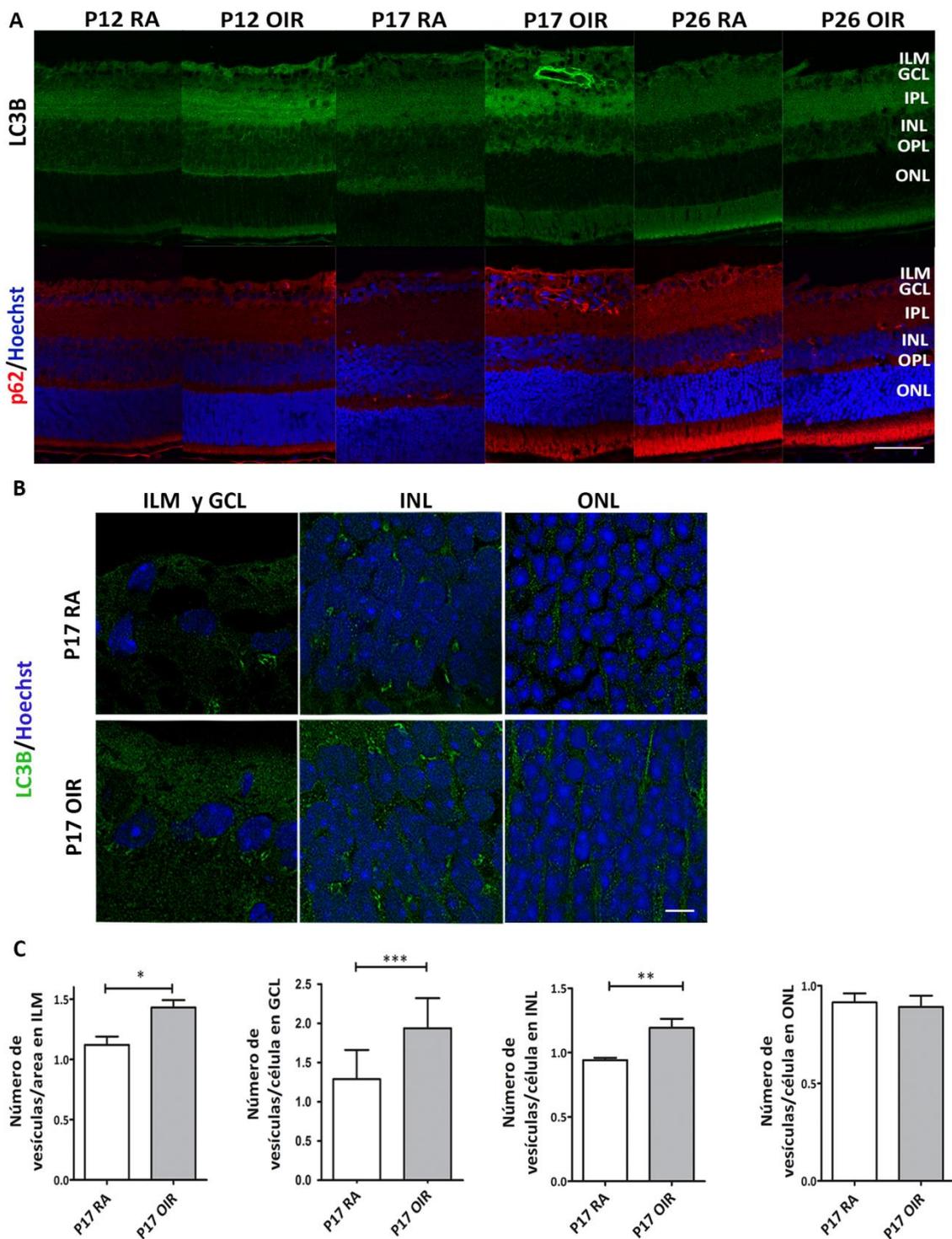


Figura 3: Expresión y distribución de los marcadores de autofagia en retinas de ratones RA y OIR. A) Análisis de inmunofluorescencia representativa de LC3B (verde) y p62 (rojo) en criosecciones de ojos de ratón RA y OIR inyectados con CQ a P12, P17 y P26, y evaluados 4 horas después. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258 (blue). **B)** Marcación representativa de LC3B (verde) en criosecciones de retinas de ratón RA y OIR a P17, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Las imágenes fueron adquiridas con objetivo 60x aceite en las mejores condiciones confocales. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258 (blue). Escala: 5 μ m. **C)** Cuantificación de LC3B puntea por área o célula con el Software ImageJ, analyze particles. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme

externa; ONL, capa nuclear externa. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Finalmente, analizamos con más detalle la presencia de autofagosomas en la ILM, una región donde existe una activa interacción entre células vasculares y macrogliales. En criosecciones identificamos CGM y CEs vasculares mediante tinción con GS y CD31 respectivamente, mientras que en *flat-mounts* retinales marcamos las CEs con isolectina IB4 (Figura 4). Tanto CGM como CEs mostraron a P17 OIR un ligero incremento en el número de vesículas LC3B dentro de las células (Figuras 4A y B). Sin embargo, en los ovillos neovasculares se detectó un mayor incremento en vesículas autofágicas (Figura 4C).

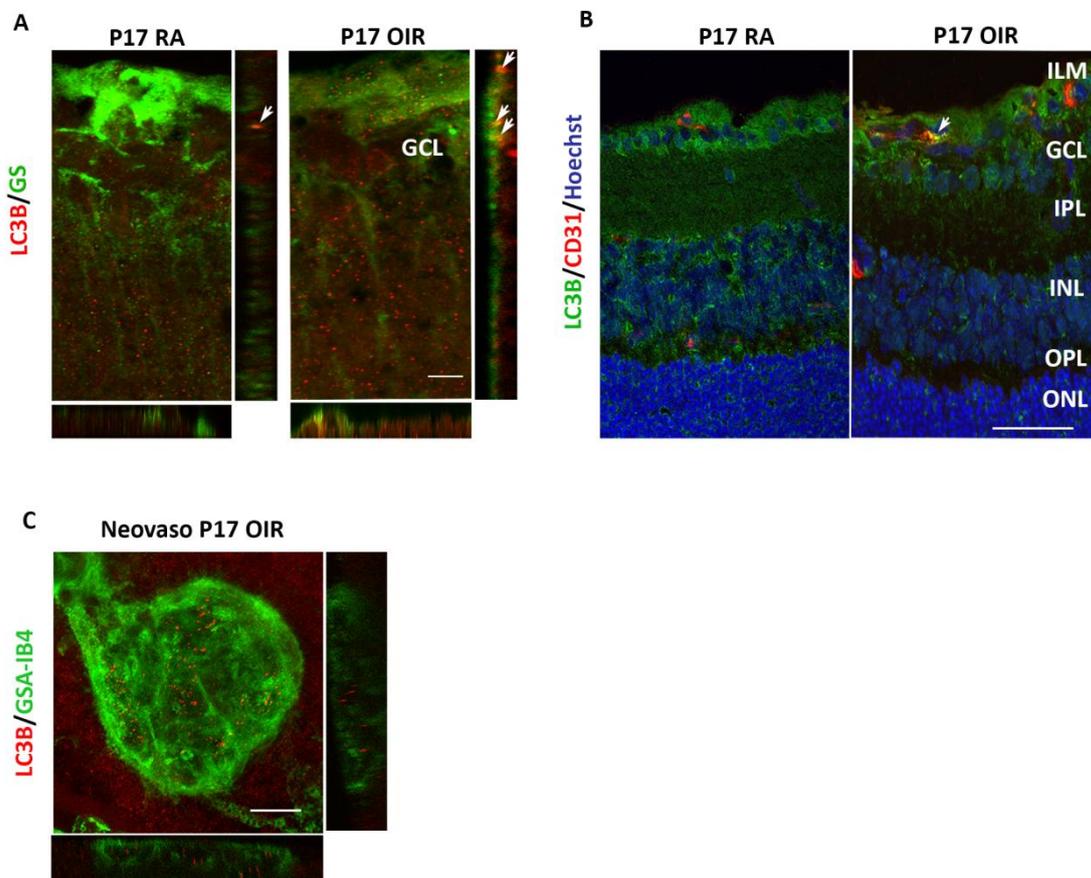


Figura 4: Presencia de autofagosomas en CGM y CEs. Marcación doble con: **A)** un anticuerpo monoclonal anti LC3B (rojo) y un marcador de CGM, anti GS (verde). Merge representativo del total de las imágenes confocales de inmunofluorescencia obtenidas en cortes en z (XY), con vistas ortogonales, XZ e YZ de una retina de ratón P17 RA y OIR, 4 horas posterior a la administración de CQ. Escala: 5 μ m. **B)** un anticuerpo monoclonal anti LC3B (verde) y un marcador específico de CEs, anti CD31 (rojo). Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul). Escala: 50 μ m. **C)** Magnificación de una microfotografía confocal de una retina P17 OIR montada en *flat-mount*, mostrando un típico ovillo neovascular. Las imágenes fueron adquiridas con objetivo de 60x aceite y zoom 5x, con la mejor resolución confocal. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul). Escala: 5 μ m.

A fin de determinar si los autofagosomas podrían alcanzar el estado degradativo a P17 OIR, llevamos a cabo ensayos de inmunofluorescencia usando una combinación de anticuerpos contra LC3B y el marcador de compartimentos endosomales tardíos y lisosomas LAMP1 (Figura 5 A). Se observó la fusión entre vesículas LC3B y LAMP1 positivas en la ILM, GCL y en la INL en retinas de ratones OIR y RA (Figura 5B). Nuestros análisis estadísticos no mostraron diferencias en la cuantificación de colocalización en ausencia de CQ, probablemente debido al elevado flujo en la retina (Figura 5C).

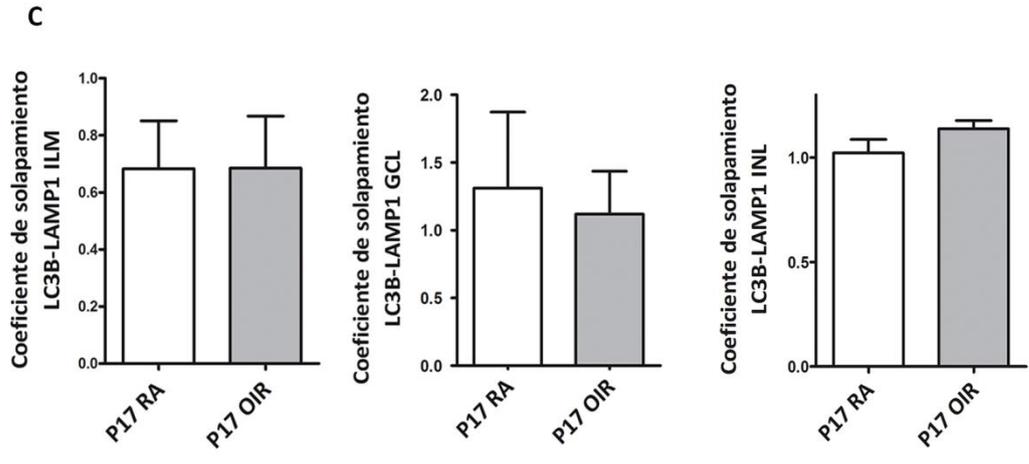
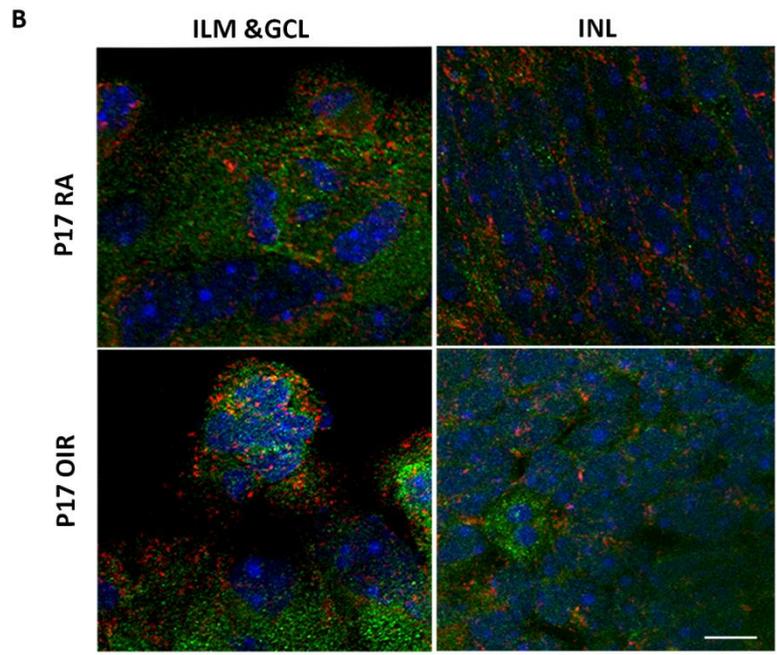
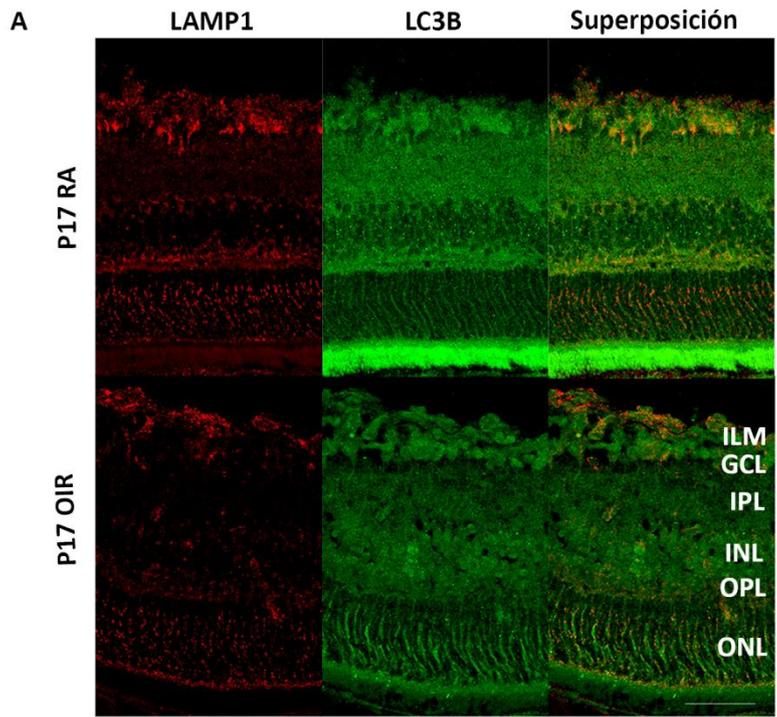


Figura 5: Autofagosomas tardíos en el modelo OIR. **A)** Análisis de inmunofluorescencia representativo de LAMP1 (rojo) y LC3B (verde) en criosecciones ojos de ratones P17 RA y OIR, sin CQ. Escala: 50 μ m. **B)** Imágenes confocales de criocortes de ratón P17 RA y OIR marcados con LAMP1 (rojo) y LC3B (verde). Las imágenes fueron adquiridas con objetivo de 60x aceite y zoom 5x, con la mejor resolución confocal. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul). Escala: 5 μ m. **C)** Cuantificación del número de vesículas LC3B/LAMP1 positivas por área (ILM) o célula (GCL e INL) con Software ImageJ JACoP. Los valores del coeficiente de solapamiento de Pearson fueron comparados estadísticamente mediante test t. Los gráficos representan la media \pm SEM.

Sin embargo, en muestras de ratón que habían recibido la inyección i.p. de CQ, pudimos detectar un incremento en las vesículas LAMP1 positivas, sugiriendo que los lisosomas y los endosomas tardíos están siguiendo la vía degradativa apropiadamente (Figura 6A y B).

A modo complementario, examinamos la actividad lisosomal mediante una inyección intravítrea de DQ-BSA, un compuesto derivado de albúmina sérica bovina conjugado a un colorante fluorescente BODIPY TR-X (110)(Figura 6C). Este conjugado se encuentra auto-apagado (estado de no emisión) en su forma comercial. Sin embargo, la proteólisis de DQ-BSA en el interior de los lisosomas es capaz de liberar el colorante fluorescente, el cual emite una señal detectable. Por lo tanto, el uso de DQ-BSA es una herramienta útil para detectar la actividad proteolítica como una medida de la funcionalidad lisosomal. Imágenes confocales evidenciaron un incremento en la marcación de DQ-BSA en CEs durante el pico de la NV en ratones OIR, respecto a controles RA, lo cual se correlaciona con lo observado en la figura 5A. Sin embargo, este incremento no se observó en aquellas capas donde la muerte celular es elevada.

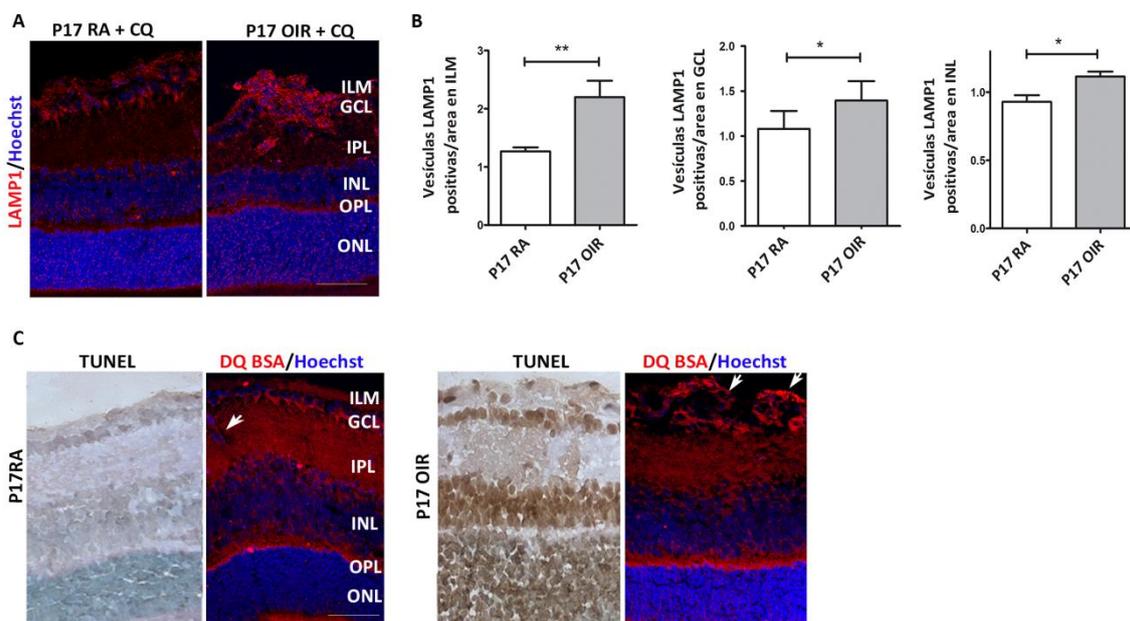


Figura 6: Compartimento lisosomal a P17. A) Análisis de inmunofluorescencia representativo de LAMP1 (rojo) en criosecciones de ratones P17 RA y OIR inyectados con CQ, y evaluados 4 horas posteriores a la administración. Escala: 50 μ m. **B)** Cuantificación del número de puncta de LAMP1 por área o por célula con el Software de Image J Analizador de partículas. Los gráficos representan la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **C)** Marcación representativa de TUNEL en criosecciones de ratones P17 RA y OIR, y criosecciones de ojos de inyectados intravítreamente con un derivado de albúmina sérica bovina DQ-BSA. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul). Escala: 50 μ m.

En conjunto, hemos observado los siguientes resultados en el modelo murino de OIR:

Modelo OIR

Se observó:

- ❖ Un incremento en el flujo autofágico en el día P17 OIR evidenciado a través del aumento en los niveles proteicos de LC3B II y p62, así como del transcritto de p62.
- ❖ Un incremento en el número de vesículas LC3B en la ILM, GCL e INL, principalmente en CEs de los neovasos.
- ❖ Ausencia de cambios en el flujo autofágico en la capa más externa de la retina (ONL),

III.II. 3 Metiladenina afecta la vascularización fisiológica retinal

Se ha descrito que la autofagia podría tomar roles diferentes a lo largo de las patologías en relación al tipo de estímulo que perciben las células. La activación sola o independiente de este mecanismo en estadios de hiperoxia, hipoxia severa, hipoxia leve o posterior a un evento isquémico podría derivar en eventos protectores o neurodegenerativos (49, 111, 112). Con el objetivo de poder determinar cuál es el rol que cumple la autofagia en el modelo OIR y en qué períodos su participación es más relevante, decidimos bloquear el flujo autofágico en dos tiempos clave: P12 y P17. Para ello empleamos 3MA, un inhibidor de las Fosfatidilinositol 3 kinasas (PI3K), las cuales están involucradas en la modulación de múltiples procesos biológicos (113, 114). Para nuestros ensayos empleamos 3MA a concentraciones bajas ya que resulta un inhibidor selectivo de PI3K tipo III, una de las vías involucradas en la activación del flujo autofágico. Se administró una única dosis intraocular de 3MA en P12 o P17 en ratones OIR y controles RA, y se obtuvieron muestras 24 horas posterior a la inyección y en los subsiguientes tiempos del modelo (Figura 7A). Por ensayos de *Western blot* observamos que la inyección de 3MA logra disminuir eficientemente los niveles de LC3B II 24 horas posterior a la inyección intravítrea (Figura 7B). En concordancia con dicho resultado, inmunofluorescencias realizadas en criocortes de retina evidenciaron una clara disminución de la intensidad de fluorescencia

para LC3B tras la inyección del inhibidor (Figura 7C), indicando que 3MA inhibe la formación de vesículas autofágicas en las células retinales.

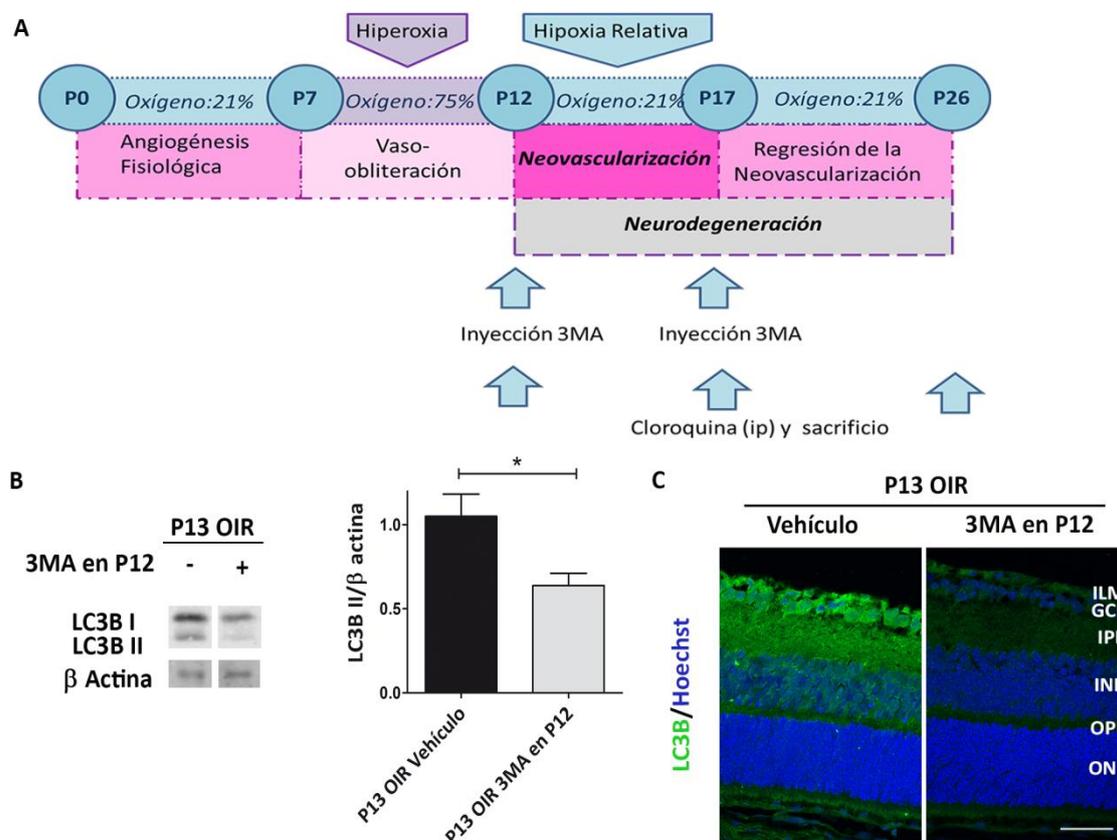


Figura 7: 3MA inhibe en flujo autofágico en ratones OIR. A) Esquema de administración. 3MA (25 μ g/ μ l) o vehículo fue administrado intraocularmente a P12 y evaluado a P13, P17 y P26; otro grupo experimental fue tratado con 3MA o vehículo a P17 y evaluado a P17 y P26. **B)** Western blot representativo y cuantificación densitométrica de LC3BII en extractos de retina neural de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o 3MA a P12 y evaluado a P13, 4 horas posteriores a una inyección i.p. de CQ. Se empleó β -actina como control de carga. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. * $p < 0.05$. **C)** Análisis de inmunofluorescencia representativa de ratones P13 OIR inyectados con vehículo o 3MA a P12 y evaluado a P13, 4 horas posteriores a la administración de una inyección i.p. de CQ. Los núcleos fueron teñidos con Hoechst 33258 (azul). Escala: 50 μ m.

A fin de evaluar si la inyección de 3MA administrada previo al evento de NV, induce cambios vasculares a P17 realizamos la tinción de retinas en *flat-mount* con isolectina GSA-IB4 tanto en ratones control como en aquellos que recibieron el tratamiento en P12 (Figura 8A). El análisis cuantitativo mostró que 3MA redujo en un 40% el área avascular y en un 80% el área neovascular, mientras que la vasodilatación no se vio modificada. En cuanto a la tortuosidad de las arteriolas, observamos una disminución leve aunque significativa (Figura 8B).

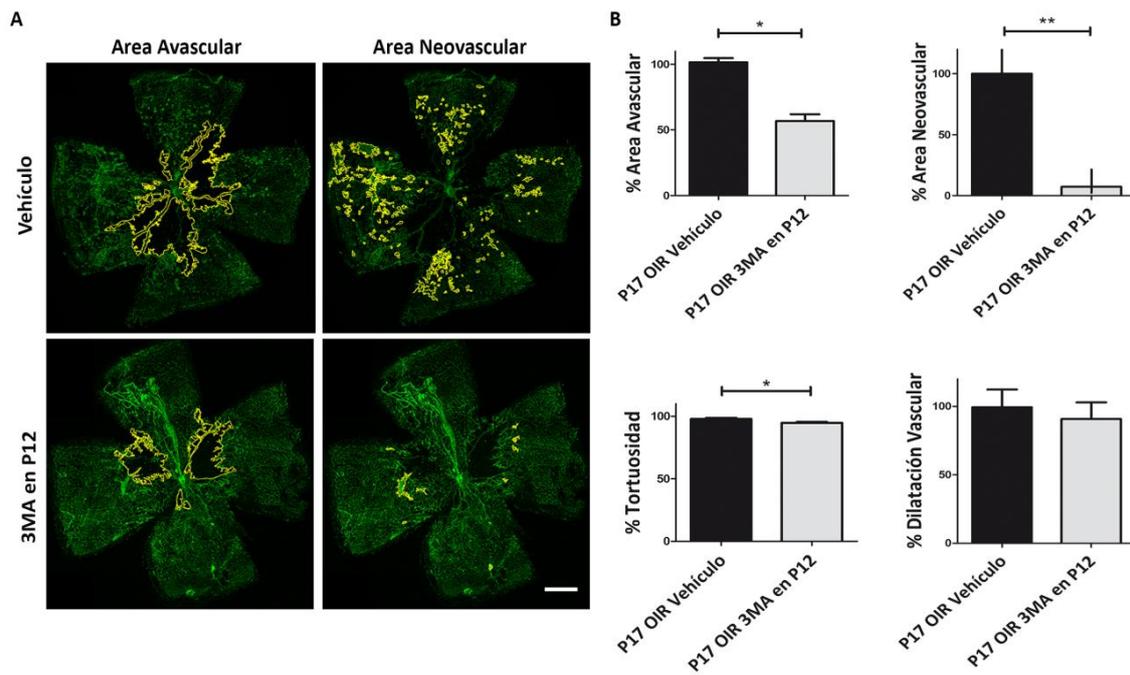


Figura 8: 3MA disminuye el área avascular y el área neovascular. A) Imágenes representativas de *flat-mount* de retinas P17 OIR vehículo e inyectadas con 3MA en P12, marcadas con lectina GSA-IB4 para identificar los plexos vasculares. Áreas con vaso-obliteración (VO) y neovascularización (NV) fueron delimitadas. Escala: 500 μ m. **B)** Cuantificación del porcentaje de VO, NV, diámetro y tortuosidad vascular. Media \pm el error estándar (SEM) (representado como T) fueron graficadas en los análisis paramétricos, mientras que la mediana y el rango intercuartil (representado como I) se mostraron cuando el análisis fue no paramétrico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Para evaluar si los cambios vasculares inducidos por 3MA impactan en las etapas finales de revascularización, se evaluó cómo se modifican los plexos vasculares a P26 tras recibir una inyección de 3MA en P12 o P17 (Figura 9A). Se observó en los montajes de retina completa una menor densidad vascular cuando el tratamiento era administrado en estadios más tempranos, indicando que el bloqueo de la vía de las PI3K tipo III en etapas de mayor inmadurez vascular impactan negativamente en el establecimiento de la red de vasos retinales.

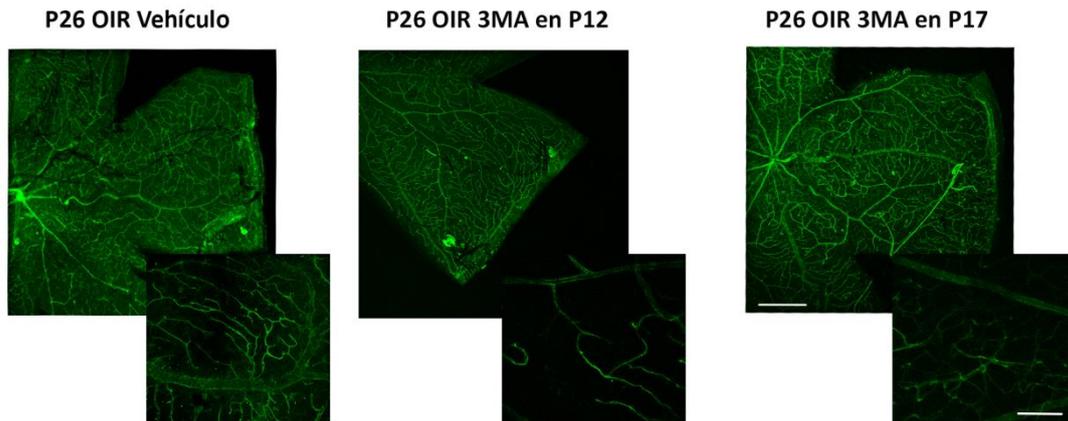


Figura 9: Alteraciones vasculares inducidas por 3MA a P26. Imágenes representativas de *flat-mount* de retinas P26 OIR vehículo e inyectadas con 3MA en P12 o en P17, marcadas con lectina GSA-IB4 para identificar los plexos vasculares. Escala: 200 μ m. Los recuadros más pequeños representan fotos confocales obtenidas a 20x en regiones próximas al nervio óptico. Escala: 15 μ m.

III.III. 3MA incrementa el estrés glial y la neurodegeneración

Todas las células retinales presentan un flujo autofágico basal y su modificación puede impactar en la funcionalidad y/o viabilidad celular. En el siguiente apartado analizamos si la inyección de 3MA administrada a P12 o P17 afecta a la macroglía y las neuronas a P17.

La activación glial persistente es considerada un signo de mal pronóstico ya que las células microgliales reactivas frecuentemente secretan citocinas y quemocinas que contribuyen al microambiente pro-inflamatorio y median la muerte neuronal (115). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que en el día P17 OIR las retinas de ratón muestran un perfil altamente proliferativo vascular, exhibiendo daño neuro-glial y pérdida de función retinal, eventos que persisten hasta P26 OIR (95). Los cambios en la macroglía se evaluaron empleando dos marcadores: GFAP indicativo de gliosis reactiva, y la enzima detoxificante de glutamato GS. *Western blot* de retinas totales mostraron un incremento significativo de GFAP a P17 OIR cuando 3MA se administró a P12 (Figura 10A y B). En concordancia con estos resultados, se observó un ligero incremento en la marcación de la proteína ácida en *flat-mounts* (Figura 10C). Por otro lado, no se observaron cambios significativos en la expresión de GS en ninguna de las condiciones, sugiriendo que no hay mejoras en la actividad detoxificante tras el tratamiento (Figuras 10A, B y D).

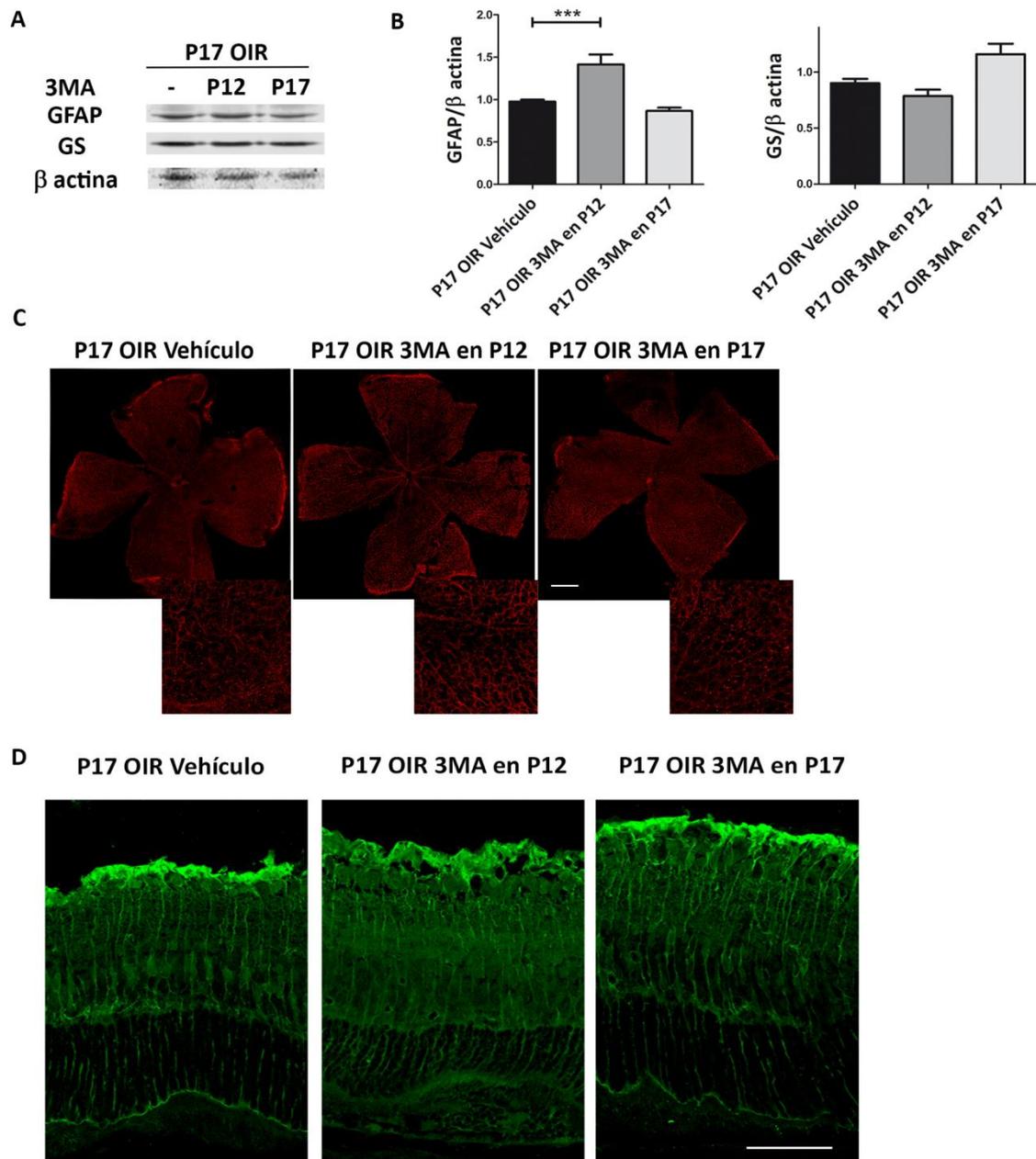


Figura 10: La inyección de 3MA en P12 incrementa el estrés glial a P17 OIR. **A)** *Western blot* representativo de GFAP y GS en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P17. Se empleó β -actina como control de carga. **B)** Niveles proteicos de GS y GFAP fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **C)** Imágenes confocales representativas de *flat-mount* de retinas P17 marcadas con GFAP en ratones OIR-vehículo y OIR-3MA administrado en P12 o P17. Escala: 500 μ m. Los recuadros más pequeños son imágenes confocales obtenidas a 20x, en regiones próximas al nervio óptico. **D)** Análisis de Inmunofluorescencia de GS (verde) en criosecciones de ratones OIR tratados con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P17. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. *** $p < 0.001$.

