

TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS

**Valeria Erika LORENC**



Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

CIBICI-CONICET

Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Córdoba, Agosto de 2014.-

“Estudios Celulares y Moleculares de la Neovascularización Retinal en Mamíferos. Participación del Sistema IGF-1/IGF-1R” .

**DIRECTOR DE TESIS**

Prof. Dra. María Cecilia Sánchez

**COMISION ASESORA**

Prof. Dr. Santiago Quiroga

Prof. Dra. Claudia Bregonzio

Prof. Dra. María Ana Contin

**EVALUADOR EXTERNO**

Prof. Dr. Luis E. Politi

Este trabajo de tesis fue realizado con la ayuda  
Económica obtenida a través de becas y subsidios de  
FONCyT, CONICET, SECyT-UNC, IUBMB, IBRO-LARC, ARVO y CAEN/ISN.

## ***Indice***

<b>Resumen</b>	<b>1</b>
<b>Summary</b>	<b>4</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>6</b>
- La retina, desarrollo y estructura	7
- Células gliales de Müller	12
- Muerte celular en la retina	15
- Vascularización Retinal	16
- Retinopatías	20
- Metaloproteinasas y su rol en la neovascularización	24
- Factor de crecimiento similar insulina tipo 1	26
<b>II. Objetivos</b>	<b>30</b>
<b>III. Resultados, Modelo “<i>In Vitro</i>”: normoxia</b>	<b>33</b>
- Mecanismo intracelular de acción de IGF-1	34
▪ IGF-1 induce la activación de su receptor y de vías intracelulares de manera específica en células gliales de Müller.	
▪ Regulación de la actividad de MMPs por IGF-1.	
▪ IGF-1 regula el estado de activación de MMP-2 en las células gliales de Müller, mediante la unión específica a su receptor.	
▪ La regulación de la actividad de MMP2 por IGF-1 involucra la vía de la PI3K.	
▪ IGF-1 produce una acumulación de MMP2, pero no de MT1-MMP en lisados totales de las CM.	
- Mecanismo extracelular de acción de IGF-1	46
▪ IGF-1 produce una redistribución de MMP-2 y MT-1 MMP en la membrana plasmática de CM.	
▪ IGF-1 produce además una redistribución de su receptor en la membrana plasmática de CM.	

	▪ Efecto de IGF-1 en el proceso de migración celular.	
<b>IV.</b>	<b>Resultados, Modelo “<i>In Vitro</i>”: Hipoxia</b>	<b>52</b>
	▪ La hipoxia no modifica los efectos de IGF-1 sobre la regulación de la actividad de MMP-2.	
	▪ La hipoxia tampoco afecta la expresión de proteínas reguladoras de la actividad de MMP-2.	
<b>V.</b>	<b>Resultados, Modelo “<i>In Vivo</i>”</b>	<b>57</b>
-	Modelo de Retinopatía inducida por oxígeno	58
	▪ Caracterización del Modelo.	
	▪ La hipoxia y los factores angiogénicos inducen una zona avascular central y neovascularización en retinas completas (flatmount) del modelo OIR.	
	▪ La hipoxia y los factores angiogénicos generan neovasos y modificaciones en el espesor de las capas retinales en ratones OIR.	
	▪ El modelo de OIR produce neurodegeneración retinal.	
-	Participación del sistema IGF-1/IGF-1R en el desarrollo retinal y en el modelo de OIR.	64
	▪ La hipoxia no modifica la expresión de IGF-1R durante el desarrollo retinal y en el modelo de OIR.	
	▪ La hipoxia acelera la expresión de MMP-2 y MT1-MMP en el modelo de OIR.	
	▪ La administración intraocular del anticuerpo de bloqueo $\alpha$ IR3 inhibió la NV y disminuyó el área de vaso obliteración en ratones OIR	
<b>VI.</b>	<b>Discusión</b>	<b>80</b>
<b>VII.</b>	<b>Materiales y Métodos</b>	<b>94</b>
<b>VIII.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>102</b>

## Abreviaturas

ASB: albumina sérica bovina

CM: células gliales de Müller

CRALBP: proteína unidora de retinaldehído (por *cellular retinaldehyde-binding protein*)

EC: ectodermo

ERK: cinasas reguladas por señales extracelulares (por *extracellular signal regulated kinase*)

FGF2: factor de crecimiento de fibroblastos tipo 2 (por *fibroblast growth factor 2*)

GFAP: proteína ácida fibrilar de la glia (por *glial fibrillary acidic protein*)

GS: enzima glutatión intasa

GSA: griffonia simplicifolia isolectin B4

HIF-1: factor inducible por hipoxia (por *hypoxia-inducible factor*)

IGF-1: factor de crecimiento similar insulina tipo 1 (por *Insulin-like growth factor-1*)

IGF-1R: receptor del factor de crecimiento similar insulina tipo 1 (por *Insulin-like growth factor-1 receptor*)

IR: receptor de Insulina (por *Insulin receptor*)

MEC: matriz extracelular

MMPs: metaloproteinasas

MS: mesenquima

MT1-MMP: metaloproteinasa de membrana tipo 1 (por *membrane type-1 matrix metalloproteinase*)

NV: neovasos

NR: retina neural (por *neural retina*)

OIR: retinopatía inducida por oxígeno (por *oxygen induced retinopathy*)

OV: vesícula óptica (por *optical vesicle*)

PBS: solución tamponada de fosfato salino (por *phosphate buffer saline*)

PDGFA: factor de crecimiento derivado de plaquetas alfa (por *platelet-derived growth factor alpha*)

PFA: para formaldehído

PNV: proceso de neovascularización

PRP: panretinal fotocoagulación (por *panretinal photocoagulation*)

RDP: retinopatía diabética proliferativa

ROP: retinopatía del prematuro (por *retinopathy of prematurity*)

RPE: epitelio pigmentario de la retina (por *retinal pigment epithelium*)

SFB: suero fetal bovino

SRS: espacio subretinal (por *subretinal space*)

TIMP-2: inhibidor tisular de metaloproteínasa (por *tissue inhibitor of metalloproteinase 2*)

TUNEL: ensayo de incorporación de dUTP mediante deoxinucleotidil transferasa (por Terminal deoxynucleotidyl transferase *dUTP Nick End Labelling*)

VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular (por *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VEGFR-1 (flt-1): receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

## **Resumen**

IGF-1 es un factor de crecimiento que ejerce efectos mitogénicos, de diferenciación, anti-apoptóticos y metabólicos sobre diferentes tipos de células pero también participa en procesos patológicos como la neovascularización (NV) retinal, la cual se encuentra asociada a una excesiva proteólisis de la matriz extracelular (MEC). A nivel de la retina, diferentes enfermedades como la Retinopatía del Prematuro (ROP) y la Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP) involucran la NV que puede provocar, en etapas finales de las mismas, la reducción parcial o total de la visión. Se conoce que la hipoxia, principal desencadenante de estas patologías, produce fundamentalmente un desbalance entre factores pro-angiogénicos (VEGF, IGF-1, bFGF, PDGF) y anti-angiogénicos (PEDF, TGF- $\beta$ , Angiostatina, TIMP) que culmina con la NV, siendo este mecanismo en la actualidad el mejor estudiado. Sin embargo, la participación de otros factores independientes de hipoxia como IGF-1, al presente no ha sido completamente esclarecida.

Si bien las retinopatías fueron clásicamente consideradas como una enfermedad vascular, evidencias más recientes indican que es también una enfermedad neurodegenerativa, por lo cual más de un tipo celular retinal se ven afectados en este proceso. Al respecto, las células gliales de Müller (CM) que tienen un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis del espacio extracelular así como en la conservación de la integridad de la barrera hemato-retiniana, merecen especial atención en la NV. Su asociación con los vasos retinales así como la capacidad de sintetizar factores como VEGF y metaloproteinasa (MMPs) dejan implícita la relación que existe entre las CM y el desarrollo tanto fisiológico como patológico de la NV retinal. Evidencias preliminares de nuestro laboratorio indican que IGF-1R está altamente expresado en las CM y que bajo estímulo con IGF-1 es capaz de regular la actividad de MMPs, sugiriendo que el sistema IGF-1/IGF-1R participaría en la regulación del complejo proceso de NV en la retina. Por lo cual, el principal interés de esta Tesis fue investigar el efecto de IGF-1 y su receptor sobre la actividad proteolítica extracelular asociada a eventos de migración celular en diferentes modelos experimentales.

Para ello, en primer lugar utilizando como modelo experimental *in vitro* la línea de células gliales humana MIO-M1 demostramos por ensayos de Western blot que IGF-1, al interactuar con su receptor, promueve la fosforilación del mismo así como la activación de las vías de señalización MAPK/ERK y PI3K/AKT de manera selectiva. A continuación y con el objeto de explorar los efectos de IGF-1 sobre la activación MMPs, se realizaron ensayos de zimografía con los sobrenadantes de

células MIO-M1 estimuladas con el factor observándose una disminución relativa de la forma activa de MMP-2, respecto a la obtenida en las células sin estímulo. Esta regulación de la actividad en los sobrenadantes se correlacionó con un incremento en MMP-2 a nivel de lisado celular. Además esta regulación demostró ser mediada por la vía de señalamiento intracelular PI3K/AKT. Finalmente, por ensayos de inmunofluorescencia en células MIO-M1 no permeabilizadas observamos, luego del estímulo con IGF-1, una redistribución de la MMP de membrana tipo 1 (MT1-MMP), de MMP-2 y IGF-1R hacia los procesos celulares así como un importante acúmulo de estas proteínas sobre la membrana celular. Finalmente, y considerando que estos hallazgos denotan un fenotipo celular migratorio nos propusimos evaluar por ensayos de herida (*scratch wound*), el efecto de IGF-1 sobre la capacidad migratoria de las células MIO-M1. Los resultados mostraron que bajo estímulo, las CM incrementaron la capacidad de migración sobre proteínas de matriz extracelular, como colágeno tipo I y laminina siendo este proceso dependiente de la interacción de IGF-1 con su receptor. Habiendo analizado los efectos de IGF-1 sobre la regulación de MMPs en células de Müller, a continuación nos planteamos analizar los efectos de la hipoxia sobre estas proteinasas a modo de reproducir *in vitro* lo que ocurriría en patologías como las retinopatías. Nuestros estudios, en CM, demostraron que bajo condiciones de hipoxia, si bien la relación de MMP-2/pro-MMP-2 aumentó respecto a normoxia, el efecto de IGF-1 sobre la regulación de MMP-2 fue similar al demostrado en condiciones de normoxia. Además por ensayos de Western blot también observamos que la hipoxia no modificó la expresión proteica de MT1-MMP inducida por IGF-1 en estas células.

Finalmente, la relevancia fisiopatológica de los estudios en el modelo *in vitro* fue evaluada utilizando un modelo de neovascularización inducida por oxígeno (OIR) en ratones, el cual ha sido ampliamente estandarizado y reproducido en nuestro laboratorio a juzgar por la presencia de áreas avasculares así como de ovillos neovasculares hacia la cavidad vítrea. En este modelo se analizó por ensayos de inmunofluorescencia la expresión de IGF-1R observándose en células GFAP positivas, lo cual confirmó que durante el desarrollo IGF-1R se expresa a nivel de astrocitos y bajo condiciones de hipoxia en CM, entre otras. Conociendo que *in vitro* IGF-1 regula la actividad de MMP-2 en CM, posteriormente evaluamos la expresión de MMP-2 en el tejido retinal. Así, observamos que células positivas para glutamina sintasa (GS) un marcador específico de CM, fueron positivas para MMP-2 lo cual confirma la expresión de MMP-2, en el modelo *in vivo*, por las CM. En el modelo de OIR, MMP-2 se expresó preferencialmente en los *endfeet* de las CM coincidiendo con el área de ovillos NV. Finalmente y con el propósito de analizar la contribución de IGF-1 en los procesos de NV, se administró a P12, por vía intraocular, un anticuerpo que bloquea específicamente la activación de

IGF-1R,  $\alpha$ IR3, en el modelo de OIR. En forma notable, el bloqueo del receptor de IGF-1 logró inhibir la NV así como disminuir el área avascular generando un efecto normalizador en la vasculatura de retinas de animales OIR.

En conjunto, estos resultados demuestran que el Sistema IGF-1/IGF-1R regula la actividad de MMP-2 en CM, colaborando con la neovascularización de la retina durante procesos isquémicos proliferativos como las retinopatías. Además, el sistema IGF-1/IGF-1R al actuar como un factor estimulante de la migración de la propia célula de Müller, tendría implicancias tanto durante el desarrollo retinal como en procesos neurodegenerativos. Respecto al primero, actuando como regulador de la migración celular hacia las distintas capas retinales mientras que en el segundo estaría asociado con la aplicación de terapias celulares. Finalmente, el bloqueo terapéutico de IGF-1R en el modelo de OIR, el cual demuestra poseer un gran potencial de normalización de la vasculatura, se convierte en una posible alternativa terapéutica para el tratamiento de las retinopatías proliferativas retinales como la ROP y la RDP.

## ***Summary***

Insulin-like growth factor I (IGF-I) exerts multiple effects on different retinal cell types in both physiological and pathological conditions. Different diseases such as retinopathy of prematurity (ROP) and proliferative diabetic retinopathy (PDR) which involve neovascularization (NV), in late stages can cause partial or total reduction of vision. It is known that in NV, hypoxia is the main trigger which activates VEGF and regulates the expression of integrins and extracellular proteinases, mediators for endothelial cell migration and proliferation. However, the role of other factors such as IGF-1, which acts in a hypoxia-independent fashion, has not been fully elucidated.

Although the endothelial cells are considered the main cell in the NV process, the Müller glial cell (MC) that plays a critical role in maintaining the homeostasis of the extracellular space and in the preservation of the integrity of the blood-retinal barrier, deserve special attention in the NV. Their associations with retinal vessels as well as their ability to synthesize growth factors such as VEGF and metalloproteinase (MMPs) highlight the relationship between this cell type and the development of retinal NV. Preliminary evidences from our group indicate that IGF-1R is highly expressed in MC and that under stimulation with IGF-1 is able to regulate the MMPs activity. Therefore, the main interest of this work was to investigate the IGF-1 effect on the extracellular proteolytic activity in different experimental models.

Using a human glial cell line, MIO-M1, we demonstrated by Western blot assays that IGF-1 was able to activate its receptor and to promote the activation of the MAPK/ERK and PI3K/AKT signaling pathways. By zymography assays we observed in the MIO-M1 supernatants a relative decrease in the active form of MMP-2, compared with that obtained in non-stimulated cells. This MMP-2 activity regulation in the supernatants was correlated with an increase in MMP-2 at cell lysate. Furthermore, we demonstrated that this process was blocked by the PI3-kinase inhibitor LY294002. In addition, by immunofluorescence microscopy in MIO-M1 cells we observed that MMP-2, MT1-MMP and IGF-1R were mainly localized in the membrane surface towards the cellular processes. Finally, considering that these findings denote a migratory cell phenotype we decided to evaluate by wound assays (scratch wound), the IGF-1 effect on the migratory capacity of MIO-M1 cells. The results demonstrated that IGF-1 induces an increased migratory capacity of MC attached on different extracellular matrix proteins, such as laminin and collagen I.

Next we demonstrated that in hypoxia, the IGF-1 effect on the MMP-2 regulation was similar to that shown in normoxic conditions. By Western blot assays also observed that hypoxia did not modify the MT1-MMP protein expression induced by IGF-1 in these cells.

Thus, the pathophysiological relevance of the *in vitro* studies was evaluated using an oxygen induced retinopathy (OIR) mouse model, which has been widely reproduced in our laboratory. In this model, we first evaluated the IGF-1R expression. By immunofluorescence assay we demonstrated receptor expression in GFAP positive cells, confirming that during development IGF-1R is expressed in astrocytes and under hypoxic conditions in MC, among others. Then, we observed that glutamine synthetase (GS) positive cells were also positive for MMP-2, confirming the MMP-2 expression in MC. Finally, in the OIR mouse model we demonstrated that a single intravitreal injection of the IGF-1R blocking antibody ( $\alpha$ IR3) at postnatal day (P) 12 significantly reduced retinal NV and enhanced the physiological revascularization of the retinal vascular plexus at P17.

These results demonstrate, for first time, that the IGF-1/IGF-1R system regulates the MMP-2 activity in MC, contributing to the MEC remodeling during the retinal NV process. Finally our findings also indicate, that the  $\alpha$ IR3 antibody might possibly be used to promote intraretinal revascularization and thus prevent the abnormal NV in ischemic vision-threatening retinal diseases.

# Capítulo I

## *Introducción*

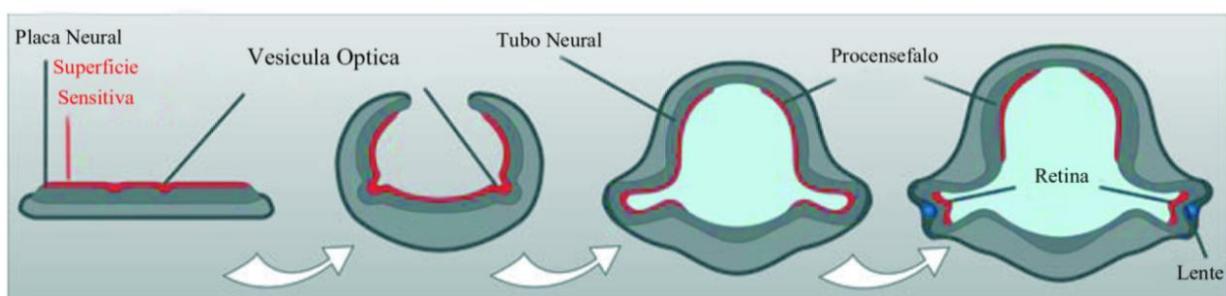
## - La retina, desarrollo y estructura.

### *Origen embrionario.*

La retina es tejido nervioso que recubre la parte posterior del ojo y contiene millones de células receptoras, distribuidas en capas bien definidas e interconectadas entre sí, las cuales cumplen dos funciones de mayor importancia:

- I. La detección de fotones y conversión de la luz en energía (proceso conocido como fototransducción),
- II. El procesamiento de la información visual (incluyendo aquí los procesos de aumento de contraste o adaptación entre las condiciones día-noche).

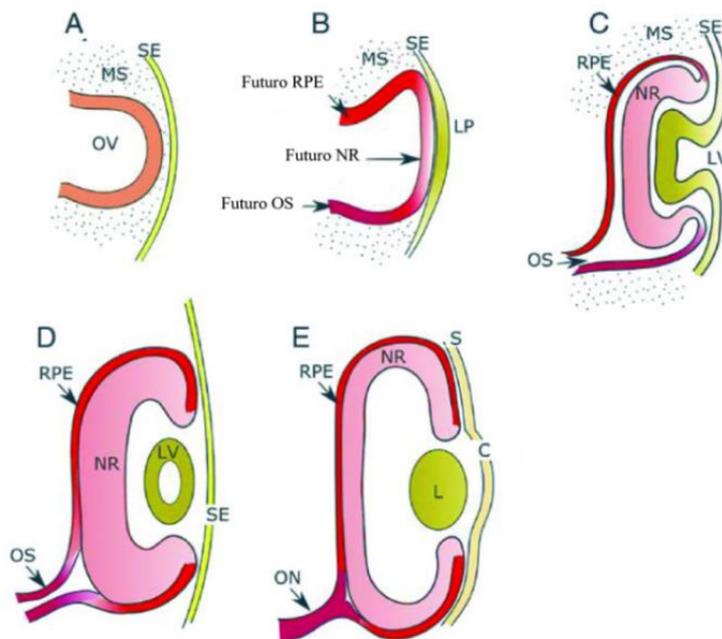
El tejido retinal, de origen neuroectodérmico, explica su composición a través del desarrollo de las vesículas ópticas (del inglés, OV), estructura presente en estadios tempranos del desarrollo embrionario. Para que las OV se formen deben suceder diversas interacciones tisulares. En primer lugar ocurre una inducción y regionalización de la zona anterior de la placa neural, en una zona o superficie sensitiva (1), seguida de la formación de las OV. El primer indicio de formación de las mismas es la presencia de evaginaciones simétricas y bilaterales desde el diencéfalo, que se expanden a través del mesénquima (MS) hacia el ectodermo (del inglés, SE) (**Figura 1 y 2 A**).



**Figura 1: Diagrama mostrando la formación de la retina por una evaginación del tubo/placa neural.** Modificado de Reichenbach A y Brigman A., 2010.

Cuando el SE y las OV entran en contacto, ocurren diversos cambios estructurales (2B) como el engrosamiento del ectodermo para formar primero la placoda del cristalino (del inglés, LP), el cristalino o lente (L) (2B-E) y por último la invaginación de las vesículas para formar la copa óptica (2

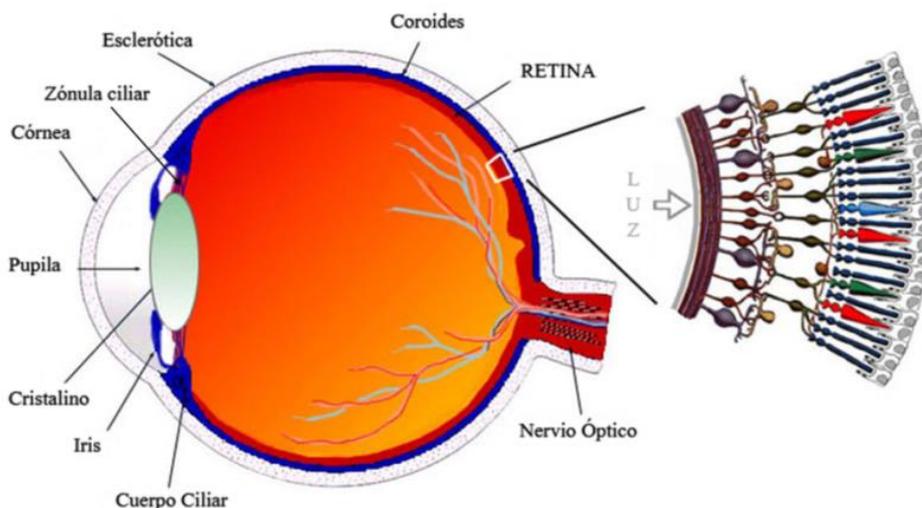
C-E). En la región dorsal de la invaginación de la OV se va a generar una capa interna, futura retina neural (del inglés, NR) y una capa externa, futuro epitelio pigmentario (del inglés, RPE). La región ventral de las mismas generará la fisura coroidea, que al cerrarse dará lugar al nervio óptico (2 D y E). Finalmente, la superficie del ectodermo originará la lente, el epitelio y la córnea (2).



**Figura 2: Diagrama representativo del desarrollo ocular de vertebrados.** A. La vesícula óptica (OV) a través del mesénquima (MS), llega al ectodermo (SE). B. Al entrar en contacto, distintas regiones en ambas estructuras se comienzan a diferenciar; el epitelio pigmentario (RPE), la retina neural (NR), el tallo óptico (OS) y la placoda del cristalino (LP). C. La vesícula óptica y la placoda del cristalino invaginan para originar la copa óptica y la vesícula del cristalino (LV), respectivamente. D-E. Posteriormente, se forma el cristalino (L), la retina neural y el epitelio pigmentario entran en contacto y el tallo óptico se cierra para formar el nervio óptico (ON). La superficie del ectodermo formara las lentes, el epitelio y la córnea (C). Modificado de Adler y Canto-Soler, 2007.

Durante el desarrollo embrionario los procesos de las células gliales de Müller (CM) inmaduras tienen un rol principal en la organización histotípica de la retina y en el correcto ordenamiento de los circuitos neuronales retinales. Ellas son las encargadas de guiar, tanto la migración de las neuronas (3) como el crecimiento de sus neuritas (4). De esta manera la retina adquiere la estructura final que la caracteriza. Un corte seccional del ojo revela las estructuras que lo componen, que a grandes rasgos podrían dividirse en 3 (**Figura 3**):

- I. La capa externa formada por esclera y cornea,
- II. La intermedia dividida en una parte anterior (iris y cuerpo ciliar) y una posterior (coroides),
- III. Una capa interna, compuesta por la parte sensitiva del ojo, la retina.

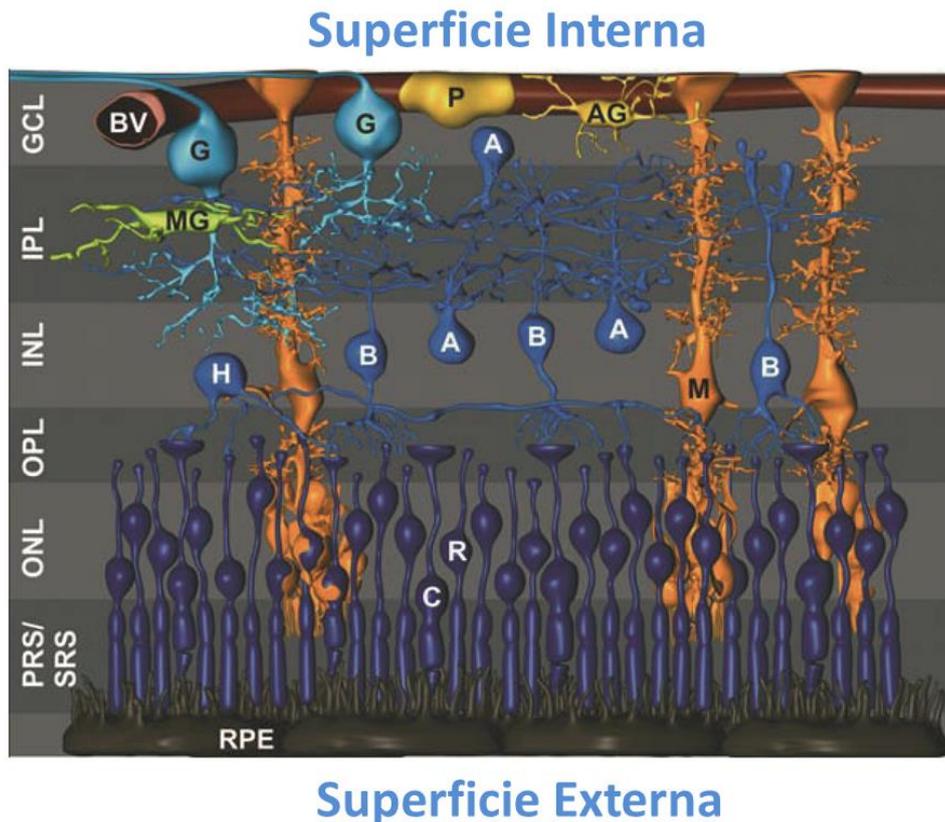


**Figura 3: Esquema representativo del ojo y la estructura retinal.** Modificado de Kolb y col., 2005.

Además pueden caracterizarse tres cámaras que contienen fluidos, la cámara anterior (entre la córnea y el iris), la cámara posterior (entre el iris y la zonula ciliar y el lente) y la cámara del vítreo (entre la lente y la retina). Las dos primeras cámaras se encuentran compuestas por el humor acuoso mientras que la cámara del vítreo, por una sustancia un poco más densa denominada humor vítreo (**Figura 3**).

#### *Estructura retinal.*

El tejido retinal se caracteriza por poseer distintas capas de células fácilmente distinguibles desde el punto de vista funcional y estructural. Dos estructuras laminares principales, la retina neural y el RPE lo componen (**Figura 4**). La interface entre estas dos estructuras es un compartimento fluido, proveniente del ventrículo óptico, denominado espacio subretinal. La superficie interna de la retina neural se encuentra en contacto con el vítreo. Esta superficie está compuesta por la membrana limitante interna (del inglés, ILM), constituida principalmente por colágeno, proteoglicanos, membrana plasmática de células de Müller (CM) y membrana basal (5). La superficie externa del RPE se encuentra rodeada también por una membrana basal, en este caso multilaminar, conocida como membrana de Bruch. Esta membrana entra en contacto con la parte interna de la coroides que provee nutrientes y oxígeno a esta zona retinal, conocida como coriocapilaris.



**Figura 4: Estructura de la retina.** Entre las capas que la componen se puede observar el Epitelio pigmentario retinal (RPE), el espacio subretinal (SRS), la capa nuclear externa (ONL), la capa plexiforme externa (OPL), la capa nuclear interna (INL), la capa plexiforme interna (IPL) y la capa de células ganglionares (GCL). Dentro de estas capas se encuentran varios tipos celulares: conos (C) y bastones (R) en la ONL; las células amacrinas (A), bipolares (B) y horizontales en la INL; la microglia (MG) en la IPL; las células ganglionares (G) y pericitos (P) rodeando a los vasos (BV), los astrocitos (AG) en la GCL; y las células de Müller (M). Modificado de Reichenbach A y Brigman A., 2010.

La retina neural de los vertebrados tiene una estructura muy definida, compuesta por 7 capas (**Figura 4**). Tres de ellas contienen cuerpos celulares con núcleos (la capa nuclear externa, ONL; la capa nuclear interna, INL; y la capa de células ganglionares, GCL), dos poseen procesos celulares y sinapsis neuronales (la capa plexiforme externa, OPL; y la capa plexiforme interna, IPL), una capa que posee los axones de las células ganglionares en su camino hacia el nervio óptico (capa de fibras nerviosas, NFL), y una última capa más externa formada por los segmentos fotosensibles de los fotorreceptores (6). Más de 60 subtipos celulares están presentes en la retina (7), mayormente representados por neuronas y células gliales y un tercer elemento son las células vasculares. Existen tres tipos de neuronas que se encuentran conectadas en serie y están encargadas de la transmisión de la información visual desde los fotorreceptores hasta la superficie

de la retina neural llegando hasta el nervio óptico (horizontales, bipolares y ganglionares). En cuanto al número de células las más abundantes son los fotorreceptores, seguidos de las células bipolares y por último las células ganglionares. Existen dos tipos neuronales que realizan un procesamiento lateral de la misma, estas neuronas son las conocidas como amacrinas (con axones y dendritas extendidas dentro de la IPL y sus núcleos en el borde interno de la INL) y horizontales (con axones y dendritas extendidas dentro de la OPL y sus núcleos en el borde externo de la INL).

La vasculatura retinal está formada por células endoteliales (CE) que regulan funciones hemostáticas y constituyen la barrera hemato-retiniana, y los pericitos que son células musculares lisas modificadas de capilares que regulan el flujo vascular.

La glía como parte del sistema nervioso la retina contiene varios tipos de células: las microgliales y las macrogliales. Las células de la microglia, son células inmunes residentes de la retina, derivadas de células sanguíneas. Entre sus funciones se encuentran las de iniciación de procesos inflamatorios y reparación tisular. En respuesta a un estímulo patogénico, estas células se activan y son capaces de migrar a través de toda la retina. Estas pueden encontrarse en ambas capas plexiformes así como en la GCL (8). Además, existen en la retina dos tipos de células macrogliales: astrocitos y CM. Los astrocitos solo están presentes en especies de mamíferos y poseen un rol clave en la vascularización retinal. Se encuentran en la NFL, GCL y alrededor de los vasos en la parte interna de la IPL. Existen dos tipos de astrocitos, los perivasculares y los intervascuales. Tanto astrocitos como las CM se encuentran en contacto con vasos superficiales, grupos de axones de células ganglionares (CG), los segmentos iniciales y estructuras como nodos de los axones de CG, y con la lámina basal en la superficie interna de la retina. Además existe un alto grado de acoplamiento entre las CM y los astrocitos (5). Si bien existe, un tercer tipo de célula macroglial, los oligodendrocitos, estos no están presentes en las retinas de los mamíferos. Con respecto a las CM, sus características funcionales y estructurales serán desarrolladas más adelante.

Finalmente, el RPE está compuesto por una monocapa de células hexagonales pigmentadas, las células epiteliales pigmentarias. Esta capa cumple funciones como la mantención de la barrera hemato-retiniana, controlando el intercambio de nutrientes y desechos celulares entre la coroides y la retina neural; contribuye al reciclaje/metabolismo de los ftopigmentos; la fagocitosis de los segmentos internos de los fotorreceptores; la absorción de los gránulos de melanina producto del exceso de luz y de los fotones no absorbidos por los ftopigmentos; el mantenimiento de la hipotensión en el espacio subretinal evitando el desprendimiento de la retina; entre otras (9).

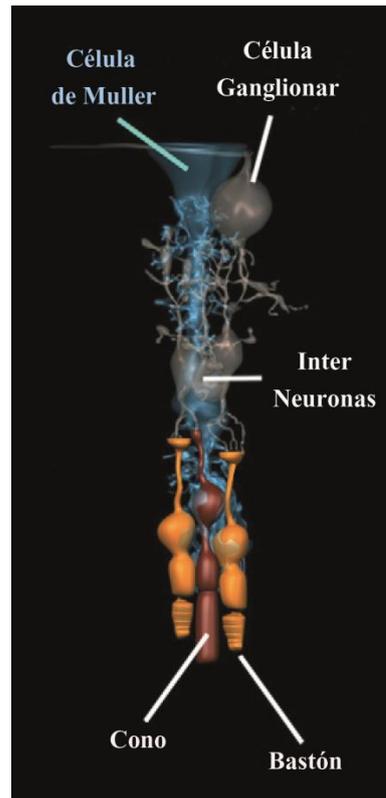
Por lo expuesto anteriormente, es importante destacar que tanto las interacciones celulares como la integridad funcional tisular son requeridas para una correcta función visual. Cualquier alteración o disrupción celular genera, en el tejido retinal, daños con consecuencias que pueden conducir a la ceguera parcial o total en los individuos afectados.

#### - **Células de Müller.**

La retina humana posee 8 a 10 millones de CM, siendo estas células el tipo más abundante en las retinas de vertebrados. Si bien las CM pueden ser fácilmente identificadas por sus características morfológicas, ellas poseen marcadores bioquímicos específicos como la proteína de unión al retinaldehído (CRALBP, por celular retinaldehyde-binding protein), vimentina y la enzima Glutación Sintasa (GS); mientras que otros son compartidos con astrocitos, como la Proteína Fibrilar Ácida de la Glia (GFAP, por glial fibrillar acidic protein) (1) la cual es expresada por la CM sólo bajo condiciones de estrés celular.

Cada CM constituye el centro de la mínima unidad funcional de la retina para el procesamiento de la información visual (**Figura 5**). Allí, la CM interactúa con las neuronas de su unidad y es la encargada del soporte estructural y metabólico de las mismas. La CM es el último tipo celular en diferenciarse en la retina, en mamíferos alrededor del día posnatal 16 (P16) (10). Posee una estructura polarizada, derivada del linaje de células gliales radiales, que se divide en tres regiones bien características (1):

- I. Un proceso celular externo que se desarrolla desde el soma celular hasta la Membrana Limitante Externa (del inglés, OLM) desde la cual extiende numerosos *microvilli* o vellosidades celulares hasta el espacio subretinal.
- II. Un proceso celular interno, que se extiende desde el soma hasta la ILM, en donde forma un *endfoot* o varios *endfeet*. Este proceso es el que comprende el mayor volumen citoplasmático de la célula, cerca del 70% (11). En retinas vascularizadas (como la de la mayoría de los mamíferos), las membranas de los *endfoot* se encuentran entremezcladas con aquellas de los astrocitos (12) y representan un sitio activo para el intercambio de moléculas entre las CM y la retina por un lado, y el humor vítreo por el otro.
- III. Un proceso lateral, que se origina de los procesos internos o externos en las dos capas plexiformes.



**Figura 5: Esquema de la unidad estructural y funcional de la retina**, cuyo eje es la célula de Müller. Modificado de Kuhrt H. y col., 2012.

Entre otras funciones, las CM tienen un rol crítico en el mantenimiento de la homeostasis del espacio extracelular (principalmente en la regulación de agua e iones), así como en la conservación de la integridad de la barrera hemato-retiniana. Guían la luz hacia los fotorreceptores, comportándose como verdaderas fibras ópticas y hacen de soporte mecánico para las deformaciones estructurales de la retina. Son responsables de modular la respuesta inmune e inflamatoria y ante un estímulo (injurias), generalmente actúan como células neuroprotectoras, pero también en estado de gliosis, pueden detener el soporte fisiológico hacia a neuronas promoviendo la degeneración de las mismas (13). Su asociación con los vasos retinales deja implícita la relación que existe entre esta célula glial y el desarrollo tanto fisiológico como patológico de la vasculatura retinal, aspecto que será tratado posteriormente.

Las CM, a diferencia de las neuronas, son altamente resistentes a injurias incluyendo isquemia, hipoglucemia e hipoxia. En este sentido, estas células presentan un umbral bajo a cambios de niveles de oxígeno en retinas vasculares (14) pero más resistentes en aquellas avasculares (15).

Además, en condiciones normales sintetizan diversos factores de crecimiento y neurotransmisores vitales para el desarrollo de la retina. Entre ellos el Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos (bFGF), el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), el Factor de Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF), Neurotrofina 2, el Factor Neurotrófico Ciliar (CNTF), Interleucina 6 (IL6), el Factor de Crecimiento Transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) (16), el Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) (17), el Factor de Crecimiento derivado del Epitelio Pigmentario (PEDF) (18) y el Factor de Crecimiento Simil-Insulina (IGF-1), (19, 20) entre otros.

Las CM son el tipo predominante de células secretoras de VEGF cuando la retina sufre hipoxia (17, 21) y bajo determinados estímulos son capaces de secretar metaloproteinasas (MMPs) (22-24) que producen degradación proteolítica de la matriz extracelular (MEC) y alteran la función de la barrera hemato-retiniana (25). Es por ello que, después de una lesión isquémica aberrante, las células gliales (CM y astrocitos) pueden exacerbar el crecimiento de los vasos y contribuir a la progresión de la retinopatía (26-28).

Otro aspecto relevante de las CM es su potencial uso para generar neuronas de reemplazo, lo cual constituye un activo campo de estudio en el área de los desórdenes neurodegenerativos retinales (29). Sin embargo, las dificultades encontradas en trasplantes de estas células, sugieren el desarrollo de mejores estrategias que incrementen las propiedades regenerativas de las CM así como su supervivencia y funcionalidad.

### *Gliosis.*

El término gliosis hace referencia al estado de activación de las CM caracterizado por cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos luego de una injuria. Este proceso tiene como fin proteger el tejido retinal de un daño mayor, promover la reparación y ayudar a la remodelación del mismo. Uno de los primeros indicios es el aumento en la expresión de filamentos intermedios como GFAP y vimentina (30) mientras que otros cambios observados en las CM son la hipertrofia y su proliferación (13).

Las causas que inician esta activación son independientes de su efecto final, pudiendo conducir tanto a procesos degenerativos como protectivos para la retina:

- Si la injuria produce una proliferación masiva de las CM, las uniones CM-neuronas se ven afectadas y comienza la degeneración. Aun un estado de gliosis conservativa (con bajo nivel de proliferación) puede también conducir a neurodegeneración.
- Además en situaciones injuria, las CM son capaces de sintetizar factores inflamatorios que atraen monocitos/macrófagos y células de la microglia a las áreas afectadas, incrementando así la respuesta inflamatoria (31, 32).
- Pero también las CM pueden proteger a las neuronas de la muerte celular, sintetizando factores como bFGF y FGF-2 que son neurotróficos para los fotorreceptores (33, 34), secretando antioxidantes (35) y fagocitando desechos celulares y proteínas derivadas de la sangre (36).

