Instituto de Fisiología y Biofísica "Bernardo Houssay" (I.FI.BIO. - Houssay)

Laboratorio de Neurociencia

Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina

PROYECTO PROPUESTO:
Estudio del rol de la angiotensina-(1-7) y el eje depresor del sistema renina angiotensina en un modelo de neovascularización en la retina del pez cebra.

REQUERIMIENTOS
Motivación, interés, predisposición y compromiso para el aprendizaje de las técnicas y la práctica necesaria para llevar a cabo experimentos en el proyecto de investigación propuesto, en colaboración y bajo supervisión de los miembros del laboratorio. Conocimientos básicos de Inglés para lectura de trabajos científicos.

DOCENTE/S: Dra. Maria Paula Faillace y Dr. Ramón Bernabeu
mfailace@fmed.uba.ar
UBICACIÓN: Paraguay 2155 7mo piso, Sector M3

TAREAS: Aprendizaje de técnicas tales como inmunohistoquímica de fluorescencia, microscopía confocal,
Y técnicas de biología molecular como RT- PCR Punto final y cuantitativa. Aprendizaje de trabajo experimental con un modelo animal de laboratorio como El PEZ cebra (zebrafish). Modelo animal experimental utilizado internacionalmente para la investigación biomédica. Estudios comportamentales con el modelo de zebrafish.
Desarrollo de experimentos tendientes a cumplimentar algunos de los objetivos dentro del marco del proyecto de investigación que se describió anteriormente. Participación del practicante como coautor en las publicaciones científicas que pudieran resultar de la experimentación realizada por el practicante en colaboración con otros miembros del laboratorio. Participación en presentaciones a congresos científicos en forma de póster.

OBJETIVOS
Aprendizaje de técnicas de laboratorio y puesta a punto de protocolos experimentales, supervisado por la directora del proyecto y becarios del laboratorio.
Familiarizarse con el cuidado en el laboratorio del modelo animal y con el uso como modelo experimental en la investigación científica. En el laboratorio este modelo se utiliza para estudiar los procesos regenerativos del tejido nervioso en particular la retina de vertebrado. También como parte del grupo del Dr. Bernabeu en el cual se utiliza para estudios neurobiológicos de la adicción a las drogas de abuso. Se estudiarán mecanismos moleculares y tipos celulares involucrados en procesos neurodegenerativos y la regeneración del tejido visual. Se estudiarán mecanismos de señalización involucrados en la reparación de la retina y la recuperación de la capacidad visual en este Modelo animal luego de realizarse lesiones retinianas como modelos experimentales de retinopatías (por ejemplo retinopatía diabética).

CARGA HORARIA 12 a 14 h semanales
Proyecto de investigación acreditado y financiado en el que se inserta el plan de trabajo

Título: **Modelos animales de plasticidad vascular y neuroglial en la retina de vertebrados. Posibles blancos terapéuticos con acción neuroprotectora y regenerativa. PIP CONICET 2393- PI: Faillace Maria Paula.**

RESUMEN DEL PLAN DE TRABAJO: La angiogénesis patológica de la retina es una de las más importantes causas de ceguera irreversible. Como tratamiento antiangiogénico se utilizan bloqueantes de la actividad de VEGF logrando disminuir la pérdida de visión. Sin embargo, no se han identificado aún todos los factores que regulan la neovascularización retiniana. Desafortunadamente, la terapia anti-VEGF deja de ser efectiva luego de un tiempo y no detiene el proceso neurodegenerativo. La experimentación en modelos animales resulta crucial para la caracterización de nuevos tratamientos anti-angiogénicos. Se puede inducir neovascularización en la retina de zebrafish, caracterizar los parámetros vasculares y los tipos neuronales afectados. Este modelo facilita realizar estudios in vivo para identificar factores anti-angiogénicos y neuroprotectores. Inyecciones intraoculares con CoCl2, que induce hipoxia química y daño citotóxico, generan neovascularización en la retina de zebrafish. En este proyecto, se propone examinar el rol de la Angiotensina 1,7 y sus receptores específicos como inhibidores de la neovascularización y la muerte neuronal en la retina. Se estudiará la presencia de los receptores para Angotensina 1,7 en la retina de zebrafish en condiciones fisiológicas y de hipoxia química. Luego, se estudiará el efecto de activar o inhibir el eje protector de la Angiotensina 1,7 sobre la neovascularización y la muerte neuronal.