Para estudiar el componente neuronal, procedimos a realizar análisis de la funcionalidad visual, muerte celular por apoptosis y los cambios en proteínas de la vía autofágica. La capacidad de respuesta eléctrica a un estímulo lumínico se obtuvo por estudios de electroretinográficos llevados a cabo con adaptación de al menos 8 horas a oscuridad (escotópicos). El análisis de las gráficas obtenidas tras promediar 10 flashes de luz nos permitió cuantificar la intensidad de la señal (amplitud) y el tiempo de respuesta (latencia) de dos grandes grupos de células: fotorreceptores (onda a) y de la retina interna (onda b). Como se indica en las gráficas, la inyección de 3MA en P12 tiende a disminuir la amplitud y a incrementar la latencia de ambas ondas, sugiriendo que el bloqueo de la vía de las PI3K afecta a la funcionalidad retinal (Figura 11A). No se pudieron llevar a cabo registros electroretinográficos en ratones P17 OIR inyectados con 3MA 24 horas previas, ya que la inyección intraocular es un procedimiento invasivo. Se requieren al menos tres días de recuperación para obtener un registro fidedigno, reflejo del tratamiento.

Correlativamente, el análisis de TUNEL evidenció un incremento en el número de células TUNEL positivas, principalmente en la ONL (Figura 11B). Paralelamente, el tratamiento con 3MA disminuyó los niveles proteicos de caspasa 3 total a P17 OIR tanto en los ratones inyectados en P12 como los inyectados en P17, indicando un mayor clivaje de dichas proteínas (Figura 11 C y D). Por ensayos de Western blot observamos que en los ratones P17 OIR que recibieron la inyección de 3MA en P12 los niveles de LC3B II vuelven a los niveles basales de P17 OIR Vehículo, indicando que el efecto de 3MA es transitorio y breve. Como se había observado en los ratones inyectados a P12 y sacrificados a P13, la inyección a P17 logró disminuir los niveles de LC3B II significativamente 24 horas posteriores a la inyección de 3MA.

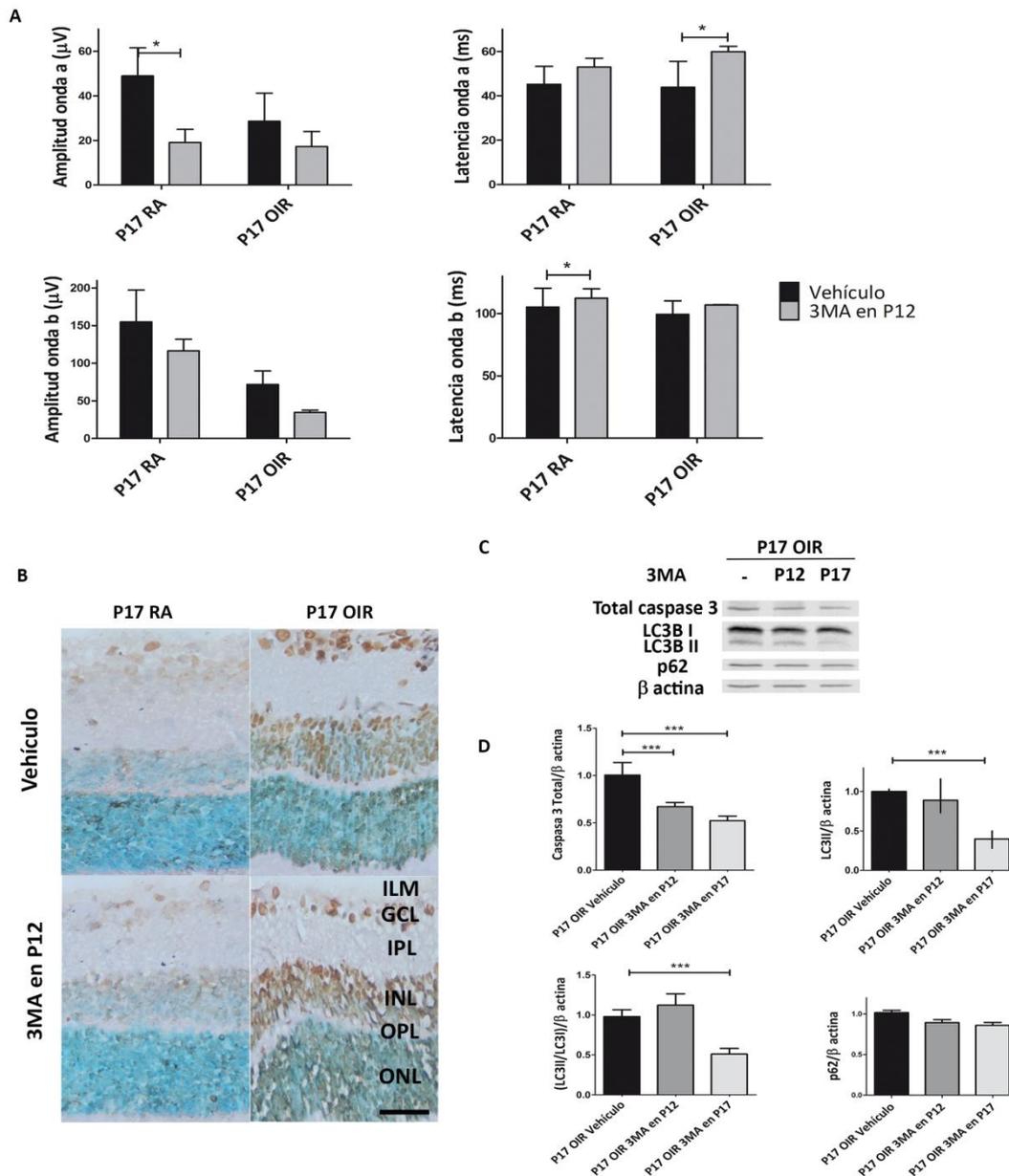


Figura 11: 3MA incrementa la muerte celular a P17 OIR. A) Amplitudes y latencias de ondas a y b de registros electroretinográficos adquiridos escotópicamente a P17 en ratones control y OIR inyectados a P12 con vehículo o 3MA. Los gráficos muestran el promedio de respuesta de ambos ojos, al menos ocho ratones por condición fueron empleados. **B)** Ensayo de TUNEL en criosecciones de ojos de ratón control y OIR inyectados a P12 con vehículo o 3MA. Escala: 50 μ m. **C)** y **D)** *Western blot* representativo y cuantificación de caspasa 3 total, LC3B II y p62 en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P17, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Se empleó β -actina como control de carga. Niveles proteicos de caspasa 3 total, LC3B II y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. La media \pm el error estándar (SEM) (representado como T) fueron graficadas en los análisis paramétricos, mientras que la mediana y el rango intercuartil (representado como I) se mostraron cuando el análisis fue no paramétrico. *** $p < 0.001$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Por inmunofluorescencia se observó que el flujo autofágico es restablecido a P17 cuando la inyección de 3MA se realizó en P12 (Figura 12).

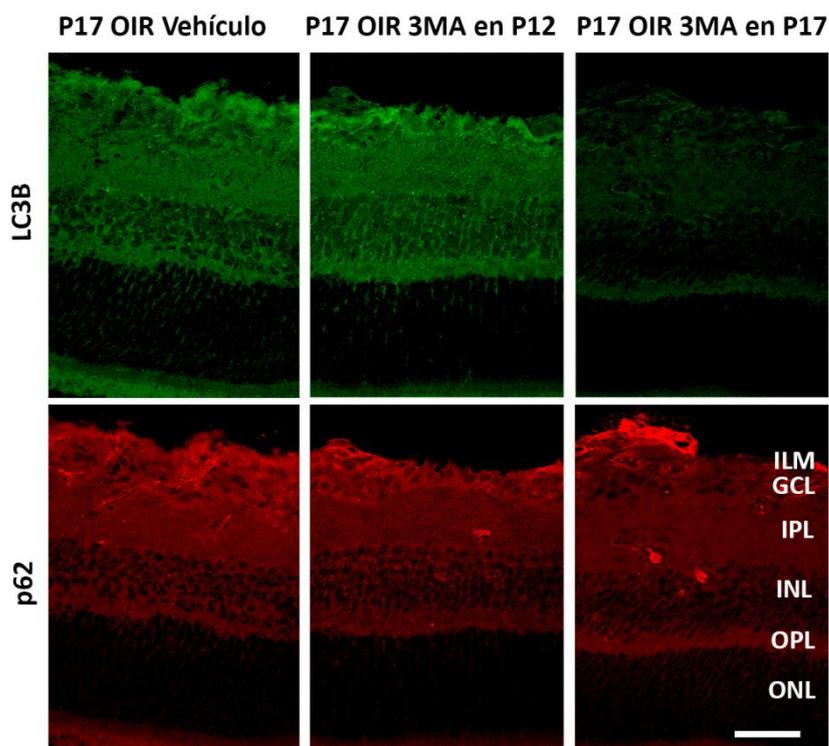


Figura 12: Inmunofluorescencia de marcadores autofágicos en retinas de ratones P17 OIR inyectados con 3MA a distintos tiempos. Análisis de Inmunofluorescencia de LC3B (verde) y p62 (rojo) en criosecciones de ratones OIR tratados con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P17, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa.

A continuación realizamos el mismo análisis neuro-glial a P26, cuando los neovasos han regresado pero persisten otras alteraciones no vasculares como la neurodegeneración y la gliosis. En este tiempo del modelo observamos que, al igual que en P17, los ratones que recibieron la inyección de 3MA en P12 presentan mayor expresión de GFAP, mientras que aquellos inyectados en P17 prácticamente no incrementan la expresión de la proteína con respecto al control (Figuras 13A y B). Paralelamente, el análisis de la expresión de GS evidenció que el tratamiento no modificó la capacidad detoxificante de la macrófaga, independientemente del momento de administración del inhibidor (Figuras 13C y D).

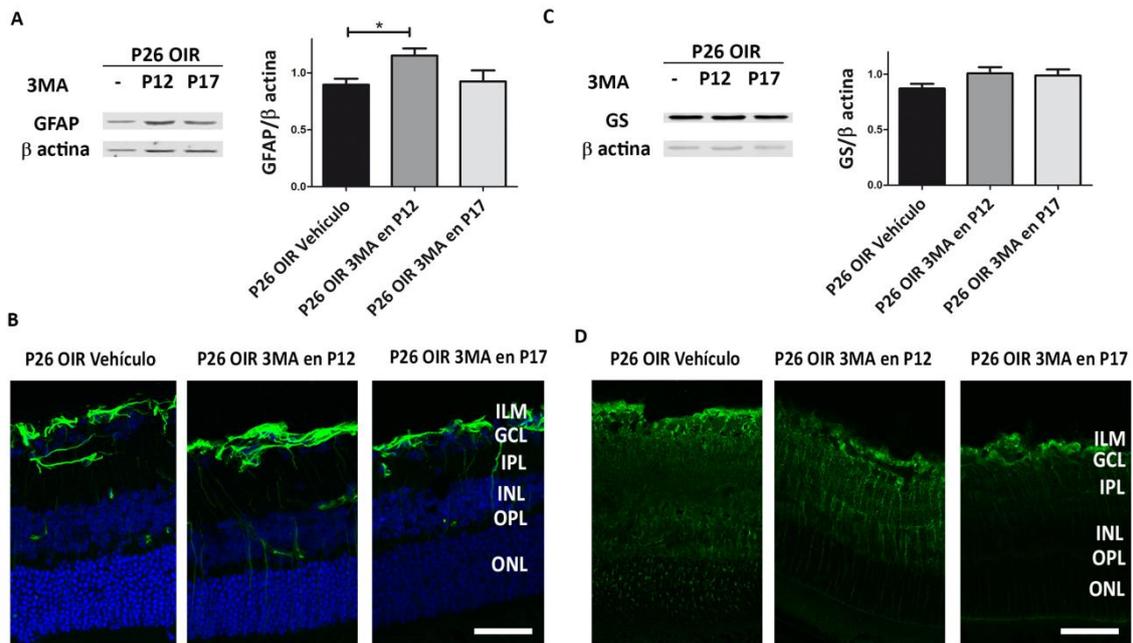


Figura 13: La inyección de 3MA en P12 incrementa el estrés glial a P26 OIR. **A)** *Western blot* representativo de GFAP en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P26. Se empleó β -actina como control de carga. Niveles proteicos de GS fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. **B)** Imágenes confocales representativas de criocortes de retinas P26 marcadas con GFAP en ratones OIR-vehículo y OIR-3MA administrada en P12 o P17. Escala: 50 μ m. **C)** *Western blot* representativo de GS en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P26. Se empleó β -actina como control de carga. Niveles proteicos de GS fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **D)** Análisis de Inmunofluorescencia de GS (verde) en criosecciones de ratones OIR tratados con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P26. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$.

Las señales electroretinográficas mostraron que la funcionalidad de las células fotorreceptoras no se afectó significativamente con el tratamiento (onda a). Sin embargo, en la retina interna se observó una disminución en la amplitud de la onda b cuando 3MA es administrada en P12, sin afectar el tiempo de respuesta (Figura 14A). En línea con estos resultados, para el tiempo de inyección más temprano, la tinción de TUNEL mostró un incremento en la marcación de núcleos positivos en las capas más internas (INL y GCL) de la retina tanto en ratones OIR como RA, indicando que la inhibición temprana de la vía autofágica disminuye la viabilidad celular e impacta en la funcionalidad retinal.

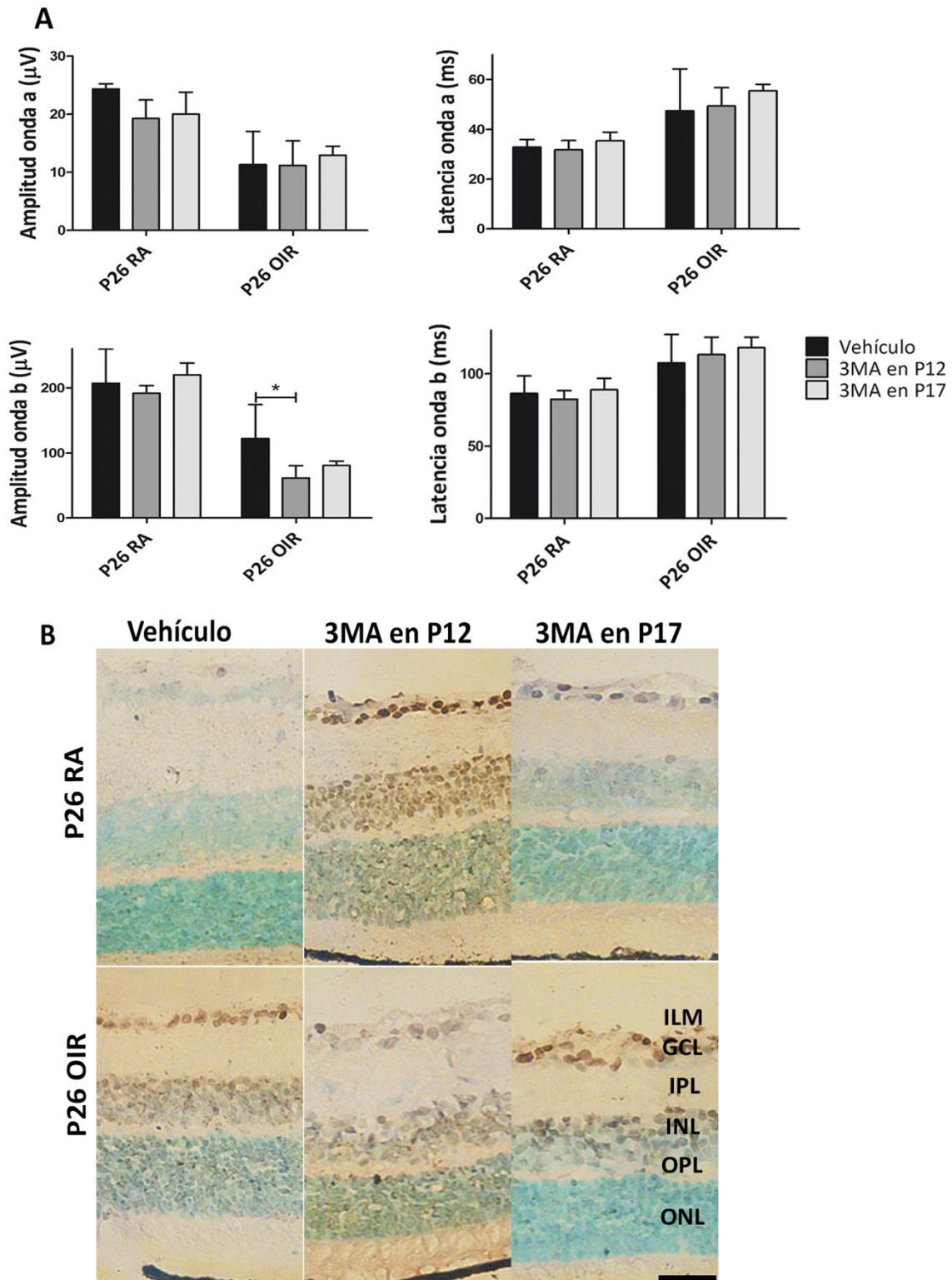


Figura 14: 3MA incrementa la muerte celular a P26 OIR. A) Amplitudes y latencias de ondas a y b de registros electroretinográficos adquiridos escotópicamente a P26 en ratones control y OIR inyectados a P12 o P17 con vehículo o 3MA. Los gráficos muestran el promedio de respuesta de ambos ojos, al menos ocho ratones por condición fueron empleados. **B)** Ensayo de TUNEL en criosecciones de ojos de ratón P26 control y OIR inyectados a P12 o P17 con vehículo o 3MA. Escala: 50 µm. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media ± SEM. * $p < 0.05$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Por *Western blot* observamos que los niveles de LC3B II tienden a volver a los niveles basales, restableciéndose el flujo a P26 (Figura 15A y B). Estos resultados se corroboraron mediante análisis de microscopía confocal (Figura 15C).

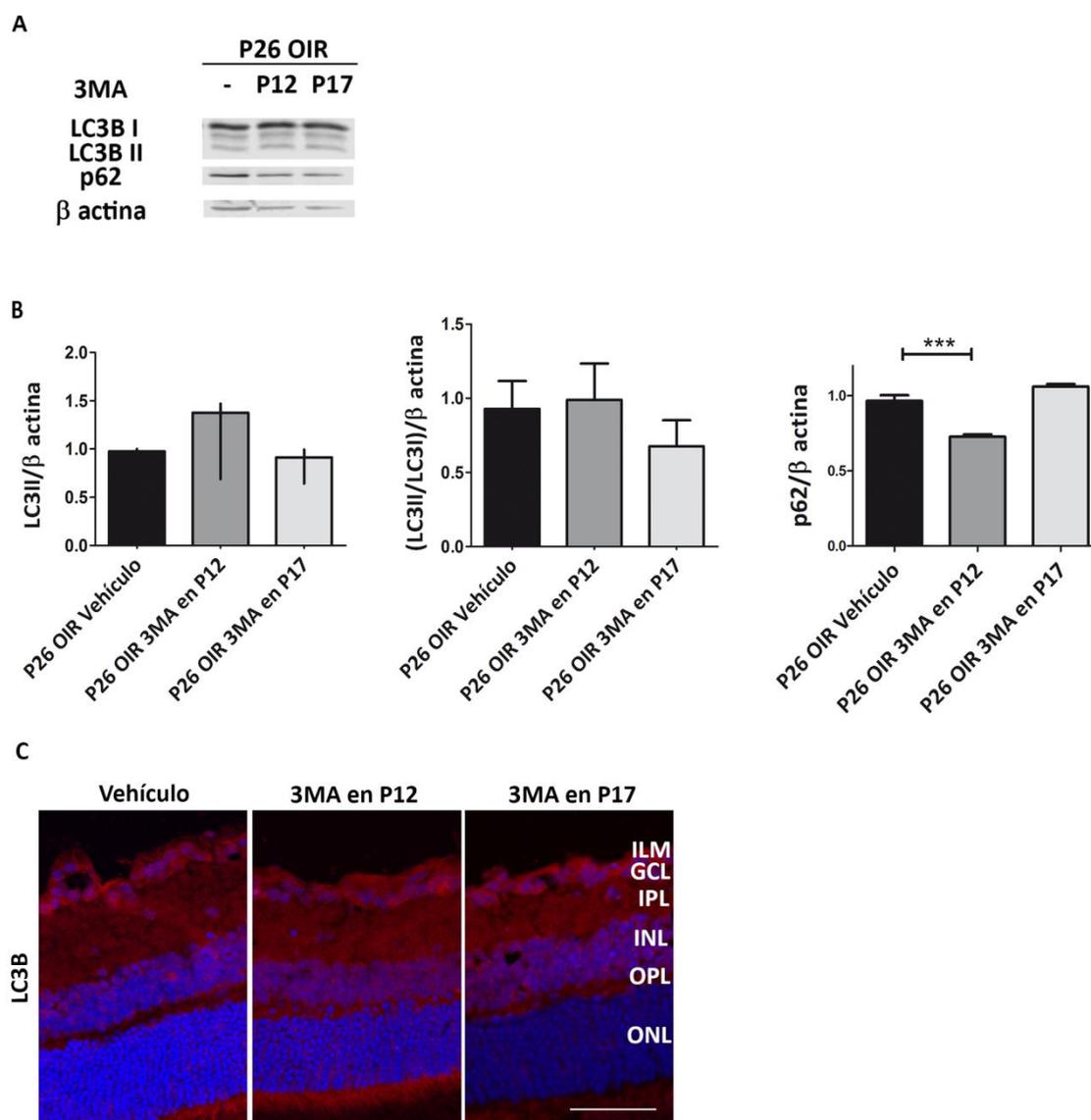
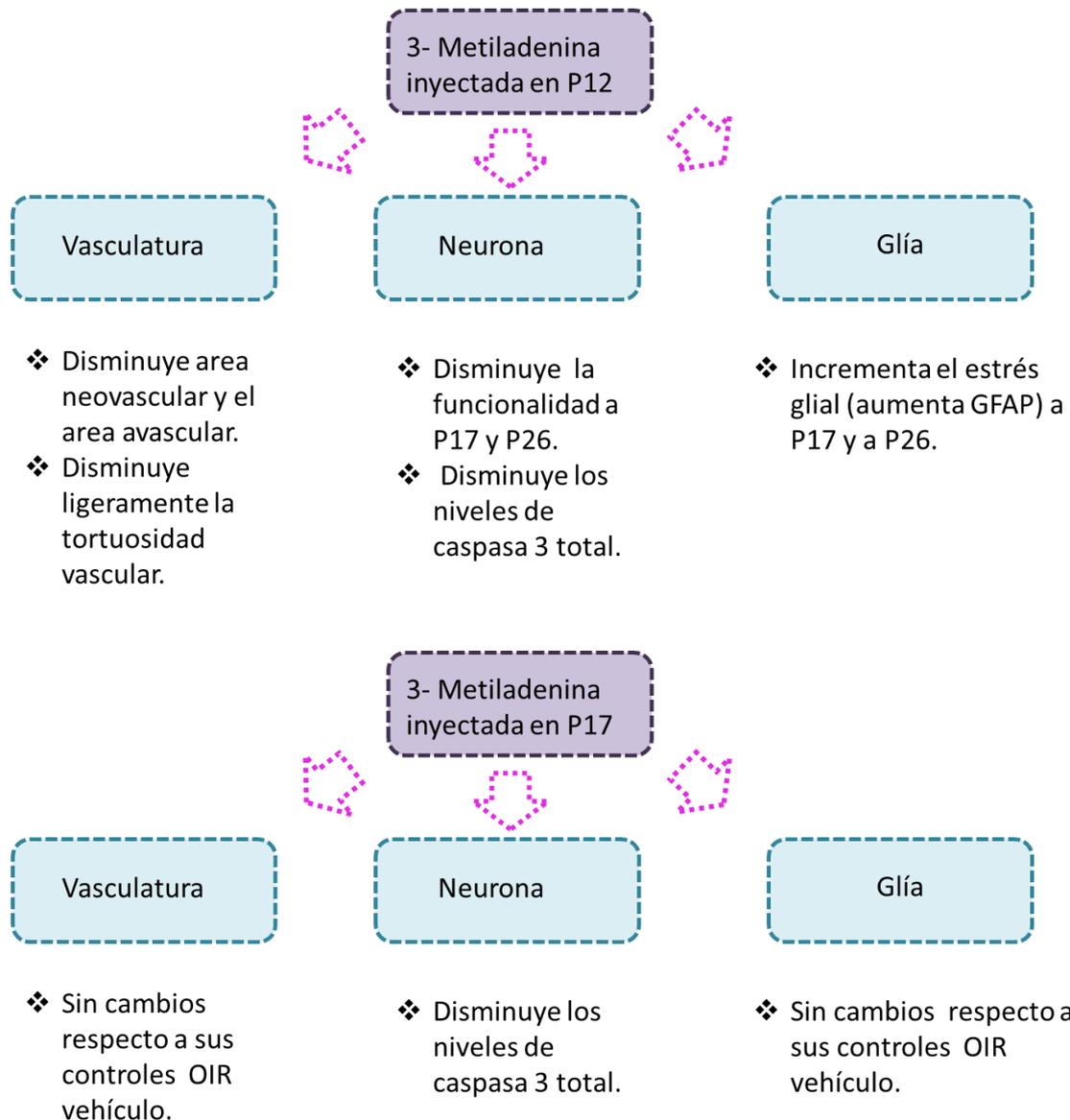


Figura 15: A) *Western blot* representativo y cuantificación de LC3B II y p62 en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P26, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Se empleó β -actina como control de carga. **B)** Niveles proteicos de LC3B II y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. La media \pm el error estándar (SEM) (representado como T) fueron graficadas en los análisis paramétricos, mientras que la mediana y el rango intercuartil (representado como I) se mostraron cuando el análisis fue no paramétrico. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **C)** Análisis de inmunofluorescencia de LC3B (rojo) en criosecciones de ratones OIR tratados con vehículo o 3MA a P12 o P17 y evaluado a P26, 4 horas posteriores a la

administración de CQ. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa.

A modo de conclusión de los resultados recientemente expuestos, resaltamos los siguientes puntos clave:



III.IV. Spautin-1 reduce NV pero no previene la neurodegeneración

Debido a que 3MA es un inhibidor de otras PI3K a mayores concentraciones, decidimos corroborar nuestros resultados con un inhibidor del flujo autofágico más específico: Spautin-1

(38, 116). Nuestro diseño experimental se enfocó en realizar inyecciones intraoculares de Spautin-1 o vehículo únicamente a P12, ya que a este tiempo en particular se observaron la mayor cantidad de cambios en el modelo con 3MA. Los sacrificios se llevaron a cabo 24 horas posterior a la inyección, en P17 y P26 (Figura 16A). Por ensayos de *Western blot* confirmamos que Spautin-1 logró disminuir los niveles de LC3B II (Figura 16B), disminuyendo el flujo autofágico en la retina.

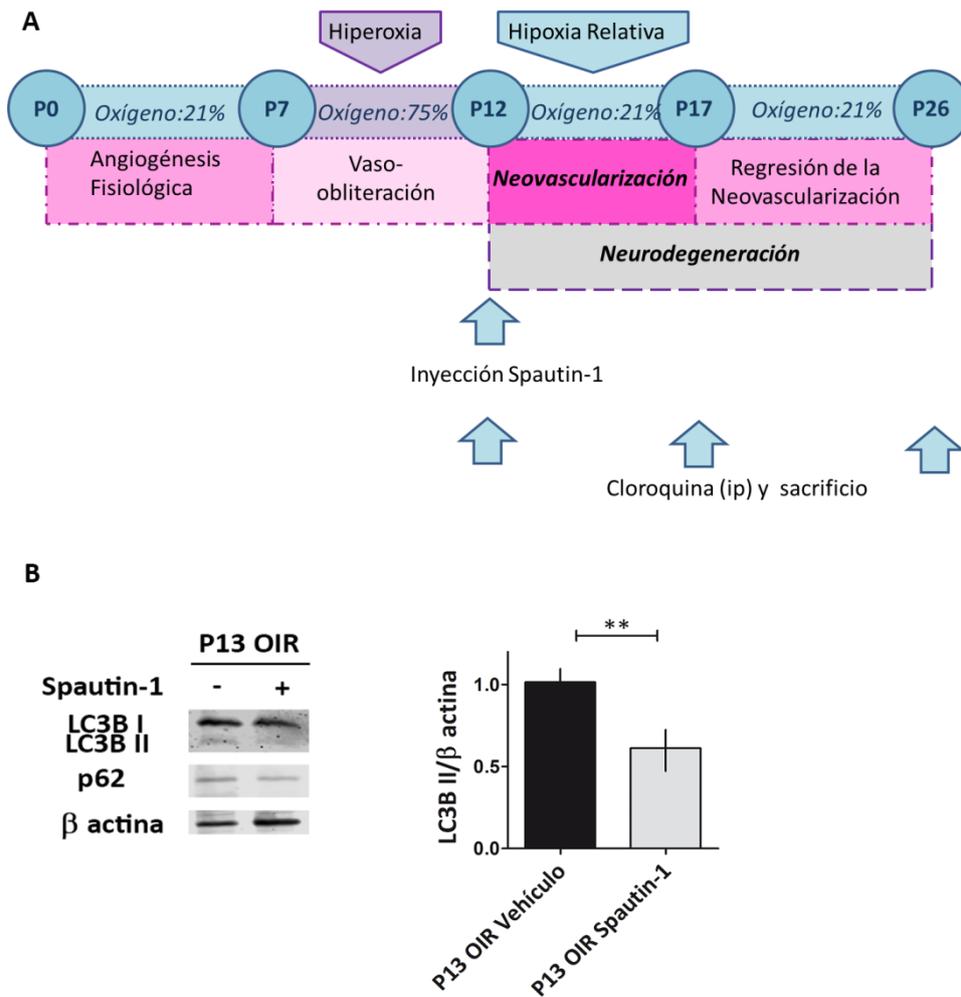


Figura 16: Spautin-1 inhibe el flujo autofágico en retinas de ratón OIR. A) Esquema de tratamiento. Spautin-1 (200 μ M) o vehículo fue inyectado intraocularmente a P12 y evaluado a P17 o P26 luego de 4 horas de una administración i.p. de CQ. **B)** *Western blot* representativo y cuantificación densitométrica de LC3B II en extractos de retina neural de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Spautin-1 a P12 y evaluado a P13, 4 horas posteriores a una inyección i.p. de CQ. Se empleó β -actina como control de carga. Los gráficos de cuantificación se presentan como la mediana \pm rango intercuartil. ** $p < 0.01$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

El análisis cuantitativo de *flat-mounts* marcados con la lectina GSA-IB4 mostró una reducción significativa de más del 70% del área neovascular luego del tratamiento con Spautin-1. Sin

embargo, otras alteraciones vasculares no mejoraron en los ratones OIR que recibieron el tratamiento, sugiriendo que la inhibición del flujo autofágico a P12 no participa en los eventos relacionados a la revascularización fisiológica (Figura 17A y B).

Los pericitos son células mesenquimales que llevan a cabo importantes tareas relacionadas al mantenimiento estructural y funcional del árbol microvascular, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (117). A fin de determinar el efecto de Spautin-1 sobre pericitos, analizamos la presencia de estas células mediante ensayos de inmunofluorescencia en criocortes de ratones P17 OIR. Un leve decrecimiento en la marcación para NG-2 se observó en los ratones OIR Spautin-1 respecto a sus controles tratados con vehículo (Figura 17C).

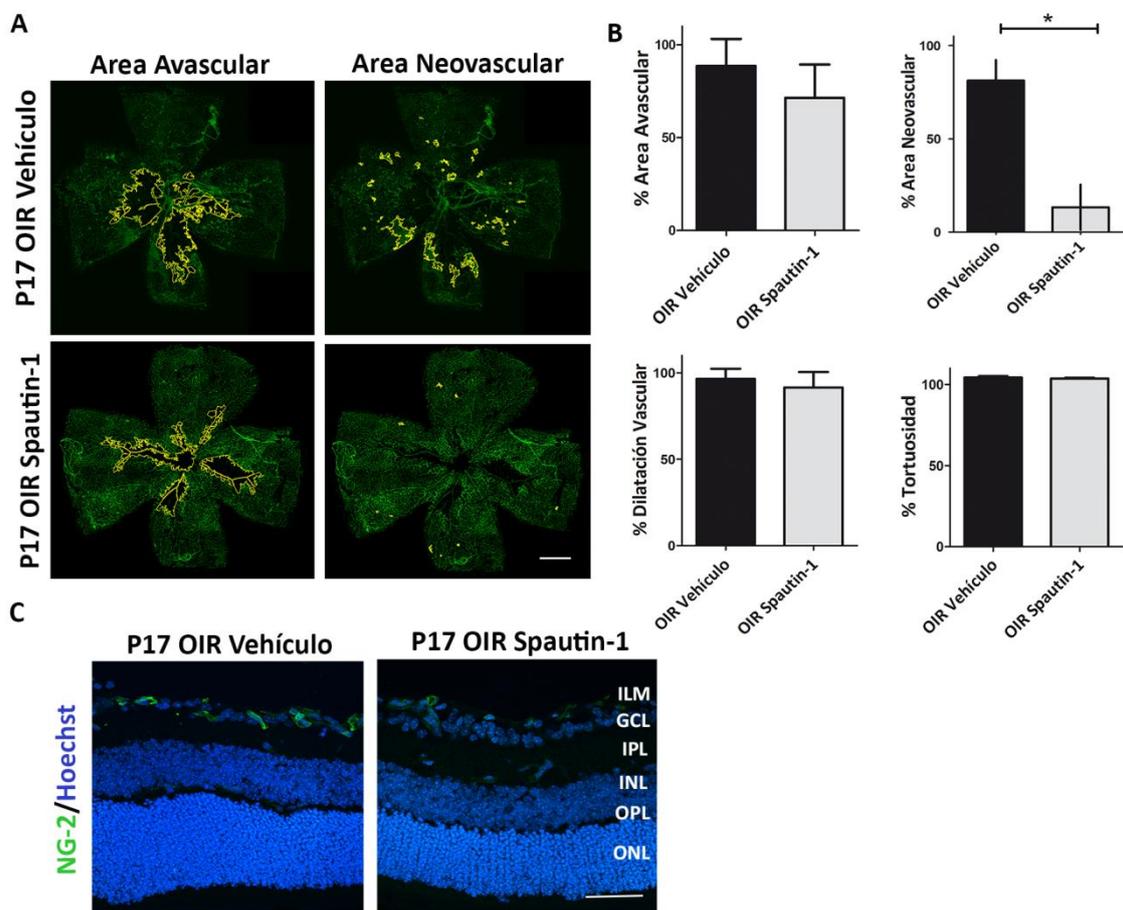


Figura 17: Efecto de Spautin-1 en alteraciones vasculares en retinas de ratones OIR. A) Imágenes representativas de *flat-mount* de retinas P17 OIR vehículo e inyectadas con Spautin-1, marcadas con lectina GSA-IB4 para identificar los plexos vasculares. Áreas con vaso-obliteración (VO) y neovascularización (NV) fueron delimitadas. Escala: 500 μ m. **B)** Cuantificación del porcentaje de VO, NV, diámetro y tortuosidad vascular. **C)** Inmunofluorescencia representativa de NG-2 (verde) en criocortes de ratones tratados con vehículo o Spautin-1 a P12 y evaluado a P17. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa. Media \pm el error estándar (SEM) (representado como T) fueron graficadas en los análisis paramétricos, mientras que la mediana y

el rango intercuartil (representado como I) se mostraron cuando el análisis fue no paramétrico. * $p < 0.05$.