#### - **Muerte celular en la retina.**

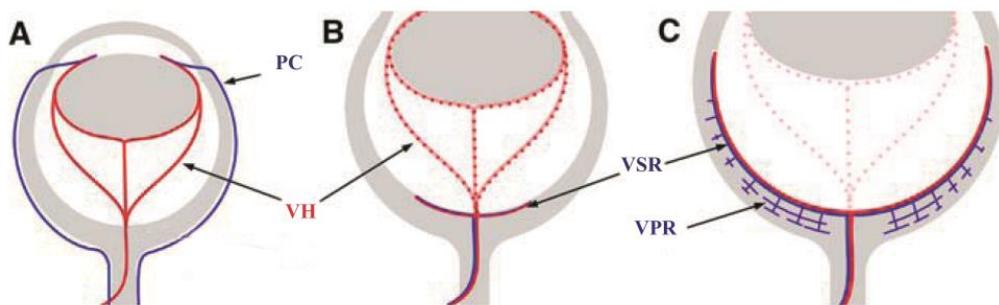
Si bien la definición de muerte celular es un concepto que fue descrito hace varios años, la definición exacta sobre las maneras y vías por las cuales esta se produce ha variado a lo largo del tiempo. En la actualidad se han desarrollado diversas clasificaciones de la misma a medida que el desarrollo en esa área avanza. De acuerdo con lo publicado por el Comité de Nomenclatura en Muerte Celular, NCCD (del inglés Nomenclature Committee on Cell Death), existen hasta el momento 13 vías de muerte celular regulada identificadas (37). Entre estas se incluye a la autofagia, apoptosis, netosis, necroptosis y piroptosis. Uno de los mayores cambios en el concepto de muerte celular fue el que la describía como un proceso pasivo (38). La apoptosis y la necroptosis son los tipos de muerte celulares más importantes y por lo tanto más estudiados (39), de los cuales la apoptosis puede ser fácilmente identificada mediante técnicas establecidas, como la técnica de TUNEL (del inglés *terminal dUTP Nick End Labelling*).

El estudio del proceso de muerte celular en la retina se encuentra en constante avance. Si bien se han descrito varios tipos de muerte celular para los diversos tipos celulares en la retina, no se han profundizado en los mecanismos por los cuales se producen ni en los eventos que los desencadenan. Hasta el momento han sido evidenciados los siguientes mecanismos de muerte celular en distintos modelos de patologías retínales: *apoptosis extrínseca e intrínseca* para las células endoteliales, pericitos, CG(40), amacrinas y conos(41); *necrosis* para pericitos; *pyroptosis* para CM (41); y *autofagia* para CG, fotorreceptores y RPE (42). Cabe destacar que el proceso de

muerte celular en la retina también ocurre como un evento fisiológico del desarrollo retinal que ha sido estudiado también para los múltiples tipos celulares de la retina (43).

## - **Vascularización retinal**

La retina es el tejido humano con mayor consumo de oxígeno y glucosa, por lo cual su abastecimiento debe ser muy eficiente y bien estructurado (44). Este tejido presenta dos plexos vasculares principales. Por un lado: a) los capilares coroideos que bañan la parte más interna de la retina neural (los fotorreceptores) y por otro b) la vasculatura retinal que es la encargada de nutrir al resto de la retina neural. En este trabajo solo nos referiremos a la vasculatura retinal, que es sobre la cual se enfoca este estudio.



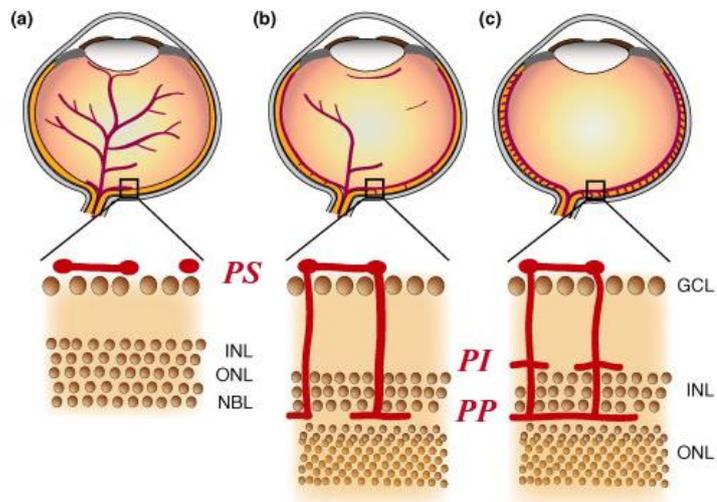
**Figura 6: Diagrama del desarrollo y remodelamiento de la vasculatura retinal:** A, la vasculatura hialoidea (VH) está constituida por una arteria hialoidea que ingresa al ojo por el nervio óptico y sale por la parte anterior del globo ocular, drenando en la vasculatura coroidea (VC); B, la vasculatura hialoidea regresa a medida que plexo vascular superficial retinal (VSR) se desarrolla; C, el plexo vascular profundo retinal (VPR) se genera a partir de venas del plexo superficial. Modificado de Fruttiger M., 2007.

Inicialmente, la retina neural es mantenida metabólicamente por la vasculatura hialoidea. Esta vasculatura primitiva, compuesta solo por arterias, envuelve todo el humor vítreo e ingresa al ojo por el nervio óptico como arteria central hialoidea (**Figura 6**). En las últimas etapas del desarrollo ocular esta vasculatura se oblitera y es reemplazada por la vasculatura retinal. Este cambio ocurre en los humanos hacia la mitad de la gestación y en ratones alrededor del nacimiento. La nueva vasculatura retinal compuesta de arterias y venas, también emerge por el nervio óptico y se distribuye por la NFL, para luego ingresar a las dos capas plexiformes y formar tres plexos vasculares bien definidos (45).

Para que la retina neural cumpla sus funciones de manera adecuada se necesita un desarrollo vascular organizado y sostenido en el tiempo. Al respecto, la vasculatura retinal da origen, de manera muy reproducible y conservada, a tres plexos vasculares: el plexo superficial (PS), el intermedio (PI) y el profundo (PP) (**Figura 7**). En mamíferos, la retina generalmente se vasculariza de manera muy similar entre las diferentes especies, comenzando en humanos en el segundo trimestre y finalizando su desarrollo hacia el nacimiento. En la mayoría de especies no primates, la retina es avascular al momento del nacimiento y su desarrollo se completa en las primeras semanas luego del mismo. En relación a los primates, estos presentan una diferencia importante respecto a los no primates que es la presencia de macula, una zona avascular con un alto número de conos, en donde ocurre la visión central (46).

Para que la vasculatura retinal se desarrolle, se requiere la presencia de un molde o *template* de astrocitos preexistentes, que también emergen desde el nervio óptico (47). Se conoce que los astrocitos migran por la superficie de la retina a medida que proliferan, proceso que es controlado por el factor de crecimiento derivado de plaquetas (del inglés, PDGFA) secretado por las células ganglionares. Una vez que estos astrocitos alcanzan el número indicado, relativo al número de neuronas, y además han migrado hasta la periferia retinal, cesan su proliferación. Allí su fenotipo característico es una baja expresión de GFAP, altos niveles de vimentina y un aumento en la síntesis de VEGF, producto de la hipoxia que experimentan durante este proceso. Una vez que ellos son recubiertos por los nuevos vasos, la expresión de GFAP aumenta mientras que vimentina y VEGF disminuye (48). Este VEGF, sintetizado por astrocitos y CM, posee un rol muy importante en el desarrollo vascular retinal debido a que presenta un gradiente de expresión dentro de la retina, el cual guía el desarrollo de la vasculatura. Existen tres isoformas de VEGF-A siendo VEGF<sub>165</sub> el que posee un rol preponderante. Este, junto a la R-caderina que media la adhesión celular, son esenciales para guiar los vasos del plexo superficial (47), pero además existen otros factores de crecimiento como el IGF-1 y el FGF que también participan en la generación y maduración de los vasos retinales (46).

A diferencia de otros tejidos, después de un largo debate, se ha llegado al consenso de que la vasculatura retinal se forma en su mayoría mediante el proceso de angiogénesis (46). Este proceso involucra la generación de nuevos vasos a partir de la proliferación de CE pre-existentes (48) mientras que en la vasculogénesis un progenitor endotelial se diferencia para dar origen a nuevas CE (49).



**Figura 7: Esquema del desarrollo espacial y temporal de los distintos plexos vasculares de la retina.** La retina posee tres plexos vasculares que pueden ser bien identificados. El plexo superficial (PS) es el primero en formarse; cuando el PS termina su desarrollo comienza a formarse el plexo profundo (PP); y luego de que este último se encuentra llegando a la periferia retinal comienza la formación del plexo intermedio (PI). Modificado de Ye X y col. 2010 (50)

Mientras la retina termina su desarrollo, también lo hace su vasculatura. El plexo superficial se ramifica e internaliza en la retina para formar cronológicamente los plexos profundo e intermedio, de manera paralela al superficial. Al formarse estos nuevos vasos, la degradación proteolítica de la matriz extracelular es secundada por la migración y proliferación de las CE y en mamíferos estos plexos comienzan a formarse cuando los superficiales han llegado a la periferia retinal. La formación de estos plexos también obedece a un gradiente de VEGF. Las CE en esta etapa migran en profundidad utilizando los procesos celulares y la característica estructura radial de las CM (45).

Además, junto con los atrociitos, las CM generan y dan estabilidad a la barrera hemato-retiniana. La retina presenta dos barreras: una interna formada por las CE y sus uniones intercelulares y una externa formada por el RPE. Ambas son las encargadas de proveer el sustento para la actividad retinal (51, 52).

### *Neovascularización retinal.*

El proceso de neovascularización (PNV) puede ser fisiológico, durante el desarrollo de la vasculatura retinal, o patológico cuando en enfermedades retinianas conduce a la pérdida de la visión. La generación de estos vasos dentro de la retina, pueden pasar de ser simples “*anormalidades micro vasculares intraretinales*” (IRMA) a ser procesos mayores “*neovasos retinales*” (NV), cuando su crecimiento se produce en la superficie de la retina hacia el humor vítreo. Estos NV son tortuosos, dilatados y poseen uniones celulares débiles, por lo cual producen una pérdida de plasma hacia el vítreo. Estas pérdidas de plasma pueden generar que el vítreo se contraiga, degenera y eventualmente colapse, mientras que su efecto sobre la retina puede ser el desprendimiento de la misma. Diversas patologías retinales convergen en esta NV. Entre ellas, las de mayor incidencia mundial son la Retinopatía Diabética (del inglés, DR), la Retinopatía del prematuro (del inglés, ROP) y la oclusión de la vena central de la retina (del inglés, RVO). Este crecimiento anormal de vasos es producido por una isquemia retinal, por lo que estas enfermedades son denominadas retinopatías isquémicas proliferativas (53).

Se conoce que la hipoxia o isquemia (54, 55) es el estímulo inicial que desencadena una serie de efectos como el aumento en la expresión de diversos factores de crecimiento, integrinas, y MMPs que van a permitir la proliferación y migración de las CE constituyentes de estos NV. Este crecimiento anormal de NV se produce fundamentalmente por un desbalance entre factores pro-angiogénicos (VEGF, bFGF, PDGF) y anti-angiogénicos (PEDF, TGF $\beta$ , Angiostatina, TIMP), entre otros (56). Este mecanismo es, en la actualidad, el mejor estudiado (**Figura 8**). Sin embargo otros factores considerados independientes de hipoxia, como IGF-1, también participan en este proceso. Es por ello, que resulta interesante evaluar la participación de este factor, el cual depende del estado metabólico del individuo, en el proceso de NV retinal.

# Mecanismo de Neovascularización Retinal

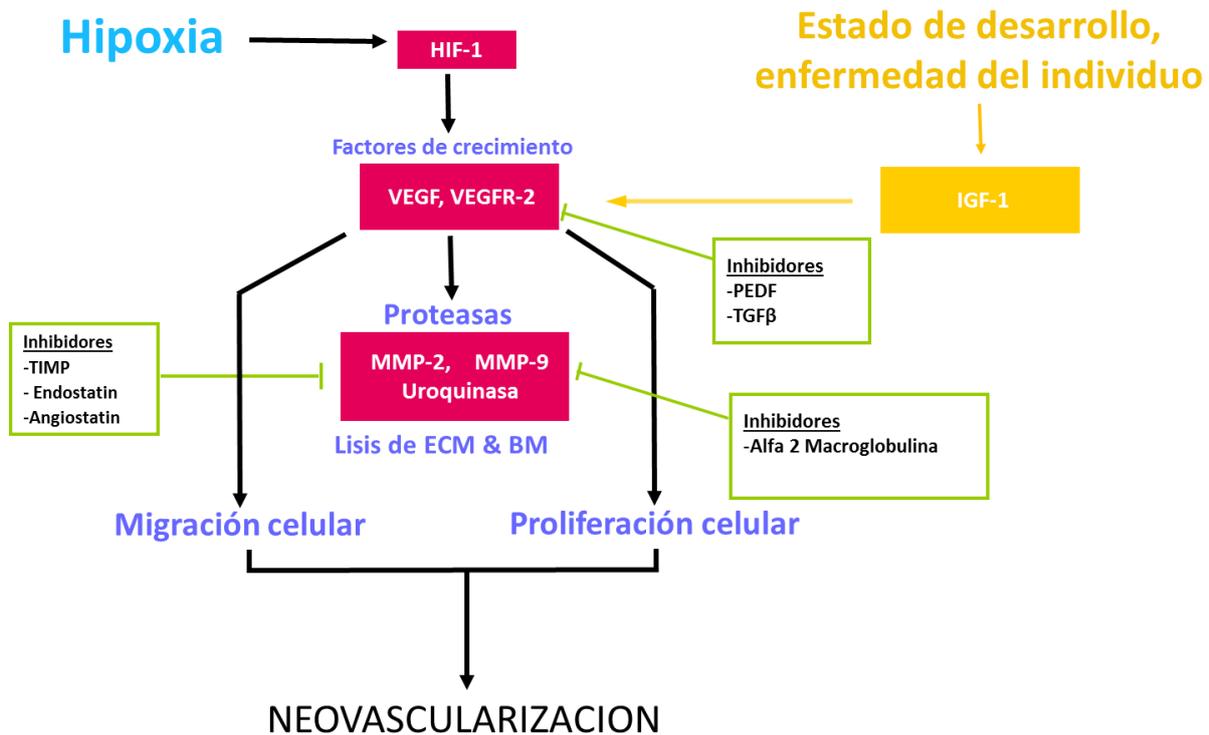


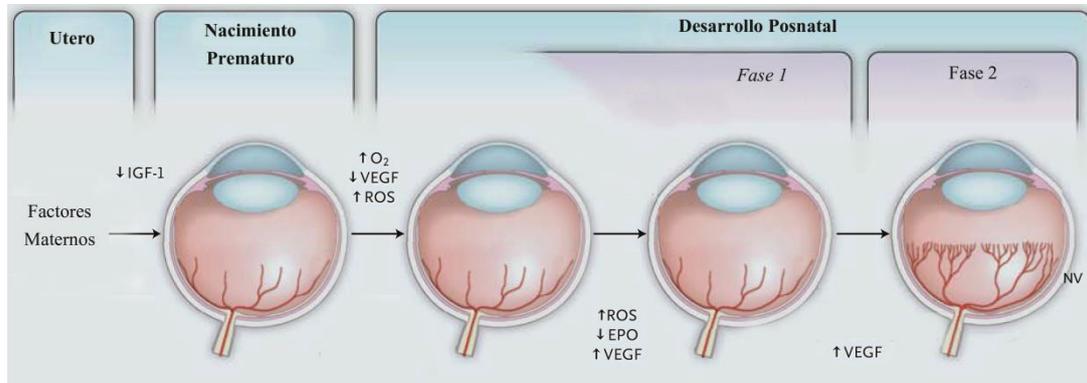
Figura 8: Esquema de los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el proceso de neovascularización retinal. Modificado de Das A., 2003.

## - Retinopatías

### *Retinopatía del Prematuro (ROP)*

La ROP es una retinopatía vasoproliferativa (NV) donde hay una detención del crecimiento vascular, y luego una anormal maduración de los mismos. Es una patología prevenible que afecta la visión de infantes nacidos antes de término. Estos niños prematuros poseen una vasculatura retinal que aún no ha concluido el desarrollo. Entre los factores de riesgo asociados a esta retinopatía se encuentran el bajo peso al nacer, el estado de prematurez y una exacerbada oxigenoterapia. Un artículo publicado en Archivos Argentinos de Pediatría en 2012 demuestra que en el período 2008-2010, nacieron y egresaron de las unidades neonatales de los Hospitales Públicos de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, 1169 prematuros (con peso medio 1.079 g y edad gestacional promedio 29 semanas). De ellos, 106 (el 13,4%) requirieron tratamiento con láser por ROP severa

(57), por lo que esta patología sigue siendo la principal causa de ceguera en la infancia no sólo en nuestro país, sino en el mundo entero (58).



**Figura 9: Diagrama del desarrollo de la ROP.** Dos fases han sido descritas en esta patología: la primera fase se caracteriza por un daño oxidativo, una regulación negativa de factores de crecimiento como IGF-1 y VEGF, y un aumento de factores antiangiogénicos como PEDF, lo que conlleva a un cese en el crecimiento de los vasos retinales. La segunda fase presenta una hipoxia relativa, con aumento de IGF-1 y VEGF además de un incremento de especies reactivas del oxígeno, que producen la proliferación neovascular excesiva característica de esta patología. Modificado de Hartnett y Penn, 2012.

Desde un primer momento, la ROP fue descrita como una patología de dos fases: la primera involucra un arresto en el desarrollo vascular fisiológico producido por hiperoxia, y la segunda, una vaso proliferación patológica inducida por una hipoxia relativa (**Figura 9**) (59). El inicio de la primera fase se produce cuando el prematuro en la incubadora, es expuesto a concentraciones de oxígeno mayores a las fisiológicas (aproximadamente 100 mm Hg). Esta hiperoxia produce una disminución en la síntesis de VEGF así como de sus receptores (VEGFR-1/flt-1 y VEGFR-2/flk1) en la retina, además de un incremento en las concentraciones de ácidos grasos oxidados producto del aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS). A esto se suma la disminución de niveles de IGF-1, el cual durante el desarrollo embrionario era provisto por la placenta de la madre (60). Luego que el prematuro sale de la incubadora y de las condiciones de hiperoxia, comienza la segunda fase caracterizada por la proliferación de neovasos inducida por la hipoxia relativa. Esta hipoxia produce la activación del factor inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), el cual a su vez induce la expresión de VEGF (61). Posteriormente, entran en juego factores no regulados por el oxígeno como IGF-1. En esta fase, IGF-1 comienza a aumentar debido al proceso de madurez que ha sufrido el prematuro. Se conoce que para que VEGF pueda ejercer su función angiogénica es necesaria una determinada concentración de IGF-1, por lo cual altos niveles de ambos factores

conducen a la NV característica de la ROP (56). Actualmente, la prevención de esta patología continua siendo un desafío en las áreas de neonatología por lo cual en estos próximos años las estrategias dependerán no sólo de la optimización de la oxígeno terapia sino también de la nutrición y la normalización de las concentraciones de factores tales como IGF-1 y ácidos grasos poliinsaturados como  $\omega$ -3, con el fin de promover el crecimiento normal y la supresión del desarrollo NV en estos prematuros (62).

### *Retinopatía Diabética*

La DR es la complicación microvascular más común de la Diabetes causada por el deterioro de los vasos sanguíneos que irrigan la retina (63). La Organización Mundial de la Salud estima que la DR produce casi 5% de los 37 millones de ciegos del mundo (64). Según un artículo publicado en el Diario La Nación (2012), en Argentina se estima que hay 2 millones y medio de personas con diabetes por lo que la proyección para el año 2020 alcanzaría a 4 millones de argentinos, con una prevalencia del 9,6%.

Entre los factores que participan en la DR, la hiperglucemia e hipoxia aparecen como los estímulos desencadenantes, al promover la activación de factores pro-angiogénicos que conducen a la NV.

Desde el punto de vista clínico, la DR tiene dos fases: la primera, no proliferativa (NPDR), presenta una permeabilidad vascular aumentada y hemorragias intrarretinales y la segunda o fase proliferativa (PDR), es caracterizada por la NV retinal. Esta última suele ir acompañada de pérdida de visión inevitable (65) por lo cual el tratamiento convencional es la fotocoagulación panretinal (del inglés, PRP), que si bien disminuye al 50% la pérdida de la visión, deja secuelas sobre el campo visual periférico, la sensibilidad al contraste y la visión nocturna.

Aunque los enfoques actuales para prevenir y /o tratar la DR incluyen la optimización del control de la glucosa en sangre (66), si la diabetes se diagnostica después de que las complicaciones se han desarrollado, resulta difícil la realización de un tratamiento preventivo. Por lo tanto, además del control de glucemia existe la necesidad de explorar nuevas estrategias terapéuticas. En este sentido varios ensayos clínicos fueron iniciados, muchos de los cuales están en curso (67-69). Sin embargo, aunque los resultados de estos ensayos mejoran el pronóstico de la DR, todavía no hay tratamientos curativos disponibles (70). En este sentido además de la PRP, las inyecciones

intravítreas de antiangiogénicos o la cirugía (vitrectomía) (71), la participación de los sistemas proteolíticos (serino y MMPs) en estas patologías, constituye hoy un nuevo desafío terapéutico.

### *Retinopatía Inducida por oxígeno (OIR) en ratones, un modelo animal.*

A fin de conocer los mecanismos bioquímicos y celulares que desencadenan estas retinopatías se cuenta con modelos animales que reproducen el proceso de la NV. Uno de los modelos utilizados es el de OIR (**Figura 10**), el cual será caracterizado en este trabajo de tesis.

A diferencia de lo que ocurre en humanos, los ratones al nacer, poseen una retina inmadura, no completamente vascularizada y con presencia de vasculatura hialoidea (72). Esto indica que la regresión de la vasculatura hialoidea y el desarrollo de la vasculatura retinal se producen de manera muy regulada posterior al nacimiento, lo que otorga una ventaja para el estudio e intervención del proceso de vascularización retinal en estos animales. Experimentalmente, el efecto vaso-atenuante de la hiperoxia en la retina neonatal con la posterior NV, se utilizó para generar modelos animales de retinopatías isquémicas. La respuesta NV obtenida ha sido muy consistente, reproducible y cuantificable; y se ha convertido en parte integral del estudio de los mecanismos de la enfermedad y posibles tratamientos para la retinopatía isquémica. Si bien, diferentes especies animales fueron utilizadas para reproducir la OIR, el ratón se destaca por ser económico, fácil de manejar y por poseer una amplia variedad de modificaciones genéticas así como fácil disponibilidad de anticuerpos para los diferentes estudios. Una diferencia importante de este modelo es el hecho de que en ratones, los vasos centrales de la retina, obliteran y desaparecen durante la exposición a hiperoxia. Esto es diferente de lo que ocurre en humanos donde los vasos afectados pertenecen a la retina periférica. A pesar de esta diferencia fundamental, el modelo de OIR en ratón reproduce muy de cerca no sólo los eventos patológicos críticos de la ROP, sino también de la retinopatía diabética proliferativa (RDP) (73). Diferentes cepas de ratón han sido utilizadas para reproducir este modelo, pero debido a que las respuestas NV son diferentes en cada una de ellas, el modelo en C57BL/6 es el mejor estandarizado. En retina normal de ratones, el plexo vascular superficial se forma durante la primera semana del desarrollo, llegando a la periferia retinal alrededor del día postnatal 8 (P8). Desde el día P7 en adelante, los vasos comienzan a migrar en profundidad para formar el plexo profundo primero y luego el intermedio. El plexo profundo llega a la periferia cerca del día P12, el intermedio entre el P12 y el P15 y hacia el final de la tercera semana los tres plexos vasculares ya se encuentran completamente formados (74). Cuando estos animales son

introducidos en el día posnatal 7 (P7) en un ambiente de hiperoxia (75% de Oxígeno) se produce una obliteración vascular y una regresión de los capilares inmaduros de la retina central, generando una zona avascular. Como esta etapa de hiperoxia se solapa con el comienzo del desarrollo de los plexos más profundos, estos crecen de manera anormal, modificando sus características fisiológicas. La retina continua su maduración pero sin el soporte vascular, por lo cual, cuando los animales son devueltos en el P12 a las condiciones de aire normal (21% de Oxígeno), este nuevo ambiente es censado como un ambiente hipóxico, activando todas las vías dependientes de HIF-1 $\alpha$  (75). Cabe destacar que en este modelo el pico de NV se produce hacia el P17 y en esta cepa los ratones son capaces de resolver esta situación regresando los NV y desarrollando una vasculatura normal hacia el P25. Sin embargo, pese a ello la retina muestra signos de apoptosis neuronal con posterior degeneración retinal. Este modelo ha permitido identificar factores claves tanto para el desarrollo vascular fisiológico como patológico, entre ellos VEGF, IGF-1 y eritropoyetina (74).

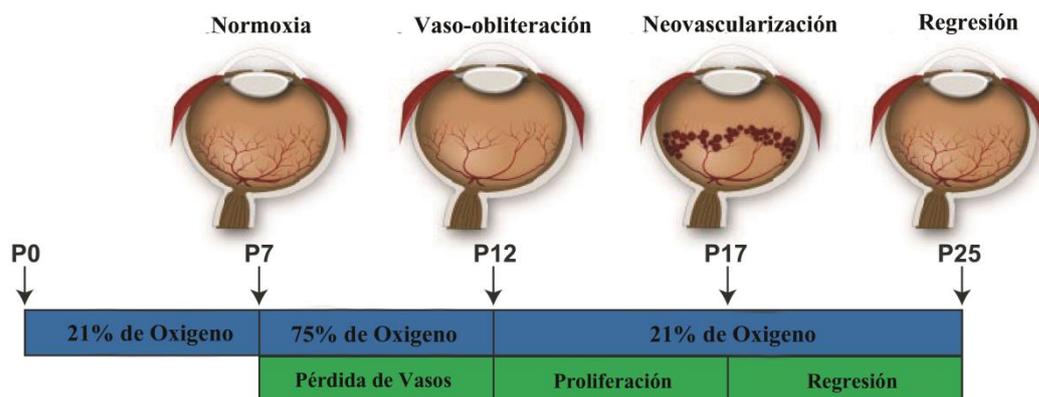


Figura 10: Diagrama del desarrollo espacial y temporal de los eventos vasculares que produce el modelo de Retinopatía Inducida por Oxígeno. Modificado de Stahl y col. 2010.

### - Metaloproteinasas y su rol en la neovascularización.

Las MMPs constituyen una familia de endopeptidasas, que poseen en sus sitio activo un átomo catalítico de metal, generalmente zinc y muestran una elevada homología estructural y de secuencia entre todos los integrantes de la familia. Hasta el momento han sido descritos 23 miembros de la familia que comparten similares componentes estructurales y funcionales (76). A esta gran familia de MMPs la podemos subdividir en dos grandes grupos en base a su localización celular: las MMPs de membrana (MT-MMPs) y las MMPs secretadas (MMPs). Dentro de estas

últimas podemos identificar, de acuerdo a su estructura y especificidad de sustrato, a las colagenasas (MMP-1, MMP-8 y MMP-13), gelatinasas (MMP-2 y MMP-9), estromelinas (MMP3-, MMP-10 y MMP11), y matrilisinas; mientras que entre las de membrana tenemos al menos 6 tipos diferentes (MT1-MT6-MMP)(77, 78).

La regulación de la actividad de MMPs tiene lugar al menos a tres niveles principales: transcripción, activación pro-enzimática e inhibición de la actividad (79). Con respecto a este último, la actividad proteolítica de las MMPs es controlada fisiológicamente por varios inhibidores, siendo los más importantes los denominados “inhibidores tisulares de las MMPs” (TIMPs del inglés *tissue inhibitors of MMPs*) (78). Además, existen otros inhibidores de amplio espectro como la  $\alpha_2$ -macroglobulina. La inhibición específica de las MMPs en el medio extracelular la ejerce la familia de los TIMPs (TIMP-1 a -4) formando complejos estequiométricos 1:1 no covalentes con las enzimas y bloqueando de esta manera su actividad proteolítica de manera reversible (80). Además de la función inhibitoria de MMPs, se conoce que TIMP-2 participa en la activación de la proMMP-2, formando un complejo trimolecular con MT1-MMP en la membrana celular (81).

Cambios en los niveles de TIMPs resultan relevantes en las condiciones patológicas asociadas a exacerbada actividad proteolítica de MMPs ya que estos inhibidores regulan directamente esta actividad en el medio extracelular. En este sentido, las MMPs se encuentran involucradas en procesos tan diversos como los de reparación de tejidos, inflamación, señalamiento intracelular, invasión y NV (82). Resultados previos de nuestro grupo así como de otros autores, han demostrado una aumentada actividad y expresión de MMP-2 en modelos de OIR (83-88). Sin embargo, los estudios que examinan el papel de MMP-9 y MMP-2 en la NV retinal han sido contradictorios (85, 86). Recientemente, ha sido demostrado que la MMP-9 se requiere para la liberación de células progenitoras endoteliales (EPC) de medula ósea, que son esenciales para el desarrollo de NV (37), lo cual indicaría que MMP-9 no tiene un rol directo en la enfermedad NV retinal.

En cuanto a los estudios en humanos, pacientes con RDP presentan elevada expresión de MMPs en tejido NV de la retina así como en humor acuoso (89-96). En este sentido, resultados propios demuestran que en humor vítreo MMP-2 está aumentada en pacientes con RDP independientemente de si los mismos tenían o no tratamiento previo con PRP. Esto sugiere que MMP-2 es un blanco terapéutico para prevenir la NV en retinopatías, incluso en pacientes que han recibido tratamiento preventivo.

A pesar de la importancia del rol de las MMPs en la progresión de enfermedades neovasculares, existe al presente, escasa información sobre la regulación de la expresión y actividad de las mismas en las enfermedades de la retina.

- **Factor de crecimiento símil insulina tipo 1 (IGF-1).**

El factor de crecimiento símil-insulina tipo 1 (IGF-1), también conocido como somatomedina C (97), es una hormona polipeptídica con efectos endócrinos, parácrinos y autócrinos (98). Aunque se produce en múltiples tejidos, más del 90% circulante es de síntesis hepática, como resultado de la estimulación de la hormona del crecimiento (GH). Esta hormona junto a los factores IGF-1 y IGF-2 desempeñan un rol importante en el crecimiento y desarrollo celular durante la etapa embrionaria, fetal y postnatal del ser humano. Dado que IGF-1 es un factor anabólico regulado por el estado nutricional del individuo, cualquier estado de desnutrición u obesidad puede modificar los niveles circulantes del mismo (99). Si bien ha sido demostrado que IGF-1 es importante para la regulación de la fisiología normal, la desregulación del factor ha sido también asociada con la estimulación del crecimiento y supervivencia de células cancerosas .

Además de los ligandos IGF-1 y -2, la familia de IGF está constituida por seis proteínas de unión a ellos (IGFBP-1 a 6), y cuatro receptores de superficie celular que median la acción de los ligandos, el receptor de IGF-1 (IGF-1R), el receptor de IGF-2 (IGF-2R), el receptor de insulina (IR) y los denominados receptores híbridos (**Figura 11**) (99-101).

Si bien ambos factores (IGF-1 y IGF-2) poseen roles importantes durante el crecimiento y desarrollo, IGF-2 ejerce su actividad primordial en las primeras etapas del mismo mientras que IGF-1 lo ejerce durante todo el periodo de vida de un individuo. Es de destacar que las acciones biológicas de los IGF, están moduladas por las proteínas de unión, también denominadas proteínas transportadoras, las cuales regulan la biodisponibilidad de los IGF en circulación y la interacción con sus receptores. Estas proteínas poseen funciones independientes de los factores de crecimiento que transportan. La similitud estructural entre los factores de crecimiento (IGF-1, IGF-2 e Insulina) (102) también se ve reflejada en la similitud que existe entre los receptores de los mismos (103), razón por la cual estos pueden formar heterodímeros, además de los homodímeros clásicos. Estos receptores híbridos pueden unir a los diferentes factores de esta familia con mayor o menor afinidad.

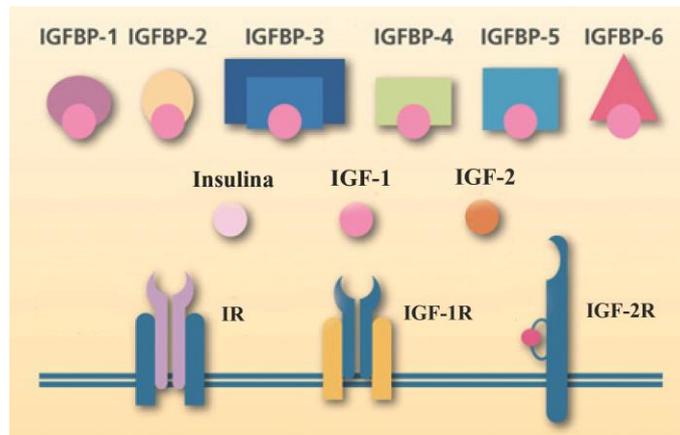


Figura 11: Esquema representativo de las proteínas de la familia IGF-1 e Insulina. Modificado de Livingstone C. 2013

A concentraciones fisiológicas, el principal mediador de los efectos biológicos de IGF-1, es IGF-1R, una proteína de transmembrana con actividad tirosina cinasa. Por el contrario, IGF-2R al carecer de este dominio transmembrana parecería estar sólo involucrado en la depuración de IGF-2, regulando los niveles extracelulares del mismo.

Estructuralmente, IGF-1R es un heterotetrámero compuesto por dos subunidades  $\alpha$  y dos  $\beta$ , con una homología de secuencia del 70% con el IR (103). Además, como es un receptor que pertenece a la familia de los receptores tipo tirosina cinasa (RTK) (104), luego de su unión al ligando (IGF-1) se activa la actividad tirosina cinasa intrínseca del receptor, lo que conlleva a su autofosforilación y la fosforilación de diversas proteínas intracelulares, entre las que se incluye la familia de sustratos específicos del receptor de insulina (IRSs) y de proteínas homólogas a Src (Shc). Luego estos sustratos por medio de sus residuos fosforilados reclutan a proteínas efectoras para la activación de dos vías principales: la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K/AKT) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK) (Figura 12). También han sido descritas otras vías alternativas de activación inducidas por IGF-1 como las Janus cinasas (JAKS), entre otras.

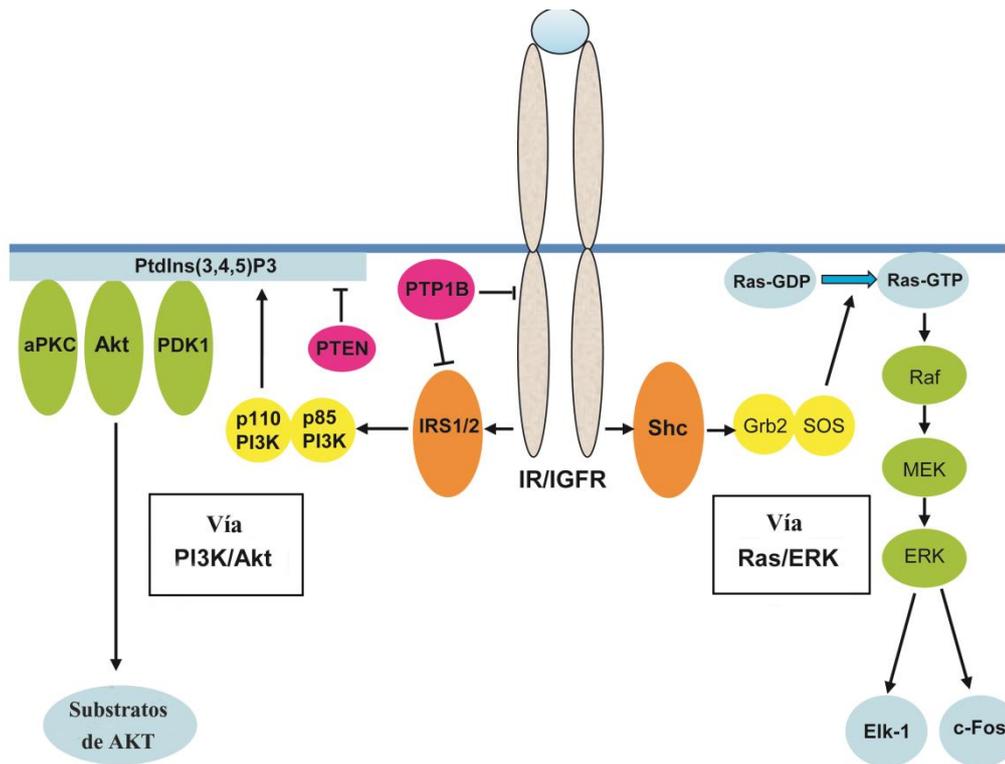


Figura 12: Esquema de las vías de señalamiento y proteínas involucradas en la señalización intracelular de los receptores de Insulina y de IGF-1R. Modificado de Desbuquois B. y col., 2013.

- *El rol del sistema IGF-1/IGF-1R en el proceso de neovascularización retinal.*

Como se comentó anteriormente diversas patologías causantes de pérdida de visión, como la ROP y PDR ocurren debido a una proliferación vascular anormal. Esta NV patológica implica la acción de factores que también participan en el desarrollo vascular fisiológico (105). Uno de ellos es IGF-1 (106), del cual al presente, no queda clara la contribución local respecto a la sistémica en referencia al crecimiento normal y patológico de los vasos retinales. Es por ello que, numerosas investigaciones en la actualidad, buscan comprender la relación entre este factor de crecimiento y las patologías retinales en las cuales se encuentra implicado.

De los miembros de la familia IGF, IGF-1 es el factor mejor estudiado. Su expresión proteica ha sido demostrada en CM y células ganglionares de retinas inmaduras de rata (107, 108) mientras que en retinas maduras de ratón fue observada en la mayoría de las capas celulares.

Con respecto a modelos animales de OIR, es aquí donde se ha encontrado la mayor área de estudio para toda la familia IGF. La expresión de IGF-1, IGF-2, Insulina y sus receptores ha sido demostrada predominantemente en fotorreceptores y con menor intensidad en vasos y demás

capas de la retina, siendo la expresión de IGF-1R 100 veces mayor a la de IR (109). Con respecto a las proteínas transportadoras, un regulador importante de IGF-1 es IGFBP-3, la cual al ser administrada por vía sistémica en el modelo de OIR, ha producido efectos beneficiosos al promover la revascularización del tejido (110) además de prevenir la muerte de CE (111).

Estudios previos han demostrado que para que VEGF ejerza sus acciones NV (112) es necesario que IGF-1 esté presente en concentraciones adecuadas, lo cual demuestra que si bien VEGF es el mediador clave de la NV, por sí sólo no es suficiente para el desarrollo de la misma. En ROP, durante la primera etapa los bajos niveles de IGF-1 en sangre periférica protegen al neonato de desarrollar NV aun cuando los niveles de VEGF son elevados, mientras que en la segunda etapa la normalización de los niveles de IGF-1 pueden brindar la posibilidad de llegar a la resolución de la enfermedad una vez que esta se ha producido. En Diabetes, pacientes con retinopatía proliferativa han mostrado niveles elevados de IGF-1 en humor vítreo (113, 114), lo cual se correlaciona con la actividad NV de esta retinopatía (115, 116).

Modelos animales que sobre expresan IGF-1 a nivel intraocular, han mostrado que los elevados niveles de este factor en el vítreo producen ruptura de la barrera hemato-retiniana ocular (117), gliosis (118), y otras características patológicas de la RDP (119).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nuestra hipótesis es que IGF-1 y su receptor regula la actividad proteolítica extracelular asociada a eventos de migración y que a través de esta regulación el sistema IGF-1/IGF-1R participa en procesos neovasculares retinales.

## Capítulo II

### *Objetivos*

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto resulta de interés plantearnos los siguientes objetivos:

#### Objetivo General

El objetivo general del trabajo de tesis es estudiar los mecanismos bioquímicos, moleculares y celulares activados por el factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1) al interactuar con su receptor (IGFR-1) en la retina de mamíferos. Dado que a nivel mundial, los problemas relacionados a la visión están adquiriendo dimensiones importantes debido al aumento en la esperanza de vida y considerando las limitaciones de los tratamientos convencionales para dar respuesta a las diferentes retinopatías, este estudio abre una nueva perspectiva relacionada a la elaboración de estrategias terapéuticas que intervengan los procesos neovasculares retinales inhabilitantes para la visión.

#### Objetivos Específicos

Establecer la participación de IGF-1 y de su receptor durante procesos de neovascularización retinal en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*.

