

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SECCIÓN DEPARTAMENTAL DE BIOQUÍMICA Y
BIOLOGÍA MOLECULAR I**



TESIS DOCTORAL

**Funciones de la autofagia en el desarrollo de la
retina: metabolismo, diferenciación y muerte
celular**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Lorena Esteban Martínez

DIRECTORA

Patricia Boya

Madrid, 2017

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



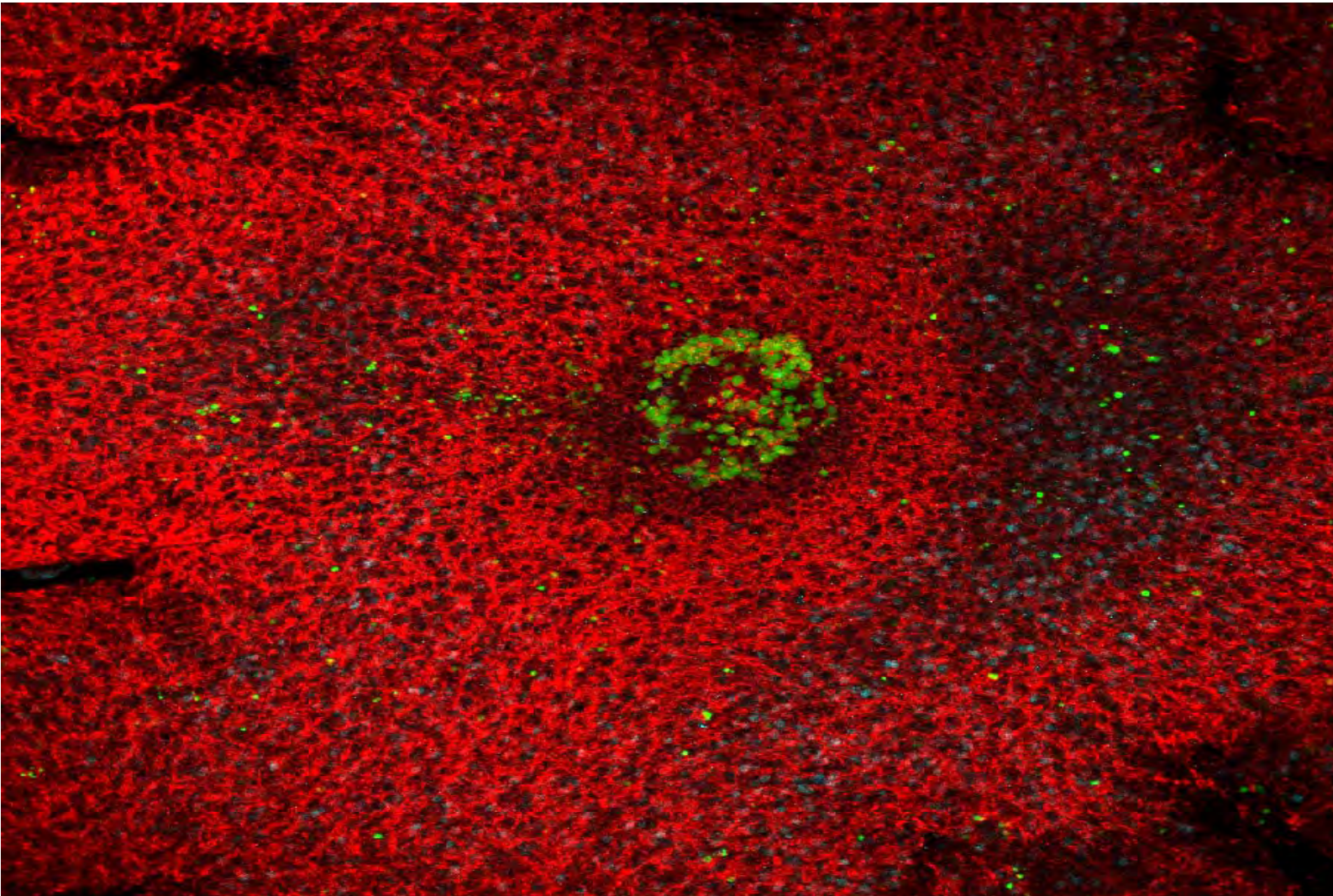
UNIVERSITÄT

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Centro de Investigaciones Biológicas

*Funciones de la autofagia en el desarrollo de la retina:
metabolismo, diferenciación y muerte celular*

Tesis Doctoral

Lorena Esteban Martínez



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Biológicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
Centro de Investigaciones Biológicas



*Funciones de la autofagia en el desarrollo de la retina:
metabolismo, diferenciación y muerte celular*

Memoria presentada por Lorena Esteban Martínez para optar al grado de Doctora en
Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina por la Universidad Complutense de
Madrid

VºBº de la Directora de la Tesis

Patricia Boya

VºBº del Tutor

Guillermo Velasco

Lorena Esteban Martínez

2016

“Todo cabe en lo breve. Pequeño es el niño y encierra al hombre; estrecho es el cerebro y cobija el pensamiento; no es el ojo más que un punto y abarca leguas”

Alejandro Dumas

A mis padres y hermanos.
A Alberto.

AGRADECIMIENTOS

Es un honor comenzar esta Tesis Doctoral por la parte mas importante, el poder agradecer a todos los que comenzáis a leer estas palabras que de alguna manera u otra habéis formado parte de esta aventura. En primer lugar, quiero expresar mi agradecimiento a la Dra. Patricia Boya, por confiar en mí desde el primer momento, aun cuando llegué al laboratorio como un pez que apenas sabe nadar. Gracias por permitirme formar parte de tu laboratorio durante todos estos años, por enseñarme a avanzar en el complicado mundo de la ciencia, por haber contado conmigo para ampliar mis conocimientos más allá de esta Tesis. Aun hoy sigo pensando que me queda un largo camino por aprender. Gracias por intentar que así sea. También quiero agradecer a los Doctores Flora de Pablo, Enrique de la Rosa, Teresa Suárez y Catalina Hernández todo su apoyo científico durante estos años. Cada día se puede aprender algo nuevo de vosotros.

Antes de comenzar a agradecerles a todas las personas que he conocido a lo largo de estos años, tengo que hacer una especial mención a los ratones CD1, C57, GFP-LC3, Ambra1, Atg5 y a los ratones neoyorquinos Lamp2A y NIX. Por que sin vuestros embriones, ojos y retinas, jamás hubiera sido Doctora. Espero que este trabajo al menos sea valorado por vuestra valiosa presencia.

Muchos han sido los años en los que he estado entregada a este trabajo y durante los cuales he conocido a gente que me ha aportado muchísimas cosas, más allá del ámbito académico. Y es que aunque en este laboratorio haya coincidido con personas en el pasado diferentes a las actuales, todos vosotros formáis parte de esta historia. A los del pasado: Sergio, Marian, Natalia, Kike... nunca me olvidaré de vosotros. En primer lugar quiero agradecerle a Sergio su valiosa presencia en el laboratorio a mi llegada. No solo me enseñaste a sacrificar ratones sin que me diera un infarto antes, si no que me diste fuerzas y ánimos para no salir corriendo ante las adversidades. Eres un gran compañero de trabajo y sobre todo una gran persona y me siento afortunada de tenerte como amigo. A Marian, gracias por tu enorme paciencia, apoyo, ayuda y consejos al comienzo de mi tesis. En cierto modo fuiste una maestra para mí, asi que espero que estés orgullosa, porque al final no hay retina que se me resista. Natalia, eres todo un ejemplo a seguir. Admiro no solo tu inteligencia, sino también tu voluntad. Confío en que llegarás muy alto. Kike, aunque estuviste poco con nosotros, gracias por los

temibles genotipajes de los embriones Ambra y por darlo todo en el play back de la fiesta de la primavera del CIB del 2011!.

Gracias al resto de personas de aquella época inicial: Jimena, Estíbaliz, Anne, Kikote, Esther, Ana Robles, Ana Arroba, Miguel Marchena, Isa, Sandra y todos los pollitos que han ido pasando por el 3D lab. Gracias por vuestras risas en las comidas que hacían el día más agradable. Gracias a José, por los genotipajes y por tus chistes. Y gracias a los que aun continuáis: Alberto, Tani, Noemí y Patri V. Sois unos veteranos imprescindibles en ese laboratorio. A Alberto y Tani, quiero agradecer vuestra disposición en cada momento que he necesitado de vosotros, y por preguntarme qué tal va esta Tesis que como veis, ha llegado a su fin. A Noemí y Patri V quiero agradecerlo todo. Sois un pilar fundamental no solo en vuestro laboratorio, si no para todas vuestras vecinas del 147. Para mi sois unas grandes científicas, y haya donde estéis, siempre lo seréis.

Y qué decir de mis pollos del presente. Sois las mejores compañeras que se puede tener. No solo ayudáis a avanzar en los momentos de crisis, si no que hacéis de un día nublado un gran amanecer soleado. Nunca olvidaré nuestras conversaciones que escucha hasta “el apuntador” o “cualquier Ignacio”. Os voy a echar muchísimo de menos! Ya me queda un suspiro para abandonar el barco, así que he ido cogiendo provisiones de pañuelos antillorera. Lucía muchas gracias por haber compartido conmigo grandes momentos durante la tesis. Por los congresos, por el mutuo apoyo, por las tardes de cerves arreglando el mundo, por enseñarme a contar en alemán... por mucho más que una compañera de Tesis. Ah!! y por aquel baile de pollitos que nos llevó a conseguir el jamón de la fiesta del CIB!! Ana, muchas gracias por ser el “loro” del Boya lab. Gracias por tus conversaciones, consejos, risas y momentos surrealistas. Por las cerves, alguna noche llena de magia compartida con los pollitos y como no, de esas maravillosas canciones que te da por tararear en cualquier momento. Esther, nunca podremos estar lo suficientemente agradecidas por tu tremenda experiencia y por saber transmitirla. Gracias por formar parte de este trabajo y ayudar a que salga adelante. Allá donde estemos, espero verte en las fiestas del CIB, porque tengo una botella de Vodka que compartir. Elena, muchísimas gracias por todo. Eres una excelente científica y persona que merece mucho la pena tener cerca. Me alegro mucho de haber podido aprender de ti, esta tesis refleja esa parte de una gran compañera. Y gracias por tus puntazos inesperados que nos hacen reír en las comidas. Raquel, nuestro pollo grande. Gracias por tu apoyo en mi etapa final, tu ayuda en mi viaje al otro lado del charco y

sobre todo, por transmitir a este laboratorio algo de tranquilidad. Y Bea, la última adquisición. Siempre te estaremos agradecidas por esa tremenda sonrisa que te acompaña y por tu optimismo. Estoy convencida de que te irá genial porque te lo mereces. También estoy convencida de que terminarás bebiendo cervezas...

No me puedo olvidar de personas que han pasado un periodo breve en nuestro laboratorio, como Marta y Fengjuan. Me alegro mucho de haberos conocido. Ni del resto de vecinos del CIB con los que compartimos momentos en la campaña de cultivos, reactivos, y por supuesto buenas conversaciones y risas: los Corbís (Víctor, Marta, Ignacio, Elena, Miriam, Emmanuel, Pilar...) y los Vidales (Mónica, Fabio y Kasia). Gracias por estar ahí.

De igual modo, tengo que agradecer a científicos del CIB como el Dr. Ángel Luis Corbí, el Dr. Miguel Ángel Vega, el Dr. José Luis Rodríguez Fernández, el Dr. Eduardo Rial y el Dr. José María Sánchez Puelles, por vuestro valioso apoyo científico en algún momento de esta Tesis.

Pero además de todas las personas con las que comparto el día a día, quiero agradecer a todo el personal científico y no científico del Centro de Investigaciones Biológicas, desde el servicio de esterilización, limpieza, fotografía, servicio técnico ... conseguís que el centro se mantenga día a día y que podamos llevar a cabo nuestro trabajo. Sois también protagonistas de esta historia porque con vuestra disposición y trabajo hacéis el camino mucho más fácil. En especial, agradecer a los servicios con los que he trabajado en mayor medida y a todo su personal por su experiencia: Maite, Gema, Lorena, Noemí y todas las personas que han pasado por el Confocal; a Bego y Fernando de microscopía electrónica; a Pedro de citometría y a todo el personal del animalario, en particular, a Dani, Esther, Carlos y Pablo. Gracias por cuidar de nuestros ratoncillos, por vuestra disposición en todo momento, por enseñarme y ayudarme a avanzar. Por vuestras risas. Y gracias por participar con los pollos en la fiesta del CIB. Aunque nuestro equipo perdió la gymkhana pasamos grandes momentos.

Tengo que agradecer también el apoyo científico externo al CIB por parte del Dr. Marcos Malumbres y la Dra. María Salazar en el CNIO. Gracias por hacerme participe de vuestro trabajo enriquecedor. Y gracias por formar parte del mío. Y a Guillermo Mariño, muchas gracias por tu gran experiencia científica en nuestra colaboración, que espero pronto tenga sus frutos.

Quería dedicar una parte de los agradecimientos a todas las personas con las que he coincidido en mi estancia en Nueva York. Fue una experiencia maravillosa, que me

aportó muchísimo a nivel laboral y sobre todo a nivel personal. Muchas gracias a la Dra. Ana María Cuervo, una científica digna de admirar. Ha sido un honor formar parte de tu laboratorio durante 3 meses y poder enriquecerme de todos vosotros. Espero que nuestros caminos se vuelvan a cruzar en algún momento.

Pero esta historia comienza mucho antes de mi llegada al laboratorio. En realidad, a quien le tengo que estar verdaderamente agradecida es a mi cuñada Sonia. Ojalá hubieras podido estar hoy presente, se que te hubiera encantado. Gracias por haberme aconsejado que estudiara Biología y que realizara una Tesis; por confiar en que podría lograrlo. Seguro que desde ahí arriba te sientes orgullosa de mí. Y gracias a eso es como conocí a unas neuronitas maravillosas en la universidad. En primer lugar quiero darle las gracias al gran eritrocito de la historia de la biología, Félix. Por todos los buenos momentos vividos desde hace 12 años, por haber cogido tu a la raya en aquellas prácticas de zoología y por aquella maravillosa prótesis de rodilla. A Selene, muchas gracias por estar conmigo también desde el comienzo e incluso en nuestra aventura neoyorquina que nos enseñó a ser fuertes. Viva Breaking Bad y las ardillas del Central Park!. A Miguel, que te voy a decir a ti mi auténtica neuronita. Sabes que eres muy especial. Gracias por tus consejos en la facultad, por tu sonrisa siempre en la cara, y por tu esfuerzo que ha permitido que te veamos en tu sitio. Hay poca gente tan grande como tú. A Virginia, muchísimas gracias por ser como eres, por enseñarme que existe la versión “paperwoman”, igual de guapa en cuerpo y cerebro. Fue un honor compartir la taquilla con tus globos y dibujo de calavera. A Sari, gracias por los ánimos y por ser el esfuerzo personificado, por no rendirte nunca. Gracias por enseñarme que un gran científico no se mide por la suerte que tenga en la vida. Y gracias por compartir conmigo aquella boda y despedida de soltera, querida Miley. A Giaco y Sandra, muchas gracias por esta última etapa. Aunque os conozca un poco menos, me habéis aportado risas y apoyo en nuestra fase tesista. Sois geniales!.

Tengo que agradecerle también su apoyo a una serie de personas que me conocen de cerca. A Iliana, por todo. Eres una amiga incondicional y gran parte de esta Tesis en cierto modo también es tuya. Gracias por estar siempre a mi lado y por los grandes momentos vividos, y los que quedan. Por acompañarme en mis aventuras de biólogos, por escucharme siempre, por alegrarte por mis logros y por estar orgullosa de mí desde el más sincero corazón. Gracias a Nuria, Félix y Dani, por considerarme como de la familia. Y gracias a Pablo, Felipa, Pablo, Mari Carmen, Pablito, Chispi, Jesús y

Ana, por todo vuestro apoyo en todo momento. Soy muy feliz formando parte de vuestras vidas.

Y en último lugar, quiero agradecerle a toda mi familia su mera existencia y su apoyo incondicional. A mis padres, por haber permitido con vuestro esfuerzo que tuviera unos estudios que me han llevado hasta aquí. Gracias por confiar en mí, por no haberme impuesto nunca lo que tenía que hacer con mi futuro y por enseñarme a ser como soy. Sin vosotros esta Tesis no hubiera tenido sentido. Me alegro mucho de que formarais parte también de mi estancia y de que hayáis podido conocer Nueva York. Espero que con esto no sigáis presumiendo de hijos xD. A mis hermanos, por ser tan distintos como sois, lo que hace que mi vida sea aun mejor. Gracias por bajar el volumen de la música en mis tiempos de estudio, por ello llegué hoy hasta donde estoy. Y gracias por escuchar lo que digo cuando hablo de mi trabajo aunque no entendáis ni una palabra. Preparaos para la próxima carrera de karts porque con la Tesis terminada ya podré con todo!. Gracias a mis sobrinos, Sandra y Roberto, por no pensar que soy una asesina de ratones y que lo que hago tiene algo de valor. Y gracias a mis primas Cira, Noemí, Mónica y Ana, vuestros ánimos siempre me han hecho sentir como si ya hubiera triunfado.

El último párrafo de esta parte tan importante quiero dedicárselo a la persona gracias a la cual sin duda hoy puedo decir que soy Doctora: a Alberto. Eres la mejor persona que he conocido y me siento muy afortunada de tenerte a mi lado. Gracias por no permitirme que tire la toalla en esta última etapa tan difícil para mí, y por haber sobrevolado el Atlántico para estar conmigo. En cierto modo, Nueva York y Washington siempre formarán parte de nuestras vidas. Gracias por entenderme en cada decisión y cada paso que doy. Gracias por confiar en que todo mi esfuerzo tendrá su recompensa. Gracias por no frenarme en mi carrera científica en ningún momento y por no imponerme ningún futuro. Mi futuro es hoy y contigo, allá donde queramos. Gracias por permitirme ser una parte tan importante de tu vida.

ÍNDICE

RESUMEN	17
ABSTRACT	18
ABREVIATURAS	19
INTRODUCCIÓN	25
1. LA AUTOFAGIA	25
1.1 La macroautofagia	26
1.2 La autofagia mediada por chaperonas (CMA)	29
1.3 Funciones fisiológicas de la autofagia	32
1.3.1 Control de la calidad celular mediante la autofagia	33
1.3.2 Papel metabólico de la autofagia	34
1.4 La autofagia y su relación con patología	36
2. LA MITOFAGIA	37
2.1 La mitocondria	37
2.1.1 Metabolismo mitocondrial	37
2.1.2 La homeostasia mitocondrial	39
2.2 La Mitofagia	40
2.2.1 Definición de la mitofagia	40
2.2.2 Funciones y reguladores moleculares de la mitofagia	41
2.2.2.1 Degradación de mitocondrias dañadas vía PINK1-Parkina	42
2.2.2.2 Degradación de mitocondrias vía NIX/BNIP3	44
2.2.2.3 Mecanismos de compensación entre los reguladores de mitofagia	47
3. DESARROLLO DE LA RETINA DE VERTEBRADOS	49
3.1 Estructura de la retina adulta	49
3.2 Desarrollo de la retina de vertebrados	50

3.3 Desarrollo de las células ganglionares de la retina _____	53
3.4 Muerte celular durante el desarrollo de la retina _____	54
3.5 Autofagia en retina y su relación con la muerte celular durante el desarrollo embrionario _____	56
4. MITOFAGIA Y MUERTE CELULAR _____	57
5. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA _____	59
5.1 Efecto Warburg _____	59
5.2 Metabolismo de la retina de vertebrados _____	60
5.3 Mitofagia y reprogramación metabólica _____	61
5.4 Mitofagia en las neuronas _____	63
OBJETIVOS _____	69
MATERIALES Y MÉTODOS _____	73
1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y EXTRACCIÓN DE RETINAS _____	73
1.1 Ratones wildtype C57 y CD1 _____	73
1.2 Ratones GFP-LC3 _____	73
1.3 Ratones deficientes de Atg5 _____	74
1.4 Ratones deficientes de Ambra1 _____	74
1.5 Ratones deficientes de NIX (BNIP3L) _____	74
1.6 Ratones deficientes de LAMP-2A _____	74
2. GENOTIPAJE DE LOS RATONES KNOCK-OUT _____	75
2.1 Genotipaje de ratones adultos y embriones de la colonia Atg5 _____	76
2.2 Genotipaje de ratones adultos y embriones de la colonia NIX _____	76
2.3 Genotipaje de ratones adultos de la colonia Ambra1 _____	77
2.4 Genotipaje de embriones deficientes de Ambra1 _____	78
3. ESTUDIO DEL FLUJO DE AUTOFAGIA <i>IN VIVO</i> _____	79
4. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINAS _____	79
5. MONTAJE EN PLANO DE RETINAS EMBRIONARIAS _____	81
6. INMUNOFLUORESCENCIA DE RETINAS EN PLANO _____	81

7. DETECCIÓN DE LA MUERTE CELULAR	82
8. PREPARACIÓN DE SECCIONES DE OJO PARA INMUNOFLUORESCENCIA	83
9. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONFOCAL	84
10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA	85
11. DISOCIACIÓN DE RETINAS Y CITOMETRÍA DE FLUJO	85
12. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO Y DETECCIÓN DE RNA MENSAJERO	87
13. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT	89
14. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ATP	91
15. ANÁLISIS METABÓLICO	91
16. EXTRACCIÓN Y ESTIMULACIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN	94
17. CULTIVO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS	94
18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	95
RESULTADOS	99
1. ESTUDIO DE LA AUTOFAGIA EN LA RETINA DE RATÓN	99
2. FENOTIPO DE MUERTE CELULAR TRAS EL BLOQUEO DE AUTOFAGIA DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DE RATÓN	104
3. FENOTIPO DE MUERTE CELULAR TRAS LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DE RATÓN	122
4. MITOFAGIA DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO, LA DIFERENCIACIÓN Y LA MUERTE CELULAR	138
4.1 Mitofagia y metabolismo	138
4.2 Mitofagia y diferenciación de las células ganglionares de la retina de ratón	146
4.3 Señal inductora y mecanismo molecular de mitofagia en retinas de E15.5	162

4.4 Mitofagia y muerte celular en E15.5 _____	171
4.5 Mitofagia durante el desarrollo postnatal de la retina _____	174
DISCUSIÓN _____	179
1. ESTUDIO DEL FLUJO DE AUTOFAGIA EN RETINA _____	179
2. LA AUTOFAGIA ES ESENCIAL PARA LA ELIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS APOPTÓTICAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RETINA _____	180
3. LA MITOFAGIA ES ESENCIAL PARA EL DESARROLLO DE LA RETINA DE RATÓN _____	185
3.1. Un aumento de NIX regula la mitofagia en retinas a E15.5 _____	185
3.2. La mitofagia regula la muerte celular fisiológica de la retina en desarrollo _____	194
3.3. La mitofagia induce un cambio metabólico durante el desarrollo de la retina de ratón _____	199
3.4. La mitofagia regula la diferenciación de las células ganglionares de la retina _____	204
3.5. Mitofagia durante el desarrollo postnatal de la retina _____	209
4. EL CAMBIO METABÓLICO REGULA LA DIFERENCIACIÓN CELULAR _____	211
CONCLUSIONES _____	221
BIBLIOGRAFÍA _____	225
ANEXOS _____	255

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral hemos querido entender el papel de la autofagia y la mitofagia en el desarrollo de la retina de ratón. Nuestros datos muestran que la autofagia es un proceso activo durante el desarrollo de la retina de ratón, sobre todo en los estadios embrionarios iniciales, siendo las células ganglionares las que presentan un mayor flujo de autofagia. Este proceso presenta diversas funciones durante la fisiología de la retina embrionaria. En primer lugar, hemos demostrado que existen diferencias en los niveles de masa mitocondrial en las retinas de embriones en E13.5 debido a la degradación de mitocondrias por mitofagia únicamente en la región central de la retina en dicho estadio. Por otro lado hemos demostrado que la autofagia es necesaria para mantener unos niveles de ATP adecuados para la exposición de fosfatidil-serina en la superficie de las células apoptóticas, lo que permite su reconocimiento y degradación.

Esta función no es universal, ya que la inhibición de autofagia no produce una acumulación de células apoptóticas en la región central, donde la masa mitocondrial es menor. Por otro lado, la mitofagia que se produce en la zona central de la retina contribuye a la muerte neural temprana localizada en dicha región.

Además, esa degradación mitocondrial se produce de manera generalizada en toda la retina en un estadio del desarrollo mas avanzado, E15.5, debido a la activación del proceso de mitofagia regulado por hipoxia y NIX. En este caso, la mitofagia no solo contribuye a la muerte fisiológica de la retina, si no que también es responsable de un cambio metabólico hacia glicólisis necesario para la correcta diferenciación de las células ganglionares de la retina. Además, existe una estrecha relación entre el metabolismo, la masa mitocondrial y la diferenciación, ya que la modulación directa de la glicólisis produce cambios en los niveles de mitocondrias y altera la diferenciación de células ganglionares. Ese cambio metabólico mediado por mitofagia, también podría estar implicado en la polarización de macrófagos hacia tipo proinflamatorio M1 y en la diferenciación temprana de células *stem*.

ABSTRACT

In this PhD we wanted to understand the role of autophagy and mitophagy in the developing mouse retina. Our data show that autophagy is an active process during development of the mouse retina, especially in the early embryonic stages, being retinal ganglion cells which have a greater autophagy flux. This process has several functions during embryonic retina physiology. First, we have shown that there are differences in mitochondrial mass levels in the retinas of E13.5 embryos due to degradation of mitochondria by mitophagy only in the central region of the retina in that stage. Furthermore we have shown that autophagy is necessary to maintain ATP levels suitable for the exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic cells, allowing their recognition and degradation. This function is not universal, since inhibition of autophagy doesn't lead to an accumulation of apoptotic cells in the central region where the mitochondrial mass is lower. Furthermore, the mitophagy that occurs in the central area of the retina contributes to early neural cell death located in that region.

Moreover, the mitochondrial degradation occurs widely in the entire retina in a more advanced stage of development, E15.5 due to activation of mitophagy process regulated by hypoxia and NIX. In this case, mitophagy not only contributes to the physiological cell death of the retina, if not it is also responsible for a metabolic shift towards glycolysis required for proper differentiation of retinal ganglion cells. Furthermore, there is a close relationship between the metabolism, mitochondrial mass and differentiation, since direct modulation of glycolysis lead to changes in mitochondrial levels and disturb the differentiation of retinal ganglion cells. That metabolic change mediated by mitophagy also may be involved in macrophage polarization to proinflammatory type M1 and to early differentiation of stem cells.

ABREVIATURAS

3-MA	3-metil-Adenina
ABC	del inglés, <i>ATP Binding Cassette</i>
<i>Ad libitum</i>	sin límite
AKT	proteína kinasa B
Ambra1	del inglés, <i>Activating Molecule of Beclin-1 Regulated Autophagy</i>
AMPK	proteína kinasa activada por AMP
ANT	adenín-nucleótido translocasa
AO	antimicina+oligomicina
Atg	del inglés, <i>Autophagy Related Gene</i> . Gen relacionado con la autofagia
ATP	adenosin trifosfato
AZD	AZD8055
Bak	del inglés, <i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i>
Bax	del inglés, <i>Bcl-2 associated x protein</i>
Blot	del inglés, transferencia
Becn1	gen de beclina1
Boc	Boc-D-FMK
Brn3a	Factor de transcripción <i>Brain3a</i>
BSA	del inglés, <i>Bovine serum abumine</i> . Albúmina sérica bovina
Casp3a	Caspasa-3 activa
CCCP	carbonilcianuro-m-clorofenilhidrazona
cDNA	DNA complementario
CMA	del inglés <i>Chaperone mediated autophagy</i> .
COX	citocromo oxidasa
DABCO	1,4-diazabicyclo-(2, 2,2)-octano
DAPI	1,4-diamino-2-fenilindol
<i>De novo</i>	del latín, de nuevo
DHE	del inglés, <i>dihydroethidium</i>
DIOC	del inglés, <i>3,3'-Dihexyloxacarboxyanine Iodide</i>
DMEM	del inglés, <i>Dulbecco 's Modified Eagle 's Médium</i>
DNA	del inglés, <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
DNasa	enzima que digiere el DNA
dNTP	del inglés, <i>deoxynucleotide-triphosphate</i>
DTT	ditiotreitól
E	Día Embrionario
EBSS	del inglés, <i>Earl 's Balanced Salt Solution</i>
ECAR	del inglés, <i>extracellular acidification rate</i> .
EDTA	etilendiaminotetraacético
ER	retículo endoplasmico
FBS	del inglés, <i>fetal bovin serum</i> . Suero fetal bovino
FCCP	del inglés, <i>fluoro-carbonyl cyanide phenylhydrazone</i> .
Feeder	del inglés, sustento alimenticio
FOXO3	factor de transcripción de la familia forkhead box O
GAPDH	del inglés, <i>Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase</i>
GCL	del inglés, <i>Ganglion Cell Layer</i> . Capa de células ganglionares

<i>gene trapping</i>	técnica genética para la inactivación y detección génica por inserción de secuencias en el genoma
GFP	del inglés, <i>green fluorescent protein</i> . Proteína verde fluorescente
HCQ	hidroxicloroquina
HK	hexokinasa
Hsc70	del inglés, <i>heat shock cognate protein of 70kDa</i>
IF1	del inglés, <i>inhibitor factor 1</i> . Factor inhibitorio 1
IFN- γ	Interferon γ
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
<i>in vitro</i>	del latín, en el vidrio. De forma artificial.
<i>in vivo</i>	del latín, en vivo
IP	inyección intraperitoneal
IPL	capa plexiforme interna
iPS	del inglés, <i>induced pluripotent stem (cells)</i>
JNK	del inglés, <i>c-jun N-terminal kinase</i>
KO	del inglés, knock-out
L2A	LAMP-2A, glicoproteína de membrana asociada a lisosoma de tipo 2
LAP	Fagocitosis asociada a LC3
LC3	del inglés, <i>microtubule-associated protein 1 light chain 3</i>
LDH	lactato deshidrogenasa
Leu	leupeptina
LIF	del inglés, <i>Leukemia inhibitory factor</i> .
LKB	kinasa B de hígado
LPS	lipopolisacárido
LTR	Lysotracker Red
LY	LY294002
M	del inglés, <i>mature</i> . Zona más madura de la retina.
M1	macrófagos de tipo proinflamatorio M1
M2	macrófagos de tipo antiinflamatorio M2
Merge	del inglés, colocalización
MP	Metil-piruvato
mRNA	RNA mensajero
mtDNA	DNA mitocondrial
MTDR	Mitotracker deep red
Mtf	Mitofusina
mTOR	del inglés, <i>Target of rapamycin</i>
MUL1	del inglés, <i>mitochondrial E3 ubiquitin protein ligase 1</i>
NbL	capa de neuroblastos
Nfe2l1	del inglés, <i>nuclear respiratory factor 2</i>
NGS	del inglés, <i>Normal Goat Serum</i> . Suero normal de cabra
NRF1	del inglés, <i>nuclear respiratory factor 1</i> , factor respiratorio nuclear 1
OCR	del inglés, <i>oxygen consumption rate</i>
Optn	gen de Optineurina
OXPHOS	fosforilación oxidativa
P	Postnatal
Park2	gen de Parkina
PBS	del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCNA	del inglés, <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	del inglés <i>polymerase chain reaction</i>

PE	fosfatidiletanolamina
PFA	paraformaldehído
Pi	fosfato inorgánico
PI3K	del inglés, <i>Phospho-Inositide-3 kinase</i> . Fosfatidil-inositol-3 kinasa.
PINK1	proteína kinasa 1 inducida por PTEN
PK	piruvato kinasa
PS	del inglés, <i>Phosphatidyl-Serine</i> . Fosfatidil-serina.
MPTP	poro de transición de permeabilidad mitocondrial
Rapa	rapamicina
RIN	del inglés, <i>RNA integrity number</i>
ROS	del inglés, reactive <i>oxygen species</i> , especies reactivas de oxígeno
ROT	rotenona
SDS	dodecilsulfato de sodio
Sirt1	sirtuína 1
SMURF1	del inglés, <i>SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1</i>
TCA	ciclo de los ácidos tricarboxílicos
TdT	el inglés, <i>Terminal Deoxinucleotidyl Transferase</i>
TE	tris-EDTA
TF	del inglés, <i>transcription factor</i> . Factor de transcripción
TFEB	factor de transcripción EB
TL	del inglés, <i>Tomato Lectin</i> . Lectina de tomate
TUNEL	del inglés, <i>TdT-mediated dUTP Nick End Labelling</i>
WM	wortmanina
Wt	<i>wildtype</i> , genotipo salvaje
X ^{+/+}	Genotipo homocigoto para el alelo salvaje
X ^{gt/gt}	Genotipo homocigoto para el alelo inactivado por <i>gene trapping</i>
Y	del inglés, <i>young</i> . Zona menos madura, de neuronas recién diferenciadas
$\Delta\Psi_m$	potencial de membrana mitocondrial

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

1. LA AUTOFAGIA

La homeostasis celular se mantiene con un equilibrio entre la síntesis y la degradación de los componentes celulares. Las células contienen dos sistemas proteolíticos: el sistema ubiquitina-proteasoma y el sistema lisosomal. La degradación de componentes intracelulares en el interior de los lisosomas se conoce como autofagia, que deriva de las palabras griegas “auto” (que significa a sí mismo) y “fagia” (que significa comer) (Boya et al, 2013).

Se han identificado tres tipos de autofagia basados en cómo los componentes celulares alcanzan el lisosoma: la macroautofagia, la autofagia mediada por chaperonas o CMA, y la microautofagia (Figura 1). La macroautofagia es el más conocido y simplemente se suele denominar autofagia. Durante este proceso los componentes celulares que van a ser degradados se encierran en un orgánulo llamado autofagosoma que se fusionará con el lisosoma (Ktistakis & Tooze, 2016). La autofagia mediada por chaperonas sólo está presente en las células de mamífero y permite la degradación selectiva de proteínas que poseen una secuencia de aminoácidos determinada. Este motivo es reconocido por una chaperona y tras la unión con un receptor presente en la membrana lisosomal permite la translocación de la proteína al interior del lisosoma (Kaushik & Cuervo, 2012). Por último, la microautofagia es un proceso mucho menos conocido donde el material a ser degradado se transloca directamente al interior del lisosoma (Sahu et al, 2011). Los lisosomas contienen más de 60 hidrolasas ácidas que son capaces de romper y digerir la mayor parte del material biológico (Boya, 2012). La degradación mediante estas enzimas (nucleasas, proteasas, lipasas y glicosidasas), genera unos productos que son devueltos al citoplasma mediante transportadores y permeasas embebidas en la membrana lisosomal (Yang & Klionsky, 2010a).

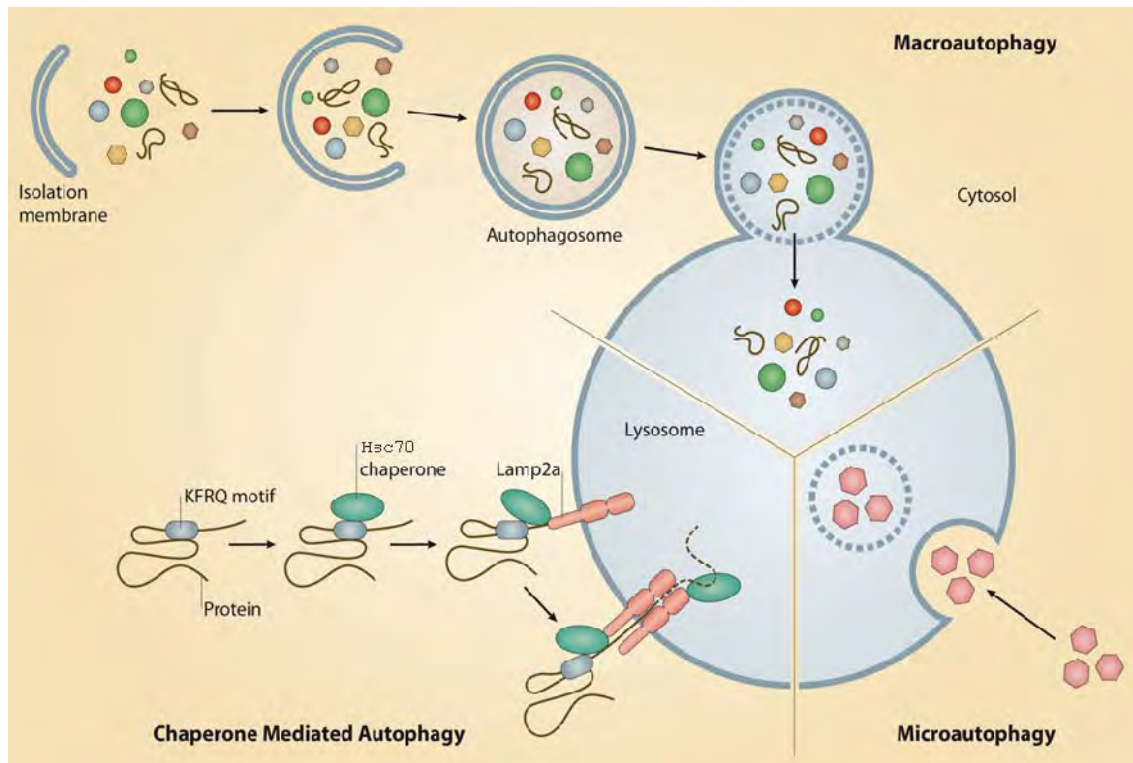


Figura 1. Esquema representativo de los subtipos de autofagia según la forma de captación del material a degradar por la vía lisosomal.

1.1 La macroautofagia

La macroautofagia fue el primer tipo de autofagia identificado por Christian De Duve (De Duve & Wattiaux, 1966) al observar que las células poseían orgánulos de doble membrana cuyo interior se asemejaba mucho al citoplasma. Posteriormente, se descubrieron en levadura los reguladores moleculares que se conocen como genes *Atg*, lo que ha permitido empezar a conocer este proceso y sus implicaciones en las células y los tejidos (Klionsky, 2007). De ahora en adelante voy a denominar a la macroautofagia como autofagia. Este proceso se activa no solo en respuesta a un estrés celular sino también de manera fisiológica, ya que el bloqueo genético de esta vía lleva a la acumulación de orgánulos dañados o proteínas alteradas sobre todo en células postmitóticas como las neuronas (Hara et al, 2006; Komatsu et al, 2006). Por lo tanto, el mantenimiento de la homeostasis celular y el control de calidad de proteínas requieren de una macroautofagia constitutiva.

Fases de la autofagia

La formación del autofagosoma es la primera etapa de la regulación de la inducción de la autofagia y se inicia con la generación de una doble membrana conocida como fagóforo, o membrana limitante en mamíferos. Posteriormente esa membrana se elonga para englobar regiones citosólicas y se acaba cerrando para formar el autofagosoma completo (Ktistakis & Tooze, 2016) (Figura 2). El origen de esta membrana es controvertido y se ha observado que puede derivar de la membrana plasmática, de la membrana externa mitocondrial y del retículo (Lamb et al, 2013).

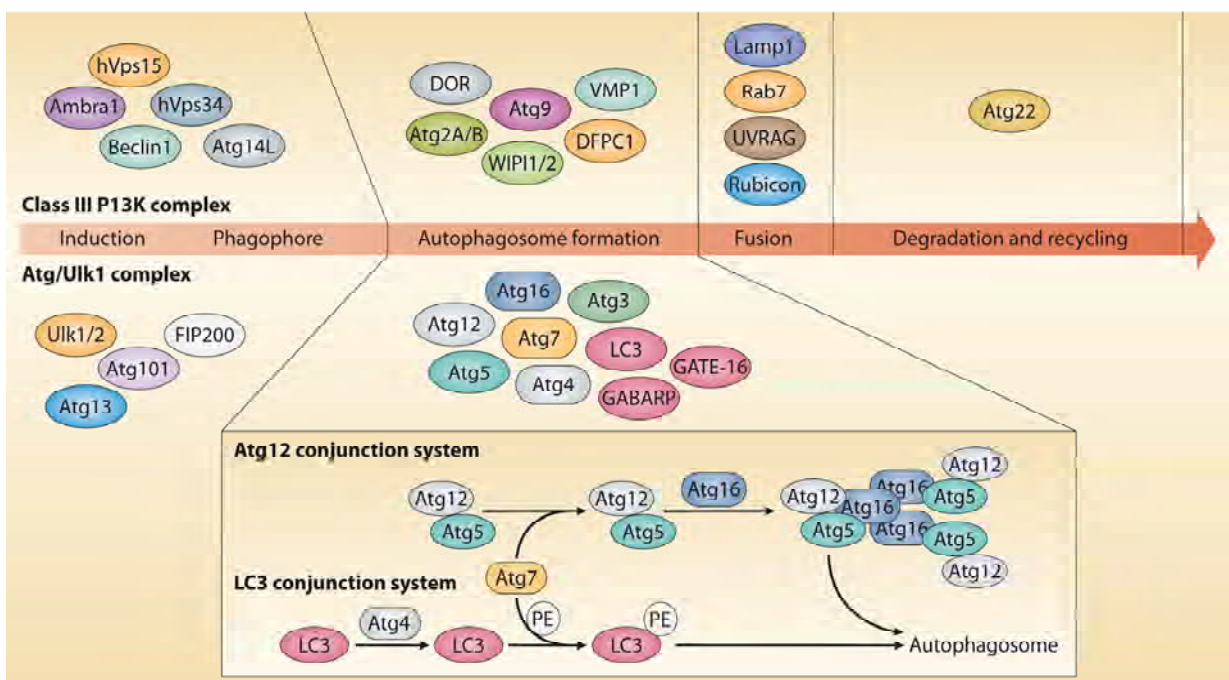


Figura 2. Esquema representativo de las fases del proceso de autofagia y proteínas Atg implicadas en su regulación.

La etapa inicial de la formación del autofagosoma está regulada por un complejo de nucleación constituido por la kinasa Vps34 y otras tres proteínas: Beclina1, Vps15 y Atg14. Las modificaciones lipídicas que se producen en estas proteínas como consecuencia de la actividad kinasa de Vps34, facilitan la formación de una estructura de andamiaje que se emplea para el posterior ensamblaje de otras proteínas y lípidos, facilitándose así el crecimiento de la membrana del autofagosoma (Ktistakis & Tooze, 2016).

Para la formación de esta membrana, se necesita la acción coordinada de dos sistemas: el sistema de conjugación covalente de Atg5 y Atg12, y la conjugación de

Atg8 (LC3 en mamíferos) a la molécula lipídica fosfatidiletanolamina. Ambos procesos se regulan enzimáticamente por la proteína Atg7, que trabaja con diferentes compañeros en cada vía de conjugación. El continuo ensamblaje de estos complejos proteína-proteína y proteína-lípidos junto con la llegada de lípidos de otras membranas intracelulares a través de moléculas como Atg9, facilitan el crecimiento de la membrana del autofagosoma (Noda & Inagaki, 2015). Las proteínas Atg también participan en el tráfico dependiente de microtúbulos de los autofagosomas y la fusión de los mismos con los lisosomas (Mizushima et al, 2008; Yang & Klionsky, 2010b). La macroautofagia, al igual que en el resto de los tipos de autofagia, finaliza con la degradación y/o reciclado de los productos de la digestión liberados de nuevo al citosol (Boya et al, 2013).

Regulación de la autofagia

La autofagia es principalmente un proceso de respuesta a estrés y en particular al estrés nutricional o alteración en el balance energético celular, por lo que está regulada por la acción de mTOR y AMPK (Wong et al, 2013). Además, diferentes situaciones como la hipoxia, la disfunción mitocondrial, el estrés oxidativo, el daño al DNA ó el estrés de retículo, también pueden activar este proceso a través de distintas vías de señalización (Kroemer et al, 2010). Así, inhibidores de PI3K-III, como 3-metiladenina (3-MA) y wortmanina (WM) bloquean autofagia. Por el contrario, la rapamicina (rapa) induce autofagia mediante inhibición de mTORC1 (Noda & Ohsumi, 1998).

Cuando existe un estrés prolongado, se activa un programa de regulación génica para mantener la activación de la autofagia (Pietrocola et al, 2013; Settembre et al, 2011). El principal componente de este programa es el factor de transcripción *EB* (*TFEB*), que normalmente está retenido en el citosol por fosforilación mediada por ERK2 o mTOR. *TFEB* regula la expresión de genes *Atg* implicados en los distintos pasos del proceso, así como de genes requeridos para la biogénesis lisosomal (Sardiello et al, 2009). Otro factor implicado en la regulación de la autofagia inducida por estrés y esencial para la supervivencia durante el envejecimiento y en respuesta a ayuno es *FOXO3* (Factor de transcripción de la familia forkhead box O). Este factor de transcripción controla la expresión de genes clave de autofagia como *Atg4b*, *Atg7*, *Beclina*, *Gabarap1*, *Map1lc3b* y *Bnip3* (Fullgrabe et al, 2014).

Autofagia selectiva

Durante mucho tiempo se ha pensado que la macroautofagia era un proceso de degradación aleatoria, pero recientemente se ha descrito que existen tipos de autofagia selectiva que degradan específicamente diferentes componentes celulares como las mitocondrias, el retículo, los ribosomas, los agregados de proteínas y los patógenos intracelulares (Figura 3). Todos los tipos de autofagia selectiva comparten la misma maquinaria que la macroautofagia general para la formación del autofagosoma, pero difieren en las moléculas de reconocimiento del material a degradar (Debnath, 2015). En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio de la mitofagia, que es la degradación selectiva de mitocondrias por la maquinaria de autofagia.

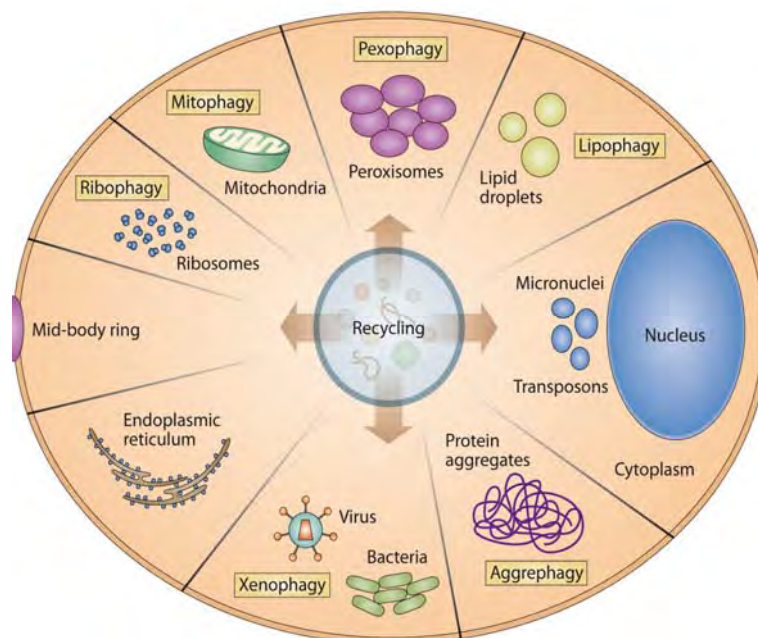


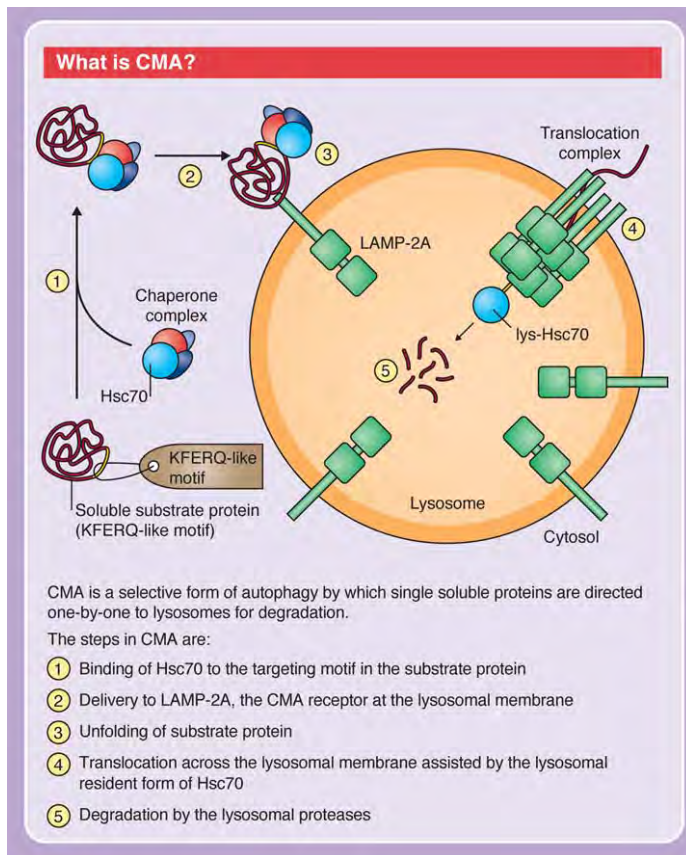
Figura 3. Esquema representativo de los tipos de macroautofagia selectiva.

1.2 La autofagia mediada por chaperonas (CMA)

La autofagia mediada por chaperonas es utilizada por la célula para degradar selectivamente proteínas citosólicas que presentan un motivo específico para su reconocimiento: KFERQ. Más del 20% de las proteínas citosólicas poseen dicho motivo (Kaushik & Cuervo, 2012).

Fases de la CMA

El proceso de CMA comienza con el reconocimiento del motivo KFERQ de la proteína a degradar por la chaperona hsc70 (del inglés, *heat shock cognate protein of 70kDa*), que se encarga de identificar y entregar proteínas individuales una a una a la superficie del lisosoma para su translocación y degradación (Cuervo, 2010; Orenstein & Cuervo, 2010; Susmita Kaushik, 2011). Tras llegar a los lisosomas, el complejo chaperona sustrato se acopla a la membrana lisosomal mediante interacción con la proteína de membrana lisosomal LAMP-2A (L2A) (Cuervo & Dice, 1996). La unión de



los sustratos a la forma monomérica de L2A dirige su organización en un complejo de translocación multimérico (Bandyopadhyay et al, 2008), de manera que el sustrato desplegado es capaz de atravesar la membrana lisosomal para ser finalmente degradado por proteasas lisosomales (Figura 4).

Figura 4. Esquema de las fases de la CMA (Susmita Kaushik, 2011)

Regulación de la CMA

Los niveles de L2A en la membrana lisosomal determinan directamente la actividad de la CMA, ya que la unión de sustratos a su región citosólica es el componente limitante de este proceso (Cuervo & Dice, 2000). La CMA se activa ante la privación prolongada de nutrientes, el estrés oxidativo y por acumulación de proteínas dañadas.

La privación prolongada de nutrientes es el principal inductor de la CMA, pero a diferencia de la macroautofagia, que se activa rápidamente ante el ayuno, este proceso aumenta su actividad a las 8h de ayuno y alcanza la máxima inducción a las 13h. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) aumentan la degradación de sustratos vía CMA mejorando la accesibilidad del motivo KFERQ a hsc70 e incrementando la eficiencia de internalización hacia el lumen lisosomal (Kiffin et al, 2004). Por último, cuando existe una acumulación de proteínas dañadas o mal plegadas, como ocurre en el caso de algunas proteínas patogénicas, la actividad de la CMA puede ser incrementada (Arias & Cuervo, 2011) (Figura 5).

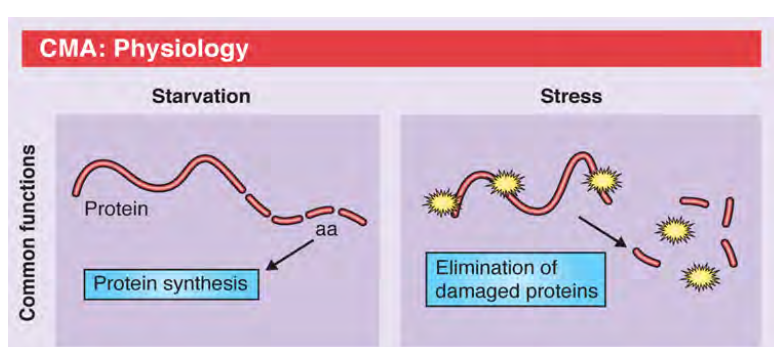


Figura 5. Esquema de las funciones fisiológicas de la CMA. La privación prolongada de nutrientes y el estrés oxidativo inducen la actividad de CMA (Susmita Kaushik, 2011)

La mayoría de las células tienen niveles basales de actividad de CMA que funciona continuamente para degradar sustratos incluso en ausencia de estrés, y su bloqueo resulta en la acumulación de proteínas dañadas o agregados proteicos en diferentes tipos celulares (Orenstein et al, 2013).

Sustratos de la CMA

Se han validado diferentes proteínas que son sustrato de CMA y están implicadas en múltiples procesos celulares. Entre ellas se encuentran varias enzimas glicolíticas (Aniento et al, 1993; Cuervo et al, 1994; Lv et al, 2011; Tasset & Cuervo, 2016), lo que tiene implicaciones fisiológicas, como un incremento en la actividad glicolítica cuando la CMA está alterada en un sistema metabólicamente activo como los hepatocitos (Schneider et al, 2014; Tasset & Cuervo, 2016). Otro sustrato de CMA de interés en esta Tesis Doctoral es el factor de transcripción inducido por hipoxia (*HIF1 α*) (Ferreira, 2015).

1.3 Funciones fisiológicas de la autofagia

La autofagia basal previene la acumulación de agregados proteicos intracelulares evitando así el estrés de retículo. Además, la degradación de orgánulos dañados, como las mitocondrias, evita su agregación y el incremento de ROS. Por otro lado, la inducción de autofagia permite proporcionar nutrientes utilizados por la célula para generar energía (Ktistakis & Tooze, 2016) (Figura 6).

En la pasada década se han descrito un gran número de funciones celulares del proceso de autofagia como resultado de muchos estudios llevados a cabo utilizando modelos genéticos y tratamientos farmacológicos para bloquear o incrementar la autofagia. Modelos de ratón carentes de genes reguladores de autofagia no redundantes como *Atg3*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg9*, *Atg16*, *Ambra1*, *Rb1cc1/Fip200*, y *Beclina1*, son letales embrionarios o perinatales (Mizushima & Levine, 2010). Estos modelos implican un papel de la autofagia durante el desarrollo embrionario, la supervivencia celular, la inmunidad y la longevidad (Figura 6). Además, se ha visto que la autofagia es necesaria para la diferenciación de numerosos tipos celulares como los eritrocitos, los adipositos, los linfocitos T y los osteoclastos (Baerga et al, 2009; Kundu et al, 2008; Sandoval et al, 2008; Schweers et al, 2007; Singh et al, 2009; Zhang et al, 2009) (Lu et al, 2013; Stephenson et al, 2009; Zhao et al, 2012). Nuestro grupo ha demostrado que la autofagia es esencial para la diferenciación neuronal desempeñando un papel importante en la axonogénesis y neuritogénesis durante la diferenciación de células madre de bulbo olfativo (Vazquez et al, 2012).