Al analizar los marcadores gliales se observó que el tratamiento con el inhibidor de la autofagia no modificó los niveles proteicos de GFAP en *Western blot* de retinas neurales (Figura 18 A y B), ni en *flat-mounts* de retinas (Figura 18C) a P17 y P26. Similarmente, no se encontraron diferencias significativas en la expresión proteica de GS por *Western blot* (Figura 18A y B) ni por inmunofluorescencia (Figura 18D) luego del tratamiento con Spautin-1 a ninguno de los tiempos evaluados.

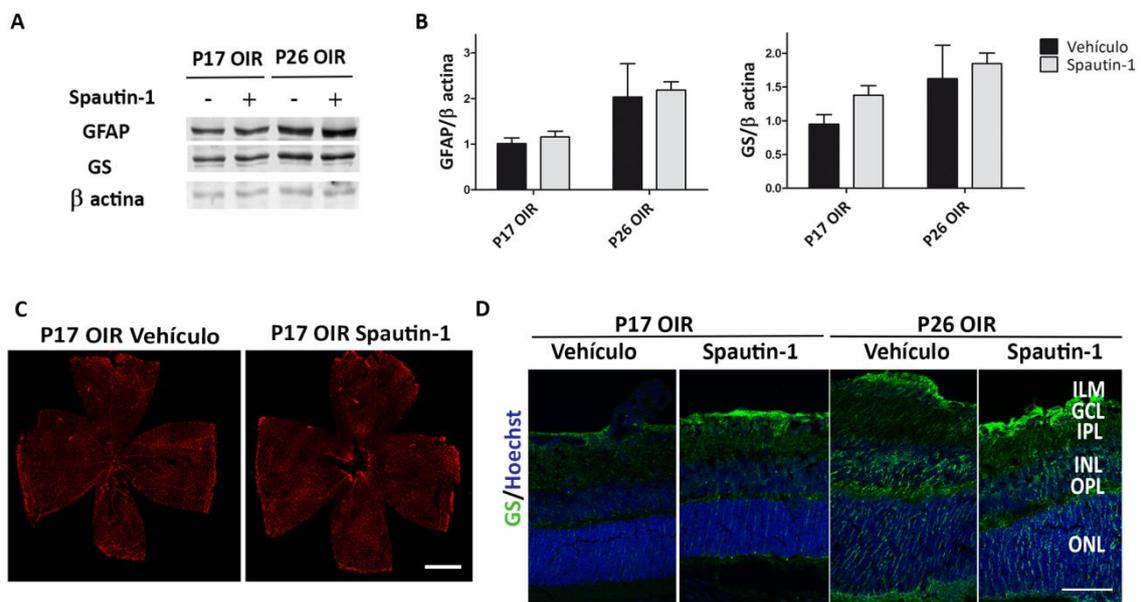


Figura 18: Spautin-1 no modifica la expresión de GFAP ni GS. A) *Western blot* representativo GS y GFAP en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Spautin-1 a P12 y evaluado a P17 y P26. Se empleó β -actina como control de carga. **B)** Niveles proteicos de GS y GFAP fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. **C)** Imágenes confocales representativas de *flat-mount* de retinas P17 marcadas con GFAP en ratones OIR-vehículo y OIR-Spautin-1. Escala: 500 μ m. **D)** Análisis de Inmunofluorescencia de GS (verde) en criosecciones de ratones OIR tratados con vehículo o Spautin-1 a P12 y evaluado a P17 y P26. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa.

Con respecto a la funcionalidad neuronal, la amplitud de la onda a mostró una tendencia a disminuir en ratones OIR Spautin-1 a P17. En concordancia, se detectó que la respuesta electrofisiológica era más tardía (latencia incrementada) en fotorreceptores tanto como en

neuronas de la retina interna luego de la inhibición del flujo autofágico (Figura 19A). El análisis cuantitativo de las amplitudes y las latencias de ambas ondas evidenció que no existen cambios significativos en la funcionalidad neuronal a P26. En línea con estos resultados, la tinción de TUNEL mostró un ligero incremento en el número de células positivas en la ONL luego del tratamiento a P17 OIR (Figura 19 B). La activación de la vía apoptótica, medida a través de la reducción de los niveles proteicos de caspasa 3 total no fue significativamente diferente a los tiempos evaluados (Figura 20 A y B).

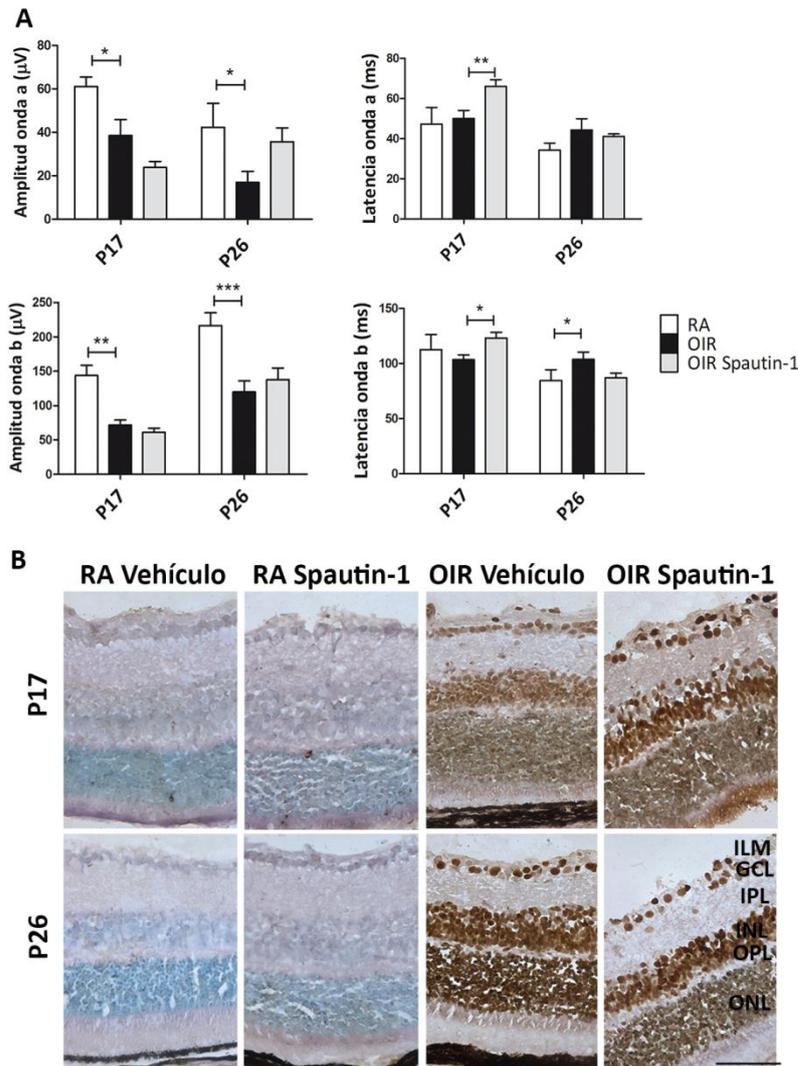


Figura 19: Spautin-1 incrementó las latencias de las ondas a y b, y no previno la muerte por apoptosis en ratones OIR. A) Amplitudes y latencias de ondas a y b de registros electroretinográficos adquiridos escotópicamente a P17 y P26 en ratones control y OIR inyectados a P12 con vehículo o Spautin-1. Los gráficos muestran el promedio de respuesta de ambos ojos, al menos ocho ratones por condición fueron empleados. **B)** Ensayo de TUNEL en criosecciones de ojos de ratón control y OIR inyectados a P12 con vehículo o Spautin-1. Escala: 50 µm. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media ± SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Finalmente, evaluamos las expresiones proteicas de LC3B y p62 a los 4 días (P17) y catorce días (P26) posteriores al tratamiento con Spautin-1. La cuantificación densitométrica de las bandas de *Western blot* (Figura 20 A y B) y la inspección de imágenes de microscopía confocal (Figura 21) evidenciaron que ambos marcadores autofágicos se restablecieron a los niveles basales de los ratones vehículo. En suma, estos resultados muestran que la inhibición de la vía autofágica por Spautin-1 perjudicó la funcionalidad y la supervivencia de los fotorreceptores a P17 OIR.

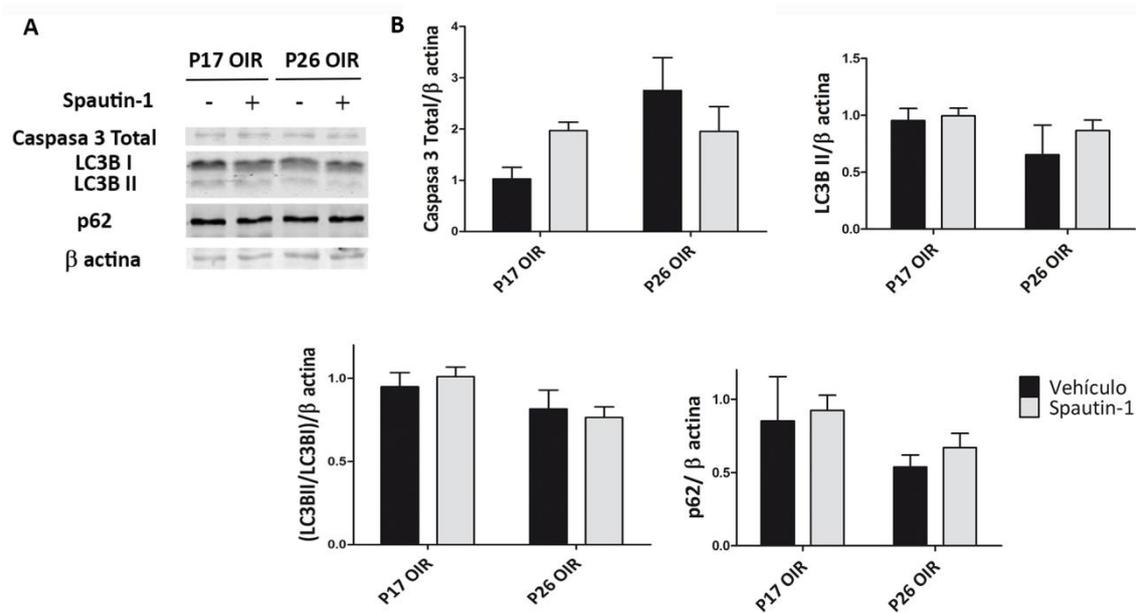


Figura 20: Los niveles de los marcadores autofágicos LC3B II y p62 fueron restablecidos a P17 y P26: A) y B) *Western blot* representativo y cuantificación de caspasa 3 total, LC3B II and p62 en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Spautin-1 a P12 y evaluado a P17 y P26, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Se empleó β -actina como control de carga. Niveles proteicos de Caspasa 3 total, LC3B II y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

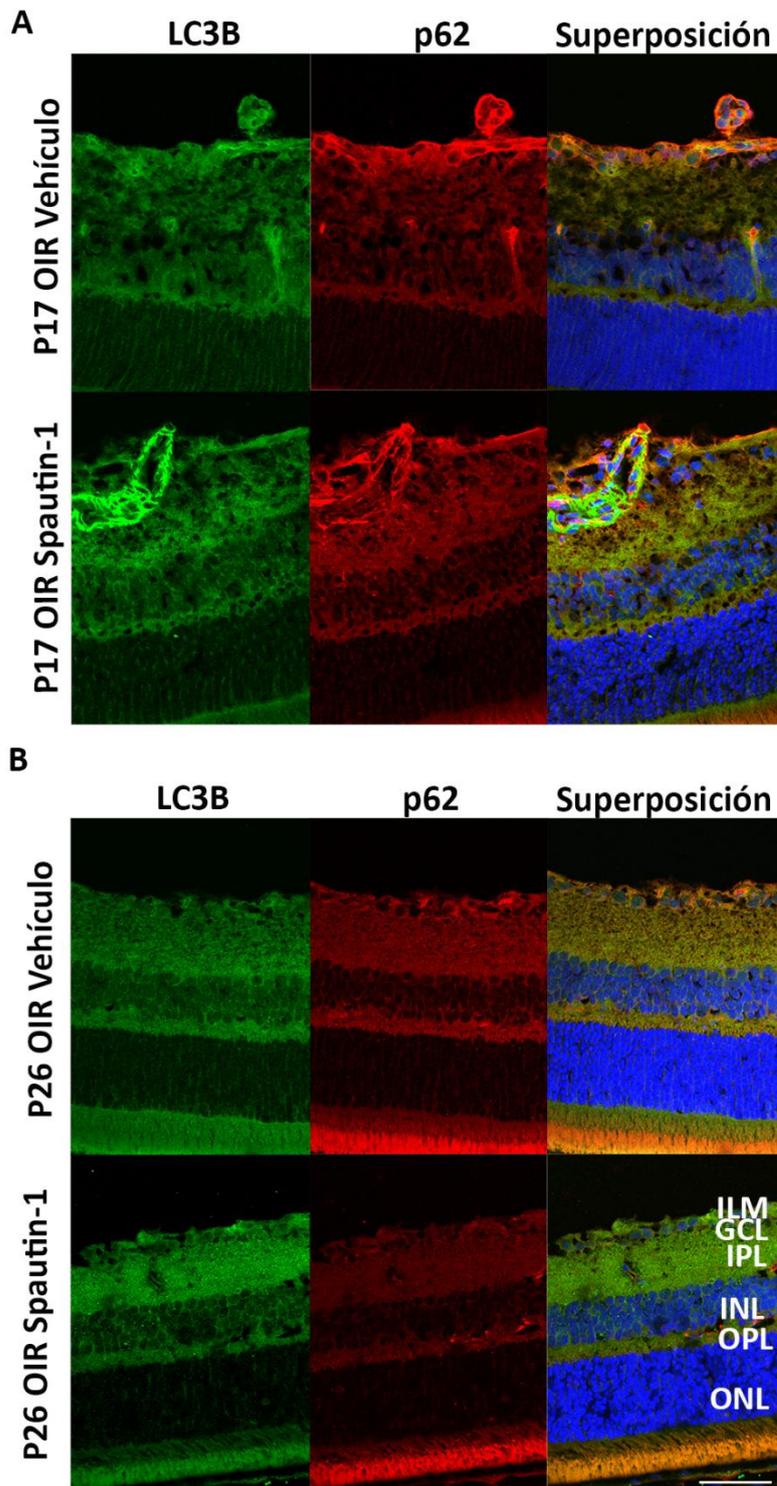
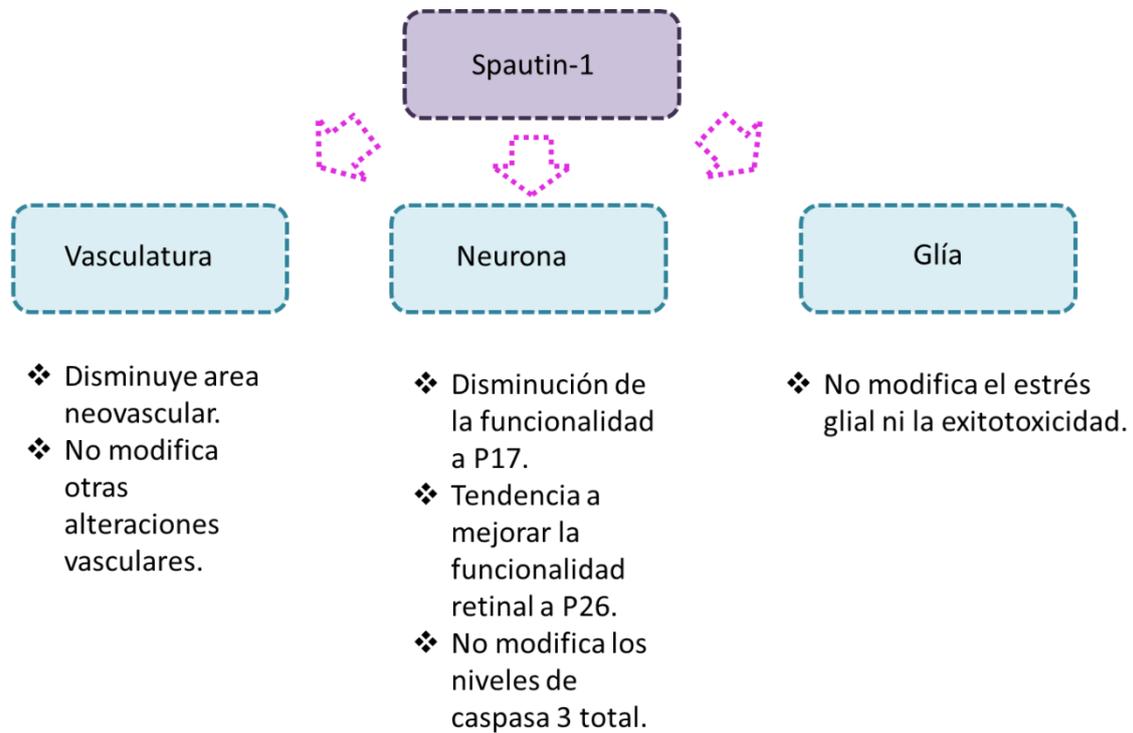


Figura 21. Inmunofluorescencia de marcadores de autofagia en retinas de ratones P17 y P26 OIR tratados con Spautin-1 o Vehículo. Análisis de Inmunofluorescencia de LC3B (verde) and p62 (rojo) en criosecciones de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Spautin-1 a P12 y evaluados a P17 y P26, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa.

En función de los resultados anteriormente expuestos, los efectos del tratamiento de ratones OIR con Spautin-1 pueden ser resumidos en el siguiente gráfico:



III.V. Rapamicina previno la NV y mejoró la gliosis reactiva

Rapamicina es un potente inhibidor del complejo mTORC1. Una de las funciones de este complejo multiproteico es prevenir la formación de nuevos autofagosomas mediante la fosforilación de ATG13. En este sentido, Rapamicina actúa como un inductor autofágico y sus diferentes formulaciones farmacológicas (everolimus, sirolimus, entre otros) han mostrado efectos benéficos en terapias de cáncer (118). Por otro lado, la fosforilación de mTORC1 incrementa la síntesis de VEGF, un factor trófico requerido para la supervivencia, proliferación y migración de las CEs vasculares (119). Nuevos estudios realizados en patologías retinales neurodegenerativas apuntan a la Rapamicina como un agente terapéutico prometedor ya que

el mismo sería capaz tanto de activar la autofagia, como de inhibir la angiogénesis (120). Por lo tanto, decidimos evaluar los eventos proliferativos neovasculares y neurodegenerativos en el modelo de OIR luego del tratamiento con Rapamicina (Figura 22A).

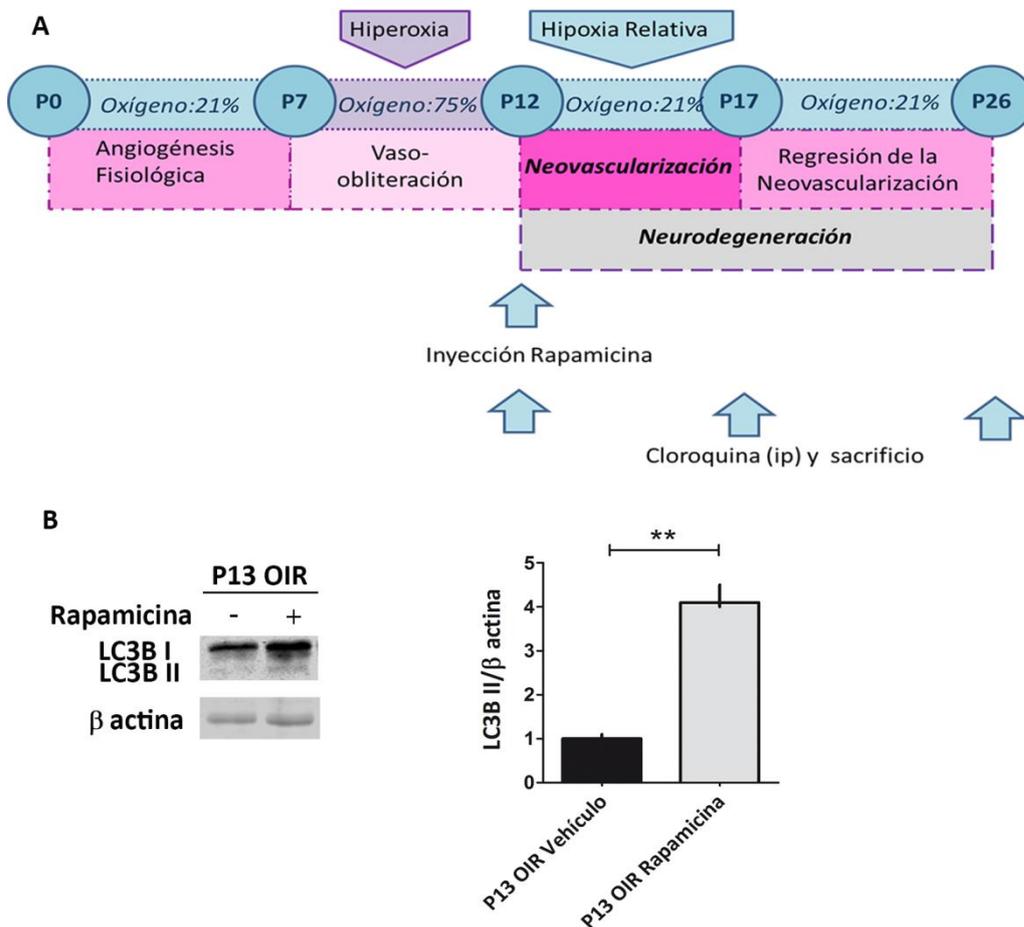


Figura 22: Rapamicina induce el flujo autofágico en retinas de ratones OIR. A) Esquema de tratamiento. Rapamicina (0,5 μ g/ml) o vehículo fue inyectado intraocularmente a P12 y evaluado a P13, P17 o P26 luego de 4 horas de una administración intraperitoneal de CQ. **B)** *Western blot* representativo y cuantificación densitométrica de LC3B II en extractos de retina neural de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Rapamicina a P12 y evaluado a P13, 4 horas posteriores a una inyección i.p. de CQ. Se empleó β -actina empleado como control de carga. Los gráficos de cuantificación se presentan como la mediana \pm el rango intercuartil. ** $p < 0.01$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes

Una única inyección intraocular de Rapamicina a P12 OIR, incrementó el flujo autofágico 24 horas más tarde, tal como observamos por ensayos de *Western blot* (Figura 22B). Previamente, Yagasaki *et al.* (68) demostró que Rapamicina administrada por vía i.p. disminuye el área neovascular en P17 OIR. En nuestras condiciones experimentales, en concordancia con lo previamente observado, el análisis cuantitativo reveló una disminución de más del 75% del área NV retinal. Sin embargo, otras alteraciones vasculares como el área avascular, la dilatación y la tortuosidad de los vasos no mejoraron con el tratamiento (Figura 23A y B). En

línea con estas observaciones, nuestro siguiente objetivo fue determinar los niveles proteicos de VEGF luego del tratamiento con Rapamicina. Nuestros resultados muestran que la inyección con Rapamicina a P12 OIR redujo significativamente la expresión proteica de VEGF a P17, respecto a las muestras de ratones inyectados con vehículo (Figura 23C). A pesar de los cambios vasculares mediados por Rapamicina, no se observaron modificaciones en la tinción para NG-2 luego del tratamiento (Figura 23D).

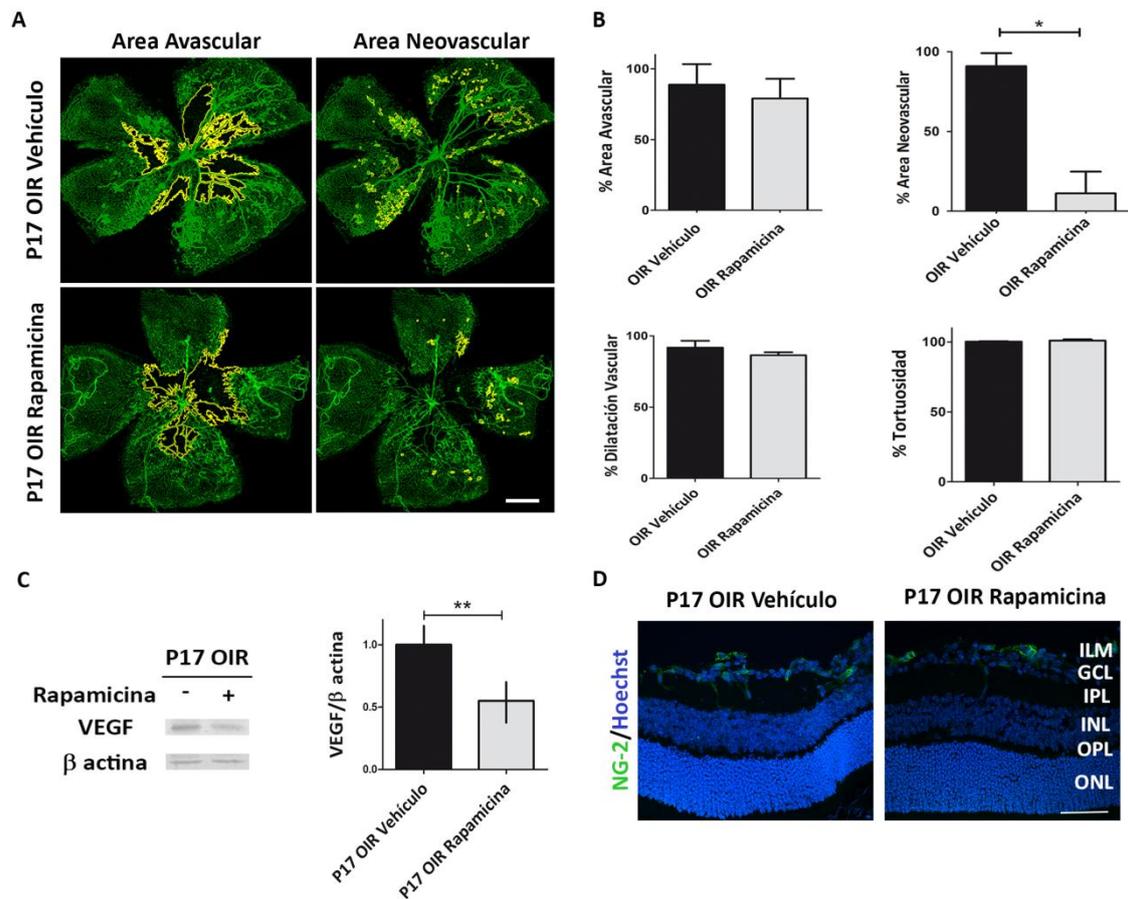


Figura 23: Efecto de Rapamicina en alteraciones vasculares en retinas de ratones OIR. A) Imágenes representativas de *flat-mount* de retinas P17 OIR vehículo e inyectadas con Rapamicina, marcadas con lectina GSA-IB4 para identificar los plexos vasculares. Áreas con vaso-obliteración (VO) y NV fueron delimitadas. Escala: 500 μ m. **B)** Cuantificación del porcentaje de VO, NV, diámetro y tortuosidad vascular. **C)** *Western blot* representativo y cuantificación de expresión proteica de VEGF en extractos de retina neural en ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Rapamicina a P12 y evaluado a P17. Se empleó β -actina como control de carga. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **D)** Inmunofluorescencia representativa de NG-2 (verde) en criocortes de ratones tratados con vehículo o Rapamicina a P12 y evaluado a P17. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa. Media \pm el error estándar (SEM) (representado como T) fueron graficadas en los análisis paramétricos, mientras que la mediana y

el rango intercuartil (representado como I) se mostraron cuando el análisis fue no paramétrico. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Posteriormente, analizamos si la inhibición de mTORC1 mejora la gliosis. Por ensayos de *Western blot* observamos que los niveles proteicos de GFAP eran comparables en retinas P17 OIR tratadas con Rapamicina o vehículo (Figura 24A y B). Este resultado se corroboró por análisis de microscopía confocal en *flat-mounts* (Figura 24C). Sin embargo, la cuantificación a P26 evidenció una disminución significativa en los niveles de expresión proteica de GFAP luego del tratamiento con Rapamicina. Al mismo tiempo, evaluamos la habilidad glial para prevenir la excitotoxicidad analizando los niveles de GS. La cuantificación densitométrica de los niveles proteicos de la enzima detoxificante indicaron que no hubo modificaciones tras el tratamiento con Rapamicina a ninguno de los tiempos evaluados (Figura 24A y B), a pesar de que se observó un ligero incremento en las capas más internas de la retina en ensayos de inmunofluorescencia (Figura 24D).

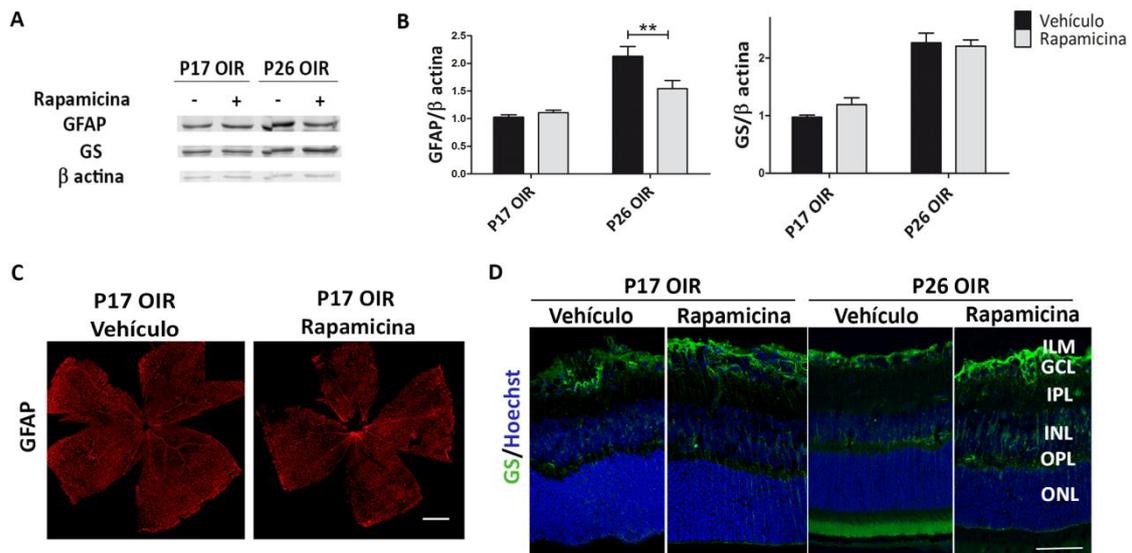


Figura 24: Rapamicina disminuye el estrés glial a P26 OIR. A) *Western blot* representativo de GS y GFAP en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Rapamicina a P12 y evaluado a P17 y P26. Se empleó β -actina como control de carga. **B)** Niveles proteicos de GS y GFAP fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **C)** Imágenes confocales representativas de *flat-mount* de retinas P17 marcadas con GFAP en ratones OIR-vehículo y OIR-Rapamicina. Escala: 500 μ m. **D)** Análisis de Inmunofluorescencia de GS (verde) en criosecciones de ratones OIR tratados con vehículo o Rapamicina a P12 y evaluado a P17 y P26. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. ** $p < 0.01$.

Respecto al componente neuronal, estudios electroretinográficos mostraron que la neurodegeneración asociada a la NV no fue prevenida por la inyección de Rapamicina a P12, ya que las señales de latencia y amplitudes no mostraron diferencias luego del tratamiento (Figura 25A). Correlativamente, los ensayos de TUNEL (Figura 25B) y la cuantificación de caspasa 3 total por *Western blot* (Figura 26A y B) fueron similares en muestras de ratones tratados con vehículo o Rapamicina.

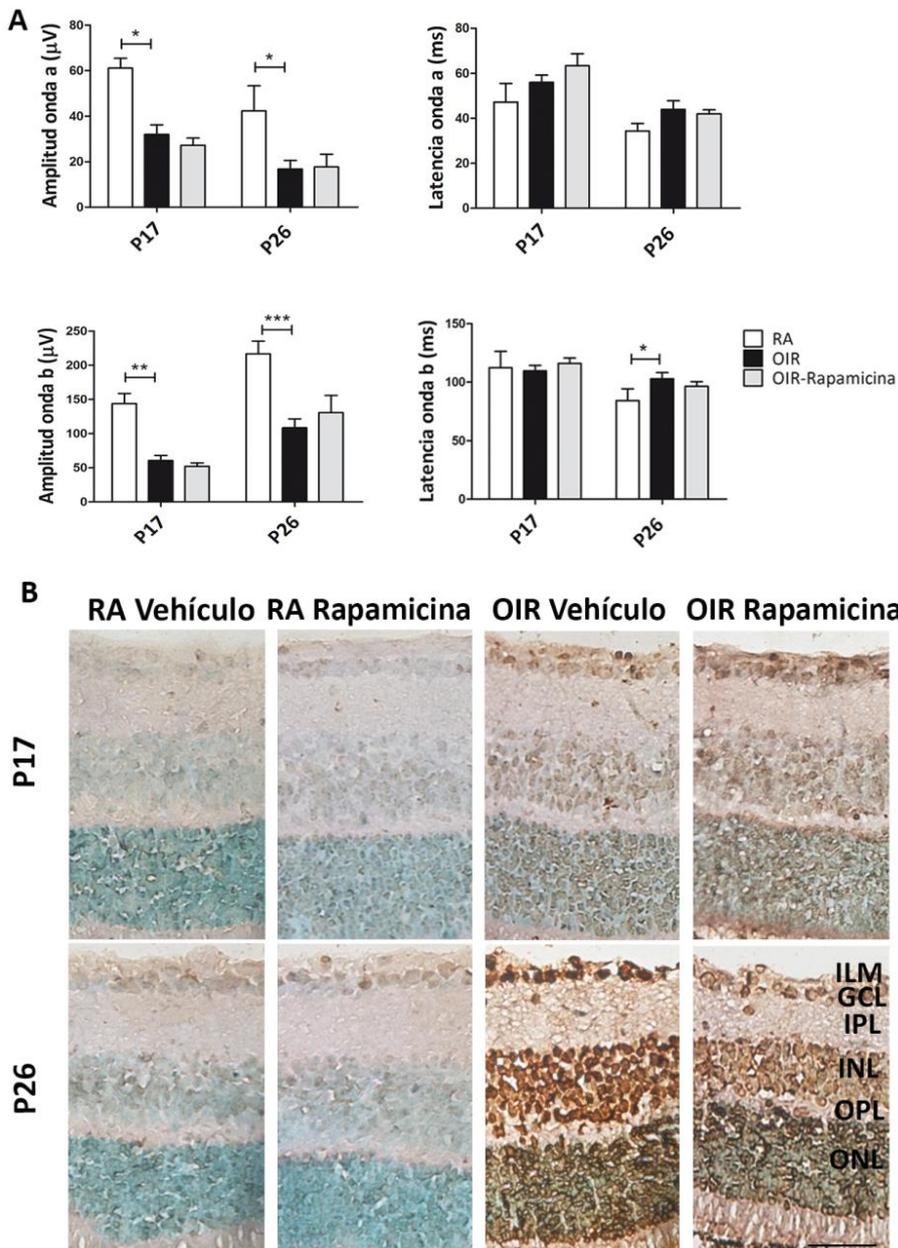


Figura 25: Una única inyección de Rapamicina no fue capaz de modificar la funcionalidad neuronal ni prevenir la muerte por apoptosis en ratones OIR. A) Amplitudes y latencias de ondas a y b de registros electroretinográficos adquiridos escotópicamente a P17 y P26 en ratones control y OIR inyectados a P12 con vehículo o Rapamicina. Los gráficos muestran el promedio de respuesta de ambos ojos, al menos ocho ratones por condición fueron empleados. **B)** Ensayo de TUNEL en criosecciones de ojos de

ratón control y OIR inyectados a P12 con vehículo o Rapamicina. Escala: 50 μ m. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

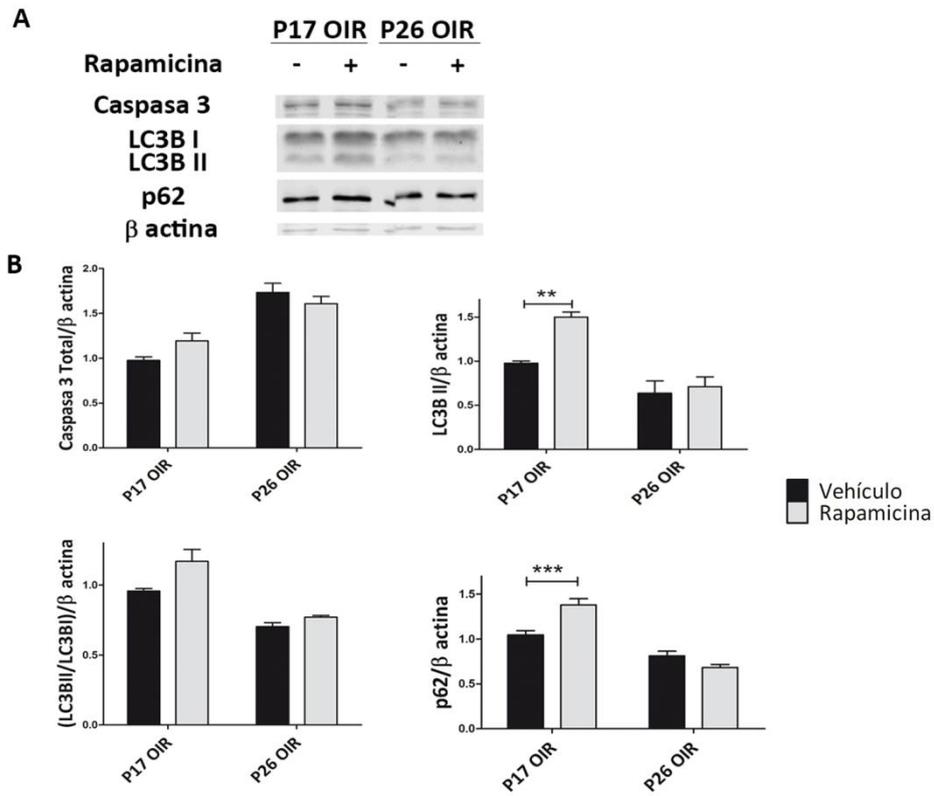


Figura 26: Los niveles de LC3B II y p62 se mantienen elevados 5 días posteriores a la inyección con Rapamicina: A) y B) *Western blot* representativo y cuantificación de caspasa 3 total, LC3B II and p62 en muestras de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Rapamicina a P12 y evaluado a P17 y P26, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Se empleó β -actina como control de carga. Los niveles proteicos de Caspasa 3 total, LC3B II y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Adicionalmente, evaluamos los cambios en el flujo autofágico a P17 y P26 OIR. Como se observa en las Figuras 26 A y B, el tratamiento incrementó los niveles de LC3B II y p62 hasta P17 inclusive. Ensayos de inmunofluorescencia (Figura 27) fueron consistentes con los resultados de *Western blot* demostrando un incremento en la marca de LC3B y p62 principalmente en GCL y INL.