Se pretende demostrar:

- En el modelo *in vitro*:
  - I.a) el efecto del Sistema IGF-1/IGFR sobre la producción de metaloproteinasas (MMPs) bajo condiciones de normoxia e hipoxia;
  - I.b) el efecto del Sistema IGF-1/IGFR sobre la migración celular;
  - I.c) los mecanismos moleculares de transducción de señales generados por la interacción de IGF-1 con su receptor, responsables de mediar los eventos moleculares y celulares antes indicados.
  
- en el modelo *in vivo*:

II.a) la expresión, localización y distribución del Sistema IGF-1/IGFR en el tejido retinal normal y en la retina de animales OIR;

II.b) el rol del sistema IGF-1/IGFR en la patogénesis de la neovascularización retinal.

# ***Resultados***

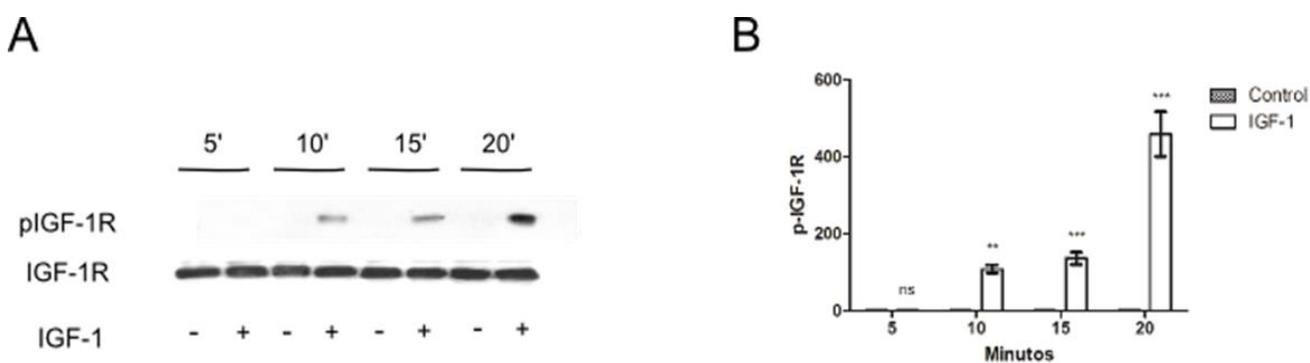
## ***Modelo "In-vitro": Normoxia***

## Mecanismo intracelular de acción de IGF-1

### IGF-1 induce la activación de su receptor y de vías intracelulares de manera específica en células gliales de Müller.

Ha sido demostrado que la unión de IGF-1 a su receptor específico activa, corriente abajo, dos vías principales de señalamiento intracelular: la fosfoinositol 3-cinasa (PI3K/AKT) y las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK/ERK) las cuales pueden potencialmente conducir a dos eventos diferentes como proliferación, supervivencia y diferenciación celular (120). Sin embargo esta activación puede, dependiendo del tipo celular, estar regulada en forma diferencial conduciendo a uno u otro evento, lo cual tiene importantes consecuencias tanto fisiológicas como patológicas demostrando la selectividad del sistema IGF-1/IGF-1R.

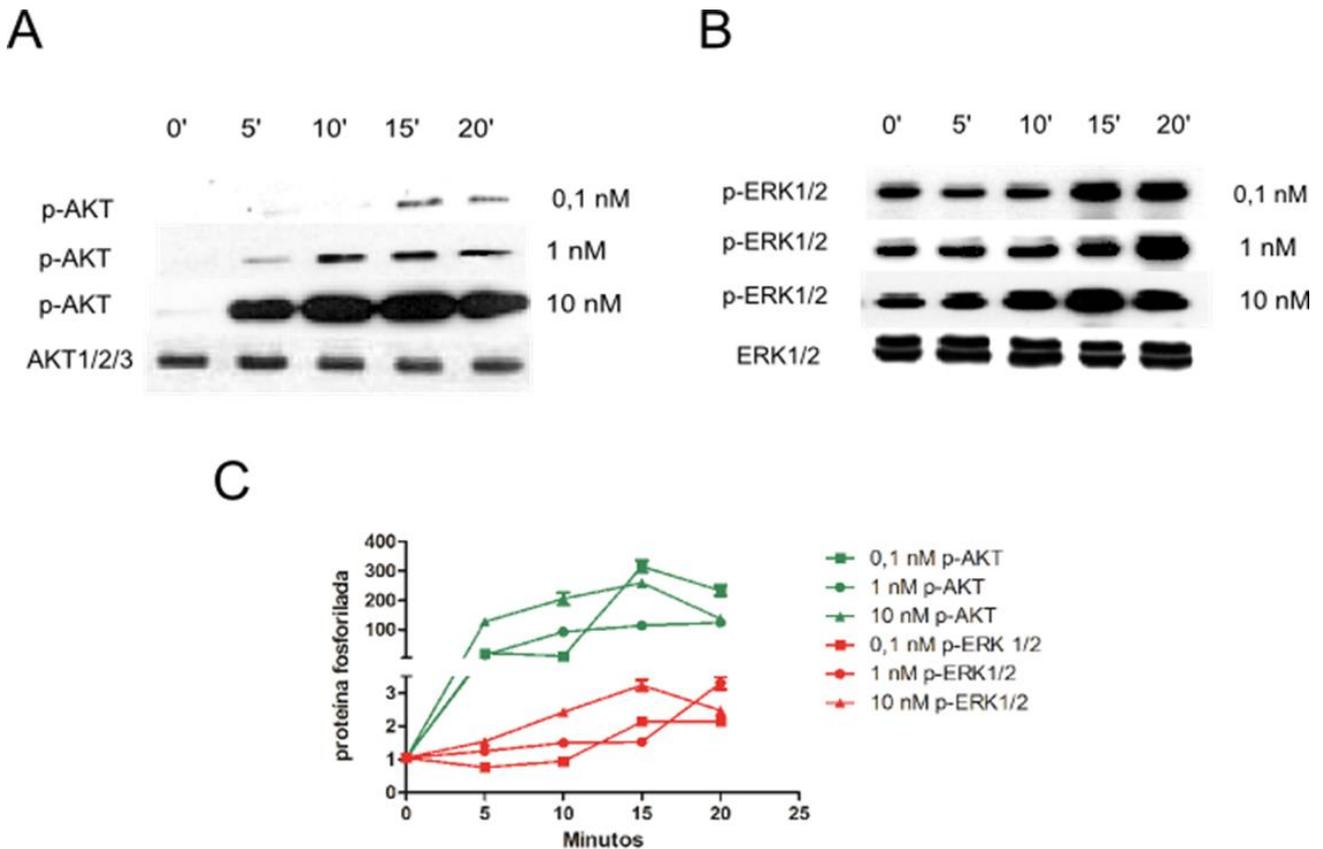
Con el propósito de evaluar si la unión de IGF-1 a su receptor específico en células gliales, era capaz de activar en forma diferencial las vías de señalización intracelular descritas anteriormente, células MIO-M1 fueron estimuladas con IGF-1 10 nM durante diferentes periodos de tiempo (5, 10, 15 y 20 minutos). Para ello, en primer lugar evaluamos por ensayos de Western blot la fosforilación de IGF-1R. La **Figura 3.1** muestra los ensayos representativos correspondientes a la activación del receptor, pudiendo observarse que la incubación de las células con IGF-1 produjo la auto-fosforilación de IGF-1R a partir de los 10 minutos, incrementando la señal con la duración del estímulo. Por el contrario, en el mismo ensayo también pudimos observar que los niveles totales de la proteína IGF-1R no incrementaron a los tiempos evaluados.



**Figura 3.1: IGF-1 induce la fosforilación de su receptor específico en células MIO-M1.** A) Análisis de Western blot de lisados de células incubadas en presencia y ausencia de IGF-1 durante distintos periodos de tiempo (5-20 minutos), utilizando un anticuerpo anti pIGF-1R y anti IGF-1R, respectivamente. B) En el eje y se indica la densitometría en píxeles de cada una de las bandas representativas de pIGF-1R en presencia de estímulo en relación al control respectivo (en ausencia de IGF-1), representando la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Siendo \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p <$

0,001. Los valores de densitometría representativas de IGF-1R no mostraron diferencias significativas en presencia o ausencia de IGF-1.

Una vez que se evidenció la activación de IGF-1R mediante estímulos con IGF-1, fueron evaluadas las vías intracelulares inducidas por el mismo sistema. De manera similar las células en cultivo fueron incubadas a distintos tiempos (0, 1, 5, 10, 15 y 20 minutos) y con tres concentraciones diferentes de IGF-1: 0,1 nM, 1 nM y 10 nM. Bajo estas condiciones la activación de las vías PI3K y MAPK cinasas fueron analizadas mediante la presencia de sus intermediarios fosforilados, p-AKT y p-ERK, respectivamente. La incubación de las células con IGF-1 produjo un aumento significativo de los niveles de AKT y ERK1/2 fosforilados a todas las concentraciones evaluadas (0,1, 1 y 10 nM). Del análisis cuantitativo se desprende que la diferencia más significativa en los niveles de fosforilación se produce en ambas vías a la concentración de 10 nM de IGF-1, a todos los tiempos evaluados. La fosforilación de AKT fue observada a partir de los 5 min de estímulo a la concentración anteriormente mencionada mientras que la fosforilación de ERK se produjo a partir de los 15 min, a la misma dosis (10 nM) (**Figura 3.2 A- B y C**). En el ensayo también se observa un incremento en la fosforilación de los intermediarios de ambas vías a 10 nM a los 15 min, la cual decae a los tiempos sucesivos de estímulo (**Figura 3.2 C**).

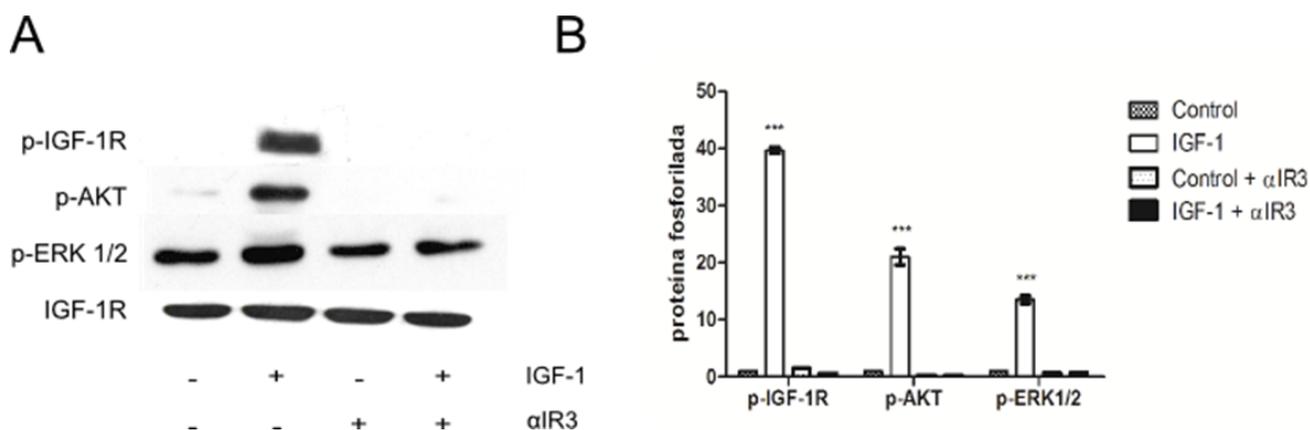


**Figura 3.2. IGF-1 activa en forma diferencial la vía PI3K respecto a MAPK/ERK en células MIO-M1.** Análisis de Western blot de lisados de células incubadas en presencia de diferentes concentraciones de IGF-1 durante distintos tiempos (5-20 minutos), utilizando un anticuerpo anti p-AKT (A) y p-ERK1/2 (B), respectivamente. Análisis cuantitativo de la cinética de activación para p-AKT y p-ERK1/2 (C). En el eje y se indica la relación densitométrica en pixeles de las bandas de p-AKT y p-ERK1/2 a cada tiempo de incubación con IGF-1 respecto a la ausencia de estímulo (t=0 min) representando la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Los valores densitométricos representativos de AKT y ERK1/2 constitutivos no mostraron diferencias significativas en presencia o ausencia de IGF-1. Dado que los controles de carga mostraron homogeneidad de intensidad a cada tiempo evaluado, las relaciones fueron calculadas sin relacionarla a la carga proteica.

Por lo tanto, estos resultados en su conjunto permiten concluir que la unión IGF-1/IGF-1R en CM, activan ambas vías PI3K. Sin embargo, bajo la misma dosis de IGF-1 (10 nM), la vía de PI3K fue activada con más eficiencia que la vía MAPK/ERK.

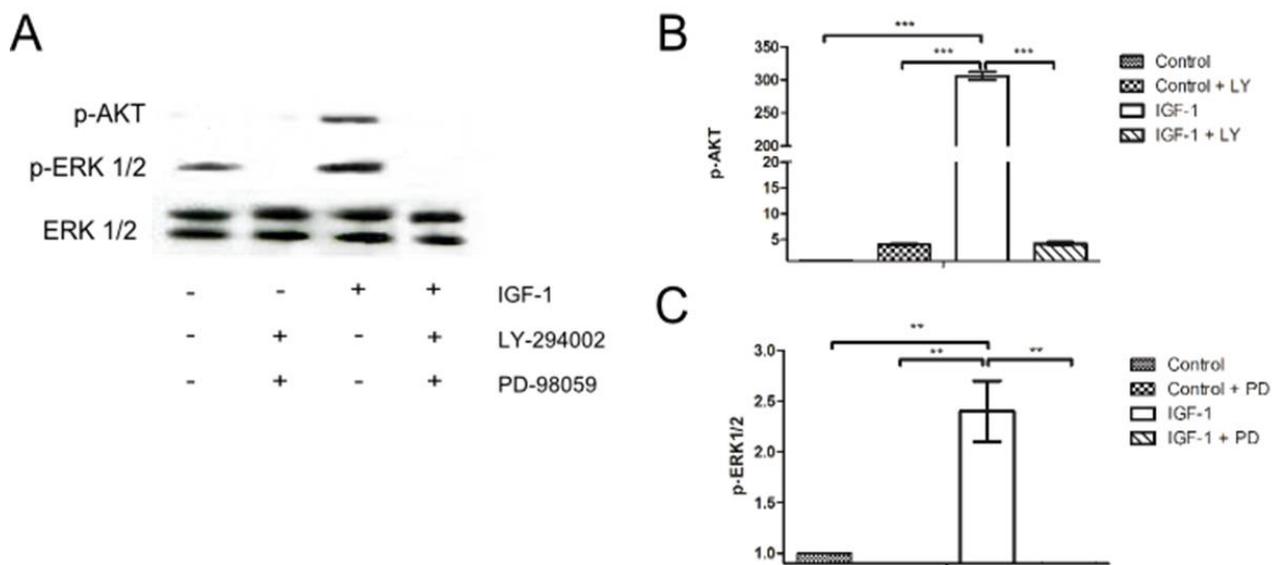
Con el propósito de demostrar si la fosforilación de IGF-1R y la posterior activación de las vías PI3K y MAPK/ERK en células MIO-M1 era una respuesta específica de la unión de IGF-1 a su receptor, utilizamos un anticuerpo de bloqueo,  $\alpha$ IR3, el cual se une específicamente a las subunidades extracelulares  $\alpha$  y  $\beta$  del IGF-1R ( $\alpha$ IR3). En función de los resultados obtenidos anteriormente seleccionamos como concentración y tiempo de trabajo IGF-1 10 nM y 10 minutos

de estímulo. Los resultados de Western blot demuestran que la preincubación de las células con  $\alpha$ IR3 16 nM durante 30 minutos inhibió totalmente la fosforilación de IGF-1R así como la fosforilación de AKT, mientras que los niveles de p-ERK 1/2 fueron disminuidos a nivel del control. Además la preincubación de  $\alpha$ IR3 no produjo por si solo ninguna modificación en los niveles de fosforilación de las moléculas evaluadas (**Figura 3.3 A y B**).



**Figura 3.3. El anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3 disminuye la fosforilación de PI3K y MAPK/ERK inducidas por IGF-1 en células MIO-M1.** **A)** Análisis de Western blot de lisados de células preincubadas o no con el anticuerpo  $\alpha$ IR3, en presencia o ausencia de IGF-1 10 nM, utilizando anticuerpos anti-p-IGF-1R, p-AKT y p-ERK1/2, respectivamente. **B)** Análisis cuantitativo: en el eje y se indica la densitometría en pixeles de cada una de las bandas correspondientes a pIGF-1R, p-AKT y p-ERK1/2, representando la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Siendo \*\*\*  $p < 0,001$ . Los valores de densidad óptica representativas de IGF-1R no mostraron diferencias significativas en presencia o ausencia del anticuerpo de bloqueo.

Considerando los resultados obtenidos con el anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3, el siguiente propósito fue utilizar inhibidores farmacológicos de los mediadores de las vías de señalamiento intracelular, AKT y ERK1/2, a fin de completar el análisis de especificidad de la activación de estas vías mediada por la interacción IGF-1/IGF-1R. Uno de los intermediarios de la vía AKT es la proteína PI3K cuya fosforilación puede ser bloqueada por inhibidores farmacológicos como LY-294002 mientras que en la vía MAPK-ERK1/2, la actividad de la proteína MEK puede también ser inhibida por otro inhibidor farmacológico como PD-980059. Para ello células MIO-M1 fueron preincubadas durante 30 minutos con LY-294002 (10  $\mu$ M) o PD-980059 (20  $\mu$ M) antes del estímulo de IGF-1. Los resultados demuestran que ambos inhibidores redujeron significativamente la fosforilación de AKT y ERK 1/2 inducidas por IGF-1 (**Figura 3.4**), lo cual indica que estas vías de señalamiento están específicamente involucradas a través de la interacción de IGF-1/IGF-1R en células MIO-M1.



**Figura 3.4. Inhibidores farmacológicos inhiben la fosforilación de las vías MAPK/ERK y PI3K inducidas por IGF-1 en células MIO-M1.** **A)** Análisis de Western blot de lisados de células preincubadas o no con 10  $\mu$ M de LY-294002 o 20  $\mu$ M de PD-980059, en presencia o ausencia de IGF-1 10 nM, utilizando anticuerpos p-AKT y p-ERK1/2, respectivamente. **B)** Análisis cuantitativo: en el eje y se indica la densitometría en pixeles de cada una de las bandas correspondientes a p-AKT y p-ERK1/2, representando la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Siendo \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . Como control de carga se utilizó ERK1/2.

### **Regulación de la actividad de MMPs por IGF-1**

Durante los últimos años han surgido un número creciente de publicaciones relacionadas al estudio de mecanismos de degradación proteolítica en el área de tumores, teniendo como principales protagonistas a las MMPs y a diferentes factores de crecimiento (121, 122). Al respecto, ha sido demostrado que IGF-1 a través de su receptor (IGF-1R), controla la invasividad de células tumorales regulando la síntesis de moléculas como MMP-2 y MT1-MMP (123).

A nivel vascular, las MMPs influyen la migración, proliferación y apoptosis de células musculares lisas, endoteliales e inflamatorias participando en eventos más complejos como la alteración de la íntima en aterosclerosis y aneurismas (124), mientras que a nivel ocular tienen también una activa participación durante el desarrollo (125), así como en patologías que involucran NV retinal como la ROP y la RDP (126-129).

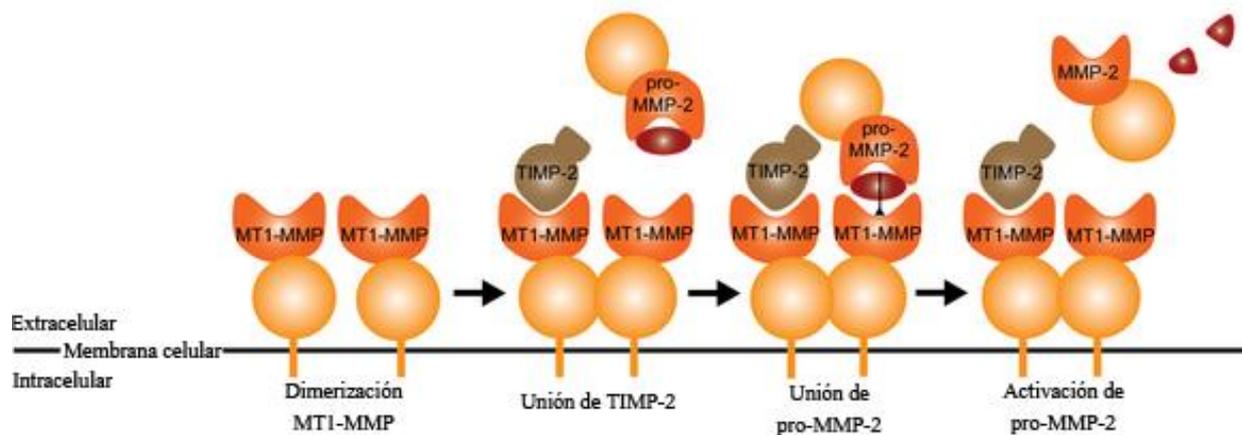
En el modelo de OIR, se ha demostrado el incremento tanto en las formas latentes (pro-) como activas de MMP-2 y -9 (84, 87). Del mismo modo, en pacientes con RD se comprobó la participación de MMPs durante las distintas fases de la enfermedad (87, 88). Pero si bien las MMPs

son de vital importancia para el proceso de angiogénesis y vasculogénesis (130), la inhibición puntual de ellas no ha demostrado tener un efecto claro en los procesos antes mencionados (85, 131). Por esta razón surge la necesidad de tratar de aclarar los numerosos modos de regulación tejidos y célula-específica que posee cada una de ellas.

Resultados propios y de otros autores señalan que en estos desordenes proliferativos, participan factores de crecimiento como IGF-1 y que además las CM son, entre otras, capaces de sintetizar elevados niveles de MMPs (23, 87, 132, 133), por lo que como siguiente propósito, decidimos profundizar el estudio de los efectos de IGF-1 sobre la activación MMPs en un modelo *in vitro* de CM.

***IGF-1 regula el estado de activación de MMP-2 en las células gliales de Müller, mediante la unión específica a su receptor.***

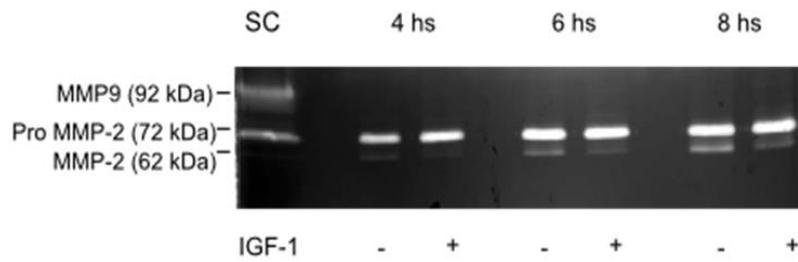
Para lograr un mejor entendimiento de los resultados obtenidos en esta etapa, es necesario destacar que MMP-2 es secretada en el ambiente pericelular como pro-enzima (pro-MMP-2), la cual deber ser activada a MMP-2, mediante ruptura proteolítica del propéptido ubicado hacia el dominio *N*-terminal de la misma. Estas dos formas de MMP-2 poseen distinto peso molecular, 70 y 62 kDa respectivamente, facilitando así su identificación por ensayos de zimografía. Para que el proceso de activación ocurra es necesaria la formación de un complejo trimolecular compuesto por la metaloproteinasa asociada a membrana plasmática, MT1-MMP, el inhibidor endógeno de MMPs, TIMP-2, además de la propia pro-MMP-2. Durante el proceso de activación, el dominio catalítico de MT1-MMP se une al dominio *N*-terminal de TIMP2. Este último con su dominio *C*-terminal se une al dominio hemopexina de la pro-MMP-2 y así por acción de una segunda MT1-MMP, se escinde el pro-péptido de la MMP-2 dando origen a la MMP-2 activa. Cabe resaltar que este mecanismo es uno de los más ampliamente estudiados como principal responsable de la activación de MMP-2, pero existen otros mecanismos alternativos que involucran la asociación de receptores de factores de crecimiento con integrinas ( $\alpha\beta$ ) así como de MT1-MMP también asociado a integrinas (134-136). Finalmente, el estado de activación de esta enzima parecería ser de gran importancia en el rol que esta enzima posee en el proceso de angiogénesis (137).



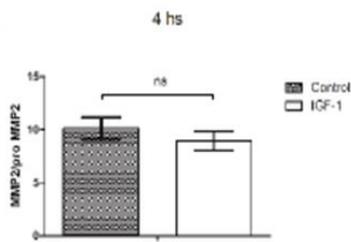
**Figura 12: Esquema de la regulación de la actividad de MT1-MMP y MMP-2.** La activación de MMP-2 es realizada en superficie celular a través de la formación de un complejo tri-molecular entre MT1-MMP, TIMP-2 y pro-MMP-2. Para ello se requiere que MT1-MMP forme dímeros y una a TIMP-2. Este TIMP-2 así dispuesto se va a unir a la pro-MMP-2 y la molécula restante de MT1-MMP va a escindir el pro-peptido presente en MMP-2 originando la MMP-2 activa. Modificado de Glaubomme D y col., 2014.

Con el objeto de explorar los efectos de IGF-1 sobre la activación MMPs, se realizaron cultivos de la línea MIO-M1, los cuales fueron depletados de SFB al momento del estímulo (10 nM de IGF-1) y mantenidos durante distintos periodos de tiempo (4, 6 y 8 horas) bajo los efectos del mismo. Como control se utilizaron células en ausencia de estímulo, mantenidas sin SFB durante los mismos periodos de tiempo. Luego los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados y su actividad gelatinasa evaluada mediante ensayos de zimografía. La actividad de MMPs fue visualizada por la degradación proteolítica de la gelatina como bandas claras respecto al fondo oscuro producto de la tinción de la gelatina no degradada. En la **Figura 3.5** podemos observar que las células estimuladas con IGF-1 mostraron una disminución relativa de la forma activa estadísticamente significativa a las 6 y 8 horas respecto a la obtenida en las células sin estímulo (**Figura 3.5 A, C y D**). Bajo estas condiciones experimentales no se observaron modificaciones ni de la forma activa ni latente de MMP-9.

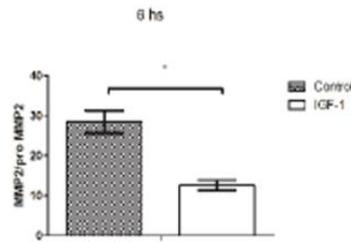
A



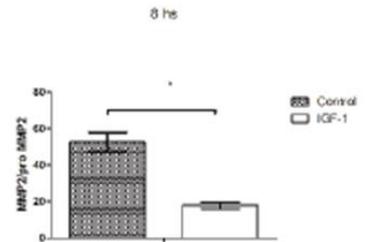
B



C

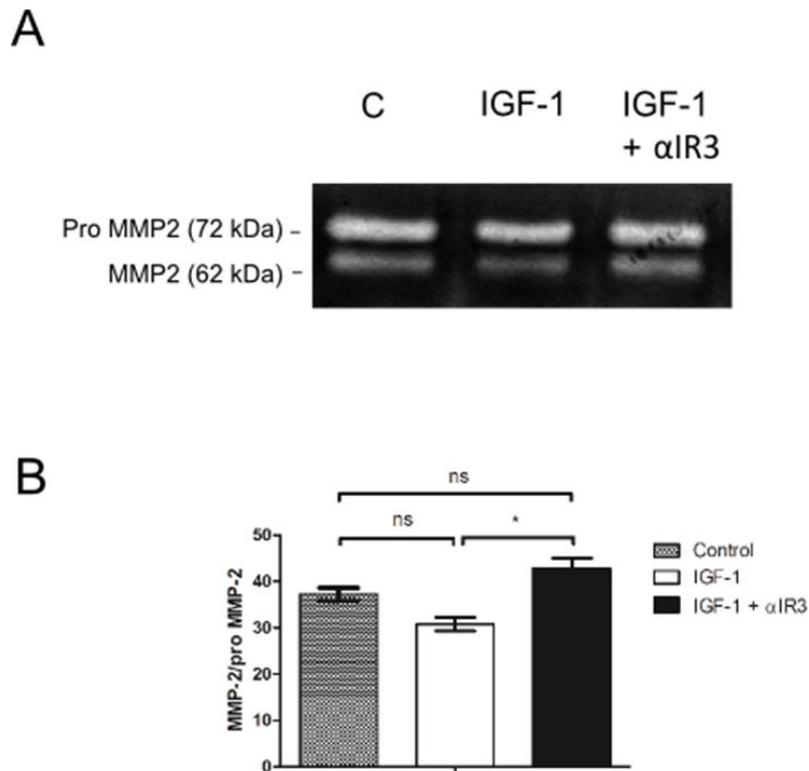


D



**Figura 3.5. IGF-1 regula la activación de MMP-2 en células MIO-M1.** A) Análisis zimográfico representativo de células MIO-M1 depletadas de suero y luego estimuladas o no (control) con IGF-1 (10nM), mostrando la actividad gelatinolítica de MMP-2 (peso molecular ~70 y 62kDa, correspondiente a la pro MMP-2 y MMP-2, respectivamente). Sangre Capilar (SC) fue utilizada como control (calle 1). B, C y D) Análisis cuantitativo: en el eje y se indica la relación densitométrica en pixeles de las bandas de MMP-2 y pro MMP-2 para cada condición representándose la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Siendo \*  $p < 0,05$ . A los fines de una mejor interpretación, los valores de cada relación fueron multiplicados por un factor de corrección  $10^2$ .

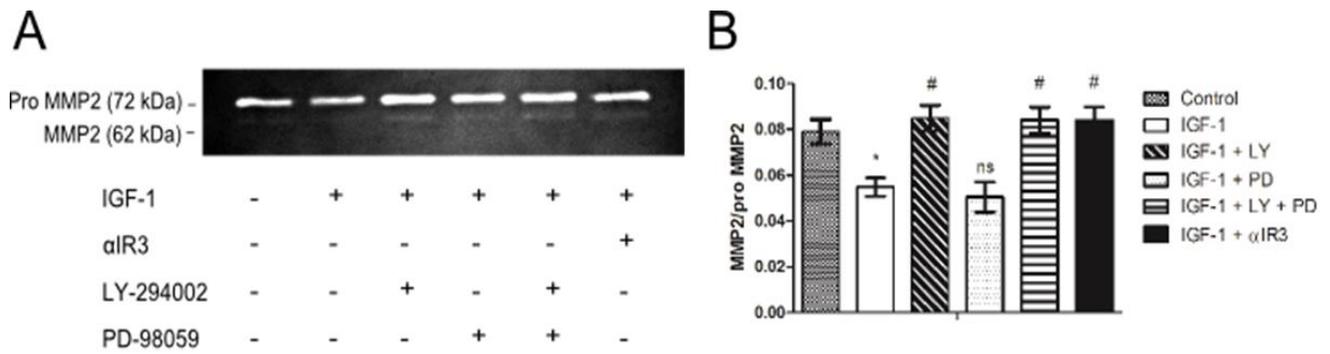
A continuación, se procedió a comprobar la especificidad del efecto de IGF-1 sobre la actividad de MMP-2, por lo cual en estos ensayos utilizamos nuevamente el anticuerpo de bloqueo,  $\alpha$ IR3. Como se observa en la **Figura 3.6**, la preincubación de las células con  $\alpha$ IR3 logro revertir la acción de IGF-1, obteniéndose en ensayos de zimografía un perfil similar a la condición control (sin IGF-1), sugiriendo la participación del IGF-1R en este efecto biológico. Cabe acotar que  $\alpha$ IR3 por sí solo no produjo modificación en la actividad de ninguna de las formas de MMP-2.



**Figura 3.6. El anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3 restablece la actividad de MMP-2 en células MIO-M1.** A) Análisis zimográfico representativo de células MIO-M1 preincubadas con el anticuerpo  $\alpha$ IR3 y luego estimuladas o no (control) con IGF-1 (10nM), mostrando la actividad gelatinolítica de MMP-2 (peso molecular ~70 y 62 kDa, correspondiente a la pro MMP-2 y MMP-2, respectivamente). B) Análisis cuantitativo: en el eje y se indica la relación densitométrica en pixeles de las bandas de MMP-2 y pro MMP-2 para cada condición representándose la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Siendo \*  $p < 0,05$ . A los fines de una mejor interpretación, los valores de cada relación fueron multiplicados por un factor de corrección  $10^2$

### ***La regulación de la actividad de MMP-2 por IGF-1 involucra la vía de la PI3K.***

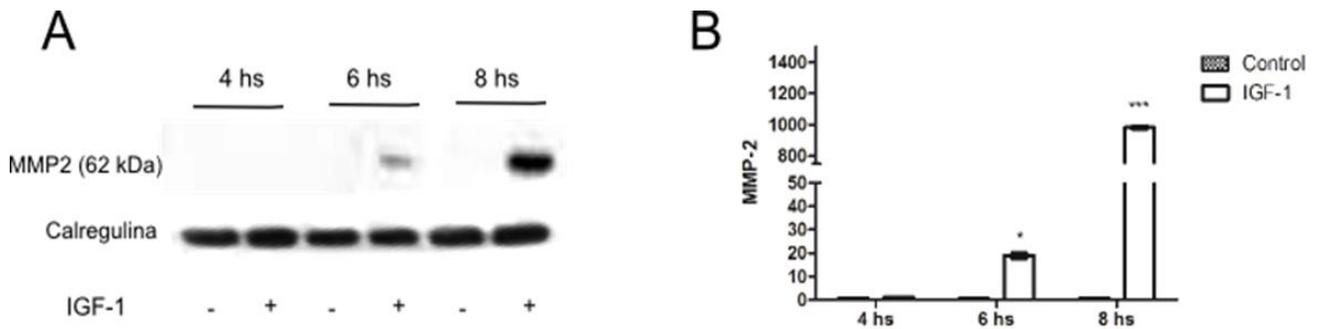
Con el propósito de evaluar si la regulación de la actividad de MMP-2 por IGF-1 era mediada por la activación de Mek1-ERK1/2 o AKT/PI3K, usamos los inhibidores farmacológicos específicos de estas vías y luego se evaluó por zimografía la actividad de MMP-2 en los sobrenadantes de CM. Los resultados muestran que una de las vías más involucradas en este proceso de regulación fue AKT/PI3K, ya que luego de la preincubación de las células con LY-294002, el nivel de actividad de MMP-2 en el sobrenadante de esas células fue restablecido de manera similar a lo observado con la preincubación con  $\alpha$ IR3 (**Figura 3.7**). Por otra parte, el pre-tratamiento de las células MIO-M1 con PD-980059 (**Figura 3.7**), no produjo modificación significativa en los niveles de MMP-2 indicando que la vía MAPK/ERK 1/2 no está involucrada en la regulación de esta actividad.



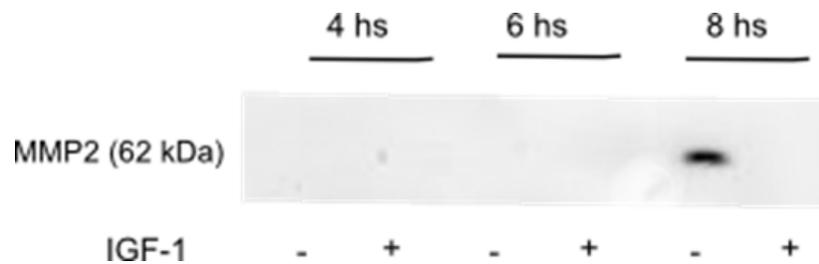
**Figura 3.7. La vía de señalización intracelular PI3K/AKT participa en la regulación de MMP-2 por IGF-1.** **A)** Análisis zimográfico representativo del sobrenadante de células MIO-M1 pre incubadas con 20  $\mu$ M de LY-294002 o 20  $\mu$ M de PD-98059 o ambos, en presencia de IGF-1 10 nM. Como control se utilizó sobrenadante de células pre incubadas con anticuerpo  $\alpha$ IR3 antes del estímulo con IGF-1. **B)** Análisis cuantitativo: en el eje y se indica la relación densitométrica en pixeles de las bandas de MMP-2 y pro MMP2 para cada condición representándose la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Siendo \*  $p < 0,05$  respecto al control y #  $p < 0,01$  respecto al estímulo con IGF-1. A los fines de una mejor interpretación, los valores de cada relación fueron multiplicados por un factor de corrección  $10^2$ .

**IGF-1 produce una acumulación de MMP-2, pero no de MT1-MMP en lisados totales de CM.**

En función de los cambios observados por zimografía en la actividad de MMP-2, en esta etapa decidimos analizar la expresión de MMP-2 a nivel de proteína, en los lisados y sobrenadantes de las células utilizando un anticuerpo dirigido contra la forma activa de esta proteinasa, y de proteínas relacionadas a su proceso de activación, como MT1-MMP. Para ello, los lisados y sobrenadantes correspondientes a las células MIO-M1 estimuladas con IGF-1 por distintos periodos de tiempo (4, 6 y 8 horas), fueron analizados por ensayos de Western blot. En la **Figura 3.8** observamos que la expresión de MMP-2 fue evidenciada de manera dependiente del tiempo en los lisados de células que habían sido incubadas con IGF-1, intensificándose hacia las 8 hs de estímulo. Interesantemente, cuando analizamos por Western blot, los sobrenadantes obtenidos del mismo ensayo, previamente liofilizados, sólo se observó expresión de MMP-2 en las células cultivadas en ausencia de IGF-1 solamente a las 8 hs (**Figura 3.9**). Estos resultados coincidentes con los obtenidos en la **Figura 3.5** demuestran en conjunto, que células MIO-M1 bajo tratamiento con IGF-1, inducen a través de su receptor la regulación de MMP-2.

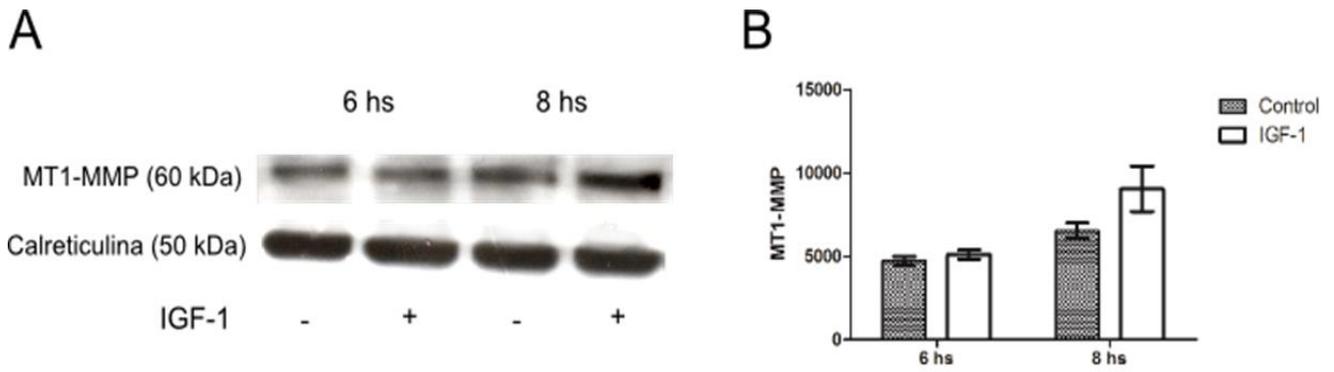


**Figura 3.8: IGF-1 regula los niveles proteicos de MMP-2 en lisados de células MIO-M1.** **A)** Análisis de Western blot representativo de células MIO-M1 estimuladas o no (control) con IGF-1 (10nM), utilizando un anticuerpo que reconoce a la MMP-2 activa. **B)** Análisis cuantitativo: En el eje y se indica la densitometría en pixeles de las bandas representativas de MMP-2 en presencia o ausencia de estímulo, representando la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Siendo \*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . Como control de carga de los ensayos se utilizó calregulina.