Estado actual del conocimiento sobre el tema y vinculación entre el plan de trabajo de el/la estudiante y el proyecto en el que se inscribe:

La retina de zebrafish

El pez cebra (zebrafish) es un modelo animal ampliamente estudiado debido a que posee la capacidad de regenerar varios órganos y tejidos durante su vida adulta. La retina adulta del zebrafish exhibe una completa regeneración morfológica y funcional en respuesta al daño, independientemente de la gravedad del mismo. En contraste, en los mamíferos la respuesta al daño en el tejido nervioso se repara por gliosis con pérdida de la función. La vasculatura retiniana del zebrafish muestra similitudes significativas con la de otros vertebrados (Gore y col. 2012). Comparado con los vasos retinianos en mamíferos, los vasos hialoideos no están cubiertos por procesos astrocíticos, no poseen expresión de ZO-1 o de ocludina y son permeables a trazadores de alto y bajo peso molecular (Kim y col. 2012). Además, aunque estos vasos se encuentran en contacto con la capa de células ganglionares, no forman plexos intrarretinianos como en la retina de mamíferos. A pesar de estas diferencias, la retina de zebrafish demuestra una gran potencialidad para el estudio de patologías vasculares en humanos. La vasculatura retiniana en el zebrafish adulto es altamente organizada y se puede inducir neovascularización por hipoxia y por tratamiento intraocular con CoCl2 (Medrano y col., 2018) en un área determinada del plexo capilar. Nuevos vasos retinianos y brotes capilares pueden ser medidos y cuantificados con alta precisión (Cao y col., 2010).

La angiogénesis y el modelo de daño hipóxico

La angiogénesis patológica de la retina es una de las más importantes causas de ceguera irreversible. Esta se observa en la retinopatía diabética proliferativa, la forma exudativa de la degeneración macular relacionada a la edad (AMD) y la retinopatía del prematuro. En estas patologías los neovasos crecen y se ramifican excesivamente en la superficie

retiniana (Henkind y col., 1974) y provocan hemorragias vítreas, desprendimiento de la retina, edema macular y pérdida de la visión (Adamis y col., 1999).
El descubrimiento del rol neovascularizante del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) guió el camino para el desarrollo de bloqueantes de la actividad de VEGF como tratamientos antiangiogénicos. El VEGF es inducible por hipoxia y juega un rol crucial en la patogénesis de las retinopatías neovascularizantes (Adamis y col., 2005; Penn y col., 2008). Además, muchos otros factores están involucrados en inducir angiogénesis pero los mecanismos y factores que regulan el proceso de neovascularización no han sido totalmente identificados.
Por lo tanto, la experimentación en modelos animales resulta aún crucial para la caracterización de nuevos tratamientos anti-angiogénicos, ya que el VEGF luego de un tiempo deja de ser efectivo en detener el desarrollo de la retinopatía. Para esto, tanto ensayos in vivo como in vitro son necesarios para caracterizar otros factores antiangiogénicos y neuroprotectores.
Se ha demostrado la existencia de neovascularización en la retina de zebrafish. Este modelo facilita llevar a cabo estudios in vivo para la identificación de inhibidores de la angiogénesis (Rezzola y col, 2014). Para inducir neovascularización en la retina de zebrafish, se ha utilizado la exposición a condiciones hipóxicas (Rezzola y col, 2014; Cao y col, 2010) y la inyección intraocular de $CoCl_2$ (Medrano y col., 2018).