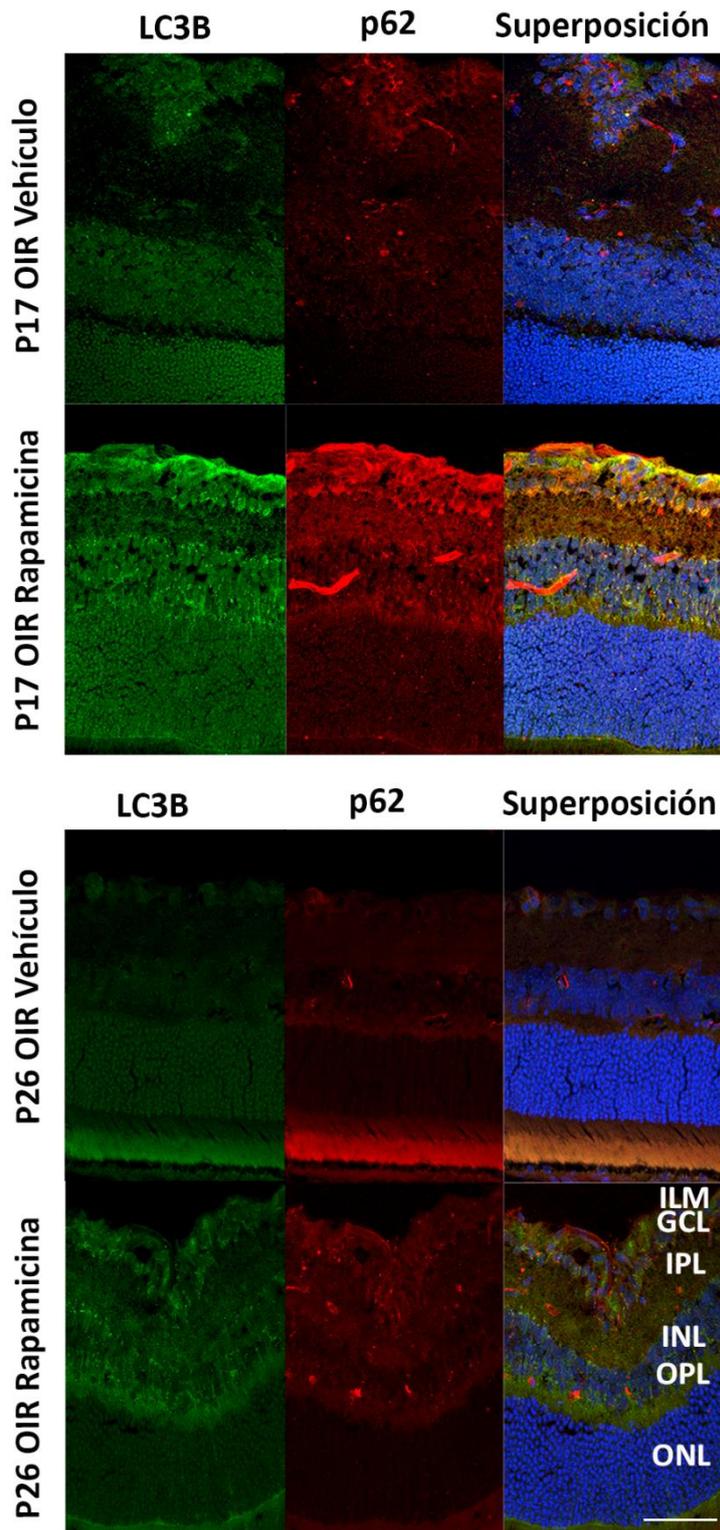


Figura 27. Rapamicina activa el flujo autofágico en el modelo OIR. Análisis de inmunofluorescencia de LC3B (verde) and p62 (rojo) en criosecciones de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o Rapamicina a P12 y evaluado a P17 y P26, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa.

En su conjunto, estos resultados indican que una única inyección con Rapamicina es capaz de prevenir la formación de neovasos a P17 OIR mediante la disminución de los niveles de VEGF y atenuar la gliosis reactiva a P26. Sin embargo, otras alteraciones vasculares y neuronales no se revertieron con el tratamiento.

III.VI. El tratamiento con anti-VEGF incrementa el flujo autofágico

En los últimos años, múltiples estudios han demostrado que los inhibidores de VEGF pueden generar activación del flujo autofágico, incluyendo Ranibizumab y Bevacizumab, entre otros (72, 104, 121). Por lo tanto, decidimos determinar si el tratamiento clásico anti-angiogénico empleado en retinopatías proliferativas era capaz de modular el flujo autofágico. Con este propósito, empleando un esquema de tratamiento similar (Figura 28A), verificamos el efecto antiangiogénico del anti-VEGF sobre las alteraciones vasculares, observándose una reducción significativa en las áreas neovascular y avascular (Figura 28B). Como era esperado, la administración del anticuerpo monoclonal anti-VEGF redujo significativamente la expresión proteica del factor trófico a P17, respecto a sus controles OIR-vehículo (Figura 28C).

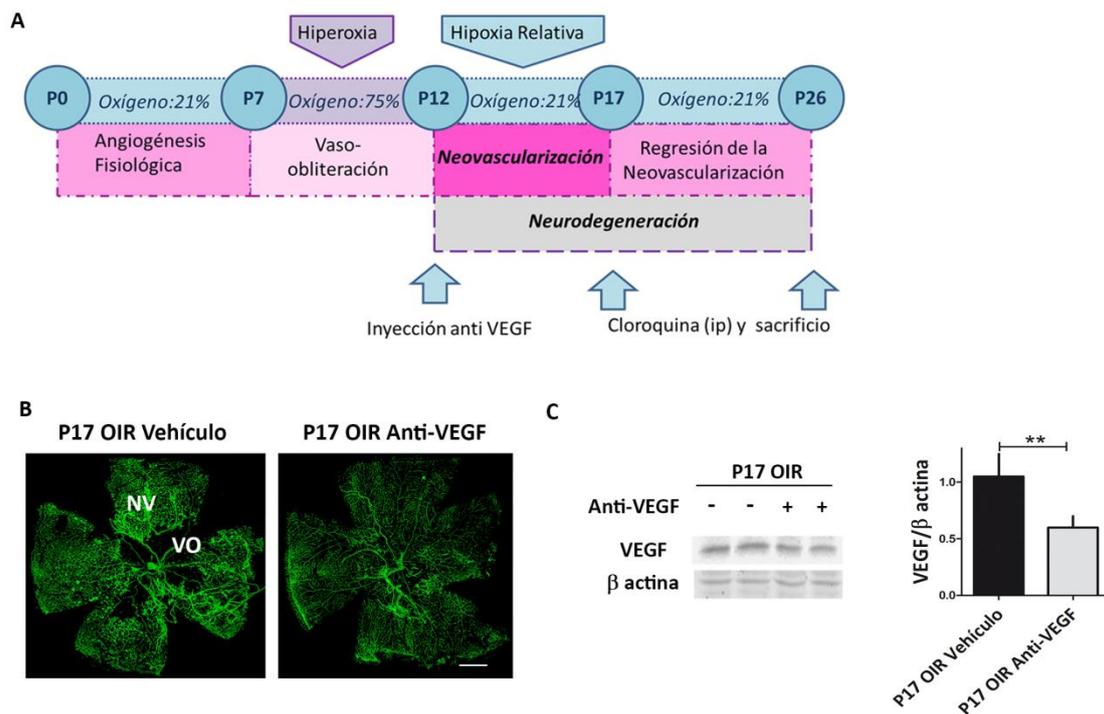


Figura 28: Administración de anti-VEGF al modelo de OIR. A) Esquema terapéutico. Anti-VEGF mAb (1.25 μ g) o vehículo fue administrado intravítreamente a P12 y evaluado a P17 o P26, luego de 4 horas de la administración de CQ. **B)** Imágenes representativas de *flat-mounts* de retinas a P17 OIR-Vehículo o tratadas con anti-VEGF y posteriormente marcadas con GSA-IB4. Escala: 500 μ m. **C)** *Western blot* representativo de VEGF a P17 en extractos de retinas neurales de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o anti-VEGF a P12 OIR. Niveles proteicos de VEGF fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan

como la mediana \pm el rango intercuartil. $**p < 0.01$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Para determinar el efecto del tratamiento anti-VEGF sobre el flujo autofágico en el modelo de OIR, inicialmente evaluamos los marcadores clásicos de la autofagia por ensayos de *Western blot*. El análisis cuantitativo reveló un ligero pero significativo incremento de LC3B II a P17 OIR (Figura 29A). Este incremento se corroboró por ensayos de inmunofluorescencia donde el incremento de LC3B fue detectado principalmente en las capas GCL e INL (Figura 29B). Estos hallazgos demuestran que la inhibición de VEGF previene las alteraciones vasculares pero también incrementa el flujo autofágico.

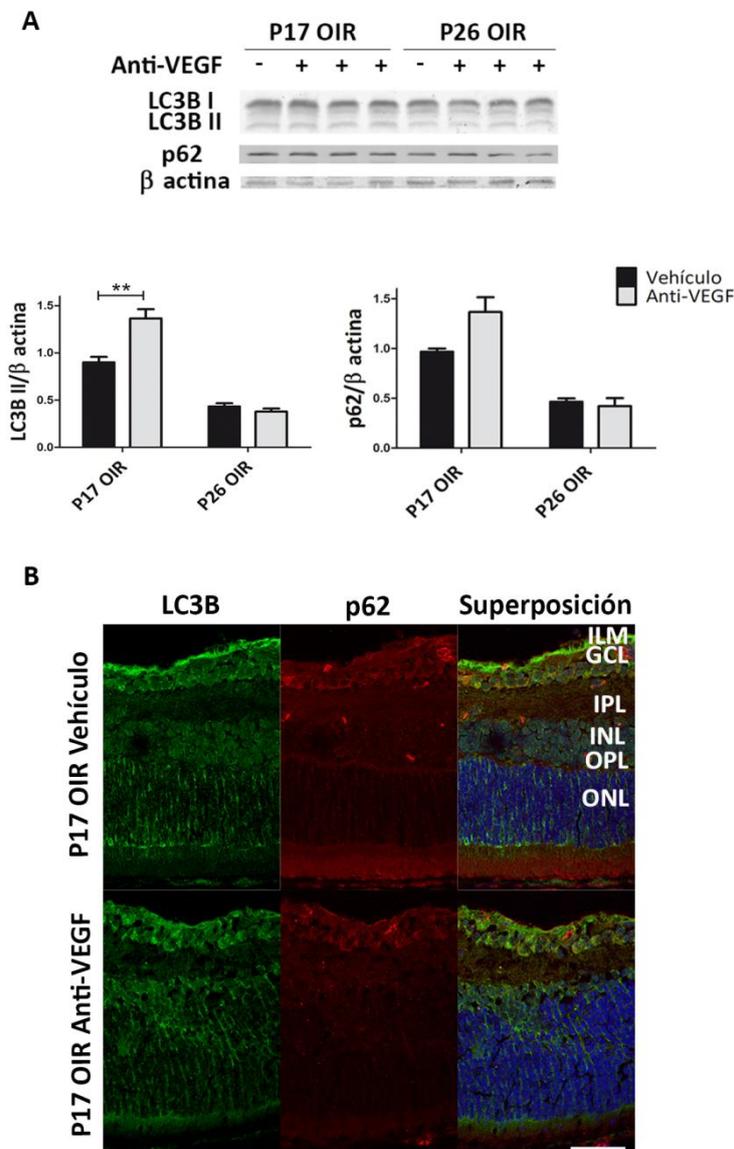
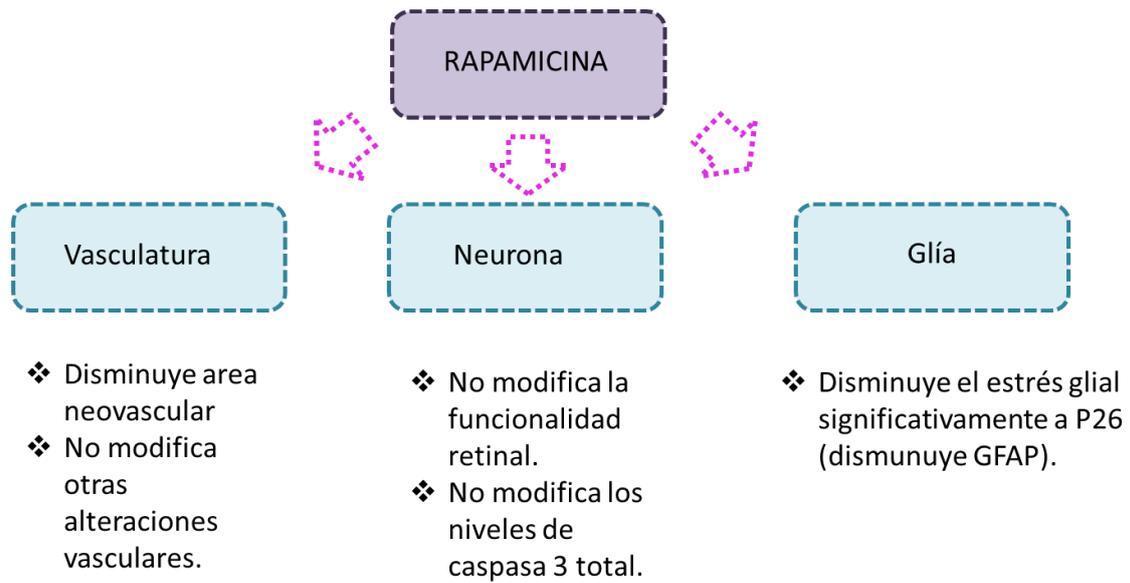


Figura 29: Efecto del tratamiento de anti-VEGF sobre los marcadores autofágicos en retinas OIR. A) *Western blot* representativo de LC3B II y p62 en extractos de retina neural de ratones OIR inyectados

intraocularmente con vehículo o anti-VEGF a P12 y evaluados a P17 y P26, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Niveles proteicos de LC3B II y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. **** $p < 0.01$.** Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **B)** Análisis de inmunofluorescencia de LC3B (verde) and p62 (rojo) en criosecciones de ratones OIR inyectados intraocularmente con vehículo o anti-VEGF a P12 y evaluado a P17, 4 horas posteriores a la administración de CQ. Escala: 50 μ m. Abreviaturas: ILM, membrana limitante interna; GCL, capa de células ganglionares; IPL, capa plexiforme interna; INL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa.

En suma, los estímulos de Rapamicina y anti-VEGF nos permiten concluir:



A diferencia de la terapia anti-VEGF, el tratamiento con Rapamicina mejora el stress glial y no incrementa la neurodegeneración.

IV. Resultados

Modelo IN VITRO

IV.I. La hipoxia incrementa el flujo autofágico en células gliales de Müller MIO-M1 a tiempos cortos.

Los tejidos nerviosos, entre ellos la retina y el cerebro, se caracterizan por ser metabólicamente muy activos. Dado que estos son incapaces de generar reservas energéticas y que poseen un elevado consumo de oxígeno por célula, son muy dependientes de los nutrientes que son provistos por el torrente circulatorio (122). Se ha observado que pequeños cambios en la tensión de oxígeno gatillan mecanismos de supervivencia en la retina (123). En este sentido, las CGM constituyen una población celular capaz de detectar cambios en el microambiente retinal con rapidez, a fin de establecer respuestas protectoras para las neuronas. Algunas de las respuestas más ampliamente estudiadas incluyen la gliosis, la secreción de factores tróficos, el establecimiento de una respuesta pro-inflamatoria reparativa, entre otros (91, 115, 124). Interesantemente, la activación de la autofagia podría ser relevante para las CGM ya que este mecanismo les aseguraría la provisión de nutrientes durante el período hipóxico, y de esta manera se mantendrían funcionales. Previamente, en nuestro modelo *in vivo*, observamos que las células residentes en las capas ILM e INL son las que se afectan en mayor medida por la deficiente provisión de oxígeno, incrementando el número de autofagosomas por célula. En dichas capas se encuentran, además de neuronas, los *endfeet* y los cuerpos de las CGM respectivamente.

En función de lo anteriormente expuesto, a continuación nos planteamos analizar el efecto de la hipoxia sobre el flujo autofágico en las CGM y en qué medida la modulación de dicho flujo podría afectar a los eventos de NV y gliosis.

En ensayos *in vitro* se ha descrito que las CGM incubadas en medio hiperglucémico presentan un flujo autofágico alterado, dado que los autofagosomas no podrían alcanzar la etapa de degradación (125). Sin embargo, en un ambiente hipóxico las CGM de rata han mostrado incremento en los niveles de LC3B II (126).

Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar los cambios en el flujo autofágico en una línea celular humana inmortalizada de CGM (MIO-M1) en condiciones de hipoxia. Para ello, desarrollamos en paralelo incubaciones en hipoxia gaseosa (oxígeno: $O_2=1\%$) y en $CoCl_2$, un modelo de hipoxia química que asegura la inhibición de las enzimas proliil-hidroxilasas. Se incorporaron al diseño experimental controles con y sin CQ a fin de evaluar la acumulación de autofagosomas. Además, para determinar si el flujo se mantiene a lo largo del tiempo o si existen variaciones temporales, se realizaron estímulos a tiempos cortos (4 horas) y largos (24 horas).

Si bien las CGM son muy perceptivas a los cambios en el microambiente, se consideran las más resistentes a los estímulos. A fin de encontrar concentraciones de CoCl_2 que en los tiempos prolongados no afecten la viabilidad celular se realizaron ensayos con sales de tetrazolio (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) (MTT). (Figura 30A y B).

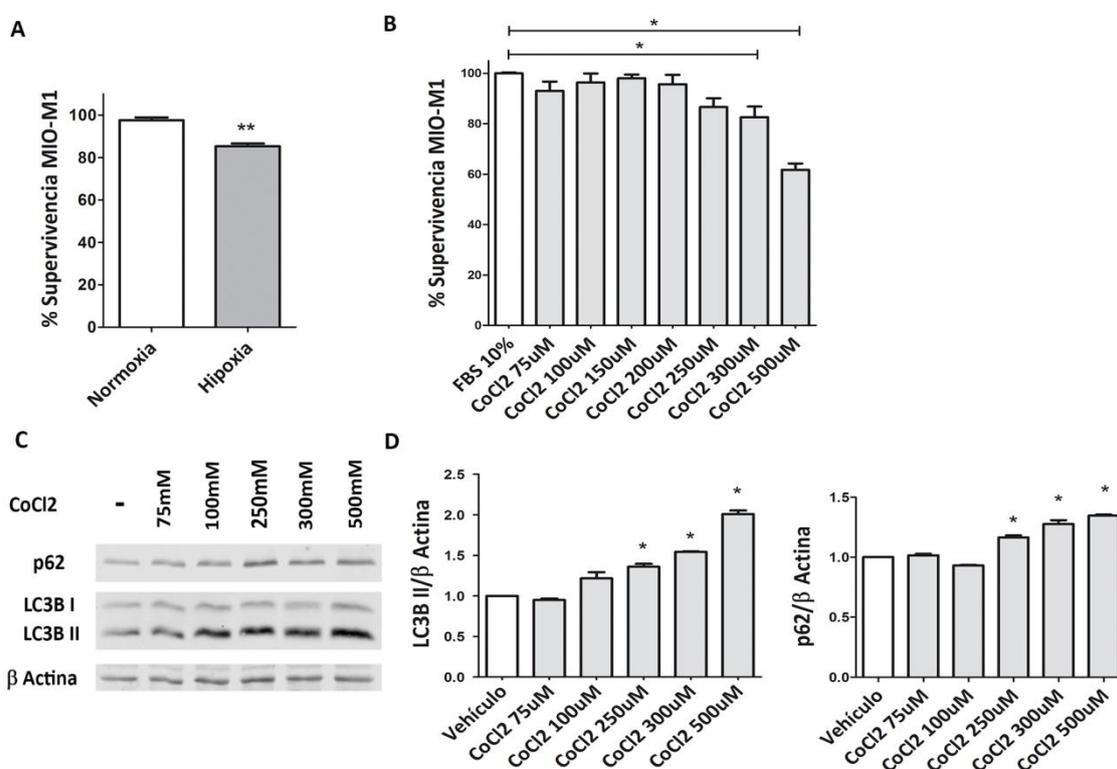


Figura 30: Ensayo de viabilidad celular por MTT. A) Viabilidad de células MIO-M1 expuestas a estímulos de 24 horas en condiciones de normoxia o hipoxia (O_2 :1%). **B)** Viabilidad de células MIO-M1 expuestas a concentraciones crecientes de CoCl_2 durante 24 horas. El ensayo de viabilidad celular se realizó empleando el test del MTT, evaluado espectrofotométricamente. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **C)** Ensayo de *Western blot* de lisados obtenidos de células MIO-M1 incubadas en concentraciones crecientes de CoCl_2 durante 4 horas y analizados empleando anticuerpos primarios anti LC3B y p62, y anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye 800 y 690. **D)** Niveles proteicos de LC3B II y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

La Figura 30 muestra que en hipoxia gaseosa, la viabilidad se encuentra disminuida, aproximadamente un 15% de la población celular tras 24 horas de estímulo. Al mismo tiempo, concentraciones mayores a $300\mu\text{M}$ de CoCl_2 muestran una reducción significativa en el porcentaje de células viables respecto al control. A continuación, estudiamos los cambios en la expresión de las proteínas autofágicas en las células MIO-M1 al ser incubadas en medios conteniendo concentraciones crecientes de CoCl_2 durante 4 horas. El análisis densitométrico

de las bandas de LC3B II y p62 evidenció que a partir de una concentración de CoCl_2 de $250\mu\text{M}$ se observa un incremento significativo en los niveles proteicos de dichas proteínas. En función de estos resultados, seleccionamos la concentración de $250\mu\text{M}$ para los estudios *in vitro* pues constituye la concentración mínima que cumple con dos condiciones de interés: no afecta la viabilidad celular y es capaz de activar el flujo autofágico.

La autofagia es un mecanismo celular rápidamente activado ante cambios ambientales y mediante la cual se favorece la adaptación a las nuevas condiciones (35). Es por ello que decidimos evaluar si la hipoxia modifica el flujo autofágico en las CGM a tiempos cortos. Para este fin, las CGM humanas se expusieron a condiciones de hipoxia o normoxia durante 4 horas y en los casos indicados se realizaron incubaciones conjuntas con CQ y vehículo. Simultáneamente, se incubaron células MIO-M1 en presencia de CoCl_2 $250\mu\text{M}$ por el mismo período de tiempo, incluyendo controles con y sin CQ. Por ensayos de *Western blot* se evidenció que en ausencia de CQ los niveles de LC3B II y p62 no presentaron diferencias significativas en condiciones de hipoxia gaseosa o CoCl_2 respecto al control normoxia. Sin embargo, en muestras tratadas con CQ se observó un incremento de los niveles proteicos de LC3B II con ambos estímulos hipóxicos. Bajo estímulo con hipoxia gaseosa, los niveles de p62 también incrementaron significativamente, mientras que en presencia de CoCl_2 se observó un incremento, aunque no significativo de la proteína (Figura 31A y B).

Por otro lado, la incubación con CQ mostró la acumulación de LC3B II en CGM respecto a sus controles vehículo, sugiriendo que las vesículas autofágicas que se forman pueden seguir la vía degradativa apropiadamente.

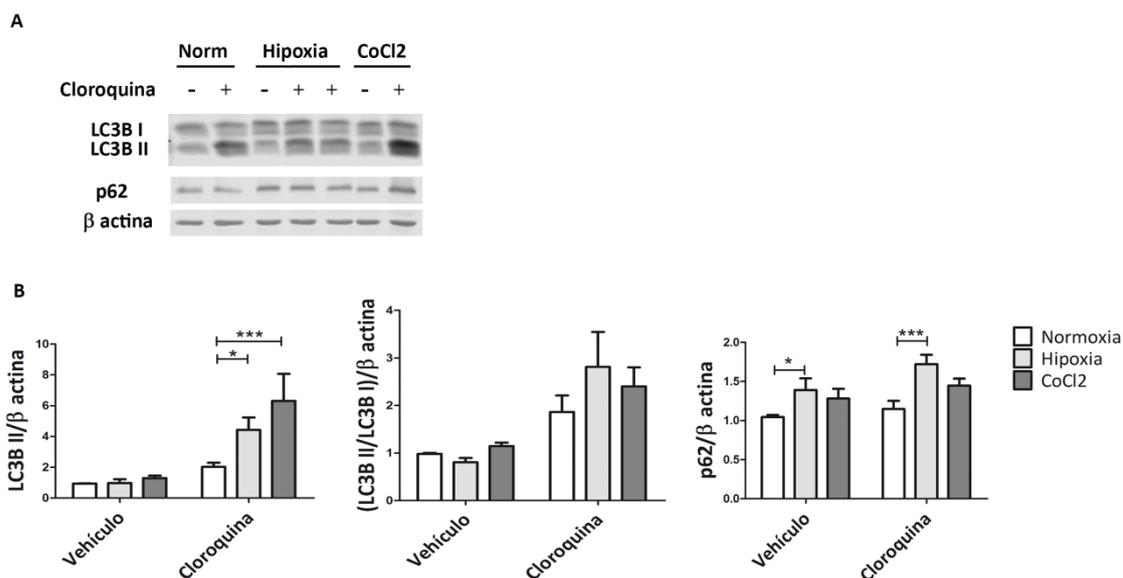


Figura 31: La hipoxia gaseosa y química incrementan los niveles de LC3B II y p62 en CGM a tiempos cortos. Ensayo de *Western blot* de lisados obtenidos de células MIO-M1 incubadas en hipoxia gaseosa ($O_2:1\%$) o química ($CoCl_2$ 250Mm) durante 4 horas y analizados empleando anticuerpos primarios anti LC3B y p62, y anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye 800 y 690. Niveles proteicos de LC3B II y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Adicionalmente, se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia con los marcadores clásicos de la autofagia evaluados previamente por *Western blot*. Correlativamente, se observó mayor número de LC3B punta por célula e incrementada colocalización de LC3B y p62 en células expuestas a $CoCl_2$ durante 4 horas. Bajo estímulo con hipoxia gaseosa, también se observó un incremento en el número de vesículas LC3B positivas (Figura 32). Este ensayo sugiere que existe un incremento en el número de autofagosomas en el citoplasma de las CGM bajo ambas condiciones de hipoxia.

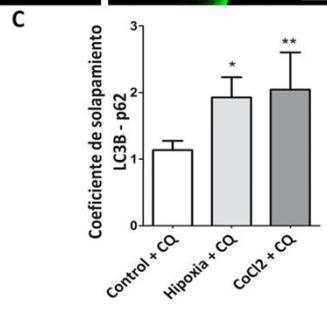
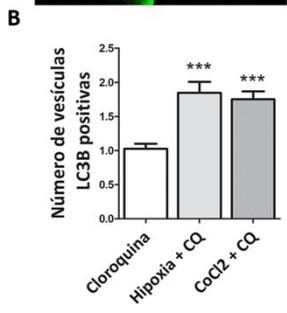
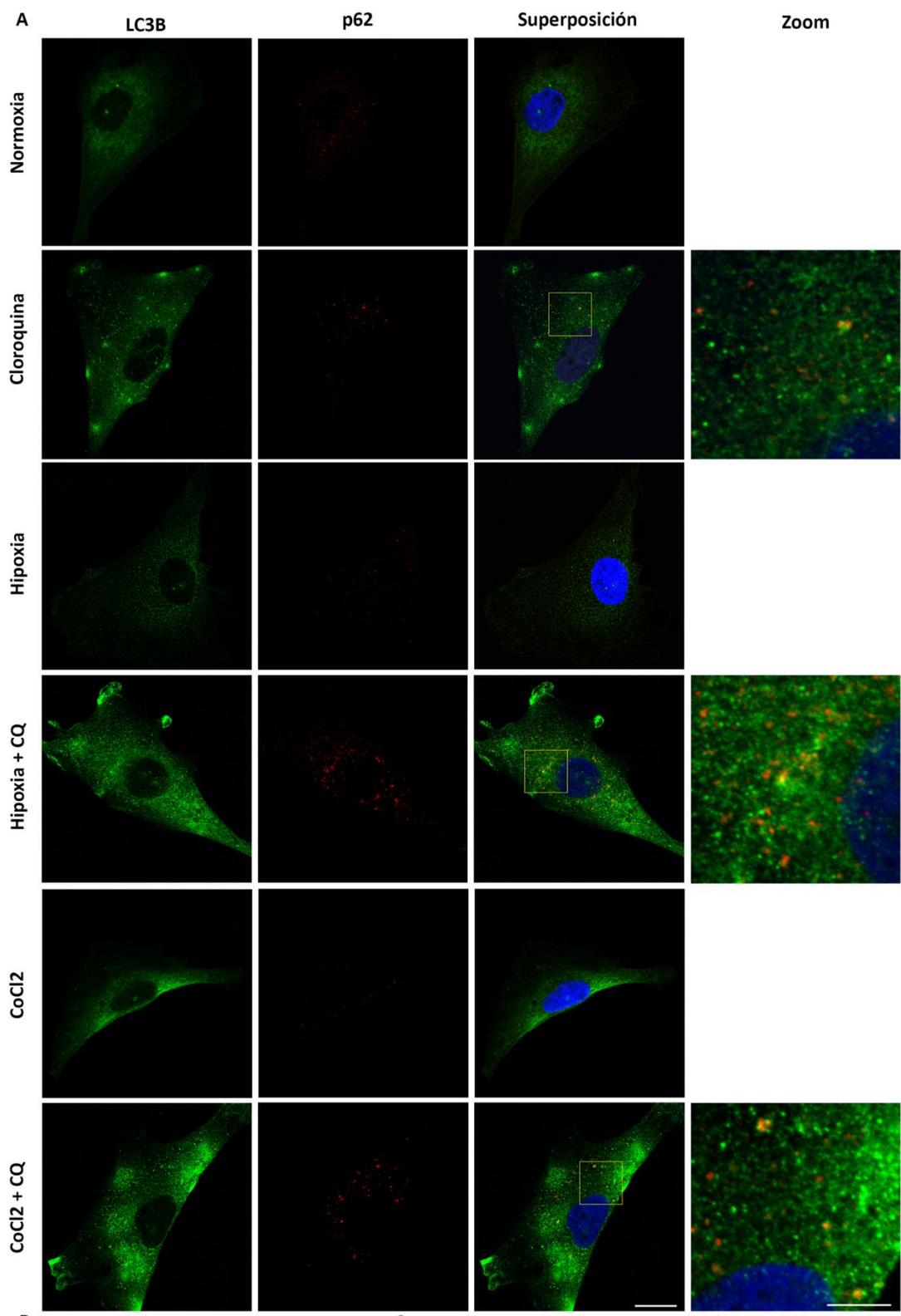


Figura 32: Inmunofluorescencia de LC3B (verde) y p62 (rojo) incubadas en hipoxia gaseosa (O₂:1%) o CoCl₂ 250μM durante 4 horas en presencia o ausencia de CQ. A) Imágenes confocales obtenidas a 60x con objetivo aceite y zoom 5x, en las mejores condiciones confocales y deconvolucionadas mediante Software ImageJ Fiji. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258 (blue). Escala: 15μm. El zoom representa la ampliación de la zona demarcada en amarillo. Escala: 5μm. **B)** Cuantificación del número de vesículas LC3B positivas en células incubadas con CQ mediante Software ImageJ Fiji, empleando el pluggin Analyze particles. **C)** Cuantificación de colocalización de LC3B y p62 en células incubadas con CQ mediante Software ImageJ Fiji, empleando el pluggin JACoP. Los valores del coeficiente de solapamiento de Pearson fueron comparados estadísticamente mediante análisis ANOVA 1 vía. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media ± SEM. **p*< 0.05, ***p*< 0.01. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Las respuestas celulares a los estímulos pueden variar en función de la duración de los mismos. Es por ello que a continuación decidimos evaluar el comportamiento de las CGM al estímulo de hipoxia mediante cambios en el flujo autofágico a tiempos más largos: 24horas. Las condiciones experimentales fueron similares a las de los tiempos cortos. Por ensayos de *Western blot* observamos que los niveles proteicos de LC3B II y p62 retornan a los niveles basales cuando las células se expusieron a hipoxia gaseosa por un día (Figura 33A y B). Los transcriptos de Beclin-1 y ATG5 muestran una tendencia a disminuir, aunque no significativamente (Figura 33D). En contraste, se observaron incrementos significativos en las proteínas de la vía autofágica en presencia de CoCl₂ (Figura 33A y B). A pesar de ello, los transcriptos de Beclin-1 y ATG-5 no mostraron incremento (Figura 33C), indicando una suave activación del flujo.