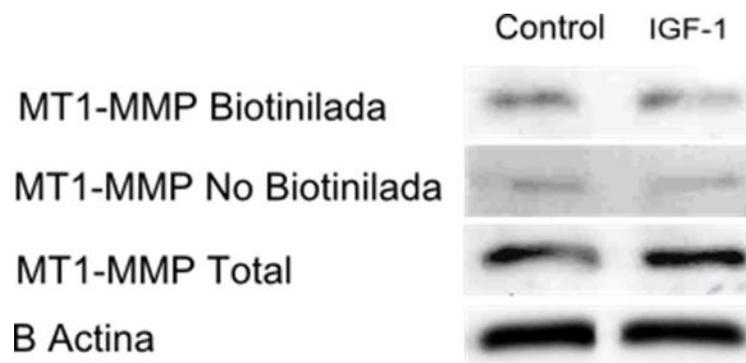
**Figura 3.9: Efecto de IGF-1 sobre la regulación de MMP-2 inducida por IGF-1 en sobrenadantes liofilizados de células MIO-M1.** Análisis de Western blot representativo de sobrenadantes obtenidos de células estimuladas o no (control) con IGF-1 (10nM), utilizando un anticuerpo que reconoce a la MMP-2 activa.

Dado que en el proceso de activación de MMP-2 participa MT1-MMP, a continuación nos propusimos evaluar los niveles proteicos de esta metaloproteinasas de membrana. Para ello, las células MIO-M1 fueron incubadas nuevamente con IGF-1 durante 6 y 8 h, y los lisado celulares analizados por ensayos de Western blot. El análisis densitométrico no mostro cambios significativos en la expresión de MT1-MMP en células estimuladas respecto a sus controles en los distintos tiempos analizados (**Figura 3.10 A y B**).



**Figura 3.10: IGF-1 no modifica los niveles proteicos de MT1-MMP en células MIO-M1.** **A)** Análisis de Western blot representativo de células MIO-M1 estimuladas o no (control) con IGF-1 (10nM), utilizando un anticuerpo que reconoce a MT1-MMP. **B)** Análisis cuantitativo: En el eje y se indica la densitometría en pixeles de las bandas representativas de MT1-MMP en presencia o ausencia de estímulo a los dos tiempos indicados, representando la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Como control de carga se utilizó calreticulina.

Además para corroborar los niveles de MT1-MMP a nivel de superficie celular, se evaluaron células MIO-M1 estimuladas con IGF-1 10 nM durante 8 horas y luego incubadas con biotina en frío. Los resultados mostraron que la cantidad de proteína biotinilada en superficie no fue modificada luego del estímulo con IGF-1 (**Figura 3.11**).



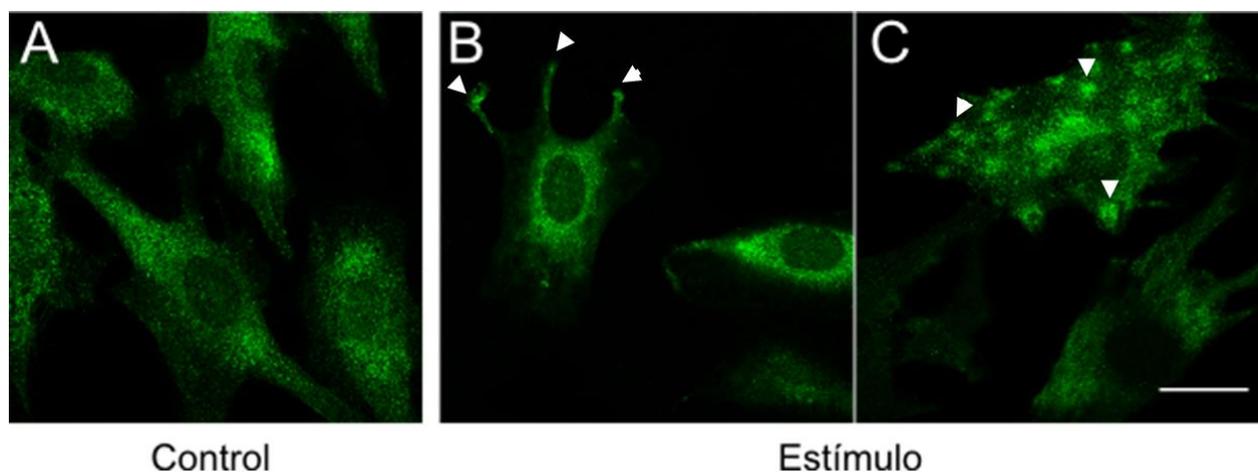
**Figura 3.11: IGF-1 no modifica los niveles proteicos de MT1-MMP a nivel de la superficie celular.** Ensayo de marcación de proteínas de superficie celular empleando Sulfo-NHS-SS-biotina en células MIO-M1 estimuladas con IGF-1 (10nM). Los ensayos de marcación y análisis de western blot son detallados en Materiales y Métodos. MT1-MMP Biotinilada: representa la fracción biotinilada unida y eluida de las perlas de agarosa-estreptavidina. MT1-MMP No biotinilada: representa la fracción no biotinilada y no unida por las perlas de agarosa-estreptavidina. MT1-MMP Total: (Input) representa el 10% de la carga proteica ofrecida a las perlas agarosa-estreptavidina. Como control de carga se muestra  $\beta$ -actina.

Estos resultados indican que IGF-1 no modifica los niveles proteicos de MT1-MMP en lisados celulares así como tampoco a nivel de la superficie celular de MIO-M1.

### ***Mecanismo extracelular de acción de IGF-1***

#### ***IGF-1 produce una redistribución de MMP-2 y MT-1 MMP en la membrana plasmática de CM.***

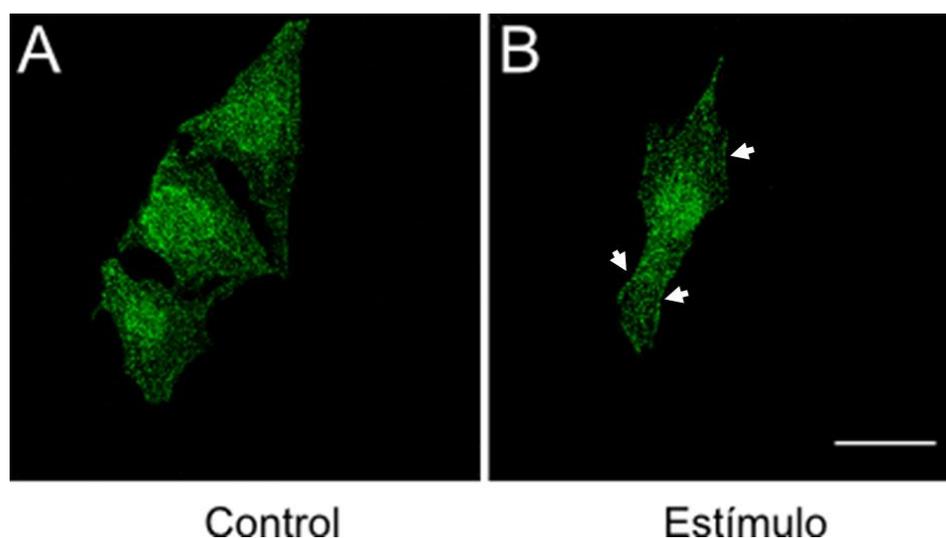
Considerando los resultados obtenidos en el ítem anterior, y conociendo que el mecanismo de activación de MMP-2 tiene lugar sobre la membrana celular (138), es que nos propusimos analizar el efecto de IGF-1 sobre la distribución de componentes del complejo trimolecular responsable de la activación de MMP-2 en la membrana de células MIO-M1. Para ello, las células cultivadas sobre colágeno tipo I, en presencia de IGF-1 durante 3 hs, fueron fijadas, pero no permeabilizadas e incubadas con los anticuerpos primarios correspondientes. La **Figura 3.12 (Estímulo)** muestra que MMP-2 se redistribuyó hacia los procesos celulares en cultivos de células tratadas con IGF-1, además de mostrar acúmulos sobre la membrana, respecto a células no tratadas (**Figura 3.12 Control**).



**Figura 3.12: IGF-1 induce una redistribución de MMP-2 en células MIO-M1.** Ensayos de inmunofluorescencia de células MIO-M1 incubadas en presencia de IGF-1 por 3 h (B y C) y ausencia (A), utilizando un anticuerpo anti-MMP-2 y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 488. Las flechas indican los acúmulos de MMP-2 sobre membrana celular. Escala: 30µm.

Cuando analizamos otro de los componentes del complejo trimolecular, MT-1 MMP, observamos que esta proteína, luego del tratamiento con IGF-1, mostro una redistribución preferencial hacia los bordes celulares (**Figura 3.13 B y C**) respecto a células control (**Figura 3.13 A**).

Estos resultados en su conjunto sugieren IGF-1 promueve un fenotipo migratorio en las células MIO-M1.

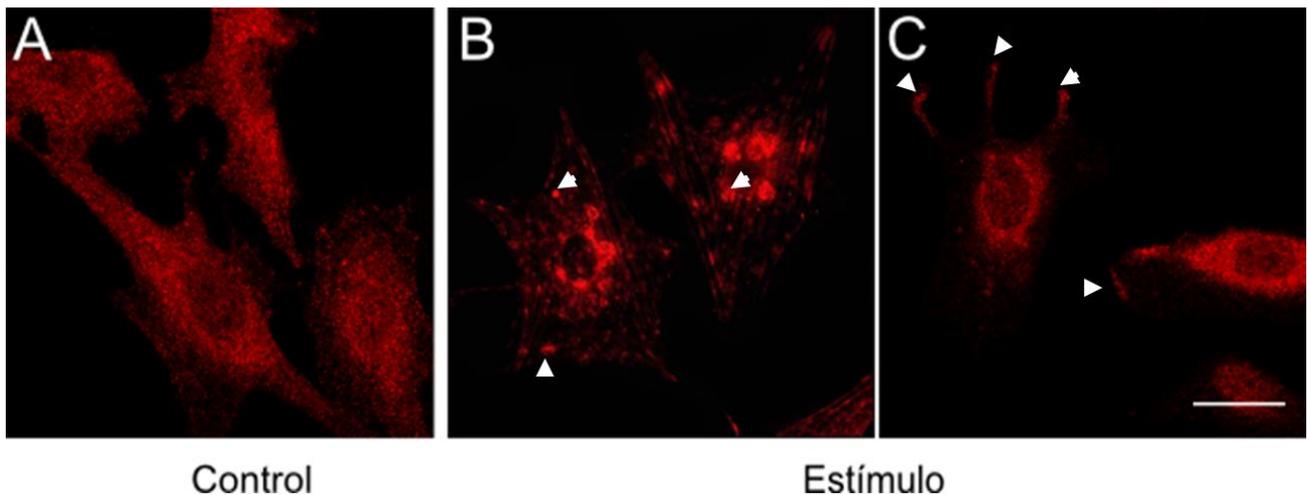


**Figura 3.13: IGF-1 induce una redistribución de MT1-MMP en células MIO-M1.** Ensayos de inmunofluorescencia de células MIO-M1 incubadas en presencia de IGF-1 por 3 h (**B**) y ausencia (**A**), utilizando un anticuerpo anti-MT1-MMP y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594. Las flechas indican la redistribución de MT1-MMP hacia los bordes celulares. Escala: 30µm.

***IGF-1 produce además una redistribución de su receptor en la membrana plasmática de CM.***

Al observar que IGF-1 regulaba, además de la actividad de MMP2, su redistribución en membrana y que el mismo efecto tenía sobre MT1-MMP, consideramos pertinente en esta etapa analizar cómo se comportaba en la superficie celular el receptor IGF-1R, bajo estímulo con su ligando. En función de ello se realizaron ensayos de IF en células no permeabilizadas bajo las mismas condiciones descritas anteriormente y luego evaluamos la distribución del receptor.

La **Figura 3.14 B** muestra que IGF-1R se redistribuyó hacia los procesos celulares de manera similar a MMP-2 luego del tratamiento de las células con IGF-1, respecto a las no tratadas (**Figura 3.14 Control**). Además de mostrar una localización preferencial hacia los bordes celulares, también pudimos observar un importante acumulo sobre la membrana respecto a células control (**Figura 3.14 Estimulo**).



**Figura 3.14: IGF-1 induce una redistribución de IGF-1R en células MIO-M1.** Ensayos de inmunofluorescencia de células MIO-M1 incubadas en presencia de IGF-1 por 3 h (**B y C**) y ausencia (**A**), utilizando un anticuerpo anti-IGF-1R y un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 594. Las flechas indican la redistribución de IGF-1R hacia los bordes celulares así como la formación de acúmulos sobre la membrana. Escala: 50 $\mu$ m.

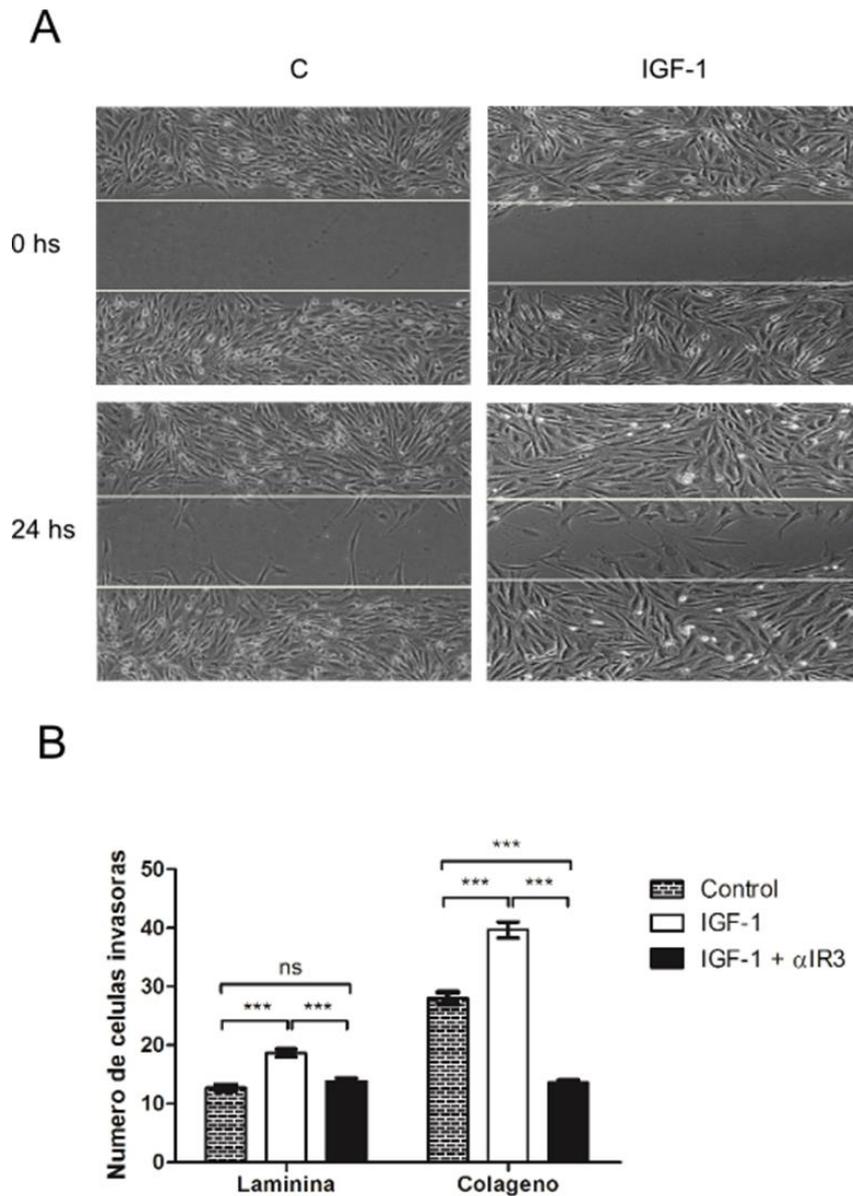
#### ***Efecto de IGF-1 en el proceso de migración celular***

En todo proceso tisular que involucra angiogénesis o vasculogénesis la regulación de los mecanismos de proliferación, migración e invasión endotelial resultan claves. Si bien las CE son actores principales en este proceso, las CM que mantienen la homeostasis y estructura retinal, también adquieren un rol importante no solo por su capacidad de regular la migración e invasión de las CE a las cuales acompañan, si no que ha sido demostrado que bajo algún daño retinal poseen la capacidad de proliferar, de-diferenciar y migrar en el tejido injuriado (139, 140). No menos importante es la capacidad que poseen estas células de regular la síntesis y secreción de moléculas neuro y vasoactivas como glutamato, VEGF y PEDF, entre otras (14). Al respecto, ensayos *in vitro* demuestran que factores de crecimiento como FGF2 y TGF  $\beta$  activan o inhiben la migración de células MIO-M1 y CE (141) mientras que IGF-1 ha sido descrito como inductor de la migración principalmente en células tumorales (142, 143) o en células progenitoras retinales transplantadas (144-146). En función de estos antecedentes y considerando el efecto de IGF-1 sobre la regulación de MMPs así como la redistribución de las mismas sobre la membrana celular, lo cual sería acorde con un fenotipo migratorio, nos propusimos en esta etapa, evaluar el efecto de IGF-1 sobre la capacidad migratoria de las CM en cultivo utilizando ensayos de *wound healing*.

### ***IGF-1 induce de manera específica la migración de CM en matrices como colágeno y laminina***

Con el propósito de reproducir *in vitro* las condiciones de migración celular sobre componentes de la matriz extracelular (MEC) que ocurren *in vivo*, a nivel experimental decidimos adsorber placas de cultivo con proteínas como colágeno tipo I o laminina a fin de mantener el entorno proteico de la MEC. Luego células MIO-M1 fueron adheridas sobre cada una de estas proteínas sobre la que formaron una monocapa, a la cual se le realizó una herida (*scratch wound*) a lo largo del diámetro central de la misma. Los ensayos de migración se realizaron en presencia y ausencia de IGF-1 durante 24 horas. Como previamente demostramos que IGF-1 era capaz de inducir la proliferación de células MIO-M1 a estos tiempos de estímulo (Tesis Barcelona 2010), en estos ensayos utilizamos Hidroxiurea (HU), un conocido inhibidor farmacológico con potente función citostática. La cuantificación del ensayo se realizó a partir del recuento de CM que habían invadido la superficie de la herida a las 24 h.

Cuando las CM fueron incubadas con IGF-1 se observó un aumento estadísticamente significativo en el número de células que invadieron la herida en comparación a lo observado en CM control (sin IGF-1) (**Figura 3.15 A y B**). Además, cuando las células fueron preincubadas con el anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3 16 nM durante 30 min y posteriormente estimuladas con IGF-1 por 24 horas el efecto migratorio disminuyó a valores similares al control, en superficies de laminina y de manera más significativa, en superficies de colágeno tipo I (**Figura 3.15 B**).



**Figura 3.15. IGF-1 incrementa la capacidad de migración de células MIO-M1 sobre superficies de colágeno I.** **A)** Ensayos de migración en herida (*scratchwound*) representativos de células MIO-M1 incubadas o no con IGF-1 por 24 h, en placas previamente adsorbidas con colágeno tipo I. **B)** Análisis cuantitativo: las barras representan la cantidad de células que invaden la herida en las condiciones descritas en A, a la cual se adiciono un tercer ensayo con células preincubadas con el anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3, antes de ser estimuladas con IGF-1 (10 nM) 24 hs, graficándose la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes siendo \*\*\* diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,001$  respectivamente).

Estos ensayos permitieron demostrar que IGF-1 es capaz de inducir el proceso de migración en las CM en cultivo, y que este efecto es específico de IGF-1 y la activación de su receptor IGF-1R.

## CONCLUSIONES CLAVES DEL TERCER CAPITULO

En el modelo *in vitro* demostramos que:

- ✓ IGF-1 induce la activación de su receptor así como de vías intracelulares como MAPK/ERK y PI3K,
- ✓ IGF-1 regula el estado de activación de MMP-2,
- ✓ La regulación de la actividad de MMP-2 por IGF-1 involucra la vía de la PI3K,
- ✓ IGF-1 produce una acumulación de MMP-2, pero no de MT1-MMP en lisados totales de CM,
- ✓ IGF-1 produce una redistribución de MMP-2 y MT-1 MMP así como de IGF-1R en la membrana plasmática,
- ✓ IGF-1 induce de manera específica la migración de CM en matrices como colágeno I y laminina mediante ensayos de wound healing.

# Capítulo IV

## *Modelo “In vitro”: Hipoxia*

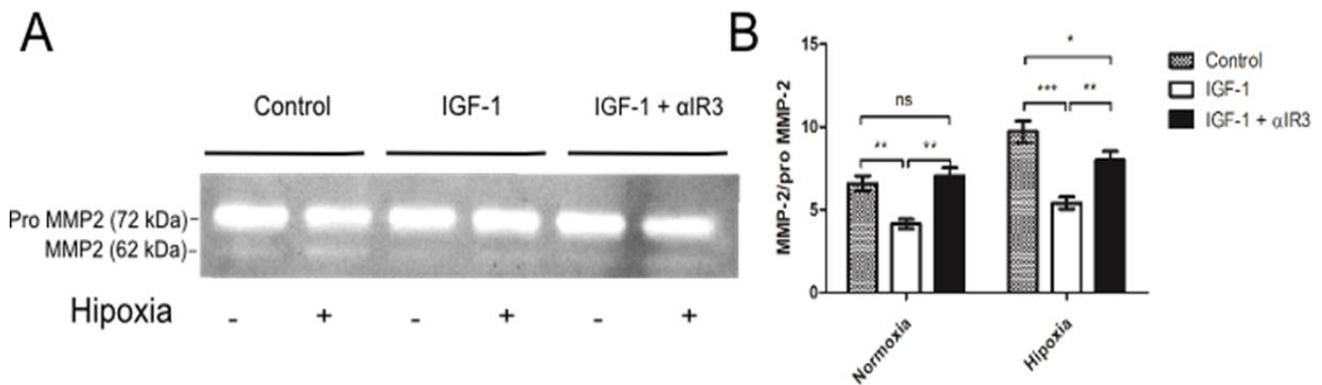
### ***La hipoxia no modifica los efectos de IGF-1 sobre la regulación de la actividad de MMP-2***

La hipoxia es considerada un factor clave en el desarrollo vascular y en las retinopatías proliferativas como la ROP y la RD (147, 148). Al respecto, el factor inducible por hipoxia (HIF-1, por hipoxia-inducible factor) activa factores angiogénicos críticos como VEGF. No obstante, existen otros factores angiogénicos independientes de hipoxia como IGF-1, altamente relacionado al estado de desarrollo del individuo, que también participa durante del desarrollo vascular así como en las retinopatías.

Se conoce que la retina adulta es uno de los tejidos metabólicamente más activos del cuerpo humano y muy sensible a cambios en los niveles de oxígeno (149). Sin embargo, al estar constituido por una gran variedad de tipos celulares, las respuestas que genera el estado de hipoxia en este tejido dependerán del tipo celular afectado. Por ejemplo, las CM han sido descritas como muy sensibles a cambios en los niveles de oxígeno en retinas vasculares (150), pero más resistentes en aquellas avasculares y con baja tensión de oxígeno (151)

Por lo tanto, en esta etapa nos planteamos analizar los efectos de la hipoxia sobre la regulación de MMP-2 en CM, a fin de poder correlacionar con los efectos de IGF-1 sobre la regulación de MMP-2 descritos previamente en este trabajo de tesis, en procesos tan complejos como las retinopatías.

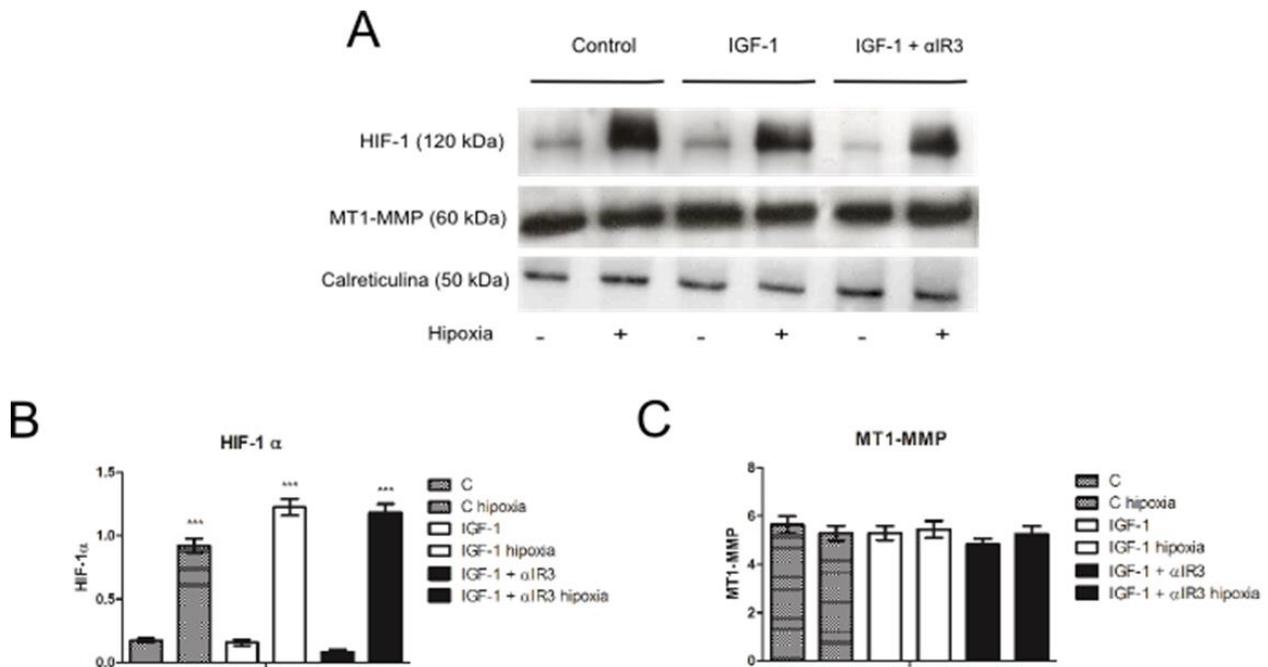
Con el fin de evaluar si la hipoxia modifica el efecto de IGF-1 sobre la regulación de MMP-2, CM fueron cultivadas durante 8 h en presencia o ausencia de IGF-1 (10 nM) en condiciones de hipoxia (0,3% de O<sub>2</sub>) o normoxia (21% de O<sub>2</sub>). Además, en los casos señalados las células se pre-incubaron con el anticuerpo de bloqueo ( $\alpha$ IR3) 30 minutos antes del estímulo con IGF-1. Posteriormente, los sobrenadantes de estas células fueron recogidos y evaluados por ensayos de zimografía. La **Figura 4.1 A y B** muestra que si bien la relación de MMP-2/pro-MMP-2 aumento en las condiciones de hipoxia respecto a normoxia, el efecto de IGF-1 sobre la regulación de MMP-2 en hipoxia fue similar al demostrado en condiciones de normoxia, el cual ya había sido observado previamente (**Figura 3.5**).



**Figura 4.1. La hipoxia no modifica la regulación ejercida por IGF-1 sobre MMP-2 en células MIO-M1.** Las células fueron expuestas a condiciones de hipoxia (0,3 % de O<sub>2</sub>) o normoxia (21 % de O<sub>2</sub>) y estimuladas o no con IGF-1 (10nM) por 8 horas en presencia o ausencia del anticuerpo de bloqueo (αIR3). **A)** Los sobrenadantes se evaluaron por zimografía para observar la actividad de pro-MMP-2 y MMP-2. **B)** Análisis cuantitativo: en el eje y se indica la relación densitométrica en pixeles de las bandas de MMP-2 y pro MMP-2 para cada condición representándose la media ± DE de tres experimentos independientes. Siendo \* p <0,01, \*\* p <0,05 y \*\*\* p <0,001. A los fines de una mejor interpretación, los valores de cada relación fueron multiplicados por un factor de corrección 10<sup>2</sup>.

#### ***La hipoxia no afecta la expresión de proteínas reguladoras de la actividad de MMP-2***

Con el propósito de profundizar si las condiciones de hipoxia a las cuales fueron expuestas las CM activaban vías clásicas descriptas para este proceso, evaluamos por ensayos de Western blot los niveles proteicos de HIF-1α. Para este fin, las CM fueron expuestas a condiciones de hipoxia o normoxia y estimuladas o no con IGF-1 (10nM) durante 8 horas y en los casos indicados se realizó una pre-incubación con el anticuerpo de bloqueo (αIR3). La **Figura 4.2** muestra que la exposición de las CM a bajas concentraciones de O<sub>2</sub>, produjo una acumulación de la proteína HIF-1α en los lisados totales, lo cual aseguró el correcto funcionamiento de la hipoxia experimental en este sistema celular.



**Figura 4.2. La hipoxia no modifica la expresión proteica de MT1-MMP inducida por IGF-1 en células MIO-M1.** Las células fueron expuestas a condiciones de hipoxia (0,3 % de O<sub>2</sub>) o normoxia (21 % de O<sub>2</sub>) estimuladas o no con IGF-1 (10nM) por 8 h. en presencia o ausencia del anticuerpo de bloqueo (αIR3). **A**) Lisados celulares sometidos a ensayos de Western blot fueron analizados utilizando anticuerpos primarios anti HIF-1α y anti MT1-MMP y revelados con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa. Análisis cuantitativo: en el eje y se indica la relación densitométrica en pixeles de HIF-1α y MT1-MMP respecto a calregulina para cada condición representándose la media ± DE de tres experimentos independientes. Siendo \*\*\* p < 0,001.

Posteriormente, conociendo que la hipoxia no afectaba la regulación de IGF-1 sobre la actividad de MMP-2, nos propusimos analizar la expresión proteica de la metaloproteína de membrana, MT1-MMP, bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente. Los resultados muestran que ni las condiciones de hipoxia ni los estímulos con IGF-1 fueron capaces de modificar los niveles proteicos de MT1-MMP en los lisados celulares totales de CM (**Fig 4.2 A y C**).

De esta manera comprobamos que la regulación previamente demostrada de IGF-1 sobre la actividad de MMP-2 en CM en normoxia, no se modifica en condiciones de hipoxia, postulando a IGF-1 como un factor clave para la regulación de MMP-2 en procesos fisiológicos y patológicos que involucren proteólisis extracelular.

## CONCLUSIONES CLAVES DEL CUARTO CAPITULO

En el modelo *in vitro* demostramos que:

- ✓ La hipoxia (0.3% de O<sub>2</sub>) no modifica la regulación ejercida por IGF-1 sobre MMP-2,
- ✓ La hipoxia tampoco modifica la expresión proteica de MT1-MMP inducida por IGF-1 en lisados de CM.

## **Capítulo V**

### ***Modelo “In-vivo”***

## ***Modelo de Retinopatía inducida por oxígeno OIR***

### ***Caracterización del Modelo.***

La ROP y la RD son patologías retinales con efectos devastadores para la visión. Tanto la ROP como la RD poseen una alta prevalencia en Latinoamérica y por ende, en Argentina (57). Según estadísticas mundiales, se estima que cerca del 25% de la población diabética presenta algún grado de retinopatía, el 5% la padece en grado moderado y el 1,2% en grado avanzado con pérdida de visión inevitable. A su vez la ROP si bien se ubica en el 5to lugar entre los problemas de ceguera en América Latina, es la principal causa de ceguera, prevenible, en la población infantil (152). En la actualidad los tratamientos existentes (PPR, vitrectomía, inyección intraocular de anticuerpos monoclonales) intentan detener las retinopatías pero solo en casos muy puntuales logran mejorar la pérdida de la visión (65). Es por ello que un mayor entendimiento de los mecanismos bioquímicos, celulares y moleculares involucrados en la progresión de estas patologías es esencial para el desarrollo de nuevas terapias y el uso de modelos animales proporciona una herramienta indispensable para ello. La retina del ratón ha sido ampliamente utilizada en las últimas décadas para estudiar tanto angiogénesis fisiológica como patológica y uno de los modelos animales más reconocidos para el estudio de las retinopatías es el modelo murino de OIR (153). Una de las características más importantes que debe reunir un modelo animal es poder reproducir lo más cercanamente posible las características de la patología en humanos y el modelo de OIR reproduce la ROP así como varias características puntuales de la RDP (neovascularización, vaso-obstrucción, ruptura de la barrera hemato-retiniana-ocular, neurodegeneración, entre otras) (74).

El modelo de OIR consiste en exponer animales neonatos a altos niveles de oxígeno (hiperoxia) durante un período de tiempo determinado, y luego al ser colocados en aire ambiental, la retina percibe este cambio como una verdadera hipoxia comenzando el proceso de vasoproliferación retinal (154, 155), existiendo además directa correlación entre el grado de avascularidad de la retina y la predisposición a la neovascularización (156). En este modelo la hipoxia activa a factores críticos como VEGF pero también a otros que son independientes de hipoxia. En este sentido, ha sido comprobado que la presencia de IGF-1, el cual depende del estado de desarrollo del individuo, es necesario para la producción de la neovascularización característica del modelo, aun cuando los niveles de VEGF sean altos (157).

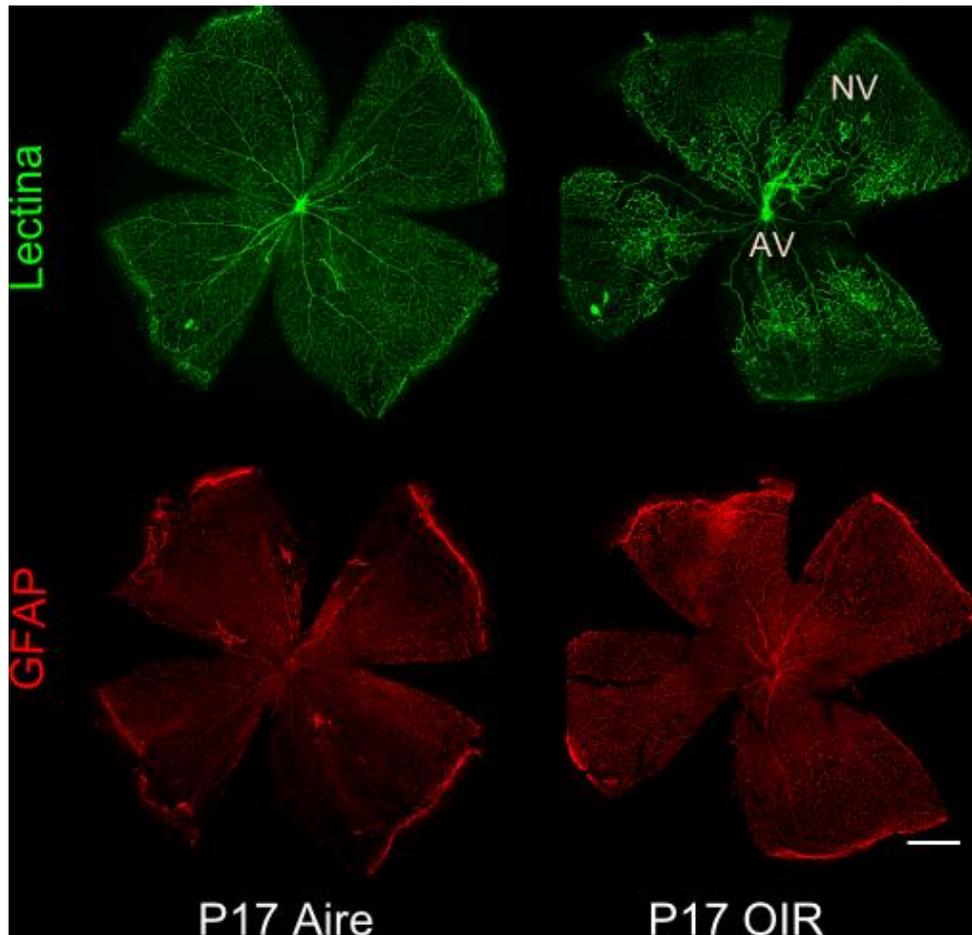
Es por ello que el objetivo de este capítulo fue analizar la participación del sistema IGF-1/IGF-1R durante el desarrollo retinal normal así como en el modelo de OIR (**Esquema 5.1**). Un mayor entendimiento del rol de IGF-1/IGF-1R en las diferentes fases del modelo podría servir de guía para el desarrollo de nuevos tratamientos en las retinopatías.



**Esquema 5.1: Modelo de OIR.** Luego de 7 días posterior al nacimiento (P7), los animales son expuestos a un ambiente de hiperoxia en el cual permanecen por 5 días hasta el P12. A partir de ese momento los animales perciben la normoxia como una hipoxia relativa, hasta el día P17. Modificado de Grant MB y col., 2008.

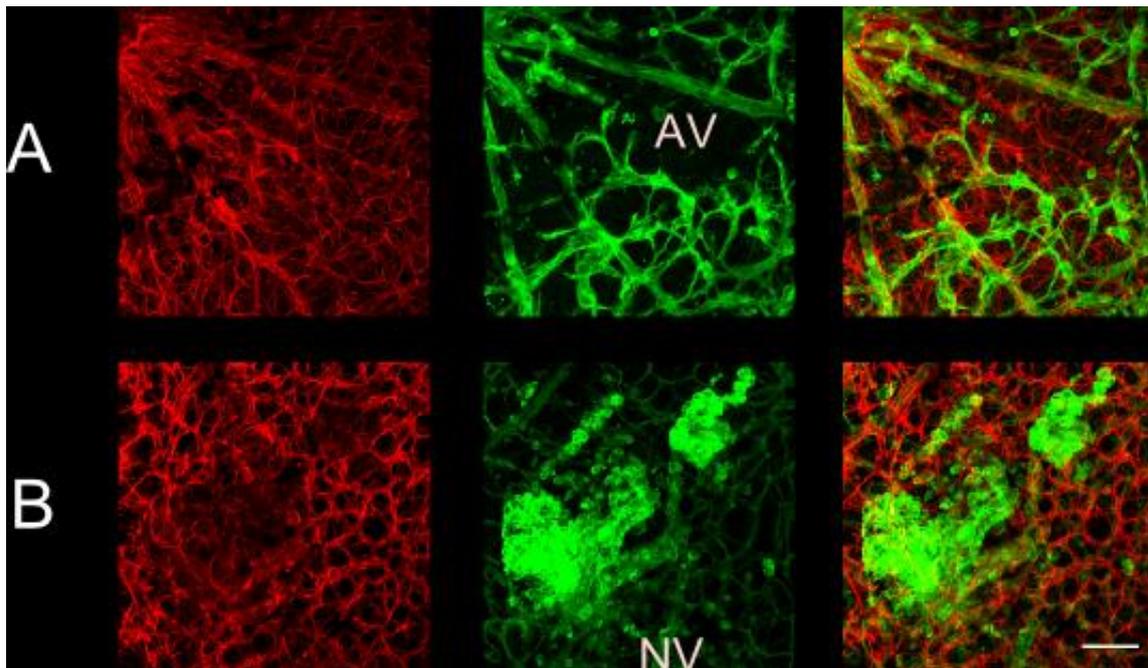
### ***La hipoxia produce una zona avascular central y neovascularización en retinas completas (flatmount) en modelo OIR***

Con el propósito de verificar el efecto de la hipoxia sobre la generación de la zona avascular y la cantidad de ovillos neovasculares (NV) presentes en las retinas del modelo de OIR, ratones C57BL/6 de 7 días de edad fueron colocados en hiperoxia y sacrificados en el día 17 posnatal (P17). Como grupo control otros animales fueron mantenidos en oxígeno ambiental (21%). Una vez realizada la enucleación, las células endoteliales de la retina fueron teñidas con Isolectina Griffonia Simplicifolia B4 (GSA) conjugada con Alexa 488; y con un anticuerpo anti-GFAP como marcador de astrocitos en normoxia y de CM activadas y astrocitos en condiciones de hipoxia.