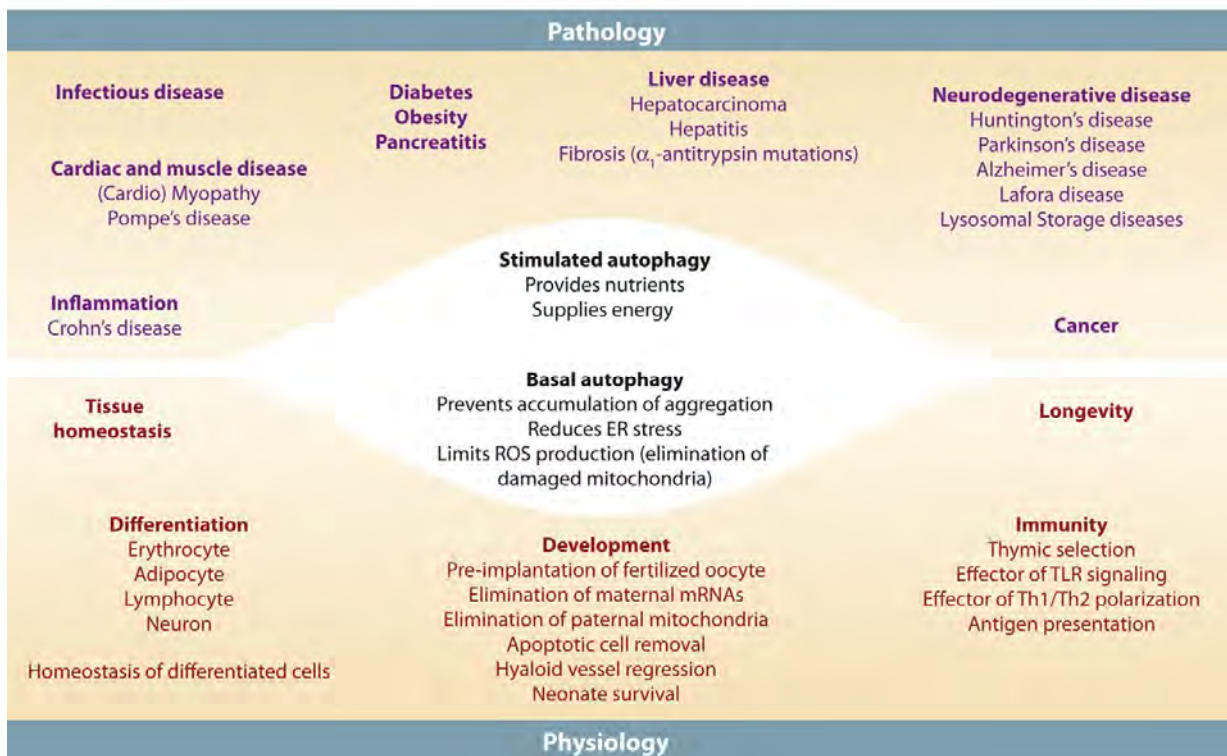


Figura 6. Síntesis de las funciones fisiológicas de la autofagia y su implicación en la patología.

1.3.1 Control de la calidad celular mediante la autofagia

Como sistema de degradación intracelular, la autofagia desempeña un papel en el control de calidad celular, evitando la acumulación de proteínas mal plegadas y de orgánulos dañados, así como mediante la eliminación de bacterias o patógenos intracelulares (Mizushima et al, 2008). Estudios con knock-out condicionales de los genes *Atg5* o *Atg7*, muestran un compromiso severo de la función celular debido a la acumulación de agregados proteicos y disfunción de orgánulos celulares que incrementan la producción de ROS (Komatsu et al, 2006; Komatsu et al, 2005; Kuma et al, 2004).

Aunque tanto la macroautofagia (Scherz-Shouval et al, 2007) como la CMA (Kiffin et al, 2004) se activan durante un estrés oxidativo, sus funciones protectoras no son redundantes. De hecho, la contribución de una vía u otra prevalece dependiendo de la diana del daño oxidativo. Así, cuando predomina un daño proteico destaca la selectividad de la CMA (Arias & Cuervo, 2011), mientras que un daño en orgánulos y acumulación de agregados proteicos dependen en mayor parte de la macroautofagia. La mayor parte de los efectos antioxidantes de la macroautofagia se han atribuido a su papel en la eliminación de mitocondrias dañadas mediante mitofagia.

1.3.2 Papel metabólico de la autofagia

A lo largo de los últimos años, varios estudios muestran la relación entre la autofagia y el metabolismo celular. En un trabajo llevado a cabo en levaduras se observa que el ayuno de nitrógeno promueve la degradación de mitocondrias vía autofagia inducida por ROS, manteniendo la masa mitocondrial al mínimo de acuerdo a los requerimientos energéticos y previniendo a su vez un exceso en la producción de ROS (Kurihara & 2012). En células de mamífero, el ayuno de aminoácidos induce muerte celular cuando la autofagia está inhibida (Boya et al, 2005). El uso de metilpiruvato (MP), un sustrato del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) permeable a la mitocondria capaz de incrementar los niveles de ATP intracelular, revierte dicha muerte. Esto indica que los nutrientes obtenidos por la autofagia tienen un importante papel en la producción de ATP (Lum et al, 2005), ya que la degradación lisosomal genera componentes celulares como aminoácidos, ácidos grasos libres y carbohidratos que pueden ser reciclados para mantener las funciones energéticas y biosintéticas de la célula (Mizushima & Klionsky, 2007; Singh & Cuervo, 2011) (Figura 7).

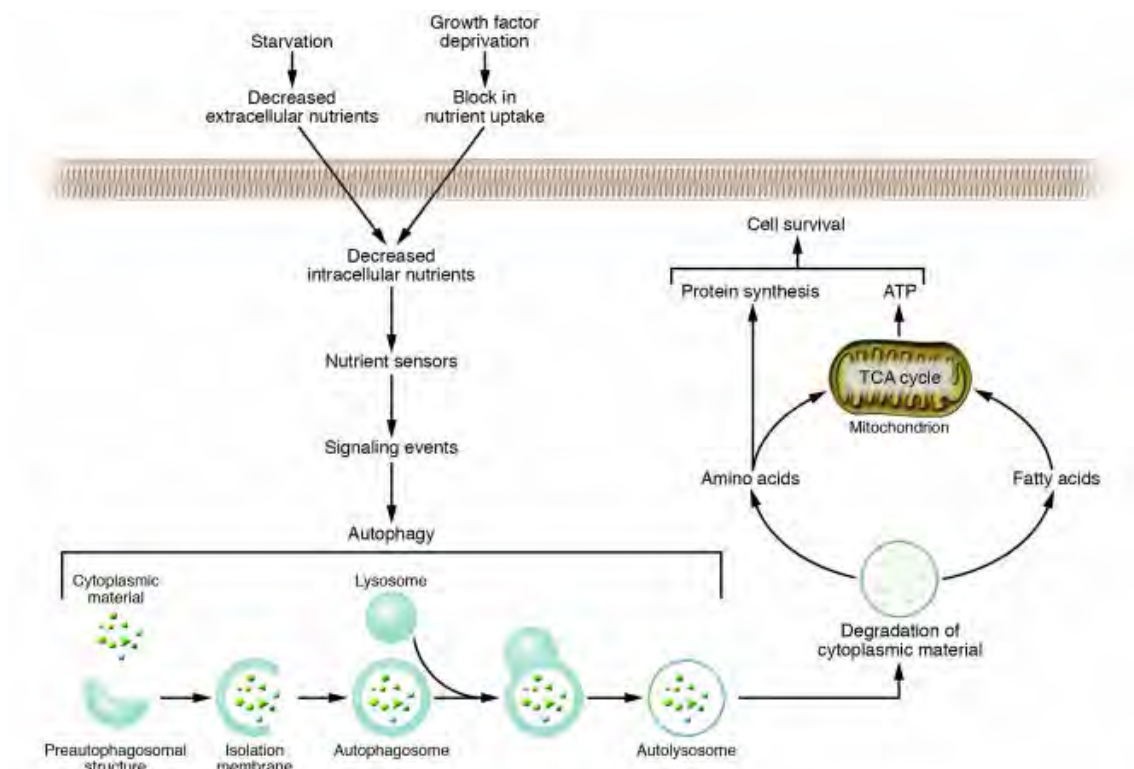


Figura 7. Esquema que muestra la inducción de autofagia por privación de nutrientes (Levine & Yuan, 2005).

Existen dos principales vías de señalización que traducen la información sobre el estado energético de la célula y modulan la autofagia: la vía de mTOR y la señalización por AMPK (Wong et al, 2013).

TOR es una serina-treonina kinasa altamente conservada que desempeña un papel importante durante el crecimiento celular, la autofagia y el metabolismo en respuesta a factores de crecimiento, nutrientes, hipoxia y estrés energético. En mamíferos, la kinasa está presente en dos complejos: el complejo 1 (mTORC1) y el complejo 2 (mTORC2). mTORC1 integra la señalización de factores de crecimiento con la disponibilidad de nutrientes y puede ser inhibido por rapamicina. Este complejo está presente en la membrana de los lisosomas y está controlado por el flujo de aminoácidos y glucosa liberados desde este compartimento (Zoncu et al, 2011), ejerciendo una regulación negativa de la autofagia (Hosokawa et al, 2009). Durante el ayuno, se suprime la actividad de mTORC1, lo que conduce al catabolismo proteico vía macroautofagia con el fin de reponer el conjunto de aminoácidos intracelulares y conservar la síntesis proteica (Mortimore et al, 1988). Por el contrario, mTORC2 es insensible a nutrientes y rapamicina y no está directamente implicado en la autofagia (Bar-Peled & Sabatini, 2014; Zoncu et al, 2011). Además, una disminución en los niveles de ATP se asocia con un incremento en los niveles de AMP que lleva a la activación de AMPK. Una vez activada, AMPK estimula procesos catabólicos, como la entrada y el metabolismo de glucosa y ácidos grasos, e inhibe procesos anabólicos (Hardie, 2007; Mihaylova & Shaw, 2011). Si no se logra restaurar el balance energético, se generará un estrés metabólico que llevará a la inducción de autofagia mediante la interacción de AMPK con Ulk1 (Egan et al, 2011).

Por otro lado, la autofagia contribuye al metabolismo general de la célula mediante la degradación selectiva de depósitos de glicógeno (glicofagia) (Debnath, 2015) y mediante la activación de la CMA (Tasset & Cuervo, 2016). Tanto la generación de aminoácidos a partir de la degradación de proteínas como el papel de CMA en la degradación de enzimas glicolíticas podrían estar detrás de los cambios energéticos celulares observados cuando la CMA está alterada (Kon et al, 2011; Lv et al, 2011), destacando así su papel en la regulación de la homeostasis metabólica.

Todos estos mecanismos implicados en la homeostasis metabólica pueden estar a su vez condicionados por la disponibilidad de oxígeno. La hipoxia lleva a un cambio

en la velocidad del metabolismo mediante regulación de la actividad de mTORC1, con el fin de disminuir el consumo de ATP y reducir así la demanda de oxígeno para mantener la homeostasis metabólica. Esto se apoya por estudios previos en los que se describe que la inhibición de mTORC1 por hipoxia induce autofagia (Solaini et al, 2010).

1.4 La autofagia y su relación con patología

Considerando la autofagia como un proceso fisiológico, se podría deducir que la alteración de dicho sistema puede desencadenar enfermedad. De hecho, diferentes estados patológicos como el cáncer, procesos infecciosos, la disfunción metabólica, la neurodegeneración, las cardiomiopatías, las miopatías y la enfermedad de Crohn, están asociados a un mal funcionamiento de los diferentes tipos de autofagia (Kroemer, 2015) (Figura 8).

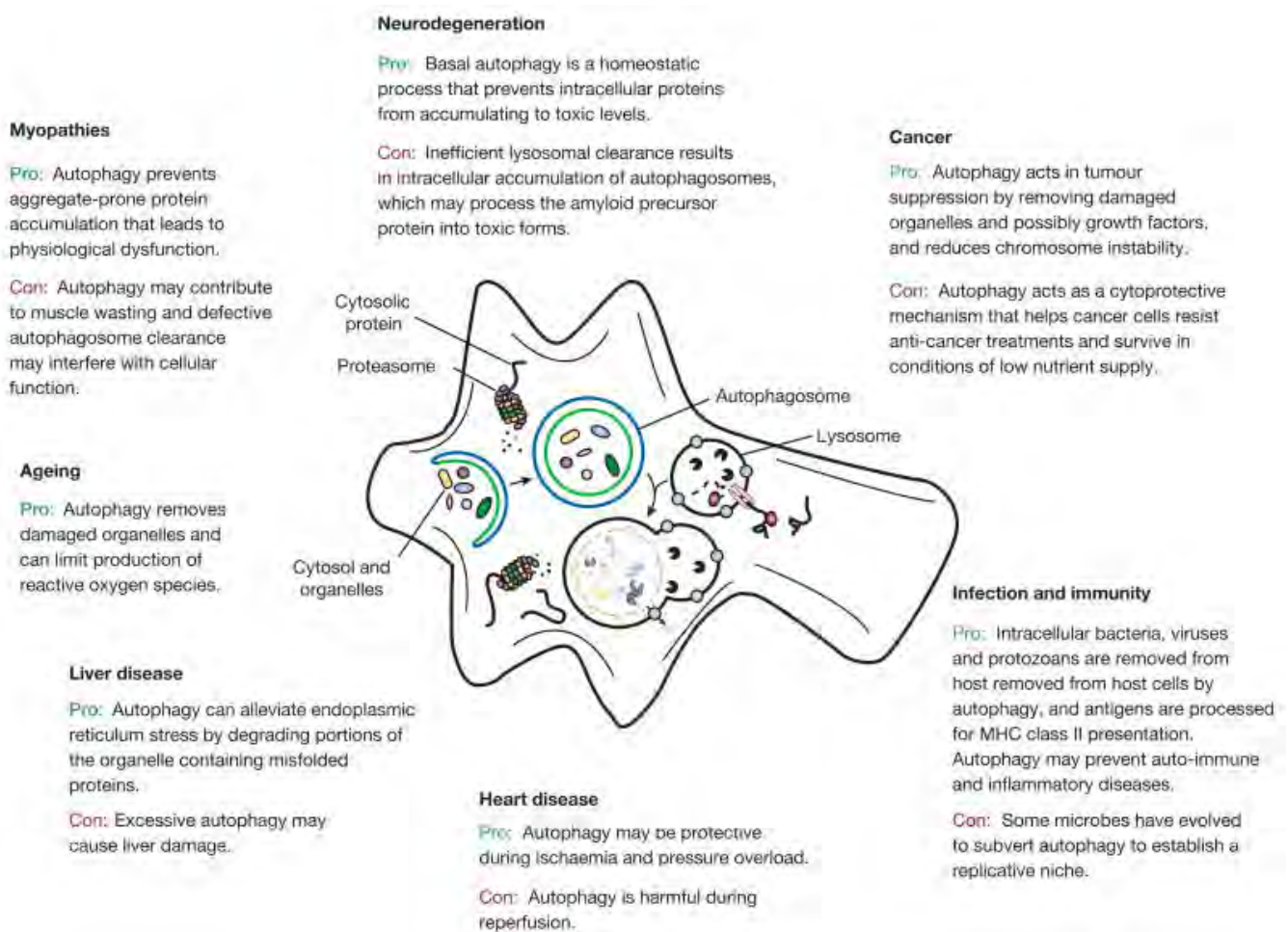


Figura 8. Esquema de los estados patológicos con mal funcionamiento de la autofagia (Mizushima et al, 2008).

En enfermedades como el Huntington, se ha descrito una alteración de la autofagia debido a la inhabilidad de formar autofagosomas que reconozcan selectivamente a su carga citosólica (Arrasate & Finkbeiner, 2012; Martinez-Vicente et al, 2010). En la enfermedad de Alzheimer, existe una disfunción del tráfico vesicular y fallo en la fusión lisosomal que puede contribuir a la patogenicidad de la enfermedad (Yang et al, 2011). En el caso de ciertas formas de enfermedad de Parkinson, hay un fallo en la eliminación de mitocondrias dañadas por mitofagia debido a mutaciones recesivas en los genes que codifican Parkina y PINK1 (proteína kinasa 1 inducida por PTEN) (Corti & Brice, 2013; Geisler et al, 2010). Además, se ha descrito que en esta enfermedad hay un fallo en la degradación mediante CMA de proteínas patogénicas como α -sinucleína, lo que contribuye a la progresión de la patogénesis (Schneider & Cuervo, 2013).

Hay que destacar por tanto que la autofagia es un proceso muy importante a nivel basal especialmente en tejidos como el cerebro y el corazón, constituidos por células postmitóticas que no pueden disminuir el daño intracelular mediante división celular.

2. LA MITOFAGIA

2.1 La mitocondria

Las mitocondrias son orgánulos abundantes en la mayoría de los tipos celulares y constituyen aproximadamente el 10-40% del volumen celular. Estos orgánulos se encargan de procesos celulares esenciales como la producción de ATP, la formación de constituyentes para la síntesis de proteínas y ácidos grasos, la regulación de la muerte celular y la producción de especies reactivas de oxígeno (Duchen, 2004; Viale et al, 2014; Weinberg & Chandel, 2015). Además, las mitocondrias presentan su propio ADN, que codifica para 13 péptidos de la cadena de transporte electrónico (Lemasters, 2005; Prigione & Adjaye, 2010).

2.1.1 Metabolismo mitocondrial

En presencia de nutrientes y oxígeno, la mitocondria es el principal componente celular encargado de generar ATP. El proceso metabólico mitocondrial que utiliza la

energía liberada durante la oxidación de nutrientes para producir ATP se denomina fosforilación oxidativa (OXPHOS) (Mitchell & Moyle, 1967). Dependiendo del tipo celular, las mitocondrias utilizan carbohidratos, ácidos grasos o aminoácidos para generar energía a través del TCA (Ciclo de los ácidos tricarboxílicos). Cuando se utiliza la glucosa como principal fuente de energía, ésta se procesa vía glicólisis en pirúvico. Posteriormente, el ácido pirúvico se transloca a la matriz mitocondrial donde es convertido en acetil-CoA, cuya oxidación genera electrones que se transportan a lo largo de la cadena respiratoria mitocondrial en la membrana interna mitocondrial. Esto permite el bombeo de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana, generando un gradiente de pH y un potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) a lo largo de la membrana interna mitocondrial. La energía de los protones que fluyen por gradiente electroquímico es utilizada por la ATP sintasa para la síntesis de ATP. Durante este proceso, el oxígeno puede generar anión superóxido (O_2^-), el precursor de la mayoría de los ROS a nivel del complejo I y III de la cadena de transporte electrónico (Hamacher-Brady & Brady, 2016) (Figura 9).

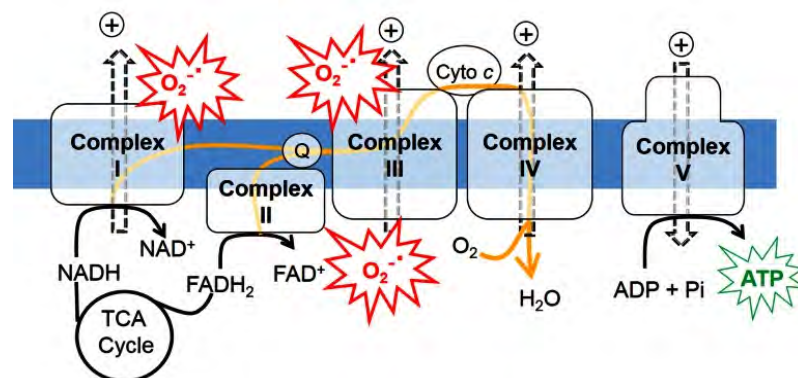


Figura 9. Esquema de la cadena de transporte de electrones y fosforilación oxidativa mitocondrial. Cadena de transporte de electrones (Complejos I, II, III y IV) y fosforilación oxidativa (OXPHOS, complejo V) en la membrana interna mitocondrial. Las flechas azules representan el movimiento de protones. El desvío de electrones fuera de la cadena de transporte electrónico puede generar anión superóxido (O_2^-), una especie reactiva de oxígeno (ROS). TCA: ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Cyto c: citocromo c. Complex V: complejo V o ATPsintasa (Hamacher-Brady & Brady, 2016)

La fosforilación oxidativa y la glicólisis funcionan de manera coordinada (Semenza, 2007). La glicólisis, aunque es menos eficiente generando ATP comparado a la respiración mitocondrial, puede producirlo más rápidamente (Prigione & Adjaye, 2010). En condiciones de normoxia, el piruvato entra en la mitocondria y relaciona la glicólisis con la respiración aeróbica mediante entrada en el TCA. Sin embargo, bajo bajas concentraciones de oxígeno o en presencia de mitocondrias disfuncionales, el

piruvato puede convertirse en lactato mediante acción de la enzima lactato deshidrogenasa (Varum et al, 2011).

2.1.2 La homeostasia mitocondrial

El contenido y la integridad mitocondrial están regulados a diferentes niveles (transcripcional, traduccional, y postraduccional) mediante procesos de fusión y fisión, así como mediante su degradación (Chen & Chan, 2005; Hock & Kralli, 2009). Todos estos procesos están coordinados e interaccionan con el fin de mantener la población mitocondrial adecuada capaz de sostener el estado bioenergético y la viabilidad celular, además de generar intermediarios metabólicos necesarios para el crecimiento celular (Michael, 2012; Scarpulla et al, 2012). En el citoplasma, mTORC1 acopla las señales que promueven el crecimiento celular con procesos anabólicos, en los cuales la mitocondria desempeña un papel importante. Los procesos regulados por mTORC1 afectan en general al flujo glicolítico y a la velocidad de degradación mitocondrial, e incluyen la regulación de factores de transcripción como *HIF1α* y *YY1/PGC-1α* (MJ, 2013) (Figura 10). Simultáneamente mTOR está sometido a varias señales como el ATP, ROS e intermediarios metabólicos.

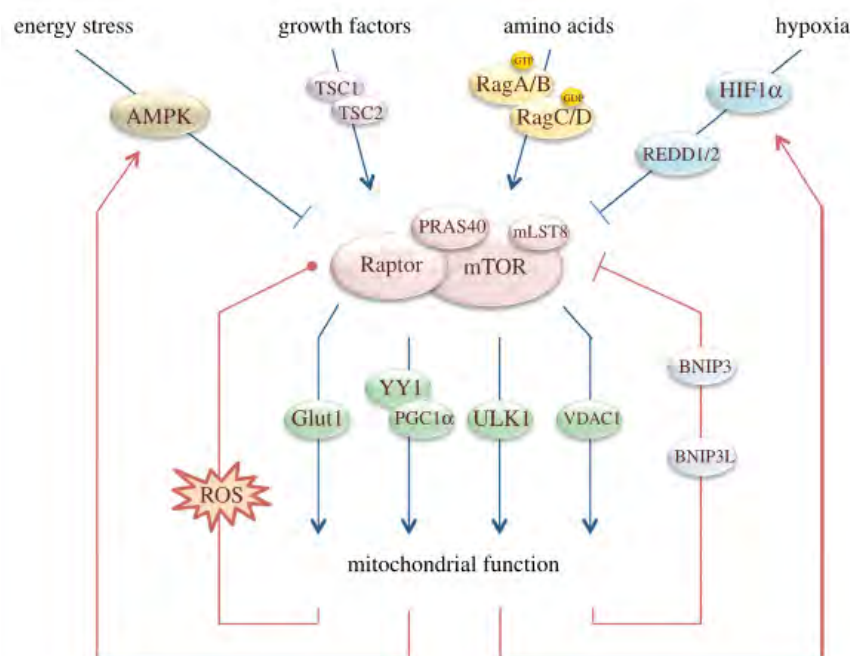


Figura 10. Esquema de la regulación de la actividad de mTOR y la función mitocondrial. Los factores de crecimiento y los aminoácidos estimulan la actividad de mTOR. Por el contrario, la hipoxia y el estrés energético la inhiben. mTOR regula la función mitocondrial mediante cuatro dianas (Glut1, PGC1α, ULK1 y VDAC1) y ésta influye en la actividad de mTOR mediante mecanismos de retroalimentación. Además, la función mitocondrial regula HIF1α, AMPK, BNIP3L y ROS, y todos ellos a su vez actúan sobre mTOR (MJ, 2013).

Varios factores de transcripción, como *PGC-1 α* , *Tfam* y *Nrf2* (también denominado *Nfe2l1*) regulan la biogénesis mitocondrial, en la que intervienen proteínas como OPA1 y mitofusinas 1 y 2 (Cunningham et al, 2007; Lin, 2005).

2.2 La Mitofagia

2.2.1 Definición de la mitofagia

La mitofagia es el proceso mediante el cual las mitocondrias son englobadas selectivamente en autofagosomas con una muy limitada cantidad de cualquier otro material celular. A lo largo de la evolución, las mitocondrias surgieron a partir de bacterias ancestrales que establecieron una relación endosimbionte con células eucariotas (Dyall et al, 2004). Por ello, cabría esperar que la mitofagia sea un proceso que ha evolucionado a partir de la fagocitosis y degradación de bacterias (Kim et al, 2007; Youle & Narendra, 2011). Hay dos tipos de mitofagia: la mitofagia que se encarga de eliminar mitocondrias dañadas y la que degrada mitocondrias funcionales o *mitofagia programada* (Ashrafi & Schwarz, 2013). Ante un estrés moderado, la eliminación de mitocondrias dañadas en las que se produce permeabilización de la membrana mitocondrial (MPTP) y ROS mediante mitofagia constituye un mecanismo citoprotector (Lemasters, 2005). Uno de los principales determinantes moleculares de esta mitofagia identificados en mamíferos fue el par proteico formado por PINK1 y Parkina, de manera que Parkina es reclutada en mitocondrias disfuncionales con bajo potencial de membrana y posteriormente media su degradación en autofagosomas (Narendra et al, 2008; Vives-Bauza et al, 2010; Youle & Narendra, 2011). Por otro lado, la mitofagia programada se ha observado en algunos procesos fisiológicos como la diferenciación de los eritrocitos, la maduración de la lente del ojo y para la eliminación de las mitocondrias de origen paterno durante la fertilización del oocito (Ashrafi & Schwarz, 2013).

2.2.2 Funciones y reguladores moleculares de la mitofagia

En mamíferos, la mitofagia está regulada mediante diferentes mecanismos que probablemente coexisten en la misma célula (Kim et al, 2007; Youle & Narendra, 2011) (Figura 11).

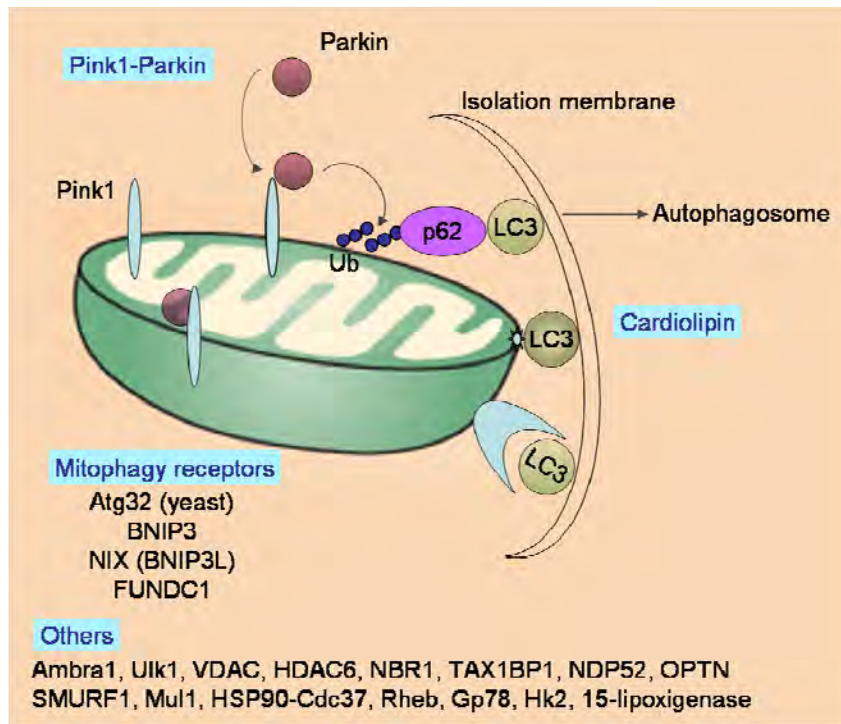


Figura 11. Resumen de los mecanismos moleculares de mitofagia.

Existen diferentes moléculas que funcionan como receptores y moléculas adaptadoras para degradar las mitocondrias por mitofagia, como NIX, BNIP3 y FUNDC1. Éste último es una proteína de membrana externa mitocondrial cuya expresión se incrementa ante un daño mitocondrial y cuya defosforilación bajo condiciones de hipoxia aumenta su interacción con LC3-II, lo que sugiere que puede ser un receptor de mitofagia inducida por hipoxia (Liu et al, 2012). Además de estos receptores, la ceramida, un esfingolípido bioactivo, y la cardiolipina, un fosfolípido de la membrana interna mitocondrial, también están implicados en mitofagia al interactuar con LC3 (Chu et al, 2013; Sentelle et al, 2012). Así, la redistribución de cardiolipina de la membrana interna mitocondrial a la externa cuando hay un daño en la mitocondria es una señal para inducir mitofagia (Chu et al, 2013). Se ha descrito que es necesaria una fragmentación mitocondrial previa mediada por la proteína de fisión DRP1 para una correcta mitofagia (Twig et al, 2008). Por otro lado, varias E3 ubiquitin

ligasas, como Parkina, SMURF1 y MUL1 están implicadas en la regulación de la mitofagia. SMURF1 regula la mitofagia mediante un mecanismo independiente de Parkina, en corazón, cerebro e hígado (Orvedahl et al, 2011), y MUL1, una proteína de membrana externa mitocondrial que promueve la fragmentación mediante estabilización de Drp1 (Braschi et al, 2009), despolarización y mitofagia durante la pérdida de músculo esquelético (Lokireddy et al, 2012; Orvedahl et al, 2011).

Aunque Atg5 y Atg7 son generalmente considerados genes esenciales para autofagia, células que carecen de *Atg5* ó *Atg7* pueden aun inducir una forma de autofagia que no depende de la lipidación de LC3 pero requiere de ULK1, Beclina1 y RAB9A. Esta autofagia independiente de Atg5-Atg7 (o autofagia no canónica) está implicada en la eliminación de mitocondrias durante el desarrollo eritroide en ratones deficientes de Atg5 (Nishida et al, 2009), los cuales presentan una degradación normal de orgánulos y diferenciación eritroide (Matsui et al, 2006).

Otros mecanismos reguladores de mitofagia implican la función de proteínas como el complejo estabilizador chaperona Hsp90-Cdc3 (Itakura et al, 2008; Lazarou et al, 2015) y ULK-1 (Joo et al, 2011). Además, también se ha descrito una mitofagia mediada por la enzima 15-lipoxigenasa (van Leyen et al, 1998).

2.2.2.1 Degradación de mitocondrias dañadas vía PINK1-Parkina

Generalmente la mitofagia de mitocondrias dañadas está mediada por la vía PINK1/Parkina (Figura 12). El daño mitocondrial se caracteriza por una acumulación de especies reactivas de oxígeno, como consecuencia del metabolismo de la mitocondria, o daños que generan mutaciones en el DNA mitocondrial, proteínas mal plegadas y una disminución en la producción ATP. Además, el daño mitocondrial puede inducir la permeabilidad mitocondrial causada por la apertura de poros de transición de permeabilidad (MPTP) en la membrana interna mitocondrial (Pickrell & Youle, 2015) (Figura 12). Estudios recientes sugieren la implicación del MPTP en la señal iniciadora de la mitofagia (Gunter & Pfeiffer, 1990; Hunter et al, 1976; Kissova et al, 2004; Lemasters, 2005), y su inhibición con algunos compuestos como la ciclosporina A (CsA), debido a su interacción con la ciclofilina D (CypD), inhiben el proceso de mitofagia (Forte & Bernardi, 2005; Mauro-Lizcano et al, 2015; Zoratti & Szabo, 1995).

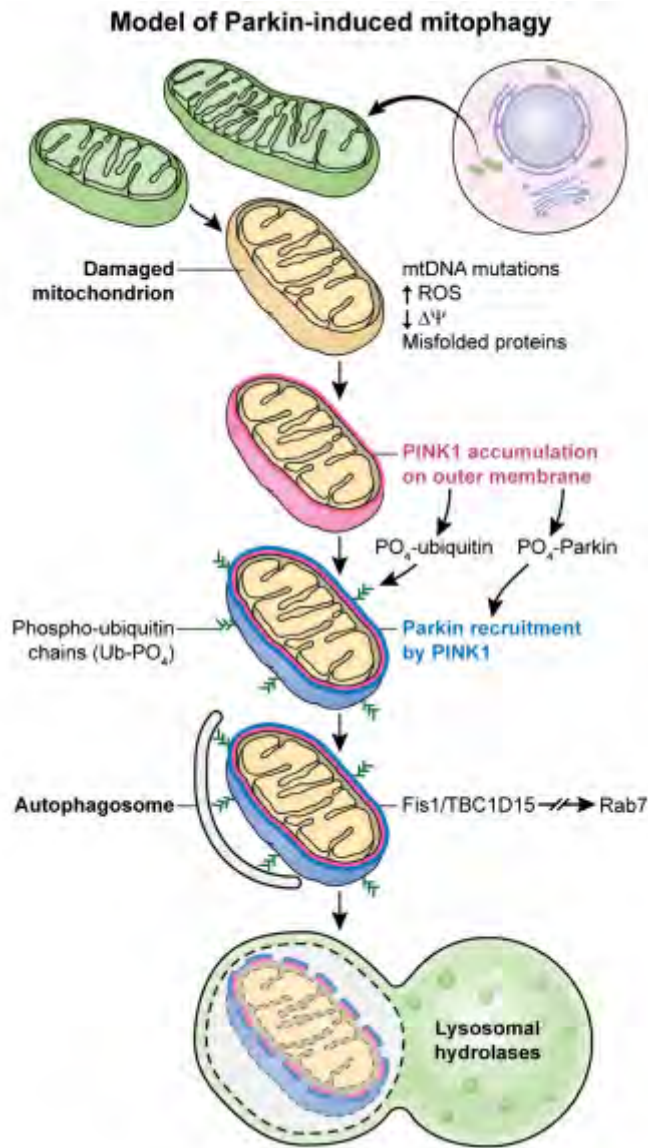


Figura 12. Esquema representativo de la mitofagia inducida por Parkina. Mitochondrias dañadas (amarillas) acumulan PINK1 en la membrana externa mitocondrial, donde fosforila a Parkina. Parkina ubiquitina sustratos de la membrana externa mitocondrial para dos procesos: el reclutamiento de autofagosomas y la degradación por proteasoma de los sustratos mitocondriales ubiquitinizados. Fis1 es un receptor mitocondrial que se une a diferentes proteínas para favorecer la formación del autofagosoma alrededor de la mitocondria dañada. Finalmente se produce la degradación mitocondrial en los lisosomas (Pickrell & Youle, 2015).

No solo el estrés oxidativo y algunos procesos patológicos causan daño y disfunción mitocondrial, sino que incluso mitocondrias normales pueden acumular especies reactivas de oxígeno suficientes a lo largo del tiempo como para llegar a ser dañinas y

posiblemente peligrosas para la célula.

PINK1 es una kinasa presente en el espacio intermembrana mitocondrial que se recicla rápidamente cuando la mitocondria funciona normalmente para asegurar que sus niveles se mantienen relativamente bajos. Cuando se produce una despolarización de la mitocondria, los niveles de PINK1 se incrementan lo cual lleva al reclutamiento de Parkina, una ubiquitin ligasa citosólica, a la membrana mitocondrial (Lazarou et al, 2012; Narendra et al, 2008; Narendra et al, 2010). Una vez allí, Parkina cataliza la conjugación de residuos de lysina 63 de ubiquitina a varias proteínas sustrato, lo que favorece el reconocimiento de mitocondrias despolarizadas por la maquinaria de autofagia (Geisler et al, 2010; Narendra et al, 2008; Vives-Bauza et al, 2010) (Figura 12). El conocimiento de esta vía de mitofagia se ha consolidado mediante un estudio reciente en el que se han generado ratones knockout para cinco receptores de autofagia:

p62, NBR1, Optineurina (OPTN), NDP52 y TAX1BP1, de manera que PINK1 es suficiente para reclutar receptores de autofagia que presentan un dominio LIR en la mitocondria para inducir mitofagia (Lazarou et al, 2015).

2.2.2.2 Degradación de mitocondrias vía NIX/BNIP3

Otra de las vías reguladoras del proceso de mitofagia está mediada por BNIP3 Y NIX (también conocido como BNIP3L) (Mammucari et al, 2007; Schweers et al, 2007; Zhang & Ney, 2009). En este caso, la mitofagia se produce por la presencia de un motivo denominado región de interacción con LC3 (LIR) en la estructura de estos reguladores, que se une a los miembros de la familia Atg8, LC3B y GABARAPL2 presentes en los autofagosomas, funcionando como receptores de mitofagia (Hanna et al, 2012; Novak et al, 2010). Las proteínas LC3 contienen una región hidrofóbica conservada que acopla mediante interacciones hidrofóbicas con el dominio LIR presente

en los receptores de autofagia, que cuando se expresan se localizan constitutivamente en la membrana externa mitocondrial (OMM) a través de sus dominios transmembrana (Hamacher-Brady & Brady, 2016) (Figura 13).

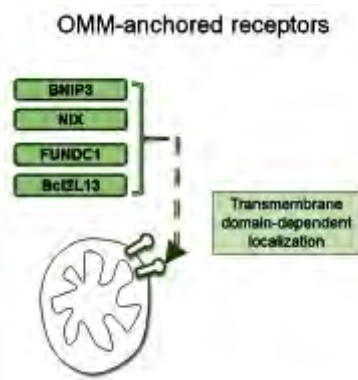


Figura 13. Síntesis de los receptores de mitofagia con dominio LIR localizados en la membrana externa mitocondrial.

Utilizando la base de datos HUGO-biogps, hemos observado que NIX se expresa en una gran cantidad de tejidos como la retina y sistema nervioso central, siendo mayor su expresión en los eritrocitos, las células mieloides, los monocitos, el músculo liso, los cardiomiocitos, el hígado y el pulmón fetales, los adipocitos y la glándula pineal. Generalmente, la expresión de NIX es baja en condiciones basales en la mayoría de los tejidos, produciéndose su incremento transcripcional bajo condiciones de estrés celular, crecimiento y diferenciación (Aerbajinai et al, 2003; Galvez et al, 2006; Sowter et al, 2001; Yussman et al, 2002).

Se ha descrito que uno de los reguladores mas importante de NIX es la hipoxia. En condiciones de hipoxia, los niveles de proteína de NIX se incrementan de manera HIF1 α y p53 dependiente (Hamacher-Brady & Brady, 2016). Como consecuencia, se

rompe la unión entre Bcl-2 y Beclina1, induciéndose la autofagia (Bellot et al, 2009) (Figura 14). Además, durante la hipoxia BNIP3 y NIX pueden unirse a la proteína Rheb, reduciéndose así la actividad de mTOR e induciéndose autofagia (Li et al, 2007).

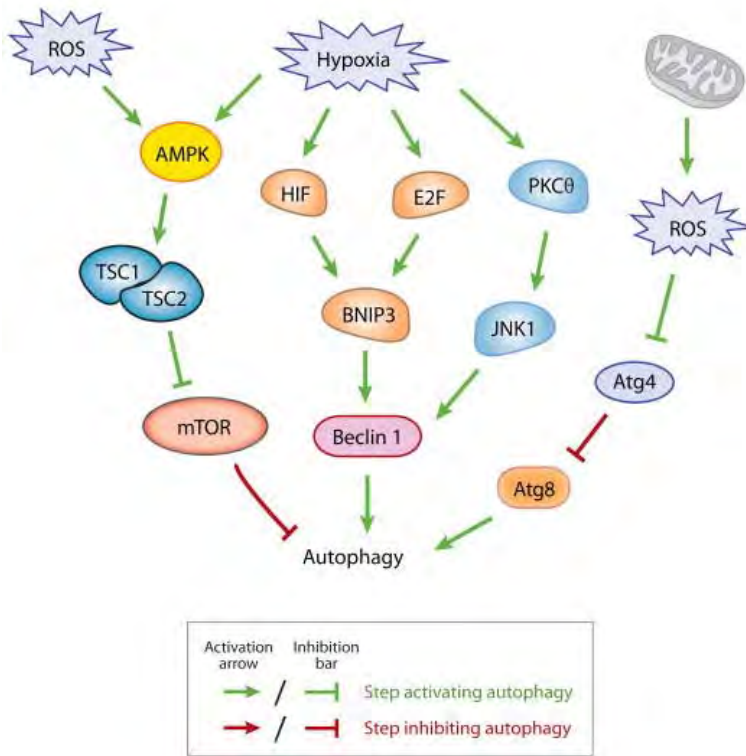


Figura 14. Esquema de la regulación de autofagia por hipoxia. La hipoxia produce en la célula la activación de diferentes vías de señalización, pero principalmente induce la estabilización de HIF1α, el cual incrementa la expresión de BNIP3/NIX induciéndose así autofagia (He & Klionsky, 2009).

Existe una regulación coordinada de esta vía de mitofagia mediante varios factores de transcripción. Se ha descrito que *SPI* aumenta la expresión de NIX en

células cardíacas y *FOXO3a* induce la expresión de BNIP3 y NIX en músculo esquelético. Sin embargo, bajo condiciones de hipoxia, *FOXO3a* suprime la expresión de NIX mediada por HIF1-α mediante el cofactor CITED2, lo que constituye una regulación negativa compensatoria bajo condiciones de hipoxia. Otro factor de transcripción que incrementa la expresión de BNIP3 es *E2F1* (Hamacher-Brady & Brady, 2016). Además, recientemente se ha descrito el papel de los microRNAs como moduladores negativos de mitofagia. Por ejemplo, miR-351, hsa-miR-125a-5p y miR-137 suprimen la mitofagia mediada por NIX y la disminución de miR-137 asociada a hipoxia permite la expresión de esta proteína (Hamacher-Brady & Brady, 2016) (Figura 15). Por otro lado, el factor de transcripción *EB* (*TFEB*), promueve la expresión de genes del autofagosoma y lisosomales (Settembre et al, 2011) e incrementa la mitofagia inducida por BNIP3 (Ma et al, 2012).

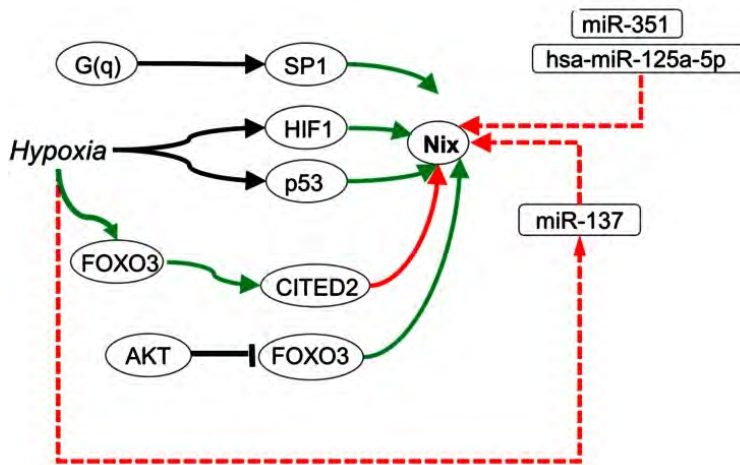


Figura 15. Esquema representativo de la regulación transcripcional de la mitofagia inducida por NIX.

Se han descrito diferentes procesos fisiológicos como la homeostasis en hígado adulto de ratón para evitar defectos metabólicos y el papel citoprotector durante el daño por isquemia/repercusión en los miocitos cardiacos, en los cuales la degradación de mitocondrias por mitofagia desempeña un papel fundamental. Así, la mitofagia mediada por NIX es necesaria durante la diferenciación de eritrocitos para generar eritrocitos maduros sin mitocondrias, al menos en parte para promover la supervivencia y limitar la producción de ROS en el ambiente con alto contenido de oxígeno del pulmón (Kundu et al, 2008; Sandoval et al, 2008; Schweers et al, 2007). Además, las células NK realizan mitofagia mediada por NIX y BNIP3 para eliminar las mitocondrias dañadas con un incremento de ROS tras una infección viral, por lo que la mitofagia podría ser una característica de la formación de la memoria inmunológica (O’Sullivan, 2015). Por tanto, NIX parece estar implicado en la regulación de la mitofagia en condiciones fisiológicas (Hamacher-Brady & Brady, 2016).

Por otro lado, la alteración del mantenimiento mitocondrial es una característica de muchas patologías humanas así como del envejecimiento. Se ha descrito que la mitofagia interactúa con la biogénesis mitocondrial para regular el contenido mitocondrial y la longevidad en *Caenorhabditis elegans*, de manera que hay una compensación que integra las señales metabólicas para coordinar la biogénesis mitocondrial y la mitofagia. La alteración de los dos procesos durante el envejecimiento contribuye a un incremento en la proliferación de mitocondrias dañadas y disminución de la función celular (Palikaras et al, 2015).

Durante situaciones patológicas como la hipertrofia cardiaca (Galvez et al, 2006; Yussman et al, 2002), también se incrementa la expresión de NIX, siendo necesario y

suficiente para causar la transición de hipertrofia a cardiomiopatía dilatada (Diwan et al, 2008; Syed et al, 2004).

Por último, hay que añadir que NIX y BNIP3 también desempeñan un papel en la muerte celular por apoptosis ya que son miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2 que contienen un dominio BH3. En la mitocondria, ambas proteínas suprimen la función de proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 (Zhang & Ney, 2009).

2.2.2.3 Mecanismos de compensación entre los reguladores de mitofagia

Hay que destacar que existen diferentes mecanismos de interacción entre las vías de mitofagia descritas hasta ahora. Además de promover el reclutamiento mediado por ubiquitina de diferentes proteínas, así como degradación de proteínas de membrana externa mitocondrial, PINK1 y Parkina interaccionan directamente con el complejo Beclina1-PI3K que promueve la nucleación del autofagosoma. Más específicamente, PINK1 interacciona directamente con el complejo Beclina1-PI3K para activar autofagia (Michiorri et al, 2010), y Parkina interacciona con Ambra1, un activador de Beclina1, facilitando su reclutamiento a la mitocondria despolarizada para activar el complejo PI3K de clase III (Van Humbeeck et al, 2011). No se requiere de Ambra1 para la translocación de Parkina a la mitocondria despolarizada, pero contribuye críticamente a la mitofagia mediada por Parkina, mediante la estimulación de la actividad del complejo PI3K de clase III, que es esencial para la formación de autofagosomas (Tooze & Yoshimori, 2010). Además, Ambra1 presenta un dominio LIR siendo por tanto un receptor de mitofagia que permite la degradación de mitocondrias independiente de Parkina (Hamacher-Brady & Brady, 2016).

Por otro lado, el mecanismo por el cual NIX y BNIP3 inducen mitofagia es controvertido, ya que también favorecen la despolarización mitocondrial y como consecuencia la inducción de mitofagia (Elmore et al, 2001; Twig et al, 2008). Así, varios estudios describen la degradación selectiva de mitocondrias despolarizadas por BNIP3 y NIX (Novak et al, 2010; Sandoval et al, 2008; Schweers et al, 2007) (Figura 16).

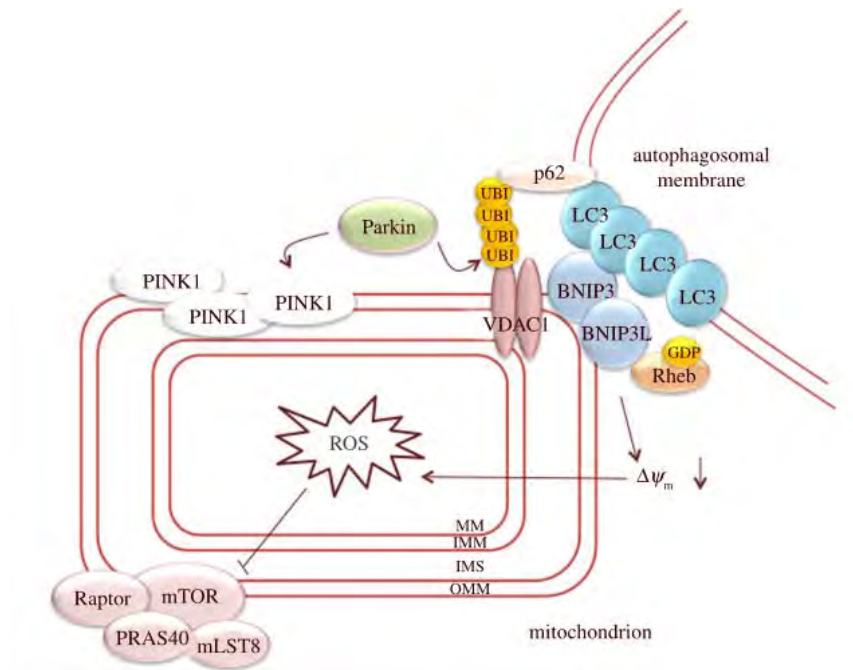


Figura 16. Esquema de los mecanismos de mitofagia inducidos por NIX/BNIP3. NIX y BNIP3 pueden ser receptores de mitofagia que interaccionan con LC3. Además, en la membrana externa mitocondrial reclutan a Parkina en la mitocondria. Por otro lado, NIX y BNIP3 pueden inducir la despolarización de la membrana externa mitocondrial y con ello producir un incremento en los niveles de ROS, que ejercen una acción inhibitoria sobre mTORC1. La inhibición de mTORC1 también se produce por la inhibición de Rheb. MM: matriz mitocondrial; IMM: membrana mitocondrial interna; IMS: espacio intermembrana; OMM: membrana mitocondrial externa; ROS: especies reactivas de oxígeno (MJ, 2013).

En el año 2010, Ding y colaboradores describieron que NIX prepara a la mitocondria para su degradación por mitofagia controlando la localización mitocondrial de Parkina bajo despolarización mitocondrial (Ding et al, 2010) (Figura 16). La despolarización mitocondrial con CCCP restaura la mitofagia incluso en reticulocitos deficientes de NIX, demostrando la presencia de mecanismos de compensación independientes de NIX para mediar mitofagia. Además, la ubiquitinización de NIX mediada por Parkina recluta al receptor de mitofagia NBR1 (Gao et al, 2015).

3. DESARROLLO DE LA RETINA DE VERTEBRADOS

3.1 Estructura de la retina adulta

La retina de vertebrados es un tejido sensible a la luz situado en la superficie interior del ojo encargado de procesar y transmitir la información visual. La retina madura está constituida por 6 tipos neurales y uno glial que se organizan en una estructura trilaminar que incluye la capa de células ganglionares (Formada por células ganglionares y amacrinas desplazadas), la capa nuclear interna (constituida por las neuronas bipolares, Müller, amacrinas y horizontales) y la capa nuclear externa (donde se encuentran los fotorreceptores) (Blackshaw, 2004 #12631). Las conexiones sinápticas se establecen entre estas tres capas y se organizan en capas adicionales denominadas capas plexiformes interna y externa (Figura 17).

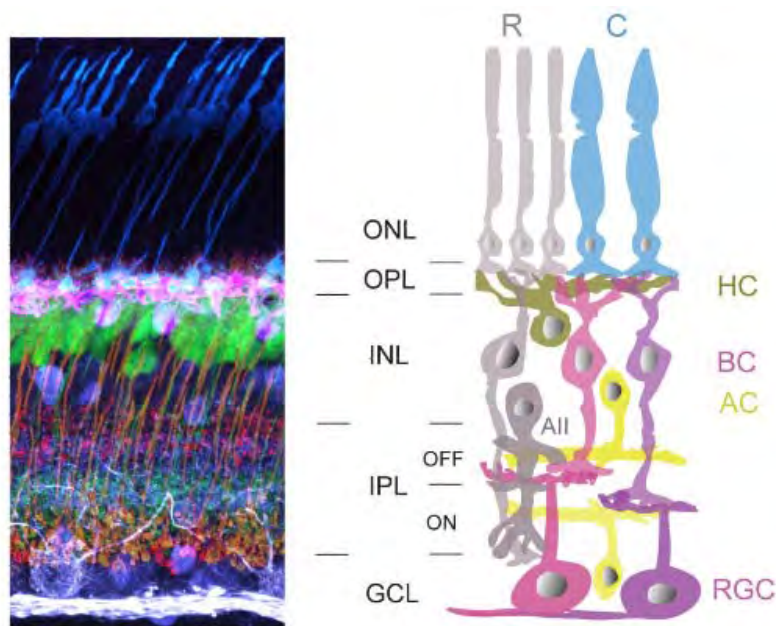


Figura 17. Organización esquemática de las neuronas en la retina de mamíferos. (Izquierda) Sección vertical de la retina de ratón mostrando diferentes tipos neuronales: conos (azul), células horizontales (rosa), células bipolares (rojo), células amacrinas (morado), y células ganglionares (blanco). ONL: capa nuclear externa, donde se agrupan los núcleos de fotorreceptores (conos y bastones); OPL: capa plexiforme externa, donde tiene lugar la sinapsis entre fotorreceptores y células bipolares; INL: capa nuclear interna, donde se agrupan los núcleos de las células horizontales, bipolares y amacrinas, así como de la glía de Müller; IPL: capa plexiforme interna, donde tienen lugar las sinapsis entre bipolares y RGCs; GCL: capa de células ganglionares. **(Derecha)** Representación esquemática de la retina. R: bastones, C: conos, HC: células horizontales, BC: células bipolares, AC: células amacrinas, RGC: células ganglionares (Hoon et al, 2014).

3.2 Desarrollo de la retina de vertebrados

El desarrollo del ojo de vertebrados es un proceso complejo regulado por factores intrínsecos y extrínsecos que especifican un área del prosencéfalo como el campo ocular y posteriormente produce la retina neural. El desarrollo del ojo comienza en la última etapa de la gástrula cuando se organiza el campo ocular y se separa bilateralmente en la placa neural (Chow & Lang, 2001; Kim & Kim, 2012). En el día embrionario (E) 8.5, aparecen las vesículas ópticas y se evaginan lateralmente desde el prosencéfalo, creciendo hacia la superficie del ectodermo (Schoenwolf, 2009), el cual da lugar a la placoda del cristalino. Después, las vesículas ópticas y la placoda del cristalino se invaginan, formando la copa óptica y las lentes. La copa óptica está constituida por dos capas: el epitelio pigmentario (RPE) y la neuroretina (NR), que se desarrolla hasta formar la retina madura trilaminada (Zagozewski et al, 2014).

El desarrollo de la neuroretina comienza en el día embrionario 12.5 (E12.5) y la neurogénesis no finaliza hasta día postnatal 6.5 (P6.5). Durante las etapas tempranas del desarrollo de la retina, la capa de neuroblastos externa está constituida principalmente por células progenitoras mitóticas, mientras que las neuronas recién diferenciadas (principalmente células ganglionares y amacrinas) residen en la capa neuroblástica interna. La posición de los progenitores mitóticos en la capa de neuroblastos externa varía dependiendo de su progreso en el ciclo celular, con células en fase S situadas en la cara vitreal cerca del límite con la capa interna, y células en fase M localizadas en la cara escleral de la capa de neuroblastos externa, limitando con el epitelio pigmentario (Young, 1985). Los distintos tipos celulares de la retina madura se desarrollan a partir de un conjunto común de progenitores multipotentes (Zagozewski et al, 2014) mediante un proceso dinámico espacio-temporal en el siguiente orden: células ganglionares, células horizontales, conos, células amacrinas durante el desarrollo embrionario, y células bipolares, bastones y glía de Müller durante el desarrollo postnatal (Zagozewski et al, 2014). Los fotorreceptores, principalmente bastones, son el tipo celular más abundante de la retina y tienen un pico de diferenciación a p0 (Blackshaw et al, 2004). Finalmente a P6 la mayoría de las células de la retina ocupan sus destinos finales, disminuyendo la expresión de marcadores característicos de progenitores como *cyclinD1* y *cdk4* (Blackshaw et al, 2004) (Figura 18).