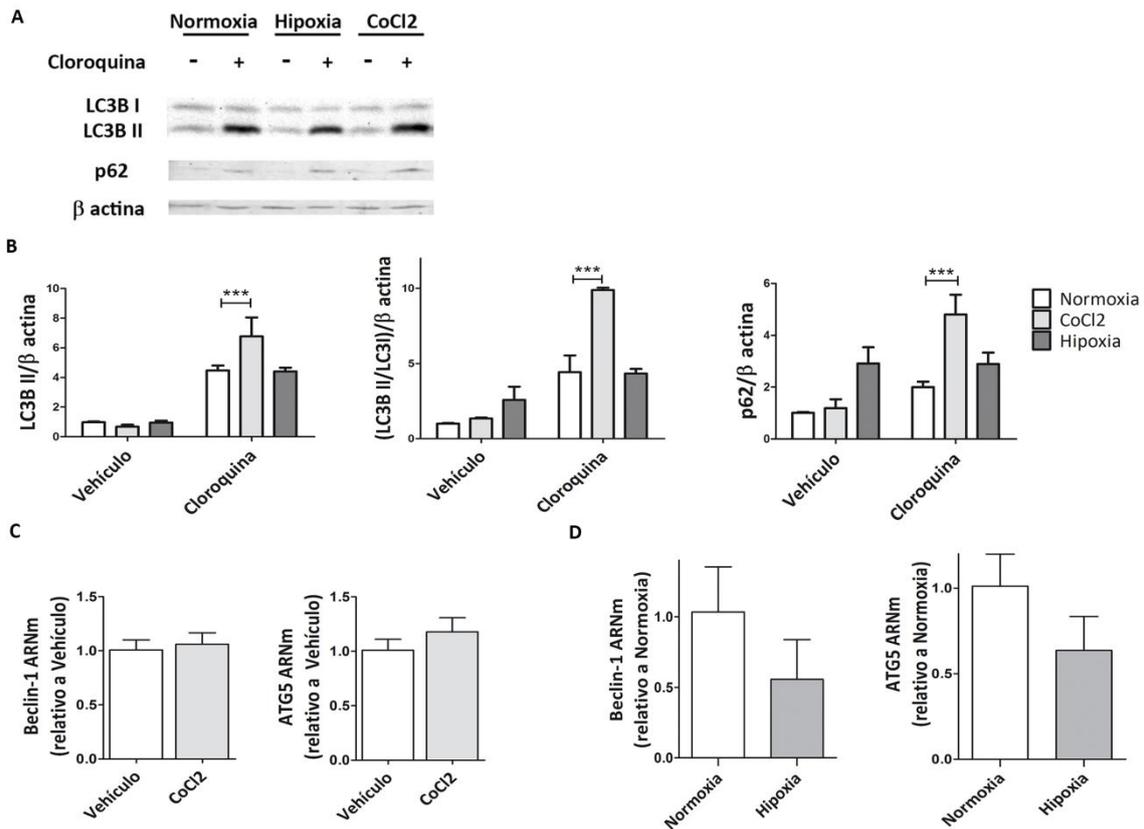


Figura 33: CoCl₂ incrementa los niveles proteicos de LC3B II y p62 a tiempos largos. **A)** Ensayo de *Western blot* de células MIO-M1 incubadas en hipoxia gaseosa (O₂:1%) o CoCl₂ 250μM durante 24 horas y analizados empleando anticuerpos primarios anti LC3B y p62, y anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye 800 y 690. **B)** Niveles proteicos de LC3B II y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β-actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media ± SEM. **p* < 0.05, ****p* < 0.001. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **C), D)** Niveles de ARNm de Beclin-1 y ATG5 fueron cuantificados por qRT-PCR en lisados celulares incubados con vehículo y CoCl₂(C), o en condiciones de normoxia e hipoxia (D). Se empleó como control endógeno a β-actina y expresados de acuerdo a el método 2-ΔΔCt empleando como calibrador el nivel de ARNm de las muestras control. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

En el mismo sentido, por inmunofluorescencia observamos que la cuantificación del número de LC3B punta por célula y la colocalización de LC3B y p62 en células expuestas a normoxia e hipoxia por 24 horas no varió significativamente, tanto en ausencia como presencia de CQ (Figura 34A y B).

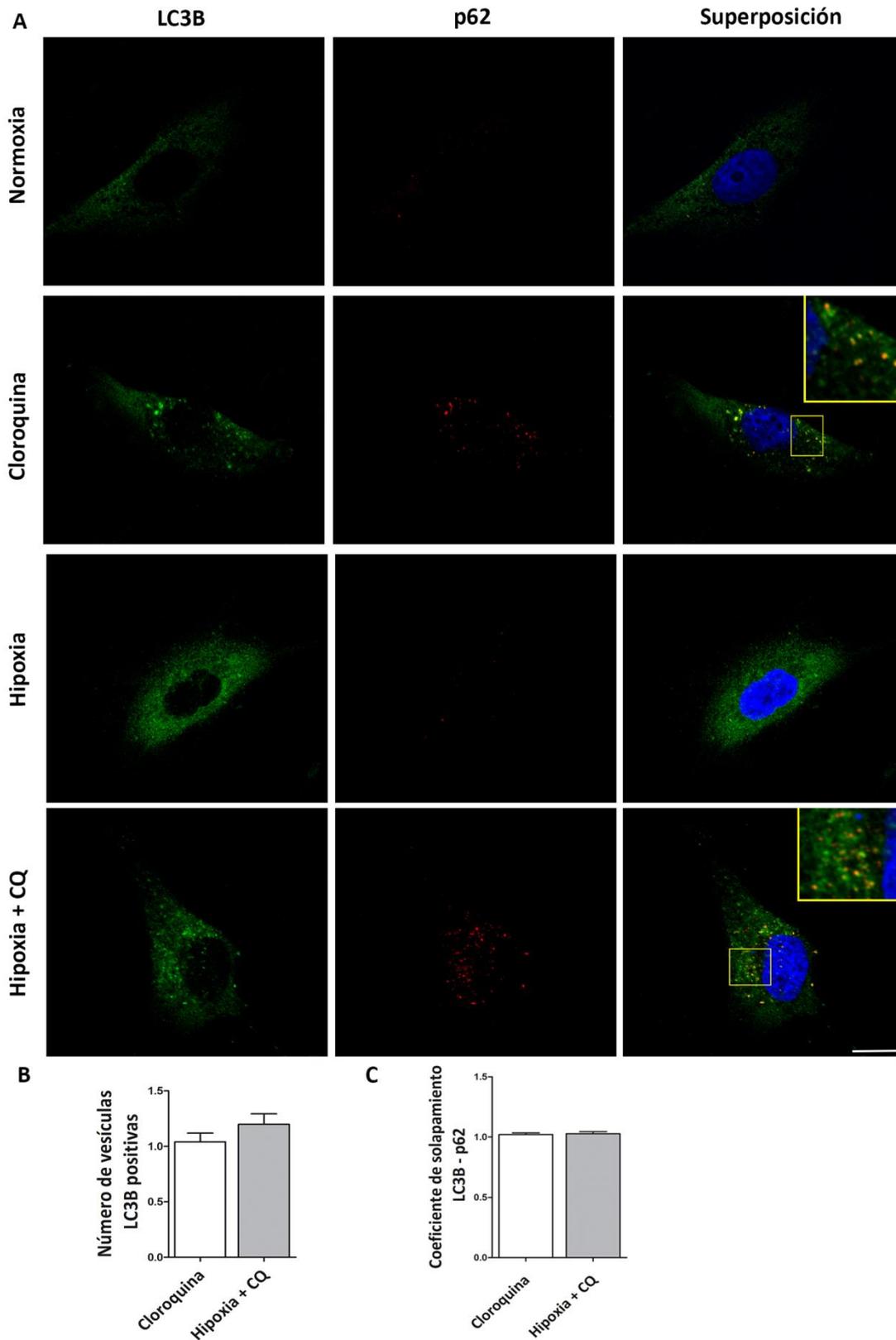


Figura 34: Inmunofluorescencia de LC3B (verde) y p62 (rojo) incubadas en normoxia (O₂:21%) hipoxia gaseosa (O₂:1%) por 24 horas en presencia o ausencia de CQ. A) Imágenes confocales obtenidas a 60x con objetivo aceite y zoom 5x, en las mejores condiciones confocales y deconvolucionadas mediante Software ImajeJ Fiji. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258 (blue). Escala: 15µm. **B)** Cuantificación del número de vesículas LC3B positivas en células incubadas con CQ mediante Software

ImageJ Fiji, empleando el plugin Analyze particles. **C)** Cuantificación de solapamiento de LC3B y p62 en células incubadas con CQ mediante Software ImageJ Fiji, empleando el plugin JACoP. Los valores del coeficiente de solapamiento de Pearson fueron comparados estadísticamente mediante test t. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Ensayos similares en CGM expuestas a CoCl_2 (250 μM) por 24 horas mostraron un incremento en el número de vesículas LC3B positivas acompañado de un ligero incremento pero significativo en la colocalización de LC3B II y p62 respecto al control (Figura 35A y B). Estos resultados muestran que las células MIO-M1 presentan un mayor número de autofagosomas a las 24 horas de estímulo con CoCl_2 respecto a su control CQ.

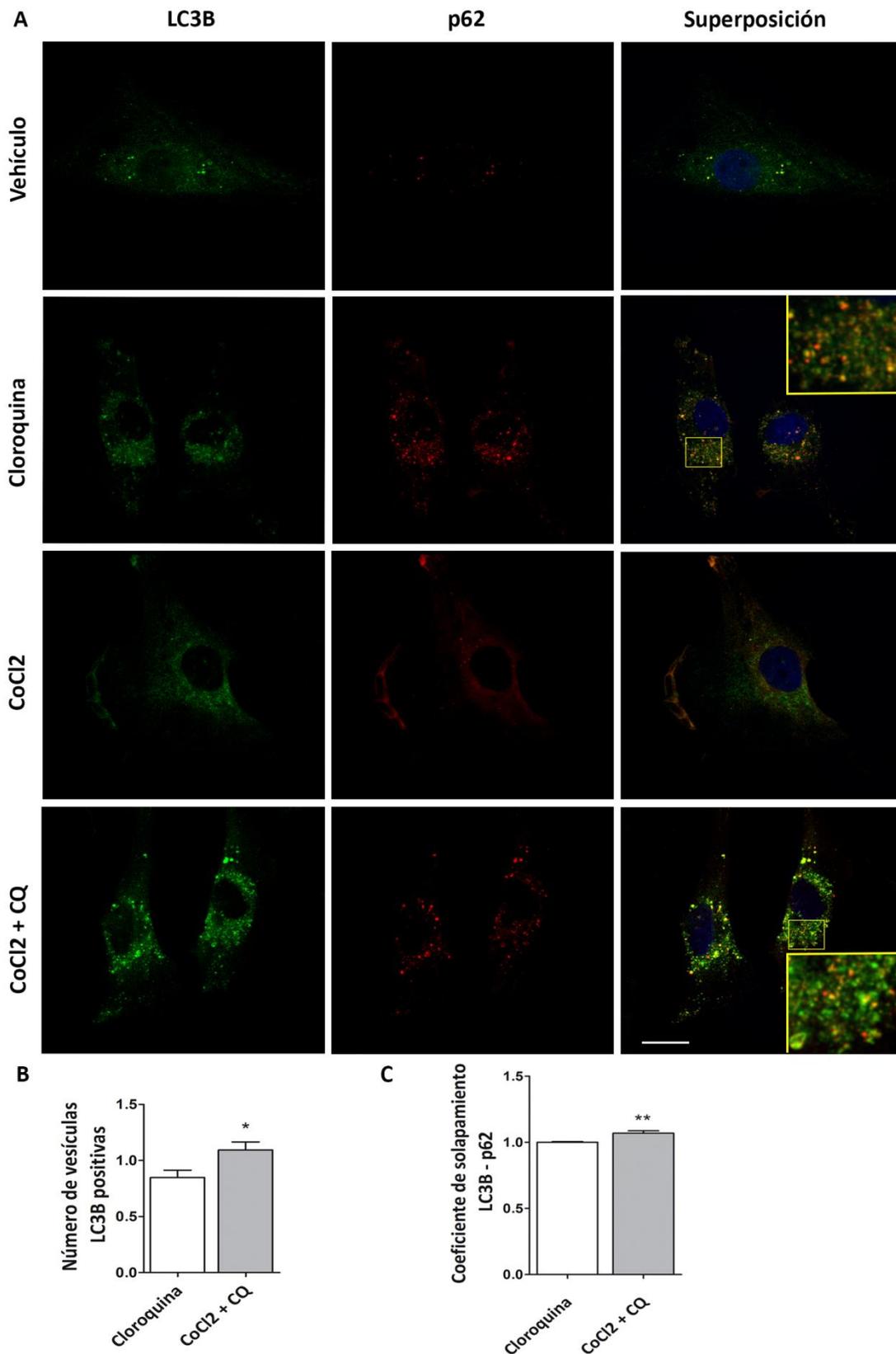


Figura 35: Inmunofluorescencia de LC3B (verde) y p62 (rojo) incubadas en CoCl₂ 250μM por 24 horas en presencia o ausencia de CQ. A) Imágenes confocales obtenidas a 60x con objetivo aceite y zoom 5x, en las mejores condiciones confocales y deconvolucionadas mediante Software ImajeJ Fiji. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258 (blue). Escala: 15μm **B)** Cuantificación del número de vesículas LC3B positivas en células incubadas con CQ mediante Software ImageJ Fiji, empleando el

pluggin Analyze particles. **C)** Cuantificación de solapamiento de LC3B y p62 en células incubadas con CQ mediante Software ImageJ Fiji, empleando el pluggin JACoP. Los valores del coeficiente de solapamiento de Pearson fueron comparados estadísticamente mediante test t. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

El estadio final de la vía autofágica implica la degradación de las vesículas decoradas con LC3B II al fusionarse con lisosomas. Tanto en condiciones control como en situaciones de estímulo (hipoxia gaseosa o química) los ensayos mostraron que CQ induce acumulación de LC3B II a las 24 horas, sugiriendo que en ausencia de CQ los autofagosomas formados alcanzan la etapa de degradación. Con el propósito de evaluar la fusión de los autofagosomas con lisosomas, se realizaron inmunofluorescencias de LC3B con el marcador de compartimentos ácidos y endosomas tardíos LysoTracker, el cual se añadió 60 minutos antes de la finalización del estímulo. Este ensayo no se realizó en hipoxia gaseosa debido a que la cámara de gases es hermética, impidiendo el agregado del reactivo una hora previa a la recolección de la muestra. El análisis de colocación no evidenció diferencias en la comarca de estas proteínas cuando las células MIO-M1 eran incubadas en vehículo y CoCl_2 250 μM (Figura 36A y B). Complementariamente, en condiciones de hipoxia gaseosa y CoCl_2 evaluamos la permeabilidad lisosomal mediante marcación con galectina-1 e inmunofluorescencia confocal. Cuando la estructura de la pared lisosomal se encuentra alterada, galectina-1 es capaz de ingresar al lumen de las vesículas ácidas y unirse a β galactósidos presentes en la pared interna de los lisosomas (127). Un patrón granular podría ser indicativo de permeabilidad y consecuentemente de disfunción lisosomal. En nuestros experimentos observamos que tanto en normoxia como en ambas condiciones de hipoxia, galectina-1 presenta un patrón de distribución homogéneo en el citoplasma celular, indicando que la estructura lisosomal se encuentra preservada tras 24 horas de estímulo (Figura 36C).

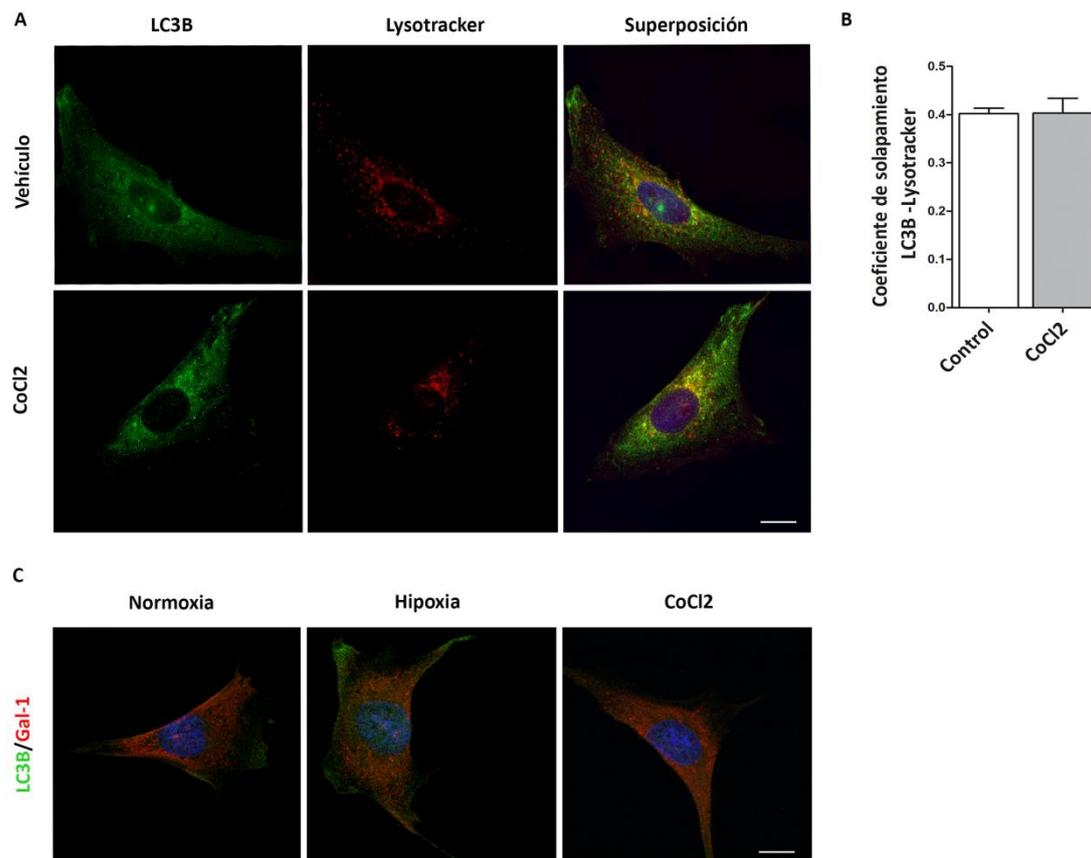
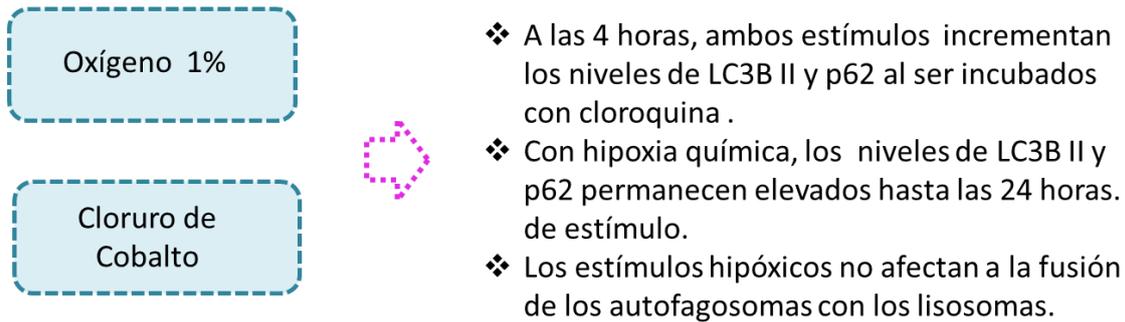


Figura 36: Los autofagosomas de las células MIO-M1 expuestas a hipoxia gaseosa (O_2 :1%) o $CoCl_2$ 250 μ M durante 24 horas pueden alcanzar la etapa degradativa. **A) Inmunofluorescencia de LC3B (verde) y Lysotracker (rojo) en células MIO-M1 incubadas con $CoCl_2$ por 24 horas. Imágenes confocales obtenidas a 60x con objetivo aceite y zoom 5x, en las mejores condiciones confocales y deconvolucionadas mediante Software ImajeJ Fiji. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258 (blue). Escala: 15 μ m. **B)** Cuantificación del solapamiento de LC3B y Lysotracker en células deconvolucionadas mediante Software ImajeJ Fiji JACoP. Los valores del coeficiente de solapamiento de Pearson fueron comparados estadísticamente mediante test t. **C)** Inmunofluorescencia de LC3B (verde) y Galectina-1 (rojo) en células MIO-M1 incubadas en normoxia (O_2 :21%), hipoxia gaseosa o $CoCl_2$ por 24 horas. Imágenes confocales obtenidas a 60x con objetivo aceite y zoom 5x, en las mejores condiciones confocales y deconvolucionadas mediante Software ImajeJ Fiji. Los núcleos celulares fueron teñidos con Hoechst 33258 (blue). Escala: Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. Escala: 15 μ m Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.**

De los resultados anteriormente expuestos podemos concluir:



IV.II. El estrés glial de las CGM puede ser disminuido con inductores del flujo autofágico.

Ante la presencia de un estresor, las CGM reaccionan estableciendo mecanismos protectores para ellas y las neuronas de la retina (115). Nuestro grupo ha demostrado previamente que en el modelo de OIR las CGM se activan luego de la fase de hiperoxia, modificando la expresión de proteínas de estrés y detoxificantes entre P12 y P26 OIR (95). Teniendo en cuenta estos registros, nuestro siguiente objetivo fue establecer los cambios en la expresión de proteínas de estrés y detoxificantes al tiempo en el cual se detectó mayor respuesta a la hipoxia (4horas).

La remoción del glutamato del espacio sináptico y su posterior transformación a glutamina (catalizado por GS en las CGM), será de vital importancia en la prevención de la neurotoxicidad. Para evaluar los niveles de GS, las células MIO-M1 se incubaron en normoxia (O_2 :21%) e hipoxia (O_2 :1%) en presencia y ausencia de CQ durante 4 horas y posteriormente procesadas para ensayos de *Western blot*. En nuestro modelo experimental *in vitro* observamos que en condiciones de hipoxia, la expresión proteica de GS tiende a incrementar respecto al control, aunque no significativamente (Figura 37A y B).

Además, el incremento de proteínas filamentosas (tales como GFAP y vimentina) constituyen marcadores usualmente empleados en los estudios *in vivo* e *in vitro* para evaluar gliosis reactiva. En patologías crónicas como las retinopatías isquémicas pueden ser predictores de daño persistente si los niveles incrementan progresivamente. Tras 4 horas de incubación a bajos niveles de oxígeno (O_2 :1%), las células MIO-M1 mostraron un aumento en los niveles proteicos de GFAP (Figura 37A y B), aunque vimentina no se vio modificada (Figura 37C y D).

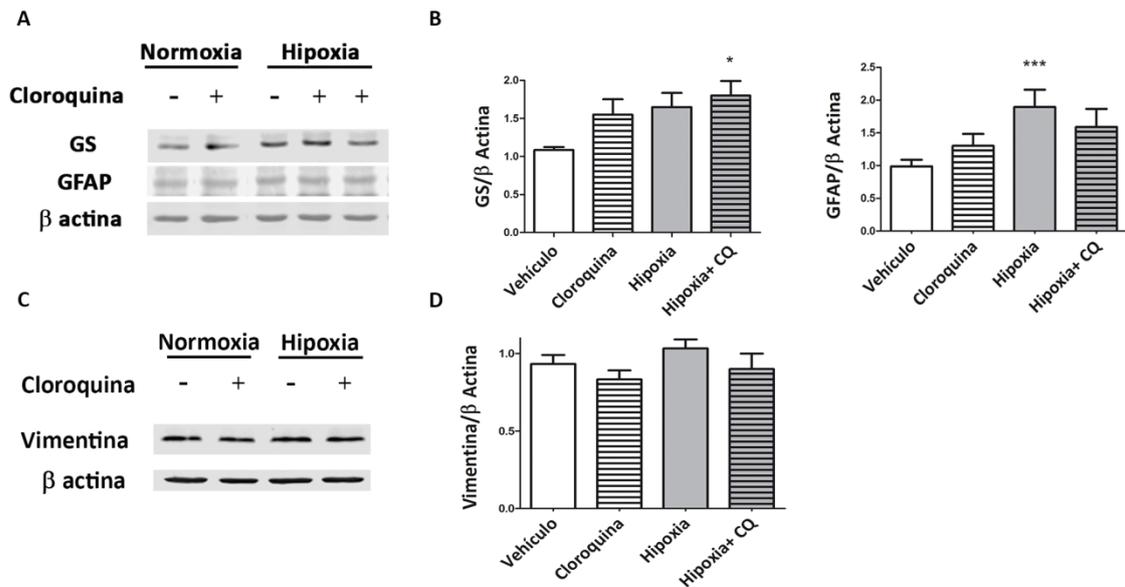


Figura 37: Cambios en proteínas detoxificantes y de estrés glial en células MIO-M1 expuestas a 4 horas de hipoxia gaseosa (O₂:1%). **A)** Ensayo de *Western blot* de células MIO-M1 incubadas en normoxia (O₂:21%) o hipoxia gaseosa (O₂:1%), durante 4 horas y analizados empleando anticuerpos primarios anti GS y GFAP, y anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye 800 y 690. **B)** Niveles proteicos de GS y GFAP fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **C)** Ensayo de *Western blot* de células MIO-M1 incubadas en normoxia (O₂:21%) o hipoxia gaseosa (O₂:1%), durante 4 horas y analizados empleando anticuerpos primarios anti-vimentina y anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye 800 y 690. **D)** Niveles proteicos de vimentina fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Múltiples son los efectos que puede mediar Rapamicina a través de la inhibición de mTOR. En la actualidad, este macrólido es empleado como un potente inmunosupresor, principalmente en transplantados renales a fin de favorecer la tolerancia al órgano (128). Dado que Rapamicina ha probado ser muy eficiente en la modulación de la respuesta pro-inflamatoria, nos preguntamos si también sería capaz de regular la respuesta de la macroglía retinal. En nuestro modelo *in vivo*, una única inyección intraocular de Rapamicina logró disminuir la expresión de GFAP a P26 OIR. Teniendo en cuenta dicho resultado, nos propusimos evaluar si los inductores del flujo autofágico eran capaces de revertir el aumento en GFAP en condiciones de hipoxia gaseosa. Para ello se incubaron células MIO-M1 en normoxia (O₂:21%) o hipoxia gaseosa (O₂:1%) en presencia de Rapamicina o Resveratrol a concentraciones capaces de inducir el flujo autofágico, sin afectar la viabilidad celular (Figura 38A). Mediante ensayos de *Western blot* observamos que Rapamicina disminuyó significativamente los niveles de GFAP en células MIO-M1 expuestas a 4 horas de hipoxia (Figura 38B y C). Una clara tendencia a

disminuir los niveles de GFAP se observó en células incubadas con Resveratrol en hipoxia, sin embargo este decrecimiento no fue significativo estadísticamente. El incremento en los niveles proteicos de LC3B II y p62 por los inductores empleados se corroboró en los mismos experimentos (Figuras 38B y D).

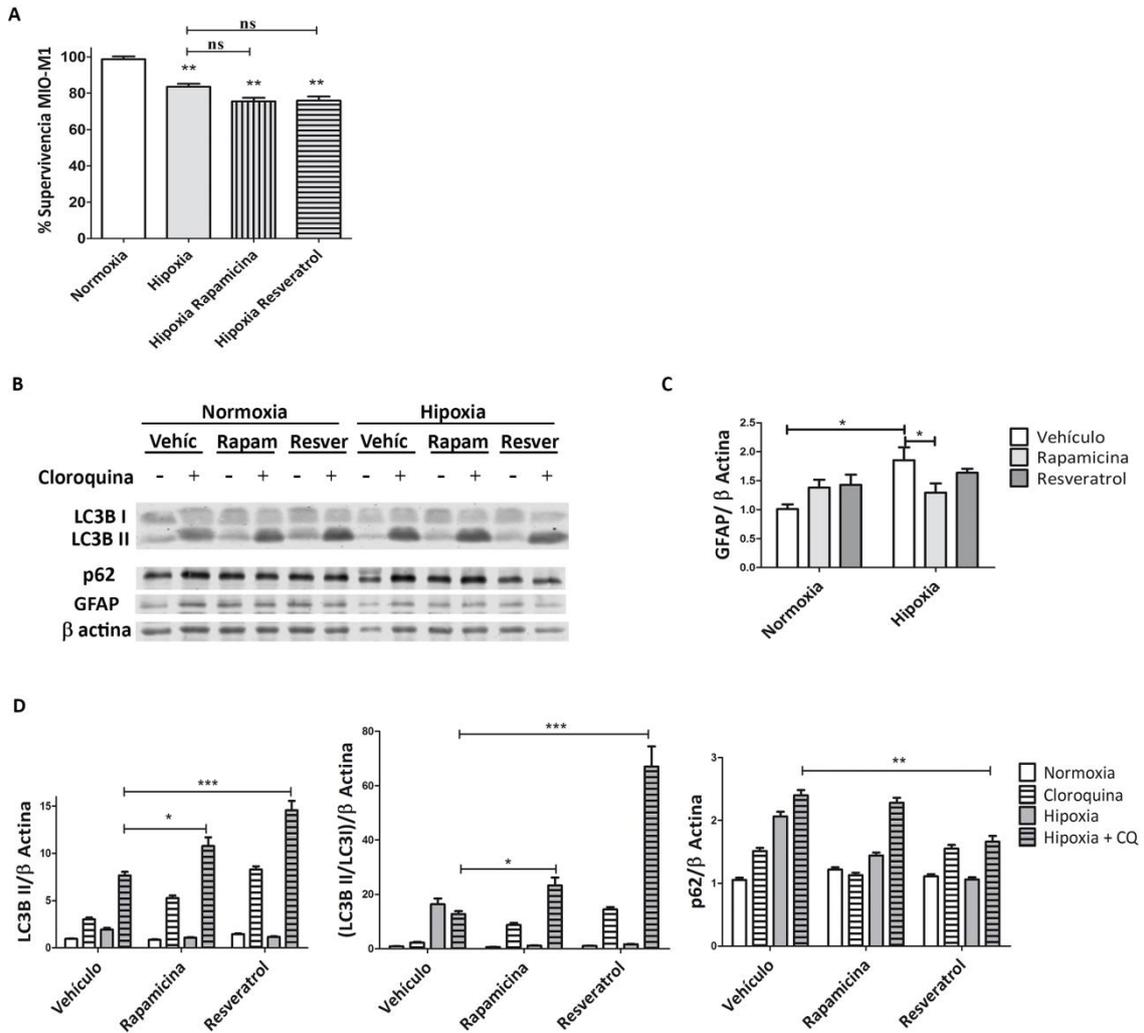


Figura 38: Cambios en la expresión proteica de GFAP mediada por Rapamicina y Resveratrol en células MIO-M1 expuestas a 4 horas de hipoxia gaseosa (O_2 :1%). **A)** Ensayo de MTT para evaluar viabilidad celular en condiciones de hipoxia y con inductores del flujo autofágico (Rapamicina y Resveratrol) o vehículo. **B)** Ensayo de *Western blot* de células MIO-M1 incubadas en normoxia (O_2 :21%) o hipoxia gaseosa (O_2 :1%) durante 4 horas y analizados empleando anticuerpos primarios anti LC3B, p62 y GFAP, y anticuerpos secundarios fluorescentes IRDye 800 y 690. **C)** Niveles proteicos de GFAP fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes. **D)** Niveles proteicos de LC3B II, LC3B II/LC3B I y p62 fueron cuantificados por ensayos densitométricos y normalizados a β -actina. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

IV.III. Las CGM modulan la NV en presencia de inductores/inhibidores del flujo autofágico.

Una de las funciones más ampliamente estudiadas de las CGM es la secreción de factores tróficos vitales para la supervivencia neuronal. Al mismo tiempo, las CGM son las encargadas de mantener la estructura vascular a través de la síntesis y secreción de cantidades finamente reguladas de factores pro- y anti- angiogénicos. Además, ha sido demostrado que en condiciones hipóxicas es una de las células responsables de incrementar la secreción de VEGF, el principal factor trófico involucrado en la angiogénesis (99, 100). En el último apartado de esta tesis, indagamos acerca de la capacidad de las CGM de inducir la formación de túbulos en las CEs de aorta bovina (BAEC) en condiciones de hipoxia y cómo la inducción o inhibición de la vía autofágica modula esa capacidad. Para ello, se incubaron células MIO-M1 en normoxia (O_2 :21%) e hipoxia (O_2 :1%) bajo el efecto de algún inductor/inhibidor del flujo autofágico durante 8 horas. A continuación, se llevaron a cabo ensayos de tubulogénesis sobre matriz, incubando las células BAEC con los sobrenadantes de las células macrogliales durante 24 horas (Figura 39A). Se emplearon Suramina y Axitinib como controles negativos de la tubulogénesis.

A través del análisis morfológico pudimos observar que los sobrenadantes de células MIO-M1 hipóxicos incrementaron la tubulogénesis respecto a sus controles normóxicos, debido al aumento en el número de polígonos formados así como en la longitud total de los túbulos. Los medios de células MIO-M1 hipóxicos condicionados con Rapamicina, Resveratrol y Spautin-1 disminuyeron la tubulogénesis respecto al sobrenadante hipoxia- vehículo ya que al menos dos de los parámetros analizados se vieron significativamente modificados con el tratamiento (Figura 39B). Más específicamente, BAEC expuestas a sobrenadantes de MIO-M1 en hipoxia y con Rapamicina disminuyeron el número de polígonos, aumentando su área promedio y disminuyeron la longitud de los segmentos totales. Dichos cambios no se observaron en los mismos sobrenadantes expuestos a normoxia. Por su parte, Resveratrol modificó todos los parámetros cuantificados, evidenciando una franca disminución de la tubulogénesis tanto en sobrenadantes de normoxia como de hipoxia. En menor medida, Spautin-1 también inhibió ligeramente la tubulogénesis, puesto que disminuyó la longitud total de los segmentos y el número de polígonos, e incrementó el número de segmentos aislados. Los últimos dos parámetros sólo se modificaron en los sobrenadantes de MIO-M1 expuestas a hipoxia, sugiriendo que la modulación del flujo autofágico de la macroglía podría participar en eventos vaso-proliferativos retinales.