**Figura 5.1.** La hipoxia y los factores angiogénicos inducen una zona avascular central y neovascularización en retinas completas (*flatmount*) de animales OIR. Imágenes representativas de retinas P17 y sus respectivos controles de aire. Las retinas fueron teñidas con GSA (verde) y GFAP (rojo), respectivamente. El tejido fue montado en su totalidad para analizar las imágenes resultantes del mismo. Las imágenes de la izquierda son retinas representativas de animales control mantenidos en condiciones de aire normal durante el tratamiento mientras que a la derecha se observan las retinas de animales del modelo de OIR. AV: zona avascular y NV: neovascularización. Escala: 100  $\mu$ m

En la **Figura 5.1** puede observarse que cuando analizamos la tinción con GSA en las retinas completas, el modelo de OIR generó una zona avascular central (AV) además de los característicos ovillos neovasculares (NV) hacia el humor vítreo. Estas características vasculares han sido bien descritas y caracterizadas en el modelo de OIR (158). De una manera más detallada se pueden observar estas mismas alteraciones en una micrografía a mayor aumento (**Figura 5.1.2**). En la tinción de GFAP se pueden observar modificaciones que acompañan a los cambios vasculares anteriormente mencionados (**Figura 5.1. 2 A y B**). En relación a ello y acorde a trabajos previos también observamos que en estas zonas avasculares y NV, los astrocitos rápidamente comienzan a degenerar (159), manifestando alteraciones en el grado de organización así como en la densidad de la tinción, lo cual puede observarse también en estas retinas a P17 (**Figura 5.1. 2 A y B**).

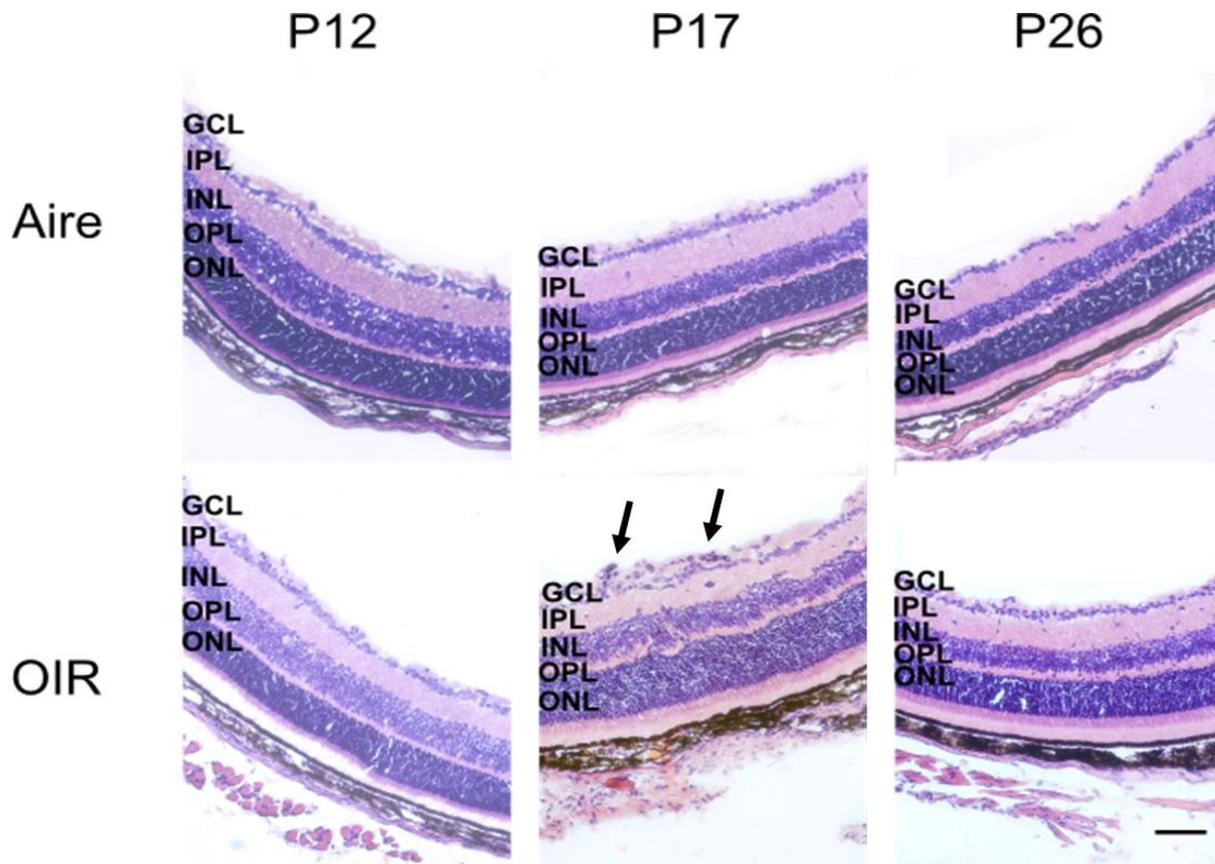


**Figura 5.1.2. La hipoxia produce una zona avascular central y neovascularización en retinas completas (*flatmount*) de OIR.** Micrografías a mayor aumento de retinas P17 en el modelo de OIR. Las retinas fueron teñidas con GSA (verde) y GFAP (rojo), respectivamente. Una superposición de las dos imágenes puede observarse en el tercer panel. En el primer panel se muestra la tinción de células con GFAP mientras que en el panel de GSA pueden observarse zonas avasculares (AV) (A) y ovillos neovasculares (NV) (B). Escala: 20  $\mu$ m.

### La hipoxia genera neovasos y modificaciones en el espesor de las capas retinales en ratones OIR

Una vez analizadas las alteraciones vasculares en las retinas completas a continuación, decidimos analizar el efecto de la hipoxia y de los factores angiogénicos sobre la generación de ovillos neovasculares así como alteraciones en las capas retinales de los animales OIR. Para ello, secciones de tejido retinal correspondientes a ambos grupos tratados y control fueron teñidas con H&E. Cuando analizamos las secciones correspondientes a P12 OIR pudimos observar que la morfología retinal fue similar a la observada en animales control, con ausencia de neovascularización dado que este día coincide con el cambio de los animales de un ambiente de hiperoxia a oxígeno ambiental normal (**Figura 5.2, panel izquierdo**). En los animales P17 pudimos comprobar la fase activa del proceso neovascular al observar la presencia de ovillos neovasculares y múltiples neovasos a lo largo de toda la retina (**Figura 5.2, panel medio**). Además observamos una disminución en el espesor de la capa nuclear interna (INL) así como en las capas plexiforme interna (IPL) y plexiforme externa (OPL) a P17 en el grupo OIR respecto a los animales control. Hacia el día

P26 las retinas de los animales OIR se recuperaron de la neovascularización acorde a lo descrito previamente (153) presentando una morfología retinal casi normal (**Figura 5.2, panel derecha**).



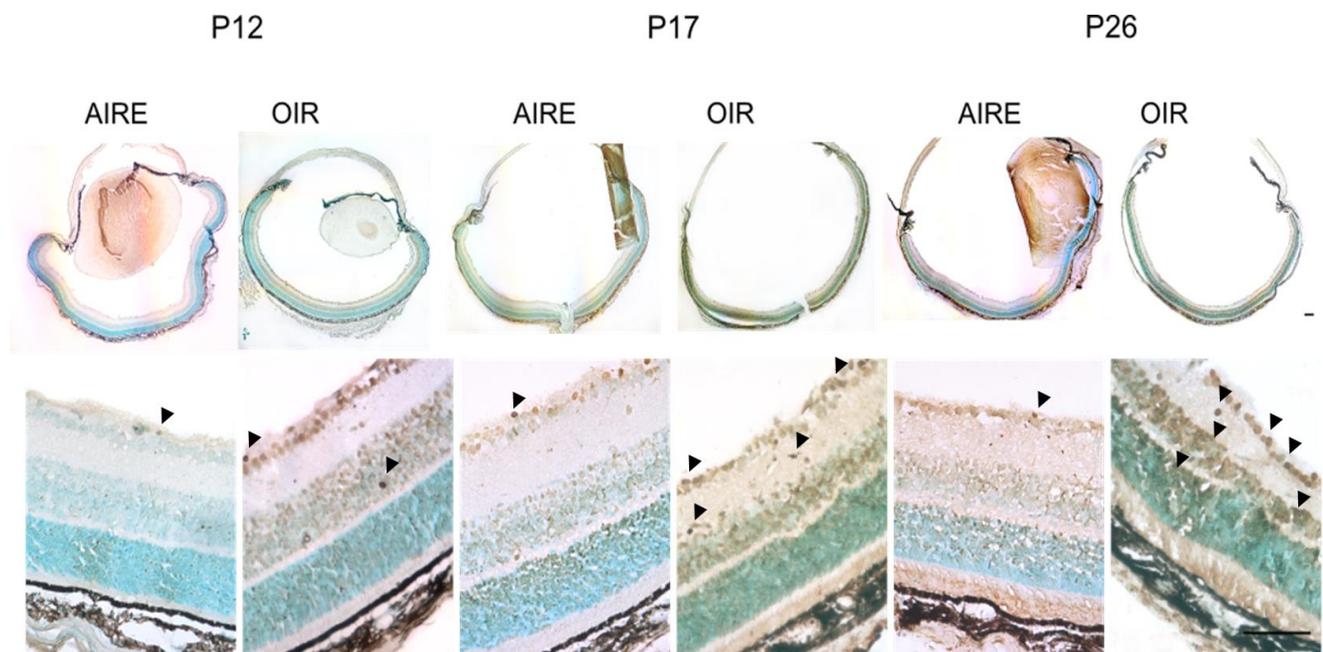
**Figura 5.2. La hipoxia y los factores angiogénicos generan neovascularización y cambios en el espesor de las retinas en animales OIR.** Tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E) de secciones de retinas de ratones C57BL/6 sometidos al tratamiento con hiperoxia (OIR): P12, P17 y P26 y retinas de animales control (Aire). Note la presencia de ovillos neovasculares en P17 revirtiendo hacia el día P26. Abreviaturas: CCG, capa de células ganglionares; INL, capa plexiforme interna; ONL, capa nuclear interna; OPL, capa plexiforme externa; ONL, capa nuclear externa. Las imágenes corresponden a zonas centrales de la retina. Escala: 50  $\mu$ m

### ***El modelo de OIR produce neurodegeneración retinal.***

Si bien los posibles mecanismos de muerte celular para diversos tejidos se encuentran actualmente bastante descritos, con la retina no sucede lo mismo. La mayoría de los estudios han abordado los mecanismos de muerte celular en condiciones que semejan la RDP (41), el glaucoma (160) o la Retinitis Pigmentaria (RP) (161), pero poco ha sido descrito en modelos o condiciones que simulan a ROP, como el modelo de OIR. En este sentido, al presente, se han descrito cambios estructurales e histológicos a nivel de la INL (162, 163) así como evidencia de apoptosis en esta

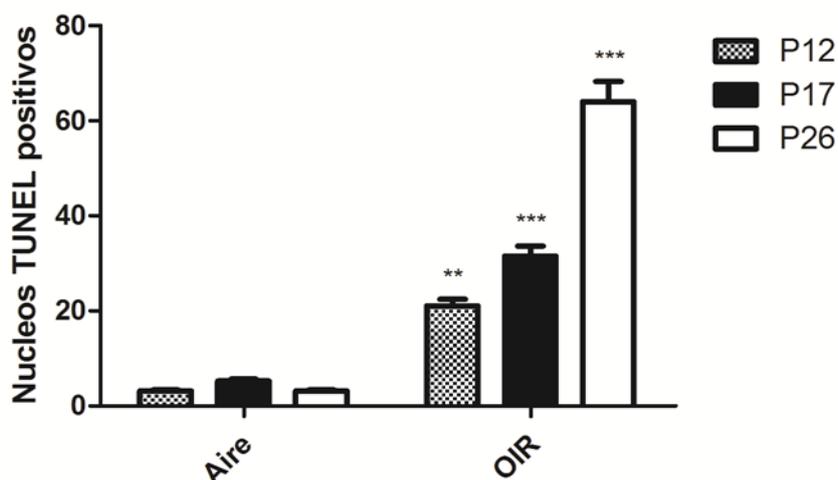
capa retinal a través del ensayo de TUNEL, sin poder especificar claramente los tipos celulares que atraviesan por este proceso. Y lo que es más interesante aun es que no se conoce si las CM, cuyos cuerpos celulares se encuentran en esta capa, se ven afectadas o si solo actúan protegiendo al tejido de los fenómenos de muerte.

Con el propósito de determinar los niveles de apoptosis generados en el modelo de OIR utilizamos el ensayo de TUNEL. Para ello criocortes de retinas de ratones expuestos a OIR fueron analizadas a diferentes tiempos (P12, P17 y P26) y correlacionadas con las retinas de animales control (grupo de aire). En la **Figura 5.3 y 5.4** se observan células TUNEL-positivas a P17 en animales OIR, en la INL así como en la capa de células ganglionares, las cuales se mantuvieron en retinas a P26. En retinas de animales control se observó ausencia de tinción a todos los tiempos analizados (P12, P17 y P26). Es importante destacar que la INL consiste, además de CM, de células neuronales predominantemente amacrinas, bipolares y horizontales. Por otro lado, cabe acotar que si bien la NV en este modelo revierte hacia el día P23 el fenómeno de muerte continúa manifestándose en las retinas a P26 lo cual demuestra la persistencia de neurodegeneración en este tejido (**Figura 5.4**). Finalmente, los hallazgos aquí observados confirman los resultados obtenidos anteriormente por tinción con H&E (**Figura 5.2**).



**Figura 5.3. El modelo de OIR produce neurodegeneración retinal.** Las retinas de animales P12, P17 Y P26 sometidos a distintas condiciones (OIR y aire) fueron analizadas por la técnica de TUNEL. Tanto las imágenes de retinas completas

como sus aumentos respectivos demostraron un incremento en apoptosis celular en los animales OIR en relación a sus respectivos controles de aire. Escala: 100  $\mu$ m.



**Figura 5.4. El modelo de OIR incrementa la apoptosis celular.** Análisis cuantitativo: en el eje y se representa el número de núcleos TUNEL positivos por retina para cada condición, representándose la media  $\pm$  SE de tres experimentos independientes. Siendo \*\*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$ .

### ***Participación del sistema IGF-1/IGF-1R en el desarrollo retinal y en el modelo de OIR***

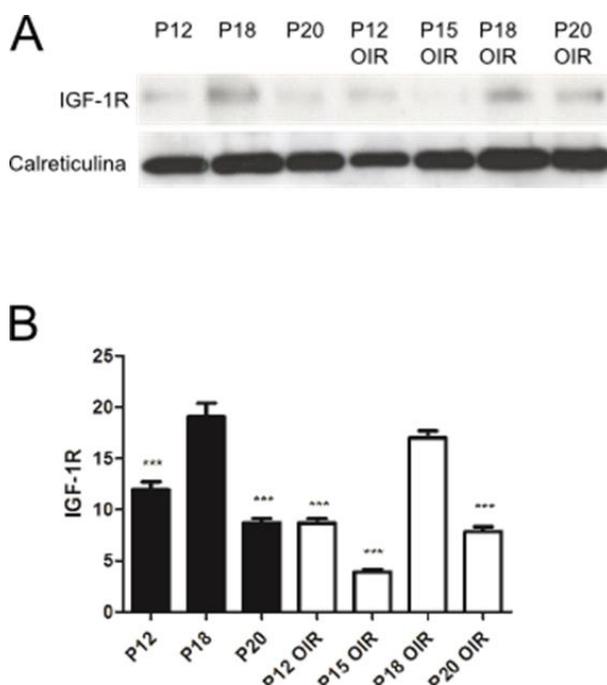
Dado que el desarrollo ocular en los no primates ocurre posterior al nacimiento, estudiarlo en ratones resulta sencillo y conocer este aspecto permite posteriormente profundizar sobre eventos patológicos como las retinopatías. En este sentido, el modelo de OIR, el cual reproduce la ROP y la RDP ha sido utilizado, entre otras cosas, para tratar de describir y entender la participación que diversos factores de crecimiento poseen en la pérdida final de la visión, enfocándose en la producción de anomalías vasculares y neurodegenerativas.

Entre los factores más estudiados IGF-1 ha tenido un gran auge en los últimos años (118, 164, 165), sin embargo la función de su receptor en particular no ha sido lo suficientemente esclarecido. Al respecto, se conoce que animales artificialmente deficientes del gen de IR o IGF-1R a nivel de CE, protegen a animales OIR de desarrollar NV retinal (166). Respecto a IGF-1R, su expresión y localización ha sido demostrada a nivel del ARNm en la vasculatura (167) así como en distintos tipos celulares de la retina de ratón (109), y en diferentes capas celulares de retina de rata (165, 168, 169), pero no fue confirmado aún, a nivel proteína, en las CM.

Finalmente, ha sido demostrado que la regulación de este receptor más que de los factores que se unen a él (109), parecería tener un rol prometedor en las futuras terapias a utilizar en el tratamiento de retinopatías proliferativas.

**La hipoxia no modifica la expresión de IGF-1R durante el desarrollo retinal y en el modelo de OIR.**

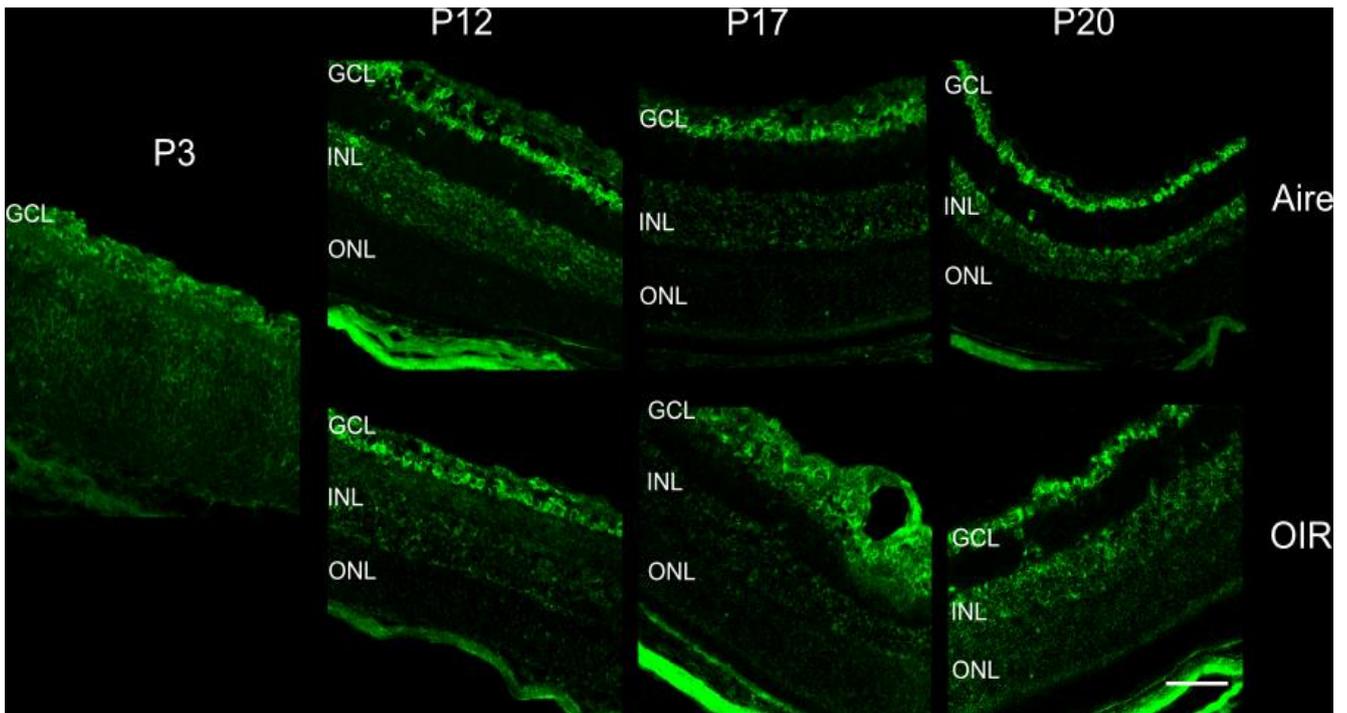
Con el propósito de analizar los niveles de expresión de IGF-1R en la retina durante el desarrollo normal y en animales OIR, se utilizaron extractos proteicos de tejido retinal de animales mantenidos en aire o tratados con oxígeno. Para ello se utilizaron animales a P12, P18 y P20 en ambos grupos y en el de OIR uno adicional a P15 (cercano pico del proceso neovascular). Por ensayos de Western blot se demostró que IGF-1R incremento su expresión durante el desarrollo normal, observándose un pico en el P18 regresando a niveles basales hacia el P20. Coincidentemente, el mismo patrón fue observado también en el P18 en los animales tratados con oxígeno (**Figura 5.5**). Estos resultados demuestran que bajo condiciones de hipoxia, los niveles de IGF-1R no fueron modificados respecto a los animales mantenidos en aire.



**Figura 5.5. La hipoxia no modifica la expresión de IGF-1R durante el desarrollo y en animales OIR.** Retinas totales fueron extraídas a distintos días de animales control (aire) y expuestos al modelo de OIR y lisadas para la obtención de homogenatos. Análisis cuantitativo: las barras corresponden a la cuantificación de IGF-1R para los distintos días

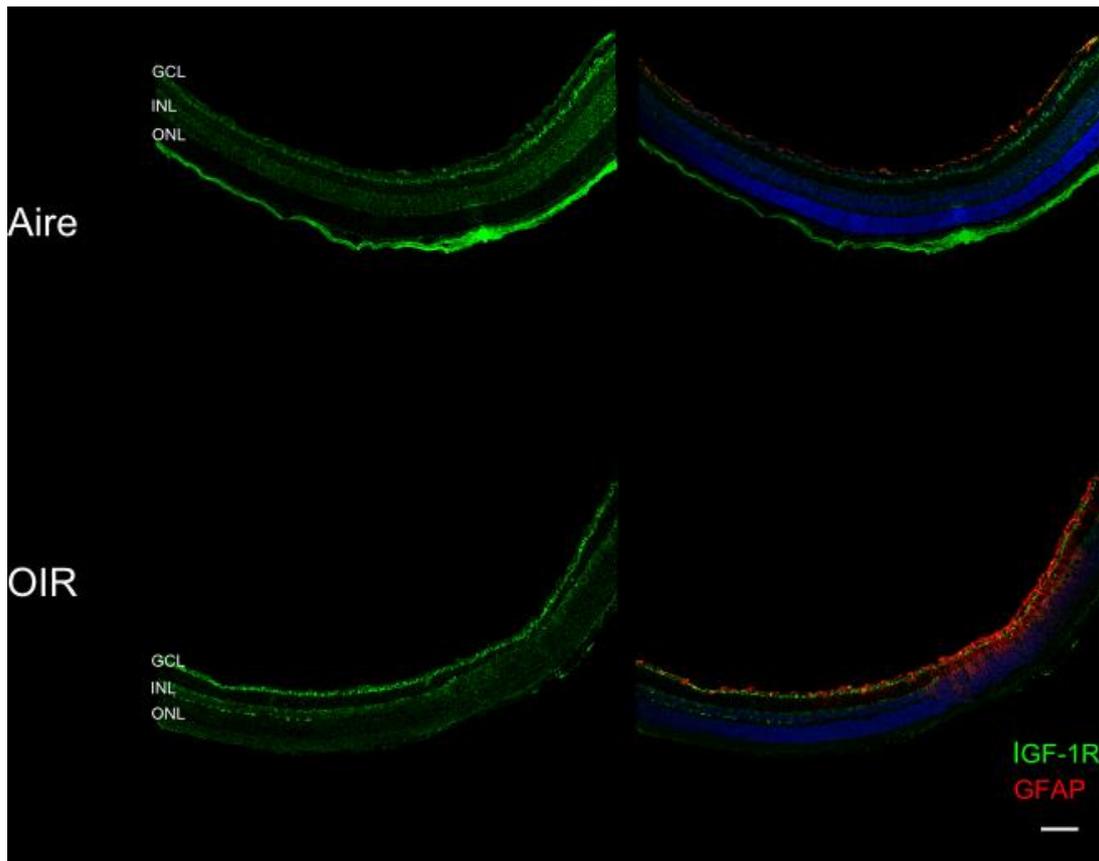
representándose la media  $\pm$  DE de tres experimentos independientes. Siendo \*\*\*  $p < 0,001$ . Como control de carga se utilizó calreticulina.

En función de estos resultados a continuación decidimos analizar la localización y distribución retinal de este receptor mediante estudios de inmunofluorescencia. Para ello se utilizaron criocortes de retina de ratones de diferentes edades (P3, P12, P17 y P20) provenientes de ambos grupos: aire y OIR. A P3, la expresión de IGF-1R se observó homogéneamente distribuida a lo largo de todo el espesor de la retina, mientras que en los animales de aire a P12 se observó principalmente en la capa de GC, en la INL y en CE y con menor intensidad en la Membrana Limitante Interna (MLI) y ONL. Este patrón de expresión se mantuvo en los diferentes días analizados (**Figura 5.6 panel superior**). En los animales OIR, observamos hacia el P17 un incremento en la expresión de IGF-1R en la zona adyacente a la cavidad vítrea, capa de CG así como en la MLI, zona donde se concentran las CE de vasos normales así como de ovillos neovasculares conjuntamente con los *endfeet* de las CM (**Figura 5.6 panel medio inferior**). Hacia el P20, el patrón de expresión en la retina interna se modificó haciéndose similar a la retina de animales P20 aire, aunque en estos animales la expresión de IGF-1R incremento en la capa ON (**Figura 5.6 panel derecho inferior**) respecto a lo observado en los animales control (**Figura 5.6 panel derecho superior**).



**Figura 5.6. La hipoxia produce una redistribución de IGF-1R en animales OIR.** Inmunofluorescencia de secciones de tejido retinal de animales mantenidos en aire (panel superior) y de animales OIR (panel inferior) a P3, P12, P17 y P20, respectivamente. La expresión de IGF-1R (verde) fue evaluada en ambos grupos de animales. Abreviaturas: GCL, capa de células ganglionares; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa. Escala: 50  $\mu$ m.

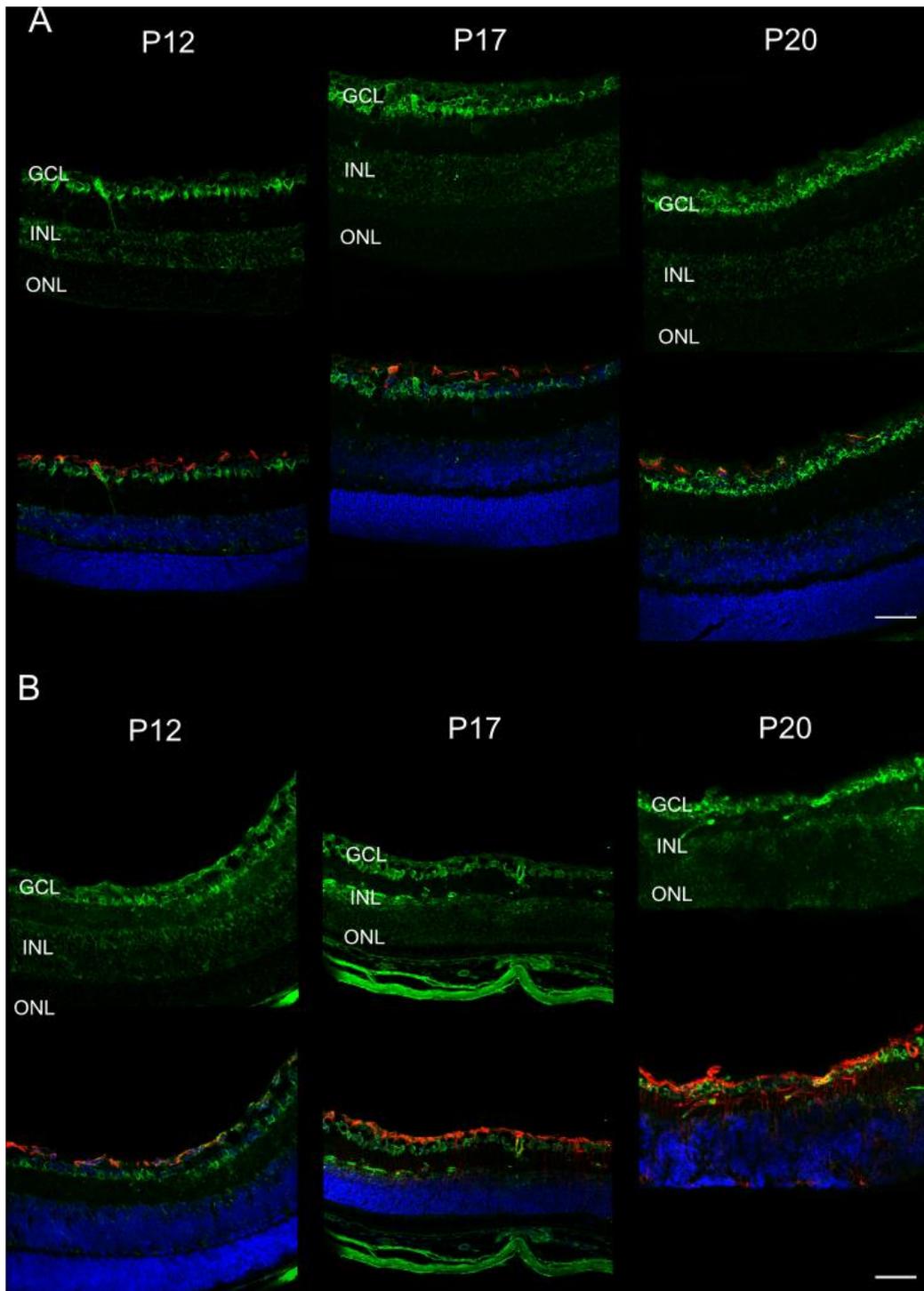
Conociendo el cambio de patrón de expresión de IGF-1R durante los diferentes tratamientos (a los distintos días) y considerando los resultados *in vitro* (en donde observamos que IGF-1R era expresado por células MIO-M1), nuestro siguiente propósito fue analizar en tejido retinal si las CM expresaban IGF-1R. Para ello se realizó un primer análisis de doble marcación con IGF-1R y GFAP, en retinas P17 de ambos grupos de animales. Como mencionáramos en la Introducción de este trabajo de tesis, el modelo de OIR se caracteriza además de la NV por la presencia de gliosis debido al efecto que genera la hipoxia sobre el tejido retinal. La gliosis se produce en respuesta al estrés retinal mediante la activación de la proteína GFAP a nivel de las CM. La **Figura 5.7** muestra que bajo condiciones de normoxia (panel superior derecho), astrocitos GFAP positivos fueron también positivos para IGF-1R. Sin embargo, bajo condiciones de estrés, además de astrocitos, CM GFAP positivas también fueron positivas para IGF-1R (**Figura 5.7 panel inferior derecho**).



**Figura 5.7. El IGF-1R se expresa en retina de ratón en células GFAP positivas** .Imágenes representativas de criocortes de retinas de animales OIR (panel inferior) y de sus respectivos controles de aire (panel superior) a P17. La expresión de IGF-1R (verde) fue evaluada conjuntamente con la expresión de GFAP (rojo), marcador característico de astrocitos y células de Müller activadas. Abreviaturas: GCL, capa de células ganglionares; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa. Escala: 100  $\mu$ m.

Posteriormente y a fin de profundizar estos hallazgos a lo largo del desarrollo retinal y en el modelo de OIR decidimos realizar doble marcaciones con anti GFAP y anti-IGF-1R en retinas provenientes de animales de diferentes edades (P12, P17 y P20). En la **Figura 5.8 A** puede observarse que IGF-1R se expresó en astrocitos, GFAP positivos, en P12 y este patrón de expresión fue mantenido en estas células a lo largo del desarrollo retinal bajo condiciones de normoxia. En animales OIR a P12 la expresión de IGF-1R fue asociada a astrocitos mientras que a P17 células de Müller GFAP positivas fueron también positivas para IGF-1R. Dado que la gliosis no se manifiesta de manera uniforme a lo largo de toda la retina, el propósito de este experimento también fue analizar si este efecto producía alguna modificación en la expresión y redistribución de IGF-1R en las CM. A P20 observamos en animales OIR en donde la retina presentaba a nivel de la CNI, una pérdida de organización característica del proceso gliótico, una importante reactividad para IGF-1R

principalmente en el límite de la cavidad vítrea mostrando una distribución coincidente con los *end feet* de las células de Müller, mientras que GFAP mostró un patrón fibrilar característico extendiéndose a nivel de los procesos celulares gliales (**Figura 5.8 B panel derecha**). Estos hallazgos permitieron confirmar que IGF-1R se expresa durante el desarrollo a nivel de astrocitos entre otras células y bajo condiciones OIR en CM positivas para GFAP.



**Figura 5.8. El IGF-1R se expresa en retina de ratón en células GFAP positivas durante el desarrollo y en animales OIR.** Imágenes representativas de criocortes de retinas de animales en aire (A) y de animales OIR (B) a P12, P17 y P20. La expresión de IGF-1R (verde) fue evaluada conjuntamente con la expresión de GFAP (rojo), marcador característico de astrocitos y CM activadas. Los núcleos fueron visualizados por marcación con Hoescht 33258 (azul). Podemos observar que el patrón de expresión de IGF-1R fue coincidente con el mostrado por GFAP (amarillo). Abreviaturas: GCL, capa de células ganglionares; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa. Escala: 50 um.

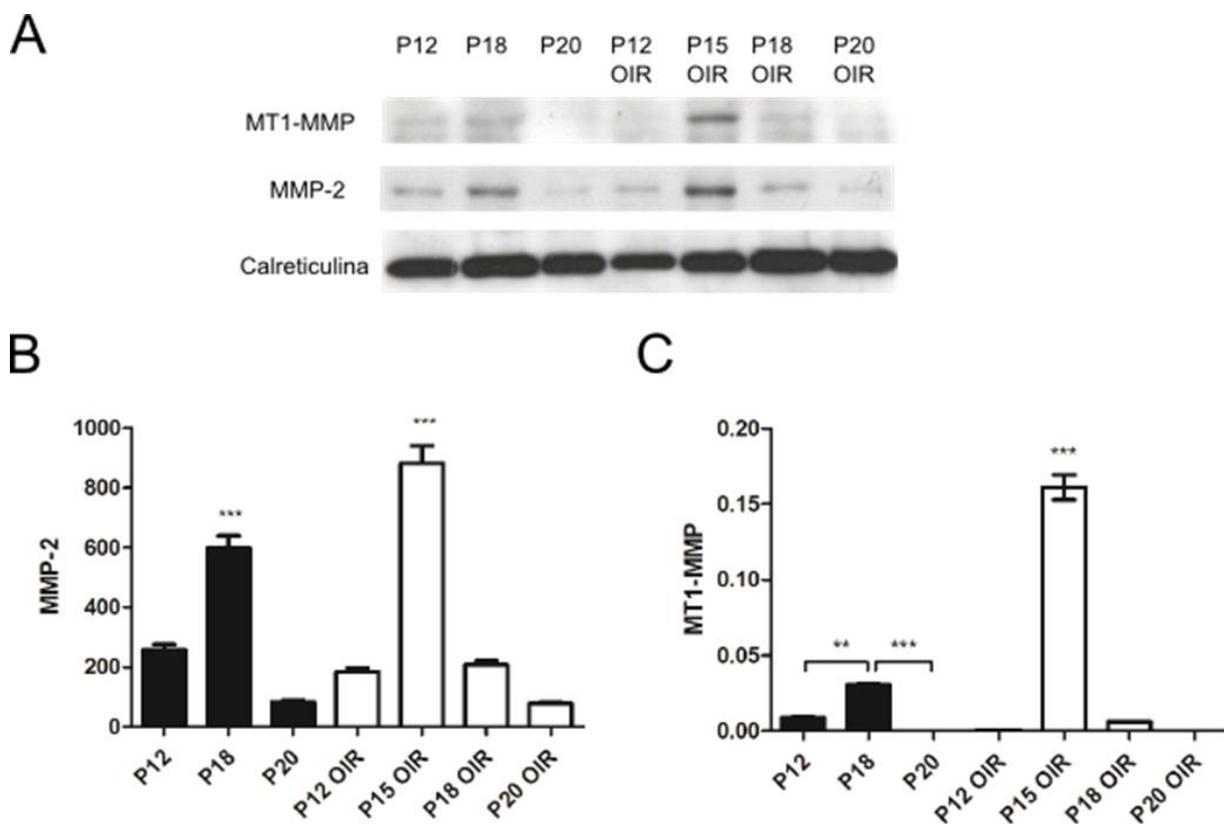
### ***La hipoxia acelera la expresión de MMP-2 y MT1-MMP en el modelo de OIR.***

Como se ha mencionado anteriormente, las MMPs son consideradas enzimas de gran importancia en procesos en los que la degradación proteolítica de la MEC se encuentra involucrada. Numerosos trabajos han estudiado aspectos relacionados a la regulación de la actividad de estas MMPs fundamentalmente en áreas como la de cáncer, ya que ellas participan en procesos de degradación, disrupción de la adhesión celular, migración e invasión (76, 77, 121). En lo que respecta al área de la fisiología retinal, los estudios han tratado de explicar su vínculo con el proceso de NV retinal patológica, pero roles opuestos según la etapa de la patología, han sido encontrados (128, 137). Por lo cual conocer qué tipo de células retinales son capaces de sintetizar estas proteasas ha permitido esclarecer, en parte, su rol en este proceso. Al presente, es conocido que CM son capaces de sintetizar MMPs como MMP-2 y MMP-9 (23); MT1-MMP (133) y TIMP-2 (170). Estos antecedentes, sumado a que en este trabajo de tesis demostramos, en un modelo *in Vitro*, la regulación que IGF-1 ejerce sobre la actividad de MMP-2 a nivel de CM, convierte al modelo de OIR en un modelo ideal para evaluar la posible relación entre las MMP-2 y el sistema IGF-1/IGF-1R a nivel de CM, en los procesos de NV retinal.

A fin de analizar la participación de MMP-2 durante el desarrollo normal retinal así como en procesos de isquemia y NV, en un primer momento se realizó la evaluación de los niveles proteicos de MMP-2 así como de la proteína de membrana MT1-MMP involucrada en el proceso de activación de MMP-2, por ensayos de Western blot. Para ello se prepararon homogenatos de retina total provenientes de animales de distintos días (P12-P20), tanto en condiciones de aire como de aquellos del modelo OIR.