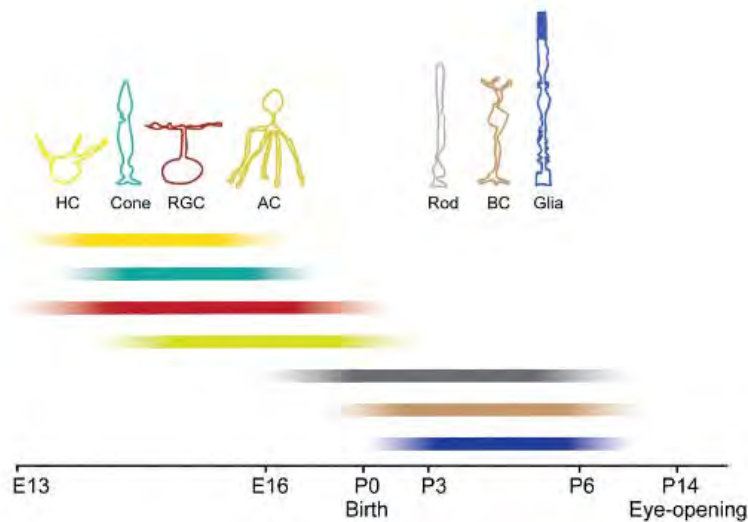


Figura 18. Esquema de la diferenciación temporal de los distintos tipos celulares de la retina de ratón. HC: células horizontales; Cone: conos; RGC: células ganglionares; AC: células amacrinas; Rod: bastones; BC: células bipolares; Glía: glía de Müller (Blackshaw et al, 2004).

La diferenciación celular sigue un patrón centro-periférico y es probable que los progenitores localizados adyacentes a las neuronas diferenciadas en la región central estén expuestos a diferentes señales que aquellos progenitores localizados en la periferia, lejos del frente de diferenciación. Además, existen diferencias en la expresión génica entre estas dos regiones de la retina (Adler & Canto-Soler, 2007; Koso et al, 2006; Koso et al, 2007). Así, diversos factores de transcripción están implicados en la organización y regionalización de la retina, como el factor de transcripción *Pax6*, que es el principal regulador del desarrollo del ojo (Zagozewski et al, 2014) y es indispensable para el mantenimiento de la multipotencia (Marquardt, 2001). Además, *Pax6* regula la expresión de genes proneurales de la familia bHLH específicos para cada subpoblación de progenitores que determinan un destino particular (Marquardt, 2001; Scardigli et al, 2003) (Figura 19).

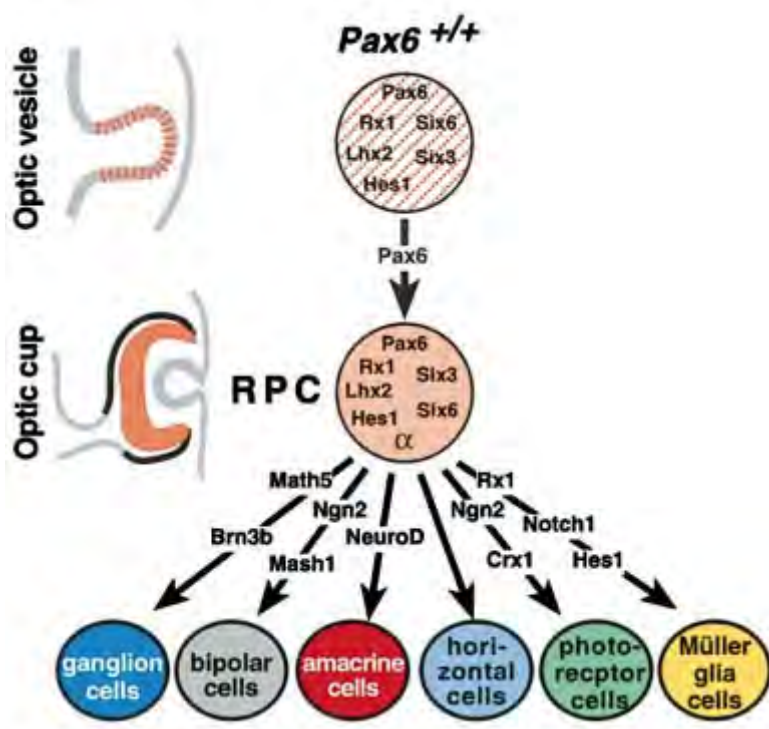


Figura 19. Esquema de los factores de transcripción que regulan el mantenimiento y diferenciación de los progenitores multipotentes de la retina (Marquardt, 2001)

Las células progenitoras de la retina tienen la habilidad de generar los diferentes tipos celulares de la retina (Jensen & Raff, 1997; Turner & Cepko, 1987). El destino celular

posterior está determinado por propiedades intrínsecas y factores extrínsecos (Bassett & Wallace, 2012; Cayouette et al, 2006; Livesey & Cepko, 2001). Los factores extrínsecos, como los factores neurotróficos, pueden activar vías de señalización que resultan en la expresión de unos factores de transcripción particulares que actúan en distintas combinaciones para definir cierta competencia/especificación de los progenitores o determinar los tipos celulares de la retina (Bejarano-Escobar et al, 2015). Así, factores de la familia bHLH como *Math5*, *Mash1* y *Ngn2* se activan en subpoblaciones de progenitores lo que hace que tengan un destino particular (Marquardt, 2001). De ese modo, a lo largo del desarrollo de la retina, varias familias de factores de transcripción mantienen la pluripotencia de los progenitores, especifican el destino de las células de la retina y promueven su diferenciación mediante un proceso dinámico espacio-temporal (Figura 20).

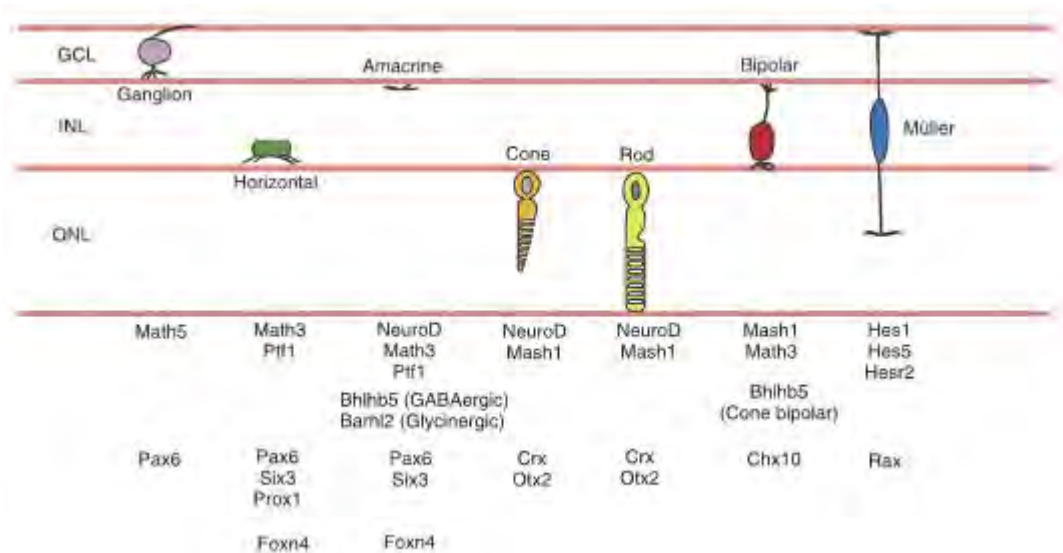


Figura 20. Resumen de los factores de transcripción implicados en la diferenciación de los diferentes tipos celulares de la retina (Graw, 2010).

3.3 Desarrollo de las células ganglionares de la retina

Se han descrito alteraciones del desarrollo en ratones que tienen anulados los genes de autofagia. Este proceso presenta un papel en la diferenciación de varios tipos celulares como los eritrocitos, los linfocitos y los adipocitos (Mizushima & Levine, 2010). Estudios previos de nuestro laboratorio han demostrado como la autofagia está implicada en el proceso de neurogénesis del bulbo olfativo, durante la cual parece tener un papel metabólico ya que el suplemento con metilpiruvato, un análogo permeable del piruvato, restaura el fenotipo (Vazquez et al, 2012). Estos datos sugieren una conexión entre la autofagia y el metabolismo durante la diferenciación celular.

En la presente Tesis Doctoral me he centrado en el proceso de diferenciación de las células ganglionares de la retina. Es importante destacar que la salida de ciclo celular durante la retinogénesis temprana se correlaciona con la expresión inicial de *Atoh7*, un factor de transcripción expresado en progenitores necesario para el desarrollo del primer tipo celular diferenciado en la retina, las células ganglionares (Gao et al, 2014). La expresión de *Atoh7* comienza en E11.5, es máxima en E12.5 y E13.5, y disminuye tras E14.5, aunque persistiendo hasta E18.5 (Gao et al, 2014; Mu et al, 2005), cuando comienza a disminuir gradualmente (Wu et al, 2015). Otros factores de transcripción, *Ebf3* y *Eya2*, están enriquecidos en progenitores que expresan *Atoh7*. Además, *Pou4f1* (*Brn3a*), *Pou4f2* (*Brn3b*), *Isl1* y *Myt1*, son factores de transcripción asociados a los

progenitores que expresan *Atoh7* y células ganglionares recién diferenciadas (Gan, 1999; Gao et al, 2014; Mu et al, 2008; Wang et al, 2001).

La figura 21 refleja el patrón de diferenciación centro-periférico de las células ganglionares en distintos estadios embrionarios.

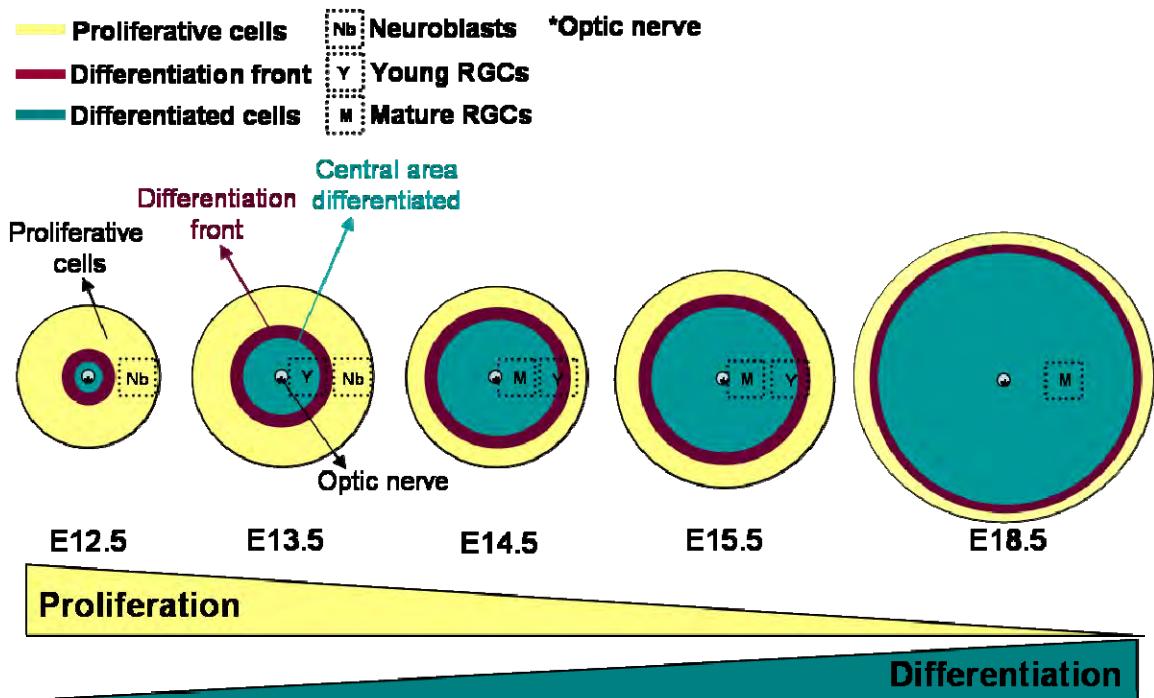


Figura 21. Representación del patrón centro-periférico de diferenciación de las células ganglionares de la retina.

Por último, hay que destacar que las células ganglionares transmiten la información visual desde la retina a los núcleos del colículo superior y núcleo geniculado lateral a través de sus axones, que constituyen el nervio óptico. Para ello, es necesaria la expresión génica de moléculas implicadas en guía axonal durante la diferenciación de las células ganglionares, como *Netrin*, *Dcc*, *Unc5*, *L1Cam*, componentes de la vía de señalización de Slit-Robo y semaforinas, como *Sema4g*, *Sema6b* y *Sema7a*, enriquecidas en células *Atoh7+* (Gao et al, 2014).

3.4 Muerte celular durante el desarrollo de la retina

La muerte celular es necesaria para la homeostasis durante el desarrollo y el envejecimiento. Sin embargo, ante una alteración fisiológica o daño, como el glaucoma y la isquemia óptica, se produce la muerte de las células ganglionares y finalmente una pérdida de visión e incluso ceguera (Nickells, 2012; Nickells et al, 2012).

El tipo de muerte más abundante durante el desarrollo es la apoptosis, que se caracteriza por una disminución del tamaño de la célula, la condensación de la cromatina, la fagocitosis y posterior degradación de los cuerpos apoptóticos tras su reconocimiento por células vecinas (Fagocitos no profesionales) (Penfold & Provis, 1986) o microglía (macrófagos del SNC) (Henson & Hume, 2006). Si las células apoptóticas no se eliminan, se puede producir la fragmentación de su membrana y desencadenar así procesos proinflamatorios, caracterizados por la ruptura de la membrana plasmática. Un aspecto importante de la apoptosis es que es una muerte celular activa dependiente de ATP e implica un gran conjunto de eventos para que progrese. Una de las primeras señales de la apoptosis es la exposición del fosfolípido fosfatidil-serina (PS) en la superficie de la membrana externa de la célula apoptótica (Fadok et al, 1992; Verhoven et al, 1999), un proceso altamente dependiente de ATP que permite el reconocimiento de las células muertas para su eliminación del tejido (Venegas & Zhou, 2007).

Durante el desarrollo embrionario de la retina, se han caracterizado diferentes fases de muerte celular que afectan a distintos tipos celulares como células troncales neurales, los progenitores proliferativos, los neuroblastos indiferenciados y las neuronas y células de glía recién diferenciadas, y cuyo fin es contribuir a la correcta generación de la retina (Boya & de la Rosa, 2005; de la Rosa & de Pablo, 2000; Yeo & Gautier, 2004).

En función del estadio de desarrollo en el que tiene lugar, se distinguen tres fases de muerte en la retina: la muerte morfogenética, la muerte neural temprana y la muerte neurotrófica. La muerte morfogenética ocurre en estadios iniciales del desarrollo de la retina (E10.5-E14.5) y se produce en la fisura óptica, siendo necesaria para la reestructuración de la retina y para facilitar la salida de los axones de las RGCs (Cuadros & Rios, 1988; Morcillo et al, 2006; Ozeki et al, 2000). La muerte neural temprana afecta a neuroblastos proliferativos y a las células ganglionares recién diferenciadas (Boya & de la Rosa, 2005) y se localiza en la región central de retinas a E13.5-E16.5. En ratón, este tipo de muerte es difícil separar espacio-temporalmente de la muerte morfogenética (Pequignot et al, 2003). La muerte neural temprana es simultánea a la generación de RGCs pero no a la generación de otros subtipos neuronales más tardíos (Chavarria et al, 2007). Y por último, la muerte neurotrófica, que se produce en RGCs diferenciadas maduras por falta de factores tróficos durante el proceso de sinaptogénesis con sus células diana, por lo que tiene lugar en la segunda

mitad del desarrollo de la retina (E18.5-P12) (Pequignot et al, 2003). Posteriormente, se produce una muerte celular en la capa de fotorreceptores que coincide con la apertura del ojo en el neonato (Valenciano et al, 2008). Ambos procesos ocurren cuando la generación de las RGCs ha finalizado.

3.5 Autofagia en retina y su relación con la muerte celular durante el desarrollo embrionario

En relación a la muerte celular asociada al desarrollo de la retina, estudios previos de nuestro laboratorio han determinado que la autofagia es funcional en la retina de aves en etapas tempranas del desarrollo y que es necesaria para la correcta eliminación de las células apoptóticas durante la muerte celular del desarrollo (Mellén et al, 2008). La inhibición farmacológica de la autofagia con 3-MA redujo los niveles de ATP y bloqueó la exposición de fosfatidilserina en la membrana plasmática de células apoptóticas. En consecuencia, las células muertas no se eliminaron y se acumularon en el neuroepitelio (Figura 22).

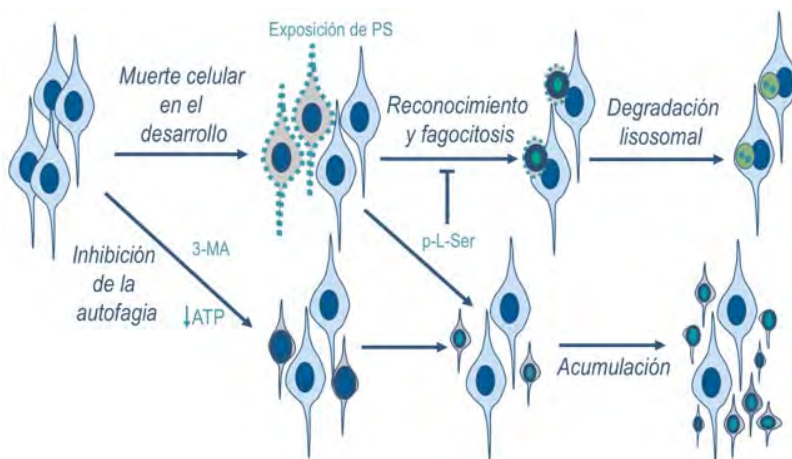


Figura 22. Representación esquemática del proceso de fagocitosis de las células apoptóticas en el neuroepitelio retiniano y el efecto de la inhibición de autofagia en el proceso. Modificado de (Boya et al, 2008).

Además, el suplemento con metilpiruvato, un análogo permeable del piruvato que sirve como un sustrato alternativo para la generación de ATP mitocondrial, restaura los niveles de ATP del ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la exposición de fosfatidilserina y la fagocitosis de las células apoptóticas (Boya et al, 2008; Mellén et al, 2008). Estudios realizados a otras edades indicaron que este requerimiento de la autofagia para la eliminación de cuerpos celulares no parece ser universal (Mellén et al, 2009). Hay que confirmar si este proceso afecta también al desarrollo de la retina de otras especies como el ratón, o es específico de aves.

En ratón, las células de la microglía están presentes en retinas de E11.5 fundamentalmente en la región central. En E12.5 incrementan sustancialmente su número y llegan hasta la periferia de la retina. Estas células presentan un aspecto ameboide y, frecuentemente, cuerpos apoptóticos en su citoplasma. Evolucionan y se ramifican ya en E13.5 y, entre E13.5 y E15.5, se distribuyen por toda la retina. Tanto en ratón como en otras muchas especies de vertebrados, las células microgliales en el adulto se localizan en la capa de células ganglionares y en la INL, estando totalmente ausentes en la ONL (Alvaro et al, 2007) aunque ese patrón varía en caso de daño o patología retiniana (Harada et al, 2002; Humphrey & Moore, 1996; Roque et al, 1996).

Por otro lado, y como he mencionado previamente, se ha descrito la autofagia como mecanismo de muerte o muerte celular de tipo II (Debnath et al, 2005; Zorov et al, 2006). Por lo que resulta interesante determinar si la autofagia podría contribuir también a la muerte fisiológica que se produce en las diferentes etapas del desarrollo de la retina así como su relación con la diferenciación de las células ganglionares.

4. MITOFAGIA Y MUERTE CELULAR

De manera general, existen diferentes vías de muerte celular evolutivamente conservadas, como la apoptosis dependiente de caspasas, mediada por los efectos coordinados de múltiples miembros de la familia Bcl-2 (Danial & Korsmeyer, 2004); la muerte por necrosis (Baines et al, 2005; Newmeyer & Ferguson-Miller, 2003) y la muerte por autofagia o muerte celular de tipo II (Debnath et al, 2005; Zorov et al, 2006).

La apoptosis y la autofagia son vías que frecuentemente producen funciones contrarias en respuesta a un estrés celular (Marino et al, 2014). Mientras que la apoptosis ejecuta programas de muerte celular durante periodos de ayuno o estrés, la autofagia puede servir como un mecanismo de supervivencia celular mediante el mantenimiento de la homeostasis energética a través de su actividad catalítica (Levine et al, 2011; Marino et al, 2014). Por tanto, en general la autofagia es un mecanismo de supervivencia aunque en algunos casos se ha demostrado que puede participar activamente en los procesos de muerte celular (Levine & Yuan, 2005; Zorov et al, 2006). De hecho, se sabe que el poro de transición de permeabilidad propociona una vía común que lleva a mitofagia, apoptosis y necrosis (Figura 23). Ante una baja intensidad de agentes estresantes, el inicio de la permeabilidad mitocondrial podría solo incrementar la mitofagia para eliminar mitocondrias dañadas, que pueden inducir

muerte celular a través de la producción de ROS (Green et al, 2011; Levine et al, 2011; Marino et al, 2014). A medida que incrementa el estrés, la liberación de factores proapoptóticos de la mitocondria al sufrir MPTP desencadena la apoptosis. Cuando el sistema de autofagia está sobrecargado, puede liberar enzimas lisosomales y posiblemente otros factores que promueven la muerte celular, además de producir una degradación excesiva de los constituyentes celulares. Finalmente, un estrés extremo causa MPTP en todas las mitocondrias y una disminución de ATP de manera drástica. Debido a ese fallo energético, ni la autofagia ni la apoptosis pueden progresar, y solo se produce muerte celular por necrosis (Kim et al, 2007) (Figura 23). Por tanto la autofagia puede presentar un papel dual en la muerte celular que se inicia con una permeabilidad mitocondrial.

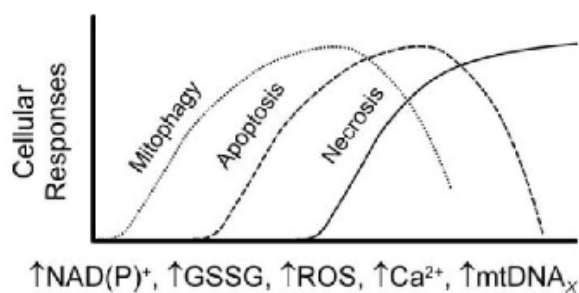


Figura 23. Esquema de la progresión de mitofagia, apoptosis y necrosis. Entre los inductores de MPTP se incluyen NAD(P)^+ , GSSG, ROS, Ca^{2+} , y mutaciones de mtDNA (mtDNA) (Kim et al, 2007).

Otro punto en común entre los tres procesos descritos en la figura 23 es NIX, que puede promover muerte celular con características tanto de apoptosis como de necrosis (Chinnadurai et al, 2008), e inducir mitofagia (Diwan, 2007; Sandoval et al, 2008; Schweers et al, 2007; Zhang & Ney, 2009). La diversidad funcional de NIX en la muerte celular se relaciona con su localización en la mitocondria o en el retículo endoplasmico (Diwan et al, 2009) (Figura 24). La muerte celular necrótica mediada por NIX cuando se localiza en el retículo en contacto con la mitocondria es dependiente de ciclofilina D y no requiere de Bax y Bak, mientras que NIX localizado en la mitocondria induce solo apoptosis dependiente de caspasas sin afectar al MPTP (Chen et al, 2010). Una característica común a ambos tipos de muerte mediados por NIX es el marcaje TUNEL positivo (Chen et al, 2010).

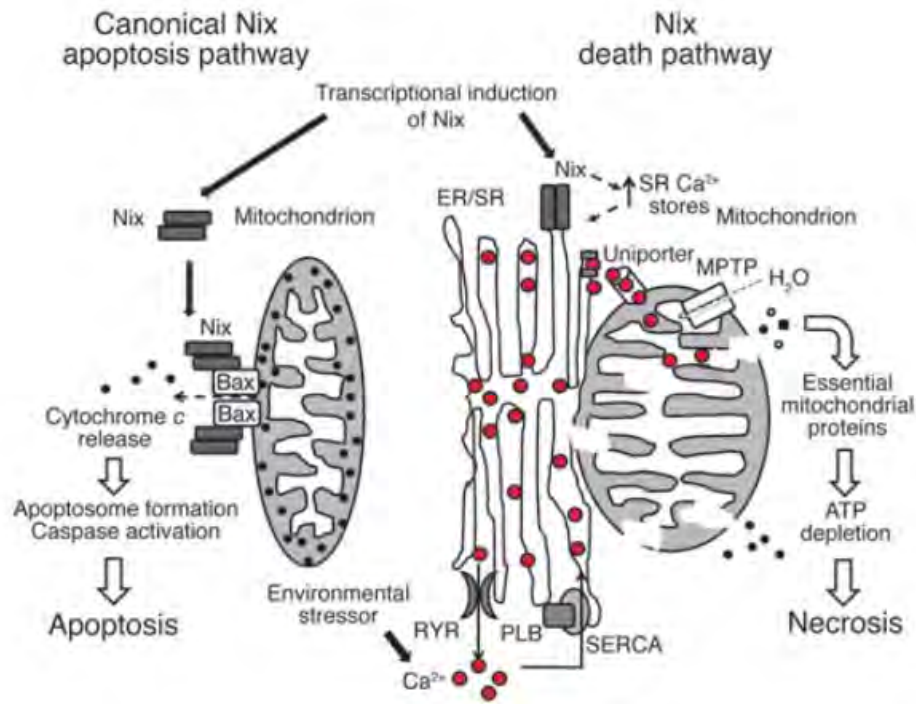


Figura 24. Mecanismos de muerte inducida por NIX. NIX inducido transcripcionalmente se une a la mitocondria y a ER/SR y activa la muerte celular en las células vía muerte apoptótica clásica y lo que se piensa un nuevo tipo de muerte celular que implica a ER/SR. NIX en la mitocondria produce una permeabilización de la membrana mitocondrial, probablemente en coordinación con Bax/Bak, llevando a la liberación de citocromo c, formación del apoptosoma, activación de caspasas y apoptosis. NIX localizado en ER/SR contribuye a la sobrecarga de calcio en ER/SR y posterior liberación del mismo, que entra a través de un transportador uniporter en la mitocondria provocando una sobrecarga de calcio en la mitocondria. Como consecuencia, se produce MPTP con pérdida del potencial de membrana mitocondrial y liberación de proteínas mitocondriales esenciales. Como consecuencia no se produce ATP y el resultado es un fallo energético que lleva a muerte por necrosis (Diwan et al, 2009)

5. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA

5.1 Efecto Warburg

La reprogramación metabólica, también conocida como efecto Warburg, es un proceso mediante el cual las células cambian de un metabolismo oxidativo a glicólisis aerobia, convirtiendo la glucosa en lactato en presencia de oxígeno (Warburg, 1931). Este fenómeno fue inicialmente descrito en células tumorales y la retina (Warburg, 1956) pero posteriormente se ha descrito en otros tipos celulares, como las células *stem* embrionarias, los linfocitos T humanos, los neutrófilos, las células dendríticas, los macrófagos y la retina adulta (Galvan-Pena & O'Neill, 2014; Jones & Thompson, 2007; Krawczyk et al, 2010; Ng et al, 2015; Palsson-McDermott, 2013).

Ese cambio metabólico promueve el flujo glicolítico y está acompañado de un incremento en la producción de lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y otros carbohidratos para mantener los requerimientos metabólicos de la célula. La hipoxia también produce un cambio de metabolismo hacia glicólisis, lo que se conoce como efecto *Pasteur*. Resulta interesante que NIX y BNIP3 regulan el proceso de mitofagia durante la hipoxia (Ney, 2015). Sin embargo, se desconoce el papel específico de la mitofagia durante la reprogramación metabólica

5.2 Metabolismo de la retina de vertebrados

La retina tiene grandes demandas energéticas para mantener el estado de excitación de las neuronas para la fototransducción y la neurotransmisión, además del mantenimiento normal de la función celular (Ames, 1992). La retina produce energía de la glicólisis incluso en presencia de oxígeno. Este hecho fue inicialmente observado por Warburg (Warburg, 1956) y varias décadas después ha sido confirmado por otros investigadores (Ames, 1992; COHEN LH, 1960; Noell, 1959; Tornquist & Alm, 1979; Winkler, 1981; Winkler, 1995).

Una posible explicación de que en retina adulta, a pesar de ser un tejido proliferativo, se observe el efecto Warburg, es que presenta similares requerimientos biosintéticos que los tejidos neoplásicos debido al reciclado de la opsina en las membranas discales de los segmentos externos de los fotorreceptores (Casson et al, 2013). Consistente con esta teoría es la observación por Agathocleus *et al.* en el año 2012 quienes describieron un metabolismo glicolítico aerobio en la retina en desarrollo de *Xenopus laevis* y *Zebrafish* para mantener sus requerimientos biosintéticos. En este caso, describen un cambio hacia un metabolismo dependiente de fosforilación oxidativa en la retina madura (Agathocleous et al, 2012).

Una explicación alternativa para la alta actividad glicolítica de los fotorreceptores podría ser la compartimentalización celular, ya que las mitocondrias están localizadas en el segmento interno y ausentes en el segmento externo (Young, 1971). La exclusión de las mitocondrias del segmento externo posiblemente lleva a la dependencia de la glicólisis en dicha región.

Además de las necesidades energéticas de los fotorreceptores, las células de Müller también dependen de la glicólisis aerobia y producción de lactato (Winkler et al, 2000), siendo células que constituyen los reservorios primarios de glicógeno en la retina (KUWABARA T, 1961). Sin embargo, la información sobre el perfil metabólico de

otros tipos celulares de la retina es limitado (Ames, 1992; COHEN LH, 1960; Noell, 1959). Noell y colaboradores demostraron que las células ganglionares de la retina adulta son susceptibles a la hipoxia y son la parte más débil de la cadena visual cuando el oxígeno es escaso (Noell, 1959). Sin embargo, no está claro si las células ganglionares presentan un efecto Warburg. Además, no hay ningún estudio metabólico realizado durante la diferenciación de la retina.

Varios factores de crecimiento, incluida la insulina/IGF1 promueven la proliferación de los progenitores de la retina (Agathocleous & Harris, 2009). Dado que mTOR está implicado en la regulación del ojo de *Drosophila* (McNeill et al, 2008) y el tubo neural del pollo (Fishwick et al, 2010) y que la velocidad de crecimiento está limitada por la disponibilidad de nutrientes, es posible que mTOR y sus consecuencias en autofagia, puedan mediar para acoplar la disponibilidad de nutrientes con la proliferación y diferenciación de los progenitores de la retina. Así, la activación de mTOR produce una neurogénesis prematura en la retina central en desarrollo (Jo et al, 2012), lo que sugiere que la vía PI3K/mTOR regula la diferenciación.

5.3 Mitofagia y reprogramación metabólica

Hasta la fecha, no había estudios sobre la relación entre mitofagia y reprogramación metabólica. En un estudio reciente en colaboración con Marcos Malumbres (CNIO) hemos demostrado que la mitofagia es un proceso modulador de un cambio metabólico hacia glicólisis durante un prolongado arresto mitótico. Esta estrategia terapéutica es empleada para alterar la proliferación de las células tumorales. Durante el arresto mitótico, la degradación de mitocondrias por mitofagia produce una disminución de los niveles de ATP y por tanto la activación de AMPK. Como consecuencia, la fosforilación oxidativa es reemplazada por la glicólisis mediante la fosforilación de PFKFB3 dependiente de AMPK. La inducción de autofagia, de AMPK o PFKFB3 resulta en un aumento de la muerte celular en mitosis y mejora la eficiencia antitumoral de las drogas utilizadas en el tratamiento contra el cáncer (Domenech et al, 2015; Esteban-Martinez et al, 2015) (Figura 25).

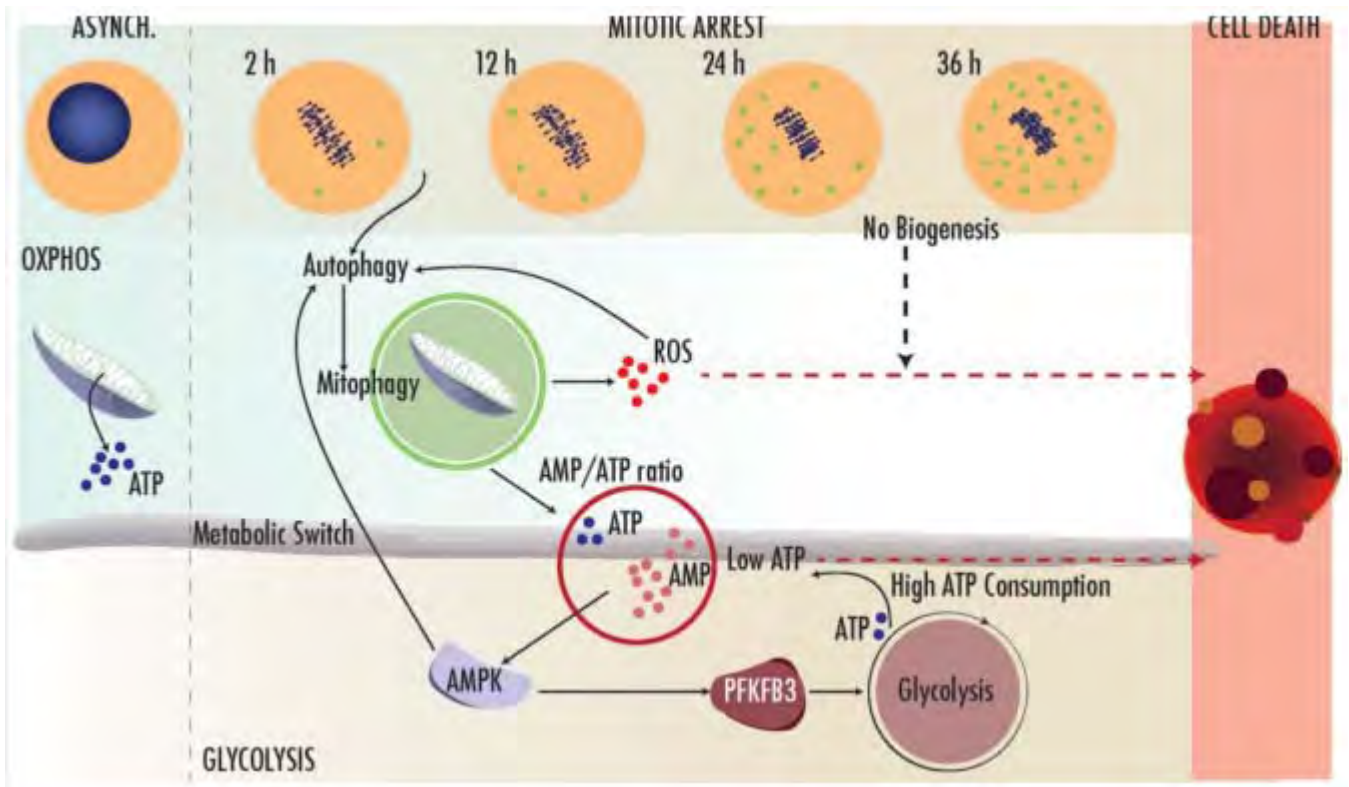


Figura 25. Mitofagia durante el arresto mitótico. La inducción de autofagia en ausencia de biogénesis mitocondrial induce mitofagia (puntos verdes en panel superior) y la depleción de mitocondrias funcionales, provocando una disminución de ATP mitocondrial. Como consecuencia se produce la activación de AMPK, que posteriormente fosforila a PFKFB3, induciéndose la glicólisis. Con el fin de suplir las demandas energéticas de la célula en arresto mitótico (Esteban-Martínez et al, 2015).

Por otro lado, se ha visto que la inducción de mitofagia mediada por MUL1 juega un papel en la modulación del balance energético del músculo esquelético y del estado aerobio/anaerobio de las fibras musculares (Lokireddy et al, 2012). Además, la mitofagia inducida por PINK1-Mtf2-Parkina juega un papel en el cambio metabólico de carbohidratos a ácidos grasos en el corazón de ratón, siendo un prerrequisito para la introducción de mitocondrias cardíacas maduras óptimas para un metabolismo dependiente de ácidos grasos (Gong et al, 2015). Durante este proceso, la preferencia metabólica hacia glicólisis en corazones fetales recuerda al efecto Warburg observado en cáncer. Aunque los determinantes moleculares específicos del metabolismo glicolítico en los corazones fetales difieren de los que se encuentran en los tumores, en ambos casos, el incremento en la glicólisis es una adaptación al ambiente hipóxico y se optimiza para incrementar la biomasa, por ejemplo promoviendo el crecimiento celular (Vander Heiden et al, 2009).

La mitofagia es por tanto un proceso que acompaña a diferentes situaciones que presentan un cambio metabólico caracterizado por una limitada actividad mitocondrial y

dependencia de la glicólisis para suplir las demandas energéticas, tanto en las células altamente proliferativas, como en las células madre hematopoiéticas (Joshi & Kundu, 2013) así como en células ya diferenciadas, no proliferativas, como los eritrocitos (Sandoval et al, 2008; Schweers et al, 2007).

Lo que aun no está del todo definido en la literatura es si la mitofagia es el proceso responsable del cambio metabólico o solo una adaptación celular a una necesidad de cambio metabólico según las demandas energéticas.

5.4 Mitofagia en las neuronas

El proceso de mitofagia se ha estudiado principalmente en líneas celulares no neuronales y apenas se ha estudiado en neuronas ya diferenciadas. Como en otros tipos celulares, las neuronas modulan continuamente el tamaño y número de las mitocondrias, dependiendo de las demandas energéticas y de los estados metabólicos a lo largo de su vida y/o diferentes compartimentos subcelulares (Chen & Chan, 2009; Santos et al, 2010; Van Laar & Berman, 2013; Vives-Bauza et al, 2010). De ese modo, un gran número de mitocondrias reside muy lejos del soma, estando localizadas en el axón distal, en los procesos dendríticos (Hollenbeck, 2005; Perkins & Ellisman, 2011; Perkins et al, 2010), los nodos de Ranvier y los conos de crecimiento (Fabricius et al, 1993; Morris & Hollenbeck, 1993), con el fin de proporcionar ATP localmente y la regulación de calcio necesaria para la actividad sináptica (Schon & Przedborski, 2011). Dado que los lisosomas están fundamentalmente localizados en el soma, se requiere de un transporte retrógrado de las mitocondrias hacia el soma para su degradación por mitofagia (Ashrafi & Schwarz, 2013). La eliminación de mitocondrias dañadas es así una función de demanda bioenergética. No obstante, la mitofagia es un proceso muy importante en neuronas, ya que permite proporcionar mitocondrias sanas en los procesos distales donde son imprescindibles para la transmisión sináptica (Amadoro et al, 2014). Por otro lado, también se ha observado una degradación local de mitocondrias despolarizadas antes de su transporte al soma (Wang et al, 2011) (Figura 26).

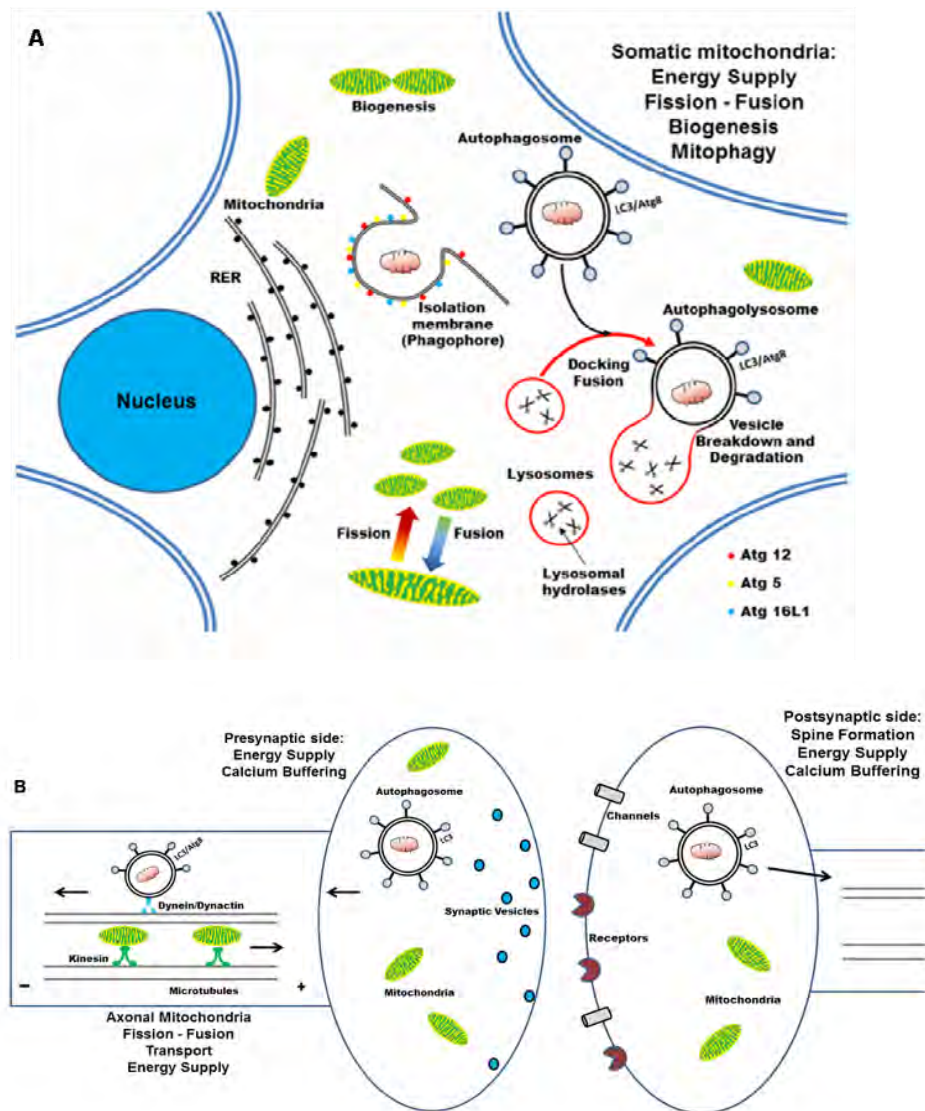


Figura 26. Compartimentalización y diferentes requerimientos energéticos en el soma, axón y compartimentos sinápticos de neuronas postmitóticas. (A) Las mitocondrias viajan largas distancias desde el soma hasta los terminales dendríticos y axónicos, donde se encargan de la producción de ATP y de la homeostasis del calcio. Los procesos dinámicos de biogénesis, fusión y fisión, regulan la función mitocondrial permitiendo adaptar los cambios espacio-temporales a los requerimientos energéticos. (B) Los autofagosomas formados se mueven a través de los microtúbulos en dos direcciones -como resultado de las actividades opuestas de proteínas motoras dineína y kinesina- y finalmente, se concentran en la región perinuclear donde se fusiona con los lisosomas (Amadoro et al, 2014).

Además, las neuronas dependen críticamente de la autofagia para la diferenciación y la supervivencia (Komatsu et al, 2006) y son específicamente propensas al estrés oxidativo, por lo que la autofagia basal parece ser más eficiente que en otros tipos celulares proliferativos no neuronales (Boland et al, 2008) y está también probablemente regulada por diferentes vías (Ashrafi & Schwarz, 2013; Van Laar & Berman, 2013). Hay que destacar que puesto que las neuronas son células diferenciadas y que producen altos niveles de ROS (Cui et al, 2004; Fatokun et al, 2008), necesitan

eliminar las mitocondrias antiguas para prevenir la acumulaci3n de da1o oxidativo (Kageyama et al, 2012).

Por tanto, las mitocondrias desempe1an una funci3n metab3lica importante en la funci3n neuronal y es necesario un control estricto de su homeostasis para mantener neuronas sanas que no acumulen ROS y evitar as3 su muerte celular. Estos datos, junto con las evidencias previas de que la autofagia es un proceso importante durante la diferenciaci3n celular, nos han llevado a plantear la hip3tesis de que la mitofagia podr3a ser un proceso esencial durante el desarrollo de la retina, modulando procesos como el metabolismo, la diferenciaci3n y la muerte celular.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta Tesis Doctoral ha consistido en entender por qué la autofagia es esencial para el correcto desarrollo de la retina de ratón. En concreto, se han estudiado las funciones de la autofagia en relación al metabolismo, la diferenciación y la muerte celular. Los objetivos de este trabajo se detallan a continuación:

1. Determinar el flujo de autofagia *in vivo* y *ex vivo* en la retina de ratón embrionaria y adulta.
2. Determinación del fenotipo de muerte celular tras el bloqueo y la inducción de la autofagia en la retina embrionaria de ratón.
3. Estudio del proceso de mitofagia a lo largo del desarrollo embrionario y postnatal de la retina.
4. Determinación de la función metabólica de la mitofagia durante el desarrollo embrionario de la retina y la polarización de macrófagos.
5. Estudio de la función de la mitofagia durante la diferenciación celular.

*MATERIALES Y
MÉTODOS*

MATERIALES Y MÉTODOS

1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y EXTRACCIÓN DE RETINAS

Todos los procedimientos experimentales realizados con animales en esta Tesis Doctoral han sido aprobados por los comités éticos locales de experimentación animal del CSIC y del *Albert Einstein College of Medicine* y se han llevado a cabo siguiendo la normativa vigente de la Unión Europea y Americana, y la declaración de ARVO para la utilización de animales en la investigación oftalmológica. Para el estudio de retinas postnatales se han empleado indistintamente machos y hembras. Los animales fueron mantenidos en ciclos de 12:12 horas de luz y oscuridad, a una temperatura de 20 °C, con comida y bebida *ad libitum*. Para la obtención de embriones, se cruzaron los animales y la mañana en la cual se detectó el tapón vaginal se consideró como el día embrionario (E) 0.5. Todos los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical y los embriones fueron obtenidos por cesárea. Los embriones se decapitaron y se colocaron en una placa Petri con PBS 1x y, con unas pinzas finas bajo la lupa, se aislaron los ojos ó se diseccionaron las retinas separándolas del epitelio pigmentario, cristalino, vítreo, vasos y otros restos de tejido. El aislamiento de los ojos y las retinas de ratones adultos se realizó de igual modo.

1.1 Ratones wildtype C57 y CD1

Los ratones silvestres utilizados en este trabajo fueron de la estirpe C57BL/6J y CD1 procedentes de *Jackson Mice Laboratories* (Bar Harbor, ME, USA). Estas cepas de ratón fueron mantenidas en el animalario del CIB (CSIC).

1.2 Ratones GFP-LC3

Los ratones transgénicos GFP-LC3 fueron proporcionados por el Dr. Noboru Mizushima (Departamento de Fisiología y Biología Celular en *Tokyo Medical and Dental University*, Tokyo, Japón) y han sido previamente descritos (Mizushima et al, 2004). Se estableció una colonia en el animalario del CIB mediante transferencia

embrionaria. Para la obtención de embriones se cruzaron machos GFP-LC3 con hembras GFP-LC3, de manera que toda la descendencia expresa GFP.

1.3 Ratones deficientes de Atg5

Los ratones $Atg5^{-/-}$ de la estirpe C57 fueron proporcionados por el Dr. Noboru Mizushima (Departamento de Fisiología y Biología Celular en *Tokyo Medical and Dental University*, Tokyo, Japón). Se estableció una colonia en el animalario del CIB mediante transferencia embrionaria. Para la obtención de embriones se cruzaron machos $Atg5^{+/-}$ con hembras $Atg5^{+/-}$.

1.4 Ratones deficientes de Ambra1

Los ratones mutantes $Ambra1^{gt/gt}$ de la estirpe CD1 fueron generados en el laboratorio del Prof. Francesco Cecconi (*Università degli Studi di Roma Tor Vergata*). Estos ratones se generaron por la técnica de *gene-trapping*, introduciendo una secuencia que cambió el marco de lectura del gen *Ambra1* (Fimia et al, 2007). Se estableció una colonia en el animalario del CIB mediante transferencia embrionaria. Para la obtención de embriones se cruzaron machos $Ambra1^{+/gt}$ con hembras $Ambra1^{+/gt}$.

1.5 Ratones deficientes de NIX (BNIP3L)

Los ratones deficientes de NIX (BNIP3L) de la estirpe C57 fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Alex Cvekl (*Albert Einstein College of Medicine*). Para la obtención de embriones se cruzaron machos $NIX^{+/-}$ con hembras $NIX^{+/-}$.

1.6 Ratones deficientes de LAMP-2A

Los ratones deficientes de LAMP-2A de la estirpe C57 fueron proporcionados por el laboratorio de la Dra. Ana María Cuervo (*Albert Einstein College of Medicine*). La colonia de ratones LAMP-2A se mantuvo en homocigosis, ya que la deficiencia de LAMP-2A no es letal, por lo que para la obtención de embriones se cruzaron machos $LAMP-2A^{-/-}$ con hembras $LAMP-2A^{-/-}$. Como controles se emplearon embriones C57 de los estadios correspondientes.

Las retinas y los ojos embrionarios obtenidos se procesaron mediante diferentes técnicas detalladas a continuación y resumidas en la figura 1:

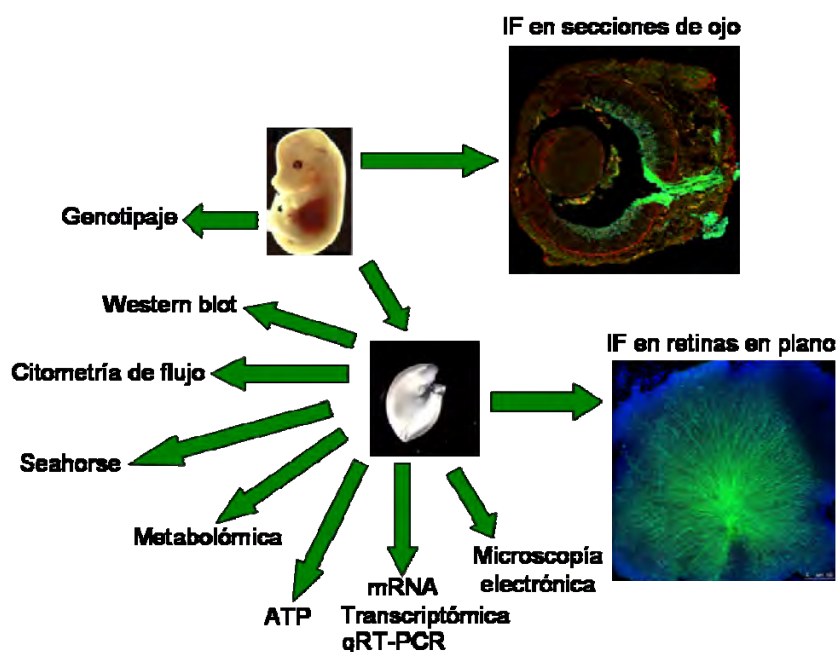


Figura 1. Procesamiento de ojos y retinas embrionarias empleados en esta Tesis Doctoral. IF: inmunofluorescencia.

2. GENOTIPAJE DE LOS RATONES KNOCK-OUT

El genotipaje de los ratones adultos de las colonias de *Ambra1*, *Atg5* y *NIX*, y de los embriones deficientes de *Atg5* y *NIX*, se realizó a partir de DNA genómico obtenido de la punta de la cola del ratón o embrión según la técnica descrita por Miller y cols (Miller et al, 1988). El fragmento de cola se digirió en 0.5 mL de tampón de lisis (Tris-HCl 40 mM, pH 8.0; EDTA 20 mM; SDS 0.5 % (p/v) y NaCl 200 mM) con 0.3 mg de Proteínasa K (Sigma, 2308) durante toda la noche a 55 °C. A continuación se añadieron 0.25 mL de una solución saturada de NaCl a 6M, se agitaron los tubos en el vortex y se dejaron 10 minutos en hielo. Posteriormente, se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C y se transfirieron los sobrenadantes, donde está contenido el DNA, a un nuevo tubo estéril. Al DNA de cada muestra se le añadió 1 mL de etanol al 96 % para su precipitación y se agitaron los tubos vivamente. Tras una centrifugación a 12.000 r.p.m, se lavó con etanol al 70 % para eliminar las sales y tras una última centrifugación en las mismas condiciones, se dejó secar el DNA manteniendo el tubo abierto y tapado para evitar contaminaciones. Finalmente, los

DNAs se resuspendieron en agua milliQ estéril a la concentración indicada para cada genotipaje.

Tras la PCR correspondiente, el resultado de las amplificaciones se analizó en geles de agarosa (Promadisa, 8014) al 2 % (p/v) conteniendo 1 µg/mL de bromuro de etidio (BioRad, 161-0433) y utilizando el marcador de pares de bases 1Kb (Invitrogen, 10787-026) en todos los casos. La electroforesis se llevó a cabo a 115V durante 60 minutos y el análisis de las bandas se realizó en GelDOC.

2.1 Genotipaje de ratones adultos y embriones de la colonia Atg5

Los DNAs genómicos procedentes de ratones adultos y embriones deficientes de Atg5 se resuspendieron en 50AL, se midió la concentración en NANODROP y se ajustó la concentración a 20 ng/µL. La detección del genotipo Atg5^{+/+}, Atg5^{+/-} y Atg5^{-/-} se realizó utilizando los cebadores Check2, Exon3-1 y Short2. (Tabla 1).

Cebador	Secuencia
Check2	5'-ACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGG-3'
Exon3-1	5'-GAATATGAAGGCACACCCTGAAATG-3'
Short2	5'-GTACTGCATAATGGTTTAACTCTTGC-3'

Tabla 1. Secuencia de los cebadores empleados para el genotipaje de ratones adultos y embriones de la colonia Atg5.

Con estas secuencias se obtiene un amplicón de 351 pb (pares de bases) en el Atg5^{+/+}, y de 574 pb en el Atg5^{-/-}. Las reacciones de amplificación se realizaron con 2.5 µL de DNA genómico en un volumen final de 25 µL. La amplificación se llevó a cabo con el kit Master Mix[®] (5 PRIME). Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95 °C, 2 minutos; 33 ciclos de: 30 segundos a 95 °C, 30 segundos a 59 °C y 30 segundos a 72 °C; y finalmente 1 ciclo a 72 °C, 10 minutos.

2.2 Genotipaje de ratones adultos y embriones de la colonia NIX

Los DNAs genómicos procedentes de ratones adultos y embriones deficientes de NIX se resuspendieron en 50 µL, se midió la concentración en NANODROP y se ajustó la concentración a 20 ng/µL. La detección del genotipo NIX^{+/+}, NIX^{+/-} y NIX^{-/-} se realizó mediante dos PCRs utilizando las parejas de cebadores NIX GT LOX-1-NIX GT LOX-3 y NIX GT LOX-2-NIX GT LOX-3. (Tabla 2).

Cebador	Secuencia
NIX GT LOX-1	5'-CACAGCATTGCCACCCCTGCAGAG-3'
NIX GT LOX-2	5'-GCTGCAGATGCCGGCCTGAGCAA-3'
NIX GT LOX-3	5'-ACCTGCCCATGCTCCAGAGCAGGC-3'

Tabla 2. Secuencia de los cebadores empleados para el genotipaje de ratones adultos y embriones de la colonia NIX.

Con estas secuencias se obtiene un amplicón de 375 pb (pares de bases) en el NIX^{+/+}, y de 210 pb en el NIX^{-/-}. Las reacciones de amplificación se realizaron con 2.5 µL de DNA genómico en un volumen final de 25 µL. La amplificación se llevó a cabo con el kit Master Mix[®] (5 PRIME). Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 °C, 2 minutos; 30 ciclos de: 1 minuto a 94 °C, 30 segundos a 60 °C y 30 segundos a 72 °C; y finalmente 1 ciclo a 72 °C, 10 minutos.