Angiotensina-(1-7)
El sistema renina-angiotensina (SRA) es fundamental en la regulación de la fisiología cardiovascular, controlando la presión arterial y la homeostasis salina e hídrica. El SRA consiste en 2 ejes diferentes. El clásico eje presor conformado por la angiotensina (Ang) II, la enzima de conversión (ECA) y el receptor AT1 (RAT1). El otro eje del SRA (protector o depresor) está representado por la Ang-(1-7), la ECA2, que produce Ang-(1-7) a partir de Ang II, y los receptores Mas (RMas) y AT2 (RAT2). Este eje induce efectos vasoprotectores y antihipertensivos (vasodilatador) y contrarresta los efectos fibróticos, proliferativos, hipertróficos, proinflamatorios y oxidativos del eje presor.
La Ang-(1-7) exhibe un claro efecto protector durante el infarto cerebral izquémico y hemorrágico (Gironacci y col., 2014). Los componentes del eje presor del SRA han sido identificados en las células vasculares, gliales y neuronales y contribuyen a la génesis de enfermedades retinianas. Se observa aumento en la neovascularización, inflamación, daño oxidativo y disfunción neuronal y glial, que son atenuadas por inhibidores de la ECA y del RAT1. En humanos, la administración oral de un inhibidor de la ECA o de un bloqueante del RAT1 redujo la presión intraocular en sujetos con glaucoma (Costagliola, 2000). La administración intraocular de Ang-(1-7) produjo una disminución de la presión intraocular en conejos (Vaajanen, 2008). Verma y col (2012) demostraron que la desregulación del SRA juega un rol fundamental en la patogenia de la retinopatía diabética y que ésta podría ser controlada restaurando el balance entre ambos ejes a través del aumento de ECA2/RMas/Ang-(1-7). La Ang-(1-7) fue encontrada en varias estructuras oculares. También se demostró que el RMas se expresa en la retina de ratones, en las células ganglionares y fotorreceptores y en menor cantidad en las células endoteliales y de Müller. La Ang-(1-7) promueve la angiogénesis cerebral después de una isquemia a través del aumento en los niveles de VEGF (Jiang et al. 2014). Se han descripto efectos antiglaucomatosos por activación de la ECA2 (Foureaux y col, 2013). Sin embargo, aún se desconoce si la Ang-(1-7) posee un rol regulatorio en la génesis de las enfermedades retinianas.
Este proyecto corresponde al desarrollo de tres de los objetivos del proyecto en el que se inscribe.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Hipótesis

1. El eje protector/depresor del sistema renina angiotensina, mediante la actividad de la Ang-(1-7) sobre sus receptores específicos, participa en la regulación de la neovascularización generada por la hipoxia química/daño citotóxico en la retina adulta de zebrafish.
2. El eje protector/depresor del sistema renina angiotensina, mediante la actividad de la Ang-(1-7) sobre sus receptores específicos, regula la muerte celular por apoptosis que ocurre durante la regeneración de los tipos celulares y remodelación de los circuitos retinianos, luego de la injuria hipóxica química/daño citotóxico en la retina de zebrafish.

Objetivos
1. Examinar los efectos de un inhibidor de la ECA2, de la Ang-(1-7), un agonista del RAT2 y de bloqueantes del RMas y RAT2 sobre el crecimiento neovascular en retinas dañadas con CoCl2.
2. Evaluar el efecto de un inhibidor de la ECA2, de la Ang-(1-7), un agonista del RAT2 y de bloqueantes del RMas y RAT2 sobre la apoptosis retiniana provocada luego del daño con CoCl2 y durante el proceso regenerativo.

ACTIVIDADES Y METODOLOGÍA
Peces cebra adultos (6-10 meses) se mantendrán a 27 ºC, bajo un ciclo de 14/10h luz/oscuridad.
Inyecciones intraoculares: en peces anestesiados con jeringas de 10 µl y aguja de 33 G (Hamilton) bajo una lupa. El vehículo o la sustancia experimental serán inyectados en el ojo izquierdo de distintos grupos de peces. Las inyecciones se realizarán dentro de la cavidad vítrea. Se inyectará un volumen de 0.5-0.6 l. En otros casos se inyectará el mismo volumen conteniendo los compuestos a las concentraciones finales deseadas (aproximadas) dentro del ojo. Se utilizará solución fisiológica (SF) o el vehículo correspondiente para los peces controles. Se utilizarán 6 a 8 animales por grupo control o experimental, ya sea inyectados con CoCl2 o con SF y con o sin tratamiento farmacológico. Se utilizarán antagonistas de receptores del eje depresor del SRA o un inhibidor de la ECA2. Se utilizarán inhibidor ECA2, MLN-4760 (dosis a determinar), antagonistas del RMas: A-779 (115 nmol/L) y antagonista de RAT2: PD123319 (30 mg/kg). Se utilizará también Ang-(1-7) y/o Angiotensin fragment 1-7 acetate salt (CAS 51833-78-4) que es una activador específico del RAT2 (todas los compuestos son de Sigma-Aldrich). Las inyecciones intraoculares con los diferentes compuestos, o con vehículo, se realizarán durante 20 días (una inyección cada 4-5 días) comenzando un día después de la primera inyección de CoCl2.

Inducción de la hipoxia química/daño citotóxico con CoCl2:
Lesión de la retina por inyección intraocular en la cavidad vítrea: se realizarán una inyección de CoCl2 (6,5 mM) seguida por dos inyecciones de CoCl2 (3,2 mM), separadas por 7 días, cuya concentración intravítrea aproximada será de 1,3 mM y luego 0,6 mM. Este protocolo de inyecciones provoca neovascularización en la retina de zebrafish a los 15-20 días posteriores a la primera inyección (Medrano y col., 2018).