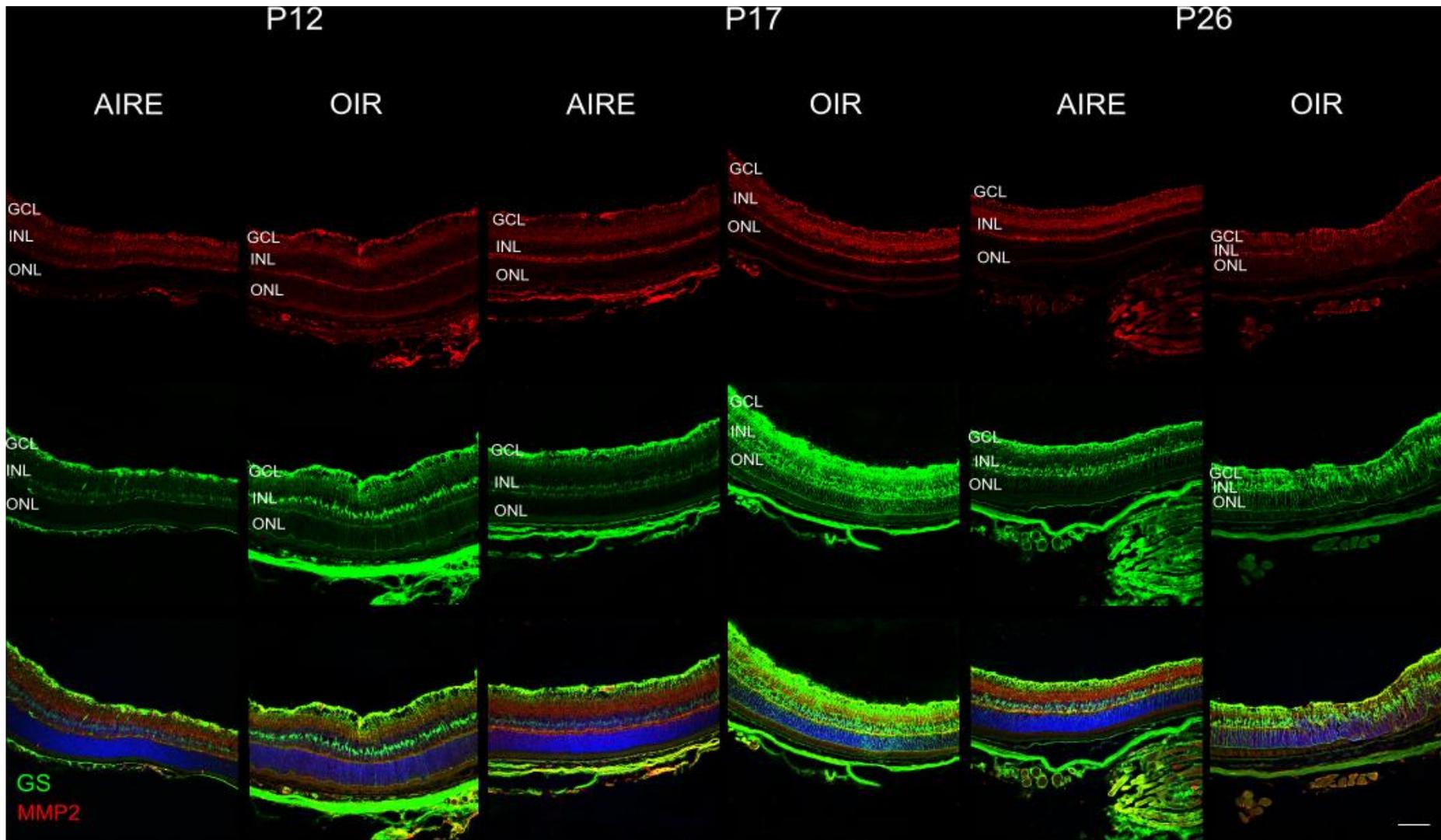
En la **Figura 5.9 A** se puede observar que tanto MMP-2 como MT1-MMP mostraron un incremento en su expresión durante el desarrollo, observándose un pico en el P18 tendiendo a desaparecer hacia el día P20. Si bien la tendencia fue similar en ambas proteínas, el incremento de

MMP-2 fue significativamente diferente al de MT1-MMP (**Figura 5.9 B y C**). En animales del modelo OIR, este incremento en la expresión de MMPs fue observado también, pero 3 días antes (P15), periodo que coincide con el pico de NV en este modelo. Cabe destacar además que la expresión de MT1-MMP en retinas OIR fue superior a la demostrada en condiciones de aire (desarrollo retinal normal) (**Figura 5.9 C**). Estos resultados demuestran que bajo condiciones de hipoxia, los niveles proteicos de MMP-2 así como de MT1-MMP incrementan en el modelo de OIR durante el periodo de mayor actividad proteolítica extracelular coincidiendo con la fase activa del proceso de NV retinal.



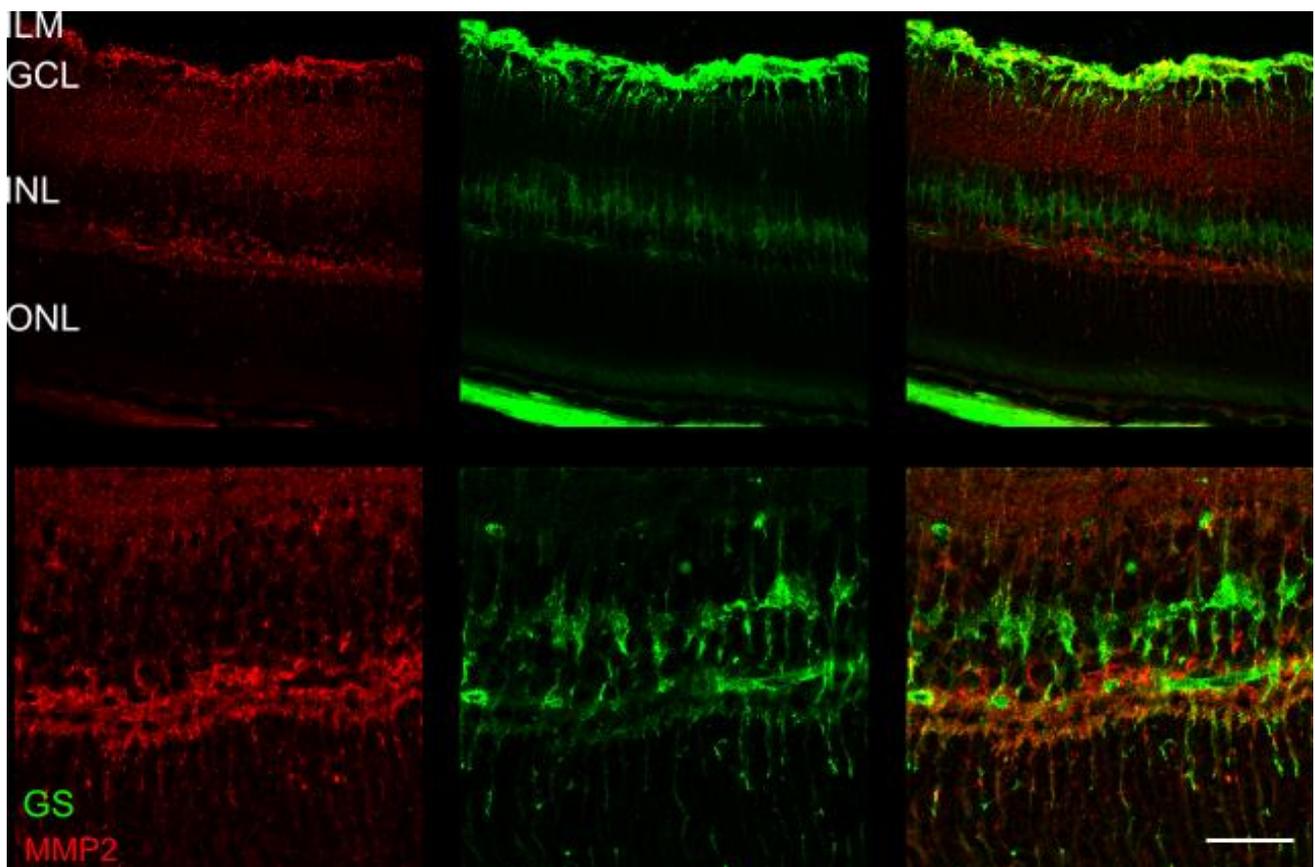
**Figura 5.9. La hipoxia acelera la expresión de MMP-2 y de MT1-MMP en retinas OIR.** Análisis por Western blot de extractos proteicos de retinas de ratón sacrificados a diferentes periodos de tiempo (P12, P15, P18 y P20). En **A** se observan los niveles de expresión de MMP-2 y MT1-MMP en retinas de animales de aire (calle 1-3) y en retinas de animales OIR (calle 4-7). En **B y C**, se muestra el análisis cuantitativo: en el eje y se indica la relación densitométrica en pixeles de las bandas de MMP-2 y MT1-MMP respecto a calreticulina en los distintos días representándose la media ± DE de tres experimentos independientes. Siendo \*\*  $p < 0,05$  y \*\*\*  $p < 0,001$ . Como control de carga se utilizó calreticulina.

Dado que la expresión de MMPs observada en los homogenatos es representativa de todas las células de retina neural, a continuación nos propusimos analizar la contribución de MMP-2 por parte de las CM a nivel retinal durante el desarrollo como en el modelo de OIR, a fin de poder correlacionar estos hallazgos con los obtenidos en el modelo *in vitro*. Por tal motivo por medio de técnicas de inmunofluorescencia se procedió a realizar una doble marcación utilizando un anticuerpo anti-Glutamina Sintasa (GS), marcador específico de cuerpos celulares así como de procesos de CM y un anti-MMP-2. En la **Figura 5.10** se puede observar que el patrón de expresión de MMP-2 se mantuvo a lo largo del desarrollo retinal (animales de aire) localizada principalmente a nivel de la capa de GC así como en la INL. En el caso de animales OIR observamos que a P17 la expresión de MMP-2 fue incrementada en la INL respecto a su control de aire y hacia el P26 se observa la gliosis característica de este modelo manteniendo la expresión de MMP-2 en las mismas capas celulares. Cuando realizamos la superposición de imágenes observamos que células positivas para GS fueron positivas para MMP-2 lo cual confirma la expresión de MMP-2 en el modelo *in vivo* por parte de las CM. Sin embargo, esa expresión fue diferencial durante el desarrollo normal respecto al modelo OIR dado que la hipoxia en el día P17 produjo un incremento en la expresión de MMP-2 a nivel de la INL. Además también observamos que la hipoxia produjo un incremento significativo en GS a largo de toda la CM, apreciación no documentada por otros autores hasta el momento.



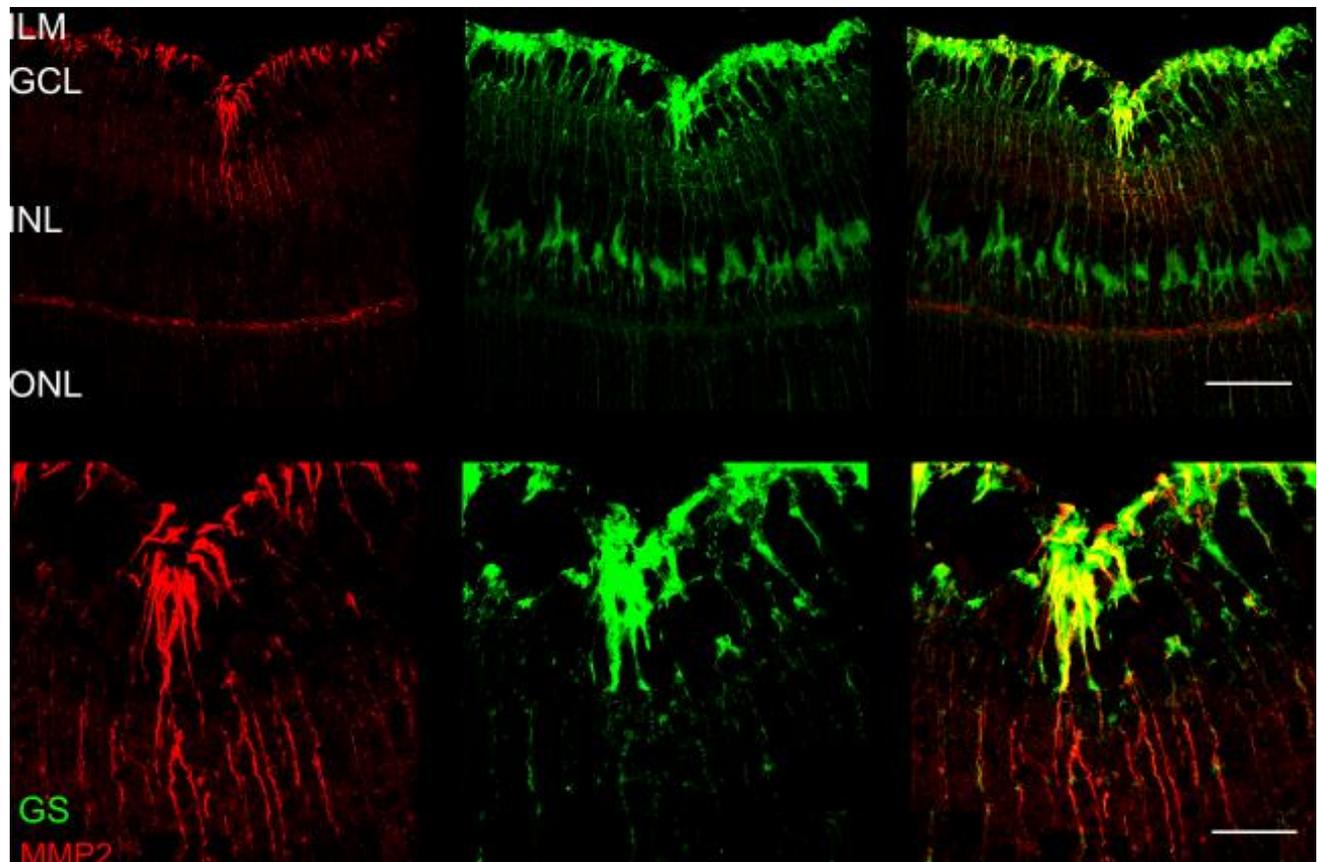
**Figura 5.10. MMP-2 se expresa en forma diferencial en retina de ratón en células GS positivas durante el desarrollo y en animales OIR.** Imágenes representativas de criocortes de retinas de animales en aire y de animales OIR a P12, P17 y P26. La expresión de MMP-2 (rojo) fue evaluada conjuntamente con la expresión de GS (verde), marcador característico de cuerpos y procesos celulares de CM. Los núcleos fueron visualizados por marcación con Hoescht 33258 (azul). Podemos observar que el patrón de expresión de MMP-2 fue coincidente con el mostrado por GS (amarillo). Abreviaturas: GCL, capa de células ganglionares; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa. Escala: 50  $\mu$ m.

Con el propósito de analizar si la expresión diferencial de MMP-2 en retinas OIR, a nivel de la INL, provenía de CM analizamos a mayor aumento la distribución de MMP-2 a P17 tanto en los animales de aire (**Figura 5.11**) como en los del modelo OIR (**Figura 5.12**). En la **Figura 5.11** podemos observar, hacia finales del desarrollo retinal normal que MMP-2 muestra un patrón más granular y homogéneamente distribuido en la IPL, INL y OPL (**panel inferior izquierda**), con acúmulos hacia la ILM donde se encuentran las expansiones membranosas de las CM conocidas como *endfeet* (**panel superior izquierda**), coincidiendo principalmente con los procesos de las CM y no con los cuerpos celulares. Del mismo modo, en el modelo de OIR, MMP-2 se expresó preferencialmente en los *endfeet* de CM así como en los procesos celulares localizándose principalmente en la zona de la ILM cercana a la cavidad vítrea (**Figura 5.12**) donde la actividad proteolítica extracelular acompaña la formación de los neovasos en este modelo. Estos resultados demuestran que MMP-2 no fue expresada en el modelo de OIR a nivel de los cuerpos celulares de las CM, ubicados en la INL pero si por los procesos que se extienden a lo largo de todo el tejido retinal.



**Figura 5.11.** La MMP-2 se expresa durante el desarrollo retinal en los procesos de células GS positivas. Imágenes representativas de criocortes de retinas de animales en aire a P17 y micrografías a mayor aumento. La expresión de MMP-2 (rojo) fue evaluada conjuntamente con la expresión de GS (verde), marcador característico de cuerpos y

procesos celulares de CM. Podemos observar que el patrón de expresión de MMP-2 fue coincidente con el mostrado por GS a nivel de procesos celulares (amarillo). Abreviaturas: GCL, capa de células ganglionares; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa. Escala: 50  $\mu$ m



**Figura 5.12.** La MMP-2 se expresa en la retina de animales OIR fundamentalmente a nivel de los endfeet y en los procesos de células GS positivas. Imágenes representativas de criocortes de retinas de animales OIR a P17 y micrografías a mayor aumento. La expresión de MMP-2 (rojo) fue evaluada conjuntamente con la expresión de GS (verde), marcador característico de cuerpos y procesos celulares de CM. Podemos observar que el patrón de expresión de MMP-2 fue coincidente con el mostrado por GS principalmente a nivel de los endfeet y de procesos celulares (en amarillo). Abreviaturas: GCL, capa de células ganglionares; INL, capa nuclear interna; ONL, capa nuclear externa. Escala: 50  $\mu$ m

Estos resultados en su conjunto demuestran que en el modelo *in vivo* el patrón de expresión de MMP-2 cambia en las retinas de animales sometidos al modelo OIR.

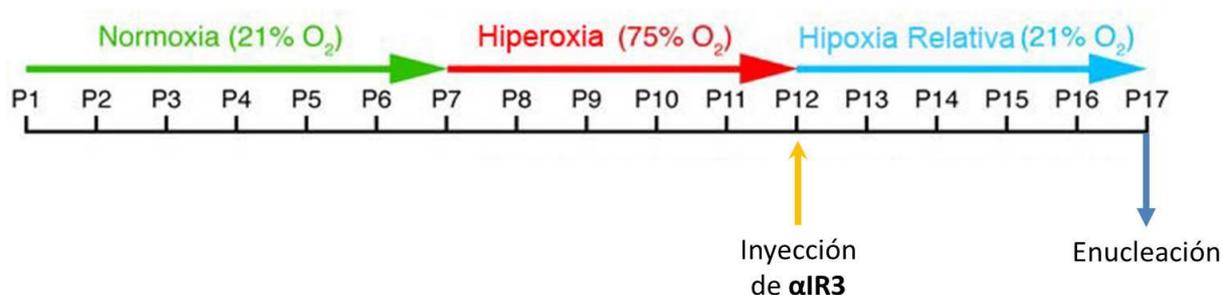
***La administración intraocular del anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3 inhibió la NV y disminuyó el área de vaso obliteración en ratones OIR.***

Se conoce que IGF-1 es un factor de crecimiento necesario tanto para el correcto desarrollo vascular retinal como para el proceso de neovascularización que se observa en patologías como la

ROP y la RD (112, 115, 171). Además, trabajos previos demuestran que animales artificialmente deficientes del gen de IR o IGF-1R a nivel de CE protegen a animales OIR de desarrollar NV retinal (166, 167). Estos antecedentes junto a los resultados obtenidos en este trabajo tanto en el modelo *in vitro* como en el *in vivo* convierten al sistema IGF-1/IGF-1R en un interesante blanco terapéutico en las retinopatías.

En la actualidad los tratamientos existentes para estas enfermedades (PRP, vitrectomía, inyección intraocular de anticuerpos monoclonales) intentan detenerlas pero solo en casos muy puntuales logran mejorar la pérdida de la visión (71). Por lo cual los tratamientos deben ser re direccionados y hoy es necesario que apunten, además de a la eliminación de NV vitreoretiniana, a promover la revascularización fisiológica retinal a fin de rescatar a neuronas y células gliales de la muerte por falta de oxígeno y nutrientes.

En función de ello y con el propósito de analizar el efecto de IGF-1 en los procesos de retinopatías proliferativas, en esta etapa del trabajo de tesis decidimos inyectar en el día P12 el anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3 en retinas de animales OIR así como en controles de aire. Este anticuerpo, como mencionáramos previamente, es capaz de inhibir específicamente la unión de IGF-1 a su receptor (172), así como de impedir la fosforilación y activación de las vías de señalamiento intracelular acorde a lo mostrado en el modelo *in vitro*, para la línea de CM, MIO-M1.

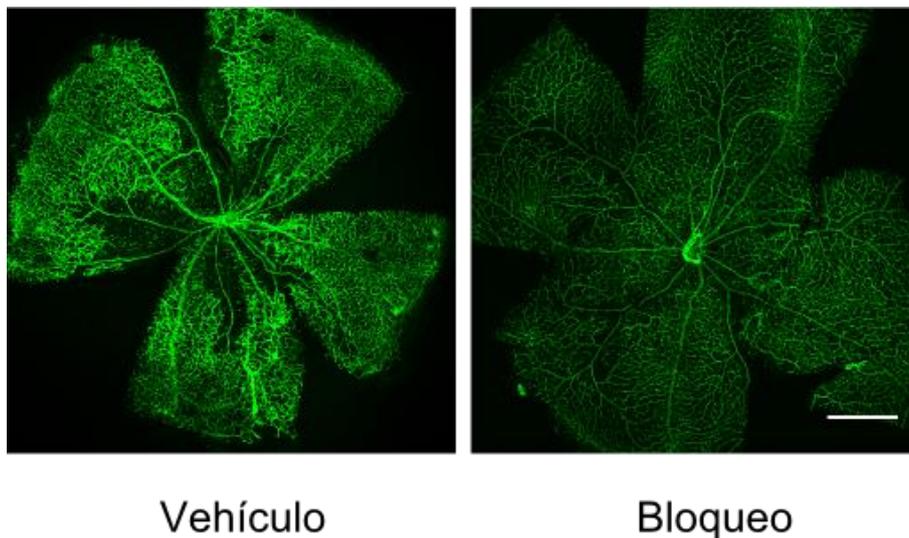


**Esquema 5.2: Protocolo de inyección de  $\alpha$ IR3 en el modelo OIR.** Al finalizar la exposición a hiperoxia en el día postnatal 12 (P12), los animales fueron inyectados con el anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3 o con vehiculo (PBS). El sacrificio de los mismos se realizó en el día P17. Modificado de Grant MB y col., 2008.

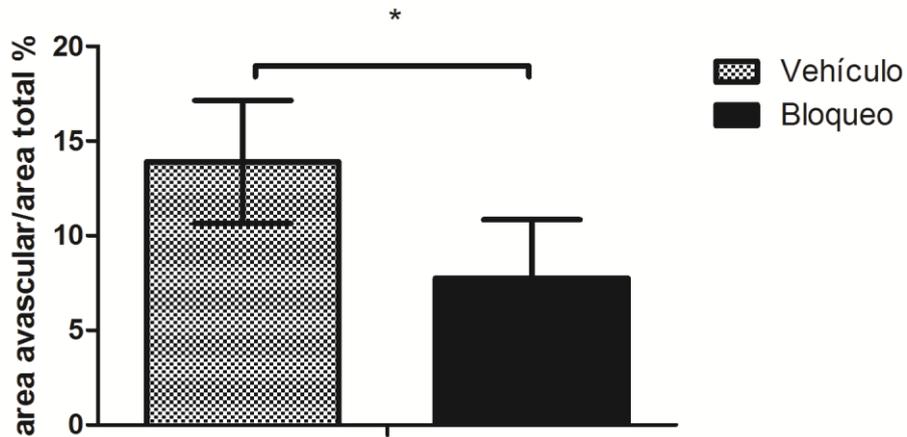
En este ensayo experimental los animales recibieron una única dosis de anticuerpo de bloqueo en el día P12 y luego fueron sacrificados en el día P17 (**Esquema 5.2**). Cabe recordar que el

día P12 coincide con la salida de los animales OIR a aire normal, periodo en donde el tejido retinal comienza a experimentar la hipoxia relativa.

La inyección intraocular de  $\alpha$ IR3 en animales P12 OIR produjo a P17 en una disminución de los ovillos neovasculares y aceleró la revascularización de la retina central en comparación con los controles OIR inyectados con vehículo. En animales de aire la vascularización retinal no sufrió ninguna alteración luego de la inyección con  $\alpha$ IR3, mostrando una morfología similar a la inyectada con vehículo (**Figura 5.13**). En animales OIR, el análisis cuantitativo demostró que la zona avascular se redujo en un 45% (**Figura 5.14**). Por lo tanto, estos resultados demuestran que el anticuerpo de bloqueo contribuyó a reconstruir una morfología vascular relativamente normal en la retina isquémica.



**Figura 5.13.** La inyección del anticuerpo de bloqueo ( $\alpha$ IR3) acelero la revascularización retinal en el modelo de OIR. Imágenes representativas de flatmount de animales inyectados con vehículo y con anticuerpo de bloqueo ( $\alpha$ IR3) y sacrificados a 17. Las retinas fueron teñidas con GSA (verde) y luego montadas como retinas completas para su posterior análisis, por microscopia confocal. Las áreas avasculares de cada retina fueron posteriormente cuantificadas. Escala: 150  $\mu$ m.



**Figura 5.14. La inyección del anticuerpo de bloqueo ( $\alpha$ IR3) reduce el área avascular en retinas OIR.** Se cuantificaron las áreas avasculares en animales inyectados con bloqueo (7 retinas/ratones) y en animales OIR inyectados solo con vehículo (6 retina/6 ratones) y sacrificados a P17. Siendo \*  $p < 0,05$ .

Finalmente, estos resultados proponen al bloqueo del receptor de IGF-1 como posible alternativa terapéutica para el tratamiento de las retinopatías proliferativas retinales como la ROP y la RD.

## CONCLUSIONES CLAVES DEL QUINTO CAPITULO

En el modelo *in vivo* demostramos:

- ✓ En retinas completas la presencia de zonas avasculares y NV a juzgar por la tinción con la lectina *Griffonia simplicifolia* isolectina B4 (GSA),
- ✓ Por análisis histológico la presencia de ovillos neovasculares en la cavidad vítrea así como reducción en el espesor de las capas retinales después del tratamiento con oxígeno,
- ✓ Mediante ensayo de TUNEL células apoptóticas en la capa de CG así como en la INL extendiéndose a la ONL hacia el P26,
- ✓ Por ensayos de IF, la expresión de IGF-1R en células GFAP positivas,
- ✓ A través de ensayos de Western blot la expresión diferencial de MMP-2 y MT1-MMP en homogenatos retinales,
- ✓ La localización preferencial de MMP-2 a nivel de procesos celulares así como en el modelo de OIR a nivel de los endfeet de CM,
- ✓ La inhibición de la NV así como la disminución del área de a vascular en animales OIR luego de la administración por vía intraocular del anticuerpo de bloque  $\alpha$ IR3, dando como resultado una morfología vascular relativamente normal en la retina isquémica.

## Capítulo VI

# *Discusión*

Tanto la proliferación como la migración celular son eventos claves durante el proceso de neovascularización, la cual además, se encuentra asociada a una excesiva proteólisis de la matriz extracelular (MEC). Dentro de las enzimas proteolíticas capaces de degradar la MEC se encuentran las metaloproteinasas cuya expresión puede ser inducida por diferentes factores de crecimiento dependiendo del tipo celular y de las condiciones temporales y espaciales del microambiente pericelular. IGF-1 es un factor de crecimiento que ejerce múltiples efectos, mitogénicos, de diferenciación, anti-apoptóticos y metabólicos, sobre diferentes tipos de células pero también participa en procesos patológicos como la neovascularización retinal. Es conocido que la neovascularización o angiogénesis, es un mecanismo altamente regulado y es el principal involucrado en la expansión del entramado vascular. Sin embargo la desregulación de este proceso es la característica de diversas enfermedades que van desde el cáncer hasta la diabetes. En este sentido, ha sido demostrado que en cáncer de pulmón y en células musculares vasculares lisas, IGF-1 induce la expresión de MMP-2 (173, 174) pero también es capaz de incrementar la actividad de MMP-9 en una línea celular derivada de macrófagos así como en mioblastos humanos (175, 176). A nivel de la retina, diferentes enfermedades isquémicas como la ROP y la RDP involucran neovascularización (177-179). Sin embargo, al presente hay pocas evidencias que asignen un rol funcional específico a IGF-1 y su receptor, en cuanto a la regulación de metaloproteinasas, por lo cual conocer la función biológica de este sistema en los procesos neovasculares retinales proporcionaría una herramienta útil para la prevención y tratamiento de las mencionadas patologías.

En función de estos antecedentes, el objetivo principal de esta Tesis fue investigar la participación del sistema IGF-1/IGF-1R durante procesos involucrados a la neovascularización retinal en dos modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* bajo condiciones de normoxia e hipoxia.

#### *Modelo in vitro*

IGF-1 es una hormona polipeptídica que ejerce sus acciones biológicas a través de la unión a su receptor, IGF-1R, un receptor tirosincinasa (RTK). La unión de IGF-1 induce la fosforilación de residuos tirosina específicos en el receptor. Estos residuos activados interactúan con moléculas adaptadoras tales como Shc y proteínas sustratos del receptor de insulina como IRS-1, lo cual conduce a la activación de las vías de señalamiento intracelular, ya conocidas, MAPK/ERK y PI3K/AKT (180). La vía por excelencia responsable de promover la proliferación celular, es la vía

MAPK. Esta vía está compuesta por diferentes enzimas con actividad cinasa que son activadas secuencialmente por procesos de fosforilación. Las MAPK cinasas son capaces de activar diferentes factores de transcripción a nivel citoplasmático y nuclear. Por otra parte, la vía de señalización asociada a las cinasas PI3K/AKT resulta clave en los procesos celulares asociados con crecimiento y supervivencia celular (120). Si bien ambas vías se influyen recíprocamente, dependiendo del tipo celular pueden conducir a respuestas similares o diferentes, lo cual genera importantes consecuencias tanto fisiológicas como patológicas demostrando la importancia en la selectividad de vías que es capaz de activar el sistema IGF-1/IGF-1R.

En un intento de esclarecer esta selectividad, en la primera etapa de esta tesis demostramos que IGF-1R se expresa en las células gliales de Müller y que la incubación de las células MIO-M1 con IGF-1 produjo la fosforilación de su receptor a partir de los 10 minutos, incrementando la señal con la duración del estímulo, pero no en los niveles totales de la proteína IGF-1R (**Figura 3.1**). Además pudimos demostrar que la unión de IGF-1 a su receptor específico produjo un aumento significativo de los niveles de AKT y ERK1/2 fosforilados, también dependientes del tiempo, a todas las concentraciones (0.1, 1 y 10 nM) evaluadas (**Figura 3.2**). Sin embargo, la fosforilación significativa de AKT demostró ser más temprana e intensa en su respuesta al estímulo que ERK lo cual demuestra un tipo de selectividad de vías en las células gliales de Müller (**Figura 3.2 A-B**). A su vez, se evidenció que un anticuerpo de bloqueo que se une específicamente a la subunidad extracelular  $\alpha$  y  $\beta$  del IGF-1R ( $\alpha$ IR3) abolió completamente la fosforilación del receptor y la activación de la vía PI3K/AKT, mientras que disminuyó significativamente la vía de MAPK/ERK a valores menores que el control en ensayos de Western blot (**Figura 3.3**), demostrando de esta manera la especificidad en la activación de dichas vías por IGF-1. Uno de los intermediarios de la vía AKT es la proteína PI3K cuya fosforilación puede ser bloqueada por inhibidores farmacológicos como LY-294002 mientras que en la vía MAPK-ERK1/2, la actividad de la proteína MEK puede también ser inhibida por otro inhibidor farmacológico como PD-980059. Para constatar que la activación de ambas vías inducida por el sistema IGF-1/IGF-1R estaba mediada por la activación de sus mediadores específicos MEK así como PI3K evaluamos los efectos de PD-980059 y LY-294002 sobre la activación de las mismas. Los resultados mostraron que la pre-incubación de las células MIO-M1 con LY-294002 o PD-980059 produjo una disminución total en la activación de las vías PI3K/AKT así como de MAPK-ERK1/2, luego del estímulo con IGF-1 (**Figura 3.4**).

En trabajos previos de nuestro laboratorio, fue demostrado que tanto IGF-1 así como Insulina son capaces de regular la síntesis de MMP-9 en una línea celular de macrófagos murinos J774A.1 (175). Además otros autores han demostrado, en un sistema celular tumoral, que el sistema IGF-I/IGF-1R puede regular la síntesis de la otra gelatinasa, MMP-2, a través de la vía PI-3K/AKT, pero al mismo tiempo producir una señal inhibitoria vía Raf/MEK/ERK. El efecto neto de estas señales regulatorias opuestas parece depender, entre otros factores, de la concentración de ligando. Así, concentraciones de ~10 ng/ml de IGF-1, activan la vía PI-3K/AKT inclinando la balanza a favor de la inducción de la síntesis de MMP-2 mientras que a dosis mayores la vía ERK parece dominar, con la consecuente inhibición de la síntesis de MMP-2 (174, 181). Si bien los mecanismos responsables de la activación preferencial de una vía u otra no están actualmente esclarecidos, las diferencias en el número de receptores sobre la superficie celular así como la expresión de los sustratos intermedios parecerían también, jugar un papel importante (182).

La vía de PI3-K ha sido identificada como la principal vía de transducción de señales del sistema IGF-1/ IGF-1R en diferentes tipos celulares, y su actividad ha sido demostrado ser crítica para la supervivencia celular, mitogénesis, y la regulación de la síntesis de distintas proteínas (16, 47-52). Por lo cual, el grado en el cual diferentes sistemas celulares utilizan preferencialmente una u otra vía para transmitir las señales provenientes de IGF-1R dependerá del contexto celular y de los niveles y accesibilidad de los sustratos como IRS-1 o Shc (40, 53, 54) los cuales se encuentran corriente abajo del receptor activado. Interesantemente y en concordancia con lo discutido previamente, los resultados obtenidos en esta primera etapa, constituyen la primera evidencia de la capacidad del sistema IGF-1/IGF-1R de mediar eventos de señalización en células gliales de Müller, activando de manera preferencial la vía de PI3K.

### *Regulación de MMP-2*

El proceso de NV retinal, que se produce en distintas patologías isquémicas proliferativas como ROP y RDP, se caracteriza por realizarse de una manera altamente organizada. Una etapa clave en la formación de nuevos vasos es la degradación y penetración de la membrana basal de los capilares, por CE activas (183, 184), lo cual es facilitado por la actividad extracelular de proteinasas como las MMPs. En este proceso NV, las CM son reconocidas por su aporte en MMPs así como en factores pro-angiogénicos fundamentales para el desarrollo del mismo. Además de VEGF, las CM son capaces de sintetizar IGF-1, factor necesario durante la iniciación, progreso y resolución de

estas patologías. Por lo que en esta etapa nos enfocamos en analizar el efecto de IGF-1 sobre la regulación de la actividad de MMP-2 sintetizada por la línea MIO-M1. En trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró por RT-PCR que IGF-1 no modifica los niveles de transcritos de MMP-2 y de TIMP-2 (185). Aquí, nuestros resultados demuestran que bajo estímulo de IGF-1 las CM produjeron una disminución en la actividad de MMP-2 en los sobrenadantes de cultivo, respecto a células control (**Figura 3.5**) siendo esta regulación específica de la interacción IGF-1/IGF-1R (**Figura 3.6**) y dependiente de la activación de la vía de señalamiento intracelular PI3K (**Figura 3.7**). Estos resultados demuestran un nuevo mecanismo de regulación de MMPs, a nivel de actividad, en células gliales no descrito anteriormente en ninguna célula retinal. Así estos resultados dejan expuesta la posibilidad de que las MMPs sintetizadas por las CM sean secretadas al medio extracelular y su actividad regulada por factores como IGF-1 dentro de la retina, y que esta manera puedan influenciar los procesos vasculares antes mencionados actuando por ejemplo a nivel de células destinadas para este fin, como las CE.

#### *Migración y regulación de la distribución de MMP-2, MT1-MMP y IGF-1R en la superficie celular*

Los eventos de movilidad celular dentro de la retina constituyen un evento fisiológico durante el desarrollo a fin de que este tejido adquiera la localización exacta de los distintos tipos celulares en las distintas capas del mismo. La CM resulta ser una de las últimas células en diferenciarse en la retina y su estratégica localización permite el contacto con CE favoreciendo el proceso de neovascularización bajo condiciones de hipoxia (14). Además, recientemente ha sido descrito que las CM poseen características de células madres neuronal sugiriéndose que estas células podrían ser utilizadas como terapia celular a fin de restituir la función retinal en diferentes desórdenes neurodegenerativos (186). Al respecto, los desórdenes isquémicos proliferativos antes mencionados además de producir neovascularización están asociados con muerte neuronal por lo cual, las CM serían claves para la regeneración neuronal. Ha sido demostrado que células MIO-M1, una línea celular inmortalizada de CM, pueden integrarse a retinas de ratas y ratones con daños degenerativos y diferenciarse a neuronas *in vivo* (144, 186). Sin embargo uno de los principales inconvenientes presentados es el acceso al destino final así como la sobrevivencia en la retina de las células trasplantadas. Por esto mismo una de las estrategias propuestas ha sido la regulación de MMP-2, a fin de proporcionar un avance en el desarrollo de los trasplantes retinales (187). Conociendo que estos procesos de movilidad celular implican activación proteolítica y que IGF-1 es

capaz de regular estos procesos, a continuación evaluamos por ensayos de Western blot la expresión de MMP-2 y de MT1-MMP bajo estímulo con IGF-1. Los resultados obtenidos mostraron que IGF-1 produce una acumulación de MMP-2 (**Figura 3.8, 3.9**) pero no de MT1-MMP (**Figura 3.10, 3.11**) en lisados de CM.

Teniendo en cuenta estos hallazgos, posteriormente decidimos evaluar por inmunofluorescencia la localización de MMP-2 así como de las proteínas de membrana MT1-MMP y IGF-1R sobre la membrana de células MIO-M1 no permeabilizadas adsorbidas sobre colágeno tipo I simulando lo que ocurre *in vivo*. Aquí observamos una localización preferencial de MMP-2, MT1-MMP y del receptor de IGF-1 hacia los bordes celulares así como importantes acúmulos sobre la membrana celular (**Figuras 3.12, 3.13 y 3.14**). Estos resultados, en conjunto, demuestran que la interacción de IGF-1 con IGF-1R produce una reorganización de los componentes proteicos constituyentes del complejo trimolecular encargado de activar a MMP-2. Los cambios hasta aquí observados en CM tratadas con IGF-1, nos llevaron a pensar que el sistema IGF-1/IGF-1R podría estar involucrado en la migración celular. Utilizando ensayos de cierre de la herida (*wound healing*) pudimos demostrar que efectivamente IGF-1 modificó la capacidad migratoria de CM adsorbidas sobre proteínas de matriz extracelular tales como colágeno tipo I y laminina (**Figura 3.15**) y que este evento fue dependiente de la interacción con su receptor. Un interesante hallazgo publicado previamente demuestra, en fibroblastos, roles diferentes para las MMPs secretadas respecto a aquellas ancladas a membrana. Al respecto señalan que si bien las MMPs solubles son efectivas en procesos de degradación solo aquellas asociadas a proteínas de membrana como MT1-MMP pueden tener un rol efectivo a nivel pericelular de manera consistente con un fenotipo invasivo (188). Nuestros resultados claramente demuestran que MMP-2 se acumula en lisados celulares lo cual indica que IGF-1 induce un fenotipo invasivo en las CM. Sin embargo, a que proteínas de membrana se uniría MMP-2 es uno de los interrogantes claves a resolver en la actualidad. En este sentido, ha sido reportado que además de MT1-MMP otra proteína candidata sería LRP-1, un receptor de membrana de la familia de los receptores de las LDL, ya que el silenciamiento de LRP-1 impide la invasión de células tumorales a pesar de una incrementada actividad proteolítica pericelular (189). Además, otro grupo de autores han demostrado una colocalización entre  $\beta 1$  integrina y MMP-2 en el frente celular de astrocitos migratorios (190). Dado que la CM posee entre sus proteínas de membrana  $\beta 1$  integrina resultaría de interés profundizar este mecanismo relacionado a la proteólisis pericelular. Finalmente, si bien la mayoría de los estudios de proteólisis

pericelular apuntan a procesos tumorales los resultados obtenidos por nosotros en el modelo *in vitro* podrían ser aprovechados desde dos puntos de vista: en procesos neurodegenerativos para estudios de trasplantes retinales así como durante el desarrollo retinal remarcando la posible función de IGF-1 como regulador de la migración celular hacia las distintas capas retinales.

### *Hipoxia*

Las retinopatías proliferativas, como la ROP y RD que culminan con el desarrollo de NV, son el resultado de una condición hipóxica tisular generalmente precedida por la no-perfusión de la retina o una disminución en la tensión de oxígeno provocada por la pérdida de capilares retinales (191, 192). La hipoxia es el principal disparador de mecanismos que alteran el balance de factores pro- y antiangiogénicos, estabilizando a HIF y generando los efectos neovasculares. Sin embargo otros factores independientes de hipoxia como IGF-1, también participan en la neovascularización. En retina, las CM que son las principales responsables de mantener la homeostasis retinal y modular diversos factores del microambiente retinal, responden a hipoxia por medio de HIF induciendo la expresión de factores de crecimiento como VEGF (88). Por lo tanto habiendo analizado en el Capítulo 3 el efecto de IGF-1, un factor independiente de hipoxia, sobre la regulación de MMP-2 en CM, nuestro siguiente objetivo fue analizar el efecto que la hipoxia podía tener sobre esta regulación. De esta manera se pretendió correlacionar los dos principales eventos que convergen en procesos tan complejos como las retinopatías.