2.3 Genotipaje de ratones adultos de la colonia Ambra1

La mutación introducida por *gene-trapping* para la generación de ratones deficientes de Ambra1 es letal embrionaria en homocigosis, por lo que la sola presencia del *cassette* introducido en tejido adulto indica que es heterocigoto para la mutación. Los DNAs genómicos procedentes de ratones adultos Ambra1 se resuspendieron en 50 µL de agua milliQ, se midió la concentración en NANODROP y se ajustó la concentración a 80 ng/µL. La detección del genotipo Ambra1^{+/+} y Ambra1^{+gt} se realizó utilizando los cebadores SAB y LacZb. (Tabla 3).

Cebador	Sentido	Secuencia
SAB	F	5'-TCCCGAAAACCAAAGAAGAAGA-3'
LacZb	R	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAA-3'

Tabla 3. Secuencia de los cebadores empleados para el genotipaje de ratones adultos de la colonia Ambra1.

Con estas secuencias se obtiene un amplicón de 145 pb (pares de bases) en el Ambra1^{+gt}. Las reacciones de amplificación se realizaron con 1 µL de DNA genómico en un volumen final de 25 µL. La amplificación se llevó a cabo con el kit Master Mix[®] (5 PRIME). Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95 °C, 5 minutos; 30 ciclos de: 2 minutos a 95 °C, 45 segundos a 58 °C y 45 segundos a 72 °C; y finalmente 1 ciclo a 72 °C, 10 minutos.

2.4 Genotipaje de embriones deficientes de Ambra1

La detección de los genotipos Ambra1^{+/+}, Ambra1^{+/^{gt}} y Ambra1^{gt/^{gt}} se realizó mediante una reacción de RT-PCR del RNA total de la cola del embrión. Para determinar los tres genotipos para el alelo mutado se estudió la presencia del mRNA aberrante y del silvestre. La extracción de RNA se realizó homogeneizándolo con un émbolo en un tubo *ependorf* en presencia de 250 µL de Trizol[®] (Invitrogen). A continuación, se añadieron 50 µL de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4 °C. Aproximadamente 125 µL del sobrenadante se mezclaron en un tubo nuevo con 125 µL de isopropanol y se centrifugaron a 12.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70 % y se volvió a centrifugar a 7.500 r.p.m. durante 5 minutos a 4 °C. Tras quitar el sobrenadante y dejar secar bien, el precipitado se resuspendió en 40 µL de agua RNasaFree, se midió la concentración en NANODROP y se diluyeron las muestras a 125 ng/µL.

La reacción de retrotranscripción se realizó con Oligo (dT) (Invitrogen) y la enzima Superscript[®] III (Invitrogen). Previamente, se trataron los RNAs con DNAsa, mediante una mezcla de RNA y H₂O en un volumen total de 8 µL (teniendo el RNA una concentración de 1 µg), a la que se añadieron 1 µL de DNAsa, 1 µL de tampón de la enzima a 10x y 1 µL de EDTA. La reacción se llevó a cabo a 65 °C durante 10 minutos. El anillamiento con Oligo (dT) se realizó a 65 °C durante 5 minutos, utilizando una primera mezcla con un volumen final de 10 µL por cada 2 µL e RNA resuspendido, conteniendo 1 µL de dNTPs y 1 µL de Oligo (dT). Posteriormente se añadió una mezcla conteniendo 4 µL de tampón de la enzima, 1 µL de DTT (Ditiotreitol), 1 µL de RNAsa y 1 µL de Superscript[®] III por cada muestra. La reacción se produjo en las siguientes condiciones: 25 °C, 5 minutos; 50 °C, 60 minutos, 70 °C, 15 minutos.

La detección del genotipo se realizó mediante dos PCRs utilizando las parejas de cebadores E-D y LacZb-E (Fimia et al, 2007). (Tabla 4).

Cebador	Sentido	Secuencia
E	F	5'-AACGCATTTATACCCAGTCCA-3'
LacZb	R	5'- CCCAGTCACGACGTTGTAAAA-3'
D	R	5'- ACCATAACGTATCGGCCCATC-3'

Tabla 4. Secuencia de los cebadores empleados para el genotipaje de embriones de la colonia Ambra1.

Con estas secuencias se obtuvo un amplicón de aproximadamente 750 pb, siendo Ambra1^{+/^{gt}} positivo para las dos reacciones de PCR, Ambra1^{gt/^{gt}} positivo sólo para LacZb-E y Ambra1^{+/⁺} positivo solo para E-D. Las reacciones de amplificación se realizaron con 2 µL de cDNA en un volumen final de 25 µL. La amplificación se llevó a cabo con el kit Master Mix[®] (5 PRIME). Para la amplificación se utilizaron las siguientes condiciones: 1 ciclo a 95 °C, 5 minutos; 30 ciclos de: 1 minuto a 95 °C, 45 segundos a 60 °C y 45 segundos a 72 °C; y finalmente 1 ciclo a 72 °C, 10 minutos.

3. ESTUDIO DEL FLUJO DE AUTOFAGIA *IN VIVO*

Para el análisis de la autofagia *in vivo*, se utilizaron los ratones transgénicos GFP-LC3 adultos a los que se les bloqueó la actividad lisosomal mediante la inyección intraperitoneal de leupeptina (L2884, Sigma) a una dosis de 40 mg/Kg de peso corporal en suero salino. Los animales control fueron inyectados intraperitonealmente con un volumen equivalente de solución salina. Para la inducción de autofagia, se mantuvieron un grupo de ratones en ayuno durante 24h, inyectando la leupeptina las 4 últimas horas. A continuación, se sacrificaron los animales y se aislaron los tejidos (retina y cerebelo), que se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento por western blot como se describe en el apartado 13. El cerebelo de ratones adultos se extrajo mediante la inserción de unas tijeras quirúrgicas pequeñas y un corte, primero lateralmente y luego en sentido anterior a través de cada oreja hacia la línea media. El cráneo fue cuidadosamente levantado hacia arriba y pelado para exponer el cerebro posterior. El cerebelo se extrajo utilizando unas tijeras curvas y la mitad del tejido se almacenó a -80 °C para la extracción de la proteína y la otra mitad se fijó con PFA al 4% para criosecciones. Los ojos se extrajeron como se describe en el apartado 1 y para el análisis de fluorescencia se procesaron los ojos como se describe en el apartado 8.

4. CULTIVOS ORGANOTÍPICOS DE RETINAS

Las retinas embrionarias de ratón fueron cultivadas durante 6h en medio DMEM:HAM/F12 (Gibco, 42400) suplementado con bicarbonato sódico 10 mM (Sigma, S7561), piruvato 1.1 mg/L (Sigma, P2256), apotransferrina 100 mg/L (Sigma-T2252), selenito sódico 0.0052 mg/mL (Sigma-S5261), putrescina 0.32 mg/L (Sigma-

P5780), progesterona 0.2 mg/L (Sigma-P8783) y con gentamicina 0.05 g/L (Gibco, 15710) y se ajustó hasta un pH de 7.14. En el momento del cultivo se suplementó el medio con glutamina a 2 mM (Gibco, 25030) e insulina humana recombinante (Sigma, I2643). Salvo que se indique, la concentración general de insulina utilizada fue de 10 nM. En aquellos experimentos donde se indica, se utilizaron distintas concentraciones de insulina: insulina alta (160 nM), insulina baja (10 nM) o en ausencia de insulina.

Los tratamientos utilizados en este estudio se presentan en la tabla 5.

Tratamiento	Casa comercial	Referencia	Concentración	Función
3-metil-adenina	Sigma	M9281	10 mM	Inhibidor de autofagia
Wortmanina	Calbiochem	681675	10, 50 y 100 nM	Inhibidor de autofagia
LY294002	Calbiochem	440202	100 µM	Inhibidor de PI3K
Hidroxiclороquina	Laboratorios Rubió	880872.4	30 µg/mL	Inhibidor de la degradación lisosomal
Metil-piruvato	Sigma	371173	10 mM	Suplemento metabólico
EBSS	Sigma	E2888		Inductor de autofagia
Rapamicina	Euromedex	R-5000	200 nM	Inductor de autofagia
AZD 8055	Axon	1561	1 µM	Inductor de autofagia
Ciclosporina A	Sigma	30024	5 µM	Inhibidor de mitofagia
Antimicina A	Sigma	A8674	10 µM	Inhibidor del complejo III mitocondrial
Oligomicina	Sigma	O4876-25mg	1 µM	Inhibidor del complejo I mitocondrial
3-PO	Millipore	525330	10 µM	Inhibidor de PFKFB3 (glucólisis)
2-Deoxi-glucosa	Sigma	D8375	10 nM	Inhibidor de Hexokinasa (glucólisis)
Deferoxamina	Sigma	D9533-1G	1 mM	Inductor de hipoxia
FM19G11	Sigma	F8807	1 µM	Inhibidor de hipoxia
Boc-D-FMK	Calbiochem	218575	25 µM	Inhibidor de caspasa3
U0126	Calbiochem	662005	50 µM	Inhibidor de

Tabla 5. Lista de reactivos empleados en los cultivos organotípicos de retinas.

Para el estudio de autofagia en embriones de ratones GFP-LC3 *ex vivo*, se cultivaron las retinas y ojos en EBSS durante 6h y para bloquear la degradación lisosomal, se añadió hidroxiclороquina durante las 3 últimas horas del cultivo. Para los western blot de flujo de autofagia de retinas en diferentes estadios, se realizaron cultivos durante 3h en presencia de hidroxiclороquina.

La 3-metil-adenina se preparó fresca para cada cultivo a 10 mM en medio de cultivo y se mantuvo en un baño a 37 °C hasta su completa disolución.

En los cultivos con metil-piruvato, se suplementó el medio con 1.2 g/L de bicarbonato sódico para tamponar la disminución del pH generada por este compuesto.

5. MONTAJE EN PLANO DE RETINAS EMBRIONARIAS

Tras el cultivo, la retina neural se montó bajo la lupa sobre una membrana de 0,44 µm de poro de nitrocelulosa (Sartorius). Las retinas se colocaron con la capa de células ganglionares hacia arriba, adhiriéndose a la nitrocelulosa con ayuda de unas pinzas finas de disección. Posteriormente se fijaron con PFA al 4% (p/v) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 durante al menos 12 horas a 4 °C en placas de 24 pocillos. Finalmente se lavaron con PBS 1x y se mantuvieron en PBS 1x con azida sódica al 0,001% a 4 °C hasta el momento del procesamiento por inmunofluorescencia.

6. INMUNOFLUORESCENCIA DE RETINAS EN PLANO

Para la detección de epítomos nucleares como el factor de transcripción Brn3a, se trataron las retinas con tampón citrato a pH 6 durante 5 minutos en el microondas, tras lo que se lavó 3 veces con PBS 1x. A continuación se procedió a la permeabilización sobre las retinas montadas en plano, lavando 3 veces con una solución de BGT (BSA 3 mg/mL, glicina al 10 mM y Tritón X-100 al 0,25% en PBS) y posteriormente con Tritón X-100 al 1% (p/v) en PBS 1x (3 veces, 30 minutos cada vez). Se eliminaron los restos de Tritón X-100 lavando bien con PBS y posteriormente se incubó con la solución de bloqueo (NGS 10% y Tritón X-100 al 1% en PBS 1x) durante 30 minutos en cámara húmeda. A continuación, se incubaron las retinas con los anticuerpos primarios en cámara húmeda a 4 °C toda la noche en la solución de bloqueo. Los anticuerpos primarios utilizados se presentan en la tabla 6.

Anticuerpo 1°	Casa comercial	Referencia	Especie	Dilución
TOMM20	Santa Cruz	sc-11415	Conejo	1/100
COX-IV	Invitrogen	459600	Ratón	1/100
Brn3a	Millipore	MAB1585	Ratón	1/50
β-III-tubulina	Covance	MMS-435P	Ratón	1/500
Caspasa3a	Cell Signaling	96615	Conejo	1/100

Tabla 6. Lista de anticuerpos empleados en inmunofluorescencia de retinas en plano.

La incubación con los correspondientes anticuerpos secundarios anti IgG de ratón, de conejo o estreptavidina conjugados con Alexa 568 o 647 (1/200, Invitrogen) se realizó durante 1 hora a temperatura ambiente, en cámara húmeda y oscuridad, también en solución de bloqueo (NGS). Tras los correspondientes lavados con PBS, las retinas se montaron con una mezcla de glicerol 70% en agua con 4% de 1,4-diazabicyclo-(2,2,2)-octano (DABCO, Sigma) conteniendo 1µg/mL de 1,4-diamino-2-fenilindol (DAPI), para marcar los núcleos.

Además, se realizaron otra serie de marcajes, entre los que se incluyen el marcaje con LysoTracker Red (LTR) (1 µM; Invitrogen) durante los 15 últimos minutos del cultivo a 37 °C, para detectar fagosomas ácidos; y el marcaje con lectina de tomate (TL)- Biotina (1/100; Sigma) durante 2h a 37 °C en NGS una vez fijadas con PFA 4%, para detectar la microglía.

7. DETECCIÓN DE LA MUERTE CELULAR

La muerte celular se moduló mediante la adición del inhibidor general de caspasas *Caspase inhibitor III* (BOC) (Calbiochem). La detección se llevó a cabo mediante diferentes procedimientos, como inmunofluorescencia de caspasa 3 activa (como se ha descrito en el apartado 5), reacción de TUNEL y detección de la translocación de fosfatidil-serina (PS) en la superficie de las células apoptóticas. Además, la tinción con DAPI permitió corroborar y diferenciar los núcleos condensados típicos del proceso apoptótico.

En la técnica de TUNEL (del inglés, *TdT-mediated dUTP Nick End Labelling*), la enzima transferasa terminal (TdT) añade nucleótidos (dUTP) marcados con fluoresceína a los extremos 3'OH libres del DNA, lo que permite detectar la fragmentación del DNA que se produce durante la muerte celular programada. El *kit* de TUNEL empleado fue DeadEnd™ Fluorometric TUNEL System (Promega, G3250). La reacción de TUNEL siempre se llevó a cabo en combinación con inmunofluorescencia para la detección de proteínas, por lo que el procesamiento de las retinas fue el mismo que en el apartado 5, aplicándose la reacción tras la incubación con los anticuerpos primarios una vez realizados lavados con PBS 1x para eliminar los restos de anticuerpo. Previamente se realizó una incubación con la solución del kit durante 30 minutos a temperatura ambiente. Se preparó la mezcla de reacción según las instrucciones del fabricante: 88 % de tampón de TUNEL, 9,8 % de dNTPs marcados

con FITC y 1,9 % de TdT y se aplicó durante 1 hora a 37 °C en oscuridad. Posteriormente, se paró la reacción con la solución SSC durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual las retinas se lavaron con PBS 1x y se procedió con la incubación con los anticuerpos secundarios como se ha descrito en el apartado 5.

Para la detección de la translocación del fosfolípido fosfatidil-serina (PS) a la superficie externa de la membrana de células apoptóticas se utilizó Anexina-V biotinilada (Chemicon). Se añadió Anexina-V al 5% en el medio de cultivo en presencia de 5 % de tampón con calcio y se incubó durante los últimos 30 minutos de cultivo a 37 °C en las retinas montadas en plano. Posteriormente las retinas se fijaron en PFA al 4% (p/v) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 y 2,5 % de tampón de calcio durante al menos 3 horas a 4 °C en placas de 24 pocillos. Tras ello, las retinas se lavaron en PBS 1x y se mantuvieron a 4 °C hasta su procesamiento. La detección posterior se realizó mediante el protocolo de inmunofluorescencia descrito en el apartado 5, utilizando como anticuerpo secundario una estreptavidina conjugada con el fluoróforo Alexa 568 o 647 (Invitrogen) 1/200 en 10% de NGS y 1% de Tritón-X 100 en PBS 1x. Cuando el experimento requirió la combinación con la técnica de TUNEL, la reacción del TUNEL se llevó a cabo antes de la conjugación con estreptavidina-Alexa 568 o 647. Finalmente, las retinas se lavaron con PBS, se montaron sobre portas con una mezcla de glicerol 70% en agua con 4% de DABCO conteniendo 1 µg/mL DAPI.

8. PREPARACIÓN DE SECCIONES DE OJO PARA INMUNOFLUORESCENCIA

Los ojos de ratones adultos o de embriones *in vivo* o tras cultivo de 6h se fijaron al menos durante 1 hora en PFA al 4% (p/v) en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4, se lavaron 3 veces con PBS 1x y se incluyeron en una solución de sacarosa al 15 % en PBS 1x (w/v) durante al menos 12 horas. Posteriormente se pasaron a una solución de sacarosa al 30% en PBS 1x (p/v), donde se mantuvieron una semana para su correcta crioprotección y se preservaron a -80 °C hasta su utilización. Tras ello, los ojos fueron embebidos en OCT (Tissue Tek, Sakura Finetek), en el interior de la tapa de un tubo *ependorf* de 1,5 mL. Sobre estas muestras se realizaron cortes de 12 µm en un criostato Leica CM 1950 sobre portaobjetos tratados (Superfrost[®] Plus, Thermo Scientific). Los portaobjetos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente a 60 °C durante otros 30 minutos, para favorecer la adhesión de los

especímenes. A continuación, los cortes se refijaron durante 15 minutos con PFA 4% en PBS 1x. Tras ello se permeabilizaron tratándolos con BGT 3 veces y se bloquearon con NGS durante 1 hora, antes de la incubación con los anticuerpos primarios y secundario tal y como se ha descrito en el apartado 5. Este procedimiento también se utilizó para la visualización de las secciones de ojos de ratones GFP-LC3 *in vivo*. Los anticuerpos utilizados en secciones de ojo se presentan en la tabla 7.

Anticuerpo 1º	Casa comercial	Referencia	Especie	Dilución
TOMM20	Santa Cruz	sc-11415	Conejo	1/100
β -III-tubulina	Covance	MMS-435P	Ratón	1/500

Tabla 7. Lista de anticuerpos utilizados en secciones de ojo.

9. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y CONFOCAL

Las inmunofluorescencias realizadas en retinas en plano y secciones de ojo, así como la detección de muerte celular se visualizaron con un microscopio Confocal Leica SP5 (Leica Microsystems GmbH). Las imágenes mostradas en esta Tesis Doctoral corresponden a la proyección máxima del grosor total de la retina o sección obtenida de secciones ópticas de 1 μ m, en el caso de los cortes de ojo, y de 2 μ m para las retinas montadas en plano.

Las cuantificaciones de las células positivas para TUNEL, caspasa3a, LTR, Anexina-V y Brn3a se realizaron mediante el programa ImageJ 1.44 p. La cuantificación automática del área cubierta por masa mitocondrial (detectada mediante inmunofluorescencia de TOMM20) se determinó con el mismo programa, para lo que las proyecciones máximas se transformaron en imágenes de 16 bit y se estableció un umbral mínimo de detección común para todas las imágenes.

En la figura 2 se muestra una imagen representativa para cada una de las tinciones realizadas en retinas montadas en plano:

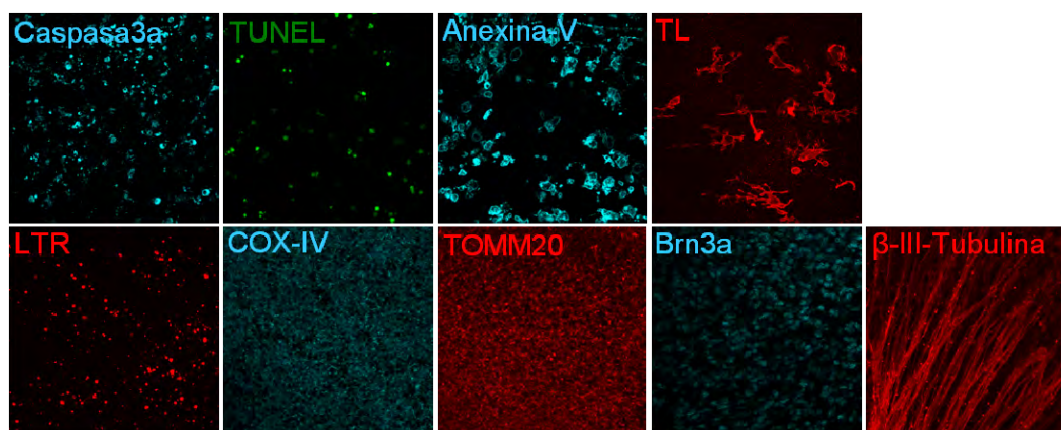


Figura 2. Imágenes representativas de las tinciones realizadas y obtenidas mediante microscopía confocal.

10. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Para la microscopía electrónica, se utilizaron ojos aislados *in vivo* o tras un cultivo de 4h con HCQ de embriones CD1 a E15.5. La fijación se realizó durante 4h a 4 °C en PFA al 4 % (w/v) con glutaraldehído al 2.5 % (v/v). Después, se lavaron y fueron fijados de nuevo en tetróxido de osmio al 5 % (w/v), ferricianida de potasio al 1 %, se deshidrataron con concentraciones crecientes de acetona y se trataron 3 veces de 10 minutos con óxido de propileno. Posteriormente se embebieron en resina Epon (EMS). La resina se polimerizó en un horno a 50 °C. A continuación, se realizaron secciones ultrafinas (50nm) en un ultramicrotomo (Vitracut E, Reichert-Jung) y se tiñeron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Este procesamiento se realizó en el servicio de microscopía electrónica del Centro de Investigaciones Biológicas. La microscopía electrónica se realizó en un microscopio de transmisión Zeiss EM 902, a 90 kV. La cuantificación del número de mitocondrias se realizó mediante el programa ImageJ 1.44 p, para lo que se cuantificaron 14 imágenes diferentes por región de retina (capa de neuroblastos y capa de células ganglionares) a una escala de 7000 nm.

11. DISOCIACIÓN DE RETINAS Y CITOMETRÍA DE FLUJO

Para el procesamiento por citometría de flujo, las retinas aisladas *in vivo* o tras un cultivo se incubaron con tripsina 0.5 mg/mL (Worthington, LS003703) en HBSS (Gibco, 14170-088) durante 5 minutos a 37 °C, tras los cuales se disociaron mediante pipeteo. La digestión mediada por tripsina se bloqueó mediante la adición de suero fetal

bovino al 10% (FBS) y las células fueron centrifugadas a 1.200 r.p.m. durante 5 minutos. A continuación, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 300 μ L de HBSS (Gibco, 14170-088) conteniendo la sonda correspondiente: MitoTracker Deep Red (MtdR) (M22426, Invitrogen) 10 nM, DHE (D1168, Invitrogen) 5 μ M, Dioc (3,3'-Dihexyloxacarboyanine Iodide) (D273-100mg, Invitrogen) 40 nM. Todas las incubaciones se realizaron durante 10 minutos a 37 °C, tras los cuales se procesaron las muestras en un citómetro FC500 (Beckman Coulter), adquiriéndose 10.000 células por muestra en los canales FL1 (Deval et al), FL3 (DHE) y FL4 (MtdR). El procesamiento de retinas GFP-LC3 se realizó de igual manera en el canal FL1. Para el análisis de los datos, se determinó la intensidad media de fluorescencia (Vivas et al) de la población viable (determinada en los canales FSC y SSC) y se normalizó frente al valor de las células no tratadas. Este análisis así como los histogramas representativos de los valores se realizaron con el programa *CXP Analysis*. En la figura 3 se muestra un ejemplo de la adquisición de los valores de la citometría realizada a partir de retinas disociadas.

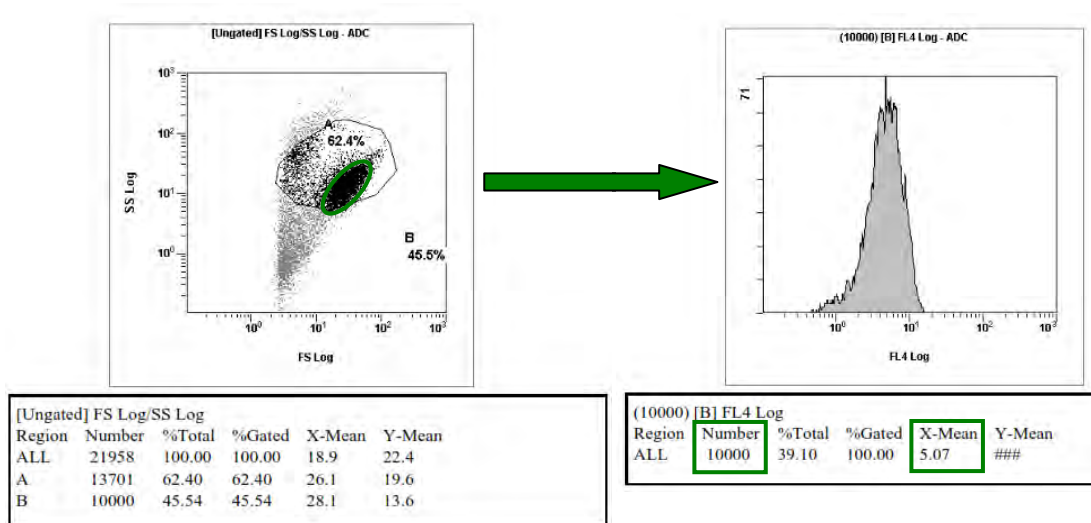


Figura 3. Esquema representativo de la población celular analizada (izquierda) e histograma resultante de la fluorescencia en dicha población (derecha). En verde está señalada la población de interés, así como el número de células adquiridas y el valor analizado.

12. ESTUDIO TRANSCRIPTÓMICO Y DETECCIÓN DE RNA MENSAJERO

El análisis de expresión génica a lo largo del desarrollo de la retina se realizó mediante un estudio transcriptómico y qRT-PCR. La extracción de RNA en ambos casos se llevó a cabo mediante el reactivo Trizol[®] (Fisher, 15596-018) como previamente se ha descrito para el genotipaje de embriones de Ambra1, pero ajustando los volúmenes como se muestra en la tabla 8.

Reactivo	V (µL) Embrión	V (µL) Adulto
Trizol	500	1000
Cloroformo	100	200
Isopropanol	250	500
EtOH 70%	500	1000
H ₂ O RNAsa free	12	12-20

Tabla 8. Volúmenes de los reactivos empleados para la extracción de RNA de retinas embrionarias y adultas.

Para el estudio transcriptómico se utilizaron grupos de retinas (de media 24 retinas/estadio) de todos los embriones de una ratona gestante para cada estadio: E12.5, E13.5, E14.5, E15.5 y E18.5; y grupos de 4 retinas para cada estadio postnatal: P0, P9, P15, P30 y P90. Las qRT-PCR se realizaron a partir de RNAs de grupos de 6 retinas por punto para los estadios E12.5, E13.5, E14.5, E15.5, E16.5, E18.5 y de 3 retinas por punto para los estadios P0, P9, P15, P30 y P90. Para las qRT-PCR de retinas deficientes de Atg5 o LAMP-2A, se realizaron grupos de 2 retinas por punto. En el caso de las qRT-PCR realizadas a partir de retinas tras cultivos organotípicos, se realizaron grupos de 2 retinas de E15.5 por punto.

La homogeneización se realizó con una aguja de 0.8 mm x 25 mm acoplada a una jeringa de 1mL, seguida de una disgregación con aguja de 0.5 mm x 16 mm, unas 5-10 veces. Además, antes de añadir el isopropanol, se añadió 1 µL en retinas adultas y 0.5 µL en retinas embrionarias de glucógeno (Fisher, 10814010), para ayudar a precipitar el RNA.

La reacción de transcripción reversa (RT) de mRNA se realizó a partir de 1 µg de RNA total mediante el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA) en un volumen total de 13.2 µL, según las instrucciones del fabricante. A cada reacción de RT se añadieron 6.8 µL de la mezcla de los siguientes reactivos del kit: 2 µL del buffer 10x, 2 µL de Random Primers 10x, 0.8

μ L de 25x dNTP Mix (100mM), 1 μ L *MultiScribe® Reverse Transcriptase* (50 U/ μ L) y 1 μ L de inhibidor de RNAsa (20 U/ μ L). Se pipeteó bien la mezcla y se llevó a cabo la reacción en termociclador con el siguiente programa: 25 °C durante 10 minutos, 37 °C durante 120 minutos, 85 °C durante 5 minutos y 4 °C como paso final.

La reacción de PCR a tiempo real se llevó a cabo en el termociclador *Light Cycler® 480 Instrument* (Roche, Mannheim, Alemania) mediante la Taq polimerasa (*Taqman Universal PCR Master Mix* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)). La amplificación de L2A se ha empleado la biblioteca *Universal Human Probe Roche library* (Roche Diagnostics). Los ensayos se realizaron por duplicado y los resultados fueron normalizados a la expresión de los niveles de RNA de 18S. Los resultados fueron expresados utilizando el método de cuantificación $\Delta\Delta$ CT (*cycle threshold*). Los cebadores empleados para RT-PCR se muestran en la tabla 9.

Gen	Referencia Taqman
Ulk1	Mm00437238_m1
Ulk2	Mm00497023_m1
Maplc3a	Mm00458725_g1
Maplc3b	Mm00782868_sH
Beclina1	Mm01265461_m1
Ambra1	Mm00554370_m1
Atg7	Mm00504340_m1
Atg5	Mm00512209_m1
Tfam	Mm00447485_m1
Ppargc1 α	Mm01208835_m1
Pfkfb3	Mm00504650_m1
Hk2	Mm00443385_m1
Pkm	Mm00834102_gH
Gapdh	Mm99999915_g1
Slc2a1	Mm00441480_m1
Pink1	Mm00550827_m1
Parkina	Mm00450187_m1
Fundc1	Mm00511132_m1
Optineurina	Mm01333245_m1
Rnf185	Mm00460976_m1
Bnip3l	Mm00786306_s1
Smurf1	Mm00547102_m1
Nrf1	Mm01135606_m1
Sirt1	Mm00490758_m1
Tfeb	Mm00448968_m1
Foxo3	Mm01185722_m1
18S	Hs99999901_s1

Tabla 9. Lista de sondas y referencias empleadas para RT-PCR.

El estudio transcriptómico se llevó a cabo en el servicio de secuenciación y la unidad de bioinformática del CNIO (Osvaldo Graña). Se utilizó 1 µg de RNA total para cada estadio con un RIN (*RNA integrity number*) dentro del rango 8.6-9.9, determinado mediante el bioanalizador *Agilent 2100 Bioanalyzer*. Las fracciones de PolyA+ fueron procesadas mediante el kit *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation kit* (Agilent). Las bibliotecas de cDNA resultantes se secuenciaron para 50 bases en un formato de lectura único (Illumina HiSeq 2000) y analizadas con *Nextpresso*, una fuente de cálculo computacional que lleva a cabo un análisis completo y automático. Se utilizó una tasa de valores falsos (*False discovery rate* (FDR)) de 0.05 como umbral de significancia de expresión diferencial. Las figuras de los *heatmap* fueron construidas mediante la plataforma GENE-E (<http://www.broadinstitute.org/cancer/software/GENE-E/index.html>).

13. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOT

Tras la extracción y/o cultivo, las retinas se mantuvieron a -80 °C hasta su procesamiento. La extracción de proteínas se realizó a partir de grupos de retinas para cada punto en el caso de los estadios embrionarios, y a partir de una retina en los estadios postnatales, en los volúmenes de tampón de lisis indicados en la tabla 10.

estadio	Nº retinas/punto	V de extracción (µL)
E12.5	4	50
E13.5	3	50
E14.5	3	50
E15.5	3	75
E18.5	3	100
P0	1	150
P9	1	150
P15	1	150
P30	1	150
P90	1	150

Tabla 10. Número de retinas y volumen de tampón utilizado para la extracción de proteínas de cada punto utilizado en western blot.

El tampón de lisis empleado está compuesto por 50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 10 % glicerol (v/v), 2 % SDS (p/v), inhibidores de proteasas (Sigma, P8783) e inhibidores

de fosfatasa (1 mM ortovanadato sódico (S6508), 1 mM fluoruro sódico (201154), y 5 mM fosfato sódico (221368); (todos de Sigma)). Las retinas se homogeneizaron mediante un émbolo en el caso de las retinas postnatales y mediante pipeta en las retinas embrionarias. La extracción de proteínas de cerebelo se realizó en 500 μ L de tampón de lisis mediante émbolo. Posteriormente, las muestras se calentaron durante 10 minutos a 95 °C para facilitar la desnaturalización de las proteínas y se guardaron a -20 °C. La cuantificación de proteínas se determinó mediante el kit *Pierce BCA Protein Assay Kit* (Pierce Thermo Fisher Scientific, 23227) realizando un patrón con BSA de concentración conocida y midiendo la longitud de onda a 540 nm. Se cargaron 15 μ g del extracto total junto con 10 mM de DTT y 0,005 % de azul de bromofenol en geles *Any kD Criterion TGX Precast Gels* (BioRad, 567–1124) y se transfirieron a membranas de PVDF (BioRad, 170–4157) durante 14 minutos a 25 V utilizando el sistema de transferencia *Trans-Blot Turbo Transfer* (BioRad). Tras la transferencia, las membranas fueron activadas con metanol al 100 % durante 2 minutos y bloqueadas con leche desnatada al 5 % en PBS-T (PBS 1X, 0.5 % Tween 20 (v/v)) durante 1h a temperatura ambiente. Tras lavar con PBS-T, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios en BSA 3 % en PBS-T durante al menos 12h a 4 °C y en agitación. (Tabla 11).

Anticuerpo 1°	Casa comercial	Referencia	Especie	Dilución
LC3	Sigma	L7543	Conejo	1/1000
Atg12-Atg5	MBL	PM050	Conejo	1/1000
pAkt (thr308)	Cell Signaling	9275	Conejo	1/1000
Akt	Santa Cruz	sc-1618	Cabra	1/1000
pS6	Cell Signaling	4856	Conejo	1/1000
S6	Cell Signaling	2317	Ratón	1/1000
COX4/1	Invitrogen	459600	Ratón	1/1000
TOMM40	Santa Cruz	sc-11414	Conejo	1/1000
TOMM20	Santa Cruz	sc-17764	Ratón	1/1000
TIMM23	BD Biosciences	611222	Ratón	1/1000
PCNA	Delta Biolabs	DB051	Conejo	1/1000
β -III-tubulina	Covance	MMS-435P	Ratón	1/1000
Recoverina	Santa Cruz	sc-28849	Conejo	1/1000
GFAP	Dako	Z0334	Conejo	1/1000
GAPDH	Abcam	ab8245	Ratón	1/1000
Tubulina	Santa Cruz	sc-8035	Ratón	1/1000
β -actina	Sigma	A5441	Ratón	1/2000

Tabla 11. Lista de anticuerpos primarios empleados para la detección de proteínas mediante western blot.

Tras sucesivos lavados con PBS-T, se incubaron las membranas durante 1h a temperatura ambiente con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa a una dilución 1/2000 (DAKO P0448 Conejo; Thermo Scientific 31430 Ratón). Las membranas fueron reveladas con el sistema *Pierce ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific, 32106) y exponiéndolas a películas *Curix RP2 Plus film* (AGFA).

14. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ATP

La medición de los niveles de ATP se realizó utilizando el kit ATP Bioluminiscent Assay Kit HS II (Roche-11699709001) a partir de retinas embrionarias *Atg5^{+/+}* y *Atg5^{-/-}* *in vivo* a E13.5, de retinas de embriones CD1 *in vivo* a E13.5 y E18.5 y de retinas de embriones CD1 a E13.5 cultivadas durante 6h con 3-MA y WM (ambas en ausencia y presencia de MP), en ausencia de insulina, con rapamicina y EBSS. Los cultivos se realizaron como previamente he descrito en el apartado 4, tras los cuales las retinas se congelaron a -80 °C hasta su procesamiento. Las retinas se extrajeron en un volumen final de 50 µL de la mezcla del buffer de dilución y buffer de lisis del kit. Tras 5 minutos de incubación a temperatura ambiente, se centrifugaron a 10000g durante 1 minuto a 4 °C. Se reservaron 10 µL del extracto para la cuantificación de proteína total mediante BCA y se midió el ATP correspondiente a una concentración de proteína de 100 ng en 50 µL. La medición de ATP se realizó mediante la reacción lumínica producto de la reacción de la luciferina en presencia de la enzima luciferasa con ATP y O₂. Para ello se añadió 50 µL de una solución de luciferasa y luciferina del kit. La curva patrón se realizó con 50 µL de concentraciones de ATP conocidas, en presencia de 50 µL de luciferasa y luciferina. Las mediciones se llevaron a cabo mediante un lector de placas Varioskan.

15. ANÁLISIS METABÓLICO

El análisis metabólico se realizó mediante espectrometría de masas y Seahorse. Los estudios de metabolómica permiten la examinación e identificación de productos de reacciones bioquímicas endógenas, revelando información sobre las vías metabólicas que tienen lugar en las muestras procesadas. Para la espectrometría de masas se utilizaron grupos de retinas (de media 24 retinas/estadio) de todos los embriones de una ratona gestante para cada estadio: E12.5, E13.5, E15.5, E18.5 y P0. Cada muestra se

pesó antes del procesamiento para la normalización posterior de los datos. La técnica se llevó a cabo en el servicio de metabolómica *Metabolomics and molecular cell biology platforms, Gustave Roussy*, mediante una colaboración con el grupo de Guido Kroemer (*Equipe 11 labellisée par la Ligue Nationale contre le cancer, INSERM U1138, Centre de Recherche des Cordeliers, 75006 Paris, France; Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité*).

El fenotipo energético de las retinas se determinó mediante Seahorse XF-24 (Seahorse Bioscience). Esta prueba mide la utilización de respiración mitocondrial y/o los niveles de lactato en condiciones basales y tras la inyección de diferentes compuestos para modular el metabolismo. El estudio se llevó a cabo a partir de retinas en distintos estadios simultáneamente en la misma placa: E13.5, E14.5, E15.5, P0 y adulto. Tras la disección, las retinas se montaron en plano en membranas de nitrocelulosa. Se utilizaron grupos de 4 retinas para las edades de E13.5 y E14.5, grupos de 2 retinas para E15.5 y 1 retina por punto para P0 y adulto. Una vez en la membrana, las retinas colocaron en placas de 24 pocillos específicas (*Seahorse XF24 islet caputre microplate*) con medio de cultivo para seahorse (DMEM no tamponado (Sigma, D0547) suplementado como en el apartado 3 pero sin bicarbonato sódico). A continuación, se realizó un perfil farmacológico clásico de BOFA, mediante la combinación de cuatro inhibidores mitocondriales (oligomicina, FCCP y rotenona+antimicina A) y el analizador seahorse como previamente ha sido descrito por Qian y Van Houten (Qian, 2010).

El OCR basal (medición de fosforilación oxidativa) es la cantidad de consumo de oxígeno que está ligada a la síntesis de ATP en la mitocondria. La oligomicina inhibe la ATP sintasa mitocondrial mediante su unión a la subunidad F_0 de la ATP sintasa. Esa unión bloquea la conductancia de protones resultando en la pérdida de transferencia de electrones y consumo de oxígeno. El FCCP es un desacoplante mitocondrial que disipa el gradiente de protones, y por lo tanto desacopla la cadena de transporte de electrones y la respiración mitocondrial de la síntesis de ATP. El tratamiento con FCCP incrementa el consumo de oxígeno a su máximo nivel. La diferencia entre el valor de OCR para FCCP y basal es una buena medida de la capacidad respiratoria. La rotenona es un inhibidor mitocondrial que previene la transferencia de electrones desde el complejo I mitocondrial a la ubiquinona mediante el bloqueo del sitio de unión de la ubiquinona. La antimicina A inhibe el complejo III mitocondrial bloqueando así la respiración. En la figura 4 se muestra el perfil clásico de OCR tras la realización de un BOFA.

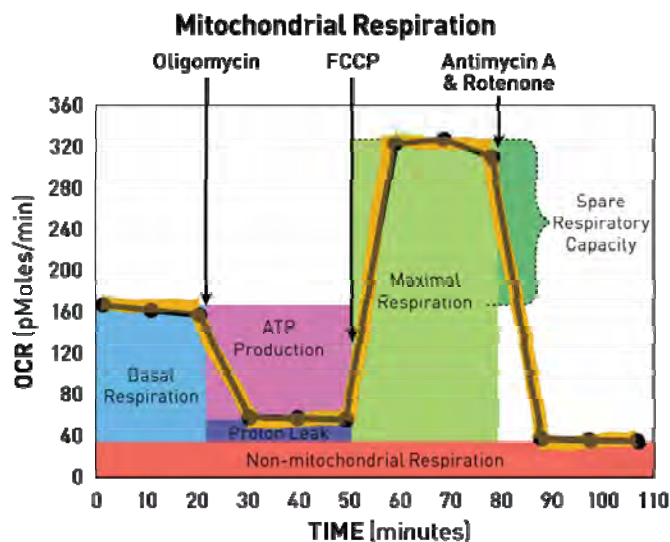


Figura 4. Perfil clásico de OCR tras un estudio de BOFA. (Modificado de Seahorse Bioscience).

Las dosis empleadas de cada compuesto para el estudio de BOFA fueron las siguientes: 1 μ M oligomicina, 0,6 μ M *fluorocarbonyl cyanide phenylhydrazone* (FCCP), y 1 μ M rotenona+1 μ M antimicina A (Sigma- Aldrich).

Para la medición de la acidificación del medio extracelular como consecuencia de la producción de lactato (ECAR) solo se consideraron los valores basales.

El estudio de la función glicolítica en retinas deficientes de LAMP-2A se realizó mediante la medición de ECAR tras la adición de glucosa, para estimular la glicólisis, oligomicina, para bloquear la respiración y ver la respuesta compensatoria en glicólisis, y 2-DG para inhibir la respuesta glicolítica. En la figura 5 se muestra el perfil clásico para este estudio glicolítico:

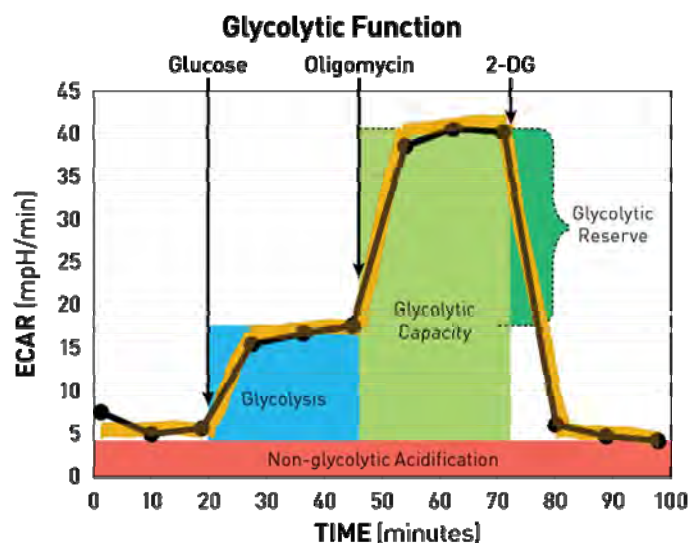


Figura 5. Perfil clásico de ECAR tras un estudio glicolítico. (Modificado de Seahorse Bioscience).

Las dosis empleadas de cada compuesto para el estudio glicolítico fueron las siguientes: 25 mM glucosa, 10 μ M oligomicina, 100 mM 2-DG (Sigma- Aldrich).

16. EXTRACCIÓN Y ESTIMULACIÓN DE MACRÓFAGOS PERITONEALES DE RATÓN

Para la obtención de macrófagos peritoneales, se inyectaron intraperitonealmente ratones CD1 adultos con 1mL de tioglicolato al 4% (w/v). A los 4 días, se sacrificaron los animales por dislocación cervical y se inyectaron con 10mL de PBS estéril frío que posteriormente se aspiró para el lavado peritoneal. Una vez extraídos, los macrófagos se lavaron 2 veces con 10mL de PBS 1x frío para evitar la adhesión de los macrófagos, se contaron, y se resuspendieron 0.5×10^6 células/mL en medio RPMI 1640 (Gibco, 21875-034) suplementado con FBS al 10% y penicilina/streptomina al 1%. Para el análisis de citometría, se sembraron 0.5×10^6 células en placas de 24 pocillos durante 24h en presencia de LPS (100 $\mu\text{g/mL}$, E. coli 055:B5; Sigma-Aldrich) y mIFN-g (20 $\mu\text{g/mL}$, Immunotools, Germany) para la obtención de macrófagos M1, ó con mIL-4 e mIL-13 (20 $\mu\text{g/mL}$, Immunotools, Germany) para la obtención de macrófagos M2. Tras las 24h, se aspiró el medio, se lavó 3 veces con PBS 1x y se cultivaron durante 6h con 3-metiladenina a 10 mM y ciclosporina A 5 μM durante 6h. Posteriormente se tomaron imágenes representativas de la morfología de los macrófagos mediante microscopía de fluorescencia. Para la preparación de las muestras para citometría tras el cultivo, se aspiró el medio, se levantaron los macrófagos con tripsina (Gibco, 25300-054), se paró la tripsina con medio conteniendo 10% de FBS y se centrifugaron las células durante 5 minutos a 1.200 r.p.m. A continuación, se incubaron con Mitotracker Deep Red (M22426, Invitrogen) a 10nM durante 10 minutos a temperatura ambiente. Para el procesamiento se utilizó el citómetro FC500 (Beckman Coulter) y el análisis se realizó con el programa *CXP Analysis*.

17. CULTIVO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Las células madre embrionarias fueron proporcionadas por la Dra. María Salazar del grupo del Dr. Marcos Malumbres (CNIO). Las células madre se mantuvieron en placas de 6 pocillos en medio DMEM, con 10 % de FBS, 1 % de penicilina/streptomina y 1 % de glutamina y se incubaron con CO_2 al 5 %. Se testaron los cultivos para asegurar la ausencia de contaminación por micoplasma. Las células se mantuvieron en estado proliferativo mediante la adición al medio de LIF (*Leukemia inhibitory factor*) y sobre *feeders* (Fibroblastos). Para la obtención de cuerpos

embrioides, se eliminó el medio de la placa y se levantaron las células con tripsina (Gibco, 25300-054) durante 5 minutos a 37 °C. Una vez levantadas, se contaron en una cámara de Neubauer y se sembraron 5.000 células por cada cuerpo embrioide. Los cuerpos embrioides se mantuvieron en la tapa de una placa Petri, con PBS 1x en la base para evitar que se secaran. Los experimentos de citometría se realizaron con 7.5×10^5 células madre y 1 cuerpo embrioide por punto. Para el cultivo de las células en presencia de LIF con 3-metil-adenina y ciclosporina, se eliminó el medio de la placa, se lavó 3 veces con PBS 1x y se añadió el medio con los inhibidores durante 6h, tras las cuales se levantaron las células con tripsina, se centrifugaron 5 minutos a 1.200 r.p.m. y se incubaron con Mitotracker Deep Red durante 10 minutos a 37 °C. Los cuerpos embrioides se pusieron en suspensión con las drogas durante 6h. A continuación, se disociaron con tripsina, se centrifugaron 5 minutos a 1.200 r.p.m. y se incubaron con Mitotracker Deep Red durante 10 minutos a 37 °C. El procesamiento posterior se realizó en un citómetro FC500 (Beckman Coulter) del mismo modo que las retinas.

18. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis de datos presentado en el siguiente trabajo se realizó con el programa estadístico SPSS 17.0. El análisis utilizado para comparar diferentes tratamientos fue el análisis T-Student ó análisis de la varianza (ANOVA) cuando las poblaciones seguían una distribución normal, y test no paramétricos (*Mann–Whitney U-test*) en el resto de los casos. Los datos se presentan como la media de cada población \pm error estándar de al menos tres experimentos independientes diseñados con triplicados. Se estableció como significativo un $p < 0.05$.

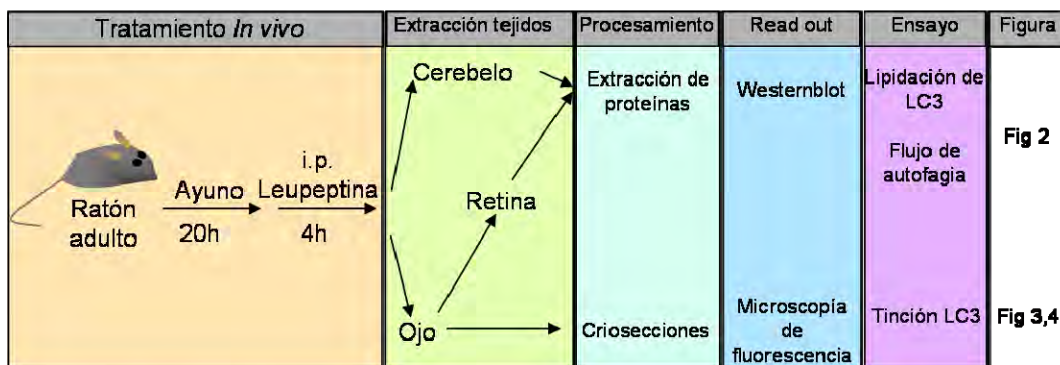
RESULTADOS

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA AUTOFAGIA EN LA RETINA DE RATÓN

Para determinar si la autofagia está activada bajo determinadas circunstancias o estadios de la vida del ratón, es necesario evaluar el flujo de autofagia mediante inhibidores lisosomales, que permite determinar los niveles de formación de autofagosomas en una ventana de tiempo (Klionsky et al, 2012). El diseño experimental llevado a cabo para determinar la autofagia en retina está representado en la figura 1.

A. Determinación de autofagia *in vivo*



B. Determinación de autofagia *ex vivo*

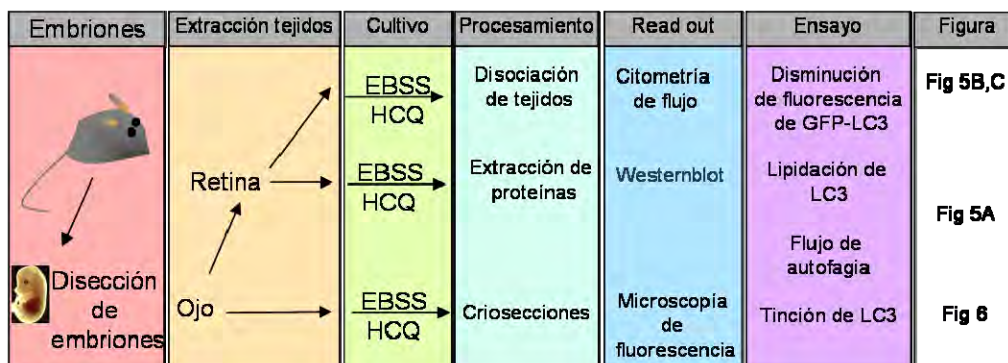


Figura 1. Esquema del diseño experimental empleado para estudiar el proceso de autofagia en retina adulta *in vivo* y embrionaria *ex vivo*.

El estudio de autofagia *in vivo* se llevó a cabo manteniendo a ratones transgénicos GFP-LC3 en ayuno (y con libre acceso a agua) durante 20h tras las cuales se realizó una inyección intraperitoneal con leupeptina, para bloquear la degradación lisosomal. Como se observa en la figura 2A, 4h de leupeptina es suficiente para incrementar los niveles de LC3-II en retinas tanto en condiciones basales como tras la inducción de autofagia por ayuno, por lo que este inhibidor es capaz de atravesar la barrera hematorretiniana e inducir un bloqueo en la actividad lisosomal, revelando la existencia de autofagia basal e inducida en la retina adulta.

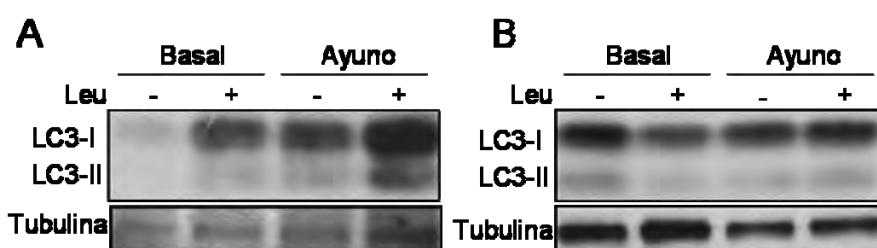


Figura 2. Determinación del flujo de autofagia mediante western blot. **A.** 4h de leupeptina inyectada intraperitonealmente bloquea el flujo basal y tras deprivación de nutrientes durante 24h. **B.** El flujo de autofagia no se bloquea en cerebelo por IP de leupeptina. Se ha empleado la tubulina como control de carga.

Estudios previos utilizando ratones transgénicos GFP-LC3 revelan que el ayuno no es capaz de inducir autofagia en otras regiones del sistema nervioso central como el cerebro (Iwai-Kanai et al, 2008). En la figura 2B podemos observar como efectivamente en cerebelo de los animales de nuestro estudio no hay inducción de autofagia por ayuno ni bloqueo del flujo de autofagia con leupeptina.

Para confirmar los resultados obtenidos por western blot, se determinaron los niveles de LC3 por microscopía de fluorescencia. Como se observa en la figura 3, la leupeptina incrementa los niveles de fluorescencia de GFP-LC3 en todas las capas de la retina, con un fuerte incremento en la capa nuclear externa (ONL) y segmento interno (IS) de los fotorreceptores (Figura 4A). Además, la capa nuclear interna (INL) así como la capa de células ganglionares (RGC layer) también presentan un incremento de la fluorescencia (Figura 3 y 4B, C). El ayuno incrementa la fluorescencia en todas las capas de la retina y el tratamiento combinado con leupeptina incrementa aun más los niveles de LC3. Por lo tanto, la autofagia puede estudiarse en retina *in vivo* en respuesta al ayuno, y más importante, se puede bloquear el flujo de autofagia con tan solo 4h de tratamiento con leupeptina.

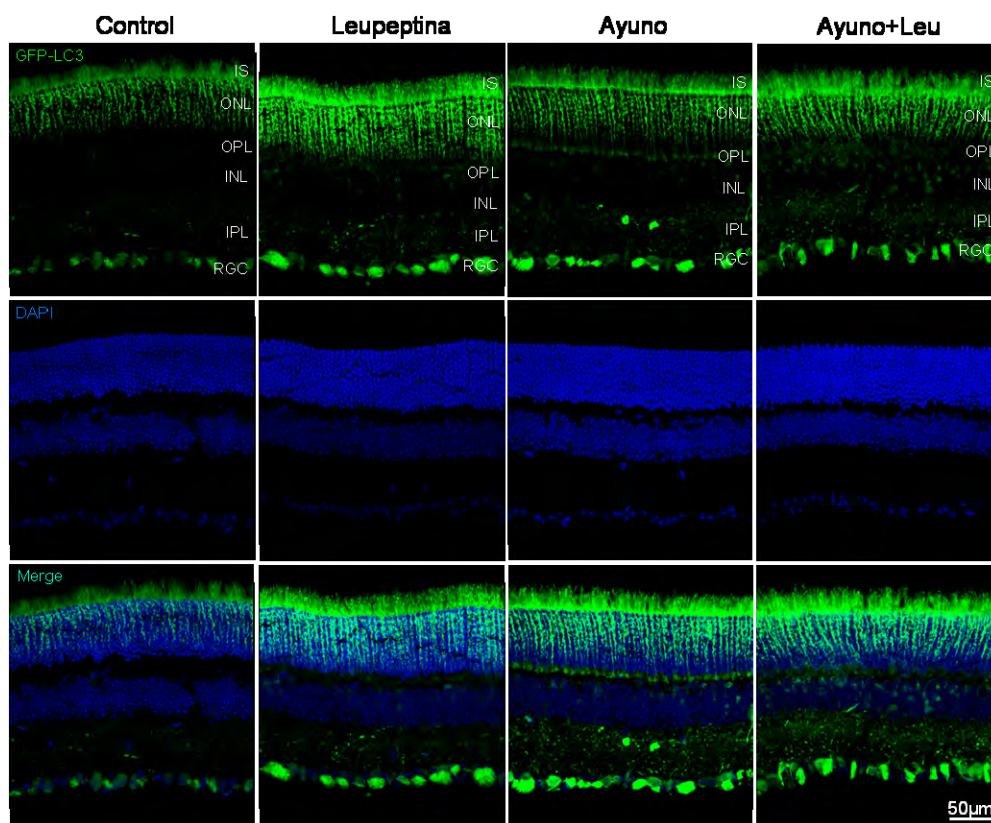


Figura 3. La privación de nutrientes induce flujo de autofagia en ojos de ratones adultos mediante análisis de fluorescencia de GFP-LC3. Ratones transgénicos GFP-LC3 fueron privados de comida durante 24h, inyectados intraperitonealmente con leuceptina para bloquear la degradación lisosomal *in vivo*, y sacrificados 4h después. Las secciones de los ojos de los ratones GFP-LC3 se tiñeron los núcleos con DAPI y se visualizaron mediante microscopía confocal. Barra de escala 50µm. RGCs: células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa; IS: segmento interno.; RPE: epitelio pigmentario.