Preparación de cortes de retina para inmunohistoquímica (IHQ):
Luego de los diferentes tratamientos, una vez eutanizados los peces, se enuclearán y prepararán "eyecups" (ojos sin córnea y cristalino). Para la preparación del "eyecup", se utilizan micropinzas y tijeras de iridectomía para cortar la córnea sobre la pupila y extraer el cristalino. Los eyecups se fijarán en 4 % de paraformaldehído/PBS y se crioprotegerán en sacarosa 20% toda la noche. Se prepararán tacos con medio especial para crióstato, orientando el "eyecup" para obtener rebanadas de retina en una orientación conocida. Se cortarán rebanadas (16 m) en un criostato a -20 ºC y se adherirán los cortes a portaobjetos y se almacenarán a -20°C.

Extracción de retinas neurales in toto y detección del endotelio vascular:
Se observará la vasculatura en la capa de células ganglionares.
De los "eyecup" por medio de las pinzas se separarán las capas de epitelio pigmentario, coroides y esclerótica y la retina neural se liberará flotando en buffer. Se fijará la retina in toto en paraformaldehído para realizar IHQ de fluorescencia doble para vasos. Se utilizarán lectinas de tomate (Lycopersicum sculentum, LEL) biotiniladas que serán detectadas con estreptavidina-Alexa488 (SIGMA) o con el complejo ABC-peroxidasa y DAB (Vector labs) y núcleos marcados con Hoechst (SIGMA). Esta marcación también se realizará sobre las secciones de retina para visualizar todas las capas retinianas y la capa coroides.
Una vez realizada la técnica IHQ, se realizarán cuatro cortes a la retina para relajarla y se montará sobre un portaobjetos con medio de montaje y un cubreobjetos (Cao y col, 2010). En retinas controles o dañadas con CoCl2 y en presencia o ausencia de Ang-(1,7) o antagonistas de los receptores de la Ang-(1,7), o un inhibidor de la ECA2, se determinarán y cuantificarán diversos parámetros de la vasculatura localizada en la capa de células ganglionares. Se medirá la longitud de los vasos, ramificaciones, anastomosis y tortuosidad (Cao y col, 2010). Se observará también la presencia o no de proyecciones intrarretinianas en la INL y ONL, que son anómalas en el zebrafish.

Determinación de apoptosis neuronal y glial mediante la técnica de TUNEL en cortes retinianos:
Mediante este método se identificará muerte celular por apoptosis de los tipos celulares distribuidos en las distintas capas retinianas, utilizando un kit comercial. Se utilizarán tratamientos intravítreos con Ang-(1-7), antagonistas del RMas y RAT2, o inhibidores de la ECA2, en retinas controles y dañadas con CoCl2, para examinar sus efectos sobre la muerte celular. Se utilizarán marcadores de la glia de Müller (un anticuerpo anti-GFAP) por IHQ de fluorescencia (roja, anticuerpo secundario acoplado a CY3), junto con la marcación para TUNEL (fluorescencia verde) para estimar la muerte neuronal y glial (Battista y col, 2009; Medrano y col, 2017; 2020). Además, utilizando doble marcaje con una lectina de tomate LEL acoplada a biotina y estreptavidina-Cy3 (fluorescente rojo) que marca el endotelio vascular en el zebrafish y TUNEL (verde) se podrá identificar apoptosis de las células endoteliales, en las retinas dañadas con CoCl2 y en presencia o ausencia de los antagonistas y agonistas de los RMas y RAT2, y del inhibidor de la ECA2.

Factibilidad
Subsidios para financiar este proyecto en **vigencia** a la fecha actual.
1) Proyectos de Investigación Plurianuales (PIP) - CONICET. 2023-2025. Código: 2393CO. "Modelos animales de plasticidad vascular y neuroglial en la retina de vertebrados. Posibles blancos terapéuticos con acción neuroprotectora y regenerativa" (IFIBIO HOUSSAY-CONICET-UBA). Director: MP Faillace. Co-director: Ramón Bernabeu. 2) UBACYT 2019-2025 - Grupos consolidados (Prorrogado). Financiado. N°: 20020190100057BA. EX-2020-01595677 Director: R. Bernabeu. Co-director: MP Faillace. 3) PICT 2020. Iniciado en 2023. Financiado. Director: MP Faillace.