Los resultados mostraron que si bien la relación de MMP-2/pro-MMP-2 aumentó en condiciones de hipoxia respecto a normoxia, el efecto de IGF-1 sobre la regulación de MMP-2 en hipoxia fue similar al demostrado en condiciones de normoxia (**Figura 4.1**). Así mismo pudimos demostrar por ensayos de Western blot que la hipoxia tampoco modificó la expresión proteica de MT1-MMP inducida por IGF-1 en este sistema celular (**Figura 4.2**). Un trabajo reciente demuestra que bajo condiciones de hipoxia (1 %O<sub>2</sub>), cultivos primarios de células de Müller así como la línea de células gliales MIO-M1 fueron capaces de estabilizar HIF-1  $\alpha$  pero no de producir un incremento en los niveles de expresión de MMP-2 así como de su ARNm. A su vez postulan que el VEGF generado por hipoxia en las CM actuaría a nivel de las CE induciendo expresión y actividad de MMP-2 (88). A lo largo de este trabajo varias veces hemos remarcado la interrelación que existe entre los efectos producidos por IGF-1 y su paralelismo con las acciones de VEGF durante los procesos neovasculares. En concordancia con este trabajo, los resultados obtenidos en esta etapa nos

permiten concluir que IGF-1 regula la activación de MMP-2 en CM de manera independiente de hipoxia.

### *Modelo in vivo*

El factor de crecimiento similar insulina (IGF-1), y su receptor (IGF-1R), son proteínas que están involucradas en los procesos de proliferación, diferenciación y migración de distintos tipos celulares durante el desarrollo, pero este Sistema resulta también clave en el proceso de vascularización. Si bien los primeros estudios sobre este factor de crecimiento y su receptor, se realizaron en el área de tumores (193), hoy se conoce que bajo condiciones fisiológicas, IGF-1 es necesario tanto para el desarrollo ocular como para la correcta vascularización del mismo (171). Sin embargo el Sistema IGF-1/IGF-1R también participa en procesos patológicos retinales como la ROP y la RDP (153). Si bien ambos procesos fisiológicos como patológicos conllevan la presencia de NV siendo principalmente regulados por VEGF, su sola presencia no es suficiente para desencadenarlos. Se conoce que IGF-1 es un potente inductor de la expresión de VEGF a través de la estabilización de HIF-1 (194) y que además pueda actuar cooperativamente con VEGF para estabilizar los vasos recién formados (195). Cuando los niveles de IGF-1 son inadecuados, las cascadas de señalamiento intracelular inducidas por VEGF en las CE disminuyen significativamente, los vasos dejan de crecer y la retina avascular se vuelve hipoxica acumulándose VEGF en el vítreo (112). Estos antecedentes resaltan el rol clave que posee el Sistema IGF-1/IGF-1R en orquestar tanto los procesos de vascularización fisiológica como la NV patológica (195) y hoy se conoce que los niveles de IGF-1 deben ser finamente regulados para evitar patologías NV (118). Habiendo demostrado los efectos de IGF-1 e hipoxia en un sistema celular *in vitro* es que a continuación nos propusimos evaluar los efectos de estos factores en un modelo más complejo de neovascularización inducida por hipoxia como el modelo de OIR, previamente estandarizado en nuestro laboratorio (**Figura 5.1 a 5.3**). Para ello en primer lugar evaluamos por ensayos de Western blot la expresión de IGF-1R en extractos de retina neural en diferentes días del desarrollo así como en el modelo de OIR. Los resultados mostraron que en ambas condiciones (Aire y OIR) IGF-1R presento un máximo de expresión en el día P18 (**Figura 5.4**). Esto demuestra que la hipoxia no modifica la expresión proteica de IGF-1R. Si bien la localización de IGF-1R ha sido evaluada en retina previamente por varios autores y existe algún tipo de discrepancia entre lo descrito por ellos, fundamentalmente debido a las diferentes técnicas y modelos animales utilizados no hay al

presente un estudio que demuestre la expresión del mismo a nivel de proteína. Así la mayoría de los estudios demuestran expresión de ARNm para IGF-1R en las siguientes capas retinales: GCL, IPL, INL, mientras que a nivel de ONL no todos los trabajos coinciden (109, 169, 196, 197). Aquí demostramos por primera vez la expresión de IGF-1R a nivel de proteína durante diferentes días del desarrollo retinal así como la redistribución que sufre IGF-1R en condiciones de hipoxia en el modelo de OIR. El análisis por inmunofluorescencia demostró que a P3 la expresión de IGF-1R estuvo homogéneamente distribuida a lo largo de todo el espesor de la retina, mientras que hacia P12 se observó principalmente en la capa de GC, en la INL y en CE y con menor intensidad en la Membrana Limitante Interna (MLI) y ONL (**Figura 5.5**) manteniéndose este patrón de expresión en los diferentes días analizados. En los animales OIR, observamos hacia el P17 un significativo incremento en la expresión de IGF-1R en la zona adyacente a la cavidad vítrea, capa de CG así como en la MLI, zona donde se concentran las CE de vasos normales así como de ovillos neovasculares conjuntamente con los *endfeet* de las CM (**Figura 5.5**). Hacia el P20, el patrón de expresión de IGF-1R en la retina interna se modificó haciéndose similar a P20 aire, observándose una distribución coincidente con los *endfeet* de las células de Müller (**Figura 5.5**). Finalmente utilizando un marcador de células gliales como GFAP pudimos corroborar que IGF-1R se expresa durante el desarrollo a nivel de astrocitos entre otras células y bajo condiciones OIR en CM (**Figura 5.6, 5.7**). Es conocido que bajo condiciones de hipoxia, como el modelo de OIR, la célula de Müller experimenta gliosis incrementando la expresión de filamentos intermedios (GFAP) como vimos anteriormente (198). Además bajo esta situación la CM es también capaz de modificar la síntesis de factores de crecimiento (199). Nuestros resultados indican que la CM en el modelo de OIR incrementa la localización de IGF-1R a nivel de la cavidad vítrea donde se origina la formación de los NV (**Figura 5.8**), lo cual podría estar asociado a una regulación de la actividad de MMPs a ese nivel donde la actividad proteolítica extracelular esta exacerbada.

#### *Análisis de la distribución de MMP-2*

Las MMPs regulan una amplia variedad de funciones celulares tales como la apoptosis (200) y la. NV, entre otros. Numerosos trabajos en estos últimos tiempos han demostrado la participación de MMPs en patologías como cáncer, en donde hay un incrementado remodelamiento de la MEC asociado a procesos invasivos (123, 138, 201-203) y de migración (121, 204) así como a fenómenos de NV (205) lo que conlleva a la progresión de las enfermedades tumorales (135, 206-210). Pero

este grupo de proteasas también ha sido relacionado a procesos vasculares involucrados en distintas patologías en general (124, 130). Estudios clínicos con inhibidores de MMPs de amplio espectro, han demostrado la necesidad de establecer los roles particulares de estas MMPs en etapas específicas de la progresión de la enfermedad, a fin de poder diseñar inhibidores más selectivos con menores efectos adversos. Dado que el proceso de vascularización retinal en ratones ocurre posterior al nacimiento y que además es un proceso tiempo dependiente, el ojo se convierte en un órgano especial a fin de comprender los eventos involucrados en procesos tanto fisiológicos como patológicos de vascularización y NV retinal así como la participación de diferentes moléculas asociadas a la excesiva proteólisis de la MEC, entre ellas las MMPs. En este sentido, pacientes diabéticos han mostrado un incremento en los niveles de MMPs medidas en el humor vítreo (92-94), así como en membranas fibrovasculares (89, 96).

Si bien varios trabajos han intentado esclarecer el rol que posee tanto MMP-2 como MMP-9 en el proceso de NV, los resultados han sido contradictorios (85, 131). Ha sido, sin embargo postulado un rol dual para MMP-2 y MMP-9. En la patogénesis de la RD en una primera etapa actuarían promoviendo la muerte de las CE capilares (mediante una acción intracelular y de estrés mitocondrial)(126, 129, 200, 211, 212) y en una fase tardía promoviendo la NV (mediante una acción extracelular) (128). Previamente, ha sido demostrado que la MMP-9 se requiere para la liberación de células progenitoras endoteliales (EPC) de medula ósea no teniendo MMP-9 acción directa sobre el proceso NV (213). En todos estos trabajos ha sido analizado el rol de las MMPs en los procesos vasculares y NV pero postulando a las CE como las únicas células responsables de la síntesis y regulación de la actividad de MMPs. Sin embargo, hoy se conoce que además de las CE otras células retinales como las del RPE (214) y las CM (23) poseen capacidad para sintetizar y regular estas proteasas. Recientemente ha sido publicado en el modelo de OIR que bajo condiciones de hipoxia la estabilización de HIF-1 $\alpha$  en CE produce un incremento en la expresión de MMP-2 en esas células mientras que en CM la acumulación de HIF-1 $\alpha$  incrementa los niveles de VEGF, el cual producirá aumento en la expresión de MMP-2 en las CE vecinas (88).

En este trabajo nosotros demostramos, por ensayos de Western blot, que la hipoxia en el modelo de OIR aceleró la expresión de proteínas como MMP-2 y MT1-MMP (P15) respecto a lo observado en animales mantenidos en aire (P 18) (**Figura 5.9**). El periodo de tiempo en el cual se observó el aumento tanto de MMP-2 como de MT1-MMP en el modelo de OIR, fue cercano al pico de NV en este proceso, lo cual demuestra la exacerbada actividad proteolítica responsable de

la degradación de la MEC, proliferación y migración de CE. Posteriormente analizamos por inmunofluorescencia la localización de MMP-2 en el tejido retinal, observándose que células GS positivas (CM) expresaban MMP-2 tanto en condiciones control (aire) como en el modelo de OIR (**Figura 5.10**). Sin embargo, luego de un evento de hipoxia relativa (OIR) esta localización incremento hacia los *endfeet* de las CM (**Figura 5.12**) respecto a animales control (**Figura 5.11**). Estos resultados claramente demuestran que MMP-2 en el modelo *in vivo* se expresa en CM y que su localización se modifica cuando los animales son expuestos al modelo de OIR, postulando a las CM como principales responsables de la expresión de MMP-2 en la retina, lo cual concuerda con resultados previos presentado por otros autores (23). Además, el cambio de localización experimentado por MMP-2 en las CM en los animales expuestos a hipoxia, lo cual demuestra su acumulación en la ILM donde los *endfeet* de las CM están próximos a la cavidad vítrea conjuntamente con los sitios de mayor gliosis, podría ser el responsable de los aumentos de concentración de MMP-2 en humor vítreo observado por nosotros (215) así como por otros autores (88) en pacientes con retinopatías. Finalmente, ha sido demostrada que la elevada expresión de MMPs en las retinopatías produce un aumento de la permeabilidad vascular, por degradación proteolítica de la proteína ocludina, lo cual llevaría a una disrupción de la barrera hemato-retiniana-retinal permitiendo el pasaje de MMPs hacia el humor vítreo, entre otras proteínas (25).

### *Bloqueo de la función de IGF-1R*

Las vías de señalización de VEGF y sus receptores son, sin duda, las más conocidas y mejor validadas en el proceso NV (216-218). No obstante los anti-angiogénicos tendientes a bloquear estas vías, en muchos casos, inducen al tiempo de tratamiento nueva generación de NV. En este contexto resulta crucial la generación de nuevos conocimientos que nos permitan ampliar el espectro de potenciales blancos terapéuticos, tanto a nivel celular como molecular, con el fin de desarrollar nuevas estrategias de tratamiento. A nivel retinal al igual que en tumores, en los últimos años, se ha incrementado sustancialmente la búsqueda de estrategias y mediadores tendientes a normalizar la vasculatura, además de eliminar la NV. En este sentido, en tumores se pretende incrementar la eficacia de las terapias convencionales mientras que a nivel retinal se busca la llegada de oxígeno y nutrientes hacia el tejido afectado por los NV, evitando la neurodegeneración del mismo.

Con el objetivo de encontrar un mejor tratamiento, varios trabajos han utilizado animales artificialmente deficientes del gen del receptor de IGF-1 a nivel de CE (166, 167), sometidos al modelo de OIR. En estos animales se observó una disminución de la NV, demostrando que la disminución en la expresión de IGF-1R en las CE retinales, los protegía de desarrollar NV inducida por hipoxia, pero no afectaba el normal desarrollo de la vasculatura (166). Cuando, en otros trabajos, se analizaron animales que carecían totalmente de este receptor también en las CE, se observó que también el desarrollo vascular normal era afectado (112, 171). Estos resultados demuestran la importancia del Sistema IGF-1/IGF-1R en la regulación de los procesos vasculares y NV de la retina. Dado que como demostramos a lo largo de esta tesis, IGF-1R además de estar presente en CE, es expresado por otras células retinales (**Figura 5.6**), resultó interesante analizar la regulación que ejerce este receptor sobre la actividad proteolítica extracelular en el modelo *in vivo*. Para ello, el siguiente propósito fue no solo inhibir la función de IGF-1R en CE, sino a nivel de toda la retina mediante la inyección intraocular de un anticuerpo de bloqueo. Previos estudios han sido realizados con objetivos similares por otro grupo de investigación, en donde los animales recibieron péptidos antagonistas de la interacción IGF-1/IGF-1R por vía sistémica (195), con la desventaja de que no solo implicaron al tejido ocular en estos estudios sino también a otros como el SNC, donde este receptor también está presente. Los resultados obtenidos en este trabajo han demostrado que el uso de este péptido inhibe la NV *in vivo*, así como regula la activación de la vía de señalamiento MAPK/ERK inducida por VEGF.

En la retina distintos tipos celulares contribuyen a la producción de VEGF: CE, CG, astrocitos, MC y RPE. Sin embargo, modelos *in vivo* han identificado a las CM como las principales productoras de este factor durante procesos NV (219). Además, se ha demostrado que IGF-1 puede regular la expresión de VEGF y su secreción de manera dependiente e independiente de HIF-1 en células RPE (220). Tratamientos con IGF-1 en pacientes con RDP tanto a nivel local como sistémico han demostrado ser contraproducentes en la evolución de la enfermedad, algo que en parte puede ser explicado por la concomitante inducción de VEGF. En este mismo sentido, en la actualidad uno de los principales objetivos del tratamiento en niños prematuros con ROP es la normalización de los niveles de IGF-1 sistémicos ya que ha sido demostrado que se necesita una fina regulación de los niveles de este factor para evitar la producción de fenómenos NV dada su íntima asociación a los niveles de VEGF.

En función de estos antecedentes el objetivo propuesto en esta última etapa fue analizar el efecto del bloqueo del IGF-1R sobre la regulación de la actividad proteolítica extracelular involucrada en los procesos de NV y revascularización de la retina en el modelo de OIR. Los animales fueron inyectados con el anticuerpo de bloqueo en dosis única a P12 por vía intraocular. En este día en el modelo OIR, los animales pasan de un ambiente de hiperoxia a aire normal y es cuando comienzan a sentir la hipoxia relativa, aumentando las concentraciones de VEGF y también de MMPs (**Figura 5.9**). Si durante este periodo, la acción de IGF-1 puede ser disminuida por inhibir la interacción con su receptor el efecto final debería resultar en una eventual reducción del proceso NV, al modular no solo la acción de IGF-1 sobre las MMPs sino también por vía indirecta, la participación de VEGF en este proceso. Cabe aclarar que la dosis de bloqueo seleccionada fue coincidente con aquella utilizada en ensayos de inhibición *in vitro* lo cual supone además, en ensayos *in vivo*, una degradación o inactivación del anticuerpo con el paso del tiempo. Los resultados obtenidos en la **Figura 5.13 y 5.14** mostraron una clara participación del Sistema IGF-1/IGF-1R en los animales OIR inyectados con anticuerpo de bloqueo al disminuir la presencia de NV así como el área avascular retinal respecto a animales inyectados con vehículo solamente (**Figura 5.13 y 5.14**).

En función de los resultados obtenidos por nuestro grupo y también en relación a los de otros autores, uno podría inferir que el bloqueo de IGF-1 al disminuir la cantidad de MMP-2 activa a nivel de los *endfeet* de las CM así como de CE, reduciría el proceso de migración endotelial y la formación de NV, mientras que por vía indirecta, al modificar la regulación de la vía MAPK/ERK estimulada por VEGF (no demostrado en este trabajo de Tesis) ayudaría a una controlada revascularización retinal tendiendo a la normalización de la misma.

Estos hallazgos, en su conjunto, convierten al Sistema IGF-1/IGF-1R en un Sistema clave para intervenciones terapéuticas futuras en enfermedades neovasculares inhabilitantes para la visión, como la ROP y la RDP.

## ***Perspectivas futuras***

A nivel de retina neural, el variado componente celular (endotelio, pericitos, glia, neuronas) provee una importante oportunidad para estudiar aspectos moleculares y celulares relacionados no solo con el desarrollo vascular y remodelamiento tisular sino con desórdenes isquémicos proliferativos que involucran proteólisis, migración celular y degeneración neuronal. Por lo tanto, el hallazgo en este trabajo de Tesis de que el Sistema IGF-1/IGF-1R en CM cumple una función clave al regular la actividad proteolítica pericelular y estimular la motilidad de estas células, proporciona información útil no solo para comprender fenómenos básicos relacionados con procesos neovasculares retinales sino también para diseñar estrategias terapéuticas racionales que permitan intervenir enfermedades tan complejas como las retinopatías.

En este sentido, el efecto supresor sobre la NV vitreoretiniana así como la inducción de la revascularización de la retina central observada luego de la inyección intraocular del anticuerpo de bloqueo  $\alpha$ IR3, en el modelo de OIR, abre un nuevo camino a nivel terapéutico, ya que plantea la posibilidad de la aplicación de un anticuerpo de bloqueo anti IGF-1R en el tratamiento de las retinopatías.

El próximo desafío consistirá en intentar, en un futuro cercano, demostrar que el uso de este anticuerpo genera además, un efecto neuroprotectivo benéfico retinal o al menos no incrementa el proceso de neurodegeneración observada en el modelo de OIR, mediante la utilización de pruebas funcionales como Electroretinogramas o técnicas de fragmentación de ADN como la de TUNEL.

## Capítulo VII

# *Materiales y métodos*

## **Modelo “In-vitro”**

- *Cultivos de células gliales de Müller.*

El modelo celular de experimentación *in vitro* fue desarrollado en una línea de células gliales humana inmortalizada MIO-M1. La línea MIO-M1, 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 (186), es decir muestra los mismos marcadores antigénicos y la misma respuesta electrofisiológica a glutamato. 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. Preparación de lisados celulares.**

Células de Müller lavadas con PBS frío, fueron lisadas con 150 mM NaCl; 1% Triton X-100; 20 mM Tris pH: 8,0; 10% Glicerol y 2 mM EDTA, conteniendo 1 mM de phenylmethyl sulfonylfluoride (PMSF) e inhibidores de proteasas (SIGMA, St. Louis, MO) y conservadas a -20 °C hasta su posterior procesamiento. Además, cuando se evaluó la fosforilación de proteínas involucradas en vías de señalamiento intracelular 1mM de O-Vanadato de Sodio (SIGMA) fue adicionado. Luego los lisados celulares fueron centrifugados a 10.000 rpm en frío y los sobrenadantes recolectados. La concentración de proteínas fue determinada utilizando ácido Bicinoninico (BCA) (Pierce, Illinois, USA), empleando Albúmina Sérica Bovina (ASB) como proteína estándar y un espectrofotómetro UV-BioTek (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA).

### **b. Ensayos de Western blot**

Con el propósito de evaluar la fosforilación de proteínas los cambios en los niveles de expresión de diferentes proteínas, lisados celulares así como extractos proteicos de retina neural fueron solubilizados en buffer de muestra (Tris-HCl 62 mM pH 6,8, SDS 2% y glicerol 10%) y calentados por 5 min a 90 °C. La electroforesis fue llevada a cabo en buffer de corrida en condiciones desnaturizantes (SDS) y reductoras (DTT). Al finalizar la misma, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa 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 toda la noche e incubadas con el anticuerpo primario respectivo, durante 18 horas a 4°C. Los anticuerpos primarios utilizados según cada caso fueron: anti-pIGF-1R, anti-IGF-1R, anti-IGF-1R ( $\alpha$ IR3), anti-p-ERK, anti p-AKT, anti-ERK total, anti MMP-2, anti-MT1-MMP y anti HIF-1  $\alpha$ ). Las diluciones de anticuerpos primarios utilizadas fueron aproximadamente 1/250-1/1000. La reacción secundaria se llevó a cabo utilizando un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa acorde con la especie del anticuerpo primario y la reacción enzimática se reveló por quimioluminiscencia (ácido cumario, luminol, buffer tris pH 8,5 y peróxido). Las bandas fueron cuantificadas por densitometría y expresadas en unidades de pixel empleando el programa GelPro (National Institute of Health of USA).

### **c. Ensayos de Zimografía**

Para evaluar la actividad gelatinolítica de proteinasas en sobrenadantes de cultivo celular, se emplearon ensayos de zimografía en geles de poliacrilamida- SDS (7,5% o 10%) copolimerizados con gelatina 1,5 mg/ml (221). Las muestras fueron diluidas en buffer de muestra 5X (Tris-HCl 500mM; pH 8,0 conteniendo SDS 2%; glicerol 10% y azul de bromofenol 0,001%). Los geles fueron lavados 1:30 horas con 2.5% (v/v) Triton X-100 y la actividad de MMPs fue desarrollada a 37 °C en buffer enzima (50 mM de Tris, 0,2 M cloruro de sodio, y 5 mM de cloruro de calcio pH 7.5) durante 24 h. Posteriormente los geles fueron teñidos con Azul Brillante de Coomasie R-250 (125 mg%) y decolorados en ácido acético: metanol (222). La actividad de MMPs fue visualizada por degradación proteolítica de la gelatina como bandas claras respecto al fondo oscuro producto de la tinción de la gelatina. Fotos de los geles fueron tomados y las bandas claras fueron cuantificadas con el programa Gel-Pro Analizer (Media Cybernetics, Warrendale, PA, USA) en todos los ensayos en que la actividad de MMP-2 fue identificada y la relación entre MMP-2 activa y Pro MMP-2 fue realizada en cada condición estudiada.

### **d. Análisis de biotilación de proteínas de superficie.**

Con el propósito de evaluar los niveles de MT1-MMP a nivel de superficie celular se realizaron ensayos de biotilación de proteínas de superficie. Para ello células MIO-M1 fueron estimuladas con IGF-1 durante 8 hs, lavadas con PBS, e incubadas con Sulfo-NHS-SS-biotina durante 1 hs a 4°C. Una vez finalizada la incubación con biotina se procedió a lisar con PBS 0,2% triton X-100 y cocktail de inhibidores. La separación de las proteínas biotiladas fue realizada siguiendo el protocolo de afinidad empleando perlas de agarosa conteniendo estreptavidina asociada covalentemente

(Pierce). Brevemente, 5  $\mu$ l de una suspensión al 20% de perlas de agarosa-streptavidina fueron lavadas con una solución de equilibrio (PBS pH 7,4) e incubadas con los extractos celulares (100  $\mu$ g de proteínas totales) 2 hs a TA. Luego de la incubación se realizaron lavados con PBS, y se procedió a la elución de las proteínas unidas mediante buffer de muestra para EGPA-SDS. Posteriormente, las proteínas fueron analizadas por Western blot empleando un anticuerpo específico para MT1-MMP y un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa. Las bandas fueron reveladas por quimioluminiscencia y cuantificadas por densitometría empleando el programa ImageJ (National Institute of Health of USA).

#### **e. Inmunofluorescencia.**

Con el propósito de analizar la distribución de IGF-1R, MMP-2 y MT1-MMP en la superficie celular, ensayos de inmunofluorescencia en células MIO-M1 no permeabilizadas fueron realizados. Brevemente, las células fueron cultivadas a una confluencia del 30% sobre cubre objetos previamente cubiertos con colágeno tipo I (c-7661, Sigma, St. Louis, MO) o laminina (L2020, Sigma, St. Louis, MO), y en estas condiciones estimuladas con IGF-1 (10 nM) durante estímulos que iban de los 30 minutos a las 3 horas. Luego de los estímulos, los cubre objetos fueron levantados de las placas y lavados con PBS frío, fijadas con PFA 4%, e incubadas con los anticuerpos primarios 18 horas a 4°C. Luego anticuerpos secundarios, conjugados con Alexa 488 o 594, acorde con las especies de los anticuerpos primarios fueron utilizados. Además, los núcleos fueron visualizados por marcación con Hoescht 33258. Las imágenes fueron tomadas con un microscopio Confocal Olympus Fluoview FV300 (Olympus, New York, NY).

#### **f. Análisis de migración en cultivos de células MIO-M1.**

Con el objeto de evaluar el efecto de IGF-1 sobre la migración de células MIO-M1 se realizaron ensayos de herida y cicatrización (Wound-Healing). Para ello, células cultivadas en placas de Petri ( $\phi$ = 3,5 cm) pre adsorbidas con colágeno tipo 1 (c-7661, Sigma, St. Louis, MO) o laminina (L2020, Sigma, St. Louis, MO) al 85% de confluencia fueron depletadas de SFB y una herida (*scratchwound*) fue realizada a lo largo del diámetro central de la placa con la punta de un tips de 10  $\mu$ l. Luego de dos lavados, las células fueron incubadas con medio conteniendo el estímulo e Hidroxiurea (Sigma) y las placas colocadas en la platina termostaticada (5% CO<sub>2</sub>) de un microscopio invertido Nikon Eclipse TE 2000-U acoplado a una cámara digital CCD Camera. Las células fueron visualizadas a través de luz directa en campo claro con un objetivo de 10X, por un periodo de 24 h siendo las

imágenes capturadas con una cámara digital a intervalos de tiempo estipulados (*time-lapse microscopy*).

#### **g. Ensayos de hipoxia**

Para los ensayos de hipoxia las células fueron cultivadas hasta una confluencia entre 50-60% y luego sometidas en 0,5% SBF a condiciones de hipoxia, 0,3 % O<sub>2</sub>, por distintos periodos de tiempo (entre 8 y 24 hs) en una incubadora diseñada para tal fin (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Durante estos periodos de tiempo las células fueron expuestas a los diferentes estímulos (IGF-1 10 nM, αIR3 16 nM). Tanto los sobrenadantes como los lisados celulares fueron evaluados para diferentes expresión y actividad de diferentes proteínas mediante las técnicas de zimografía y Western blot, respectivamente.

#### **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 del Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Resol. HCD 451/07).

##### **- Modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR) en ratones**

Para el desarrollo del modelo de OIR, ratones C57BL/6, en el día P7, fueron colocados junto a sus madres en una cámara con una concentración de oxígeno constante (75% O<sub>2</sub>) durante un periodo de 5 días. Luego los animales fueron colocados durante otros 5 días a oxígeno ambiental (21% O<sub>2</sub>) etapa que transcurre en relativa hipoxia respecto a la etapa anterior y durante la cual se activa la neovascularización en este modelo (153). Otro grupo de ratones de la misma edad fueron mantenidos en oxígeno ambiental (21% O<sub>2</sub>) para ser empleados como animales control. Luego los animales fueron sacrificados entre los días P12-P26, para su posterior enucleación y/o obtención de tejido retinal para distintos fines. El procesamiento posterior de los tejidos (fijación, permeabilización) dependió del objetivo final para el cual se utilizarían los mismos.

**a. Preparación de retinas completas (flatmounts) 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 posteriormente una marcación de CE utilizando la lectina *Griffonia Simplicifolia Isolectin B4* (223) conjugada con Alexa 488. Para ello, en primer lugar se prepararon flats con ojos de animales sacrificados a P17 y fijados en 2% de para formaldehído (PFA) durante 2 hs. Luego bajo lupa estereoscópica cada retina neural fue separada del RPE para su posterior tinción y análisis.

**b. Marcación de CE con Griffonia Simplicifolia I IsolectinB4 (GSI-B4) y células gliales con GFAP**

Las retinas, preparadas en el ítem anterior, fueron bloqueadas y permeabilizadas con 5% ASB en PBS, 0,1% Tritón X-100 6 h. Luego incubadas con un anticuerpo anti-GFAP 18 h a 4 °C, lavadas con TBS- Triton para ser incubadas posteriormente con la solución de lectina (1/50) y el anticuerpo secundario 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 microscopia confocal (Olympus Fluoview FV300) utilizando un objetivo 5X. Las imágenes finales de los flatmounts fueron obtenidas con el programa Adobe Photoshop (Adobe System Software).

**c. 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) y luego incubados en gradiente de sucrosa (10%, 20% y 30%), durante al menos 5 horas en cada uno de los pasos. Cortes sagitales paralelos al nervio óptico fueron obtenidos en un crióstato (Thermo Cientific) a -20°C y secciones de 8 µm de espesor fueron conservadas a -20 °C hasta su posterior utilización.

**d. Evaluación de NV así como del espesor de las capas retinales**

Los criocortes retinales fueron teñidos con hematoxilina y eosina, con el objeto de identificar los núcleos de las células endoteliales así como la integridad de las capas retinales. Mediante microscopía de campo claro se visualizaron los núcleos de las células endoteliales, en campos de gran aumento, ubicados en la zona anterior a la membrana limitante interna. Además y dado que el

modelo de OIR produce neurodegeneración retinal se procedió a analizar el espesor de las capas retinales en estos cortes retinales.

#### **e. 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). 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 (anticuerpo conjugado con peroxidasa) 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 para poder observar las estructuras tisulares. Los tejidos fueron montados con (DPX, Fluka, Bioquemika) y analizados por microscopía de campo claro.

#### **f. Ensayos de Inmunofluorescencia**

Con el propósito de investigar la expresión, localización y distribución de diferentes proteínas en tejido retinal el material fue en primer lugar permeabilizado con metanol a -20 °C durante 7 min, lavado con PBS-Tween 20 (0.05%), y luego bloqueado con ASB al 2%, 15 min. Luego el tejido retinal fue incubado con diferentes anticuerpos primarios (IGF-1R, GFAP, GS, MMP-2) durante 18 horas a 4°C. Las diluciones de anticuerpos primarios utilizadas fueron aproximadamente 1/30-1/100. Finalmente, según la especie del anticuerpo primario utilizado, empleamos los siguientes anticuerpos secundarios: de burro anti-IgG de conejo y anti-IgG de ratón conjugados con Alexa-488 o Alexa-594 (Molecular Probes) durante 1 hora a TA. Los núcleos fueron visualizados por marcación con Hoescht 33258 y finalmente las secciones de tejido fueron montadas con Fluorsave (Calbiochem) y visualizadas usando un microscopio confocal, Olympus Fluoview FV300.

#### **g. Extractos proteicos de retina neural**

Retina neural de animales sacrificados a diferentes tiempos permanecieron a -80 °C durante 2 a 18 hs. Una vez descongeladas fueron sonicadas en buffer TBS conteniendo coctel de inhibidores (Tris-Base 0,05 M pH 7,4; NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, aprotinina 1µg/ml, leuceptina 1µg/ml, pepstatina 1µg/ml). Luego los lisados fueron centrifugados a 1000 rpm a 4 °C. Después de la

centrifugación, los sobrenadantes fueron recolectados y la concentración de proteínas fue determinada por el método BCA descrito en el modelo *in vitro* para ser posteriormente utilizados en ensayos de Western blot.

#### **h. Inyección intraoculares de animales con el anticuerpo de bloqueo $\alpha$ IR3**

Los ratones fueron anestesiados con inyecciones intraperitoneales de 0.5 ml/kg de un coctel que contiene 100 mg/ml de ketamina, 20 mg/ml de xilazina y 10 mg/ml de acepromacina. Posteriormente los ojos fueron tratados con una solución de Proparacaina, que permite la dilatación de la pupila. Las inyecciones intraoculares se realizarán bajo un microscopio quirúrgico, utilizando una jeringa Hamilton acoplada a una aguja especial de 30 G, de punta roma, que ocasiona un daño mínimo al ojo. El volumen inyectado fue de 1,5  $\mu$ l a fin de evitar dañar la retina. Luego se aplicó a los animales un antibiótico local superficial. Los animales fueron inyectados por única vez en el día P12 y fueron sacrificados 5 días después (P17). Como control del modelo de OIR se utilizaron los ojos contralaterales a los inyectados con  $\alpha$ IR3, los cuales recibieron solo vehículo (PBS). El grupo de animales de aire también fue inyectado de la misma manera y a los mismos tiempos que aquellos que fueron expuestos al modelo OIR.

#### **i. Análisis estadístico**

En todos los ensayos, los datos fueron expresados como la media  $\pm$  1 desviación estándar de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas entre las medias se determinaron mediante test t de Student o ANOVA y se consideraron significativas cuando el valor p fue menor a 0,05. Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism.

## Capítulo VIII

# Bibliografía

1. Reichenbach A, Bringmann A. Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina. New York: Springer; 2010.
2. Adler R, Canto-Soler MV. Molecular mechanisms of optic vesicle development: Complexities, ambiguities and controversies. *Developmental Biology*. 2007;305(1):1-13.
3. Willbold E, Berger J, Reinicke M, Wolburg H. On the role of Müller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns. *Journal für Hirnforschung*. 1997;38(3):383-96. Epub 1997/01/01.
4. Stier H, Schlosshauer B. Different cell surface areas of polarized radial glia having opposite effects on axonal outgrowth. *The European journal of neuroscience*. 1998;10(3):1000-10. Epub 1998/09/30.
5. la Cour M, Ehinger B. The Retina. In: Fischbarg J, editor. *Advances in Organ Biology*: Elsevier; 2005. p. 195-252.
6. Kolb H. Simple Anatomy of the Retina. In: Kolb H, Fernandez E, Nelson R, editors. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City UT1995.
7. Kolb H, Nelson R, Ahnelt P, Cuenca N. Chapter 1 Cellular organization of the vertebrate retina. In: Helga Kolb HRSWHKSM-SWJED, editor. *Progress in brain research*: Elsevier; 2001. p. 3-26.
8. Kaur C, Rathnasamy G, Ling EA. Roles of activated microglia in hypoxia induced neuroinflammation in the developing brain and the retina. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*. 2013;8(1):66-78. Epub 2012/03/01.
9. Strauss O. The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*. 2005;85(3):845-81. Epub 2005/07/01.
10. Ohsawa R, Kageyama R. Regulation of retinal cell fate specification by multiple transcription factors. *Brain research*. 2008;1192:90-8. Epub 2007/05/10.
11. Reichenbach A, Hagen E, Schippel K, Eberhardt W. Quantitative electron microscopy of rabbit Müller (glial) cells in dependence on retinal topography. *Zeitschrift für mikroskopisch-anatomische Forschung*. 1988;102(5):721-55. Epub 1988/01/01.
12. Richter W, Reichenbach A, Reichelt W. Orthogonal arrays of intramembranous particles in the Müller cell and astrocyte endfoot membrane of rabbit retina. Postnatal development and adulthood. *Journal of neurocytology*. 1990;19(1):127-39. Epub 1990/02/01.
13. Bringmann A, Wiedemann P. Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica Journal international d'ophtalmologie International journal of ophthalmology Zeitschrift für Augenheilkunde*. 2012;227(1):1-19. Epub 2011/09/17.
14. Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, et al. Müller cells in the healthy and diseased retina. *Progress in retinal and eye research*. 2006;25(4):397-424. Epub 2006/07/15.
15. Winkler BS, Arnold MJ, Brassell MA, Puro DG. Energy metabolism in human retinal Müller cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2000;41(10):3183-90. Epub 2000/09/01.
16. de Melo Reis RA, Ventura AL, Schitine CS, de Mello MC, de Mello FG. Müller glia as an active compartment modulating nervous activity in the vertebrate retina: neurotransmitters and trophic factors. *Neurochemical research*. 2008;33(8):1466-74. Epub 2008/02/15.
17. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(3):905-9. Epub 1995/01/31.
18. Lange J, Yafai Y, Reichenbach A, Wiedemann P, Eichler W. Regulation of pigment epithelium-derived factor production and release by retinal glial (Müller) cells under hypoxia. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(11):5161-7. Epub 2008/08/05.
19. Sato T, Fujikado T, Morimoto T, Matsushita K, Harada T, Tano Y. Effect of electrical stimulation on IGF-1 transcription by L-type calcium channels in cultured retinal Müller cells. *Japanese journal of ophthalmology*. 2008;52(3):217-23. Epub 2008/07/29.
20. Morimoto T, Miyoshi T, Matsuda S, Tano Y, Fujikado T, Fukuda Y. Transcorneal electrical stimulation rescues axotomized retinal ganglion cells by activating endogenous retinal IGF-1 system. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2005;46(6):2147-55. Epub 2005/05/26.

21. Robbins SG, Conaway JR, Ford BL, Roberto KA, Penn JS. Detection of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in vascular and non-vascular cells of the normal and oxygen-injured rat retina. *Growth factors (Chur, Switzerland)*. 1997;14(4):229-41. Epub 1997/01/01.
22. Behzadian MA, Wang XL, Windsor LJ, Ghaly N, Caldwell RB. TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(3):853-9. Epub 2001/02/27.
23. Limb GA, Daniels JT, Pleass R, Charteris DG, Luthert PJ, Khaw PT. Differential expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 by glial Muller cells: response to soluble and extracellular matrix-bound tumor necrosis factor-alpha. *The American journal of pathology*. 2002;160(5):1847-55. Epub 2002/05/10.
24. Milenkovic I, Weick M, Wiedemann P, Reichenbach A, Bringmann A. P2Y receptor-mediated stimulation of Muller glial cell DNA synthesis: dependence on EGF and PDGF receptor transactivation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(3):1211-20. Epub 2003/02/26.
25. Giebel SJ, Menicucci G, McGuire PG, Das A. Matrix metalloproteinases in early diabetic retinopathy and their role in alteration of the blood-retinal barrier. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2005;85(5):597-607. Epub 2005/02/16.
26. Dorrell MI, Aguilar E, Jacobson R, Trauger SA, Friedlander J, Siuzdak G, et al. Maintaining retinal astrocytes normalizes revascularization and prevents vascular pathology associated with oxygen-induced retinopathy. *Glia*. 2010;58(1):43-54. Epub 2009/06/23.
27. Weidemann A, Krohne TU, Aguilar E, Kurihara T, Takeda N, Dorrell MI, et al. Astrocyte hypoxic response is essential for pathological but not developmental angiogenesis of the retina. *Glia*. 2010;58(10):1177-85. Epub 2010/06/15.
28. Liu X, Wang D, Liu Y, Luo Y, Ma W, Xiao W, et al. Neuronal-driven angiogenesis: role of NGF in retinal neovascularization in an oxygen-induced retinopathy model. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(7):3749-57. Epub 2010/03/09.
29. Fischer AJ, Bongini R. Turning Muller glia into neural progenitors in the retina. *Molecular neurobiology*. 2010;42(3):199-209. Epub 2010/11/23.
30. Lewis GP, Fisher SK. Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *International review of cytology*. 2003;230:263-90. Epub 2003/12/25.
31. Hollborn M, Francke M, Iandiev I, Buhner E, Foja C, Kohen L, et al. Early activation of inflammation- and immune response-related genes after experimental detachment of the porcine retina. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(3):1262-73. Epub 2008/03/11.
32. Nakazawa T, Matsubara A, Noda K, Hisatomi T, She H, Skondra D, et al. Characterization of cytokine responses to retinal detachment in rats. *Molecular vision*. 2006;12:867-78. Epub 2006/08/19.
33. Wen R, Song Y, Cheng T, Matthes MT, Yasumura D, LaVail MM, et al. Injury-induced upregulation of bFGF and CNTF mRNAs in the rat retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 1995;15(11):7377-85. Epub 1995/11/01.
34. Hauck SM, Kinkl N, Deeg CA, Swiatek-de Lange M, Schoffmann S, Ueffing M. GDNF family ligands trigger indirect neuroprotective signaling in retinal glial cells. *Molecular and cellular biology*. 2006;26(7):2746-57. Epub 2006/03/16.
35. Arai-Gaun S, Katai N, Kikuchi T, Kurokawa T, Ohta K, Yoshimura N. Heme oxygenase-1 induced in muller cells plays a protective role in retinal ischemia-reperfusion injury in rats. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2004;45(11):4226-32. Epub 2004/10/27.
36. Francke M, Makarov F, Kacza J, Seeger J, Wendt S, Gartner U, et al. Retinal pigment epithelium melanin granules are phagocytosed by Muller glial cells in experimental retinal detachment. *Journal of neurocytology*. 2001;30(2):131-6. Epub 2001/09/29.
37. Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV, et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell death and differentiation*. 2012;19(1):107-20. Epub 2011/07/16.
38. Surova O, Zhivotovsky B. Various modes of cell death induced by DNA damage. *Oncogene*. 2013;32(33):3789-97. Epub 2012/12/05.