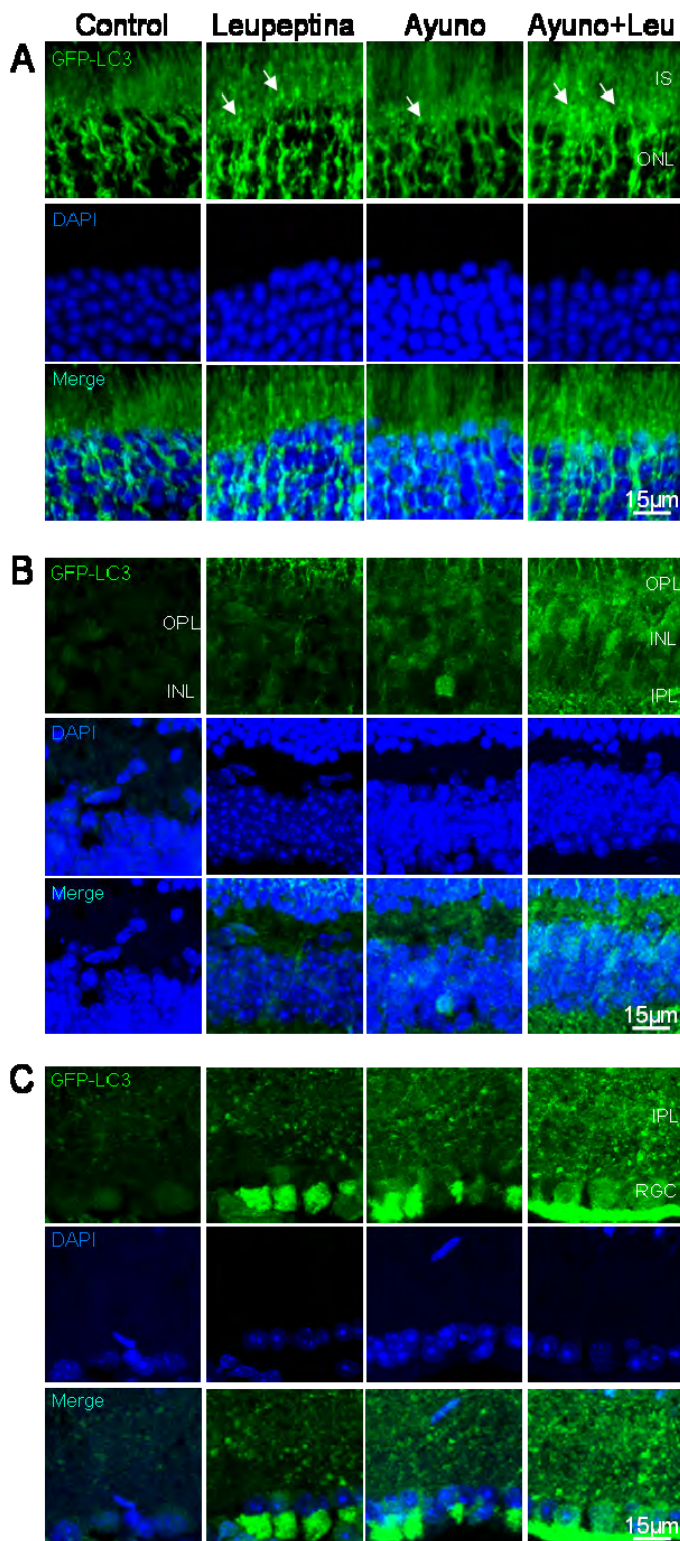


Figura 4. Análisis de fluorescencia de GFP-LC3 en las capas individuales de la retina de ratón adulto. Magnificación de las diferentes capas de la retina de las secciones descritas en la figura 3: **A.** IS y ONL. **B.** INL. **C.** RGCs. Las flechas indican los puntos de LC3. Barra de escala 15µm. RGCs: células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa plexiforme externa; ONL: capa nuclear externa; IS: segmento externo; RPE: epitelio pigmentario.

Una vez confirmado el estudio de autofagia de retina adulta *in vivo*, determinamos si el flujo de autofagia se puede observar también en explantes de retina embrionaria *ex vivo*, para comenzar el estudio embrionario posterior llevado a cabo en esta Tesis Doctoral. Para ello se utilizaron retinas de embriones en estadio E13.5 cultivadas durante 6h en medio control o

EBSS para inducir autofagia, en presencia o ausencia de hidroxiclороquina (HCQ) durante las últimas 3h del cultivo para bloquear la degradación lisosomal. Como se observa en la figura 5A, la inhibición con HCQ incrementa los niveles de LC3-II y el ayuno mediante cultivo con EBSS induce un incremento en dichos niveles, que puede

ser también bloqueado al inhibir la degradación lisosomal (Figura 5A). Estos datos muestran que la autofagia basal e inducida puede ser determinada en explantes de retina mediante western blot. Estos resultados fueron confirmados mediante citometría de flujo, donde el descenso en la fluorescencia refleja la pérdida de la misma debido al pH ácido tras la fusión del autofagosoma con el lisosoma, como ha sido descrito por Shvets *et al* (Shvets *et al*, 2008). El cultivo con EBSS disminuye la fluorescencia de GFP-LC3, que puede bloquearse con HCQ (Figura 5B y C).

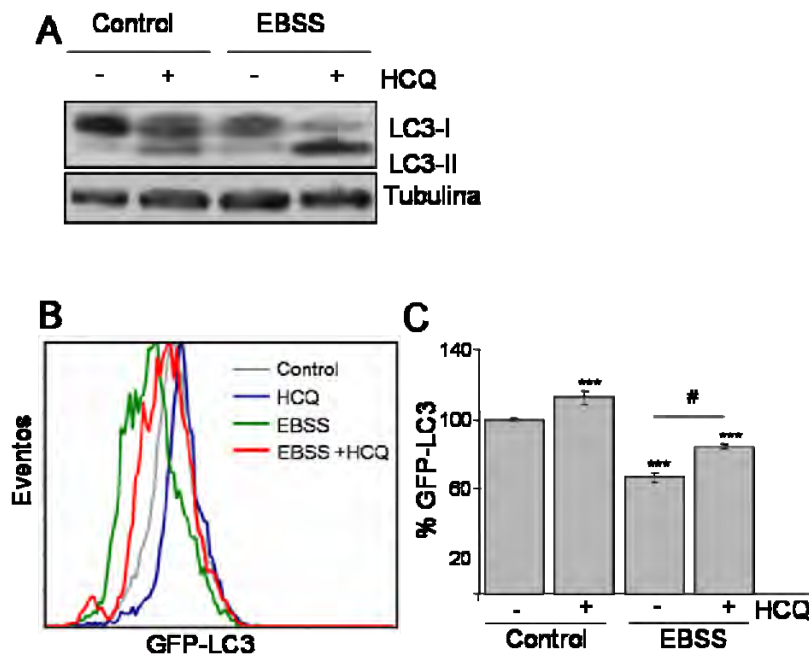


Figura 5. El ayuno de aminoácidos induce flujo de autofagia en explantes de retina embrionaria. A. Western blot de grupos de 3 retinas por tratamiento que muestra el bloqueo del flujo de autofagia mediante cultivo con HCQ en condiciones basales y tras la inducción de autofagia mediante ayuno de aminoácidos. Se ha empleado la tubulina como control de carga. **B.** Histograma representativo de la fluorescencia de GFP unido a LC3 de retinas disociadas cultivadas en las condiciones descritas. **C.** Cuantificación de la fluorescencia de GFP-LC3 mediante citometría de flujo. Los datos representan la media \pm error estándar de al menos 8 retinas de diferentes embriones. *** $p < 0,001$; # $p < 0,05$.

Además, mediante inmunofluorescencia a partir de secciones de ojos GFP-LC3 cultivados bajo las mismas condiciones que las retinas de la figura 5, podemos observar que incluso en ojo completo de un embrión de E13.5, la HCQ incrementa la señal de GFP-LC3 en el neuroepitelio, siendo la región de las células ganglionares la que presenta un mayor incremento (Figura 6). El cultivo con EBSS y EBSS en combinación con HCQ incrementan la fluorescencia de GFP-LC3, lo que revela la presencia de autofagia tanto basal e inducida y confirma los resultados obtenidos *in vivo*.

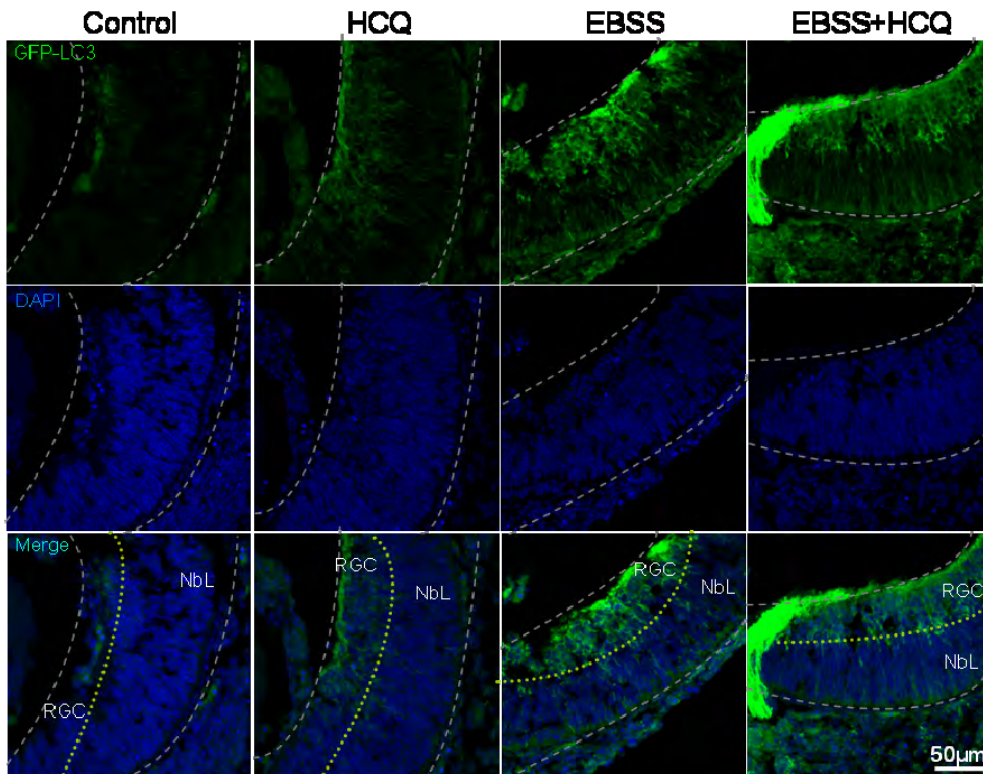


Figura 6. El ayuno de aminoácidos incrementa la fluorescencia de LC3 en ojos embrionarios cultivados *ex vivo*. Ojos a E13.5 de ratones GFP-LC3 cultivados en condiciones control y ayuno de aminoácidos durante 6h en ausencia/presencia de HCQ para bloquear la actividad lisosomal. Barra de escala 50µm.

2. FENOTIPO DE MUERTE CELULAR TRAS EL BLOQUEO DE AUTOFAGIA DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DE RATÓN

Estudios previos de nuestro laboratorio han determinado que la autofagia es funcional en etapas tempranas del desarrollo en la retina de aves y que es necesaria para la correcta eliminación de las células apoptóticas durante la muerte celular del desarrollo (Boya et al, 2008; Mellén et al, 2008). Para determinar si la autofagia es un proceso activo no solo en retinas de aves, se realizó un western blot a partir de retinas de ratón a diferentes estadios embrionarios y postnatales. Observamos un incremento de proteínas reguladoras de autofagia como LC3 y el complejo Atg12-Atg5 a medida que progresa el desarrollo (Figura 7A). Además, se observan cambios en la fosforilación de S6, por lo que mTOR podría regular la autofagia durante el desarrollo de la retina. Estos cambios pueden tener relación con el estado proliferativo de la retina, que se mantiene hasta P0 como se observa mediante el anticuerpo PCNA, o bien con los requerimientos

nutricionales, que son detectados por mTOR (Figura 7A). A nivel de mRNA también se observa un incremento en la expresión de diferentes reguladores de autofagia con el desarrollo (Figura 7B). No obstante, el flujo de autofagia es mayor en las etapas iniciales del desarrollo embrionario, disminuyendo a medida que progresa la diferenciación, detectada con el anticuerpo β -III-tubulina (Figura 7C).

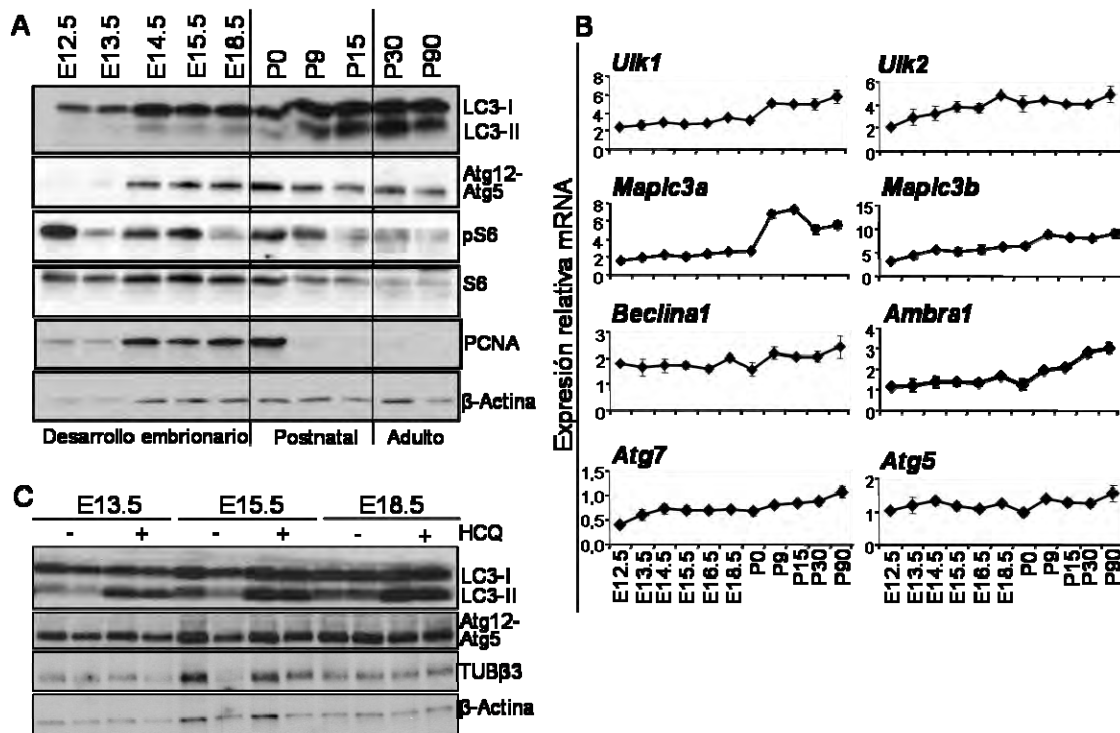


Figura 7. La autofagia es un proceso activo durante el desarrollo de la retina. A. Western blot de retinas de ratón en diferentes estadios embrionarios y postnatales en el que se observa un incremento de proteínas de autofagia con el desarrollo. mTOR podría estar implicado en la regulación de la autofagia en la fisiología de la retina, ya que se observan cambios en la fosforilación de su diana S6. La proliferación se ha detectado mediante anticuerpo frente a PCNA y se ha utilizado β -actina como control de carga. B. Expresión relativa de diferentes genes reguladores de la autofagia en diferentes estadios embrionarios y postnatales. C. El flujo de autofagia, detectado mediante el bloqueo de la degradación lisosomal con HCQ, disminuye con el desarrollo embrionario. La diferenciación neuronal se ha detectado mediante el anticuerpo β -III-tubulina y se ha empleado β -actina como control de carga.

En la presente tesis doctoral he estudiado si al igual que ocurre en retinas de aves, la autofagia también está implicada en la eliminación de células apoptóticas durante la muerte celular asociada al proceso de desarrollo de la retina de ratón. El flujo de autofagia puede ser inhibido en retinas embrionarias de ratón en estadios tempranos del desarrollo (E13.5) tras cultivo de 6h con 3-MA en ausencia/presencia de HCQ (Figura 8A). La inhibición de autofagia con 3-MA en tales condiciones produce un incremento de células TUNEL y caspasa3 activa positivas en una región muy concreta,

la periferia de la retina (Figura 8B-D). En esta región se localiza el frente de diferenciación, que es la zona en la cual se generan neuronas recién diferenciadas a partir de progenitores neurales.

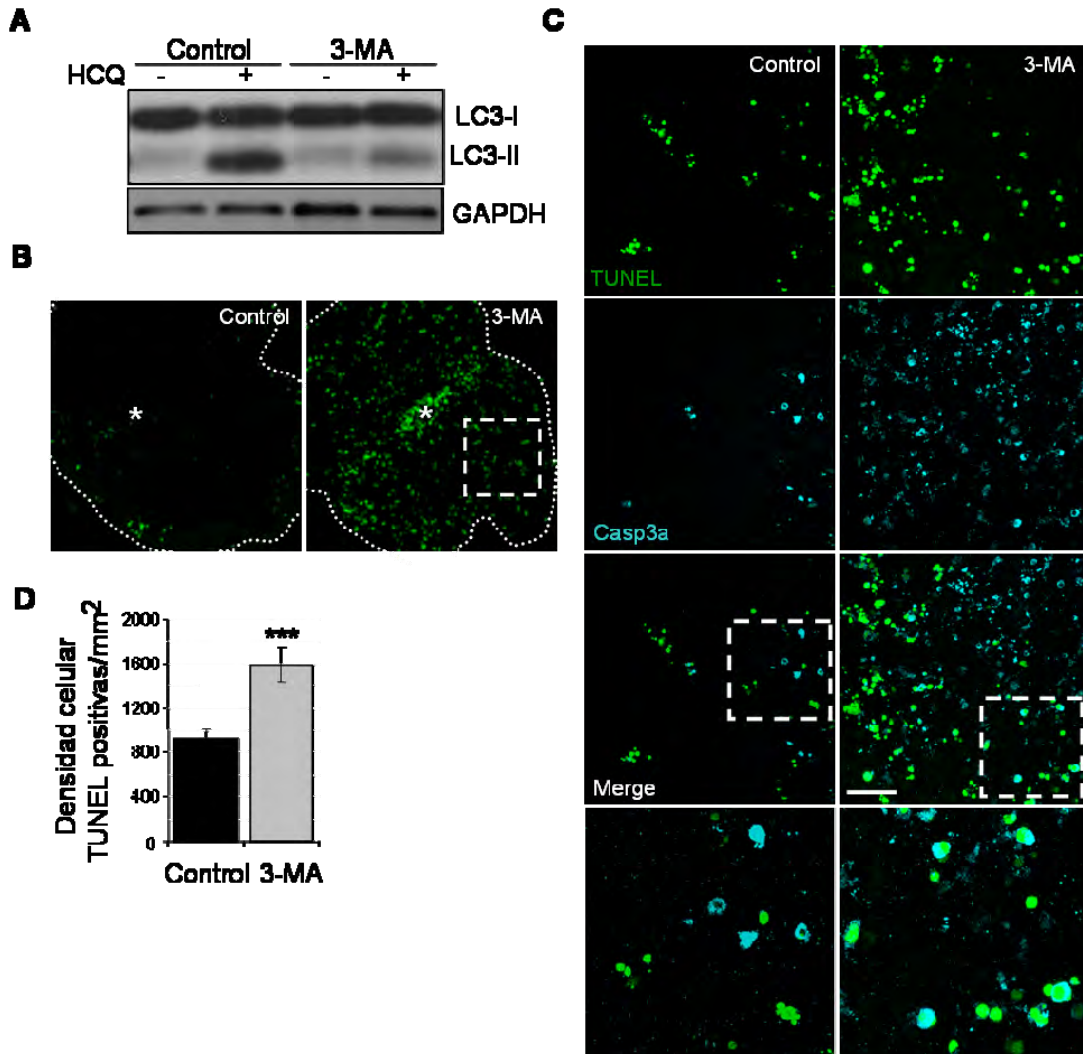


Figura 8. La inhibición de autofagia incrementa la muerte celular en la región periférica de la retina de E13.5. **A.** Flujo de autofagia determinado por cultivo de retinas en E13.5 durante 6h en presencia/ausencia de 3-MA y HCQ. Se ha empleado GAPDH como control de carga. **B.** Reacción de TUNEL para detectar muerte celular en retinas en plano cultivadas 6h con 3-MA. Barra de escala 100µm. El asterisco señala el nervio óptico. **C.** Inmunofluorescencia de caspasa 3 activa y reacción de TUNEL en la región periférica de la retina. Barra de escala 50µm. Las dos imágenes inferiores corresponden al aumento de las áreas señaladas en el merge. **D.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de la retina. ***p<0,001.

Las retinas de ratón en estas etapas del desarrollo empiezan a tener infiltración de células microgliales, los cuales son responsables de la fagocitosis de cuerpos celulares apoptóticos (Santos et al, 2008). Estos fagocitos profesionales pueden ser detectados específicamente mediante tinción con lectina de tomate (TL) conjugada con

un fluoróforo (Santos et al, 2008). Como se observa en la figura 9, muchas de las células apoptóticas que aparecen en la retina tras cultivo en presencia de 3-MA no se encuentran en el interior de células microgliales.

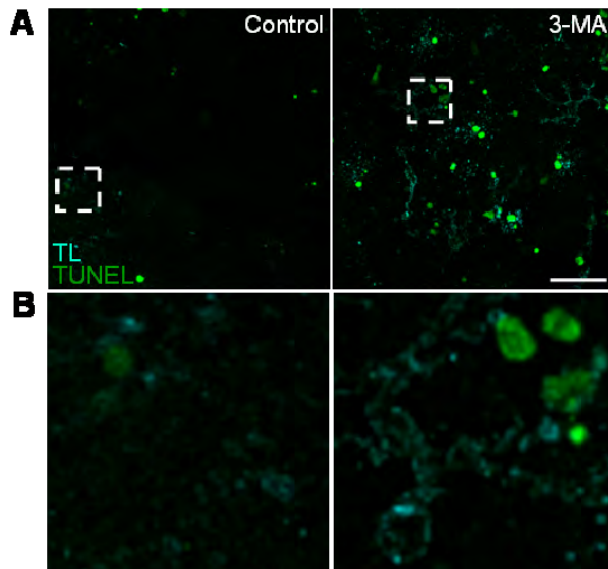


Figura 9. La inhibición de autofagia provoca una acumulación de células apoptóticas en la periferia de la retina que no son fagocitadas por células microgliales. A. Inmunofluorescencia de TL para detectar microglía y reacción de TUNEL para detectar muerte celular. Barra de escala 50 μ m. **B.** Aumento de las regiones señaladas en A.

Tras la fagocitosis, los cuerpos apoptóticos son degradados en el interior de lisosomas, que pueden ser visualizados utilizando sondas lisosomotrópicas como el LysoTracker (LTR) (Boya et al, 2008; Mellén et al, 2008). La inhibición farmacológica de autofagia reduce la cantidad de células LTR positivas así como el porcentaje de fagocitosis (células TUNEL-LTR/TUNEL) (Figura 10). Estos datos parecen indicar que las células apoptóticas que aparecen en la retina de ratón tras el bloqueo de autofagia no están siendo correctamente fagocitadas y por lo tanto degradadas.

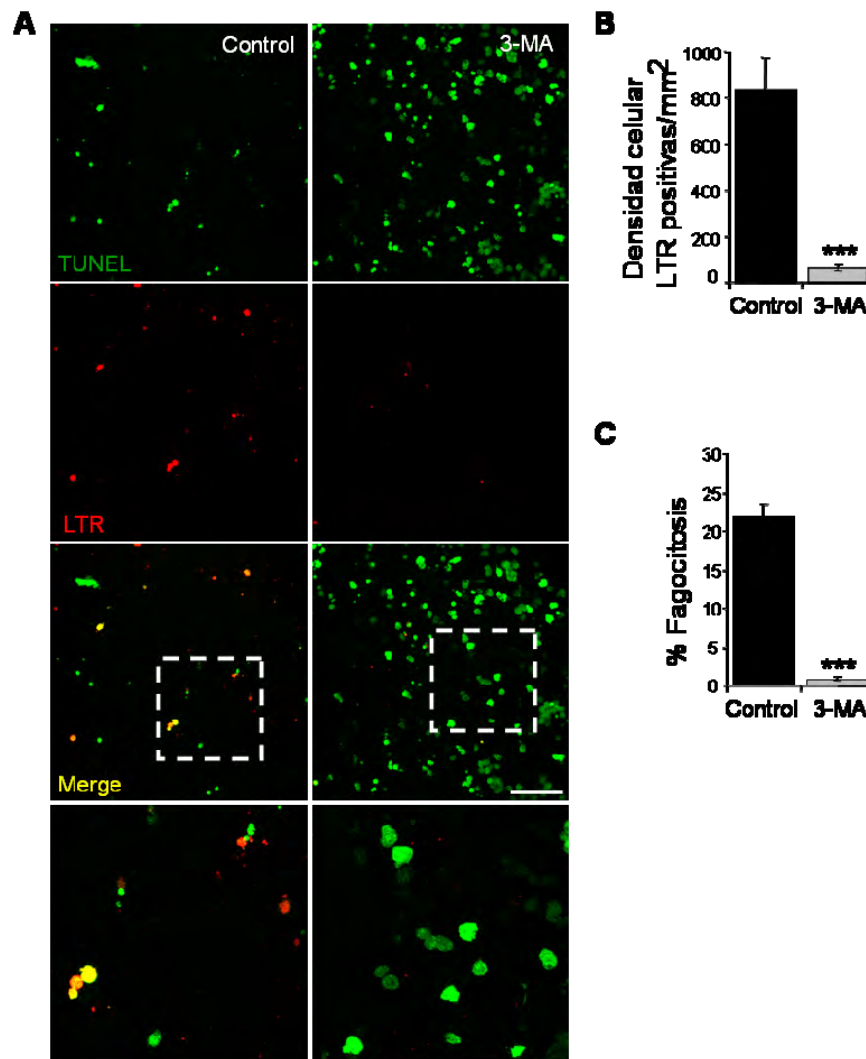


Figura 10. Las células apoptóticas no son degradadas en el interior de lisosomas tras el bloqueo de autofagia. **A.** Imágenes de la región periférica de retinas en E13.5 marcadas con lysotracker (LTR) y reacción de TUNEL. Barra de escala 50 μ m. Las dos imágenes inferiores corresponden al aumento de las áreas señaladas en el merge. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de la retina. ***p<0,001. **C.** Porcentaje de fagocitosis (células TUNEL-LTR/TUNEL) en la periferia de la retina. ***p<0,001.

Durante la apoptosis, la fosfatidilserina (PS) se transloca a la cara externa de la membrana plasmática de las células que mueren, donde es reconocida por fagocitos profesionales o células vecinas. Estas células fagocitan los cuerpos apoptóticos y los degradan en el interior de los lisosomas (Elliott & Ravichandran, 2010). Para determinar si como ocurre en retinas embrionarias de ave, la autofagia es necesaria para mantener unos niveles de ATP intracelulares suficientes para que en las células apoptóticas se exponga la fosfatidilserina, se realizó una tinción con anexina-V en presencia y ausencia de metilpiruvato (MP). El MP es un análogo permeable del piruvato que sirve como un sustrato alternativo para la generación de ATP mitocondrial,

Como se puede observar en la figura 11, el metilpiruvato restaura la tinción de anexina-V y el porcentaje de exposición de fosfatidilserina (células TUNEL-Anexina-V/TUNEL), lo que permite la fagocitosis de las células apoptóticas.

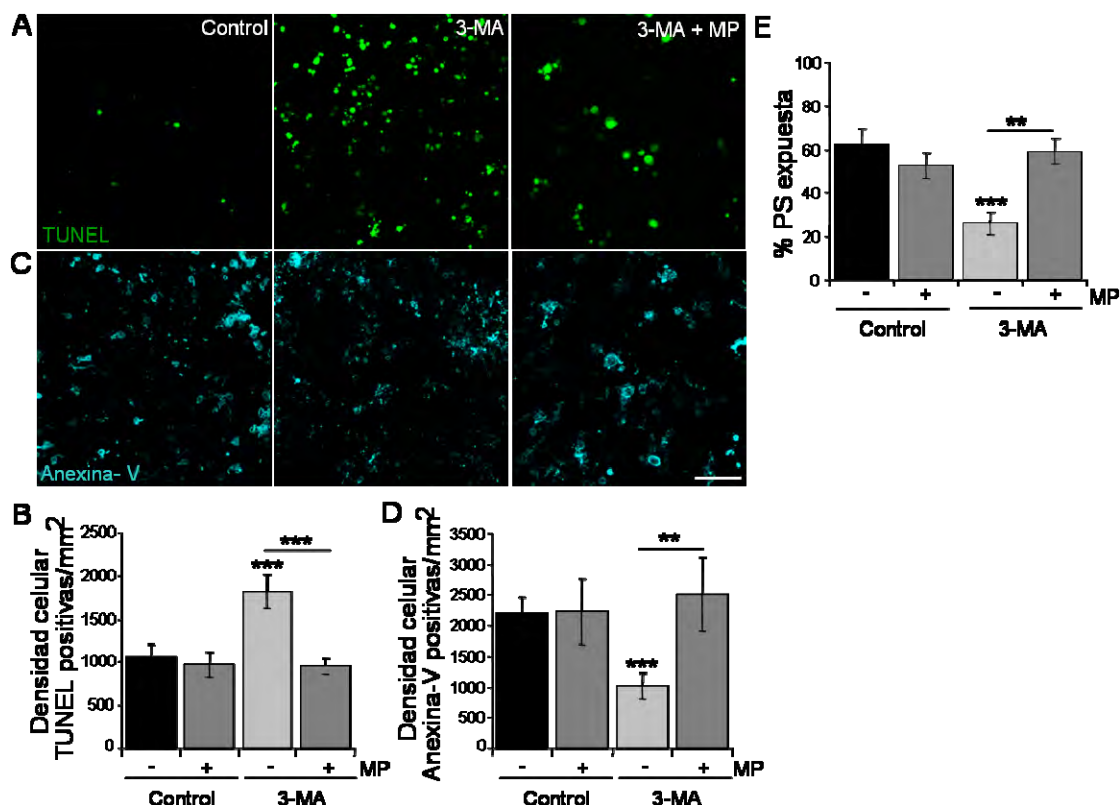


Figura 11. Bloqueo del reconocimiento de las células apoptóticas de la retina de ratón en E13.5 por disminución de la externalización de PS al inhibir autofagia que se recupera al suplementar con MP. **A.** Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano para la detección de muerte celular tras cultivo con 3-MA en ausencia/presencia de MP. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de la retina. ***p<0,001. **C.** Detección de PS expuesta en la superficie de células apoptóticas mediante tinción con Anexina-V en retinas montadas en plano. Barra de escala 50µm. **D.** Cuantificación del número de células Anexina-V positivas/mm² en la periferia de la retina. **p<0,01; ***p<0,001. **E.** Porcentaje de exposición de PS (células TUNEL-Anexina-V/TUNEL). **p<0,01; ***p<0,001.

Además, se determinaron los niveles de ATP mediante el kit comercial *ATP Bioluminescent Assay Kit HS II*. Según se observa en la figura 12, las retinas cultivadas en presencia de 3-MA presentan niveles reducidos de ATP, que se recuperan al suplementar con MP. Por tanto, se puede concluir que la autofagia es necesaria para mantener unos niveles de ATP intracelulares suficientes para que en las células apoptóticas se exponga la fosfatidilserina, lo que permite el reconocimiento, fagocitos y

degradación de las células apoptóticas que se generan durante el desarrollo de la retina embrionaria de ratón.

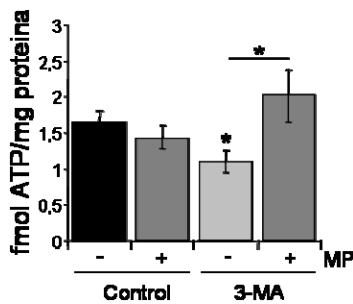


Figura 12. La inhibición de autofagia disminuye los niveles de ATP y éstos se recuperan en presencia de MP. Determinación de los niveles de ATP en retinas embrionarias de E13.5 tras bloqueo de autofagia y en ausencia/presencia de MP. * $p < 0,05$.

Estudios realizados con retinas de pollo a otras edades indicaron que este requerimiento de la autofagia para la eliminación de cuerpos celulares no parece ser universal (Mellén et al, 2009). Para determinar si en otros estadios del desarrollo embrionario de retinas de ratón la autofagia desempeña el mismo papel, se cultivaron retinas de embriones en E12.5 y E18.5 en presencia de 3-MA, y se realizó una tinción de TUNEL y LTR. Como se observa en la figura 13, la inhibición de autofagia con 3-MA incrementa la muerte celular en E12.5 pero no en E18.5. De igual manera, la inhibición de autofagia en E18.5 no altera la tinción de LTR, pero si disminuye en E12.5. Estos datos demuestran que la función de la autofagia en la degradación de células apoptóticas solo se produce en etapas tempranas del desarrollo de la retina de ratón.

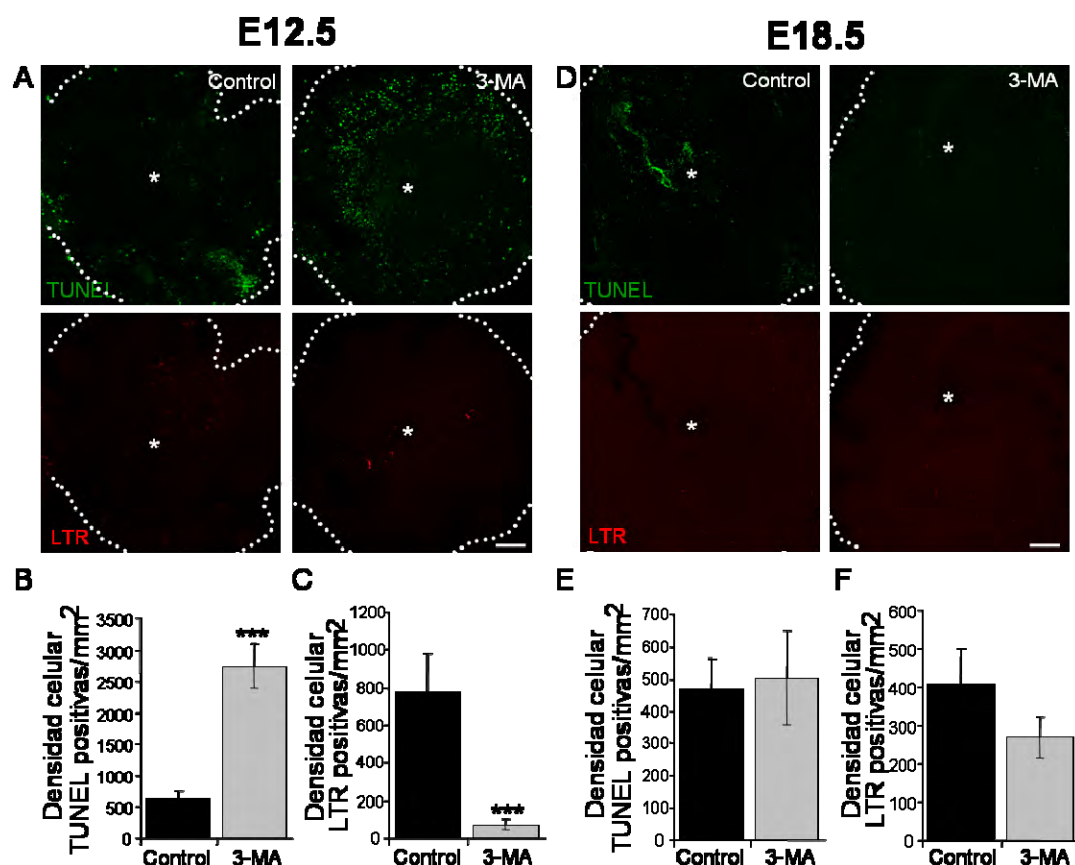


Figura 13. La acumulación de células apoptóticas por inhibición de autofagia se produce en la muerte neural temprana (E12.5-E13.5), pero no en la muerte fisiológica de retinas en E18.5. **A.** Reacción de TUNEL y marcaje con LTR de retinas en E12.5 montadas en plano. Barra de escala 100µm. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² de la retina de E12.5. ***p<0,001. **C.** Cuantificación del número de células LTR positivas/mm² de la retina de E12.5. ***p<0,001. **D.** Reacción de TUNEL y marcaje con LTR de retinas en E18.5 montadas en plano. Barra de escala 100µm. El asterisco señala el nervio óptico. **E.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² de la retina de E18.5. **F.** Cuantificación del número de células LTR positivas/mm² de la retina de E18.5.

Para confirmar que lo observado es un efecto dependiente de autofagia y no a una alteración del proceso de apoptosis durante el desarrollo de la retina, se cultivaron retinas en presencia de wortmanina (WM), otro inhibidor de PI3K-III (Powis et al, 1994) y por tanto de autofagia, así como en ausencia de insulina, condición en la cual se produce un incremento de muerte celular al ser la insulina un factor de supervivencia durante el desarrollo de la retina embrionaria (Diaz et al, 1999). Ambas condiciones incrementan la muerte dependiente de caspasas en retinas embrionarias en E13.5 (Figura 14).

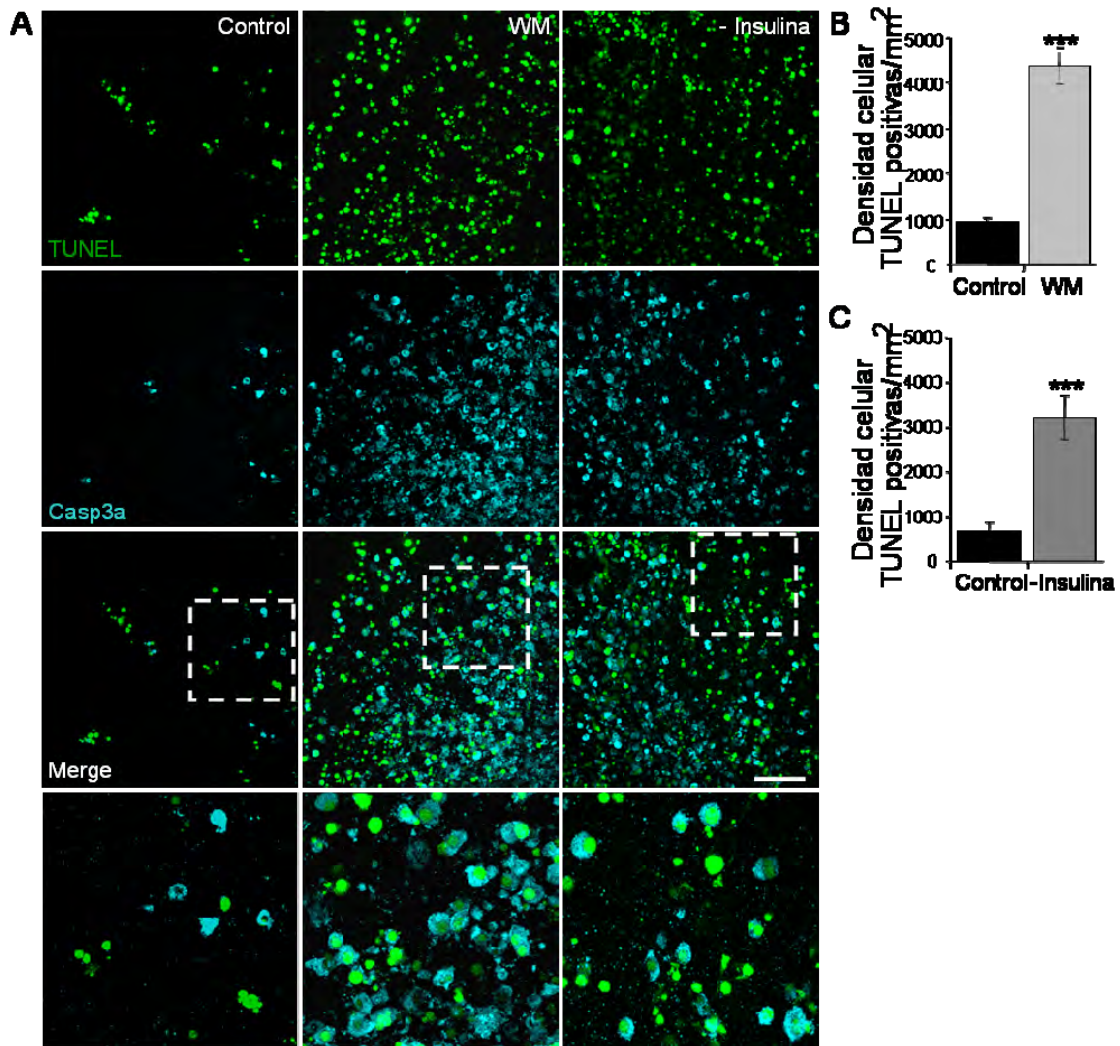


Figura 14. La inhibición de autofagia mediante wortmanina y el cultivo en ausencia de insulina incrementan la muerte apoptótica dependiente de caspasas. A. Inmunofluorescencia de caspasa 3 activa y reacción de TUNEL en la región periférica de la retina. Barra de escala 50 μ m. Las dos imágenes inferiores corresponden al aumento de las áreas señaladas en el merge. **B.C.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de retinas tratada con wortmanina y en privación de insulina, respectivamente. ***p<0,001.

Sin embargo, solo la inhibición de autofagia, y no la privación de insulina, reduce el número de células LTR positivas y el porcentaje de fagocitosis (Figura 15). La ausencia de insulina incrementa el marcaje con LTR siendo correcta la fagocitosis de las células TUNEL positivas (Figura 15 C, E).

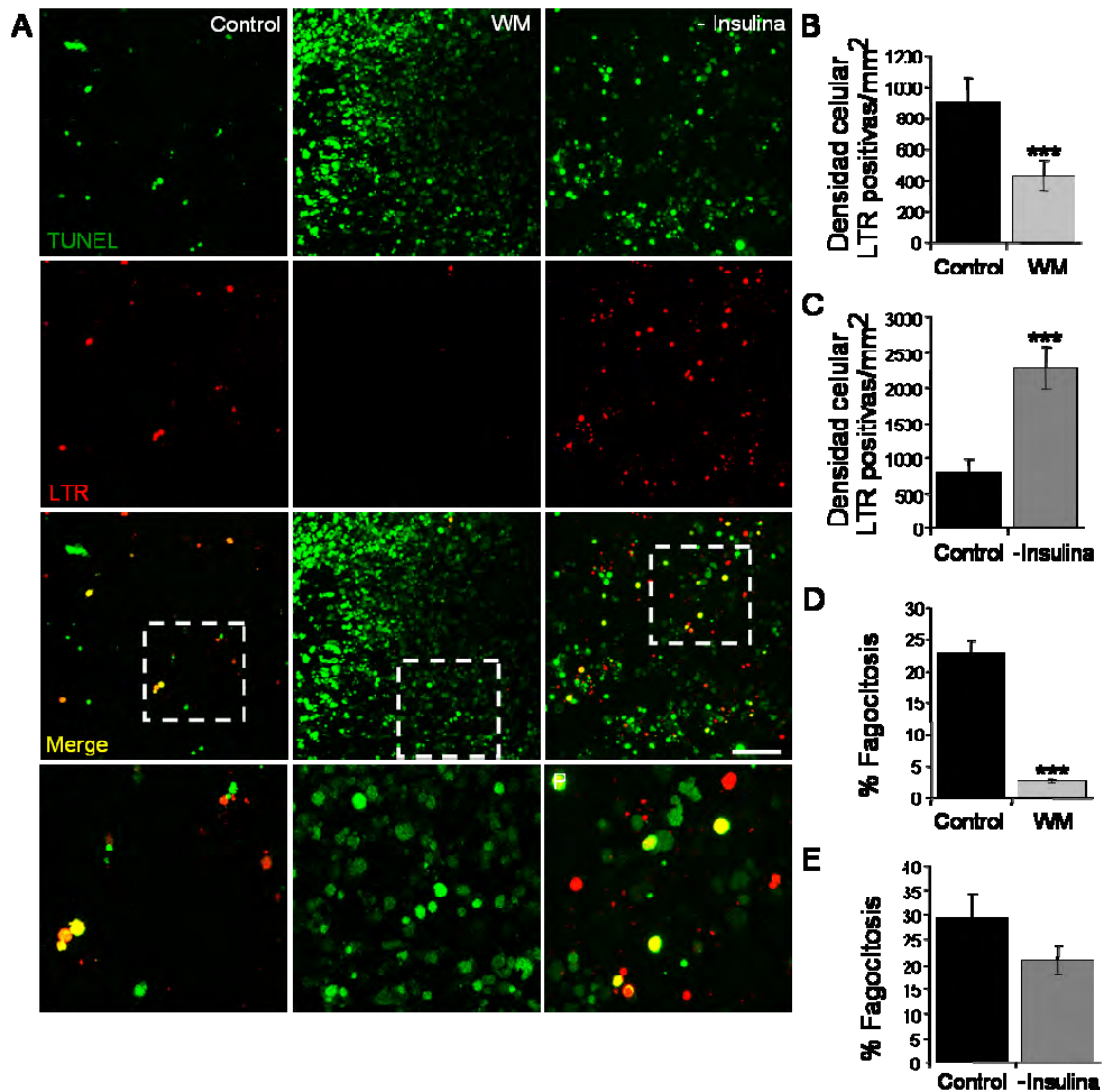


Figura 15. La inhibición de autofagia con wortmanina impide la degradación de las células apoptóticas en el interior de lisosomas. Por el contrario, las células apoptóticas producidas por cultivo de retinas en privación de insulina son degradadas en el interior de los lisosomas. **A.** Imágenes de la región periférica de retinas en E13.5 marcadas con lysotracker (LTR) y reacción de TUNEL. Barra de escala 50µm. Las dos imágenes inferiores corresponden al aumento de las áreas señaladas en el merge. **B. C.** Cuantificación del número de células LTR positivas/mm² en la región periférica de la retina. ***p<0,001. **D. E.** Porcentaje de fagocitosis (células TUNEL-LTR/TUNEL) en la periferia de la retina. ***p<0,001.

Además, mediante tinción con anexina-V, hemos corroborado que la inhibición de autofagia con wortmanina disminuye el número de células anexina-V positivas así como el porcentaje de exposición de PS (Figura 16A, B, D).

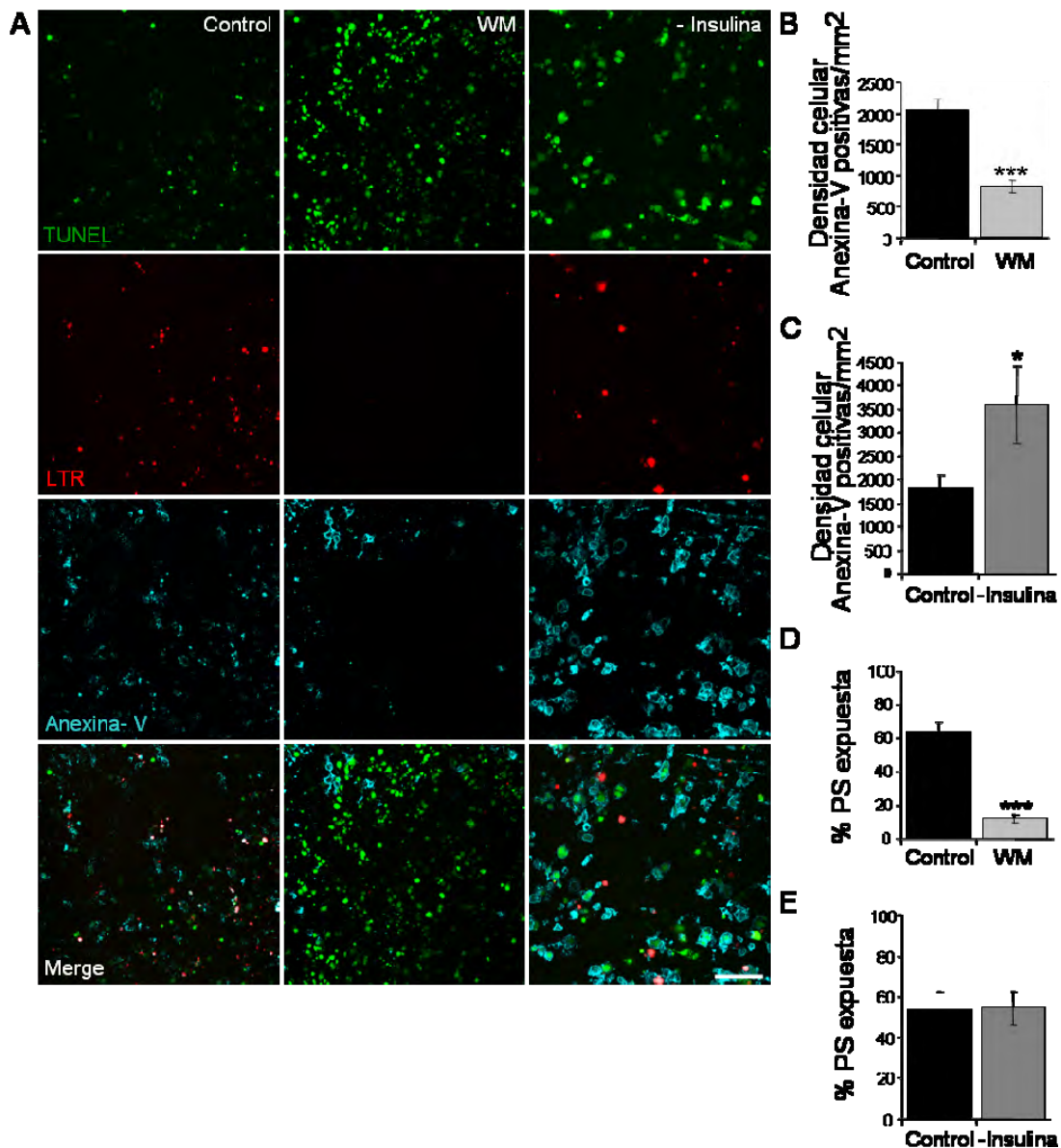


Figura 16. Bloqueo del reconocimiento de las células apoptóticas de la retina de ratón en E13.5 por disminución de la externalización de PS tras a inhibición de autofagia con WM. A. Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano para la detección de muerte celular tras cultivo con WM y en ausencia de insulina. Barra de escala 50µm. **B. C.** Cuantificación del número de células Anexina-V positivas/mm² en la periferia de la retina. *p<0,05; ***p<0,001. **D. E.** Porcentaje de exposición de PS (células TUNEL-Anexina-V/TUNEL). ***p<0,001.

Por el contrario, este proceso no se ve alterado en una muerte producida por ausencia de factores de crecimiento, inducida en las retinas mediante privación de insulina (Figura 16A, C, E). Las diferencias obtenidas entre ambas condiciones son debidas a una disminución de los niveles de ATP al inhibir autofagia, hecho que no sucede en retinas cultivadas en ausencia de insulina (Figura 17A, B).

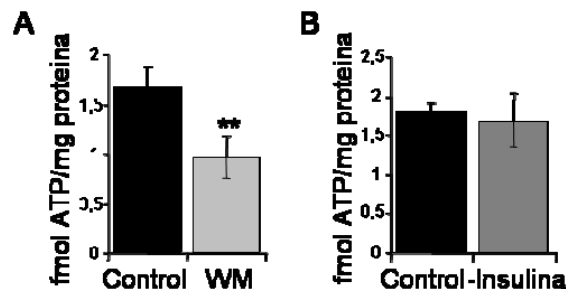


Figura 17. La inhibición de autofagia con WM disminuye los niveles de ATP, pero éstos no se ven alterados en el cultivo de retinas de E13.5 en ausencia de insulina. ** $p < 0,01$.

A continuación, se suplementaron las retinas con MP. El MP restaura el número de células anexina-V positivas en retinas con autofagia inhibida por wortmanina. Sin embargo, el porcentaje de exposición de fosfatidilserina solo se recupera parcialmente (Figura 18A-C). Esto se correlaciona con la recuperación parcial de los niveles de ATP al suplementar con MP retinas cultivadas con WM (Figura 18D). No obstante, hay que destacar que en estos experimentos el suplemento con MP tiende a disminuir los niveles de ATP basales y el porcentaje de PS expuesta, lo que podría explicar por qué no recupera completamente el ATP y la exposición de PS en retinas con autofagia inhibida por WM. Para confirmarlo, habría que incrementar el número de retinas para estas mediciones, ya que se trata de experimentos preliminares.

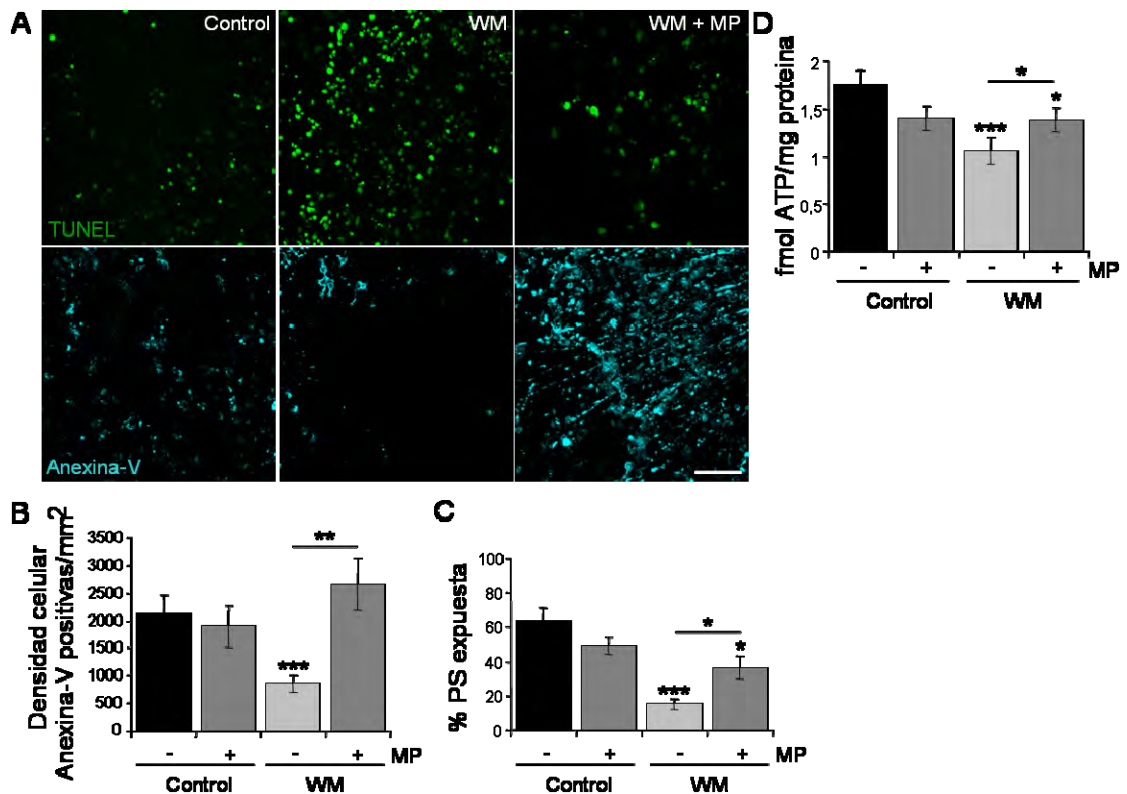


Figura 18. Recuperación parcial de los niveles de ATP y de la externalización de PS al suplementar con MP retinas cultivadas con WM. **A.** Reacción de TUNEL e inmunofluorescencia de Anexina-V en retinas montadas en plano para la detección de muerte celular y exposición de PS tras cultivo con WM en ausencia/presencia de MP. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de células Anexina-V positivas/mm² en la región periférica de la retina. **p<0,01; ***p<0,001. **C.** Porcentaje de exposición de PS (células TUNEL-Anexina-V/TUNEL). *p<0,05; ***p<0,001. **D.** Niveles de ATP en retinas con autofagia inhibida por WM en ausencia/presencia de MP. *p<0,05; ***p<0,001.