Bibliografía (Citada y consultada, desarrollar en no más de una carilla):
Adamis AP, Aiello LP, D'Amato RA (1999) Angiogenesis and ophthalmic disease. Angiogenesis 3:9–14
Adamis AP, Shima DT (2005) The role of vascular endothelial growth factor in ocular health and disease. Retina 25:111–118
Battista AG, Ricatti MJ, Pafundo DE, Gautier MA, and Faillace MP (2009) Extracellular ADP regulates lesion induced in vivo cell proliferation and death in the zebrafish retina. J Neurochem 111:600-613.

Cao Z , Jensen LD, Rouhi P, Hosaka K, Länne T, Steffensen JF, Wahlberg E, Cao Y. (2010) Hypoxia-induced retinopathy model in adult zebrafish. Nature protocols. 5:1903-10. doi:10.1038/nprot.2010.149
Costagliola C, Verolino M, de Rosa ML, Iaccarino G, CiancagliniM, Mastropasqua L (2000) Effect of oral losartan potassium on intraocular pressure in normotensive and glaucomatous human subjects. Exp Eye Res 71:167–171
Foureaux G, Nogueira JC, Nogueira BS, Fulgencio GO, Menezes GB, Fernandes SO, Cardoso VN, Fernandes RS, Oliveira GP, Franca JR, Faraco AA, Raizada MK, Ferreira AJ (2013). Antiglaucomatous effects of the activation of intrinsic angiotensin converting enzyme 2. Invest Ophthalmol Vis Sci 54:4296–4306
Gironacci MM, Cerniello FM, Longo Carbajosa NA, Goldstein J, Cerrato BD (2014) Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. ClinSci (Lond). 127:295-306
Gore AV, Monzo K, Cha YR, Pan W, Weinstein BM (2012) Vascular development in the zebrafish. Cold Spring Harb Perspect Med 2:a006684
Henkind P, Wise GN (1974) Retinal neovascularization, collaterals, and vascular shunts. Br J Ophthalmol 58:413–422
Jiang, T, Yu, JT., Zhu, XC, Zhang, QQ, Tan, MS et al. (2014) Angiotensin-(1-7) induces cerebral ischaemic tolerance by promoting brain angiogenesis in a Mas/eNOS-dependent pathway. Br J Pharmacol 171:4222-4232.
Kim LA, D'Amore PA (2012) A brief history of anti-VEGF for the treatment of ocular angiogenesis. Am J Pathol 181:376–379
Medrano MP, Bejarano CA, Battista AG, Venera GD, Bernabeu RO, Faillace MP. Injury-induced purinergic signalling molecules upregulate pluripotency gene expression and mitotic activity of progenitor cells in the zebrafish retina. Purinergic Signal. 2017 Dec;13(4):443-465. doi: 10.1007/s11302-017-9572-5. Epub 2017 Jul 14.
Medrano MP, Pisera Fuster A, Sanchis PA, Paez N, Bernabeu RO, Faillace MP. Characterization of proliferative, glial and angiogenic responses after a CoCl2 -induced injury of photoreceptor cells in the adult zebrafish retina. Eur J Neurosci. 2018 Nov;48(9):3019-3042. doi: 10.1111/ejn.14113. Epub 2018 Sep 30.
Medrano MP, Pisera-Fuster A, Bernabeu RO, Faillace MP. P2X7 and A2A receptor endogenous activation protects against neuronal death caused by CoCl2 -induced photoreceptor toxicity in the zebrafish retina. J Comp Neurol. 2020 Aug;528(12):2000-2020. doi: 10.1002/cne.24869. Epub 2020 Feb 7.
Penn JS, Madan A, Caldwell RB, Bartoli M, Caldwell RW, Hartnett ME (2008) Vascular endothelial growth factor in eye disease. Prog Retin Eye Res 27:331–371.
Rezzola S, Belleri M, Gariano G, Ribatti D, Costagliola C, Semeraro F, Presta M. (2014) In vitro and ex vivo retina angiogenesis assays. Angiogenesis. 17:429-42. DOI 10.1007/s10456-013-9398-x. Review.
Vaajanen A, Vapaatalo H, Kautiainen H, Oksala O (2008) Angiotensin (1–7) reduces intraocular pressure in the normotensive rabbit eye. Invest Ophthalmol Vis Sci 49:2557–2562
Verma A, Shan Z, Lei B, Yuan L, Liu X, Nakagawa T, Grant MB, Lewin AS, Hauswirth WW, Raizada MK, Li Q. (2012)