39. Lee EW, Seo J, Jeong M, Lee S, Song J. The roles of FADD in extrinsic apoptosis and necroptosis. *BMB reports*. 2012;45(9):496-508. Epub 2012/09/27.
40. Monnier PP, D'Onofrio PM, Magharious M, Hollander AC, Tassew N, Szydłowska K, et al. Involvement of caspase-6 and caspase-8 in neuronal apoptosis and the regenerative failure of injured retinal ganglion cells. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. 2011;31(29):10494-505. Epub 2011/07/22.
41. Feenstra DJ, Yego EC, Mohr S. Modes of Retinal Cell Death in Diabetic Retinopathy. *Journal of Clinical & Experimental Ophthalmology*. 2013.
42. Chen Y, Sawada O, Kohno H, Le YZ, Subauste C, Maeda T, et al. Autophagy protects the retina from light-induced degeneration. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(11):7506-18. Epub 2013/01/24.
43. 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. Epub 2004/11/24.
44. Yu DY, Cringle SJ. Oxygen distribution and consumption within the retina in vascularised and avascular retinas and in animal models of retinal disease. *Progress in retinal and eye research*. 2001;20(2):175-208. Epub 2001/02/15.
45. Fruttiger M. Development of the retinal vasculature. *Angiogenesis*. 2007;10(2):77-88. Epub 2007/02/27.
46. Jousseaume AM, Gardner TW, Kirchhof B, Ryan SJ. *Retinal Vascular Disease* 2007.
47. Dorrell MI, Aguilar E, Friedlander M. Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(11):3500-10. Epub 2002/10/31.
48. Fruttiger M. Development of the mouse retinal vasculature: angiogenesis versus vasculogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2002;43(2):522-7. Epub 2002/01/31.
49. McLeod DS, Luttjohann GA, Wajsbort SD, Flower RW. Visualization of a developing vasculature. *Microvascular research*. 1987;33(2):257-69. Epub 1987/03/01.
50. Ye X, Wang Y, Nathans J. The Norrin/Frizzled4 signaling pathway in retinal vascular development and disease. *Trends in Molecular Medicine*. 2010;16(9):417-25.
51. Cunha-Vaz JG. The blood-retinal barriers. *Documenta ophthalmologica Advances in ophthalmology*. 1976;41(2):287-327. Epub 1976/10/15.
52. Cunha-Vaz JG. Blood-retinal barriers in health and disease. *Transactions of the ophthalmological societies of the United Kingdom*. 1980;100(3):337-40. Epub 1980/09/01.
53. Campochiaro PA. Ocular neovascularization. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)*. 2013;91(3):311-21. Epub 2013/01/19.
54. Michaelson IC. INTRA-MURAL NEW VESSELS IN AN OCCLUDED RETINAL VEIN: A clinical description. *The British journal of ophthalmology*. 1948;32(3):164-6. Epub 1948/03/01.
55. Ashton N. Retinal vascularization in health and disease: Proctor Award Lecture of the Association for Research in Ophthalmology. *American journal of ophthalmology*. 1957;44(4 Pt 2):7-17. Epub 1957/10/01.
56. Das A, McGuire PG. Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Progress in retinal and eye research*. 2003;22(6):721-48. Epub 2003/10/25.
57. Tavosnanska J, Carreras IM, Farina D, Luchtenberg G, Celadilla ML, Celotto M, et al. Mortality and morbidity of very low birth weight newborn infants assisted in Buenos Aires public hospitals. *Archivos argentinos de pediatria*. 2012;110(5):394-403. Epub 2012/10/17.
58. Hellstrom A, Smith LE, Dammann O. Retinopathy of prematurity. *Lancet*. 2013;382(9902):1445-57. Epub 2013/06/21.
59. Hartnett ME, Penn JS. Mechanisms and management of retinopathy of prematurity. *The New England journal of medicine*. 2012;367(26):2515-26. Epub 2012/12/28.
60. Randhawa R, Cohen P. The role of the insulin-like growth factor system in prenatal growth. *Molecular genetics and metabolism*. 2005;86(1-2):84-90. Epub 2005/09/17.
61. Jousseaume AM, Huang S, Poulaki V, Camphausen K, Beecken WD, Kirchhof B, et al. In vivo retinal gene expression in early diabetes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(12):3047-57. Epub 2001/11/01.

62. Hard AL, Smith LE, Hellstrom A. Nutrition, insulin-like growth factor-1 and retinopathy of prematurity. *Seminars in fetal & neonatal medicine*. 2013. Epub 2013/02/23.
63. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 2001;414(6865):782-7. Epub 2001/12/14.
64. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization*. 2004;82(11):844-51. Epub 2005/01/11.
65. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic retinopathy. *The New England journal of medicine*. 2012;366(13):1227-39. Epub 2012/03/30.
66. Teixeira AS, Andrade SP. Glucose-induced inhibition of angiogenesis in the rat sponge granuloma is prevented by aminoguanidine. *Life sciences*. 1999;64(8):655-62. Epub 1999/03/09.
67. Sahu AK, Majji AB. Effect of ruboxistaurin on the visual acuity decline associated with long-standing diabetic macular edema. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2010;51(12):6890; author reply -1. Epub 2010/12/03.
68. Aiello LP, Vignati L, Sheetz MJ, Zhi X, Girach A, Davis MD, et al. Oral protein kinase c beta inhibition using ruboxistaurin: efficacy, safety, and causes of vision loss among 813 patients (1,392 eyes) with diabetic retinopathy in the Protein Kinase C beta Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study and the Protein Kinase C beta Inhibitor-Diabetic Retinopathy Study 2. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2011;31(10):2084-94. Epub 2011/08/25.
69. Sheetz MJ, Aiello LP, Shahri N, Davis MD, Kles KA, Danis RP. Effect of ruboxistaurin (RBX) On visual acuity decline over a 6-year period with cessation and reinstatement of therapy: results of an open-label extension of the Protein Kinase C Diabetic Retinopathy Study 2 (PKC-DRS2). *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2011;31(6):1053-9. Epub 2011/03/10.
70. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, et al. Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease. *Diabetes*. 2006;55(9):2401-11. Epub 2006/08/29.
71. Elman MJ, Bressler NM, Qin H, Beck RW, Ferris FL, 3rd, Friedman SM, et al. Expanded 2-year follow-up of ranibizumab plus prompt or deferred laser or triamcinolone plus prompt laser for diabetic macular edema. *Ophthalmology*. 2011;118(4):609-14. Epub 2011/04/05.
72. Gyllenstein LJ, Hellstrom BE. Experimental approach to the pathogenesis of retrolental fibroplasia. I. Changes of the eye induced by exposure of newborn mice to concentrated oxygen. *Acta paediatrica Supplementum*. 1954;43(100):131-48. Epub 1954/01/01.
73. Aguilar E, Dorrell MI, Friedlander D, Jacobson RA, Johnson A, Marchetti V, et al. Chapter 6. Ocular models of angiogenesis. *Methods in enzymology*. 2008;444:115-58. Epub 2008/11/15.
74. Stahl A, Connor KM, Sapiha 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. Epub 2010/05/21.
75. Ozaki H, Yu AY, Della N, Ozaki K, Luna JD, Yamada H, et al. Hypoxia inducible factor-1alpha is increased in ischemic retina: temporal and spatial correlation with VEGF expression. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999;40(1):182-9. Epub 1999/01/15.
76. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell*. 2010;141(1):52-67. Epub 2010/04/08.
77. Bourbouli D, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in cancer biology*. 2010;20(3):161-8. Epub 2010/05/18.
78. Murphy G, Nagase H. Progress in matrix metalloproteinase research. *Molecular aspects of medicine*. 2008;29(5):290-308. Epub 2008/07/16.
79. Overall CM, Lopez-Otin C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(9):657-72. Epub 2002/09/05.
80. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1-2):267-83. Epub 2000/03/10.
81. Bode W, Maskos K. Matrix metalloproteinases. In: Messerschmidt A, Cygler M, Bode W, editors. *Handbook of Metalloproteins* Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 2004. p. 130-47.

82. Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Progress in retinal and eye research*. 2002;21(1):1-14. Epub 2002/03/22.
83. Das A, McLamore A, Song W, McGuire PG. Retinal neovascularization is suppressed with a matrix metalloproteinase inhibitor. *Archives of ophthalmology*. 1999;117(4):498-503. Epub 1999/04/17.
84. Majka S, McGuire P, Colombo S, Das A. The balance between proteinases and inhibitors in a murine model of proliferative retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2001;42(1):210-5. Epub 2001/01/03.
85. Ohno-Matsui K, Uetama T, Yoshida T, Hayano M, Itoh T, Morita I, et al. Reduced retinal angiogenesis in MMP-2-deficient mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(12):5370-5. Epub 2003/11/26.
86. Barnett JM, McCollum GW, Fowler JA, Duan JJ, Kay JD, Liu RQ, et al. Pharmacologic and genetic manipulation of MMP-2 and -9 affects retinal neovascularization in rodent models of OIR. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2007;48(2):907-15. Epub 2007/01/26.
87. Sanchez MC, Barcelona PF, Luna JD, Ortiz SG, Juarez PC, Riera CM, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP-1) expression in a rat model of oxygen-induced retinal neovascularization. *Experimental eye research*. 2006;83(6):1378-85. Epub 2006/09/19.
88. 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. Epub 2013/07/26.
89. Das A, McGuire PG, Eriqat C, Ober RR, DeJuan E, Jr., Williams GA, et al. Human diabetic neovascular membranes contain high levels of urokinase and metalloproteinase enzymes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1999;40(3):809-13. Epub 1999/03/06.
90. Descamps FJ, Martens E, Kangave D, Struyf S, Geboes K, Van Damme J, et al. The activated form of gelatinase B/matrix metalloproteinase-9 is associated with diabetic vitreous hemorrhage. *Experimental eye research*. 2006;83(2):401-7. Epub 2006/04/29.
91. Ishizaki E, Takai S, Ueki M, Maeno T, Maruichi M, Sugiyama T, et al. Correlation between angiotensin-converting enzyme, vascular endothelial growth factor, and matrix metalloproteinase-9 in the vitreous of eyes with diabetic retinopathy. *American journal of ophthalmology*. 2006;141(1):129-34. Epub 2006/01/03.
92. Jin M, Kashiwagi K, Iizuka Y, Tanaka Y, Imai M, Tsukahara S. Matrix metalloproteinases in human diabetic and nondiabetic vitreous. *Retina (Philadelphia, Pa)*. 2001;21(1):28-33. Epub 2001/02/24.
93. Klysik AB, Naduk-Kik J, Hrabec Z, Gos R, Hrabec E. Intraocular matrix metalloproteinase 2 and 9 in patients with diabetes mellitus with and without diabetic retinopathy. *Archives of medical science : AMS*. 2010;6(3):375-81. Epub 2010/06/30.
94. Kosano H, Okano T, Katsura Y, Noritake M, Kado S, Matsuoka T, et al. ProMMP-9 (92 kDa gelatinase) in vitreous fluid of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Life sciences*. 1999;64(25):2307-15. Epub 1999/06/22.
95. Noda K, Ishida S, Inoue M, Obata K, Oguchi Y, Okada Y, et al. Production and activation of matrix metalloproteinase-2 in proliferative diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(5):2163-70. Epub 2003/04/26.
96. Salzmann J, Limb GA, Khaw PT, Gregor ZJ, Webster L, Chignell AH, et al. Matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy. *The British journal of ophthalmology*. 2000;84(10):1091-6. Epub 2000/09/27.
97. Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WD, Jr., van den Brande JL, van Wyk JJ. Somatomedin: proposed designation for sulphation factor. *Nature*. 1972;235(5333):107. Epub 1972/01/14.
98. Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A. Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. *Dev Biol*. 2001;229(1):141-62. Epub 2001/01/03.
99. Livingstone C. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) and clinical nutrition. *Clinical science (London, England : 1979)*. 2013;125(6):265-80. Epub 2013/06/01.
100. Clemmons DR. Use of mutagenesis to probe IGF-binding protein structure/function relationships. *Endocrine reviews*. 2001;22(6):800-17. Epub 2001/12/12.

101. Firth SM, Baxter RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. *Endocrine reviews*. 2002;23(6):824-54. Epub 2002/12/06.
102. Baserga R, Hongo A, Rubini M, Prisco M, Valentinis B. The IGF-I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochimica et biophysica acta*. 1997;1332(3):F105-26. Epub 1997/06/07.
103. Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, et al. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggests structural determinants that define functional specificity. *The EMBO journal*. 1986;5(10):2503-12. Epub 1986/10/01.
104. Ullrich A, Schlessinger J. Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*. 1990;61(2):203-12. Epub 1990/04/20.
105. Edwards MM, Lefebvre O. Laminins and retinal vascular development. *Cell adhesion & migration*. 2013;7(1):82-9. Epub 2012/11/17.
106. Shaw LC, Grant MB. Insulin like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding proteins: their possible roles in both maintaining normal retinal vascular function and in promoting retinal pathology. *Reviews in endocrine & metabolic disorders*. 2004;5(3):199-207. Epub 2004/06/24.
107. Hansson HA, Holmgren A, Norstedt G, Rozell B. Changes in the distribution of insulin-like growth factor I, thioredoxin, thioredoxin reductase and ribonucleotide reductase during the development of the retina. *Experimental eye research*. 1989;48(3):411-20. Epub 1989/03/01.
108. Lee WH, Javedan S, Bondy CA. Coordinate expression of insulin-like growth factor system components by neurons and neuroglia during retinal and cerebellar development. *J Neurosci*. 1992;12(12):4737-44. Epub 1992/12/01.
109. Lofqvist C, Willett KL, Aspegren O, Smith AC, Aderman CM, Connor KM, et al. Quantification and localization of the IGF/insulin system expression in retinal blood vessels and neurons during oxygen-induced retinopathy in mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2009;50(4):1831-7. Epub 2008/11/11.
110. Lofqvist C, Chen J, Connor KM, Smith AC, Aderman CM, Liu N, et al. IGF3 suppresses retinopathy through suppression of oxygen-induced vessel loss and promotion of vascular regrowth [Clinical Trial

Research Support, N.I.H., Extramural

Research Support, Non-U.S. Gov't]2007.

111. Kielczewski JL, Jarajapu YP, McFarland EL, Cai J, Afzal A, Li Calzi S, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 mediates vascular repair by enhancing nitric oxide generation. *Circulation research*. 2009;105(9):897-905. Epub 2009/09/19.
112. Hellstrom A, Perruzzi C, Ju M, Engstrom E, Hard AL, Liu JL, et al. Low IGF-I suppresses VEGF-survival signaling in retinal endothelial cells: direct correlation with clinical retinopathy of prematurity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(10):5804-8. Epub 2001/05/02.
113. Inokuchi N, Ikeda T, Imamura Y, Sotozono C, Kinoshita S, Uchihori Y, et al. Vitreous levels of insulin-like growth factor-I in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Current eye research*. 2001;23(5):368-71. Epub 2002/03/23.
114. Guidry C, Feist R, Morris R, Hardwick CW. Changes in IGF activities in human diabetic vitreous. *Diabetes*. 2004;53(9):2428-35. Epub 2004/08/28.
115. Dills DG, Moss SE, Klein R, Klein BE. Association of elevated IGF-I levels with increased retinopathy in late-onset diabetes. *Diabetes*. 1991;40(12):1725-30. Epub 1991/12/01.
116. Paques M, Massin P, Gaudric A. Growth factors and diabetic retinopathy. *Diabetes & metabolism*. 1997;23(2):125-30. Epub 1997/04/01.
117. Haurigot V, Villacampa P, Ribera A, Llombart C, Bosch A, Nacher V, et al. Increased intraocular insulin-like growth factor-I triggers blood-retinal barrier breakdown. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(34):22961-9. Epub 2009/05/29.
118. Villacampa P, Ribera A, Motas S, Ramirez L, Garcia M, de la Villa P, et al. Insulin-like growth factor I (IGF-I)-induced chronic gliosis and retinal stress lead to neurodegeneration in a mouse model of retinopathy. *The Journal of biological chemistry*. 2013;288(24):17631-42. Epub 2013/04/27.

119. Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, Carretero A, Nacher V, Haurigot V, et al. Increased ocular levels of IGF-1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease. *Journal of Clinical Investigation*. 2004;113(8):1149-57.
120. Lodish H. BA, Matsudaira P., Kaiser C. A., Kreiger M. y Scott M. P. . Vías de señalización que controlan la actividad génica. In: Panamericana, editor. *Biología celular y Molecular*. Argentina: Panamericana; 2005. p. 973.
121. Davies KJ. The Complex Interaction of Matrix Metalloproteinases in the Migration of Cancer Cells through Breast Tissue Stroma. *International journal of breast cancer*. 2014;2014:839094. Epub 2014/05/07.
122. Konnecke H, Bechmann I. The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas. *Clinical & developmental immunology*. 2013;2013:914104. Epub 2013/09/12.
123. Zhang D, Brodt P. Type 1 insulin-like growth factor regulates MT1-MMP synthesis and tumor invasion via PI 3-kinase/Akt signaling. *Oncogene*. 2003;22(7):974-82. Epub 2003/02/20.
124. Newby AC. Matrix metalloproteinase inhibition therapy for vascular diseases. *Vascular pharmacology*. 2012;56(5-6):232-44. Epub 2012/02/14.
125. Wride MA, Geatrell J, Guggenheim JA. Proteases in eye development and disease. *Birth defects research Part C, Embryo today : reviews*. 2006;78(1):90-105. Epub 2006/04/20.
126. Yang R, Liu H, Williams I, Chaqour B. Matrix metalloproteinase-2 expression and apoptogenic activity in retinal pericytes: implications in diabetic retinopathy. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2007;1103:196-201. Epub 2007/03/03.
127. Kowluru RA, Kanwar M. Oxidative stress and the development of diabetic retinopathy: contributory role of matrix metalloproteinase-2. *Free radical biology & medicine*. 2009;46(12):1677-85. Epub 2009/04/07.
128. Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9. *Expert opinion on investigational drugs*. 2012;21(6):797-805. Epub 2012/04/24.
129. Mohammad G, Kowluru RA. Matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy and mitochondrial dysfunction. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2010;90(9):1365-72. Epub 2010/05/19.
130. Siefert SA, Sarkar R. Matrix metalloproteinases in vascular physiology and disease. *Vascular*. 2012;20(4):210-6. Epub 2012/08/17.
131. Sarman S, van der Ploeg I, Seregard S, Kvanta A. Retinal vascular development and pathologic retinal angiogenesis are not impaired in matrix metalloproteinase-2 deficient mice. *Current eye research*. 2005;30(4):259-67. Epub 2005/04/13.
132. 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. Epub 2010/10/01.
133. Barcelona PF, Jaldin-Fincati JR, Sanchez MC, Chiabrando GA. Activated alpha2-macroglobulin induces Muller glial cell migration by regulating MT1-MMP activity through LRP1. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 2013;27(8):3181-97. Epub 2013/05/04.
134. Gaublumme D, Buyens T, De Groef L, Stakenborg M, Janssens E, Ingvarsen S, et al. Matrix metalloproteinase 2 and membrane type 1 matrix metalloproteinase co-regulate axonal outgrowth of mouse retinal ganglion cells. *Journal of neurochemistry*. 2014;129(6):966-79. Epub 2014/03/13.
135. Bauvois B. New facets of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 as cell surface transducers: outside-in signaling and relationship to tumor progression. *Biochimica et biophysica acta*. 2012;1825(1):29-36. Epub 2011/10/25.
136. Rupp PA, Visconti RP, Czirok A, Cheresh DA, Little CD. Matrix metalloproteinase 2-integrin alpha(v)beta3 binding is required for mesenchymal cell invasive activity but not epithelial locomotion: a computational time-lapse study. *Molecular biology of the cell*. 2008;19(12):5529-40. Epub 2008/10/17.
137. Shapiro S, Khodalev O, Bitterman H, Auslender R, Lahat N. Different activation forms of MMP-2 oppositely affect the fate of endothelial cells. *American journal of physiology Cell physiology*. 2010;298(4):C942-51. Epub 2010/01/15.

138. Fillmore HL, VanMeter TE, Broaddus WC. Membrane-type matrix metalloproteinases (MT-MMPs): expression and function during glioma invasion. *Journal of neuro-oncology*. 2001;53(2):187-202. Epub 2001/11/22.
139. Fisher SK, Lewis GP. Muller cell and neuronal remodeling in retinal detachment and reattachment and their potential consequences for visual recovery: a review and reconsideration of recent data. *Vision research*. 2003;43(8):887-97. Epub 2003/04/02.
140. Tackenberg MA, Tucker BA, Swift JS, Jiang C, Redenti S, Greenberg KP, et al. Muller cell activation, proliferation and migration following laser injury. *Molecular vision*. 2009;15:1886-96. Epub 2009/09/22.
141. Romo P, Madigan MC, Provis JM, Cullen KM. Differential effects of TGF-beta and FGF-2 on in vitro proliferation and migration of primate retinal endothelial and Muller cells. *Acta ophthalmologica*. 2011;89(3):e263-8. Epub 2010/07/31.
142. Ro TB, Holien T, Fagerli UM, Hov H, Misund K, Waage A, et al. HGF and IGF-1 synergize with SDF-1alpha in promoting migration of myeloma cells by cooperative activation of p21-activated kinase. *Experimental hematology*. 2013;41(7):646-55. Epub 2013/03/19.
143. Mezi S, Todi L, Orsi E, Angeloni A, Mancini P. Involvement of the Src-cortactin pathway in migration induced by IGF-1 and EGF in human breast cancer cells. *International journal of oncology*. 2012;41(6):2128-38. Epub 2012/10/02.
144. Bull ND, Limb GA, Martin KR. Human Muller stem cell (MIO-M1) transplantation in a rat model of glaucoma: survival, differentiation, and integration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2008;49(8):3449-56. Epub 2008/04/15.
145. West EL, Pearson RA, Duran Y, Gonzalez-Cordero A, MacLaren RE, Smith AJ, et al. Manipulation of the recipient retinal environment by ectopic expression of neurotrophic growth factors can improve transplanted photoreceptor integration and survival. *Cell transplantation*. 2012;21(5):871-87. Epub 2012/02/14.
146. Ma J, Kabiell M, Tucker BA, Ge J, Young MJ. Combining chondroitinase ABC and growth factors promotes the integration of murine retinal progenitor cells transplanted into Rho(-/-) mice. *Molecular vision*. 2011;17:1759-70. Epub 2011/07/14.
147. Arjamaa O, Nikinmaa M. Oxygen-dependent diseases in the retina: role of hypoxia-inducible factors. *Experimental eye research*. 2006;83(3):473-83. Epub 2006/06/06.
148. Campochiaro PA. Retinal and choroidal neovascularization. *Journal of cellular physiology*. 2000;184(3):301-10. Epub 2000/07/27.
149. Wangsa-Wirawan ND, Linsenmeier RA. Retinal oxygen: fundamental and clinical aspects. *Archives of ophthalmology*. 2003;121(4):547-57. Epub 2003/04/16.
150. Germer A, Biedermann B, Wolburg H, Schuck J, Grosche J, Kuhrt H, et al. Distribution of mitochondria within Muller cells--I. Correlation with retinal vascularization in different mammalian species. *Journal of neurocytology*. 1998;27(5):329-45. Epub 1999/01/29.
151. Germer A, Schuck J, Wolburg H, Kuhrt H, Mack AF, Reichenbach A. Distribution of mitochondria within Muller cells--II. Post-natal development of the rabbit retinal periphery in vivo and in vitro: dependence on oxygen supply. *Journal of neurocytology*. 1998;27(5):347-59. Epub 1999/01/29.
152. Mechoulam H, Pierce EA. Retinopathy of prematurity: molecular pathology and therapeutic strategies. *American journal of pharmacogenomics : genomics-related research in drug development and clinical practice*. 2003;3(4):261-77. Epub 2003/08/22.
153. 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. Epub 1994/01/01.
154. Chan-Ling T, Gock B, Stone J. The effect of oxygen on vasoformative cell division. Evidence that 'physiological hypoxia' is the stimulus for normal retinal vasculogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995;36(7):1201-14. Epub 1995/06/01.
155. Luttj GA, McLeod DS. Retinal vascular development and oxygen-induced retinopathy: a role for adenosine. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22(1):95-111. Epub 2003/02/25.

156. Penn JS, Tolman BL, Henry MM. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal nonperfusion to subsequent neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1994;35(9):3429-35. Epub 1994/08/01.
157. Smith LE, Kopchick JJ, Chen W, Knapp J, Kinose F, Daley D, et al. Essential role of growth hormone in ischemia-induced retinal neovascularization. *Science (New York, NY).* 1997;276(5319):1706-9. Epub 1997/06/13.
158. Smith L. *Oxygen Induced Retinopathy in the Mouse.* 1993.
159. Bucher F, Stahl A, Agostini HT, Martin G. Hyperoxia causes reduced density of retinal astrocytes in the central avascular zone in the mouse model of oxygen-induced retinopathy. *Molecular and cellular neurosciences.* 2013;56C:225-33. Epub 2013/06/13.
160. 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. Epub 2012/10/06.
161. Athanasiou D, Aguila M, Bevilacqua D, Novoselov SS, Parfitt DA, Cheetham ME. The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS letters.* 2013;587(13):2008-17. Epub 2013/05/21.
162. 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. Epub 2002/05/23.
163. 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. Epub 2012/03/14.
164. Vottero A, Guzzetti C, Loche S. New aspects of the physiology of the GH-IGF-1 axis. *Endocrine development.* 2013;24:96-105. Epub 2013/02/09.
165. Bu SY, Yu GH, Xu GX. Expression of insulin-like growth factor 1 receptor in rat retina following optic nerve injury. *Acta ophthalmologica.* 2013;91(6):e427-31. Epub 2013/05/08.
166. Kondo T, Vicent D, Suzuma K, Yanagisawa M, King GL, Holzenberger M, et al. Knockout of insulin and IGF-1 receptors on vascular endothelial cells protects against retinal neovascularization. *Journal of Clinical Investigation.* 2003;111(12):1835-42.
167. Shaw LC, Pan H, Afzal A, Calzi SL, Spoerri PE, Sullivan SM, et al. Proliferating endothelial cell-specific expression of IGF-I receptor ribozyme inhibits retinal neovascularization. *Gene therapy.* 2006;13(9):752-60. Epub 2006/01/27.
168. Lambooi AC, van Wely KH, Lindenbergh-Kortleve DJ, Kuijpers RW, Kliffen M, Mooy CM. Insulin-like growth factor-I and its receptor in neovascular age-related macular degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2003;44(5):2192-8. Epub 2003/04/26.
169. Burren CP, Berka JL, Edmondson SR, Werther GA, Batch JA. Localization of mRNAs for insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF-I receptor, and IGF binding proteins in rat eye. *Investigative ophthalmology & visual science.* 1996;37(7):1459-68. Epub 1996/06/01.
170. Miyata Y, Kase M, Sugita Y, Shimada A, Nagase T, Katsura Y, et al. Protein kinase C-mediated regulation of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase production in a human retinal muller cells. *Current eye research.* 2012;37(9):842-9. Epub 2012/06/07.
171. Hellstrom A, Carlsson B, Niklasson A, Segnestam K, Boguszewski M, de Lacerda L, et al. IGF-I is critical for normal vascularization of the human retina. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2002;87(7):3413-6. Epub 2002/07/11.
172. Kull FC, Jr., Jacobs S, Su YF, Svoboda ME, Van Wyk JJ, Cuatrecasas P. Monoclonal antibodies to receptors for insulin and somatomedin-C. *The Journal of biological chemistry.* 1983;258(10):6561-6. Epub 1983/05/25.
173. Meng D, Lv DD, Fang J. Insulin-like growth factor-I induces reactive oxygen species production and cell migration through Nox4 and Rac1 in vascular smooth muscle cells. *Cardiovascular research.* 2008;80(2):299-308. Epub 2008/06/24.

174. Zhang D, Bar-Eli M, Meloche S, Brodt P. Dual regulation of MMP-2 expression by the type 1 insulin-like growth factor receptor: the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and Raf/ERK pathways transmit opposing signals. *The Journal of biological chemistry*. 2004;279(19):19683-90. Epub 2004/03/03.
175. Saragusti AC, Ortega MG, Cabrera JL, Estrin DA, Marti MA, Chiabrando GA. Inhibitory effect of quercetin on matrix metalloproteinase 9 activity molecular mechanism and structure-activity relationship of the flavonoid-enzyme interaction. *European journal of pharmacology*. 2010;644(1-3):138-45. Epub 2010/07/14.
176. Lafreniere JF, Mills P, Tremblay JP, El Fahime E. Growth factors improve the in vivo migration of human skeletal myoblasts by modulating their endogenous proteolytic activity. *Transplantation*. 2004;77(11):1741-7. Epub 2004/06/18.
177. Goldberg MF. Retinal neovascularization in sickle cell retinopathy. *Trans Sect Ophthalmol Am Acad Ophthalmol Otolaryngol*. 1977;83(3 Pt 1):OP409-31. Epub 1977/05/01.
178. Koizumi K, Poulaki V, Doehmen S, Welsandt G, Radetzky S, Lappas A, et al. Contribution of TNF-alpha to leukocyte adhesion, vascular leakage, and apoptotic cell death in endotoxin-induced uveitis in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003;44(5):2184-91. Epub 2003/04/26.
179. McLeod DS, Merges C, Fukushima A, Goldberg MF, Litty GA. Histopathologic features of neovascularization in sickle cell retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 1997;124(4):455-72. Epub 1997/11/05.
180. O'Kusky J, Ye P. Neurodevelopmental effects of insulin-like growth factor signaling. *Frontiers in neuroendocrinology*. 2012;33(3):230-51. Epub 2012/06/20.
181. Lupia E, Elliot SJ, Lenz O, Zheng F, Hattori M, Striker GE, et al. IGF-1 decreases collagen degradation in diabetic NOD mesangial cells: implications for diabetic nephropathy. *Diabetes*. 1999;48(8):1638-44. Epub 1999/07/30.
182. Navab R, Chevet E, Authier F, Di Guglielmo GM, Bergeron JJ, Brodt P. Inhibition of endosomal insulin-like growth factor-I processing by cysteine proteinase inhibitors blocks receptor-mediated functions. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276(17):13644-9. Epub 2001/03/30.
183. Klagsbrun M, Moses MA. Molecular angiogenesis. *Chemistry & biology*. 1999;6(8):R217-24. Epub 1999/07/28.
184. Han ZC, Liu Y. Angiogenesis: state of the art. *International journal of hematology*. 1999;70(2):68-82. Epub 1999/09/25.
185. Barcelona PF. Estudios celulares y moleculares de la neovascularización ocular en mamíferos. Participación del sistema  $\alpha$ 2-M/LRP-1: Universidad Nacional de Cordoba; 2010.
186. Lawrence JM, Singhal S, Bhatia B, Keegan DJ, Reh TA, Luthert PJ, et al. MIO-M1 cells and similar muller glial cell lines derived from adult human retina exhibit neural stem cell characteristics. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2007;25(8):2033-43. Epub 2007/05/26.
187. Khaw PT, Limb GA. Muller stem cells. *Google Patents*; 2005.
188. Sabeh F, Li XY, Saunders TL, Rowe RG, Weiss SJ. Secreted versus membrane-anchored collagenases: relative roles in fibroblast-dependent collagenolysis and invasion. *The Journal of biological chemistry*. 2009;284(34):23001-11. Epub 2009/06/23.
189. Dedieu S, Langlois B, Devy J, Sid B, Henriot P, Sartelet H, et al. LRP-1 silencing prevents malignant cell invasion despite increased pericellular proteolytic activities. *Molecular and cellular biology*. 2008;28(9):2980-95. Epub 2008/03/05.
190. Ogier C, Bernard A, Chollet AM, T LED, Hanessian S, Charton G, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) regulates astrocyte motility in connection with the actin cytoskeleton and integrins. *Glia*. 2006;54(4):272-84. Epub 2006/07/18.
191. Barinapa M. Shedding light on blindness. *Science (New York, NY)*. 1995;267(5197):452-3. Epub 1995/01/27.
192. Williamson JR, Chang K, Frangos M, Hasan KS, Ido Y, Kawamura T, et al. Hyperglycemic pseudohypoxia and diabetic complications. *Diabetes*. 1993;42(6):801-13. Epub 1993/06/01.
193. Gombos A, Metzger-Filho O, Dal Lago L, Awada-Hussein A. Clinical development of insulin-like growth factor receptor--1 (IGF-1R) inhibitors: at the crossroad? *Investigational new drugs*. 2012;30(6):2433-42. Epub 2012/03/15.

194. Treins C, Giorgetti-Peraldi S, Murdaca J, Monthouel-Kartmann MN, Van Obberghen E. Regulation of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 activity and expression of HIF hydroxylases in response to insulin-like growth factor I. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)*. 2005;19(5):1304-17. Epub 2005/02/08.
195. Smith LE, Shen W, Perruzzi C, Soker S, Kinose F, Xu X, et al. Regulation of vascular endothelial growth factor-dependent retinal neovascularization by insulin-like growth factor-1 receptor. *Nature medicine*. 1999;5(12):1390-5. Epub 1999/12/02.
196. Walker JL, Zhang L, Zhou J, Woolkalis MJ, Menko AS. Role for alpha 6 integrin during lens development: Evidence for signaling through IGF-1R and ERK. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 2002;223(2):273-84. Epub 2002/02/12.
197. Antoinette C. Lambooij KHMvW, 2 Dicky J. Lindenbergh-Kortleve,3, Robert W. A. M. Kuijpers MK, 4 and Cornelia M. Mooy. Insulin-like Growth Factor-I and its Receptor in Neovascular Age-Related Macular Degeneration. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003;44(5):7. Epub January 14, 2003.
198. Kim IB, Kim KY, Joo CK, Lee MY, Oh SJ, Chung JW, et al. Reaction of Muller cells after increased intraocular pressure in the rat retina. *Experimental brain research*. 1998;121(4):419-24. Epub 1998/09/24.
199. Eichler W, Kuhrt H, Hoffmann S, Wiedemann P, Reichenbach A. VEGF release by retinal glia depends on both oxygen and glucose supply. *Neuroreport*. 2000;11(16):3533-7. Epub 2000/11/30.
200. Mohammad G, Kowluru RA. Novel role of mitochondrial matrix metalloproteinase-2 in the development of diabetic retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011;52(6):3832-41. Epub 2011/02/25.
201. Lu KV, Jong KA, Rajasekaran AK, Cloughesy TF, Mischel PS. Upregulation of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 promotes matrix metalloproteinase (MMP)-2 activation and cell invasion in a human glioblastoma cell line. *Laboratory Investigation*. 2003;84(1):8-20.
202. Matsumoto Y, Tanaka K, Harimaya K, Nakatani F, Matsuda S, Iwamoto Y. Small GTP-binding protein, Rho, both increased and decreased cellular motility, activation of matrix metalloproteinase 2 and invasion of human osteosarcoma cells. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 2001;92(4):429-38. Epub 2001/05/11.
203. Pazzaglia L, Ponticelli F, Magagnoli G, Gamberi G, Ragazzini P, Balladelli A, et al. Activation of metalloproteinases-2 and -9 by interleukin-1alpha in S100A4-positive liposarcoma cell line: correlation with cell invasiveness. *Anticancer research*. 2004;24(2B):967-72. Epub 2004/05/27.
204. Shaverdashvili K, Wong P, Ma J, Zhang K, Osman I, Bedogni B. MT1-MMP modulates melanoma cell dissemination and metastasis through activation of MMP2 and RAC1. *Pigment cell & melanoma research*. 2013. Epub 2014/01/07.
205. Silletti S, Kessler T, Goldberg J, Boger DL, Cheresch DA. Disruption of matrix metalloproteinase 2 binding to integrin alpha vbeta 3 by an organic molecule inhibits angiogenesis and tumor growth in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2001;98(1):119-24. Epub 2001/01/03.
206. Theret N, Musso O, Turlin B, Lotrian D, Bioulac-Sage P, Campion JP, et al. Increased extracellular matrix remodeling is associated with tumor progression in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2001;34(1):82-8. Epub 2001/06/30.
207. Benassi MS, Magagnoli G, Ponticelli F, Pazzaglia L, Zanella L, Gamberi G, et al. Tissue and serum loss of metalloproteinase inhibitors in high grade soft tissue sarcomas. *Histology and histopathology*. 2003;18(4):1035-40. Epub 2003/09/16.
208. Zhang XP, Zhou FJ, Shen PF, Zhou C, Wei JX. [Significance of activated matrix metalloproteinase 2 (MMP2) in progression of bladder transitional cell carcinoma]. *Ai zheng = Aizheng = Chinese journal of cancer*. 2003;22(6):637-9. Epub 2003/09/02.
209. Zeng W, Su J, Wu L, Yang D, Long T, Li D, et al. CD147 Promotes Melanoma Progression Through Hypoxia-Induced MMP2 Activation. *Current molecular medicine*. 2014;14(1):163-73. Epub 2013/10/05.
210. Yang XC, Wang X, Luo L, Dong DH, Yu QC, Wang XS, et al. RNA interference suppression of A100A4 reduces the growth and metastatic phenotype of human renal cancer cells via NF-kB-dependent MMP-2 and bcl-2 pathway. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2013;17(12):1669-80. Epub 2013/07/09.

211. Santos JM, Tewari S, Lin JY, Kowluru RA. Interrelationship between activation of matrix metalloproteinases and mitochondrial dysfunction in the development of diabetic retinopathy. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;438(4):760-4. Epub 2013/07/31.
212. Kowluru RA, Mohammad G, dos Santos JM, Zhong Q. Abrogation of MMP-9 gene protects against the development of retinopathy in diabetic mice by preventing mitochondrial damage. *Diabetes*. 2011;60(11):3023-33. Epub 2011/09/22.
213. Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell*. 2002;109(5):625-37. Epub 2002/06/14.
214. Hou X, Han QH, Hu D, Tian L, Guo CM, Du HJ, et al. Mechanical force enhances MMP-2 activation via p38 signaling pathway in human retinal pigment epithelial cells. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie*. 2009;247(11):1477-86. Epub 2009/07/11.
215. Sanchez MC, Luna JD, Barcelona PF, Gramajo AL, Juarez PC, Riera CM, et al. Effect of retinal laser photocoagulation on the activity of metalloproteinases and the alpha(2)-macroglobulin proteolytic state in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Experimental eye research*. 2007;85(5):644-50. Epub 2007/09/11.
216. Ferrara N. Pathways mediating VEGF-independent tumor angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews*. 2010;21(1):21-6. Epub 2009/12/17.
217. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nature medicine*. 2003;9(6):669-76. Epub 2003/06/05.
218. Olsson AK, Dimberg A, Kreuger J, Claesson-Welsh L. VEGF receptor signalling - in control of vascular function. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(5):359-71. Epub 2006/04/25.
219. Madamanchi A, Capozzi ME, Geng L, Li Z, Friedman RD, Dickeson SK, et al. Mitigation of oxygen-induced retinopathy in alpha2beta1 integrin-deficient mice. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014. Epub 2014/06/12.
220. Slomiany MG, Rosenzweig SA. Hypoxia-inducible factor-1-dependent and -independent regulation of insulin-like growth factor-1-stimulated vascular endothelial growth factor secretion. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*. 2006;318(2):666-75. Epub 2006/05/10.
221. Lombard C, Saulnier J, Wallach J. Assays of matrix metalloproteinases (MMPs) activities: a review. *Biochimie*. 2005;87(3-4):265-72. Epub 2005/03/23.
222. Murphy G, Crabbe T. Gelatinases A and B. *Methods Enzymol*. 1995;248:470-84. Epub 1995/01/01.
223. 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. Epub 2009/10/10.