Además, las diferencias obtenidas entre 3-MA y WM pueden ser debidas a la menor especificidad de la wortmanina (Cross et al, 1995), ya que hemos observado que su efecto como inhibidor de autofagia depende de las condiciones nutricionales del cultivo. En retinas cultivadas con alta dosis de insulina (insulina 160nM), la autofagia basal no está muy activa, siendo el flujo de LC3 menor que a baja dosis de insulina (10nM), cultivo sin insulina o cultivo en ayuno de aminoácidos mediante EBSS (Figura 19, LC3-I y LC3-II). En estas cuatro condiciones, podemos observar como la inhibición del flujo de LC3 por inhibición de autofagia con WM, es mayor ante un estrés celular por privación de insulina o ayuno. De hecho, en el cultivo de retinas con alta insulina la WM induce autofagia en vez de inhibirla (Figura 19, LC3-I y LC3-II), como previamente se ha descrito en la inhibición con 3-MA a tiempos largos y en condiciones ricas en nutrientes (Wu et al, 2010). Por otro lado, la wortmanina también

inhibe PI3K de clase I, afectando directamente a la viabilidad celular independientemente del proceso de autofagia.

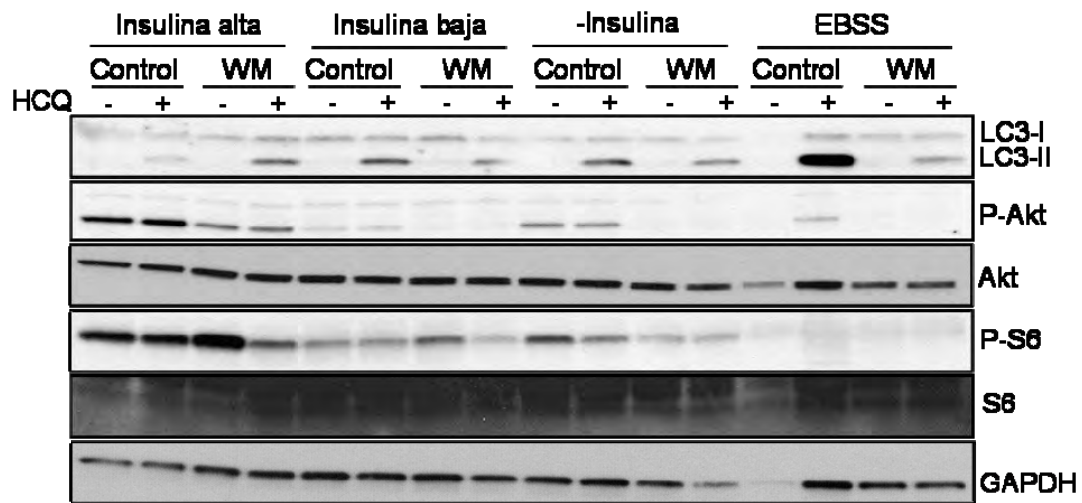


Figura 19. El efecto de la WM como inhibidor de autofagia depende de las condiciones nutricionales del cultivo. La inhibición del flujo de autofagia con WM es mayor ante un estrés celular por privación de insulina o ayuno. La WM induce autofagia en el cultivo de retinas con alta dosis de insulina. Además, la vía de señalización de Akt está inhibida por WM en todas las condiciones.

Esas diferencias tienen sus consecuencias en la muerte celular, siendo ésta mayor cuando se utiliza wortmanina en condiciones limitantes de nutrientes, asociado a una disminución de la tinción con LTR (Figura 20).

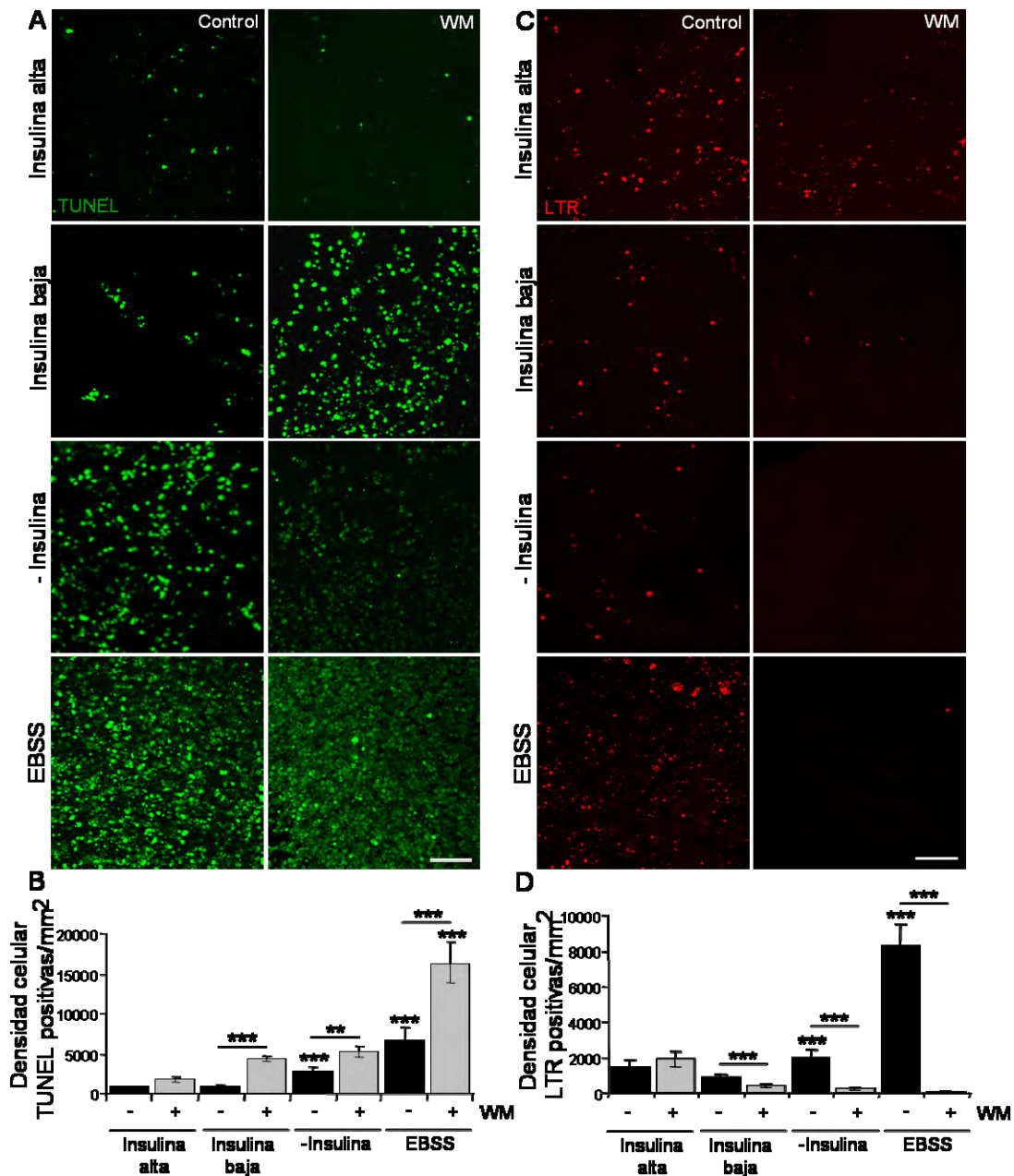


Figura 20. La muerte celular por cultivo con WM es mayor a medida que disminuye la dosis de insulina y en cultivo en ayuno de aminoácidos, y está asociada inversamente a la tinción de LTR. **A.** Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de retinas tratadas con wortmanina en las condiciones mostradas. **p<0,01; ***p<0,001. **C.** Marcaje de LTR en retinas montadas en plano. Barra de escala 50µm. **D.** Cuantificación del número de células LTR positivas/mm² en la región periférica de retinas tratadas con wortmanina en las condiciones mostradas. ***p<0,001.

Además, el incremento de muerte con WM es mayor al incrementar la dosis del inhibidor (Figura 21A, B), mientras que la disminución de la tinción con LTR solo ocurre a la dosis más elevada (Figura 21C, D). Por ello, es posible que la acumulación de células apoptóticas por inhibición de autofagia con WM que no se rescata al

suplementar con MP, sea debido a un incremento de muerte celular por inhibición de vías de supervivencia como PI3K-I/Akt.

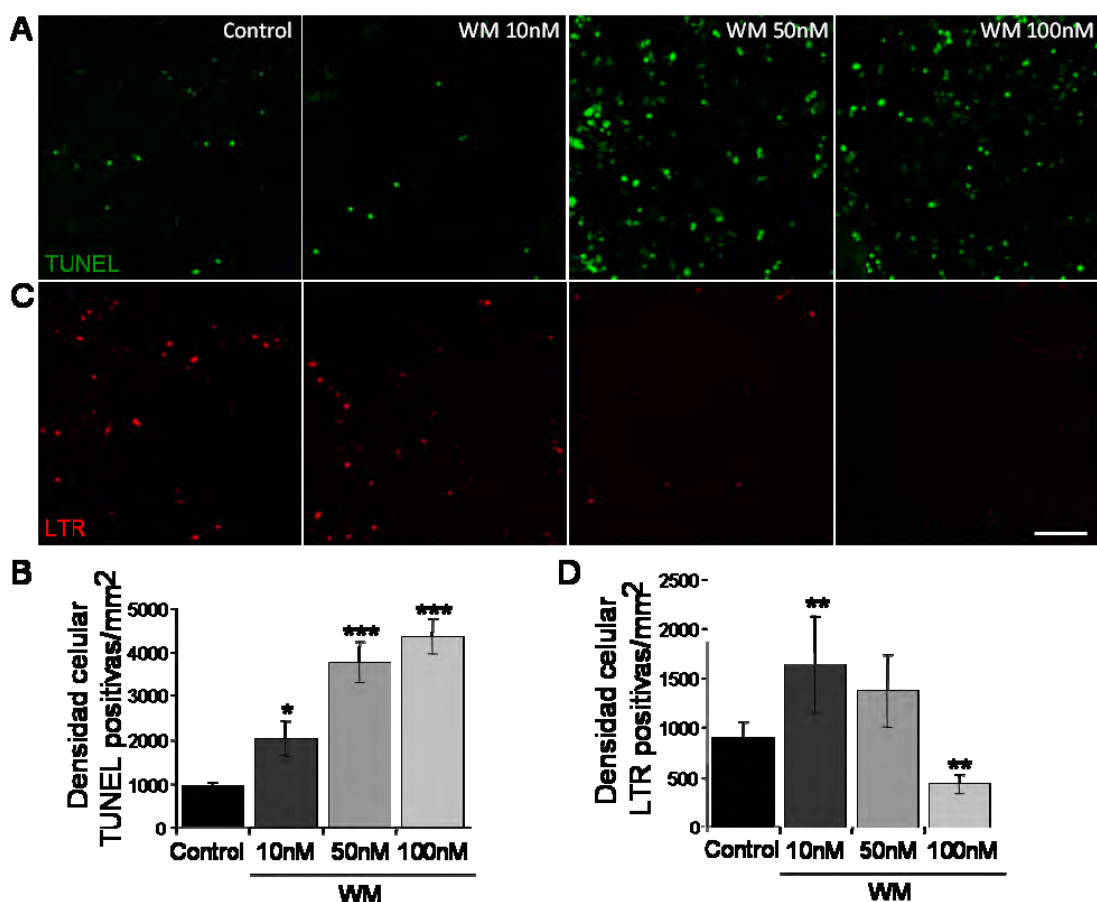


Figura 21. Incremento de muerte celular dosis dependiente en retinas cultivadas con WM. La disminución de LTR solo ocurre a la mayor dosis probada. **A.** Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano cultivadas con concentraciones crecientes de WM. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de retinas tratadas con diferentes concentraciones de wortmanina. *p<0,05; ***p<0,001. **C.** Marcaje de LTR en retinas montadas en plano cultivadas con concentraciones crecientes de WM. Barra de escala 50µm. **D.** Cuantificación del número de células LTR positivas/mm² en la región periférica de retinas tratadas con diferentes concentraciones de wortmanina. **p<0,01.

El incremento de muerte celular por inhibición de PI3K-I de comprobó mediante cultivo de retinas en presencia de LY294002 (Vlahos et al, 1994) (Figura 22A, B). En este caso, el porcentaje de exposición de PS no está alterado, por lo que las células TUNEL positivas son debidas a un incremento en muerte celular y no a un bloqueo de la fagocitosis (Figura 22C, D).

Con estos datos podemos concluir que observamos tres situaciones diferentes en cuanto a muerte celular. En primera lugar, la inhibición de autofagia con 3-MA produce un bloqueo en la degradación de las células que mueren de manera fisiológica durante el desarrollo de la retina embrionaria de ratón específicamente en el frente de

diferenciación. En segundo lugar, el cultivo de retinas en ausencia de factores de supervivencia, como la insulina, o en presencia de inhibidores de PI3K-I (LY), incrementa la muerte celular por toda la retina, sin estar afectada la fagocitosis de las células apoptóticas. Y por último, el cultivo de retinas con WM produce un incremento de muerte que refleja ambas situaciones: el incremento de muerte celular general por bloqueo de PI3K-I, así como un aumento de células apoptóticas en el frente de diferenciación por bloqueo de su reconocimiento y degradación lisosomal por autofagia.

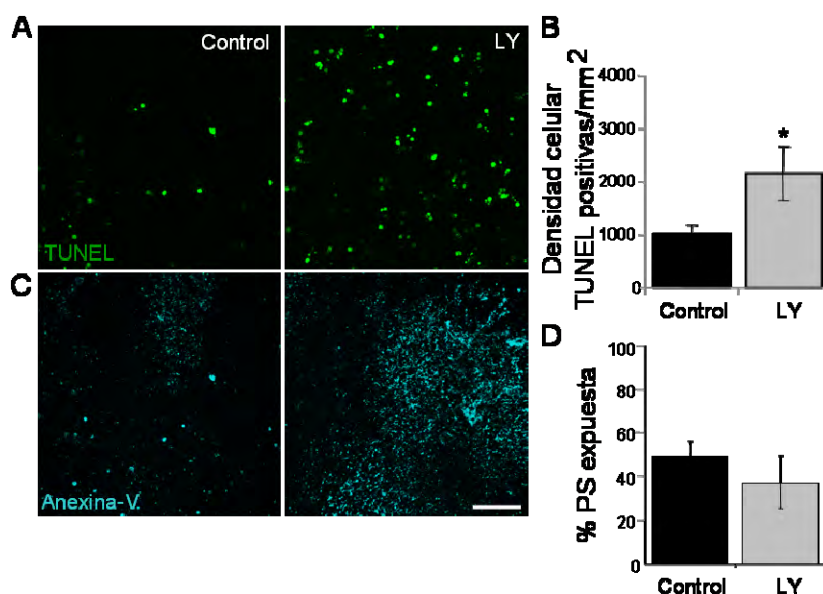


Figura 22. La muerte celular producida por inhibición de PI3K de clase I no se debe a una acumulación de células apoptóticas por alteración en la exposición de PS. A. Reacción de TUNEL en retinas de E13.5 montadas en plano. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de retinas tratadas con LY. *p<0,05. **C.** Inmunofluorescencia de Anexina-V en retinas montadas en plano para la detección de exposición de PS tras cultivo con LY. Barra de escala 50µm. **D.** Porcentaje de exposición de PS (células TUNEL-Anexina-V/TUNEL) en retinas cultivadas con LY.

A continuación se estudió el proceso de fagocitosis de células apoptóticas en retinas deficientes de dos reguladores de autofagia, Ambra1 y Atg5. El fenotipo de Ambra1 se caracteriza a nivel celular por un incremento de la apoptosis en el tubo neural a partir de E9, en regiones en las que se produce la muerte asociada al desarrollo (Fimia et al, 2007). Por tanto Ambra1 parece tener un papel citoprotector durante el desarrollo del sistema nervioso. Retinas deficientes de *Ambra1* presentan un incremento de muerte celular así como una disminución del porcentaje de exposición de PS *in vitro* (Figura 23A-D).

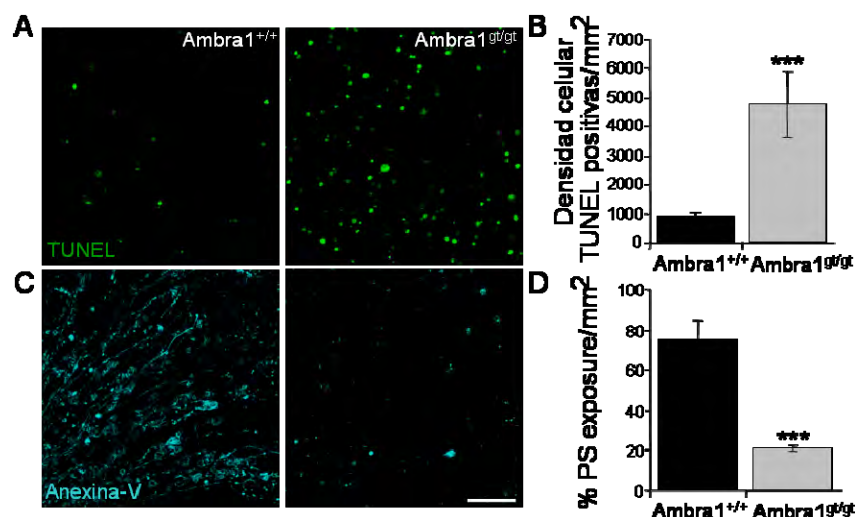


Figura 23. Retinas deficientes de Ambra1 presentan un incremento de la muerte celular y reducción de la exposición de PS en cultivo. A. Reacción de TUNEL en retinas deficientes de Ambra1. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de retinas deficientes de

Ambra1. ***p<0,001. **C.** Inmunofluorescencia de Anexina-V en retinas deficientes de Ambra1 montadas en plano PS tras cultivo. Barra de escala 50µm. **D.** Porcentaje de exposición de PS (células TUNEL-Anexina-V/TUNEL) en retinas deficientes de Ambra1 tras el cultivo.

El incremento en muerte celular por inhibición genética de autofagia también es una característica de retinas deficientes en Atg5 en E13.5, que presentan a su vez una disminución de los niveles de ATP (Figura 24A-C). Además, datos preliminares muestran que muchas de las células apoptóticas no se encuentran en el interior de células microgliales, pero el suplemento con MP en retinas Atg5^{-/-} restaura parcialmente la muerte celular en el frente de diferenciación (Figura 24D). Todos estos datos obtenidos por inhibición genética de autofagia confirman los resultados de la inhibición farmacológica de autofagia. No obstante, es posible que además de estar afectado el reconocimiento de las células apoptóticas tras la inhibición genética de autofagia, otros procesos estén alterados, como la degradación lisosomal en el interior de las células microgliales. Se necesitan experimentos adicionales para corroborar esta hipótesis.

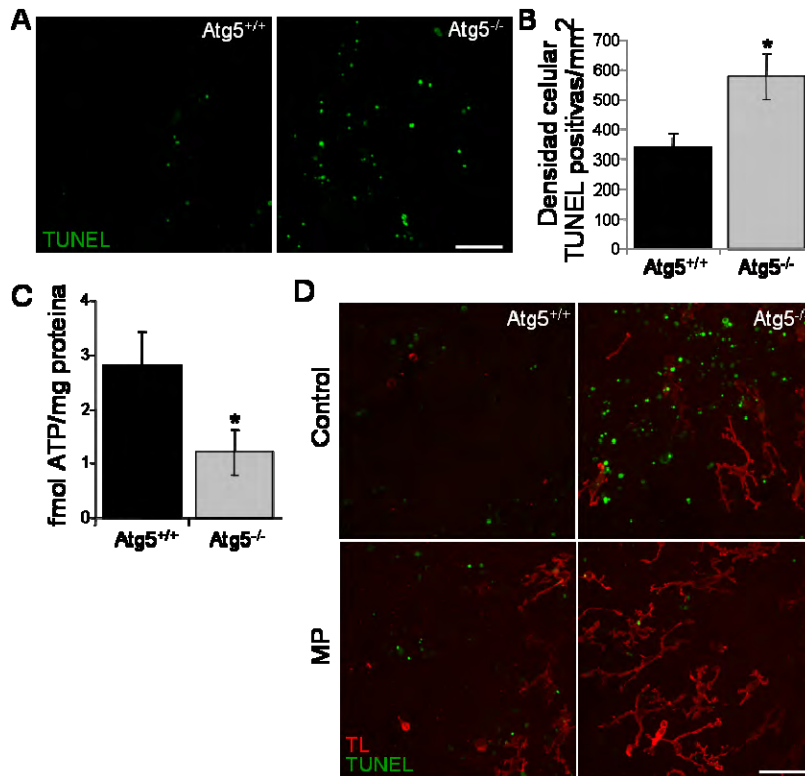


Figura 24. Retinas deficientes de Atg5 presentan un incremento de muerte celular y un déficit energético. A. Reacción de TUNEL en retinas deficientes de Atg5 montadas en plano. Barra de escala 50µm. B. Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de retinas deficientes de Atg5. *p<0,05. C. Niveles de ATP en retinas deficientes de Atg5. *p<0,05. D. Reacción de TUNEL e inmunofluorescencia de TL para el marcaje de microglía en retinas deficientes de Atg5 tras cultivo en ausencia/presencia de MP. Barra de escala 50µm.

3. FENOTIPO DE MUERTE CELULAR TRAS LA INDUCCIÓN DE AUTOFAGIA DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA DE RATÓN

Una vez determinadas las consecuencias de la inhibición de autofagia en relación a la muerte celular, decidimos estudiar en detalle qué ocurre cuando se induce autofagia en retinas embrionarias de estadios tempranos, ya que como previamente hemos visto, el ayuno mediante cultivo en EBSS incrementa la muerte celular (ver figura 20). Como se observa en la figura 25A, la inducción de autofagia con EBSS incrementa la muerte celular siguiendo un patrón centro-periférico. Dicha muerte celular es dependiente de la activación de caspasas y se revierte con BOC, un inhibidor general de caspasas (Figura 25 B-D).

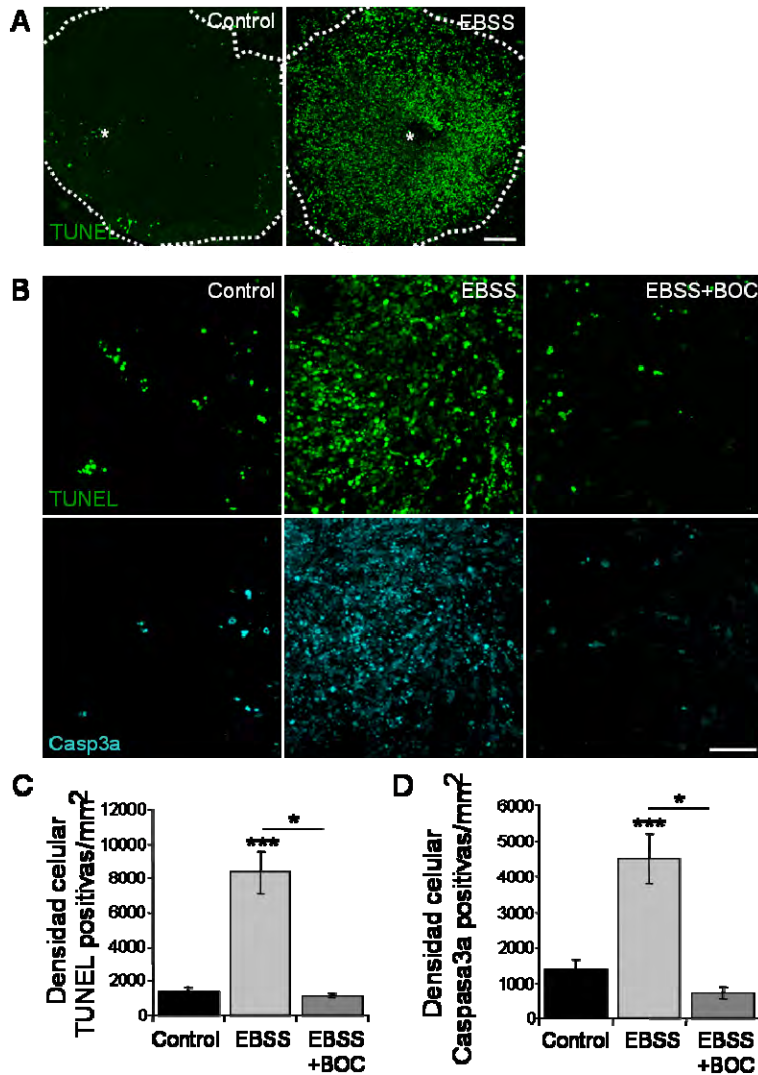


Figura 25. El cultivo de retinas de E13.5 en ayuno de aminoácidos incrementa la muerte celular dependiente de caspasas. **A.** Imágenes de retina completa donde se muestra la reacción de TUNEL para la detección de muerte celular. Barra de escala 100µm. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Inmunofluorescencia de caspasa 3 activa y reacción de TUNEL en retinas montadas en plano tras cultivo en EBSS en ausencia/presencia de BOC. Barra de escala 50µm. **C. D.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² y caspasa3a positivas/mm² en B, respectivamente. *p<0,05; ***p<0,001.

Interesantemente, la muerte celular con EBSS también se revierte por inhibición aguda de autofagia con 3-MA (Figura 26 A-C). Sin embargo, la inhibición crónica de autofagia en retinas deficientes de Atg5 cultivadas en EBSS, produce un incremento mayor de la muerte celular, de acuerdo con el papel citoprotector de la autofagia durante el ayuno (Boya et al, 2005) (Figura 26 D, E).

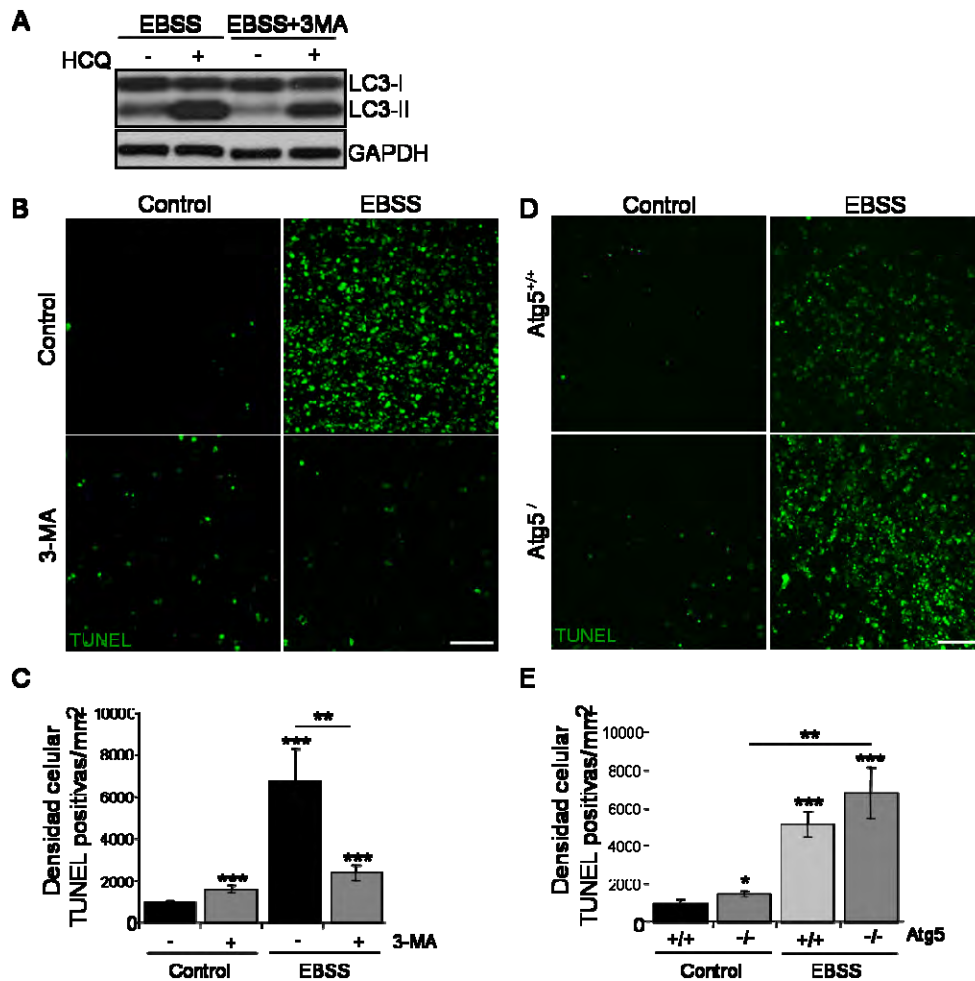


Figura 26. El cultivo de retinas de E13.5 en ayuno de aminoácidos incrementa la muerte celular dependiente de autofagia. **A.** Flujo de autofagia determinado por cultivo de retinas en E13.5 durante 6h en presencia/ausencia de EBSS, 3-MA y HCQ. Se ha empleado GAPDH como control de carga. **B. D.** Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano tras cultivo con EBSS en ausencia/presencia de 3-MA y en retinas deficientes de Atg5, respectivamente. Barra de escala 50µm. **C. E.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en B y D, respectivamente. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

Para corroborar estos resultados, se estudió la inducción de autofagia mediante tratamiento con rapamicina. De nuevo se observa un incremento de muerte celular dependiente de caspasas que se revierte con BOC (Figura 27A-D) y 3-MA (Figura 28A-C). Al contrario que en la muerte inducida por EBSS, retinas deficientes de Atg5 no presentan el incremento de muerte celular por tratamiento con rapamicina en retinas *wildtype* (Figura 28 D, E).

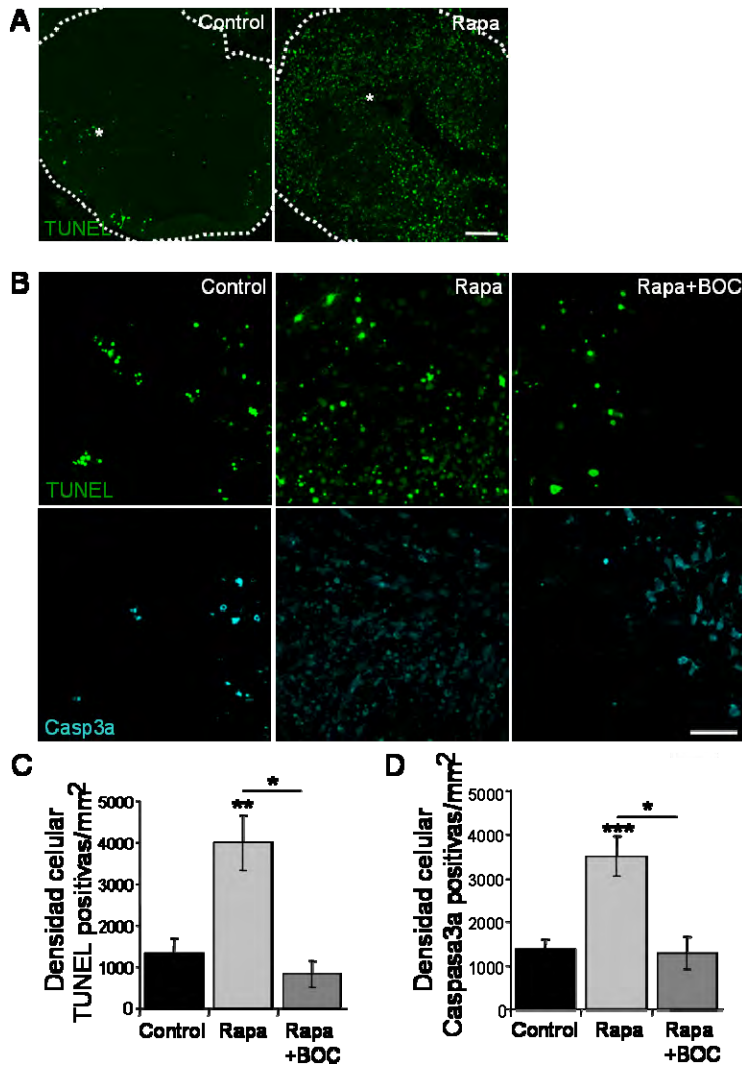


Figura 27. El cultivo de retinas de E13.5 con rapamicina incrementa la muerte celular dependiente de caspasas.
A. Imágenes de retina completa donde se muestra la reacción de TUNEL para la detección de muerte celular. Barra de escala 100 μ m. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Inmunofluorescencia de caspasa 3 activa y reacción de TUNEL en retinas montadas en plano tras cultivo con rapamicina en ausencia/presencia de BOC. Barra de escala 50 μ m. **C.** **D.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² y caspasa3a positivas/mm² en B, respectivamente. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

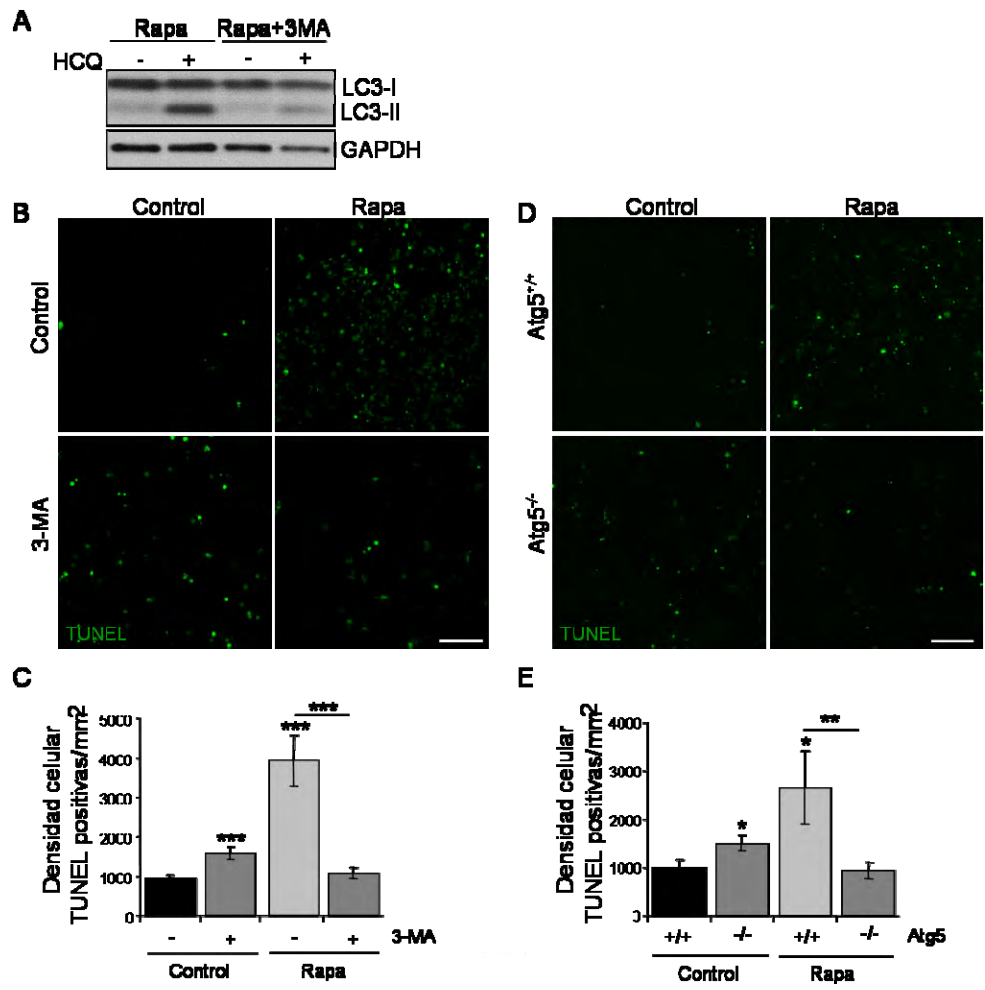


Figura 28. El cultivo de retinas de E13.5 con rapamicina incrementa la muerte celular dependiente de autofagia. **A.** Flujo de autofagia determinado por cultivo de retinas en E13.5 durante 6h en presencia/ausencia de rapamicina, 3-MA y HCQ. Se ha empleado GAPDH como control de carga. **B. D.** Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano tras cultivo con rapamicina en ausencia/presencia de 3-MA y en retinas deficientes de Atg5, respectivamente. Barra de escala 50µm. **C. E.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en B y D, respectivamente. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

De igual manera, se observa un incremento de muerte celular dependiente de caspasas y autofagia al utilizar el inhibidor de mTOR AZD8055 (AZD) (Schenone et al, 2011), que se bloquea al inhibir con BOC y 3-MA (Figuras 29 A-D, 30 A, B).

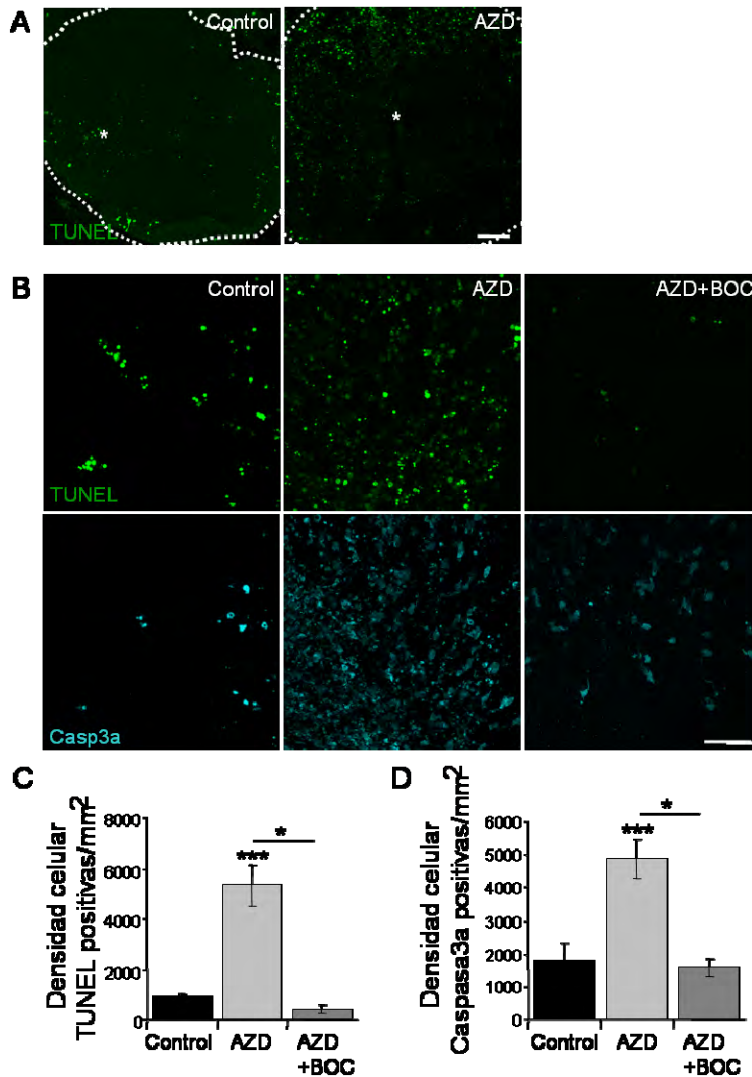


Figura 29. El cultivo de retinas de E13.5 con AZD incrementa la muerte celular dependiente de caspasas.

A. Imágenes de retina completa donde se muestra la reacción de TUNEL para la detección de muerte celular. Barra de escala 100µm. El asterisco señala el nervio óptico.

B. Inmunofluorescencia de caspasa 3 activa y reacción de TUNEL en retinas montadas en plano tras cultivo con AZD en ausencia/presencia de BOC. Barra de escala 50µm.

C. D. Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² y caspasa3a positivas/mm² en B, respectivamente. *p<0,05; ***p<0,001.

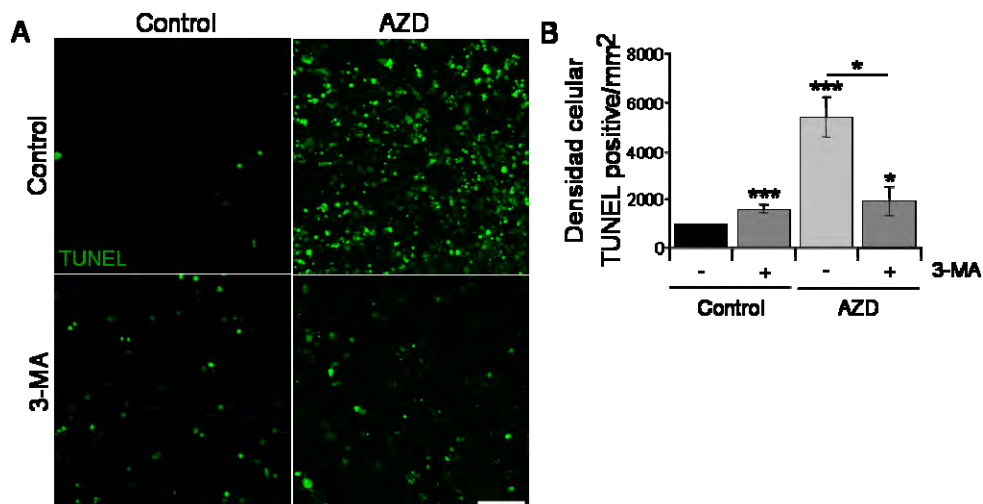


Figura 30. El cultivo de retinas de E13.5 con AZD incrementa la muerte celular dependiente de autofagia. **A.** Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano tras cultivo con AZD en ausencia/presencia de 3-MA. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en A. *p<0,05; ***p<0,001.

En estas tres condiciones de muerte inducida por activación de autofagia no se han detectado diferencias en el porcentaje de muerte por apoptosis (% TUNEL-Caspasa3a/TUNEL), lo que sugiere que la inducción de autofagia tiene una función proapoptótica (Figura 31).

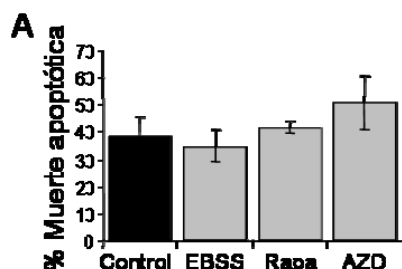


Figura 31. Porcentaje de muerte por apoptosis (células TUNEL-Caspasa3a/TUNEL) tras la inducción de autofagia con EBSS, rapamicina y AZD.

Además, y al contrario de lo que cabría esperar, los niveles de ATP disminuyen drásticamente al inducir autofagia (Figura 32), pero en este caso el suplemento con MP no solo no revierte la muerte celular por inducción de autofagia, sino que la incrementa aun más (Figura 33 A-D). Estos datos sugieren que una disminución drástica de los niveles de ATP es consecuencia de un incremento de muerte celular, y que el MP puede no estar metabolizándose correctamente cuando se induce autofagia, lo que incrementa aun más la muerte celular.

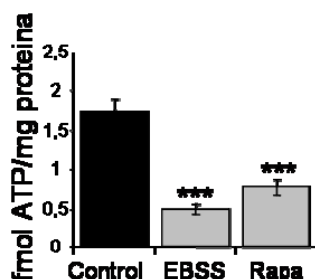


Figura 32. La inducción de autofagia con EBSS y rapamicina disminuye los niveles de ATP. *** $p < 0,001$.

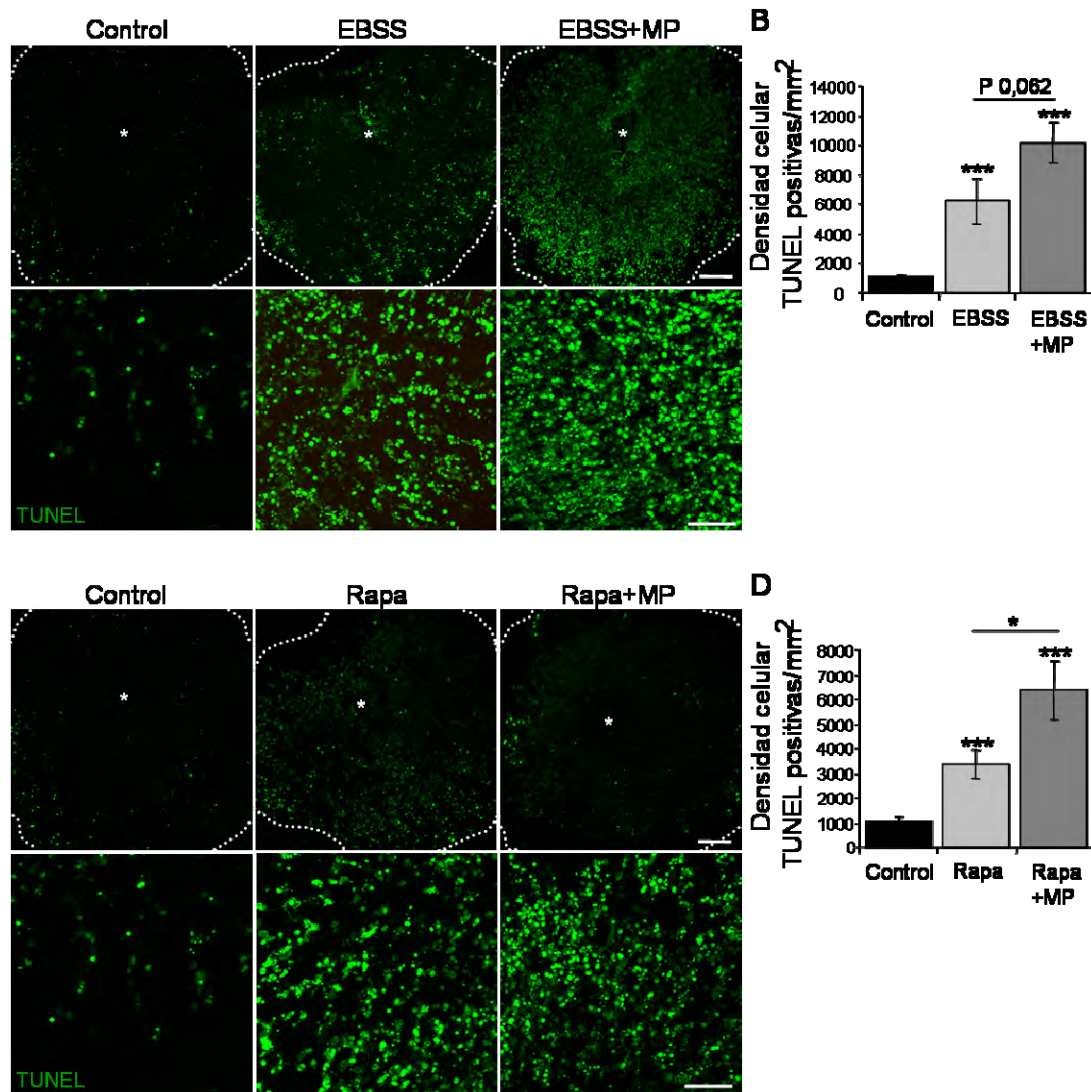


Figura 33. El suplemento con MP incrementa la muerte producida por inducción de autofagia con EBSS y rapamicina. A. C. Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano tras tratamiento con EBSS y rapamicina, respectivamente, en ausencia/presencia de MP. La imagen superior (barra de escala 100µm) corresponde a la retina completa y la inferior (barra de escala 50µm) a la región periférica en ambos casos. El asterisco señala el nervio óptico. **B. D.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en la región periférica de retinas tratadas como se ha descrito en A y C. *p<0,05; ***p<0,001.

Como he mencionado previamente, la deficiencia de autofagia produce una acumulación de células apoptóticas únicamente en la periferia de la retina (ver figura 8B) como consecuencia de una disminución de ATP, lo que sugiere que la autofagia aporta metabolitos para la obtención de energía mediante TCA en dicha región. Por el contrario, la inducción de autofagia incrementa la muerte celular siguiendo un patrón centro-periférico (ver figuras 25, 27 y 29) y en este caso, el suplemento con MP no solo es capaz de disminuir la muerte producida al inducir autofagia, si no que la incrementa (ver figura 33 A-D). Estos datos nos llevaron a plantear si había una

distribución diferencial de la masa mitocondrial, orgánulos donde el MP es incorporado, y si la inducción de autofagia en estos estadios estaba induciendo mitofagia y eso impedía que el MP fuera metabolizado.

Para ello, determinamos la distribución de la masa mitocondrial mediante inmunofluorescencia utilizando anticuerpos frente a proteínas mitocondriales, TOMM20 y COX-IV. Podemos observar que hay una mayor masa mitocondrial en la región periférica de la retina de E13.5 (Figura 34 A, B).

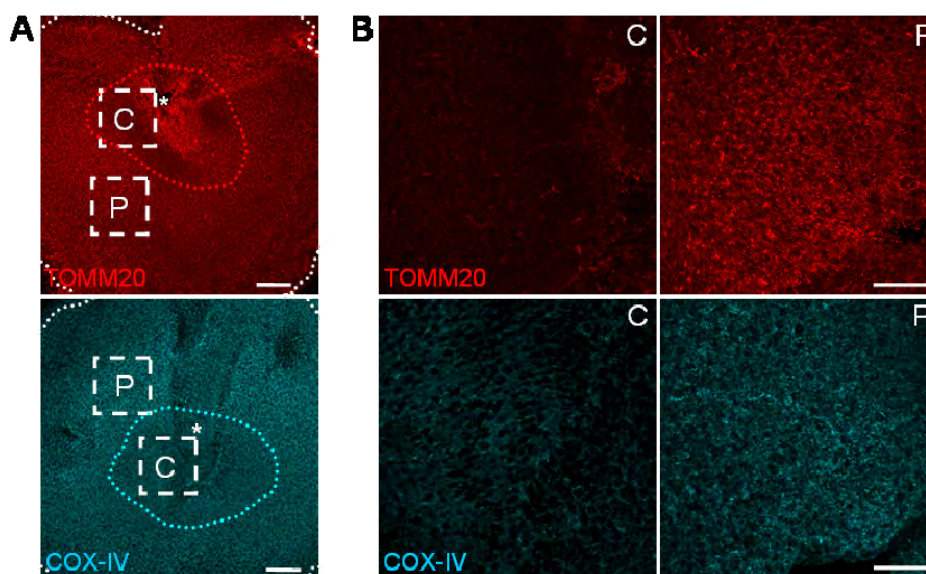


Figura 34. Distribución diferencial de la masa mitocondrial en retinas de E13.5. **A.** Imágenes de retina completa tras inmunotinción con anticuerpos frente a las proteínas mitocondriales TOMM20 y COX-IV. Barra de escala 100μm. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Imágenes de la inmunotinción para TOMM20 y COX-IV de las áreas marcadas en A. Barra de escala 50μm.

Además, la inhibición específica de mitofagia con CsA (Kim et al, 2007) (Carreira et al, 2010; Mauro-Lizcano et al, 2015) y de autofagia con 3-MA, incrementa ligeramente la masa mitocondrial en la región central de la retina (Figura 35A), pero no en la periferia (Figura 35B). Estos datos indican que la autofagia degrada mitocondrias en la región central de la retina de E13.5. En este estadio de desarrollo, se produce un proceso de muerte neural temprana, localizada fundamentalmente en la retina central (Boya & de la Rosa, 2005). Para determinar si la mitofagia contribuye a dicho proceso de muerte, se realizó una tinción de TUNEL en presencia de CsA y 3-MA. Como se observa en la figura 35, la inhibición de mitofagia y autofagia reduce la muerte en la región central de la retina (A, C), sugiriendo la implicación de la mitofagia en la muerte neural temprana.

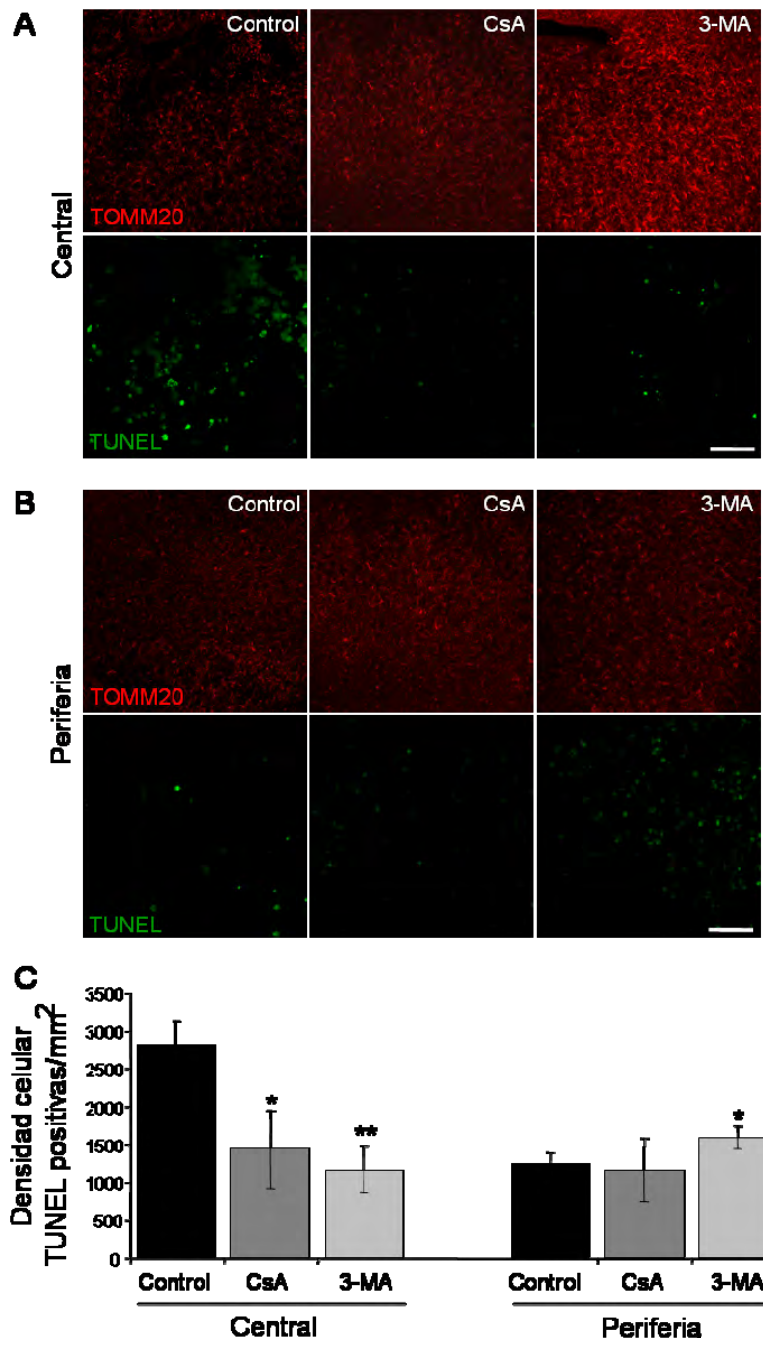


Figura 35. Degradación mitocondrial por mitofagia y su implicación en la muerte neural temprana en la región central de retinas de E13.5. A. B. Imágenes de la inmunotinción para la detección de TOMM20 y reacción de TUNEL en la región central y periférica (respectivamente) de la retina tras cultivo con CsA y 3-MA. Barra de escala 50µm. **C.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en las regiones indicadas de retinas tratadas con CsA y 3-MA. *p<0,05; **p<0,01.