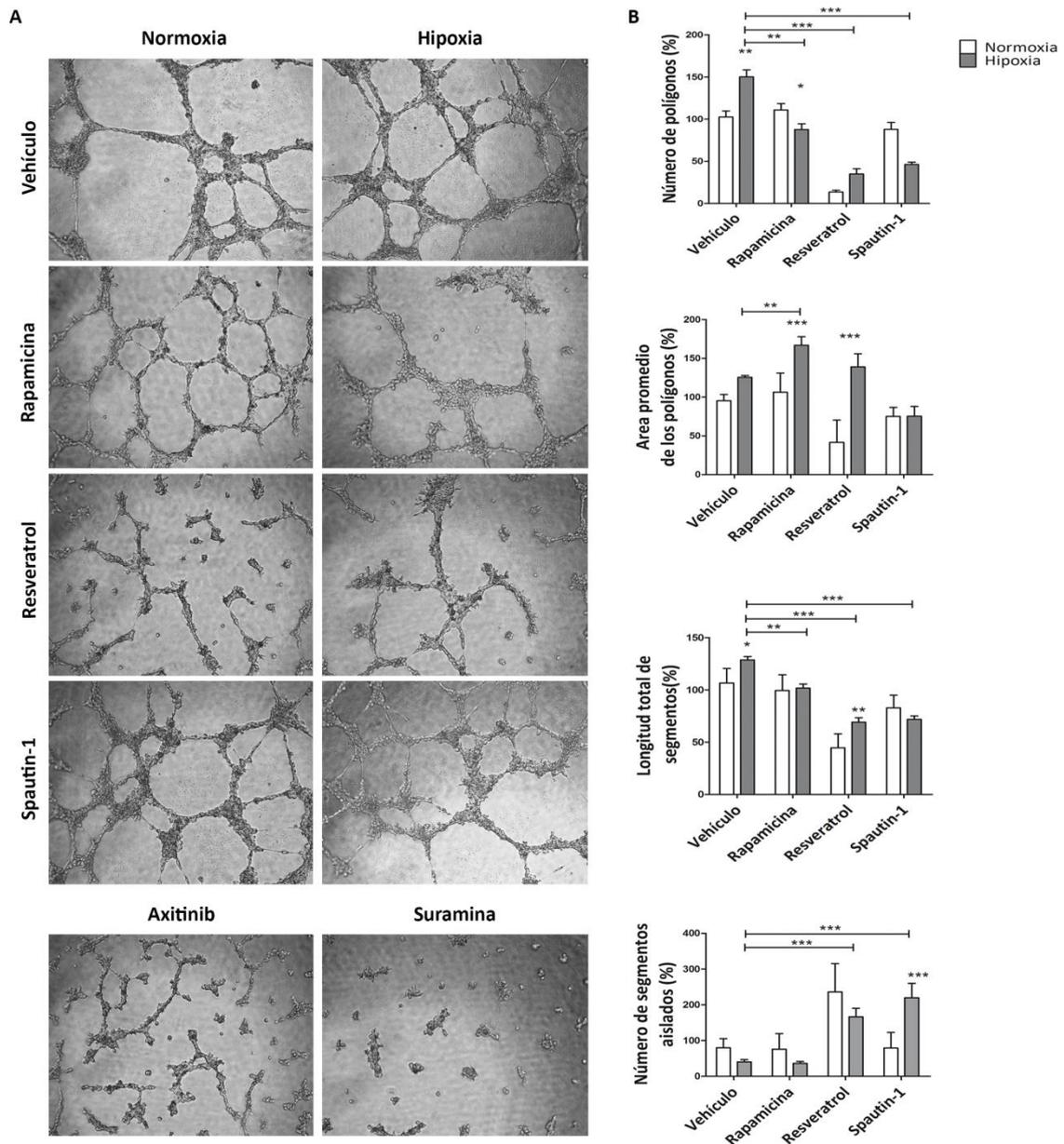


Figura 39: Evaluación de la tubulogénesis en células BAEC expuestas a sobrenadantes de MIO-M1. A) Imágenes de contraste de fase de células endoteliales BAEC incubadas con sobrenadantes de MIO-M1 en condiciones de normoxia o hipoxia (8 horas) y con algún inductor/inhibidor de la vía autofágica. Axitinib y Suramina fueron empleados como controles de inhibición de la tubulogénesis. **B)** Análisis cuantitativo del número y área promedio de los polígonos, longitud total de segmentos y número de segmentos aislados mediante Software Image J Fiji Angiogenesis Analyser. Los gráficos de cuantificación se presentan como la media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. Los gráficos muestran resultados de 3 experimentos independientes.

Los puntos clave de este último grupo de experimentos son:

Hipoxia: O₂ 1%



Incrementa la expresión de GFAP.
Rapamicina es capaz de restablecer los niveles de GFAP a los niveles proteicos basales.



Los sobrenadantes MIO-M1 hipóxicos inducen la tubulogénesis de células endoteliales vasculares. El agregado de Rapamicina, Resveratrol y Spautin-1 a dichos sobrenadantes disminuyen significativamente la formación de túbulos.

V. Discusión

“Para encontrar la respuesta a tu pregunta, hay que remar en dulce de leche” Pablo F. Barcelona

V.I. Conclusiones del modelo *IN VIVO*

La NV pre-retinal es un proceso que se asocia a muchas enfermedades oculares graves, incluyendo la ROP, la RD y la Retinopatía por anemia falciforme, entre otras. A pesar de que su origen es diferente, esta familia de retinopatías se caracteriza por un decrecimiento en la tensión de oxígeno en determinado estadio. La respuesta inmediata ante esta situación es el incremento en la síntesis de VEGF, el factor trófico responsable de la proliferación de las CEs que originan ovidos neovasculares frágiles e inmaduros hacia la cavidad vítrea (1, 2). Simultáneamente, se llevan a cabo otros eventos en la retina como la gliosis y la neurodegeneración las cuales pueden ser desarrolladas por el evento hipóxico u otros estímulos primarios (95). Actualmente, los tratamientos para las retinopatías proliferativas son paliativos y tienen por objetivo disminuir la NV. Sin embargo, la inflamación persistente, la muerte neuronal y el déficit en la provisión de oxígeno frecuentemente generan recurrencias en los eventos de NV. En consecuencia, estudios previos sostienen que un tratamiento más apropiado debería contemplar la normalización de las alteraciones vasculares y no vasculares observadas en las retinopatías proliferativas (129).

Es conocido que el flujo autofágico es un proceso intracelular que ocurre en todas las células y que posee una relación directa con la neurodegeneración, la angiogénesis y la inflamación, por lo cual la modulación del mismo resulta un blanco atractivo en las retinopatías (50). Múltiples estudios han evidenciado que la inhibición o estimulación del flujo autofágico es capaz de revertir las alteraciones de patologías crónicas o agudas, incluyendo enfermedades visuales (66, 67, 130-134). Rapamicina, otros análogos de Rapamicina y CQ son las drogas más frecuentemente elegidas en los diseños experimentales ya que han sido aprobados previamente por la FDA para un tratamiento en específico (135, 136) y por lo tanto, sería más simple ejecutar estudios clínicos para segundos usos de dichas sustancias.

En función de ello, como primer objetivo nos planteamos analizar los cambios en el flujo autofágico en el modelo murino de OIR. Cabe destacar que el modelo de OIR recapitula eventos patológicos que ocurren en la ROP y algunos aspectos de la etapa proliferativa de la RD (137). Los tratamientos se realizaron a diferentes días posnatales cuando las crías murinas todavía se encontraban en su fase de desarrollo retinal, período en el cual la autofagia juega un rol crucial (50). En efecto, los ensayos de *Western blot* en ratones control RA mostraron un decrecimiento en los niveles proteicos de LC3B II desde P12 a P26, indicando un elevado flujo autofágico luego del nacimiento. En contraste, los ratones OIR mostraron un incremento en los niveles proteicos de LC3B II y p62 a P17 OIR, comparado con los controles RA, sugiriendo un incremento del número de autofagosomas en el citosol de las células retinales. La actividad

transcripcional de las proteínas de la vía reveló un incremento significativo en los niveles del ARNm de p62 a P17 OIR. Este incremento sería un reflejo de la inducción del flujo autofágico, dado que en estas condiciones p62 es degradado en los autofagosomas conjuntamente con el cargo más rápidamente que en las muestras retinales de RA. Este resultado indicaría que el aumento en los niveles proteicos de p62 a P17 OIR es una consecuencia del incremento en la síntesis proteica y no de su acumulación.

Ha sido demostrado que la vascularización fisiológica de la retina murina se completa a P21 en ratones, cuando la vasculatura provisoria hialoidea es reemplazada por la definitiva siguiendo un gradiente de hipoxia. Primariamente, se constituye el plexo superficial por el brote radial de los vasos que ingresan por el nervio óptico. A continuación, se crea el plexo profundo por crecimiento transversal de los vasos superficiales y el proceso se completa mediante la formación del plexo intermedio (138). Debido al hecho de que existe un suministro irregular de oxígeno en las diferentes capas de la retina, el grado de hipoxia sentido por las células podría variar a lo largo de las distintas capas de la retina neural y en consecuencia la respuesta celular (109). Imágenes confocales mostraron que la marca de LC3B está incrementada en las áreas próximas a los plexos vasculares, células ganglionares y neuronas que residen en la INL de ratones P17 OIR, mientras que los marcadores autofágicos no se vieron modificados en las neuronas de la ONL. La ausencia de cambio en el flujo autofágico de fotorreceptores se podría explicar por la provisión de oxígeno a conos y bastones por la vasculatura coroidea, previniendo eventos de hipoxia severa en esta capa. A pesar de que los fotorreceptores son dañados por el modelo de OIR, la tasa de muerte celular es menor respecto a las otras capas celulares (95). En las proximidades de la ILM, tanto CGM como CEs mostraron incrementada tinción para LC3B. Interesantemente, a P17 OIR las vesículas decoradas con LC3B se hallaron dentro de los ovillos neovasculares de CEs, sugiriendo un elevado número de autofagosomas en dichas células en proliferación.

A continuación evaluamos la maduración de los autofagosomas formados a P17 OIR mediante marcaciones inmunofluorescentes para LC3B/LAMP1. En ausencia de CQ no se observaron diferencias significativas en el número de vesículas LC3B/LAMP1 entre P17 RA y P17 OIR. Sin embargo, evidenciamos un incremento en las estructuras positivas para LAMP1 luego de bloquear el flujo con CQ, principalmente en la ILM, evidenciando que la vía degradativa está activada. Adicionalmente, los neovasos en la ILM hidrolizaron DQ-BSA en lisosomas en mayor proporción que los vasos retinales de ratones control RA. Por ensayos de TUNEL demostramos que la viabilidad celular está reducida en INL y GCL, por lo que las células expuestas a estrés hipóxico podrían estar activando el flujo autofágico como un mecanismo de supervivencia.

Una vez evaluados los cambios en el modelo de OIR, nos preguntamos qué rol cumpliría la autofagia en los eventos proliferativos vasculares y de neurodegeneración. Para ello inyectamos intraocularmente 3MA, en dos tiempos distintos: a P12 para evidenciar su participación durante la etapa de hipóxica del modelo (P12-P17) y a P17 para determinar su función durante la etapa de regresión de los ovillos vasculares aunque con persistente gliosis y degeneración neuronal.

Ensayos de *flat-mount* teñidos con *isolectina IB4* mostraron una reducción significativa del número de neovasos cuando 3MA era administrado a P12. Inclusive, se observó que la disminución del flujo mediada por 3MA indujo alteraciones en la densidad vascular a P26 OIR, en ratones que recibieron el inhibidor a cualquiera de los tiempos indicados. En cuanto al estrés glial, se observó que los niveles de GFAP incrementaron a P17 y P26 OIR cuando la inyección de 3MA era llevada a cabo en P12. Por el contrario, los niveles proteicos de GS no se vieron afectados con el tratamiento a ninguno de los tiempos evaluados. En el mismo sentido, si bien los registros electroretinográficos no mostraron cambios significativos tras la administración del inhibidor, se detectó un fuerte incremento en el número de células TUNEL positivo a P17 y P26 cuando 3MA era inyectada en P12. Estos datos sugieren que la autofagia cumple un rol protector dado que cuanto más tempranamente se disminuye el flujo autofágico en el desarrollo de la patología, mayores son los daños neuronales retinales.

Con el objetivo de validar los resultados anteriormente expuestos, utilizamos un inhibidor más específico del flujo autofágico, inyectando a P12 una única dosis de Spautin-1. Esta sustancia inhibe a las ubiquitin peptidasas USP10 y USP13, las cuales tienen como diana a la subunidad de beclin-1 (139). Los efectos observados fueron similares a aquellos obtenidos con 3MA al mismo tiempo de administración. Spautin-1 disminuyó el área neovascular sin modificar otros parámetros vasculares. En este sentido, nuestras imágenes confocales de los neovasos retinales clarificaron estos resultados ya que mostraron que las CEs en proliferación, células con un alto metabolismo, presentaban un elevado flujo autofágico. Si la autofagia es un mecanismo relevante en las CEs proliferantes, es factible que la inhibición de este proceso degradativo lleve a la muerte celular o a una disminución en la tasa de proliferación. La interacción entre CEs y los pericitos es crítico para la formación de la microvasculatura estructuralmente sana. En este estudio encontramos una reducción en la tinción para NG-2 en retinas de ratones OIR luego del tratamiento con Spautin-1, indicando un aparente decrecimiento de la densidad de pericitos, lo cual exacerbaría las alteraciones vasculares.

En referencia a las células no vasculares, la respuesta glial se mantuvo sin cambios ya que no se detectaron modificaciones en los niveles de GS ni GFAP luego del tratamiento con Spautin-

1. Los registros electroretinográficos mostraron que la funcionalidad de fotorreceptores tiende a disminuir a P17 OIR en los ratones tratados con el inhibidor de la vía autofágica pues su respuesta es más tardía. Este resultado refuerza la idea que en el pico de la NV se activa la autofagia como mecanismo protector. En este sentido, los fotorreceptores podrían constituir la población celular más sensible al tratamiento con Spautin-1 pues no incrementaron el flujo autofágico en el modelo OIR. Correlativamente, un incremento en la marcación de TUNEL se observó en la ONL cuando el flujo fue inhibido. Cinco días posteriores al tratamiento con Spautin-1, los niveles proteicos de LC3B II y p62 retornaron a los niveles basales de OIR, indicando que la vida media de la droga en el ojo fue reducida.

En segunda instancia, nos preguntamos si la administración de Rapamicina podría mejorar las alteraciones vasculares, neuronales y gliales en ratones OIR. Para ello consideramos que la inhibición de mTORC1 incrementa el flujo autofágico pero también modula múltiples procesos intracelulares relacionados a inflamación, angiogénesis y metabolismo. Una única inyección intraocular de Rapamicina disminuyó el área ocupada por neovasos, sin embargo el tratamiento no promovió la revascularización fisiológica (evaluada por área avascular, dilatación vascular y tortuosidad). La normalización del plexo vascular es esencial para la irrigación correcta del tejido retinal y prevenir alteraciones derivadas de la turbulencia en el flujo sanguíneo o estasis de las células sanguíneas (129). La reducción del área de NV se acompañó de una reducción en la expresión proteica de VEGF. Se ha descrito que la inhibición de mTORC1 disminuye la síntesis del factor de transcripción HIF-1 α y consecuentemente reduce la expresión de sus genes diana (140). Cabe resaltar que en la retina VEGF es principalmente producido por las CGM, astrocitos, células ganglionares, epitelio pigmentario y en menor proporción CEs (99). Por lo tanto es probable que la modulación de la NV sea debido a los efectos directos de Rapamicina sobre otras células, más que sobre el endotelio. De hecho, Rapamicina podría ser una estrategia terapéutica más exitosa ya que disminuye los niveles de VEGF sin llegar a depletarlos lo cual promueve un adecuado nivel del factor trófico. Por el contrario, la excesiva inhibición del señalamiento de VEGF podría ser deletérea para las neuronas. Bajo ciertas condiciones patológicas, el incremento en el flujo autofágico también puede llevar a muerte (141). En nuestro modelo, Rapamicina no afecta la viabilidad de pericitos, uno de los tipos celulares más susceptibles en la retina. La permanencia de las células murales es un buen marcador de maduración vascular, indicando que el período final de la vasculogénesis no está alterado y que los vasos sanguíneos formados *de novo* son funcionales.

En relación a la gliosis, Rapamicina redujo marcadamente los niveles proteicos de GFAP a P26 OIR, indicando una menor respuesta glial durante el período de regresión de la NV. Esto contribuiría a la reducción en la respuesta pro-inflamatoria persistente que induce daños en el tejido retinal. Desafortunadamente, una única dosis de Rapamicina fue insuficiente para incrementar la funcionalidad neuronal. Se requerirán nuevos estudios para evaluar si un esquema de administración prolongada logra prevenir la pérdida de visión.

Previamente ha sido reportado que altas dosis de Rapamicina podrían incrementar el área avascular (68), lo cual podría ser el resultado de una reducción en la tasa de proliferación o un incremento en la muerte de las CEs. En nuestro trabajo, la inducción del flujo autofágico no resultó en un incremento de la apoptosis, medido por caspasa 3 total, sugiriendo que el entrecruzamiento entre ambas vías no es la responsable de la muerte mediada por caspasas. Notablemente, el incremento del flujo autofágico se observó hasta P17 OIR inclusive, indicando que Rapamicina tiene una vida media prolongada en el vítreo, como ha sido reportado previamente (142).

A fin de contrastar los efectos de Rapamicina con las terapias administradas intravítreamente en la actualidad, en un experimento comparativo analizamos los efectos del tratamiento con anti-VEGF en el flujo autofágico. Ranibizumab, Bevacizumab y Aflibercept son los tres inhibidores de VEGF más empleados en los tratamientos oftalmológicos de las retinopatías proliferativas (6). Los mismos resultan eficientes reductores de la NV e inicialmente se sostenía que solo modularían los eventos vaso-proliferativos. Ante la pérdida de agudeza visual en pacientes con tratamientos crónicos con anti-VEGF y el descubrimiento de los VEGFR3 presentes en las membranas plasmáticas de células ganglionares y otras células, médicos e investigadores básicos comenzaron a postular que los procesos mediados por este factor trófico podrían ir más allá de la CE (29, 143). Dado que los roles de VEGF en la regulación de la función visual y la viabilidad neuronal todavía no han sido dilucidados y considerando la relevancia de los mecanismos de reciclado en las neuronas, en el presente trabajo evaluamos si variaciones en los niveles de VEGF modifican el flujo autofágico retinal. El análisis de *Western blot* reveló una ligera inducción del flujo autofágico a P17 OIR. Dado que en las imágenes confocales se observa un incremento en las proteínas de la vía autofágica LC3B y p62 en GCL e INL, hipotetizamos que la privación del factor trófico VEGF podría activar mecanismos de supervivencia como la autofagia. En este sentido, un estudio llevado a cabo en conejos sanos demuestra que la privación de VEGF con dos agentes terapéuticos diferentes reduce la expresión de neurotrofinas y la fosforilación de sus receptores, e incrementa significativamente los niveles de LC3B II y beclin-1. Este estudio sugiere que la activación del

flujo podría ser una respuesta secundaria a la privación de factores neurotróficos generada por las terapias anti-VEGF (144). En relación a ello, nuestro grupo reportó que la administración intravítrea de anti-VEGF no mejoraba la funcionalidad neuronal ni la gliosis (95). A pesar de que ambos tratamientos con Rapamicina y anti-VEGF logran reducir la NV y activan la autofagia, ninguno de ellos previene la neurodegeneración en nuestras condiciones experimentales. Sin embargo, los beneficios de Rapamicina por sobre la actual terapia se basan en la multiplicidad de eventos modulados a través de la inhibición de mTORC1. Interesantemente, nuestros resultados mostraron reducción de la gliosis reactiva, lo cual refleja una mayor capacidad retinal para alcanzar la resolución, previniendo la neurodegeneración asociada a la respuesta pro-inflamatoria persistente.

Presumiblemente, todas las células de la retina intentarán activar el flujo autofágico en condiciones hipóxicas. Sin embargo, la habilidad para responder al insulto dependerá del estado de la célula tanto como de la intensidad y duración del estímulo (50). Previo al estadio hipóxico en el modelo OIR, la fase de hiperoxia induce múltiples alteraciones en las células retinales que dan origen a la apoptosis en P12 (145-147). Recientemente, se ha demostrado en retinas de ratones OIR existe un incremento en la apoptosis y una reducción en la autofagia entre P13 y P15 (62). Nosotros, con el mismo modelo *in vivo*, completamos el análisis incluyendo los tiempos clave del modelo; P12, P17 y el período de regresión vascular P26.

En resumen, nuestros resultados del modelo *in vivo* demuestran que todos los tratamientos de inducción e inhibición del flujo autofágico logran reducir el área neovascular pero son incapaces de revertir totalmente el daño neuronal. Adicionalmente, en comparación con los actuales tratamientos oftalmológicos, Rapamicina provee una respuesta terapéutica más prometedora debido a su elevada capacidad de disminuir la formación de ovillos neovasculares y la gliosis persistente.

V.II. Conclusiones del modelo *IN VITRO*

Al desafiar un tejido con algún estímulo, la respuesta obtenida será la resultante de las respuestas individuales de cada tipo celular y de todas las posibles interacciones establecidas entre células. Sin embargo, desglosar dicha respuesta integrada resulta complejo. Desde este punto de vista, el sistema *in vitro* es una herramienta esencial para conocer las respuestas individuales.

En el modelo experimental de OIR, las principales modificaciones en la retina al inducir/inhibir el flujo autofágico se observaron en los componentes glial y vascular. Particularmente, las CGM

son capaces de regular los procesos angiogénicos y establecen una comunicación permanente con otras células gliales a fin de asegurar la homeostasis de la retina. Es por ello que decidimos indagar si la presencia de inductores e inhibidores de la vía autofágica en condiciones de hipoxia modifica la respuesta de las CGM.

En primera instancia evaluamos los cambios en el flujo autofágico ante dos estímulos hipóxicos (gaseoso y químico). Observamos que ambos estímulos incrementaron los niveles de LC3B II respecto a su control (normoxia), siendo esta diferencia mucho más significativa en presencia de CQ. De estos resultados también deducimos que la CQ indujo una franca acumulación de autofagosomas respecto a sus controles vehículo, sugiriendo que las vesículas que se forman pueden alcanzar los estadios finales de la vía degradativa. Cuantitativamente, los niveles de LC3B II incrementaron en mayor medida en las células MIO-M1 tratadas con CoCl_2 , indicando que la naturaleza del estímulo también condiciona la intensidad de la respuesta. En el mismo sentido, por inmunofluorescencia cuantificamos mayor número de LC3B puncta y mayor porcentaje de colocalización entre LC3B y p62 en células tratadas con CoCl_2 en presencia de CQ, indicando un aumento de autofagosomas en el citoplasma celular. En cuanto al estímulo de hipoxia gaseosa, pudimos observar resultados similares al estímulo con CoCl_2 . Si bien en este trabajo no nos avocamos al estudio de las vías de señalización participantes en la activación del flujo autofágico, los estudios llevados a cabo con CoCl_2 constituyen un reflejo de la activación del flujo vía HIF-1. En cuanto al estímulo con hipoxia gaseosa, es posible que además de HIF-1 también se activen los otros mecanismos descritos (vía mTOR o PKC γ), en distinta medida.

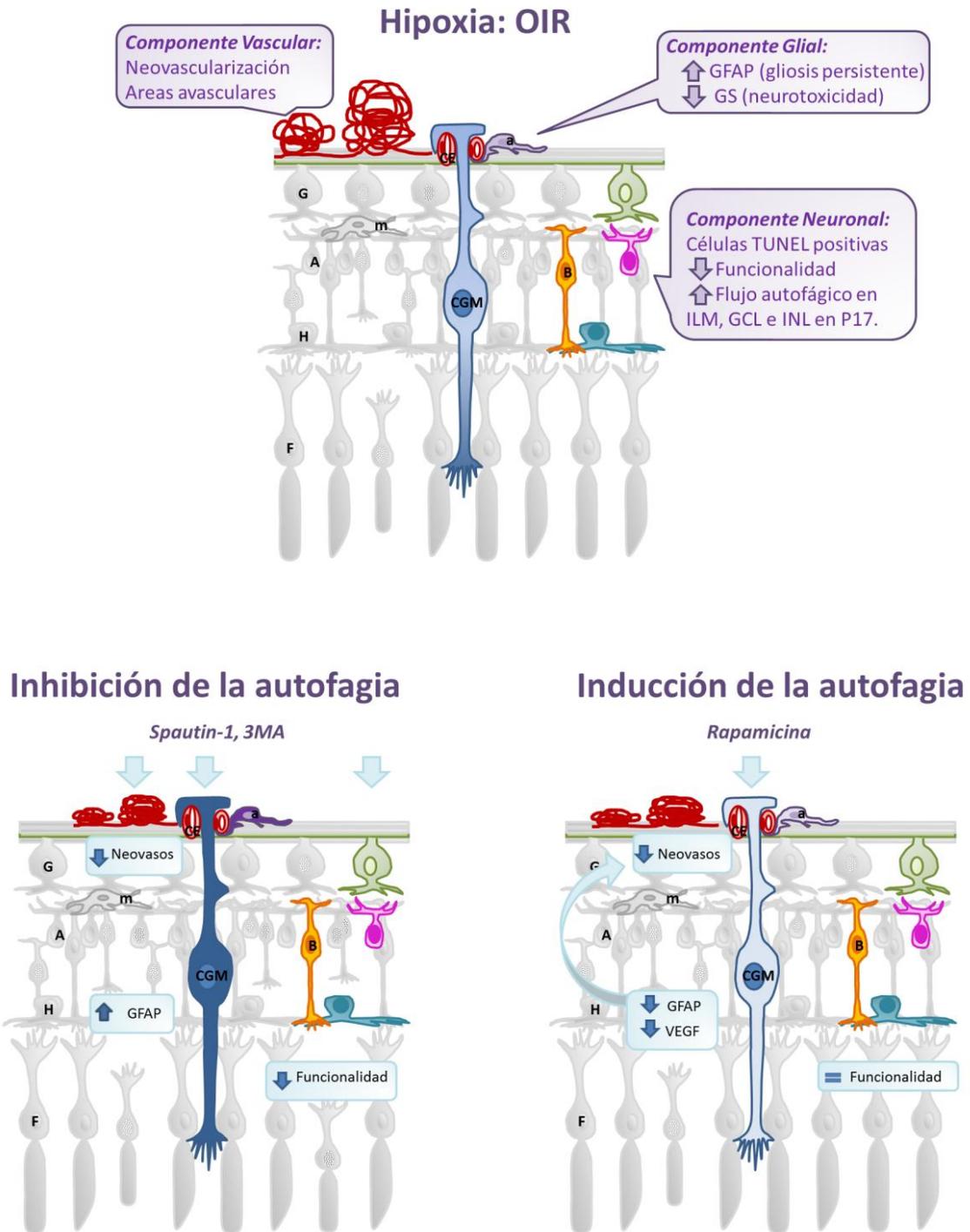
La autofagia constituye un mecanismo de reciclado de los componentes celulares que provee nutrientes ante distintas situaciones de estrés y colabora en el restablecimiento de la homeostasis. Es de esperar entonces, que el flujo cumpla un rol preponderante durante etapas iniciales del estímulo hasta que la célula alcance un nuevo estado metabólico estable. Consecuentemente, fue de interés evaluar los niveles de LC3B II y p62 a tiempos más largos. Tras 24 horas de estímulo, pudimos observar por ensayos de *Western blot* e inmunofluorescencia que los niveles de LC3B II retornaban a los niveles control en condiciones de hipoxia gaseosa. Contrariamente, los niveles de LC3B II permanecieron elevados luego de 24 horas de incubación con CoCl_2 . A este tiempo final demostramos que el incremento en los niveles de LC3B II no corresponde a alteraciones en la fusión de los autofagosomas con lisosomas pues la colocalización entre LC3B y LysoTracker fue similar. En línea con estos resultados, no se detectaron cambios en el patrón de marcación de galectina-1 en ambas condiciones hipóxicas, indicando que los lisosomas no son permeables.

Seguidamente, evaluamos cambios en las respuestas de las CGM a condiciones hipóxicas mediadas por moduladores de la vía autofágica. En nuestro sistema celular, la exposición a ambientes pobres en oxígeno por 4 horas incrementó significativamente la expresión de la proteína GFAP, un marcador de estrés glial. Otra proteína filamentosa, vimentina, mostró ser menos sensible al cambio hipóxico, manteniendo sus niveles estables. Además evaluamos los niveles de expresión de la proteína detoxificante GS, observando un ligero incremento, no significativo, lo que indica que las CGM tienen una tendencia a incrementar su habilidad para prevenir la neurotoxicidad mediada por glutamato. Notablemente, la expresión de GFAP disminuyó ante la incubación con Rapamicina. Consideramos que los mecanismos subyacentes a este fenómeno de disminución del estrés glial pueden ser diferentes entre ambos compuestos e incluso podrían ser independientes de la modulación del flujo autofágico. Serán necesarios estudios adicionales para dar respuestas a estas incógnitas.

En última instancia, analizamos otra de las funciones de las CGM bajo condiciones de hipoxia: su participación en los eventos proliferativos vasculares. En dichos ensayos observamos disminución en la formación de estructuras tubulares vasculares en presencia de sobrenadantes de MIO-M1 bajo condiciones de hipoxia y en presencia de Rapamicina y Spautin-1. Resveratrol, en cambio, inhibió fuertemente la tubulogénesis en células BAEC tanto al ser incubado con sobrenadantes de MIO-M1 normóxicos como hipóxicos. Deducimos de este ensayo que los efectos inhibitorios de Resveratrol son independientes de los niveles de oxígeno ambiental, y probablemente tengan un efecto directo sobre las células endoteliales. Otra posible explicación es que Resveratrol altere la síntesis de factores pro-angiogénicos/anti-angiogénicos, afectando la tubulogénesis. Mientras que Rapamicina y Spautin-1 modulan procesos en las CGM en condiciones de hipoxia que modifican su capacidad para inducir tubulogénesis.

Por medio de dos abordajes experimentales, esta tesis intenta exponer los roles de la autofagia en las retinopatías isquémicas proliferativas (Esquema 8). Nuestros resultados muestran que la autofagia no cumple un rol central en los mecanismos de muerte, pero que es importante para la supervivencia de las células retinales y como mecanismo de adaptación a las condiciones de hipoxia. La modulación con inductores e inhibidores del flujo ha mostrado tener un impacto significativo sobre la respuesta glial y la angiogénesis, dos eventos que colaboran en la neurodegeneración. A nivel celular, corroboramos que en condiciones de hipoxia las CGM establecen una respuesta temprana gliótica reactiva y participan en los eventos vaso-proliferativos. Sin embargo, los moduladores del flujo lograron revertir parcialmente estas respuestas. La posibilidad de modular las alteraciones vasculares y no

vasculares a través de terapias de *drug delivery* específicas para las CGM constituye una estrategia muy tentadora, dado que prevendrían posibles efectos secundarios sobre otras células.



Esquema 8: Modulación del flujo autofágico retinal en el modelo de OIR. Alteraciones en los componentes vascular, glial y neuronal por efecto de la hipoxia. Se observaron cambios en el flujo autofágico en las capas ILM, GCL e INL a P17 OIR. La inhibición del flujo autofágico con 3MA o Spautin-1 redujo el área ocupada por neovasos, pero incrementó el estrés glial y la neurodegeneración. Por otro

lado, el tratamiento con Rapamicina no modificó la funcionalidad retinal. Sin embargo, en presencia del inductor del flujo autofágico, las CGM disminuyeron la expresión de GFAP y de VEGF, lo cual repercutió positivamente en el área neovascular.

A lo largo de la tesis, basamos nuestros estudios en el análisis principalmente de las proteínas LC3B y p62. Múltiples estudios demuestran que las proteínas de la vía autofágica no sólo participan en este mecanismo, sino también en otros que pueden o no llevar a la degradación final de un sustrato. Más aún, la descripción de vías no canónicas de autofagia sugiere que algunas proteínas de la vía no serían requeridas para procesos degradativos específicos (41). La pregunta que nos surge es: ¿Todos estos procesos son autofagia? Los avances realizados en el campo de la biología celular durante los últimos años, han dejado en jaque a los paradigmas del tráfico y metabolismo celular. Pensar en eventos independientes, proteínas involucradas a un solo proceso o vías degradativas específicas para un tipo de sustrato es hoy inconcebible. La evidencia de múltiples trabajos apoya la idea de que existen comunicaciones constantes entre los distintos mecanismos de degradación y que en conjunto, responden a los requerimientos celulares en una circunstancia en particular. Para comprender verdaderamente los eventos que suceden en las células, deberá cambiar la mirada del observador y animarnos a crear nuevas teorías que integren a las vías, como parte de un todo. Este mecanismo tan complejo da cuenta de lo mucho que falta por conocer y no es irrisorio pensar que probablemente en un futuro no lejano, estos mismos resultados puedan tener otra interpretación. Eso es lo maravilloso de la biología y la química detrás de un fenómeno.

Cada paso constituye un desafío en el que vale la pena tomar riesgos, detenernos a repensar nuestras preguntas y seguir indagando en pos de acercarnos a la utopía de todo investigador del área: *preservar la visión*.

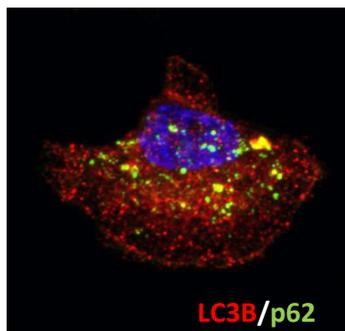
V.I.Perspectivas Futuras

“Lo importante es hacerse buenas preguntas”

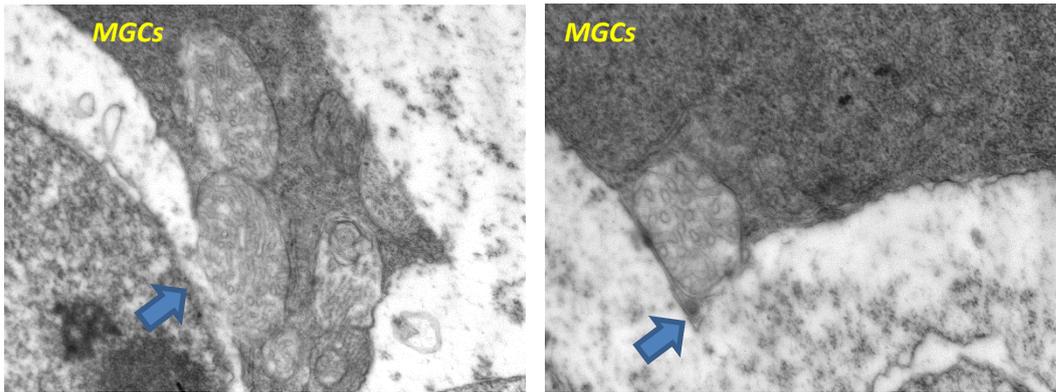
Gustavo Chiabrando

En función de los resultados obtenidos, planteamos nuevos experimentos a desarrollar tanto en el modelo *in vitro* como *in vivo*:

- ❖ Determinar las variaciones en el flujo autofágico y su rol durante la fase de hiperoxia en el modelo de OIR.
- ❖ Estudiar el crosstalk entre autofagia y otras vías de muerte celular, así como la activación del inflamosoma.
- ❖ Evaluar los cambios en el flujo mitofágico en el modelo de OIR. Las células retinales tienen altos requerimientos energéticos y es por ello que deben producir grandes cantidades de ATP. Defectos mitocondriales se han detectado en la ancianidad y enfermedades oculares neurodegenerativas (50).
- ❖ Estudiar en otros modelos de RD no proliferativa el rol de la autofagia y si su modulación en etapas tempranas de la patología puede rescatar de la neurodegeneración.
- ❖ Estudiar qué rol cumplen en las CGM las vesículas p62 positivas, LC3B negativas (148). Recientemente se reportó la presencia de vesículas conteniendo p62 en el espacio extracelular. Las mismas corresponderían al migrasoma, un conjunto de vesículas que se liberan durante la migración de una célula. Dado que las CGM pueden migrar durante el desarrollo y bajo ciertas condiciones patológicas, sería de interés determinar si las vesículas p62 positivas-LC3 negativas constituyen migrasomas y cuál es su función biológica.



- ❖ En microscopías electrónicas realizadas en día P12, observamos un intercambio de mitocondrias entre las CGM y células adyacentes (neuronas). Hay registros que en la retina los astrocitos son capaces de donar mitocondrias a las neuronas vecinas a fin de reponer aquellas dañadas (149). Eventos similares se han registrado en cerebro (150).



- ❖ A lo largo de esta tesis se ha empleado la cloroquina (en nuestro caso empleamos hidroxiclороquina) como herramienta para monitorear el flujo autofágico. Sin embargo, se han detectado múltiples cambios en la expresión de proteínas no relacionadas a la vía autofágica en presencia de este compuesto. La hidroxiclороquina es frecuentemente empleada en la clínica para el tratamiento de la malaria, lupus eritematoso sistémico y discoide y la artritis reumatoide. Existen múltiples trabajos científicos que plasman los efectos adversos retinales asociados al consumo crónico o agudo de este compuesto, patología denominada Ojo de buey. Sería de gran interés, ahondar en los mecanismos de daño neuronal a fin de disminuir su toxicidad o prevenir el daño ocular.

V.II.Materiales y métodos

***“La actividad experimental es como el cartel de NO SE FIA, pero el
nuestro dice: HOY NO TIENE RESULTADOS, MAÑANA SI...”***

María V. Vaglianti

VII.I. Modelo “In-vivo”

Animales

Se utilizaron ratones C57BL/6, los cuales fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad de La Plata y criados en el bioterio del CIBICI. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados siguiendo las normas de ARVO (de las siglas en inglés *Association for Research in Vision and Ophthalmology*) y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Resol. HCD 1216/18). Se realizó el máximo esfuerzo por emplear el menor número posible de animales de experimentación.

Modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) en ratones

Para el desarrollo del modelo de OIR (Smith et al., 1994), ratones C57BL/6, en el día P7, fueron colocados junto a sus madres en una cámara incubadora con una concentración de oxígeno constante ($75\% \pm 2\%$) durante un periodo de 5 días. Los niveles de oxígeno fueron controlados permanentemente con un sensor (Teledyne Analytical Instruments, CA, USA). Luego los animales fueron devueltos a condiciones ambientales ($21\% O_2$) durante otros 5 o 14 días. Otro grupo de ratones de la misma edad fueron mantenidos en oxígeno ambiental ($21\% O_2$) para ser empleados como animales control. Los animales se mantuvieron en cajas plásticas transparentes con ciclos de luz y oscuridad (12 horas luz/12 horas oscuridad). A P12, los ratones fueron inyectados intraocularmente con $1 \mu\text{l}$ de una solución conteniendo un tratamiento específico: a) Rapamicina: $0.5\mu\text{g/ml}$ (R0395 Sigma Aldrich, St. Louis, MO); b) Anti-VEGF mAb: $1.25 \mu\text{g}$ anti-VEGF diluído 1/20 en buffer fosfato salino (PBS) (Bevacizumab; Genentech, San Francisco, CA) (95); c) Spautin-1 $200\mu\text{M}$ (SML0440, Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Ratones inyectados con vehículo (DMSO/PBS or PBS) fueron empleados como control. Las concentraciones de Rapamicina y Spautin-1 fueron seleccionadas de acuerdo a ensayos *in vitro* (89, 151) y se emplearon concentraciones 10 veces mayor a los cultivos ya que se tomó en cuenta la dilución de la droga en la cavidad vítrea. Brevemente, los ratones fueron anestesiados localmente con una gota de Proparacaína Clorhidrato 0,5% (Anestalcon, Alcon), se indujo exoftalmia con una gota de tropicamida 1% (Midril, Alcon, Buenos Aires, Argentina) y los ojos fueron inyectados en el limbo nasal superior, de acuerdo a descripciones previas (152). Algunos animales fueron sacrificados a los tres tiempos típicos del modelo murino de OIR: P12 (máxima vaso-obliteración), P17 (máximo neovascularización) y P26 (resolución de alteraciones vasculares) (137). Para evaluar el efecto de Rapamicina, Spautin-1 y 3MA, algunos ratones fueron sacrificados 24hs posterior a la inyección intraocular (P13). A fin de analizar el

flujo autofágico, algunos ratones recibieron una inyección intraperitoneal (i.p.) de CQ 60mg/kg (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) diluido en PBS estéril 4 horas previas al sacrificio. Los ojos o retinas de los ratones sacrificados y con pre-tratamiento de CQ fueron colectados y procesados para *Western blot* e inmunofluorescencia, mientras que otras muestras sin CQ fueron destinadas a ensayos de PCR en tiempo real, inmunohistoquímica o *flat-mounts*. Al menos seis ratones por grupo fueron empleados para cada condición a cada tiempo examinado. La información fue colectada de tanto hembras como machos ya que no había diferencias aparentes entre sexos. Todos los ratones fueron sacrificados en el mismo horario del día a fin de disminuir variaciones interindividuales producto del ritmo circadiano en los marcadores del flujo autofágico. El análisis lisosomal fue llevado a cabo mediante una inyección intraocular de 1 μ l de DQ-BSA roja (1mg/ml disuelto en PBS pH:7,2; D12051, Invitrogen). El reactivo es captado por todas las células y luego el dye rojo es detectado en el compartimento ácido, donde la DQ es hidrolizada de la albúmina. Los ratones fueron sacrificados 4 horas posteriores a una única inyección de DQ-BSA (sin pre-tratamiento con CQ), fijados en PFA 4% y deshidratados en un gradiente de sucrosa para su posterior seccionamiento en criostato.

Electrorretinografía (ERG)

La actividad electroretinográfica fue determinada en ratones control y tratados luego de adaptarlos en oscuridad completa overnight (ON). Posteriormente, bajo iluminación con luces led rojas, los ratones fueron anestesiados via i.p. con una solución de ketamina (90mg/kg)/xilacina (8mg/kg). Las pupilas fueron dilatadas con 1% de tropicamida y la cornea fue lubricada con gotas de gel conteniendo 0,4% polietilenglicol 400 y 0,3% polietilenglicol (Systane, Alcon, Buenos Aires, Argentina) para prevenir el daño de la superficie ocular. Los ratones fueron expuestos al estímulo lumínico a una distancia de 20cm. Un electrodo de referencia fue situado subcutáneamente en el lomo del ratón, próximo al cuello. Un electrodo de tierra se insertó en la cola y el electrodo de oro de registro se colocó en contacto con la superficie corneal. Las señales electroretinográficas fueron registradas simultáneamente de ambos ojos (Akonic BIO-PC, Argentina). Se amplificaron, filtraron (1.5-Hz low-pass filter, 1000 high-pass filter, notch activated) y promediaron 10 respuestas consecutivas al flash de luz blanca no atenuada (5 cd.s/m², 0.2 Hz) emitida por un estimulador fotópico (lightemitting diodes) configurado a brillo máximo. La amplitud de la onda a fue medida como la diferencia en amplitudes entre la línea de base y el valle de la deflexión negativa, mientras que la amplitud de la onda b fue medida desde el valle de la onda a, hasta el pico de la onda b. Las latencias de

las ondas a y b corresponden a los tiempos en los cuales llega al pico cada onda. Se promediaron las respuestas de ambos ojos de cada ratón.

Preparación de retinas completas (*flat-mounts*) y marcación de CE con *Griffonia Simplicifolia* I Isolectina B4 (GSI-B4)

A fin de evaluar en el modelo los eventos de vaso-oclusión y vaso-obliteración retinal así como la neovascularización se prepararon *flat-mounts* de retina completa sobre los cuales se realizó marcaciones de CE utilizando la lectina *Griffonia Simplicifolia Isolectin B4* (153) conjugada con Alexa 488 y otros anticuerpos. Para ello, se enuclearon los ojos de ratones sacrificados a P17 y se fijaron en 4% de para formaldehído (PFA) durante 2 hs a temperatura ambiente. Luego bajo lupa estereoscópica cada retina neural fue separada del RPE para su posterior tinción y análisis. A continuación las retinas fueron bloqueadas y permeabilizadas con 5% albúmina sérica bovina (ASB) en PBS, 0,1% Tritón X-100 durante 6 h a 4°C en agitador orbital. Luego las retinas fueron incubadas con un anticuerpo anti-GFAP (1/200; Dako, Carpintería, CA) o anti LC3B (1:100; L7543, Sigma) 18 h a 4 °C, lavadas con TBS- Triton para ser incubadas posteriormente con la solución de lectina (1/200) y el anticuerpo secundario (1:250) durante 24 h a 4°C. Luego de varios lavados con PBS las retinas fueron abiertas con 4 incisiones perpendiculares al nervio óptico y montadas con la capa de vasos retinales orientados hacia arriba sobre un portaobjeto para ser visualizadas por microscopía confocal (Olympus Fluoview FV1200; Olympus Corp., New York, NY, USA) utilizando un objetivo 10X y platina motorizada. Las imágenes finales de los *flat-mounts* fueron procesadas con el programa Image J Fiji.

Preparación de criocortes retinales

Con el objeto de realizar análisis histológicos y de inmunofluorescencia así como evaluar neovascularización retinal, se prepararon en el modelo murino criosecciones retinales obtenidas a partir de ojos previamente fijados con 4 % de PFA a temperatura ambiente (TA) durante 2 horas y luego incubados en gradiente de sucrosa (10%, 20% y 30%), durante al menos 5 horas en cada uno de los pasos. Se embebieron los ojos en medio OCT (de optimum cutting temperature, Tissue-TEK, Sakura) y cortes sagitales paralelos al nervio óptico fueron obtenidos en un crióstato (Thermo Cientific) a -20°C. Las secciones de 10 µm de espesor fueron conservadas a -20 °C hasta su posterior utilización.

Ensayos de muerte celular: TUNEL

A fin de analizar la integridad del ADN por la técnica de TUNEL utilizamos un kit comercial (Roche N 11684817910), el cual contiene un anticuerpo anti-dUTP conjugado a una peroxidasa

(POD). Brevemente criocortes de retina de distintos días fueron lavados con PBS, bloqueados con una solución de peróxido al 3%, y permeabilizados con PBS 0,1% Triton X 100. Luego de un nuevo lavado con PBS por 10 minutos, los tejidos fueron incubados con la solución de TUNEL (solución label + solución enzima) por 1:20 horas a 37 °C, en cámara húmeda. Para finalizar este proceso, lavamos nuevamente con PBS, y se procedió a incubarlos con POD y luego con Di-amino bencidina (DAB) para hacer evidente la presencia de la actividad peroxidasa. Finalmente se contra coloreo el tejido con verde de metilo durante 20 segundos para poder observar las estructuras tisulares. Los tejidos fueron montados con DPX Mounting Media (Sigma- Aldrich, St. Luis, MO). Los controles negativos sin la enzima fueron procesados a fin de evitar resultados falsos positivos (resultados no mostrados). La adquisición de imágenes se llevó a cabo con microscopio de campo claro (Nikon Eclipse TE2000-U, USA).

Ensayos de Inmunofluorescencia

Con el propósito de investigar la expresión, localización y distribución de diferentes proteínas en tejido retinal se llevaron a cabo ensayos de inmunofluorescencia en criocortes retinales. Las criosecciones fueron atemperadas 10 minutos y posteriormente lavadas con PBS para eliminar restos de OCT. El material fue luego permeabilizado con metanol a RT durante 7 min, lavado dos veces con PBS-Tween 20 (0.2%) durante 5 minutos, y bloqueado con ASB al 2%, 25 min. Luego el tejido retinal fue incubado con diferentes anticuerpos primario durante 18 horas a 4°C, incluyendo: anti-LC3B policlonal de conejo (1/100; L7543, Sigma Aldrich), anti-p62 monoclonal de ratón (1/100; ab56416, Abcam), anti- GS policlonal de conejo (1/100; ab16802, Abcam), anti- Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1) monoclonal de rata (1/350; ab25245, Abcam), anti- glutamine synthase (GS) monoclonal de ratón (1/100; MAB 302, Millipore), anti-CD31 monoclonal de ratón (1/50; Abcam Inc.,Cambridge, MA), anti-GLUT1 monoclonal de ratón (1/100; Abcam) y anti-NG-2 policlonal de conejo (1/100; AB5320, Millipore). A continuación se procedió a lavar las criosecciones 2 veces con buffer PBS- Tween 20 durante 5 minutos y se incubaron con anticuerpos secundarios durante 1 hora a RT. Los anticuerpos secundarios empleados fueron: IgG de cabra contra ratón o conejo conjugado con Alexa Fluor 488 y 594 (1/250; Molecular Probes, Eugene, OR, USA) e IgG de cabra anti rata conjugada con Alexa Fluor 594 (1/350; ab150160, Abcam). Los núcleos fueron visualizados por marcación con Hoescht 33258 durante 7 minutos y lavados con buffer PBS- Tween 20 durante 5 minutos adicionales. Finalmente las secciones de tejido fueron montadas con Fluorsave (Calbiochem, La Jolla, CA) y guardadas al resguardo de la luz hasta su visualización. La adquisición de las imágenes fue llevada a cabo con microscopio confocal (Olympus Fluoview FV1200; Olympus Corp., New York, NY, USA). Imágenes OIB fueron procesadas con Image J FIJI

software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA), incluyendo deconvolución, cuantificación vesicular y colocalización. Los controles negativos sin incubación con los anticuerpos primarios fueron realizados a fin de detectar marca inespecífica (datos no mostrados).

Extractos proteicos de retina neural

Retina neural de animales sacrificados a diferentes tiempos fueron disecadas de las capas RPE-Coroides y almacenadas a -80 °C para ensayos de *Western blot* o PCR en tiempo real. Una vez descongeladas fueron sonicadas durante 20s a una amplitud de 40% en buffer de TBS conteniendo coctel de inhibidores (Tris-Base 0,05 M pH 7,4; lisis 137 mM NaCl, 2 mM EDTA pH 8, 1 % Nonidet P40, 1 mM fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), 2 mM ortovanadato de sodio y coctel de inhibidor de proteasas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) luego los lisados fueron incubados a 4 °C por 30 min y centrifugados a 1000 rpm por 20 min en centrífuga refrigerada. Después de la centrifugación, los sobrenadantes fueron recolectados y la concentración de proteínas fue determinada por el método BCA (Pierce, Buenos Aires, Argentina) para ser posteriormente utilizados en ensayos de *Western blot*.

Western blot

Con el propósito de evaluar los cambios en los niveles de expresión de diferentes proteínas, extractos proteicos de retina neural conteniendo 10 a 20 µg de proteínas fueron solubilizados en buffer de muestra y calentados por 5 min a 100 °C en baño seco. Las muestras fueron sembradas en geles SDS-PAGE preparadas con 15% de acrilamida. La electroforesis fue llevada a cabo en buffer de corrida en condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras (DTT), a 100V y 400mA durante 2 y media horas. Al finalizar la misma, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) en buffer Tris (25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20%v/v), pH 8,6 a 100V durante 1h. Luego las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS Tween-20 0,1% durante 1 hora e incubadas con el anticuerpo primario respectivo diluído en 5 % BSA in TBS-T, durante 18 horas a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados según cada caso fueron: anti-LC3 policlonal de conejo (1/1000; L7543, Sigma Aldrich), anti p62 monoclonal de ratón (1/1000; ab56416, Abcam) anti- VEGF monoclonal de ratón (1/500; R&D system), anti-GFAP policlonal de conejo (1/1000; Dako, Carpinteria, CA), anti-GS monoclonal de ratón (1/500; MAB 302, Millipore Corporation MA, USA), anti-caspasa 3 policlonal de conejo (1/300; HPA 002643, Sigma Aldrich), anti-Glut-1 monoclonal de ratón (1/1000; Abcam) and anti-β-actina monoclonal de ratón (1/2000; ab8226, Abcam).

La reacción secundaria se llevó a cabo utilizando un anticuerpo secundario IgG de burro anti-conejo IRDye 800 CW o IgG de burro anti-ratón IRDye 700 CW (1/15000 en TBS en 5 % BSA) durante 1 hora a RT, protegido de la luz. Luego de 3 lavados con TBS-T, las membranas fueron visualizadas y cuantificadas empleando Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA).

PCR en tiempo real

A fin de evaluar cambios en la transcripción de proteínas de la vía autofágica, algunas retinas fueron colocadas en 500µL de Trizol (Invitrogen) y homogeneizadas mecánicamente con pipeta bajo campana de extracción. Se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ARNm. 1µg de ARN total fue retro-transcripto en un volumen total de 20µl empleando random primers

(Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y 50 U de M-MLV transcriptasa reversa

(Promega Corp.). Luego el cDNA fue mezclado con 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y los siguientes primers forward y reverse

Beclin1 forward:ATGGAGGGGTCTAAGGCGTC/ Beclin 1 reverse: TGGGCTGTGGTAAGTAATGGA;

ATG5 forward: TGTGCTTCGAGATGTGTGGTT/ ATG5 reverse:

GTCAAATAGCTGACTCTTGGCAA;

MAPLC3 forward: CGCTTGCAGCTCAATGCTAAC/ MAPLC3 reverse:

TCGTACTTTCGGAGATGGG;

P62 forward: TGTGGAACATGGAGGGAAGAG/ P62 reverse: TGTGCCTGTGCTGGAACCTTC.

La reacción de PCR cuantitativa fue llevada a cabo en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System con el Software Sequence Detection v1.4. Las condiciones de ciclado incluyeron: una etapa de calentamiento a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 segundos y 60 °C por 1 min. La especificidad fue verificada mediante el análisis de las curvas de melting. Los resultados fueron normalizados a β-actina (Forward: GGCTGTATTCCCCTCCATCG/ Reverse: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT).

La expresión relativa de genes fue calculada de acuerdo al método 2-ΔΔCt. Cada muestra fue analizada por triplicado. No se observaron amplificaciones en los controles negativos de PCR que emplearon agua como muestra (resultados no mostrados).

VII.II Modelo “In-vitro”

Cultivos de células gliales de Müller humanas: MIO-M1 (por las siglas en ingles Moorfields/ Institute of Ophthalmology-Müller 1).

El modelo celular de experimentación *in vitro* fue desarrollado en una línea de células gliales humana inmortalizada MIO-M1. La línea MIO-M1, amablemente donada por la Dra. GA Limb (Ocular Repair and Regeneration Biology Unit, Departments of Cell Biology and Pathology, Institute of Ophthalmology and Moorfields Eye Hospital, London, United Kingdom) posee las mismas características fenotípicas y funcionales que un cultivo primario de células de Müller, es decir muestra los mismos marcadores antigénicos y la misma respuesta electrofisiológica a glutamato (154). Esta línea celular fue cultivada en DMEM High Glucose, suplementada con 10% de suero fetal bovino (SFB), penicilina (50 U/ml), Glutamax (Invitrogen) y estreptomycin (50 µg/ml) a 37°C con 5% de CO₂.

Preparación de lisados celulares.

Células de Müller lavadas con PBS frío, fueron lisadas con una solución de PBS 1% Triton X-100, conteniendo 1 mM de fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF) e inhibidores de proteasas (SIGMA, St. Louis, MO) y conservadas a -20 °C hasta su posterior procesamiento. Luego los lisados celulares fueron centrifugados a 10.000 rpm en frío por 20 minutos y los sobrenadantes recolectados. La concentración de proteínas fue determinada utilizando ácido Bicinconínico (BCA) (Pierce, Illinois, USA), empleando Albúmina Sérica Bovina (ASB) como proteína estándar y un espectrofotómetro UV-BioTek (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA).

Ensayos de Western blot

Con el propósito de evaluar los cambios en los niveles de expresión de diferentes proteínas, lisados celulares fueron solubilizados en buffer de muestra y calentados por 5 min a 100 °C en baño seco. La electroforesis fue llevada a cabo en buffer de corrida en condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras (DTT). Al finalizar la misma, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) en buffer Tris (25 mM; Glicina 192 mM; Metanol 20%v/v), pH 8,6 a 100V durante 1h. Luego las membranas fueron bloqueadas con leche descremada al 5% en TBS Tween-20 0,05% durante 1 hora e incubadas con el anticuerpo primario respectivo, durante 18 horas a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados según cada caso fueron: anti-LC3 policlonal de conejo (1/1000; L7543, Sigma Aldrich), anti p62 monoclonal de ratón (1/1000; ab56416, Abcam), anti-GFAP policlonal de conejo (1/1000; Dako, Carpinteria, CA), anti-GS

monoclonal de ratón (1/500; MAB 302, Millipore Corporation MA, USA), anti-vimentina monoclonal de ratón (1/1000; M7020, Dako), y anti- β -actina monoclonal de ratón (1/2000; ab8226, Abcam).

La reacción secundaria se llevó a cabo utilizando un anticuerpo secundario IgG de burro anti-conejo IRDye 800 CW o IgG de burro anti-ratón IRDye 700 CW (1/15000 en TBS en 5 % BSA) durante 1 hora a RT, protegido de la luz. Luego de 3 lavados con TBS-T, las membranas fueron visualizadas y cuantificadas empleando Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA).

Inmunofluorescencia.

Brevemente, las células fueron cultivadas a una confluencia del 30% sobre cubre objetos. Para la marcación con LysoTracker red (Thermo Fisher), se adicionó un microlitro/ml del reactivo al medio de cultivo una hora antes de finalizar el estímulo. Luego de los estímulos, los cubre objetos fueron levantados de las placas y lavados con PBS frío 2 veces por 5 minutos, fijadas con PFA 4%-sucrosa 4% durante 15 minutos a RT, e incubadas con solución de quenching (PBS- ClNH_4 50mM) por 20 minutos a RT. A continuación se lavaron las células 3 veces durante 5 minutos con PBS y se procedió a permeabilizar y bloquear con solución de saponina (PBS/saponina 5%/ASB 0,2%) durante 30 minutos a RT. Las células se incubaron con los anticuerpos primarios 18 horas a 4°C, los cuales fueron preparados en la solución de saponina. Los anticuerpos primarios empleados fueron: anti-LC3B policlonal de conejo (1/100; L7543, Sigma Aldrich), anti-p62 monoclonal de ratón (1/100; ab56416, Abcam), anti galectina 1 policlonal de ratón (1/50 Abcam). Tras 3 lavados adicionales con PBS, las muestras se incubaron con anticuerpos secundarios, conjugados con Alexa 488 o 594, acorde con las especies de los anticuerpos primarios fueron utilizados por una hora a RT. Además, los núcleos fueron visualizados por marcación con Hoechst 33258. Finalmente las muestras fueron lavadas 3 veces con solución de saponina y otras dos adicionales con PBS y fueron montadas con 10 μ l Mowiol sobre portaobjetos. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Confocal Olympus Fluoview FV1200 (Olympus, New York, NY) y procesadas con Software Image J-Fiji.

Ensayos de hipoxia gaseosa

Para los ensayos de hipoxia gaseosa las células fueron cultivadas hasta una confluencia entre 50-60% en 10% de SFB y luego sometidas a 1 % O_2 , durante distintos periodos de tiempo (4 y 24 hs) en una incubadora diseñada para tal fin (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Se emplearon muestras mantenidas en condiciones de normoxia (O_2 : 21%) como controles. Se

empleó cloroquina 10 μM para ensayos de 24hs, mientras que una concentración de 50 μM fue seleccionada para estímulos más cortos (4 horas). Algunos experimentos a tiempos cortos incluyeron la incubación de las células con activadores e inhibidores del flujo autofágico (Rapamicina: 50 μM , Resveratrol: 100 μM , Spautin-1: 20 μM), en presencia o ausencia de cloroquina. Los ensayos se realizaron sin ayuno previo de las células, ya que éste constituye un estímulo para la inducción del flujo autofágico. Las muestras obtenidas fueron procesadas para ensayos de *Western blot*, PCR, inmunofluorescencia o MTT.

Ensayos con hipoxia química

Paralelamente se evaluaron cambios en células expuestas a hipoxia química inducida por Cloruro de Cobalto (Cicarelli). La concentración seleccionada para los ensayos fue de 250Mm (diluído en PBS), de acuerdo a los estudios de exposición a un gradiente de concentraciones de CoCl_2 evaluados en la Figura 28. Se realizaron incubaciones a tiempos cortos (4 horas) y largos (24 horas), empleando muestras con vehículo como control. Para evaluar el flujo autofágico se adicionó cloroquina 10 μM para ensayos de 24hs, y 50 μM para estímulos más cortos (4 horas). Los ensayos se realizaron sin ayuno previo de las células, ya que éste constituye un estímulo para la inducción del flujo autofágico. Las muestras obtenidas fueron procesadas para ensayos de *Western blot*, PCR, inmunofluorescencia o MTT.

PCR en tiempo real

A fin de evaluar cambios en la transcripción de proteínas de la vía autofágica, algunas células fueron colectadas en 200 μL de Trizol (Invitrogen). Se almacenaron a -80°C hasta la extracción de ARNm. 1 μg de ARN total fue retro-transcripto en un volumen total de 20 μl empleando random primers (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y 50 U de M-MLV transcriptasa reversa (Promega Corp.). Luego el cDNA fue mezclado con 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y los siguientes primers forward y reverse:

Beclin-1 forward: CCATGCAGGTGAGCTTCGT/ Beclin-1 reverse: GAATCTGCGAGAGACCCATC;

ATG5 forward: AAAGATGTGCTTCGAGATGTGT/ ATG5 reverse: CACTTTGTTCAGTTACCAACGTCA .

La reacción de PCR cuantitativa fue llevada a cabo en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System con el Software Sequence Detection v1.4. Las condiciones de ciclado incluyeron: una etapa de calentamiento a 95°C for 10 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 min. La especificidad fue verificada mediante el análisis de las curvas de melting. Los resultados fueron normalizados a β -actina (Forward: AAATCTGGCACCACCTTC/ Reverse: GGGGTGTGAAGGTCTCAA).

La expresión relativa de genes fue calculada de acuerdo al método 2- $\Delta\Delta C_t$. Cada muestra fue analizada por triplicado. No se observaron amplificaciones en los controles negativos de PCR que emplearon agua como muestra (resultados no mostrados).

Ensayo de Viabilidad Celular

Las células MIO-M1 se cultivaron en pocillos de 96 wells, sembrando 2000 células/pocillo en un volumen final de 100 μ l. Luego se incubaron las células en las distintas condiciones experimentales (Normoxia, hipoxia, CoCl₂, Rapamicina, Resveratrol o Spautin-1) por 24 horas. Para evaluar la viabilidad celular se adicionó en cada pocillo 10 μ l del colorante 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromuro (MTT) de concentración 5mg/ml. Se incubaron las células con el reactivo colorante durante 3 horas a 37°C. Posteriormente se removió el medio y se agregó 100 μ l de DMSO por pocillo para disolver el precipitado de color formado. La placa se colocó en agitador por 15 minutos para favorecer la disolución. Se hicieron 5 replicados por condición en 3 experimentos independientes. La absorbancia del complejo coloreado se midió a 590nm y los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular respecto al control.

Ensayo de formación de túbulos.

Este ensayo se fundamenta en la capacidad de las células endoteliales de formar estructuras tubulares tridimensionales cuando son colocadas sobre una base de matrigel en presencia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este ensayo es considerado una de las pruebas más específicas para medir angiogénesis in vitro (Arnaoutova and Kleinman, 2010; Grant et al., 1992; Madri et al., 1988) motivo por el cual ha sido seleccionado para la realización del screening. La técnica será desarrollada según Arnaoutova y Kleinman, 2010 (Arnaoutova and Kleinman, 2010). Brevemente, las células ($\approx 1.5 \times 10^4$ células BAEC) se colocaron en una placa de 96 pocillos half área previamente cubiertos con 30 μ L de matrigel. Las mismas fueron incubadas durante 18 h (37 °C, 5% CO₂) en presencia y ausencia de sobrenadantes de cultivo de células MIO-M1, las cuales son capaces de secretar VEGF. Dichos sobrenadantes corresponden a estímulos de hipoxia en presencia o ausencia de inductores (Rapamicina o Resveratrol) o inhibidores (Spautin-1) del flujo autofágico durante 8 horas. El tiempo de hipoxia fue el menor requerido para asegurar el intercambio gaseoso y que las células MIO-M1 perciban la hipoxia sin necesidad de realizar previamente el burbujeo del medio con el gas pobre en oxígeno. Como controles se utilizaron sobrenadantes idénticos en condiciones de normoxia. Como control positivo de inhibición se empleó suramina sódica 30

uM y Axitinib. Las imágenes se obtuvieron utilizando un microscopio invertido Olympus CKX41 y se analizaron con el programa ImageJ FIJI y el plugin Angiogenesis Analyser.

Procesamiento de Imágenes y Cuantificación

El procesamiento de las imágenes fue llevado a cabo mediante el Software Image J Fiji, empleando distintos pluggins y herramientas a fin de obtener la información requerida para el análisis cuantitativo de las vesículas autofágicas. Para ello, las imágenes fueron deconvolucionadas mediante el plugin Parallel Spectral Deconvolution, a partir de una PSF generada de acuerdo a los datos de adquisición de la imagen. Las vesículas presentes en las imágenes resultantes fueron posteriormente cuantificadas mediante la herramienta Analyze Particles. El número de vesículas por célula fue registrado y graficado relativizando los valores obtenidos en las distintas condiciones respecto al control. El análisis de solapamiento de dos marcadores proteicos fue realizado con el plugin JACoP en imágenes previamente deconvolucionadas. Los coeficientes de Pearson fueron registrados y graficados relativizando los valores obtenidos en las distintas condiciones respecto al control. Al menos 10 células de cada condición fueron analizadas en cada experimento.

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 5.0. Un p-valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Estudios paramétricos y no paramétricos fueron seleccionados de acuerdo a la homogeneidad de varianzas evaluada por test F o de Barlett. Se emplearon el test t de 2 colas no apareado o Mann Whitney cuando se analizaron 2. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba post-test de comparación múltiple de Dunnett; o bien, Kruskal-Wallis seguido de post-test de comparación múltiple de Dunn fueron empleados para determinar las diferencias estadísticas entre más de 2 diferentes grupos. ANOVA de vías seguido del post-test de Bonferroni fue empleado para comparaciones entre grupos cuando 2 variables afectaban la variable dependiente. Media \pm el error estándar (SEM) (representado como T) fueron graficadas en los análisis paramétricos, mientras que la mediana y el rango intercuartil (representado como I) se mostraron cuando el análisis fue no paramétrico.

VIII. Referencias

Bibliográficas

“Es importante hacer experimentos pero más aún dedicarle un tiempo a leer y a escribir lo que hallamos” *Magalí E. Ridano*

Referencias Bibliográficas

1. Campochiaro PA. Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Progress in retinal and eye research*. 2015;49:67-81.
2. Rubio RG, Adamis AP. Ocular Angiogenesis: Vascular Endothelial Growth Factor and Other Factors. *Developments in ophthalmology*. 2016;55:28-37.
3. Alda E, Lomuto CC, Benitez AM, Bouzas L, Brussa M, Cattaino A, et al. Results of the National Program for the Prevention of Blindness in Childhood by Retinopathy of Prematurity in Argentina (2004-2016). *Archivos argentinos de pediatria*. 2018;116(6):386-93.
4. Silva JC, Mujica OJ, Vega E, Barcelo A, Lansingh VC, McLeod J, et al. A comparative assessment of avoidable blindness and visual impairment in seven Latin American countries: prevalence, coverage, and inequality. *Revista panamericana de salud publica = Pan American journal of public health*. 2015;37(1):13-20.
5. Evans JR, Michelessi M, Virgili G. Laser photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2014(11):CD011234.
6. Tah V, Orlans HO, Hyer J, Casswell E, Din N, Sri Shanmuganathan V, et al. Anti-VEGF Therapy and the Retina: An Update. *Journal of ophthalmology*. 2015;2015:627674.
7. Petursdottir D, Holmstrom G, Larsson E. Visual function is reduced in young adults formerly born prematurely: a population-based study. *The British journal of ophthalmology*. 2019.
8. Bowl W, Lorenz B, Stieger K, Schweinfurth S, Holve K, Andrassi-Darida M. Fundus-Controlled Dark Adaptometry in Young Children Without and With Spontaneously Regressed Retinopathy of Prematurity. *Translational vision science & technology*. 2019;8(3):62.
9. Golas L, Shapiro MJ, Blair MP. Late ROP Reactivation and Retinal Detachment in a Teenager. *Ophthalmic surgery, lasers & imaging retina*. 2018;49(8):625-8.
10. Wong RK, Hubschman S, Tsui I. Reactivation of retinopathy of prematurity after ranibizumab treatment. *Retina*. 2015;35(4):675-80.
11. Zhu Z, Wang W, Scheetz J, Zhang J, He M. Prevalence and risk profile of retinopathy in non-diabetic subjects: National Health and Nutrition Examination Survey 2005 to 2008. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2019.
12. Busch C, Zur D, Fraser-Bell S, Lains I, Santos AR, Lupidi M, et al. Shall we stay, or shall we switch? Continued anti-VEGF therapy versus early switch to dexamethasone implant in refractory diabetic macular edema. *Acta diabetologica*. 2018;55(8):789-96.
13. Simons BD, Flynn JT. Retinopathy of prematurity and associated factors. *International ophthalmology clinics*. 1999;39(2):29-48.
14. Pryds O, Greisen G, Lou H, Friis-Hansen B. Heterogeneity of cerebral vasoreactivity in preterm infants supported by mechanical ventilation. *The Journal of pediatrics*. 1989;115(4):638-45.
15. Chan-Ling T, Gole GA, Quinn GE, Adamson SJ, Darlow BA. Pathophysiology, screening and treatment of ROP: A multi-disciplinary perspective. *Progress in retinal and eye research*. 2018;62:77-119.
16. Rivera JC, Holm M, Austeng D, Morken TS, Zhou TE, Beaudry-Richard A, et al. Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies. *Journal of neuroinflammation*. 2017;14(1):165.
17. Klinger G, Levy I, Sirota L, Boyko V, Lerner-Geva L, Reichman B, et al. Outcome of early-onset sepsis in a national cohort of very low birth weight infants. *Pediatrics*. 2010;125(4):e736-40.
18. Lee J, Dammann O. Perinatal infection, inflammation, and retinopathy of prematurity. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2012;17(1):26-9.

19. Hellstrom A, Hard AL. Screening and novel therapies for retinopathy of prematurity - A review. *Early human development*. 2019;104846.
20. Lechner J, O'Leary OE, Stitt AW. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision research*. 2017;139:7-14.
21. Phipps JA, Wilkinson-Berka JL, Fletcher EL. Retinal dysfunction in diabetic ren-2 rats is ameliorated by treatment with valsartan but not atenolol. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(2):927-34.
22. Tang J, Kern TS. Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*. 2011;30(5):343-58.
23. Huang H, Gandhi JK, Zhong X, Wei Y, Gong J, Duh EJ, et al. TNFalpha is required for late BRB breakdown in diabetic retinopathy, and its inhibition prevents leukostasis and protects vessels and neurons from apoptosis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(3):1336-44.
24. Masoud GN, Li W. HIF-1alpha pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta pharmaceutica Sinica B*. 2015;5(5):378-89.
25. Pugh CW, Ratcliffe PJ. New horizons in hypoxia signaling pathways. *Experimental cell research*. 2017;356(2):116-21.
26. Semenza GL. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell*. 2012;148(3):399-408.
27. Choudhry H, Harris AL. Advances in Hypoxia-Inducible Factor Biology. *Cell metabolism*. 2018;27(2):281-98.
28. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(2):109-19.
29. Saint-Geniez M, Maharaj AS, Walshe TE, Tucker BA, Sekiyama E, Kurihara T, et al. Endogenous VEGF is required for visual function: evidence for a survival role on muller cells and photoreceptors. *PloS one*. 2008;3(11):e3554.
30. Zhang X, Bao S, Hambly BD, Gillies MC. Vascular endothelial growth factor-A: a multifunctional molecular player in diabetic retinopathy. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2009;41(12):2368-71.
31. Gerhardt H. VEGF and endothelial guidance in angiogenic sprouting. *Organogenesis*. 2008;4(4):241-6.
32. Osaadon P, Fagan XJ, Lifshitz T, Levy J. A review of anti-VEGF agents for proliferative diabetic retinopathy. *Eye*. 2014;28(5):510-20.
33. Yang S, Zhao J, Sun X. Resistance to anti-VEGF therapy in neovascular age-related macular degeneration: a comprehensive review. *Drug design, development and therapy*. 2016;10:1857-67.
34. Bahrami B, Shen W, Zhu L, Zhang T, Chang A, Gillies MC. Effects of VEGF inhibitors on human retinal pigment epithelium under high glucose and hypoxia. *Clinical & experimental ophthalmology*. 2019;47(8):1074-81.
35. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell*. 2011;147(4):728-41.
36. Harnett MM, Pineda MA, Latre de Late P, Eason RJ, Besteiro S, Harnett W, et al. From Christian de Duve to Yoshinori Ohsumi: More to autophagy than just dining at home. *Biomedical journal*. 2017;40(1):9-22.
37. Levine B, Packer M, Codogno P. Development of autophagy inducers in clinical medicine. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(1):14-24.
38. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*. 2016;12(1):1-222.
39. Parzych KR, Klionsky DJ. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*. 2014;20(3):460-73.