No obstante, la inhibición de caspasas bloquea la muerte general de la retina sin alterar la masa mitocondrial (Figura 36).

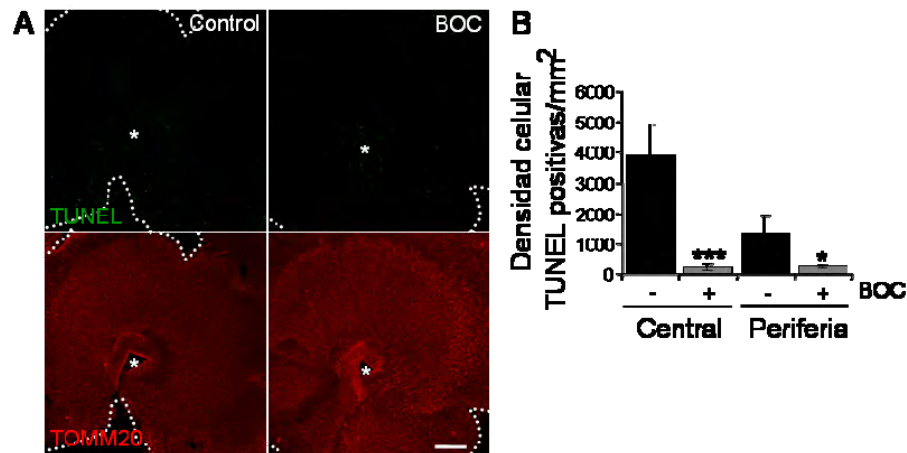


Figura 36. La inhibición de caspasas con BOC disminuye la muerte general de la retina sin alterar la masa mitocondrial. A. Imágenes de retina completa tras la reacción de TUNEL e inmunotinción de TOMM20 en retinas montadas en plano. Barra de escala 100μm. El asterisco señala el nervio óptico. B. Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en las regiones indicadas de retinas tratadas con BOC. *p<0,05; ***p<0,001.

Por otro lado, la inducción de autofagia con rapamicina y EBSS disminuye la tinción de TOMM20 en retinas de E13.5 montadas en plano. En este caso, tanto CsA como 3-MA incrementan la masa mitocondrial en toda la retina (Figuras 37A y 38A). Para corroborar si esa disminución de mitocondrias en la región central de la retina así como tras la inducción de autofagia es debida a mitofagia, se llevó a cabo el estudio de mitofagia mediante citometría de flujo, utilizando la sonda mitotracker deep red en combinación con inhibidores de autofagia y mitofagia según hemos descrito previamente en el laboratorio (Mauro-Lizcano et al, 2015). A pesar de las diferencias regionales observadas en retinas en plano, no se han detectado diferencias de masa mitocondrial a nivel basal en retina completa mediante citometría de flujo (Figuras 37 B-E y 38 B-E). Sin embargo, los tratamientos con rapamicina, AZD y EBSS disminuyen la masa mitocondrial de toda la retina, siendo un proceso dependiente de inducción de autofagia ya que se revierte con 3-MA. Además, observamos un incremento de la masa mitocondrial mediante tratamiento con CsA tras la inducción de autofagia, lo que demuestra que la inducción de autofagia está induciendo mitofagia en retinas de E13.5 (Figuras 37 y 38).

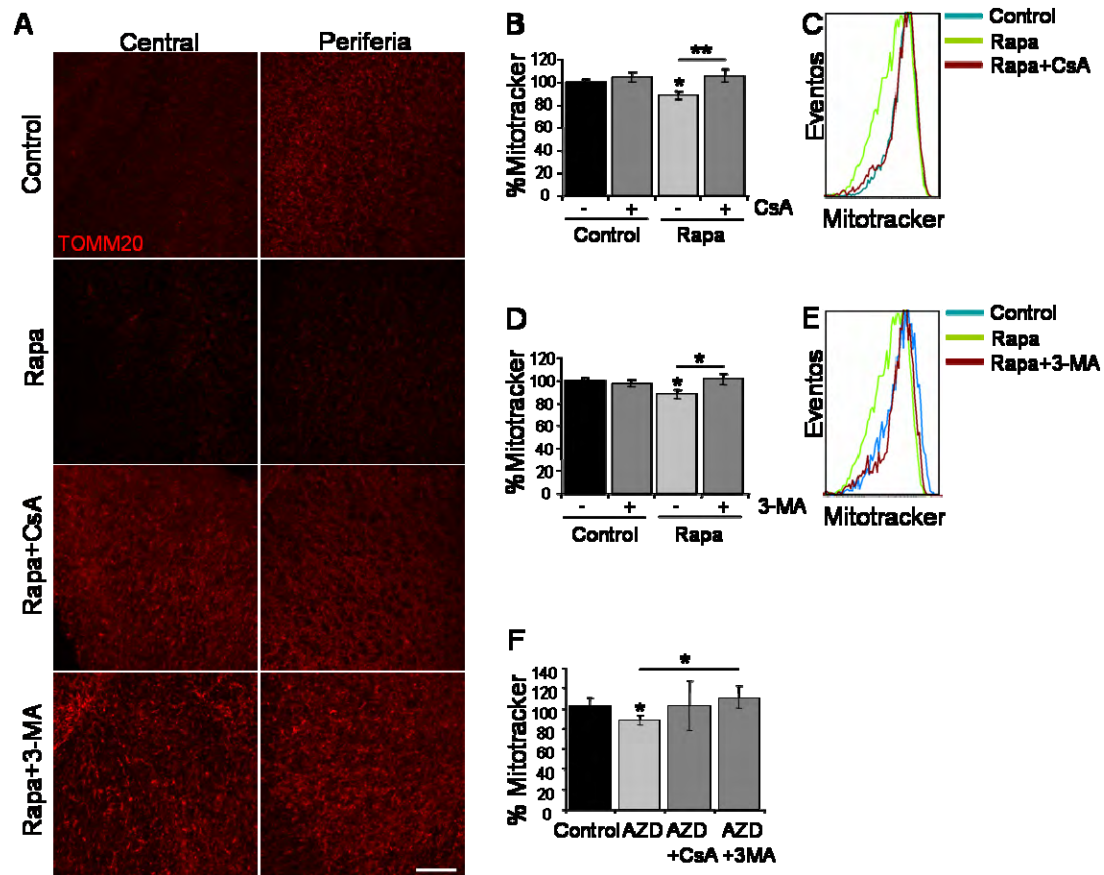


Figura 37. La inducción de autofagia con rapamicina y AZD disminuye la masa mitocondrial por inducción de mitofagia. A. Inmunotinción de TOMM20 en retinas montadas en plano tras cultivo con rapamicina, en ausencia y presencia de CsA y 3-MA. Barra de escala 50µm. B. D. Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en las condiciones descritas mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. C. E. Histogramas representativos de los datos de citometría en B y D, respectivamente. F. Disminución de la masa mitocondrial dependiente de mitofagia tras inducción de autofagia con AZD determinado mediante citometría de flujo. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

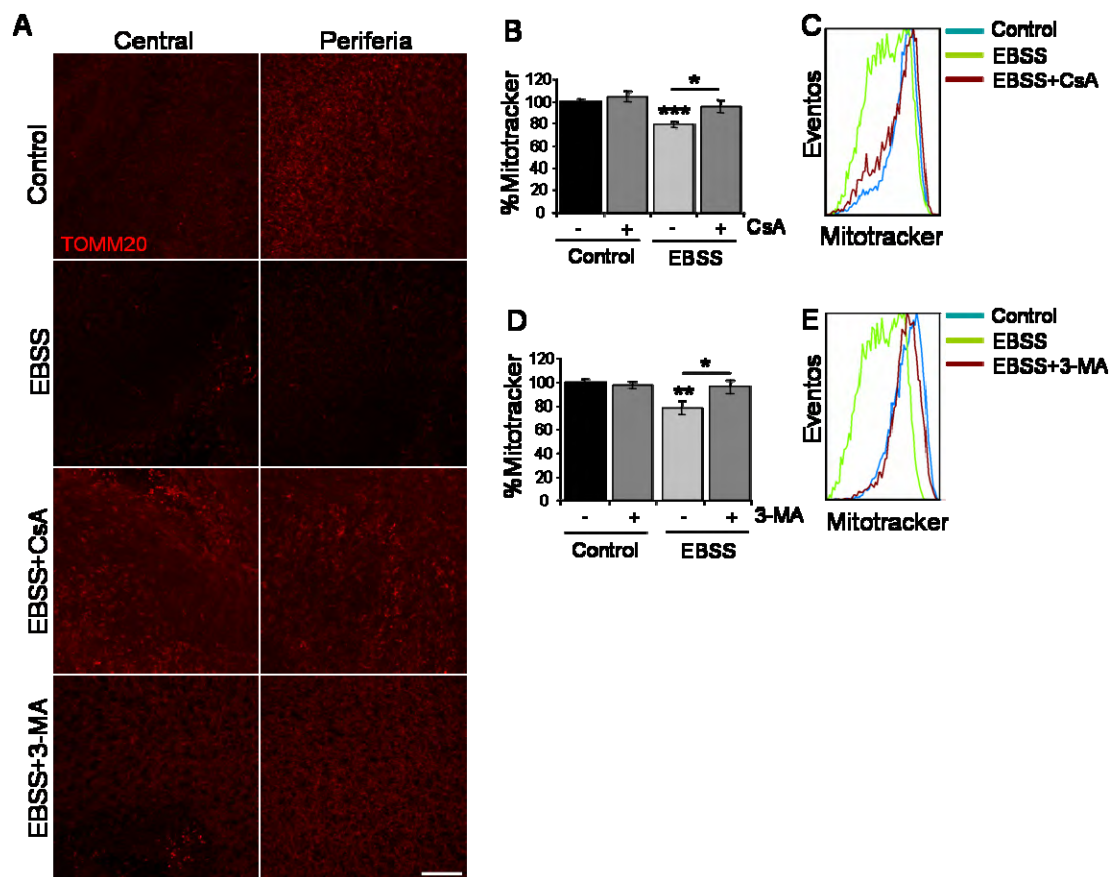


Figura 38. La inducción de autofagia con EBSS disminuye la masa mitocondrial por inducción de mitofagia. **A.** Inmunotinción de TOMM20 en retinas montadas en plano tras cultivo con EBSS, en ausencia y presencia de CsA y 3-MA. Barra de escala 50µm. **B. D.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en las condiciones descritas mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. **C. E.** Histogramas representativos de los datos de citometría en B y D, respectivamente. *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001.

A continuación se determinó si la muerte producida por inducción de autofagia era consecuencia de la inducción de mitofagia. Como se observa en la figura 39, al igual que la inhibición de autofagia (ver figuras 26, 28 y 30), la inhibición de mitofagia con CsA disminuye la muerte producida por inducción de autofagia con rapamicina en toda la retina, lo que refleja de nuevo la contribución del proceso de mitofagia en la muerte celular.

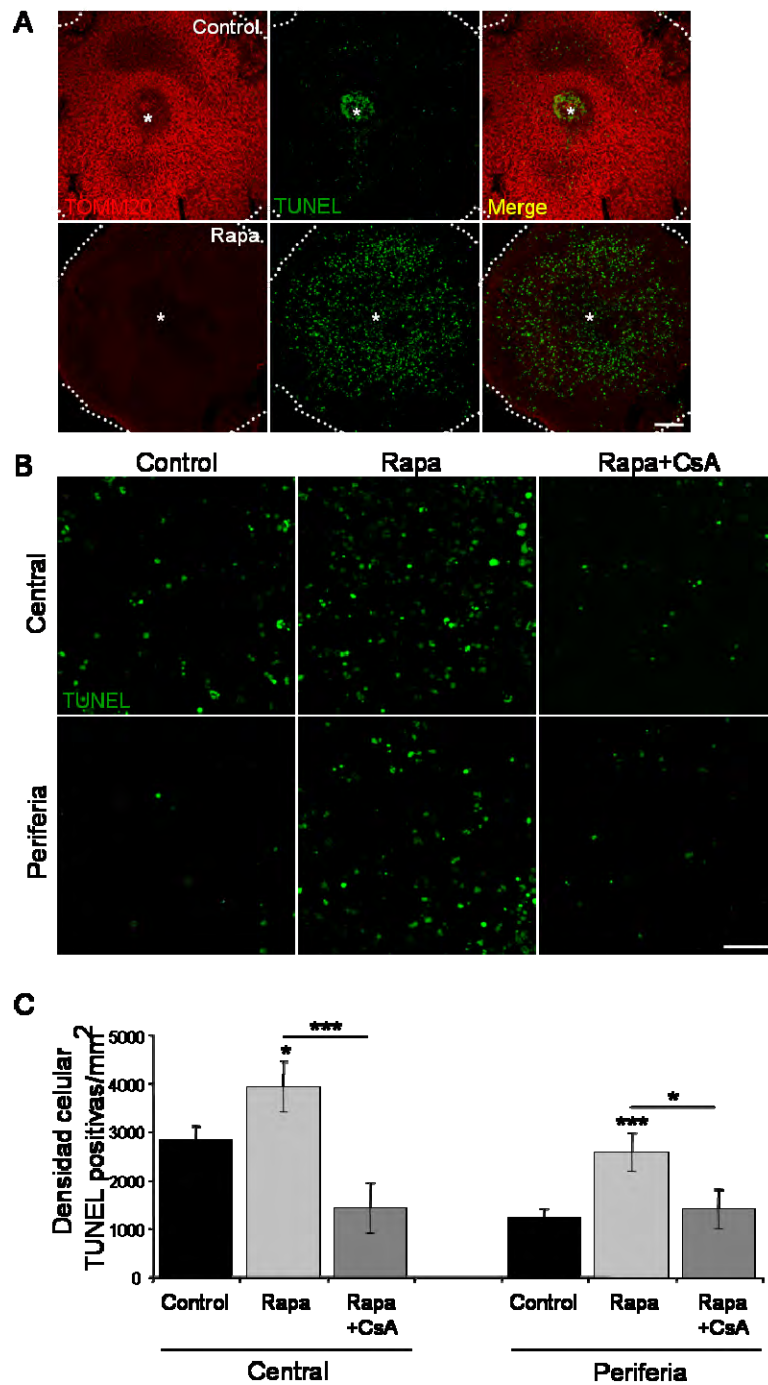


Figura 39. La muerte celular por inducción de autofagia con rapamicina en E13.5 se bloquea al inhibir mitofagia con CsA. **A.** Imágenes de retina completa donde se muestra la reacción de TUNEL e inmunotinción de TOMM20 en retinas montadas en plano tras cultivo con rapamicina. Barra de escala 100 μ m. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Imágenes de las regiones central y periférica de retinas montadas en plano tras la reacción de TUNEL. Barra de escala 50 μ m. **C.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en las regiones indicadas de retinas tratadas con rapa en ausencia/presencia de CsA. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.

En el caso de la muerte inducida por EBSS, solo se bloquea al inhibir mitofagia en la zona central de la retina, lo que refleja que el ayuno provoca muerte también por mecanismos independientes de mitofagia (Figura 40).

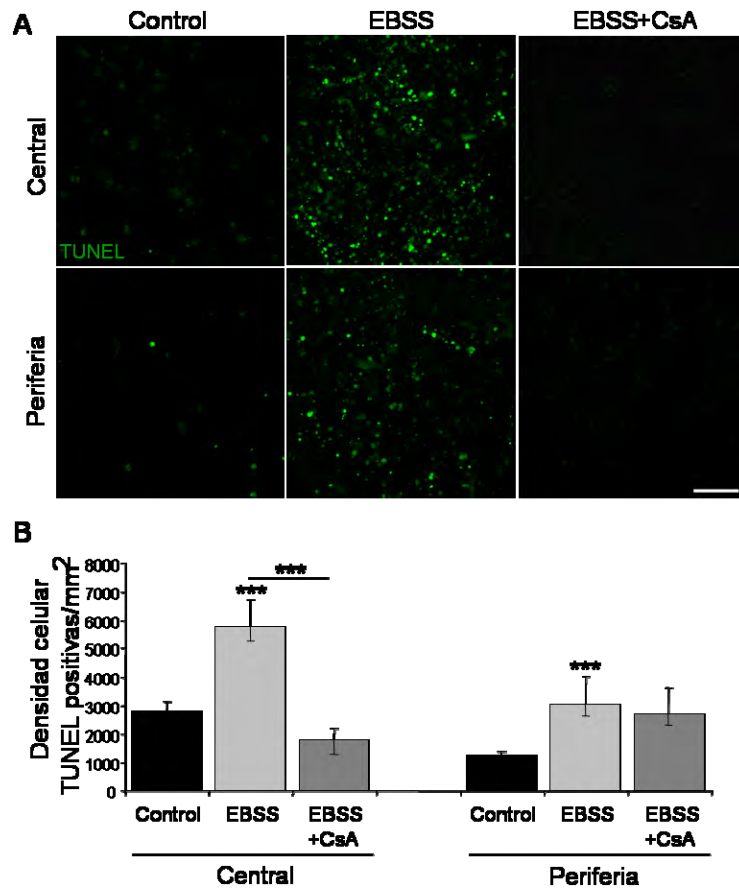


Figura 40. La muerte celular por inducción de autofagia con EBSS en E13.5 se bloquea al inhibir mitofagia con CsA. **A.** Imágenes de las regiones central y periférica de retinas montadas en plano donde se muestra la reacción de TUNEL en retinas cultivadas con EBSS en ausencia/presencia de CsA. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en las regiones indicadas de retinas tratadas con EBSS en ausencia/presencia de CsA. ***p<0,001.

Para corroborar la inducción de mitofagia en este estadio de la retina y su implicación en la muerte celular, se realizó el mismo abordaje anterior con un tratamiento inductor específico de mitofagia, la combinación de antimicina y oligomicina (AO) (Ashrafi & Schwarz, 2013; Ding & Yin, 2012; Narendra et al, 2010; Youle & van der Bliek, 2012). De nuevo se observa una disminución de la tinción de TOMM20 tras cultivo con AO en retinas en plano de E13.5, así como de mitotracker por citometría de flujo, que se bloquea en presencia de CsA y 3-MA (Figura 41 A-C). Sin embargo, la inducción específica de mitofagia no incrementa la muerte celular, y de hecho, la disminuye en la región central (Figura 41 D, E). Esto podría ser debido a la inhibición de la señal inductora de muerte celular, ya que como he mencionado anteriormente, hay mitofagia basal que produce muerte celular en la región central de retinas en E13.5 (Ver figura 35).

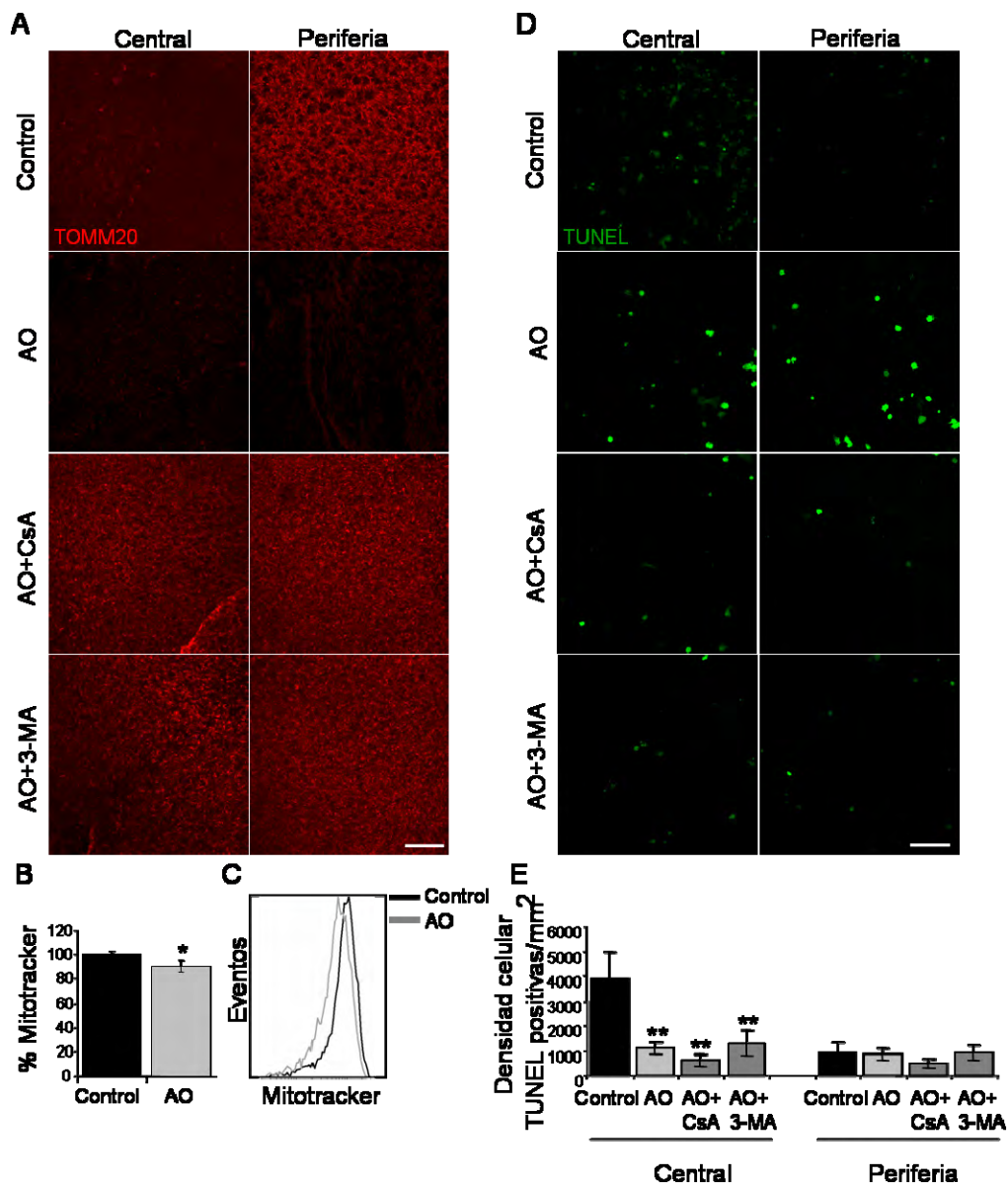


Figura 41. Inducción de mitofagia en retinas de E13.5 tras cultivo con Antimicina+Oligomicina (AO). **A.** Inmunotinción de TOMM20 en retinas montadas en plano tras cultivo con AO, en ausencia y presencia de CsA y 3-MA. Barra de escala 50 μ m. **B.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en las condiciones descritas mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. * $p < 0,05$. **C.** Histograma representativo de los datos de citometría en B. **D.** Reacción de TUNEL en retinas montadas en plano tras cultivo con AO, en ausencia y presencia de CsA y 3-MA. Barra de escala 50 μ m. **E.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en las regiones indicadas de retinas tratadas como se ha descrito** $p < 0,01$.

4. MITOFAGIA DURANTE EL DESARROLLO DE LA RETINA Y SU RELACIÓN CON EL METABOLISMO, LA DIFERENCIACIÓN Y LA MUERTE CELULAR

4.1 Mitofagia y metabolismo

Una vez confirmado que podemos modular la mitofagia a partir de cultivos organotípicos de retina embrionaria, decidimos estudiar este proceso a lo largo de todo el desarrollo de la retina. En primer lugar determinamos los niveles de masa mitocondrial en diferentes estadios embrionarios. En la figura 42 se observa tanto por inmunotinción de TOMM20 en retinas en plano (A, B) como por citometría de flujo (C, D), una disminución de la masa mitocondrial *in vivo* a medida que progresa el desarrollo de la retina. Este resultado se ha corroborado mediante western blot a distintas edades embrionarias para la detección de diferentes proteínas mitocondriales, observándose una disminución de la masa mitocondrial a partir de E15.5 (Figura 42 E). Además, retinas de E18.5 presentan menores niveles de ATP que retinas de E13.5 (Figura 42 F).

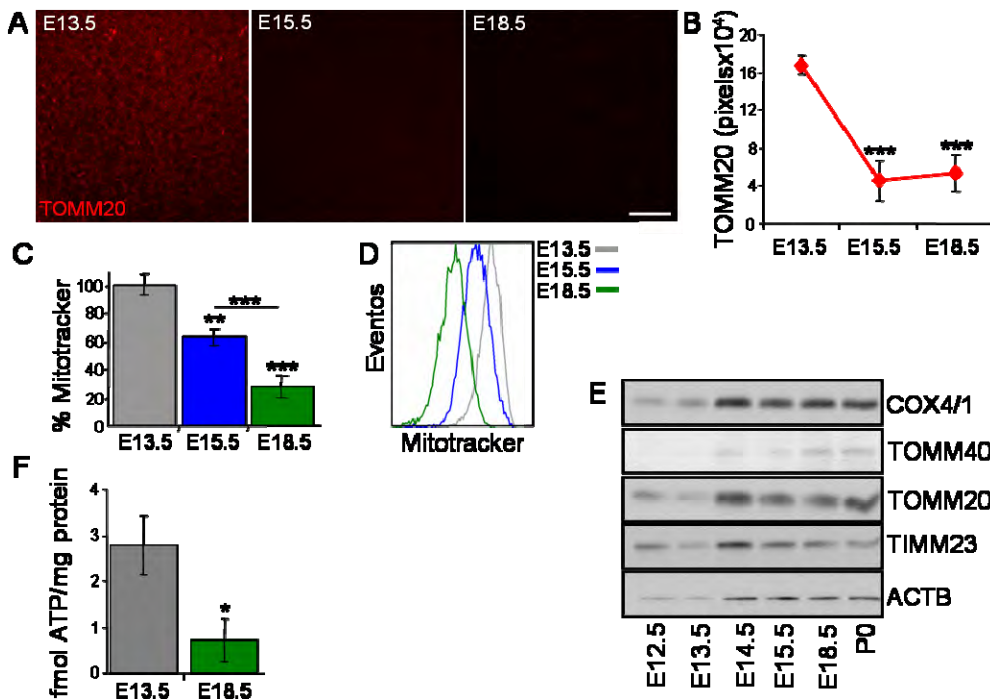


Figura 42. Disminución de la masa mitocondrial durante el desarrollo embrionario de la retina *in vivo*. **A.** Inmunofluorescencia de la proteína mitocondrial TOMM20 en retinas *in vivo* montadas en plano. Barra de escala 50µm. **B.** Área cubierta por la masa mitocondrial detectada en A. ***p<0,001. **C.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en retinas de E13.5, E15.5 y E18.5 *in vivo* mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. **p<0,01; ***p<0,001. **D.** Histograma representativo de los datos de citometría en C. **E.** Western blot de proteínas mitocondriales a partir de extractos de proteína de grupos de 3 retinas para cada una de las edades indicadas. **F.** Niveles de ATP en retinas de E13.5 y E18.5. *p<0,05.

Ese descenso de masa mitocondrial es dependiente de autofagia, ya que retinas *in vivo* de embriones deficientes de Atg5 presentan mayor marcaje de TOMM20 (Figura 43 A, B) y de masa mitocondrial determinada por citometría de flujo (Figura 43 C, D) en E15.5 y E18.5. La inhibición de autofagia con 3-MA también incrementa la masa mitocondrial en los mismos estadios que en el modelo genético. Sin embargo, la inhibición específica de mitofagia mediante CsA evita el descenso de masa mitocondrial a E15.5 pero no a E18.5, lo que sugiere que la degradación selectiva de mitocondrias únicamente tiene lugar en E15.5 (Figura 44).

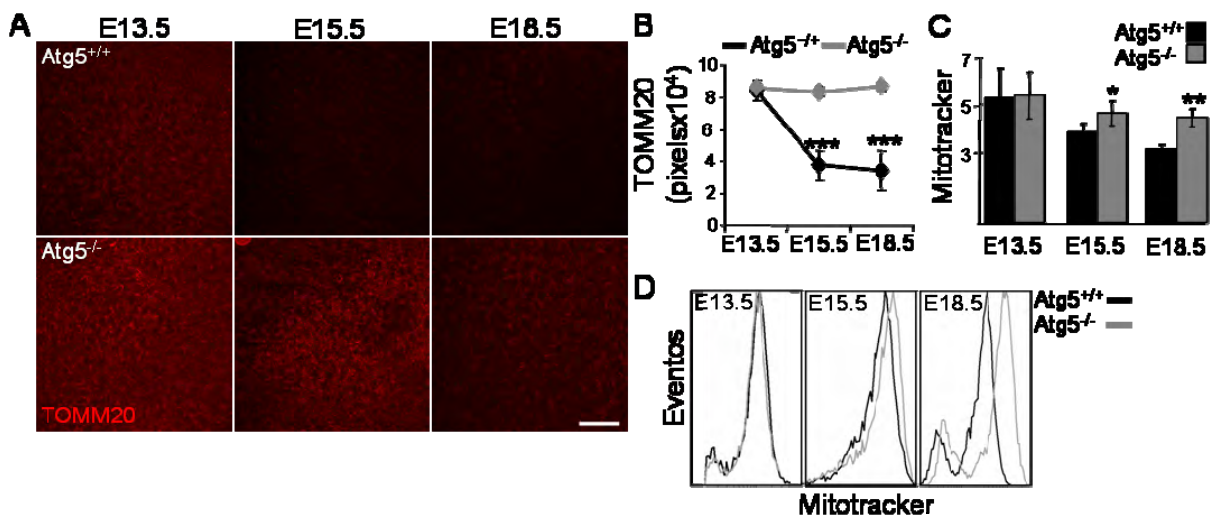


Figura 43. El descenso de masa mitocondrial durante el desarrollo embrionario de la retina está mediado por autofagia. **A.** Inmunofluorescencia de la proteína mitocondrial TOMM20 en retinas deficientes de Atg5 *in vivo* montadas en plano. Barra de escala 50µm. **B.** Área cubierta por la masa mitocondrial detectada en A. ***p<0,001. **C.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en retinas Atg5^{+/+} y Atg5^{-/-} de E13.5, E15.5 y E18.5 *in vivo* mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. *p<0,05; **p<0,01. **D.** Histogramas representativos de los datos de citometría en C.

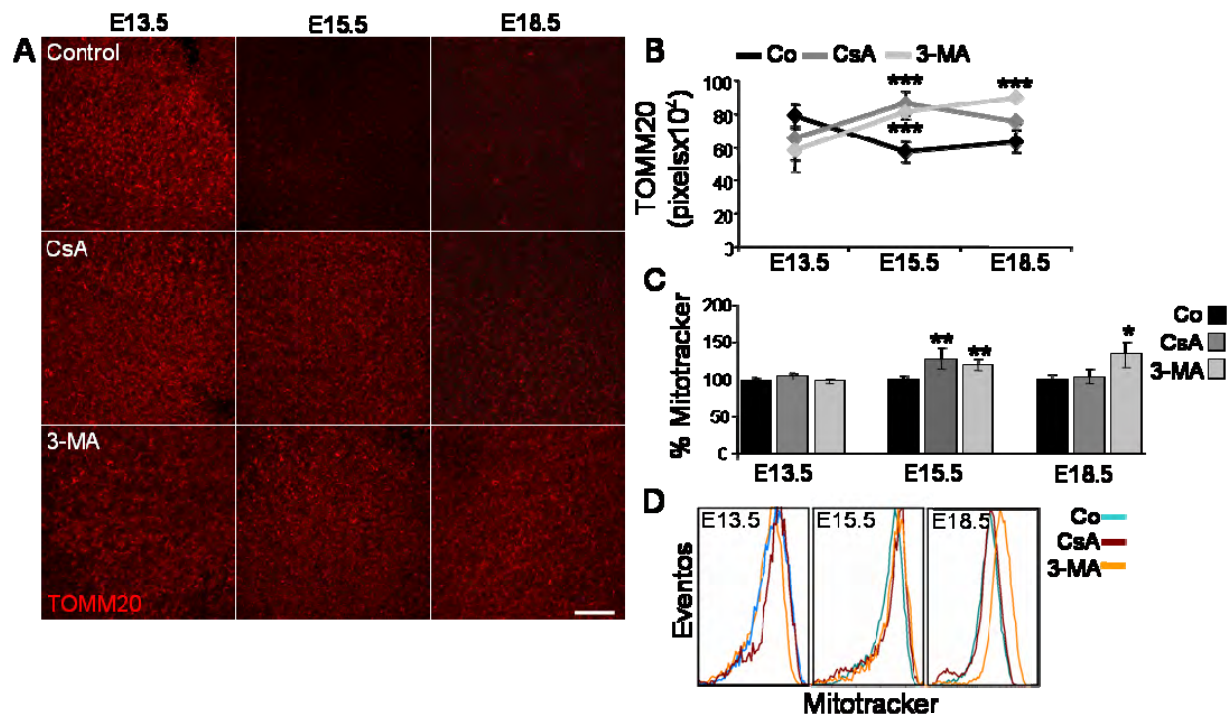


Figura 44. El descenso de masa mitocondrial durante el desarrollo embrionario de la retina está mediado por mitofagia. **A.** Inmunofluorescencia de la proteína mitocondrial TOMM20 en retinas de E13.5, E15.5 y E18.5 montadas en plano tras cultivo con CsA y 3-MA. Barra de escala 50µm. **B.** Área cubierta por la masa mitocondrial detectada en A. ***p<0,001. **C.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en retinas de E13.5, E15.5 y E18.5 montadas en plano tras cultivo con CsA y 3-MA mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. *p<0,05; **p<0,01. **D.** Histogramas representativos de los datos de citometría en C.

Esta observación ha sido confirmada en todas las edades del desarrollo embrionario de la retina desde E12.5 hasta E18.5 (Figura 45A), así como mediante western blot (Figura 45 B) e inmunotinción (Figura 45 C, D) de la proteína mitocondrial COX4/1 en retinas de E15.5. Además, el cultivo simultáneo con 3-MA y CsA no incrementa la masa mitocondrial más de lo que lo incrementan por sí solos cada uno de los inhibidores, reflejando que están en la misma vía (Figura 45 E), a pesar de que solo 3-MA inhibe el flujo de autofagia (Figura 45 F). De igual modo, retinas deficientes de Atg5 cultivadas en presencia de 3-MA no presentan un incremento mayor de masa mitocondrial, por lo que la degradación selectiva de mitocondrias en E15.5 está mediada por una autofagia dependiente de Atg5 (Figura 45 G, H).

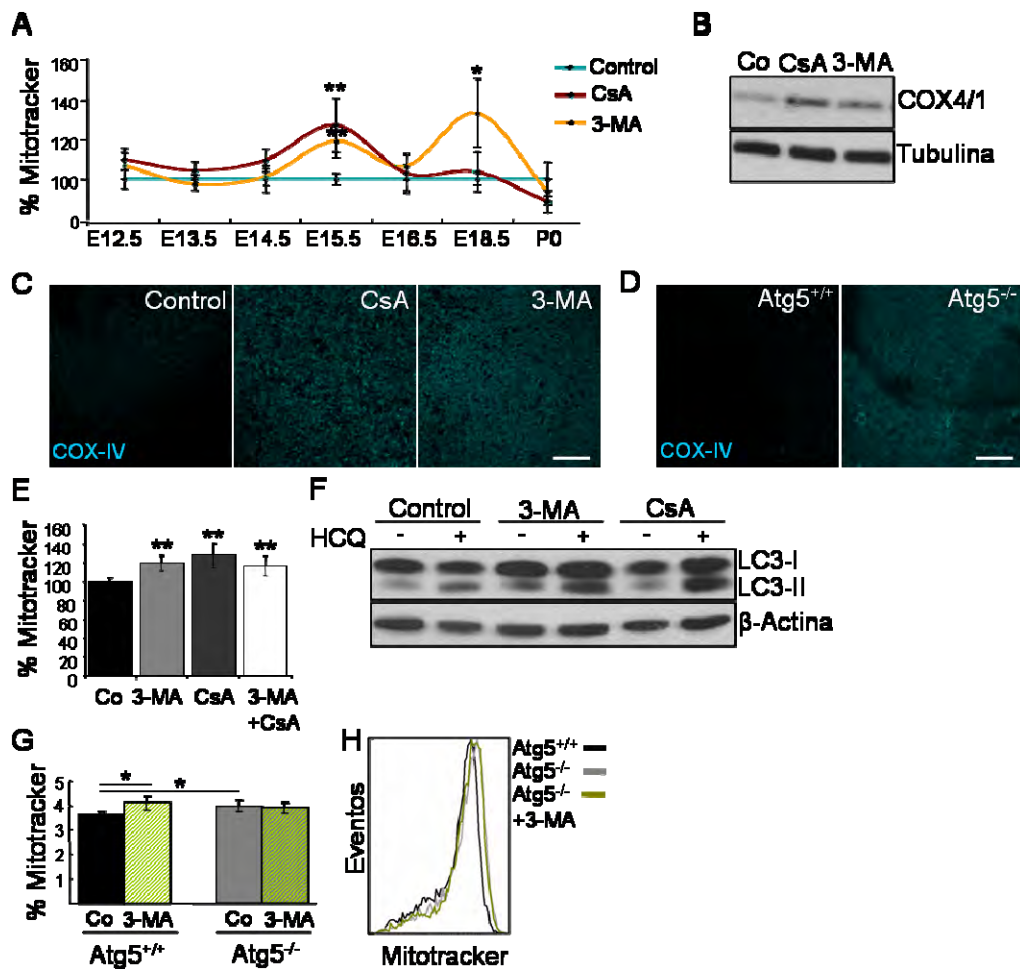


Figura 45. La degradación selectiva de mitocondrias durante el desarrollo de la retina tiene lugar en E15.5 y está mediada por autofagia dependiente de Atg5. **A.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial a lo largo de todo el desarrollo embrionario con retinas cultivadas con CsA y 3-MA mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. **B.** Western blot de retinas en E15.5 tratadas con CsA y 3-MA de la proteína mitocondrial COX4/1. **C. D.** Inmunofluorescencia de la proteína mitocondrial COX-IV en retinas tratadas con CsA y 3-MA y en retinas deficientes de Atg5 *in vivo* montadas en plano, respectivamente. Barra de escala 50 μ m. **E.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en retinas de E15.5 cultivadas con 3-MA, CsA y tratamiento combinado de 3-MA+CsA mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. ** $p < 0,01$. **F.** Western blot para la detección del flujo de autofagia al bloquear la degradación lisosomal con HCQ en retinas cultivadas con 3-MA y CsA. **G.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en retinas deficientes de Atg5 cultivadas en ausencia/presencia de 3-MA. **H.** Histograma representativo de los datos de citometría en G.

La homeostasis mitocondrial se regula por una fina coordinación entre los procesos de fusión, fisión, biogénesis mitocondrial y mitofagia (Chen & Chan, 2005; Hock & Kralli, 2009; Palikaras et al, 2015). El estudio de la expresión génica mediante transcriptómica muestra que no hay cambios en la expresión *Tfam* y *Nfe2l1*, aunque sí una ligera disminución en la expresión de *Ppargc1 α* en E14.5, por lo que no hay cambios drásticos de la biogénesis mitocondrial durante el desarrollo embrionario de la retina (Figura 46A). Por otro lado, si se observa una bajada de la expresión de

Mitofusina 2 (Mtf2) en E15.5 (Figura 46B), que podría favorecer la pérdida de una estructura mitocondrial alargada y la mitofagia (Gomes et al, 2011). Estos datos han sido confirmados mediante RT-PCR de *Ppargc1a* y *Tfam*, lo que destaca el papel de la mitofagia como proceso implicado en la homeostasis mitocondrial en dichos estadios (Figura 46C).

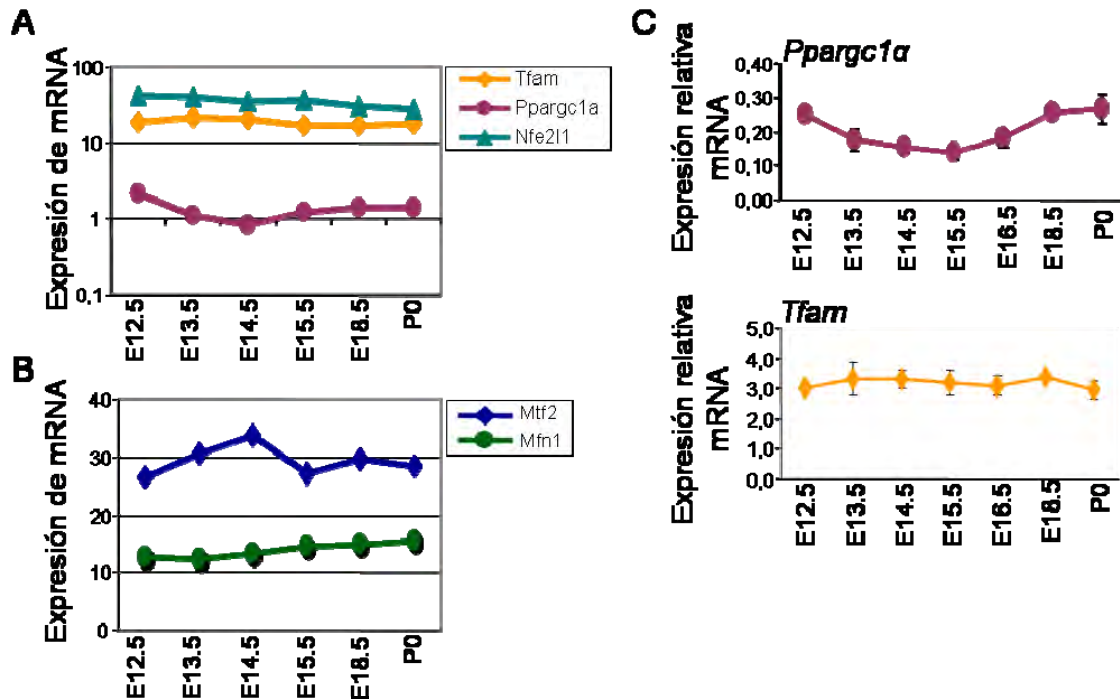


Figura 46. La disminución de masa mitocondrial durante el desarrollo de la retina no es debida a una disminución de la biogénesis mitocondrial. A. Expresión de mRNA de genes reguladores de biogénesis mitocondrial mediante transcriptómica a partir de RNAs de retinas en los estadios mostrados. **B.** Expresión de mRNA de Mitofusinas 1 y 2 mediante transcriptómica a partir de RNAs de retinas en los estadios mostrados. **C.** Expresión relativa de mRNA de los genes *Ppargc1a* y *Tfam* determinados mediante RT-PCR.

En un estudio en colaboración con el grupo de Marcos Malumbres (CNIO), hemos demostrado que la mitofagia es necesaria para un cambio metabólico hacia glicólisis durante el arresto mitótico (Domenech et al, 2015; Esteban-Martinez et al, 2015). Debido a que la mitofagia degrada mitocondrias durante el desarrollo de la retina, decidimos estudiar si este proceso tenía una relación con un cambio metabólico durante la fisiología de la retina, para lo que se realizó espectometría de masas de retinas en distintos estadios. En la figura 47A, se observa un incremento de metabolitos de la glicólisis posterior al pico de mitofagia descrito en E15.5. Además, se realizó un análisis de la actividad glicolítica mediante la determinación de la acidificación del medio extracelular (ECAR, de *extracellular acidification rate*) por incremento en la producción de lactato mediante Seahorse. Durante el desarrollo de la retina, se produce

un incremento de ECAR en retinas de E15.5 (Figura 47B) que se bloquea en presencia de CsA y 3-MA (Figura 47C), así como en retinas deficientes de Atg5 (Figura 47D), por lo que la mitofagia parece ser responsable del incremento en glicólisis. Para determinar si también se producen cambios a nivel de expresión génica, se realizó un estudio transcriptómico de retinas procedentes de embriones de ratón de distintos estadios. Como se observa en la figura 47E, F, hay un incremento en la expresión de enzimas glicolíticas a partir del pico de mitofagia de E15.5. Además, la mitofagia está implicada en ese incremento de expresión génica, ya que la inhibición de mitofagia con CsA y de autofagia con 3-MA disminuye la expresión de varias enzimas reguladoras de glicólisis (Figura 47G). Estos datos muestran que la mitofagia es responsable de un cambio metabólico hacia glicólisis durante el desarrollo de la retina de ratón.

Para determinar si esa modulación metabólica es un proceso fisiológico específico de retina o se produce también en otros contextos fisiológicos, decidimos estudiar si se producía mitofagia o no en macrófagos, debido a las diferencias metabólicas entre macrófagos M1 y macrófagos M2. En respuesta a patógenos o daño tisular, las células del sistema inmune deben adaptar rápidamente sus programas metabólicos para poder llevar a cabo sus funciones y los macrófagos polarizan en distintos subtipos funcionales en respuesta a diferentes tipos de estímulo o citocinas. El programa de activación clásico en macrófagos (observado en macrófagos M1) se produce mediante combinación de componentes microbianos, como lipopolisacárido (LPS) e interferon- γ . La activación de los macrófagos antiinflamatorios de tipo M2 se produce por citoquinas como IL-4 e IL-13 (O'Neill & Hardie, 2013). En macrófagos M1 son necesarios los programas metabólicos de reconfiguración de fosforilación oxidativa a glicólisis aerobia y la ruta de las pentosas fosfato (PPP) para llevar a cabo su función proinflamatoria. Por el contrario, los macrófagos M2 utilizan principalmente la oxidación de ácidos grasos y un incremento en la biogénesis mitocondrial para producir ATP y poder reductor para sus necesidades metabólicas (O'Neill & Hardie, 2013).

El protocolo experimental utilizado para estos experimentos está representado en la figura 48A. A partir de macrófagos extraídos de la cavidad peritoneal de ratón, determinamos mediante citometría de flujo que efectivamente los macrófagos M2 tenían más masa mitocondrial que los de tipo M1 (Figura 48B, C). Además, esa disminución de masa mitocondrial en M1 es debida a mitofagia, ya que se bloquea con CsA y 3-MA (Figura 48D, E); bloqueo que no se observa en los de tipo M2 (Figura 48F, G). Tras la activación con citoquinas de tipo proinflamatorio, los macrófagos adquieren una morfología redondeada característica de los M1, mientras que la activación con citoquinas antiinflamatorias conlleva la adquisición de una morfología alargada propia de macrófagos M2. En la figura 48H observamos como la inhibición de mitofagia en macrófagos M1 produce un cambio en la morfología, siendo más similares a macrófagos M2 con morfología alargada. Estos datos reflejan que la mitofagia es necesaria para adquirir el fenotipo de macrófagos M1, por lo que podría estar modulando la diferenciación hacia macrófagos proinflamatorios M1.

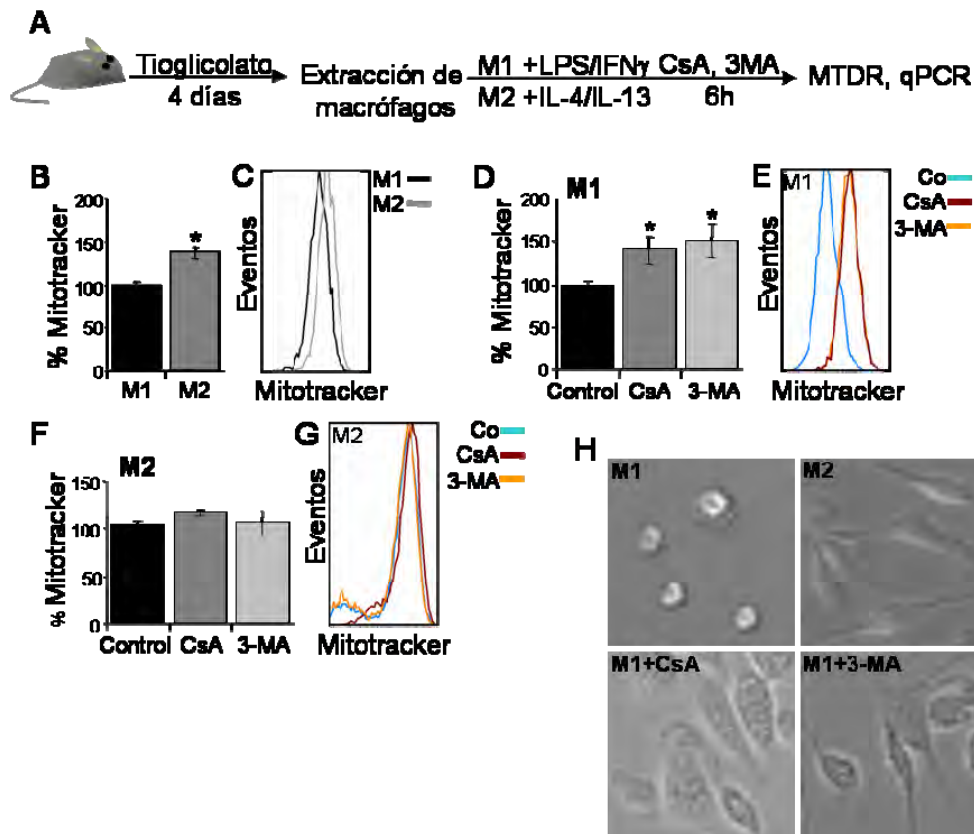


Figura 48. Degradación de mitocondrias por mitofagia en macrófagos de tipo M1. **A.** Esquema del protocolo experimental seguido para la obtención de macrófagos de tipo M1 mediante estimulación con LPS e IFN γ y macrófagos de tipo M2 mediante estimulación con IL-4 e IL-13. **B.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en macrófagos M1 y M2 mediante citometría de flujo utilizando la sonda Mitotracker Deep Red. * $p < 0,05$. **C.** Histograma representativo de los datos en B. **D.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en macrófagos M1 tras cultivo con CsA y 3-MA. * $p < 0,05$. **E.** Histograma representativo en D. **F.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial en macrófagos M2 tras cultivo con CsA y 3-MA. **G.** Histograma representativo de F. **H.** Imágenes representativas de microscopio de fluorescencia que muestran la morfología de los macrófagos en las condiciones empleadas.

4.2 Mitofagia y diferenciación de las células ganglionares de la retina de ratón

Nuestros datos demuestran que el proceso de mitofagia observado en retina se produce en un estadio embrionario muy concreto: E15.5. Los distintos tipos celulares de la retina madura se desarrollan a partir de un grupo común de progenitores multipotentes mediante un proceso dinámico espacio-temporal en el siguiente orden: células ganglionares, células horizontales, conos, células amacrinas durante el desarrollo embrionario, y células bipolares, bastones y glía de Müller durante el desarrollo postnatal (Zagozewski et al, 2014). Varias familias de factores de transcripción mantienen la pluripotencia de los progenitores, especifican el destino de las células de la retina y promueven su diferenciación (Zagozewski et al, 2014).

A partir de los datos de transcriptómica realizado con RNAs procedentes de retinas en diferentes estadios, se han elaborado varios *heatmaps* con los diferentes factores de transcripción que regulan el mantenimiento de los progenitores así como la generación de los distintos tipos celulares de la retina. Como se observa en la figura 49A, la retina continua siendo proliferativa fundamentalmente hasta P0. La salida de ciclo celular durante la retinogénesis temprana se correlaciona con la expresión inicial de *Atoh7*, un factor de transcripción expresado en progenitores necesario para el desarrollo del primer tipo celular diferenciado en la retina, las células ganglionares (Gao et al, 2014). *Atoh7* y otros factores de transcripción específicos de progenitores de RGCs, como *Pax6*, *Hes1* y *Sox11*, disminuyen su expresión a partir de E15.5, mientras que se mantiene la expresión de factores de transcripción específicos de progenitores de otros tipos celulares de la retina que se desarrollan más tardíamente.

Además, en los *heatmaps* realizados para la expresión de genes específicos de cada tipo celular de la retina, observamos que a E15.5 se produce un incremento en la expresión de genes propios de RGCs diferenciadas como *Pou4f1* (también denominado *Brn3a*), *Sncg*, *LICAM* y diferentes *Semaforinas* (Gao et al, 2014), mientras que otros tipos celulares se diferencian más tardíamente (Figura 49B-G). Estos datos reflejan que el pico de mitofagia observado durante el desarrollo de la retina se produce durante los estadios de la diferenciación de las células ganglionares.

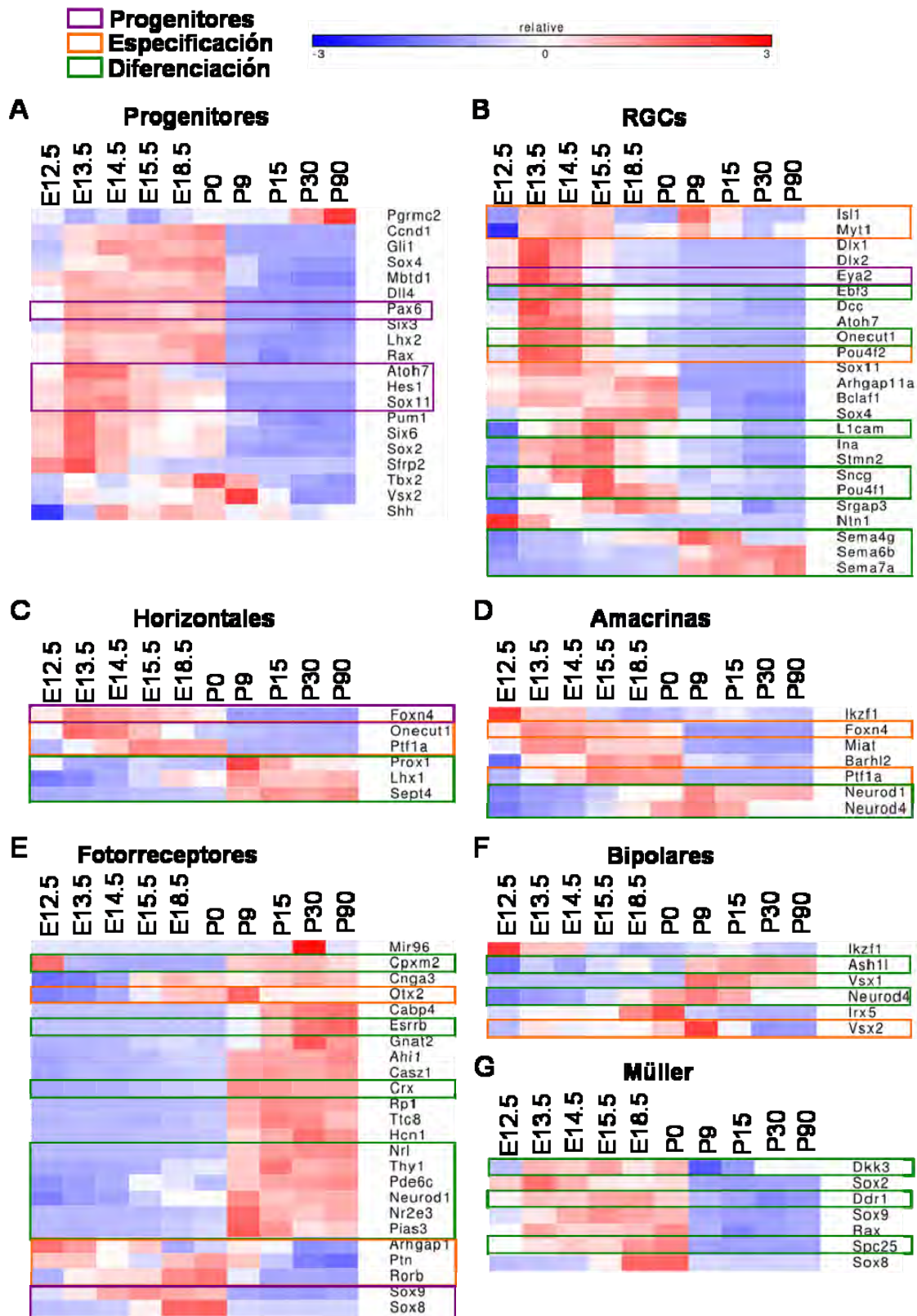


Figura 49. Expresión de los genes reguladores del mantenimiento de progenitores y diferenciación de los distintos tipos celulares de la retina realizados a partir del estudio de transcriptómica con retinas a diferentes estadios embrionarios y postnatales. **A.** *Heatmap* de expresión de genes característicos de progenitores de la retina. **B.** *Heatmap* de genes expresados en linaje de RGCs. **C-G.** *Heatmaps* de genes expresados en el linaje de células horizontales, amacrinas, fotorreceptores, bipolares y glía de Müller.