40. Chiang HL, Dice JF. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(14):6797-805.
41. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *The EMBO journal*. 2017;36(13):1811-36.
42. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*. 1993;333(1-2):169-74.
43. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, et al. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Molecular biology of the cell*. 2009;20(7):1981-91.
44. Grasso D, Renna FJ, Vaccaro MI. Initial Steps in Mammalian Autophagosome Biogenesis. *Frontiers in cell and developmental biology*. 2018;6:146.
45. Ktistakis NT, Tooze SA. Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends in cell biology*. 2016;26(8):624-35.
46. Liu WJ, Ye L, Huang WF, Guo LJ, Xu ZG, Wu HL, et al. p62 links the autophagy pathway and the ubiquitin-proteasome system upon ubiquitinated protein degradation. *Cellular & molecular biology letters*. 2016;21:29.
47. Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM, Ploegh HL. A single protease, Apg4B, is specific for the autophagy-related ubiquitin-like proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(51):51841-50.
48. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO journal*. 2010;29(11):1792-802.
49. Li M, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. The dual role of autophagy under hypoxia-involvement of interaction between autophagy and apoptosis. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death*. 2015;20(6):769-77.
50. Boya P, Esteban-Martinez L, Serrano-Puebla A, Gomez-Sintes R, Villarejo-Zori B. Autophagy in the eye: Development, degeneration, and aging. *Progress in retinal and eye research*. 2016;55:206-45.
51. Boya P, Mellen MA, de la Rosa EJ. How autophagy is related to programmed cell death during the development of the nervous system. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 5):813-7.
52. Guimaraes CA, Benchimol M, Amarante-Mendes GP, Linden R. Alternative programs of cell death in developing retinal tissue. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(43):41938-46.
53. Mellen MA, de la Rosa EJ, Boya P. The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium. *Cell death and differentiation*. 2008;15(8):1279-90.
54. Esteban-Martinez L, Sierra-Filardi E, McGreal RS, Salazar-Roa M, Marino G, Seco E, et al. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *The EMBO journal*. 2017;36(12):1688-706.
55. Kim JH, Kim JH, Yu YS, Mun JY, Kim KW. Autophagy-induced regression of hyaloid vessels in early ocular development. *Autophagy*. 2010;6(7):922-8.
56. Lu WH, Shi YX, Ma ZL, Wang G, Liu L, Chuai M, et al. Proper autophagy is indispensable for angiogenesis during chick embryo development. *Cell cycle*. 2016;15(13):1742-54.
57. He L, Wei JY, Liu DX, Zhao WD, Chen YH. Atg7 Silencing Inhibits Laminin-5 Expression to Suppress Tube Formation by Brain Endothelial Cells. *Anatomical record*. 2019.
58. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell death and differentiation*. 2018;25(3):486-541.

59. Russo R, Berliocchi L, Adornetto A, Varano GP, Cavaliere F, Nucci C, et al. Calpain-mediated cleavage of Beclin-1 and autophagy deregulation following retinal ischemic injury in vivo. *Cell death & disease*. 2011;2:e144.
60. Park HL, Kim JH, Park CK. Different contributions of autophagy to retinal ganglion cell death in the diabetic and glaucomatous retinas. *Scientific reports*. 2018;8(1):13321.
61. Piano I, Novelli E, Della Santina L, Strettoi E, Cervetto L, Gargini C. Involvement of Autophagic Pathway in the Progression of Retinal Degeneration in a Mouse Model of Diabetes. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2016;10:42.
62. Cammalleri M, Locri F, Catalani E, Filippi L, Cervia D, Dal Monte M, et al. The Beta Adrenergic Receptor Blocker Propranolol Counteracts Retinal Dysfunction in a Mouse Model of Oxygen Induced Retinopathy: Restoring the Balance between Apoptosis and Autophagy. *Frontiers in cellular neuroscience*. 2017;11:395.
63. Zhu K, Zhang ML, Liu ST, Li XY, Zhong SM, Li F, et al. Ghrelin Attenuates Retinal Neuronal Autophagy and Apoptosis in an Experimental Rat Glaucoma Model. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2017;58(14):6113-22.
64. Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005;102(23):8204-9.
65. Huang Q, Shen HM. Erratum to: Huang Q, Shen H-M. To die or to live: the dual role of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in autophagy and necrosis under oxidative stress and DNA damage. *Autophagy* 2009; 5:273-6. *Autophagy*. 2010;6(8):1232.
66. Rosa MD, Distefano G, Gagliano C, Rusciano D, Malaguarnera L. Autophagy in Diabetic Retinopathy. *Current neuropharmacology*. 2016;14(8):810-25.
67. Amato R, Catalani E, Dal Monte M, Cammalleri M, Di Renzo I, Perrotta C, et al. Autophagy-mediated neuroprotection induced by octreotide in an ex vivo model of early diabetic retinopathy. *Pharmacological research*. 2018;128:167-78.
68. Yagasaki R, Nakahara T, Ushikubo H, Mori A, Sakamoto K, Ishii K. Anti-angiogenic effects of mammalian target of rapamycin inhibitors in a mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2014;37(11):1838-42.
69. Hua J, Guerin KI, Chen J, Michan S, Stahl A, Krahn NM, et al. Resveratrol inhibits pathologic retinal neovascularization in Vldlr(-/-) mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(5):2809-16.
70. Niu C, Chen Z, Kim KT, Sun J, Xue M, Chen G, et al. Metformin alleviates hyperglycemia-induced endothelial impairment by downregulating autophagy via the Hedgehog pathway. *Autophagy*. 2019;15(5):843-70.
71. Gao S, Zhang ZM, Shen ZL, Gao K, Chang L, Guo Y, et al. Atorvastatin activates autophagy and promotes neurological function recovery after spinal cord injury. *Neural regeneration research*. 2016;11(6):977-82.
72. Lytvynchuk L, Sergienko A, Lavrenchuk G, Petrovski G. Antiproliferative, Apoptotic, and Autophagic Activity of Ranibizumab, Bevacizumab, Pegaptanib, and Aflibercept on Fibroblasts: Implication for Choroidal Neovascularization. *Journal of ophthalmology*. 2015;2015:934963.
73. Reichenbach A, Fromter C, Engelmann R, Wolburg H, Kasper M, Schnitzer J. Muller glial cells of the tree shrew retina. *The Journal of comparative neurology*. 1995;360(2):257-70.
74. Hurley JB, Lindsay KJ, Du J. Glucose, lactate, and shuttling of metabolites in vertebrate retinas. *Journal of neuroscience research*. 2015;93(7):1079-92.
75. Lindsay KJ, Du J, Sloat SR, Contreras L, Linton JD, Turner SJ, et al. Pyruvate kinase and aspartate-glutamate carrier distributions reveal key metabolic links between neurons and glia in retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(43):15579-84.
76. Reichenbach A, Bringmann A. Role of Purines in Muller Glia. *Journal of ocular pharmacology and therapeutics : the official journal of the Association for Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2016;32(8):518-33.

77. Freitas HR, Ferraz G, Ferreira GC, Ribeiro-Resende VT, Chiarini LB, do Nascimento JL, et al. Glutathione-Induced Calcium Shifts in Chick Retinal Glial Cells. *PLoS one*. 2016;11(4):e0153677.
78. Vogler S, Pannicke T, Hollborn M, Kolibabka M, Wiedemann P, Reichenbach A, et al. Impaired Purinergic Regulation of the Glial (Muller) Cell Volume in the Retina of Transgenic Rats Expressing Defective Polycystin-2. *Neurochemical research*. 2016;41(7):1784-96.
79. Xue Y, Shen SQ, Jui J, Rupp AC, Byrne LC, Hattar S, et al. CRALBP supports the mammalian retinal visual cycle and cone vision. *The Journal of clinical investigation*. 2015;125(2):727-38.
80. Agte S, Junek S, Matthias S, Ulbricht E, Erdmann I, Wurm A, et al. Muller glial cell-provided cellular light guidance through the vital guinea-pig retina. *Biophysical journal*. 2011;101(11):2611-9.
81. Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, et al. Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(21):9228-36.
82. Jacobo SM, Kazlauskas A. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) stabilizes nascent blood vessels. *The Journal of biological chemistry*. 2015;290(10):6349-60.
83. Lorenc VE, Jaldin-Fincati JR, Luna JD, Chiabrando GA, Sanchez MC. IGF-1 Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2 and Promotes Muller Glial Cell Motility. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2015;56(11):6948-60.
84. Yafai Y, Eichler W, Iandiev I, Unterlauff JD, Jochmann C, Wiedemann P, et al. Thrombospondin-1 is produced by retinal glial cells and inhibits the growth of vascular endothelial cells. *Ophthalmic research*. 2014;52(2):81-8.
85. Biesecker KR, Srienic AI, Shimoda AM, Agarwal A, Bergles DE, Kofuji P, et al. Glial Cell Calcium Signaling Mediates Capillary Regulation of Blood Flow in the Retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2016;36(36):9435-45.
86. Kur J, Newman EA. Purinergic control of vascular tone in the retina. *The Journal of physiology*. 2014;592(3):491-504.
87. Wang M, Ma W, Zhao L, Fariss RN, Wong WT. Adaptive Muller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *Journal of neuroinflammation*. 2011;8:173.
88. Liu Y, Biarnes Costa M, Gerhardinger C. IL-1beta is upregulated in the diabetic retina and retinal vessels: cell-specific effect of high glucose and IL-1beta autostimulation. *PLoS one*. 2012;7(5):e36949.
89. Chen C, Chen H, Xu C, Zhong Y, Shen X. Role of interleukin-1beta in hypoxia-induced depression of glutamate uptake in retinal Muller cells. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2014;252(1):51-8.
90. Qiu AW, Bian Z, Mao PA, Liu QH. IL-17A exacerbates diabetic retinopathy by impairing Muller cell function via Act1 signaling. *Experimental & molecular medicine*. 2016;48(12):e280.
91. Coorey NJ, Shen W, Chung SH, Zhu L, Gillies MC. The role of glia in retinal vascular disease. *Clinical & experimental optometry*. 2012;95(3):266-81.
92. Lundkvist A, Reichenbach A, Betsholtz C, Carmeliet P, Wolburg H, Pekny M. Under stress, the absence of intermediate filaments from Muller cells in the retina has structural and functional consequences. *Journal of cell science*. 2004;117(Pt 16):3481-8.
93. Inada M, Taguchi M, Harimoto K, Karasawa Y, Takeuchi M, Ito M. Protective effects of dexamethasone on hypoxia-induced retinal edema in a mouse model. *Experimental eye research*. 2019;178:82-90.
94. Xue L, Ding P, Xiao L, Hu M, Hu Z. Nestin, a new marker, expressed in Muller cells following retinal injury. *The Canadian journal of neurological sciences Le journal canadien des sciences neurologiques*. 2010;37(5):643-9.

95. Ridano ME, Subirada PV, Paz MC, Lorenc VE, Stupirski JC, Gramajo AL, et al. Galectin-1 expression imprints a neurovascular phenotype in proliferative retinopathies and delineates responses to anti-VEGF. *Oncotarget*. 2017;8(20):32505-22.
96. Wang JJ, Zhu M, Le YZ. Functions of Muller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World journal of diabetes*. 2015;6(5):726-33.
97. Casie Chetty S, Rost MS, Enriquez JR, Schumacher JA, Baltrunaite K, Rossi A, et al. Vegf signaling promotes vascular endothelial differentiation by modulating etv2 expression. *Developmental biology*. 2017;424(2):147-61.
98. Stone J, Itin A, Alon T, Pe'er J, Gnessin H, Chan-Ling T, et al. Development of retinal vasculature is mediated by hypoxia-induced vascular endothelial growth factor (VEGF) expression by neuroglia. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(7 Pt 1):4738-47.
99. Wang J, Xu X, Elliott MH, Zhu M, Le YZ. Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes*. 2010;59(9):2297-305.
100. Bai Y, Ma JX, Guo J, Wang J, Zhu M, Chen Y, et al. Muller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *The Journal of pathology*. 2009;219(4):446-54.
101. Kimura T, Jia J, Claude-Taupin A, Kumar S, Choi SW, Gu Y, et al. Cellular and molecular mechanism for secretory autophagy. *Autophagy*. 2017;13(6):1084-5.
102. Harris H, Rubinsztein DC. Control of autophagy as a therapy for neurodegenerative disease. *Nature reviews Neurology*. 2011;8(2):108-17.
103. Du J, Teng RJ, Guan T, Eis A, Kaul S, Konduri GG, et al. Role of autophagy in angiogenesis in aortic endothelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2012;302(2):C383-91.
104. Liu J, Fan L, Wang H, Sun G. Autophagy, a double-edged sword in anti-angiogenesis therapy. *Medical oncology*. 2016;33(1):10.
105. Kim CB, D'Amore PA, Connor KM. Revisiting the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Eye and brain*. 2016;8:67-79.
106. Kumagai AK, Glasgow BJ, Pardridge WM. GLUT1 glucose transporter expression in the diabetic and nondiabetic human eye. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1994;35(6):2887-94.
107. Trachsel-Moncho L, Benlloch-Navarro S, Fernandez-Carbonell A, Ramirez-Lamelas DT, Olivar T, Silvestre D, et al. Oxidative stress and autophagy-related changes during retinal degeneration and development. *Cell death & disease*. 2018;9(8):812.
108. Yin Z, Pascual C, Klionsky DJ. Autophagy: machinery and regulation. *Microbial cell*. 2016;3(12):588-96.
109. Rodrigues M, Xin X, Jee K, Babapoor-Farrokhran S, Kashiwabuchi F, Ma T, et al. VEGF secreted by hypoxic Muller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*. 2013;62(11):3863-73.
110. Frost LS, Dhingra A, Reyes-Reveles J, Boesze-Battaglia K. The Use of DQ-BSA to Monitor the Turnover of Autophagy-Associated Cargo. *Methods in enzymology*. 2017;587:43-54.
111. Wang JF, Mei ZG, Fu Y, Yang SB, Zhang SZ, Huang WF, et al. Puerarin protects rat brain against ischemia/reperfusion injury by suppressing autophagy via the AMPK-mTOR-ULK1 signaling pathway. *Neural regeneration research*. 2018;13(6):989-98.
112. Bendix I, Schulze C, Haefen C, Gellhaus A, Endesfelder S, Heumann R, et al. Erythropoietin modulates autophagy signaling in the developing rat brain in an in vivo model of oxygen-toxicity. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(10):12939-51.
113. Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, et al. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(14):10850-61.

114. Caro LH, Plomp PJ, Wolvetang EJ, Kerkhof C, Meijer AJ. 3-Methyladenine, an inhibitor of autophagy, has multiple effects on metabolism. *European journal of biochemistry*. 1988;175(2):325-9.
115. Subirada PV, Paz MC, Ridano ME, Lorenc VE, Vaglienti MV, Barcelona PF, et al. A journey into the retina: Muller glia commanding survival and death. *The European journal of neuroscience*. 2018;47(12):1429-43.
116. Shao S, Li S, Qin Y, Wang X, Yang Y, Bai H, et al. Spautin-1, a novel autophagy inhibitor, enhances imatinib-induced apoptosis in chronic myeloid leukemia. *International journal of oncology*. 2014;44(5):1661-8.
117. Gerhardt H, Betsholtz C. Endothelial-pericyte interactions in angiogenesis. *Cell and tissue research*. 2003;314(1):15-23.
118. Li J, Kim SG, Blenis J. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell metabolism*. 2014;19(3):373-9.
119. Wei J, Jiang H, Gao H, Wang G. Blocking Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Attenuates HIF-1alpha Pathways Engaged-Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in Diabetic Retinopathy. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*. 2016;40(6):1570-7.
120. Zhu XR, Du JH. Autophagy: a potential target for the treatment of intraocular neovascularization. *International journal of ophthalmology*. 2018;11(4):695-8.
121. Liang J, Piao Y, Henry V, Tiao N, de Groot JF. Interferon-regulatory factor-1 (IRF1) regulates bevacizumab induced autophagy. *Oncotarget*. 2015;6(31):31479-92.
122. Sapielha P. Eyeing central neurons in vascular growth and reparative angiogenesis. *Blood*. 2012;120(11):2182-94.
123. Wangsa-Wirawan ND, Linsenmeier RA. Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects. *Archives of ophthalmology*. 2003;121(4):547-57.
124. Coughlin BA, Feenstra DJ, Mohr S. Muller cells and diabetic retinopathy. *Vision research*. 2017;139:93-100.
125. Lopes de Faria JM, Duarte DA, Montemurro C, Papadimitriou A, Consonni SR, Lopes de Faria JB. Defective Autophagy in Diabetic Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(10):4356-66.
126. Fung FK, Law BY, Lo AC. Lutein Attenuates Both Apoptosis and Autophagy upon Cobalt (II) Chloride-Induced Hypoxia in Rat Muller Cells. *PloS one*. 2016;11(12):e0167828.
127. Aits S, Krickler J, Liu B, Ellegaard AM, Hamalisto S, Tvingsholm S, et al. Sensitive detection of lysosomal membrane permeabilization by lysosomal galectin puncta assay. *Autophagy*. 2015;11(8):1408-24.
128. Marquet P, Djebli N, Picard N. [Pharmacogenetics and immunosuppressor drugs: impact and clinical interest in transplantation]. *Annales pharmaceutiques francaises*. 2007;65(6):382-9.
129. Liang X, Zhou H, Ding Y, Li J, Yang C, Luo Y, et al. TMP prevents retinal neovascularization and imparts neuroprotection in an oxygen-induced retinopathy model. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2012;53(4):2157-69.
130. Mitter SK, Rao HV, Qi X, Cai J, Sugrue A, Dunn WA, Jr., et al. Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration. *Advances in experimental medicine and biology*. 2012;723:83-90.
131. Russo R, Berliocchi L, Adornetto A, Amantea D, Nucci C, Tassorelli C, et al. In search of new targets for retinal neuroprotection: is there a role for autophagy? *Current opinion in pharmacology*. 2013;13(1):72-7.
132. Chinskey ND, Besirli CG, Zacks DN. Retinal cell death and current strategies in retinal neuroprotection. *Current opinion in ophthalmology*. 2014;25(3):228-33.
133. Frost LS, Mitchell CH, Boesze-Battaglia K. Autophagy in the eye: implications for ocular cell health. *Experimental eye research*. 2014;124:56-66.

134. Chai P, Ni H, Zhang H, Fan X. The Evolving Functions of Autophagy in Ocular Health: A Double-edged Sword. *International journal of biological sciences*. 2016;12(11):1332-40.
135. Nalbandian A, Llewellyn KJ, Nguyen C, Yazdi PG, Kimonis VE. Rapamycin and chloroquine: the in vitro and in vivo effects of autophagy-modifying drugs show promising results in valosin containing protein multisystem proteinopathy. *PloS one*. 2015;10(4):e0122888.
136. Kezic A, Popovic L, Lalic K. mTOR Inhibitor Therapy and Metabolic Consequences: Where Do We Stand? *Oxidative medicine and cellular longevity*. 2018;2018:2640342.
137. Smith LE, Wesolowski E, McLellan A, Kostyk SK, D'Amato R, Sullivan R, et al. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1994;35(1):101-11.
138. Stahl A, Connor KM, Sapieha P, Chen J, Dennison RJ, Krah NM, et al. The mouse retina as an angiogenesis model. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(6):2813-26.
139. Liu J, Xia H, Kim M, Xu L, Li Y, Zhang L, et al. Beclin1 controls the levels of p53 by regulating the deubiquitination activity of USP10 and USP13. *Cell*. 2011;147(1):223-34.
140. Liu NN, Zhao N, Cai N. Suppression of the proliferation of hypoxia-Induced retinal pigment epithelial cell by rapamycin through the /mTOR/HIF-1alpha/VEGF/ signaling. *IUBMB life*. 2015;67(6):446-52.
141. Hirt J, Porter K, Dixon A, McKinnon S, Liton PB. Contribution of autophagy to ocular hypertension and neurodegeneration in the DBA/2J spontaneous glaucoma mouse model. *Cell death discovery*. 2018;4:14.
142. Nguyen QD, Merrill PT, Sepah YJ, Ibrahim MA, Banker A, Leonardi A, et al. Intravitreal Sirolimus for the Treatment of Noninfectious Uveitis: Evolution through Preclinical and Clinical Studies. *Ophthalmology*. 2018;125(12):1984-93.
143. Amato R, Biagioni M, Cammalleri M, Dal Monte M, Casini G. VEGF as a Survival Factor in Ex Vivo Models of Early Diabetic Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016;57(7):3066-76.
144. Segatto M, Fico E, Gharbiya M, Rosso P, Carito V, Tirassa P, et al. VEGF inhibition alters neurotrophin signalling pathways and induces caspase-3 activation and autophagy in rabbit retina. *Journal of cellular physiology*. 2019;234(10):18297-307.
145. Sennlaub F, Courtois Y, Goureau O. Inducible nitric oxide synthase mediates retinal apoptosis in ischemic proliferative retinopathy. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2002;22(10):3987-93.
146. Vecino E, Hernandez M, Garcia M. Cell death in the developing vertebrate retina. *The International journal of developmental biology*. 2004;48(8-9):965-74.
147. Narayanan SP, Suwanpradid J, Saul A, Xu Z, Still A, Caldwell RW, et al. Arginase 2 deletion reduces neuro-glial injury and improves retinal function in a model of retinopathy of prematurity. *PloS one*. 2011;6(7):e22460.
148. Ma L, Li Y, Peng J, Wu D, Zhao X, Cui Y, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration. *Cell research*. 2015;25(1):24-38.
149. Davis CH, Kim KY, Bushong EA, Mills EA, Boassa D, Shih T, et al. Transcellular degradation of axonal mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2014;111(26):9633-8.
150. Hayakawa K, Esposito E, Wang X, Terasaki Y, Liu Y, Xing C, et al. Transfer of mitochondria from astrocytes to neurons after stroke. *Nature*. 2016;535(7613):551-5.
151. Russo R, Varano GP, Adornetto A, Nazio F, Tettamanti G, Girardello R, et al. Rapamycin and fasting sustain autophagy response activated by ischemia/reperfusion injury and promote retinal ganglion cell survival. *Cell death & disease*. 2018;9(10):981.
152. Barcelona PF, Ortiz SG, Chiabrando GA, Sanchez MC. alpha2-Macroglobulin induces glial fibrillary acidic protein expression mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in Muller cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(2):778-86.

153. Connor KM, Krah NM, Dennison RJ, Aderman CM, Chen J, Guerin KI, et al. Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nature protocols*. 2009;4(11):1565-73.
154. Limb GA, Salt TE, Munro PM, Moss SE, Khaw PT. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Muller cell line (MIO-M1). *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(3):864-9.

IX. Producción Científica

Publicaciones

Metabolic syndrome triggered by high-fructose diet impairs neuronal functionality and vascular integrity in the retina of apoe-ko mice María C. Paz, Pablo F. Barcelona, Paula V. Subirada, Magali E. Ridano, Gustavo A. Chiabrando, Claudia Castro, María C. Sánchez. (Manuscrito en revisión)

Effect of autophagy modulators on vascular, glial and neuronal alterations in the oxygen-induced retinopathy mouse model. Paula V. Subirada, María C. Paz, Magali E. Ridano, Valeria E. Lorenc, Claudio M. Fader, Gustavo A. Chiabrando, María C. Sánchez. *Front Cell Neurosci.* 2019 Jun 26;13:279. doi: 10.3389/fncel.2019.00279.

A journey into the retina: Müller glia commanding survival and death. Subirada PV, Paz MC, Ridano ME, Lorenc VE, Vaglianti MV, Barcelona PF, Luna JD, Sánchez MC. *Eur J Neurosci.* 2018 Jun;47(12):1429-1443. doi: 10.1111/ejn.13965. Epub 2018 Jun 8

Retinopatías Neovasculares: etiología y modelos de estudio para la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. M.E. Ridano, J.D. Luna Pinto, V.E. Lorenc, P.V. Subirada, M.C. Paz, V. Vaglianti, P.F. Barcelona, M.C. Sánchez. *Anales AFA Nro. Especial inVisionT* (2018) 56-61

Hemin Induces Autophagy In A Leukemic Erythroblast Cell Line Through The Lrp1 Receptor Rubén Grosso, Paula Subirada Caldarone, María Sánchez, Gustavo Chiabrando, María Colombo, and Claudio Fader. *Biosci Rep.* 2019 Jan 3;39(1). pii: BSR20181156. doi: 10.1042/BSR20181156. Print 2019 Jan 31

Galectin-1 expression imprints a neovascular phenotype in proliferative retinopathies and delineates responses to anti-VEGF Ridano, ME; Subirada Caldarone, PV; Paz, MC; Lorenc, V; Stupirsky, J; Gramajo AL; Luna Pinto, J; Croci, D; Rabinovich, G; Sánchez, MC. *Oncotarget.* 2017 May 16;8(20):32505-32522. doi: 10.18632/oncotarget.17129.

IGF-1R Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2, Pathological Neovascularization and Functionality in Retinas of OIR Mouse Model. Valeria E. Lorenc, Paula V. Subirada Caldarone, Maria C. Paz, Dario G. Ferrer, Jose D. Luna Pinto, Gustavo A. Chiabrando, María C. Sánchez. *Mol Neurobiol.* 2017 Jan 17. doi: 10.1007/s12035-017-0386-9

Modelos Animales De Retinopatía Diabética: Comprensión De La Patogénesis Y Potencial Utilización En El Desarrollo De Nuevos Agentes Terapéuticos. Paula V. Subirada Caldarone, Valeria E. Lorenc, Ma. Cecilia Sánchez*. *Bitacora Digital* (Revista de la FCQ, UNC) Agosto de 2013.

Presentaciones en Congresos:

SUBIRADA, PV; VAGLIANTI, MV; FIERRO JA; JURADO AE; O'BRIEN MP; LUNA PINTO, JD; SÁNCHEZ, MC; ANASTASIA, A; BARCELONA, PF. Participation of p75^{NTR} in a mouse model of Choroidal Neovascularization. XXXIV Reunión Anual SAN 2019. 3 al 5 de octubre. Villa Carlos Paz, Córdoba.

SUBIRADA, PAULA V.; PAZ, MARÍA C.; RIDANO, MAGALI E.; VAGLIENTI, VICTORIA; BARCELONA, PABLO F.; SÁNCHEZ, MARÍA C. Efectos del tratamiento de rapamicina en retinopatías proliferativas. II Congreso Científico Profesional de Bioquímica .Del 5 al 7 de Junio de 2019, Córdoba.

SUBIRADA, PV; PAZ, MC; RIDANO, ME; VAGLIENTI, V; BARCELONA, PF; CHIABRANDO, GA ; SÁNCHEZ, MC RAPAMYCIN: Another potential therapeutic strategy to modulate retinal neovascularization but not neurodegeneration.. XII Congreso AIVO, Córdoba, 27de Octubre de 2018.

SUBIRADA, P.V.; PALANDRI, A. ; HERRERA, G. ; ROZES, V. ; PAZ, M.C. ; GAZAL, G.N. ; D'ALOISIO, G. ; ÁVALOS, M.P. ; JANDAR, M. ; DÍAZ, N. ; MARTÍNEZ, G. ; MARTÍN, J. ; SÁNCHEZ, M.A. ; VAGLIENTI, V. ; SOTERAS, E. ; PISANO, V. ; OLIVEROS, A.L. ; REMEDI, M. ; CALFA, G. ; CONDE, C. ; SOSA, L. ; GALIANO, M. ; GOROSTIZA, A.; BARCELONA, P. ; SÁNCHEZ, M.C. ; UNSAIN, N Getting in contact with schools: the synopsis between students and neuroscientists.. Congreso Sociedad Argentina de Neurociencias (SAN), Córdoba, del 23 al 26 de Octubre de 2018.

SUBIRADA, PAULA V.; ACTIS DATO, VIRGINIA; VAZQUEZ, MATÍAS M.; BARCELONA, PABLO F.; BONACCI, GUSTAVO R.; SÁNCHEZ, MARÍA C Actividades didácticas como herramientas para reforzar conceptos.. 1º Jornadas Nacionales De Enseñanza De Farmacia Y Bioquímica, Córdoba, 17 y 18 de septiembre de 2018.

SUBIRADA, P. V.; PAZ, M.C.; RIDANO, ME; BARCELONA, P.F.; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C. Ischemic Neovascular Retinopathies: Autophagy flux deregulation in Glial Müller cells under oxygen deprivation conditions.Estados Unidos de América. EEUU. 2017. Revista. Resumen. Congreso. 2017 ARVO Annual Meeting. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)

PAZ, M.C.; BARCELONA, P.F.; SUBIRADA, P. V.; RIDANO, ME; CHIABRANDO, G. A.; CASTRO, C; SANCHEZ, M.C. Retinal dysfunction in early stages of Metabolic Syndrome established on a new experimental mouse model. Estados Unidos de América. EEUU. 2017. Revista. Resumen. Congreso. 2017 ARVO Annual Meeting. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)

RIDANO, ME; SUBIRADA, P. V.; PAZ, M.C.; LORENC, V.E; STUPIRSKI, JC; GRAMAJO, A.L.; LUNA, J.D.; CROCI, D.O.; RABINOVICH GA; SANCHEZ, M.C.. Galectin-1 involvement in neovascular retinopathies. Estados Unidos de América. EEUU. 2017. Revista. Resumen. Congreso. 2017 ARVO Annual Meeting. The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO)

SUBIRADA CALDARONE, PV; PAZ, M.C.; RIDANO, ME; BARCELONA, P.F.; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C.FOLLOWING HYPOXIC GRADIENT: DIFFERENT REGULATION OF AUTOPHAGY FLUX IN INNER AND OUTER NUCLEAR LAYERS. Argentina. Buenos Aires. 2017. Revista. Resumen. Congreso. Reunión Conjunta de las Sociedades de Biociencias. Sociedades de Biociencias

SUBIRADA, P. V.; RIDANO, ME; PAZ, M.C.; FADER KAISER, C; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C.. Impaired Autophagy flux in Müller cells exposed to hypoxia: in vitro and in vivo models.. Argentina. MENDOZA. 2016. Revista. Resumen. Congreso. LII Reunion SAIB 2016. Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB)

PAZ, M.C.; LORENC, V.E; SUBIRADA, P. V.; FERRER, D.G.; LUNA, J.D.; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C.. El IGF-1R regula la neovascularización patológica y la funcionalidad retinal en un modelo de ratón de Retinopatía Inducida por Oxígeno (OIR).

Argentina. Buenos Aires. 2016. Revista. Resumen. Congreso. XI Congreso Nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología

SUBIRADA, P. V.; BARCELONA, P.F.; PAZ, M.C.; RIDANO, ME; BONACCI, G. R.; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C.. Autofágica en el modelo murino de Retinopatía inducida por oxígeno: ¿igual efecto para todas las células? Argentina. Buenos Aires. 2016. Revista. Resumen. Congreso. XI Congreso Nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología

RIDANO, ME; SUBIRADA, P. V.; PAZ, M.C.; LORENC, V.E; LUNA, J.D.; CROCI, D.O.; BARCELONA, P.F.; RABINOVICH, GA; SANCHEZ, M.C. Expresión y localización de Galectina 1 durante el desarrollo de Retinopatía Inducida por Oxígeno (OIR). Argentina. Buenos Aires. 2016. Revista. Resumen. Congreso. XI Congreso Nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología

SUBIRADA, P. V.; RIDANO, ME; PAZ, M.C.; FADER KAISER, C ; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C. Autophagy participation in a mouse model of Oxygen-induced retinopathy (OIR). LI Reuñon SAIB 2015. Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB), Mar del Plata.

PAZ, M.C.; SUBIRADA, P. V.; RIDANO, ME; CASTRO; SANCHEZ, M.C.. RETINOPATIA DIABETICA: CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MODELO ANIMAL MURINO. Argentina. Buenos Aires. 2015. Revista. Resumen. Congreso. LX Reuñon de la Sociedad Argentina de Investigación en Clínica (SAIC). Sociedad Argentina de Investigación en Clínica

REYES, A.B.; VAZQUEZ, M.M.; SUBIRADA, P. V.; SANCHEZ, M.C.; BONACCI, G. R.. NITRO-FATTY ACID IRREVERSIBLE INHIBITION OF PTP1B.. LI Reuñon SAIB 2015. Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). Mar del Plata.

RIDANO, ME; SUBIRADA, P. V.; PAZ, M.C.; CROCI, D.O.; RABINOVICH GA; LUNA JD; SANCHEZ, M.C.. Retinopatía inducida por oxígeno (OIR): Expresión diferencial de proteínas pro-angiogénicas y de daño retinal como posibles blancos moleculares para el desarrollo de estrategias terapéuticas combinadas. Argentina. Buenos Aires. 2015. Revista. Resumen. Congreso. LX Reuñon de la Sociedad Argentina de Investigación en Clínica (SAIC). Sociedad Argentina de Investigación en Clínica

SUBIRADA, P. V.; JALDÍN FINCATI, J.; LORENC, V.E; PAZ, M.C.; SANCHEZ, M.C.. PARTICIPACION DE MECANISMOS DE AUTOFAGIA EN LAS RETINOPATIAS ISQUEMICAS DE LA RETINA. Argentina. Buenos Aires. 2014. Revista. Resumen. Congreso. X Congreso Nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Comité AIVO

PAZ, M.C.; LORENC, V.E; SUBIRADA, P. V.; CASTRO; SANCHEZ, M.C.. Retinopatía diabética: caracterización de un nuevo modelo animal murino. Argentina. Buenos Aires. 2014. Revista. Resumen. Congreso. X Congreso Nacional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Comité AIVO

SUBIRADA, P. V.; RIDANO, ME; PAZ, M.C.; VAGLIENTI, M.V.; BARCELONA, P.F.; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C. VÍA AUTOFÁGICA EN EL MODELO MURINO DE RETINOPATÍA INDUCIDA POR OXÍGENO: UNA RESPUESTA DEPENDIENTE DE LA INTENSIDAD DEL ESTÍMULO. Argentina. Córdoba Capital. 2017. Jornada. Jornada

Regional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología

SUBIRADA, P. V.; BARCELONA, P.F.; PAZ, M.C.; RIDANO, ME; BONACCI, G. R.; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C. EL PROCESO AUTOFÁGICO ES REQUERIDO PARA EL DESARROLLO DE NEOVASOS A NIVEL RETINAL. Argentina. Córdoba Capital. I Congreso Científico Profesional de Bioquímica 2016. UNC-UCC Colegio de Bioquímicos

RIDANO, ME; SUBIRADA, P. V.; PAZ, M.C.; LORENC, V.E; STUPIRSKI, JC; GRAMAJO, A.L.; LUNA, J.D.; CROCI, D.O.; RABINOVICH, GA; SANCHEZ, M.C. GAL-1 Y VEGF COMO BLANCOS TERAPEÚTICOS EN RETINOPATÍAS NEOVASCULARES. Argentina. Córdoba Capital. 2016. Congreso. I Congreso Científico Profesional de Bioquímica 2016. UNC-UCC-Colegio de Bioquímicos

PAZ, M.C.; SUBIRADA, P. V.; BARCELONA, P.F.; RIDANO, ME; CASTRO, C; SANCHEZ, M.C. EL DÉFICIT EN APOLIPOPROTEINA E Y DIETA RICA EN FRUCTOSA INDUCE EN RATONES RETINOPATÍA DIABÉTICA NO PROLIFERATIVA. Argentina. Córdoba Capital. I Congreso Científico Profesional de Bioquímica 2016. UNC-UCC-Colegio de Bioquímicos

PAZ, M.C.; PAULA V. SUBIRADA CALDARONE; RIDANO, ME; CASTRO; SANCHEZ, M.C. RETINOPATIA DIABÉTICA: CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO MODELO ANIMAL MURINO. Argentina. Córdoba. 2015. Jornada. Jornada Regional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Comité AIVO

SUBIRADA, P. V.; RIDANO, ME; PAZ, M.C.; FADER KAISER, C; CHIABRANDO, G. A.; SANCHEZ, M.C. Autophagy participation in a mouse model of Oxygen-induced retinopathy (OIR). Argentina. Córdoba. 2015. Jornada. Jornada Regional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Comité AIVO

RIDANO, ME; SUBIRADA, P. V.; PAZ, M.C.; CROCI, D.O.; RABINOVICH GA; LUNA JD; SANCHEZ, M.C.. Retinopatía inducida por oxígeno (OIR): Expresión diferencial de proteínas pro-angiogénicas y de daño retinal como posibles blancos moleculares para el desarrollo de estrategias terapéuticas combinadas. Argentina. Córdoba. 2015. Jornada. Jornada Regional de la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Comité AIVO