A partir de retinas montadas en plano podemos estudiar el proceso de diferenciación de RGCs, que sigue un patrón centro-periférico, de manera que las células más maduras (M, de *mature*) se localizan en la retina central y las recién diferenciadas (Y, de *young*) en la retina periférica. Mediante inmunofluorescencia del factor de transcripción específico de células ganglionares diferenciadas *Brn3a* en retinas montadas en plano, hemos confirmado el incremento en diferenciación de RGCs a E15.5 (Figura 50 A-C).

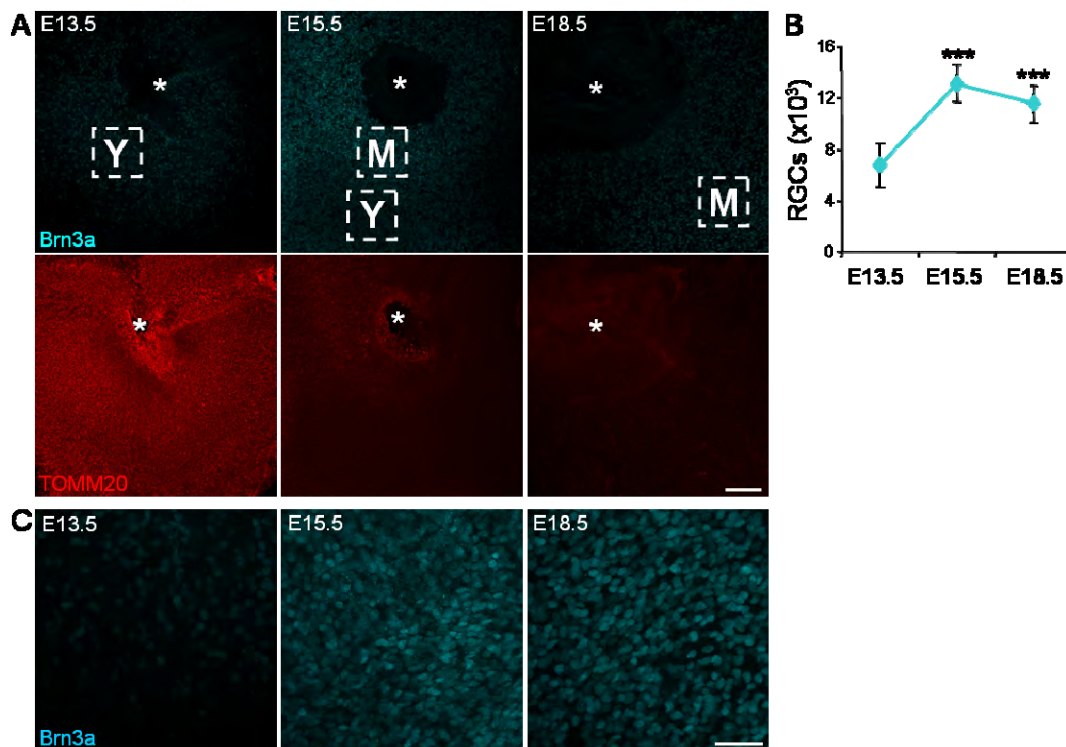


Figura 50. Esquema que muestra el patrón de diferenciación centro-periférico de las RGCs de la retina. En E13.5, las RGCs recién diferenciadas se localizan en la región central de la retina. En E15.5 podemos distinguir RGCs más maduras en la región central y otras recién diferenciadas en la región periférica. En E18.5 prácticamente todas las RGCs han completado su maduración. **A.** Inmunotinción con el anticuerpo *Brn3a* para la detección de RGCs y *TOMM20* para el marcaje mitocondrial. Barra de escala 100 μ m. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Cuantificación del número de RGCs en retinas *in vivo* a E13.5, E15.5 y E18.5. *** $p < 0,001$. **C.** Imágenes de las áreas señaladas en A: región Y en E13.5; región Y en E15.5 y región M en E18.5. Barra de escala 50 μ m.

Durante las etapas embrionarias del desarrollo de la retina de ratón, se pueden distinguir fundamentalmente dos capas: la capa de neuroblastos externa, constituida principalmente por células progenitoras mitóticas, y la capa neuroblástica interna, donde residen las neuronas recién diferenciadas (principalmente células ganglionares). Mediante inmunofluorescencia de *TOMM20* en secciones de ojos de diferentes estadios

embrionarios, observamos una disminución de la masa mitocondrial a partir de E15.5 en toda la retina, siendo más acusada en la capa de RGCs (Figura 51).

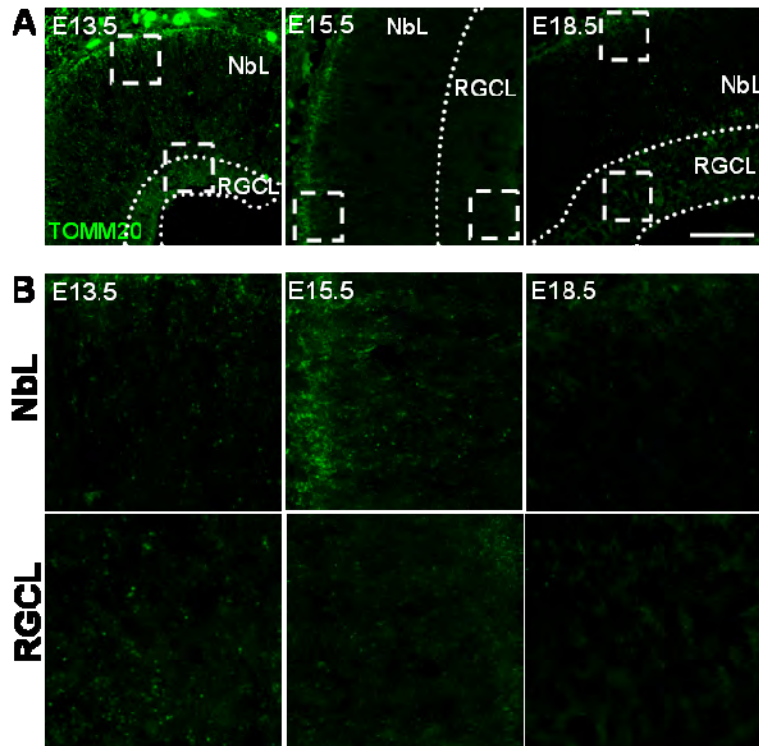


Figura 51. La disminución de la masa mitocondrial durante el desarrollo de la retina se produce en toda la retina, siendo más acusada en la capa de RGCs. A. Inmunotinción de TOMM20 en secciones de ojos embrionarios a E13.5, E15.5 y E18.5. NbL: capa de neuroblastos; RGCL: capa de células ganglionares. Barra de escala 75 μ m. **B.** Ampliación de las áreas señaladas en la capa de neuroblastos y de células ganglionares.

Además, mediante microscopía electrónica se puede observar claramente que en la capa de RGCs las células presentan mitocondrias hinchadas, con acumulación de materiales electrón-densos y crestas mitocondriales desorganizadas, siendo menor el número de mitocondrias por célula en esta capa (Figura 52 A-D). Estas características son propias de mitocondrias dañadas. En relación con la mitofagia determinada en E15.5, el bloqueo de la degradación lisosomal con HCQ permite observar mitocondrias englobadas en autofagosomas en la capa de RGCs (Figura 52 E), confirmando mediante microscopía electrónica la activación de la mitofagia. Estos datos sugieren que la autofagia degrada mitocondrias durante el desarrollo de las RGCs.

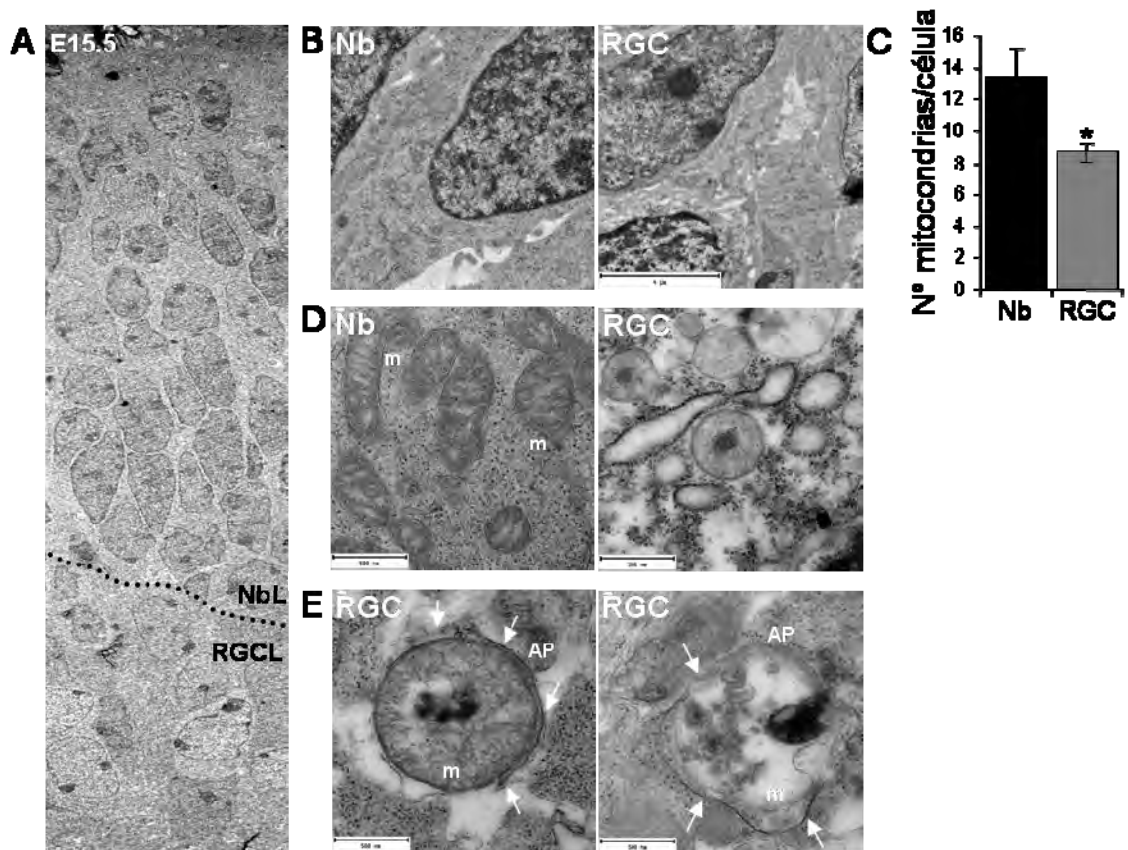


Figura 52. Determinación de mitofagia en retinas a E15.5 mediante microscopía electrónica. **A.** Imagen que muestra la capa de neuroblastos y la capa de RGCs en retinas de E15.5. **B.** Imagen representativa de un neuroblasto (NB), con gran cantidad de mitocondrias, y una RGC, con menor cantidad de mitocondrias. **C.** Cuantificación del número de mitocondrias por célula a partir de imágenes de microscopía electrónica. * $p < 0,05$. **D.** Las mitocondrias en la capa de neuroblastos son alargadas y con crestas mitocondriales organizadas. Por el contrario, las mitocondrias de la capa de RGCs están hinchadas, con crestas mitocondriales desorganizadas y acúmulos de materiales electrón-densos. **E.** Etapa inicial de la formación del autofagosoma alrededor de una mitocondria (izquierda) y mitocondria en el interior de un autofagosoma (derecha) en la capa de RGCs. AP: autofagosoma; m: mitocondria. Las flechas indican la doble membrana del autofagosoma.

A continuación se determinó el papel de la mitofagia en el proceso de diferenciación de las RGCs. Retinas deficientes de Atg5 presentan una disminución en el número de células Brn3a positivas en un estadio temprano de la diferenciación (E13.5), así como en toda la retina a E15.5 (Figura 53 A, B). En esas regiones se observa un incremento de masa mitocondrial (Figura 53 C, D) acorde al bloqueo de mitofagia previamente descrito. Además, mediante inmunotinción de RGCs con β -III-tubulina en secciones de ojos en E13.5 y E15.5, se observa una disminución de RGCs en la capa interna de ojos deficientes de Atg5, presentando además una diferenciación ectópica (Figura 53 E). En retinas en plano se observa una distribución anómala de los axones de RGCs en toda la retina (Figura 53 F). Estos resultados muestran una

alteración en la diferenciación y axonogénesis de las RGCs en embriones deficientes de Atg5.

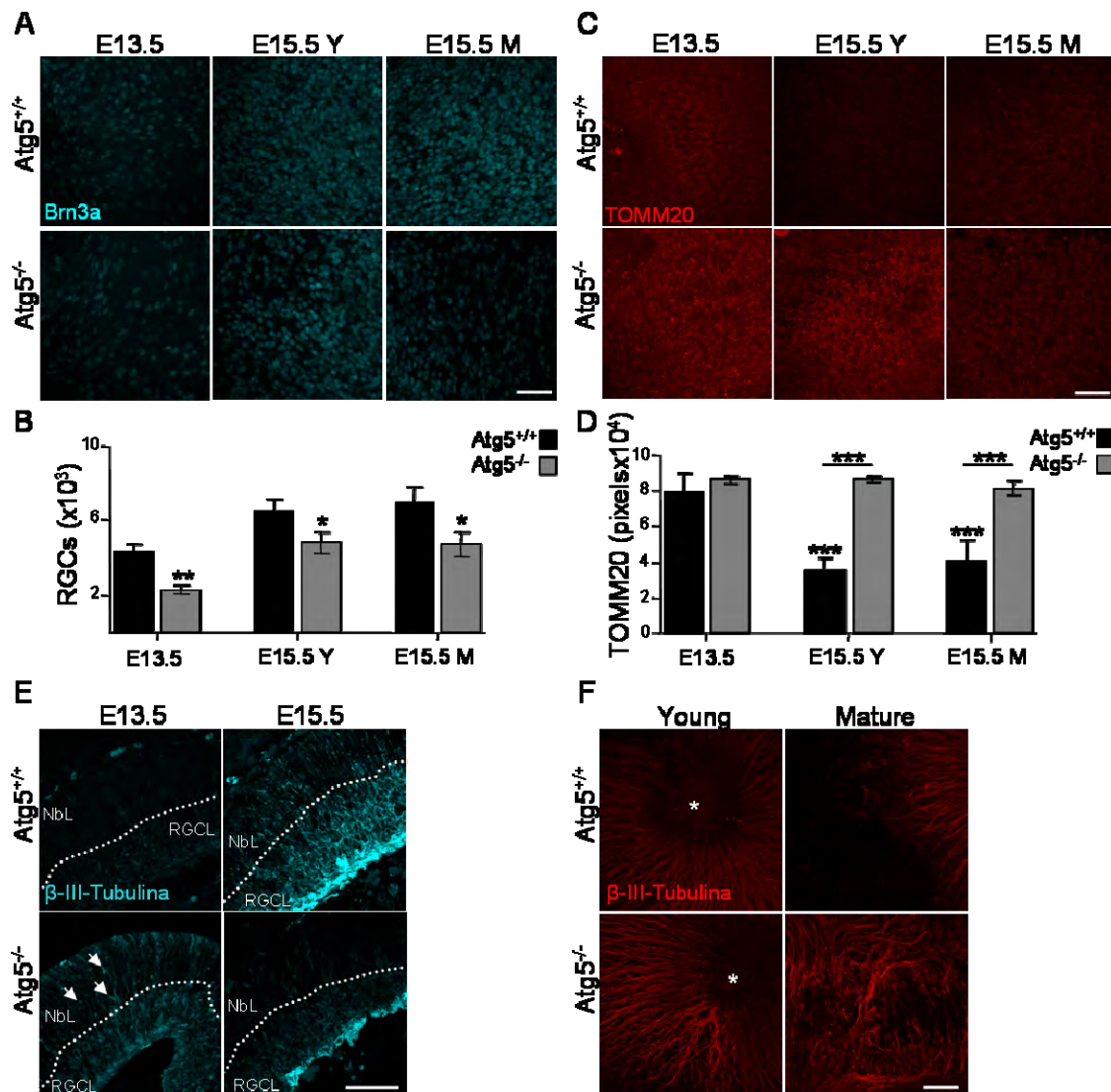


Figura 53. Retinas deficientes de Atg5 presentan alterada la diferenciación de RGCs. A. Imágenes de la región donde se inicia la diferenciación en retinas de E13.5 y de las regiones Y (de *young*, menos madura) y M (de *mature*) donde se muestra la inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas en plano. Barra de escala 50µm. B. Cuantificación del número de RGCs en A. *p<0,05; **p<0,01. C. Inmunotinción de TOMM20 de las retinas mostradas en A. D. Área cubierta por la masa mitocondrial detectada en C. ***p<0,001. E. Inmunotinción de β-III-tubulina para la detección de RGCs en secciones de ojos Atg5^{+/+} y Atg5^{-/-} de embriones en E13.5 y E15.5. Barra de escala 75µm. La línea discontinua separa las capas NbL y RGCL. Las flechas indican la diferenciación ectópica. F. Inmunotinción que muestra la distribución de los axones de las RGCs en retinas en plano de ratones deficientes de Atg5. Barra de escala 50µm. El asterisco señala el nervio óptico.

A nivel farmacológico, a diferencia de la inhibición genética de autofagia, solo se observa una disminución de RGCs en la región periférica menos madura de retinas en E15.5 (Figura 54 A, B). Estas diferencias entre el modelo genético y el farmacológico

pueden deberse al efecto más acusado de la inhibición crónica en retinas $Atg5^{-/-}$ o bien a otras posibles funciones de $Atg5$ independientes de autofagia (Codogno et al, 2011). No obstante, las diferencias observadas en RGCs entre retinas $Atg5^{+/+}$ y $Atg5^{-/-}$ son mayores cuanto menos madura es la retina (Figura 54 C), por lo que la regulación de la generación de RGCs mediada por mitofagia se produce en el paso inicial de la diferenciación. La distribución anómala de los axones de RGCs observadas en retinas deficientes de $Atg5$ también se produce mediante el tratamiento farmacológico con CsA y 3-MA (Figura 54 D).

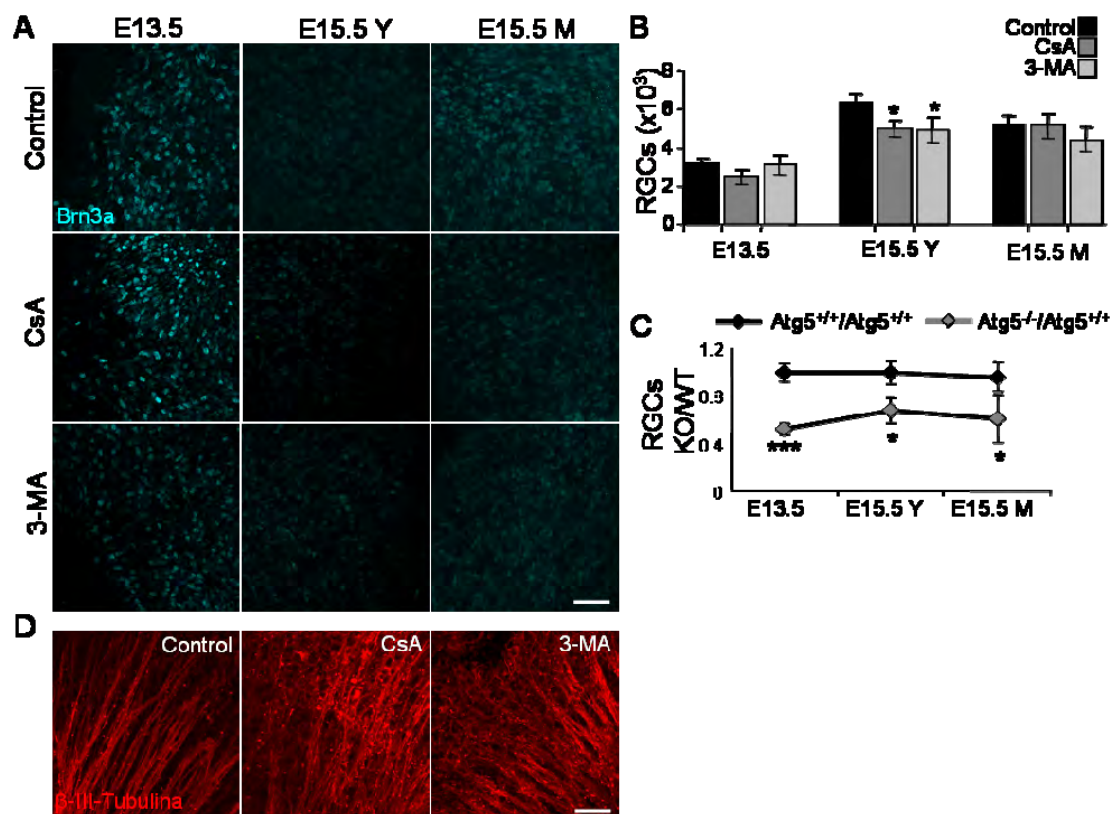


Figura 54. Disminución de la diferenciación de RGCs en la región menos madura de retinas en E15.5 tras inhibición farmacológica de mitofagia con CsA y 3-MA. A. Imágenes de la región donde se inicia la diferenciación en retinas de E13.5 y de las regiones Y (de *young*, menos madura) y M (de *mature*) donde se muestra la inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas en plano. Barra de escala 50 μ m. **B.** Cuantificación del número de RGCs en A. * $p < 0,05$. **C.** Representación del cociente del número de RGCs entre retinas $Atg5^{-/-}$ y $Atg5^{+/+}$ que muestra mayores diferencias en el número de RGCs cuanto menos madura es la retina. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. **D.** Inmunotinción que muestra la distribución de los axones de las RGCs en retinas en plano cultivadas con CsA y 3-MA. Barra de escala 50 μ m.

A continuación se determinó si la implicación de la mitofagia en la diferenciación tiene relación con el cambio metabólico hacia glicólisis previamente observado. Para ello, se moduló el metabolismo glicolítico directamente y se analizó la

diferenciación de las RGCs. Como se observa en la figura 55 (A, B), la inhibición de la glicólisis mediante 3-PO y 2-DG disminuye el número de células Brn3a positivas únicamente en la región más madura de la retina a E15.5.

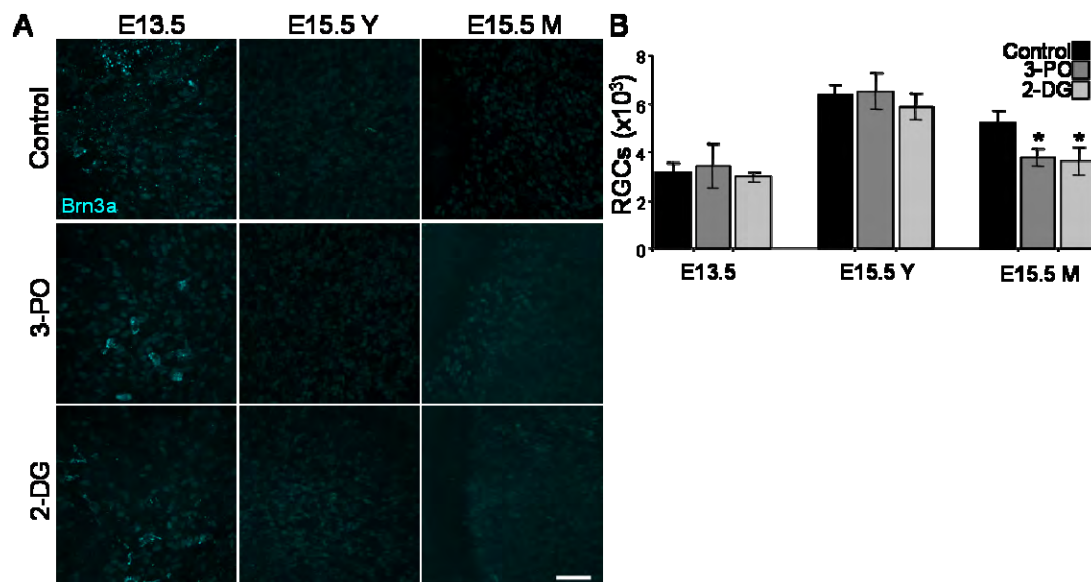


Figura 55. Disminución de la diferenciación de RGCs en la región más madura de retinas en E15.5 tras la inhibición farmacológica de la glicólisis con 3-PO y 2-DG. **A.** Imágenes de la región donde se inicia la diferenciación en retinas de E13.5 y de las regiones Y (de *young*, menos madura) y M (de *mature*) donde se muestra la inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas en plano. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de RGCs en A. *p<0,05.

Además, se utilizaron retinas deficientes de L2A, que presentan un incremento de glicólisis en respuesta a glucosa e insensibilidad a 2-DG, en relación con la implicación de CMA en la degradación de enzimas glicolíticas (Aniento et al, 1993; Cuervo et al, 1994; Kon et al, 2011; Lv et al, 2011; Schneider et al, 2014; Tasset & Cuervo, 2016) (Figura 56 A). Retinas en plano de embriones deficientes en L2A presentan un incremento significativo en el número de RGCs solo en retinas de E15.5, siendo mayor la diferencia en la región madura de la retina (Figura 56 B-D). Al contrario que en retinas deficientes de Atg5, se observa un incremento de RGCs en secciones de ojos deficientes de L2A en E13.5 y E15.5. (Figura 56 E). Aunque no podemos descartar otras funciones mediadas por la CMA, es posible que su papel metabólico en cuanto a la degradación de enzimas glicolíticas regule la diferenciación de las RGCs. Esto se correlaciona con la disminución de la expresión de L2A en E15.5 (Figura 56 F), estadio a partir del cual la retina comienza a depender del metabolismo glicolítico.

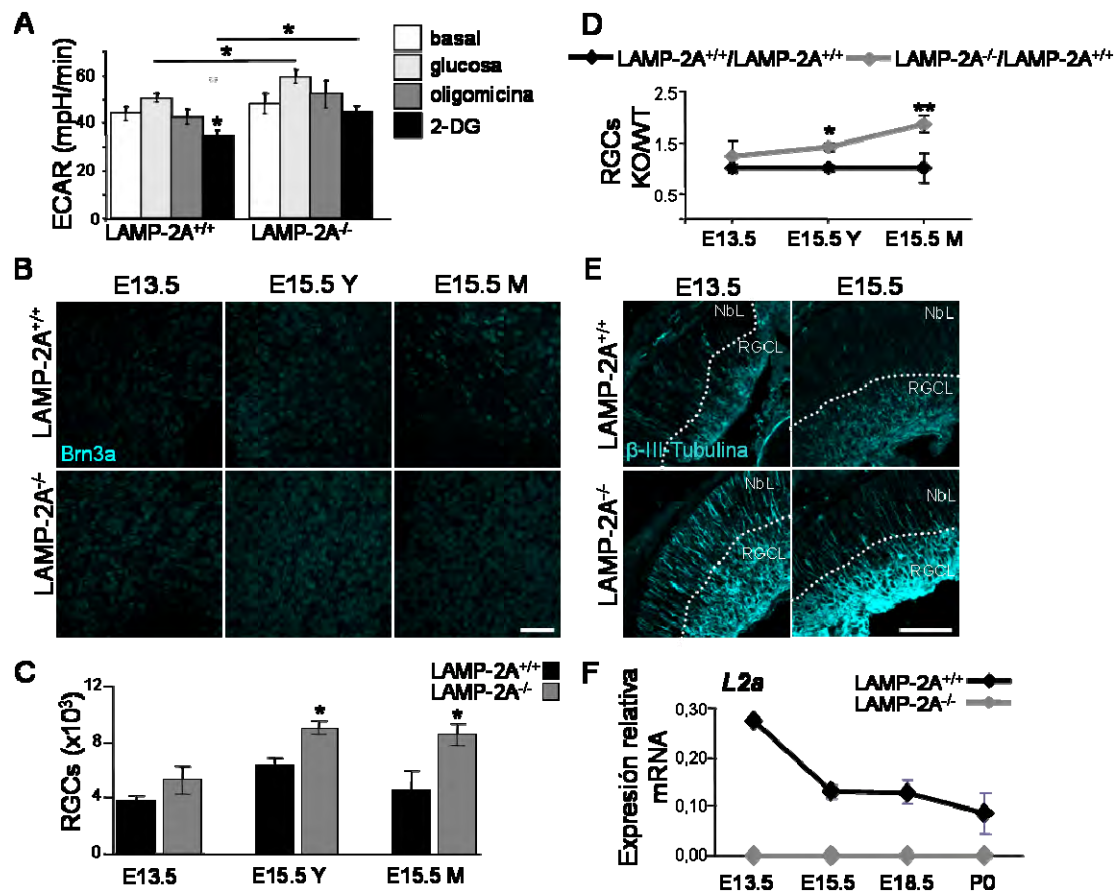


Figura 56. Retinas deficientes de LAMP-2A muestran un incremento de la diferenciación de las RGCs. **A.** Análisis de la acidificación extracelular (ECAR) consecuencia de la actividad glicolítica mediante seahorse en condiciones basales y tras la adición de glucosa, oligomicina y 2-DG en retinas LAMP-2A^{+/+} y LAMP-2A^{-/-}. *p<0,05. **B.** Imágenes de la región donde se inicia la diferenciación en retinas de E13.5 y de las regiones Y (de *young*, menos madura) y M (de *mature*) donde se muestra la inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas en plano. Barra de escala 50µm. **C.** Cuantificación del número de RGCs en B. *p<0,05. **D.** Representación del cociente del número de RGCs entre retinas LAMP-2A^{-/-} y LAMP-2A^{+/+} que muestra mayores diferencias en el número de RGCs cuanto más madura es la retina. *p<0,05; **p<0,01. **E.** Inmunotinción de β-III-tubulina para la detección de RGCs en secciones de ojos LAMP-2A^{+/+} y LAMP2A^{-/-} de embriones en E13.5 y E15.5. Barra de escala 75µm. La línea discontinua separa las capas NbL y RGCL. **F.** Expresión relativa de mRNA de LAMP-2A (L2a) durante el desarrollo embrionario de la retina determinado mediante RT-PCR.

Estos resultados demuestran que el cambio metabólico mediado por mitofagia regula la diferenciación de las células ganglionares de la retina. El hecho de que la inhibición farmacológica de mitofagia y de glicólisis en E13.5 no tenga efectos en diferenciación, puede ser debido a que en dicho estadio la mitofagia solo tiene un papel en la muerte celular temprana pero no en el metabolismo, que como he mencionado anteriormente, cambia a partir de E15.5.

Hay que añadir que como consecuencia de la inhibición de la glicólisis en retinas cultivadas con 3-PO y 2-DG, se produce un incremento de la masa mitocondrial determinado por inmunotinción de TOMM20 en retinas en plano y por citometría de flujo con mitotracker deep red (Figura 57 A-C). Es posible que la inhibición del metabolismo glicolítico desencadene procesos de compensación para sostener el metabolismo celular. Por otro lado, retinas deficientes de LAMP-2A también presentan mayor masa mitocondrial, a pesar de ser más glicolíticas (Figura 57 D). Ese incremento podría deberse a la observación preliminar de la disminución de la expresión de algunos de los reguladores de la mitofagia en retinas deficientes de LAMP-2A (Figura 57 E). Estos datos demuestran que existe una relación recíproca entre el metabolismo y la masa mitocondrial, de manera que cualquier alteración en uno de los dos procesos, tiene consecuencias para el otro y viceversa.

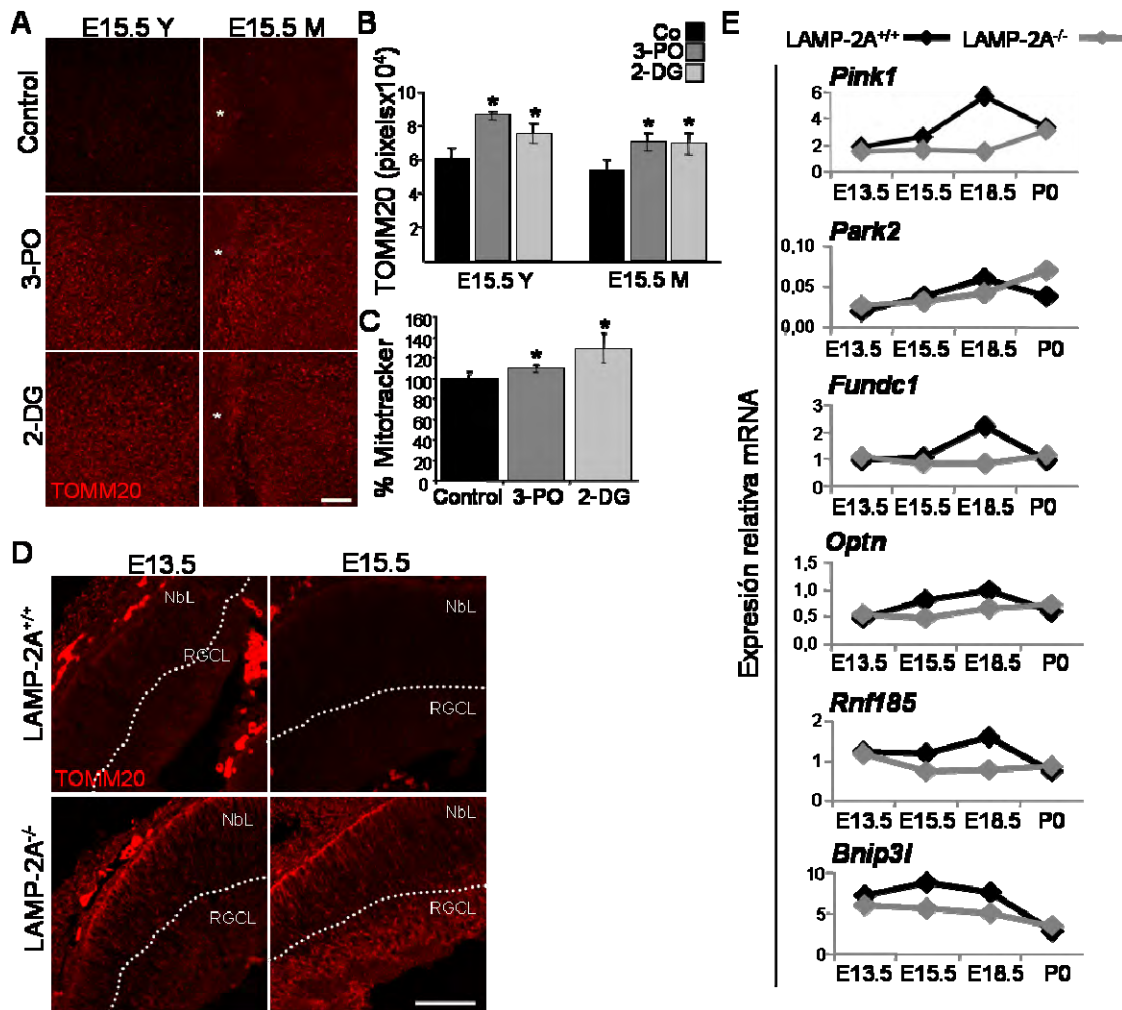


Figura 57. Relación recíproca entre el metabolismo y la masa mitocondrial durante el desarrollo de la retina de ratón. **A.** Inmunotinción de TOMM20 de retinas de E15.5 tras cultivo con 3-PO y 2-DG. Barra de escala 50µm. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Área cubierta por la masa mitocondrial detectada en A. * $p < 0,05$. **C.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial mediante citometría de flujo en retinas de E15.5 cultivadas con 3-PO y 2-DG. * $p < 0,05$. **D.** Inmunotinción de TOMM20 en secciones de ojos *LAMP-2A^{+/+}* y *LAMP2A^{-/-}* de embriones en E13.5 y E15.5. Barra de escala 75µm. La línea discontinua separa las capas NbL y RGCL. **E.** Expresión relativa de mRNA de genes reguladores de mitofagia en retinas de embriones *LAMP-2A^{+/+}* y *LAMP2A^{-/-}* a las edades indicadas mediante RT-PCR.

El siguiente paso fue determinar los efectos de mitofagia y metabolismo en la diferenciación de RGCs en estadios posteriores del desarrollo embrionario, cuando la retina ya es glicolítica. Como he mencionado previamente, solo la inhibición con 3-MA incrementa la masa mitocondrial en retinas de E18.5, pero ni CsA ni 3-MA alteran el número de RGCs (Figura 58A, B). Sin embargo, la inhibición de la glicólisis con 3-PO y 2-DG si disminuye la diferenciación en retinas de E18.5 (Figura 58 C, D). Estos datos refuerzan la idea de que es la mitofagia específica que se produce en E15.5 la que regula el cambio metabólico necesario para la diferenciación y maduración de RGCs. Por otro lado, la inducción de mitofagia en retinas de E18.5 con rapamicina y EBSS (Figura 58E,

F), disminuye el número de células Brn3a positivas (Figura 58G, H), por lo que una vez se ha producido el cambio metabólico, la inducción de mitofagia puede desencadenar mecanismos de retroalimentación negativa para evitar un exceso de diferenciación. Esa mitofagia solo se bloquea con 3-MA, pero no con CsA (Figura 58E, F), lo que refleja una degradación mitocondrial no selectiva debido a la inducción de autofagia. Estos datos sugieren que solo la mitofagia selectiva que se bloquea con CsA favorece la diferenciación de las células ganglionares. Además, el tratamiento con AO no induce mitofagia en E18.5, por lo que la inhibición de la cadena de transporte electrónico solo induce mitofagia antes o justo cuando comienza el cambio metabólico (Figura 58I).

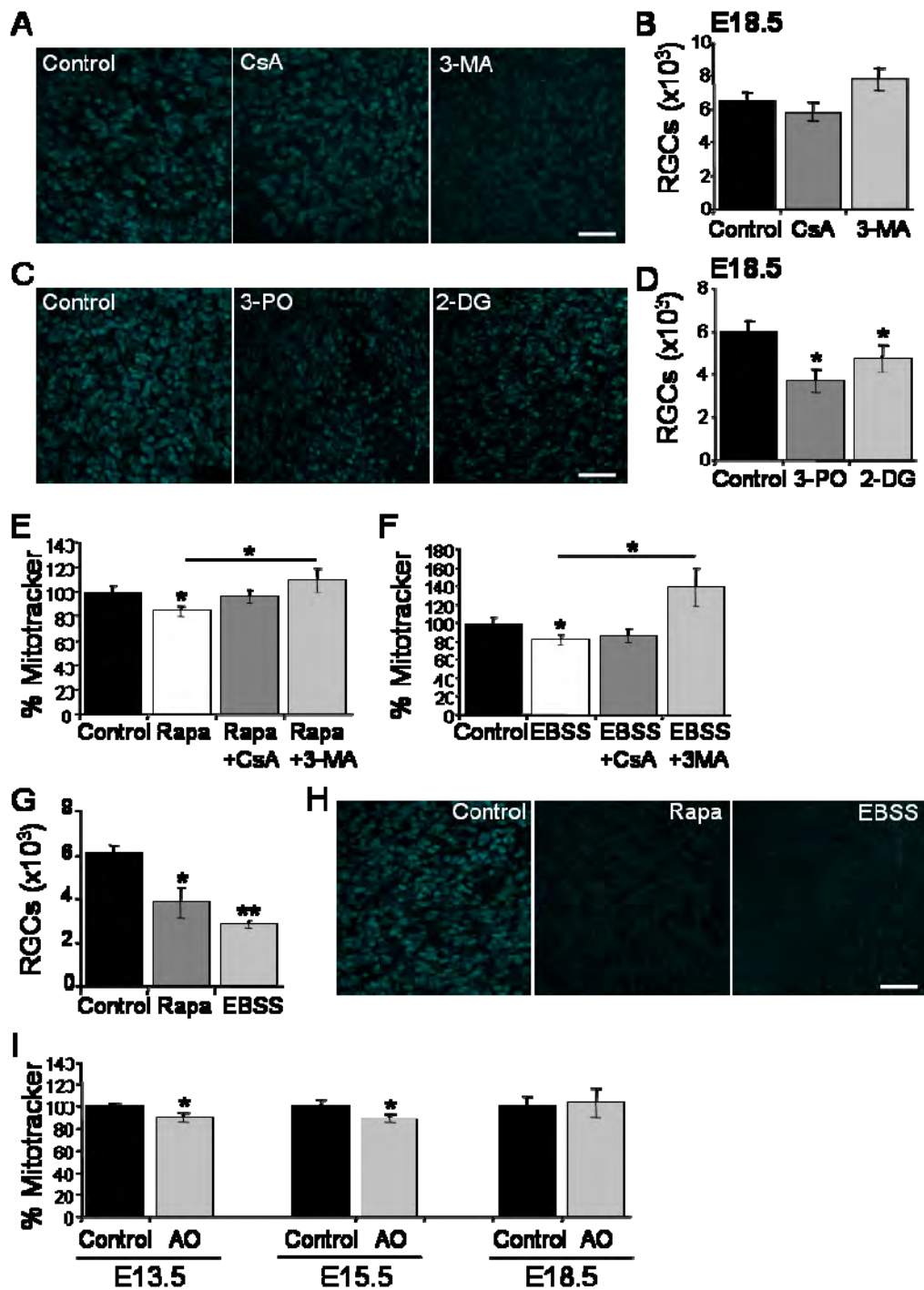


Figura 58. Efectos de la modulación de mitofagia y glicólisis en la diferenciación de RGCs en retinas a E18.5. **A. C.** Inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas a E18.5 en plano tras el bloqueo de mitofagia y glicólisis, respectivamente. Barra de escala 50 μ m. **B. D.** Cuantificación del número de RGCs en A y C, respectivamente. * $p < 0,05$. **E. F.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial tras la inducción de autofagia con rapamicina y EBSS en ausencia/presencia de CsA y 3-MA en retinas de E18.5 * $p < 0,05$. **G.** Cuantificación del número de RGCs tras la inducción de autofagia con rapa y EBSS en retinas a E18.5. **H.** Inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas a E18.5 en plano tras cultivo con rapamicina y EBSS. Barra de escala 50 μ m. **I.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial tras la inducción de mitofagia con AO en retinas a E13.5, E15.5 y E18.5.

A continuación determinamos si la inducción de autofagia/mitofagia en E13.5 favorece la diferenciación en dicho estadio. La inducción de mitofagia en toda la retina mediante rapamicina aumenta la diferenciación de las RGCs en la región central, donde se inicia la diferenciación de retinas en E13.5 (Figura 59 A-D).

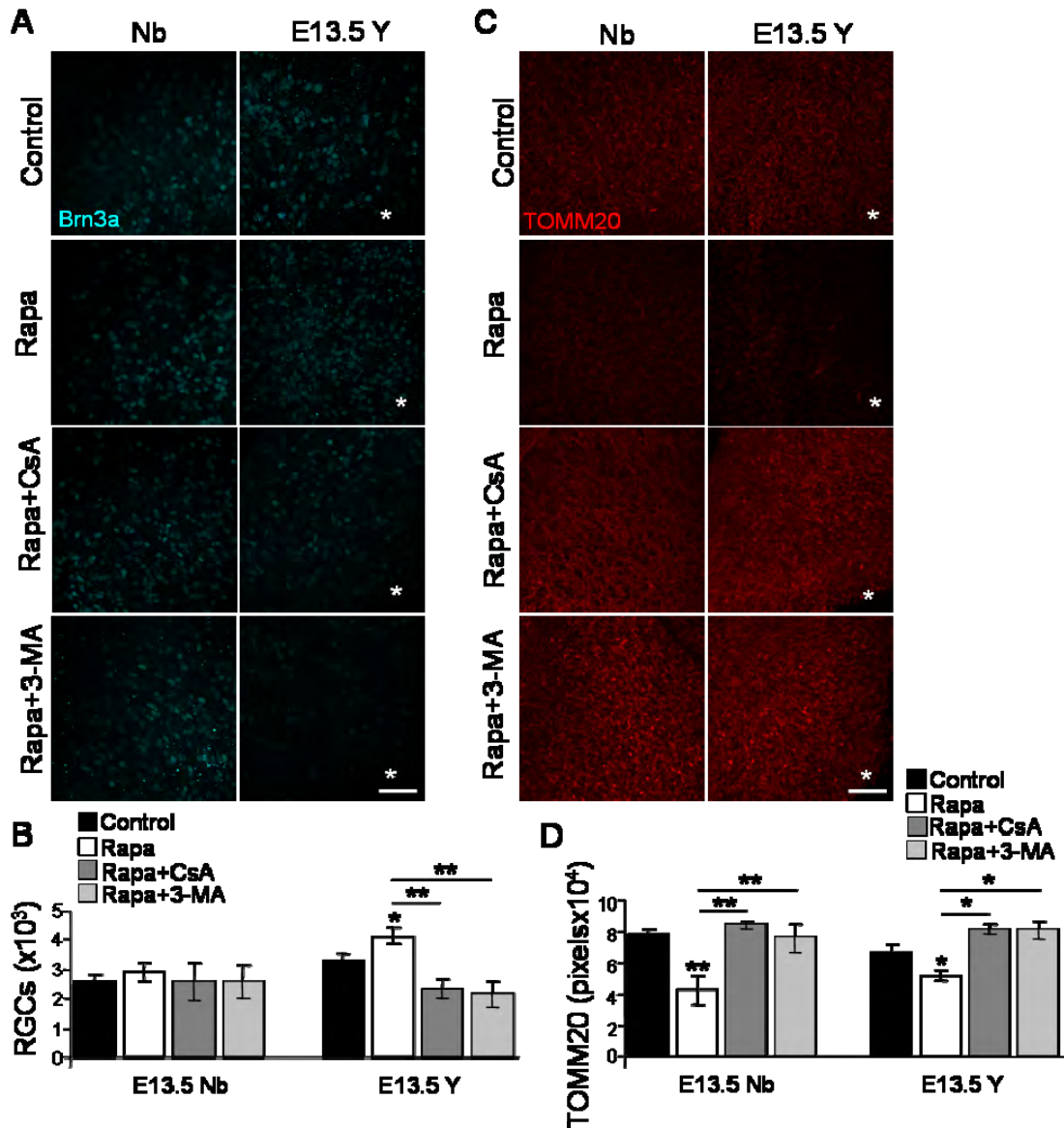


Figura 59. La inducción de mitofagia con rapamicina en retinas de E13.5 incrementa la diferenciación de las células ganglionares. **A.** Inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas de E13.5 en plano tras la inducción de mitofagia con rapamicina en ausencia/presencia de CsA y 3-MA. Barra de escala 50µm. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Cuantificación del número de RGCs en A. *p<0,05; **p<0,01. **C.** Inmunotinción de TOMM20 de las retinas en A. Barra de escala 50µm. El asterisco señala el nervio óptico. **D.** Área cubierta por la masa mitocondrial detectada en A. *p<0,05; p<0,01.

Sin embargo, la inducción de mitofagia mediante EBSS no cambia la diferenciación de RGCs (Figura 60 A, B). Además, cuando se induce mitofagia

mediante AO, la diferenciación de RGCs disminuye en toda la retina, siendo este efecto independiente de mitofagia ya que no se revierte con CsA (Figura 60 C, D). Queda por determinar si estas diferencias entre los distintos estímulos inductores de mitofagia se deben a que sus efectos sean diferentes en el metabolismo celular. Además, como he mencionado previamente, la muerte por EBSS no solo se debe a mitofagia, ya que en la región periférica de la retina no se revierte con CsA, por lo que el ayuno tiene otros efectos independientes de mitofagia.

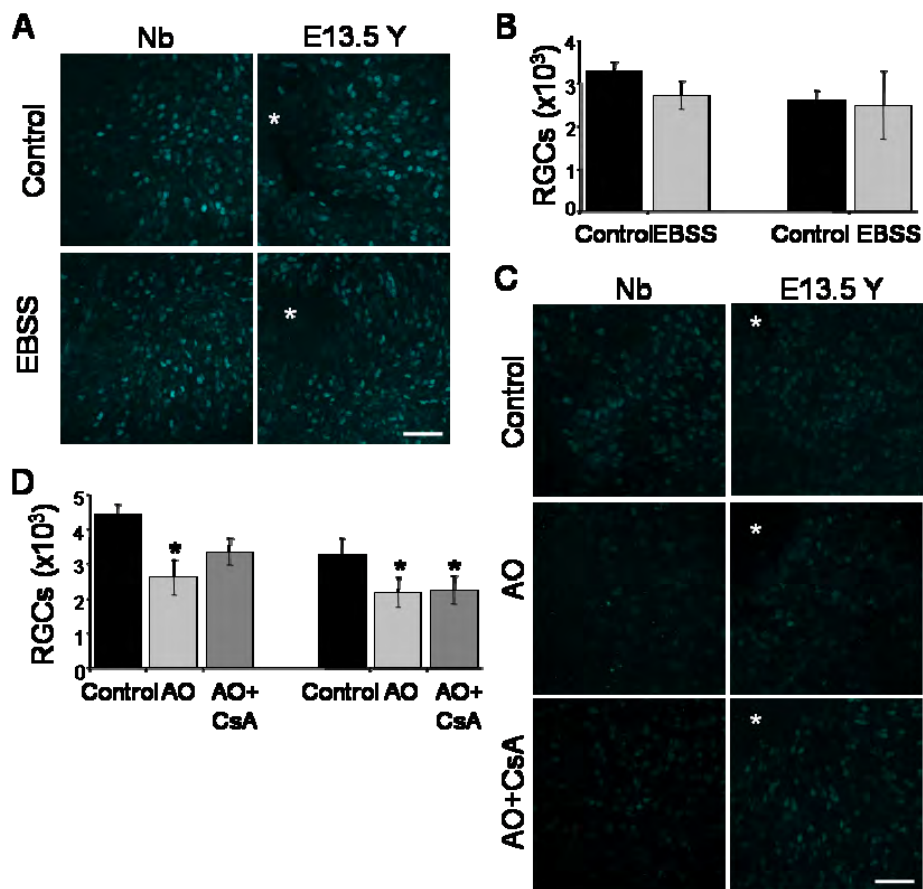


Figura 60. La inducción de mitofagia con EBSS y AO en retinas de E13.5 no incrementa la diferenciación de las células ganglionares. A. Inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas de E13.5 en plano tras la inducción de mitofagia con EBSS. Barra de escala 50µm. El asterisco señala el nervio óptico. **B.** Cuantificación del número de RGCs en A. **C.** Inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas de E13.5 en plano tras la inducción de mitofagia con AO en ausencia/presencia de CsA. Barra de escala 50µm. El asterisco señala el nervio óptico. **D.** Cuantificación del número de RGCs en C. *p<0,05.

4.3 Señal inductora y mecanismo molecular de mitofagia en retinas de E15.5

Una vez determinada la activación de mitofagia y sus efectos en metabolismo y diferenciación, quisimos conocer el estímulo inductor de mitofagia a nivel basal en retinas de E15.5. Uno de los principales estímulos para inducir mitofagia es el daño mitocondrial, que se caracteriza por un incremento en la producción de ROS y disminución del potencial de membrana mitocondrial (Lemasters, 2005). Durante el desarrollo de la retina hemos observado una disminución de los niveles de ROS medidos con la sonda DHE a partir del momento en el que se produce mitofagia (Figura 61A, B). Sin embargo, esta disminución no es debida al proceso de mitofagia, ya que la deficiencia de Atg5 y la inhibición farmacológica de autofagia con 3-MA no alteran los niveles de ROS (Figuras 61 C-E). Por el contrario, la inhibición con CsA incrementa el estrés oxidativo, lo que sugiere que los niveles de ROS podrían modularse por cambios en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura 61 D, E). Además, esto parece ser específico del momento en el que se produce mitofagia selectiva, ya que retinas en E18.5 no presentan cambios en los niveles de ROS tras bloqueo de autofagia/mitofagia (Figura 61F).

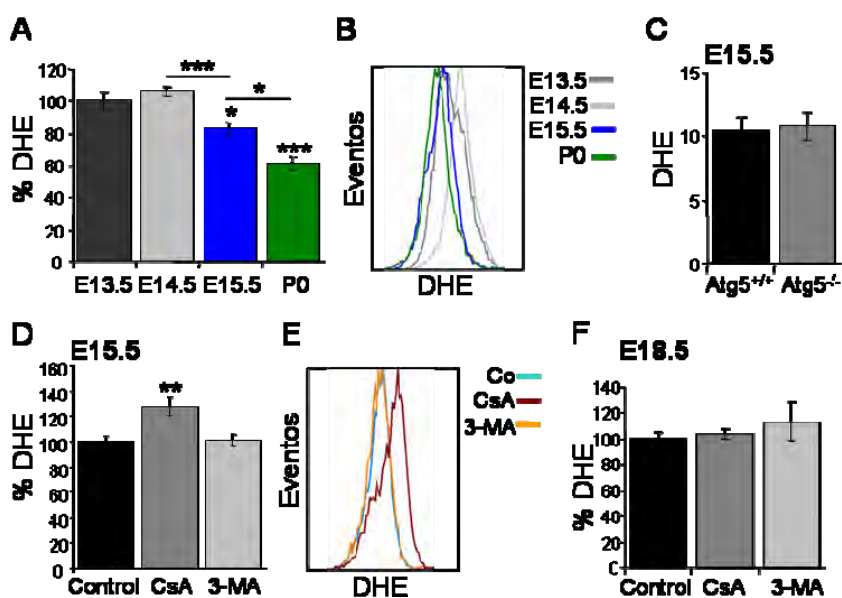


Figura 61. Disminución de los niveles de ROS durante el desarrollo de la retina de vertebrados independiente de mitofagia. A. Determinación del porcentaje de ROS en retinas *in vivo* en diferentes estadios mediante la sonda DHE por citometría de flujo. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. B. Histograma representativo de los datos en A. C. Determinación de los niveles de ROS en retinas deficientes de *Atg5* a E15.5. D. Determinación del porcentaje de ROS en retinas a E15.5 cultivadas en presencia de CsA y 3-MA. ** $p < 0,01$. E. Histograma representativo de los datos de D. F. Determinación del porcentaje de DHE en retinas a E18.5 tras cultivo con CsA y 3-MA.

La cadena de transporte electrónico genera un gradiente de electrones a través de la membrana interna mitocondrial que se encarga de mantener el potencial de membrana. Para determinar el funcionamiento de la cadena de transporte electrónico se midió el potencial de membrana mitocondrial mediante citometría de flujo, utilizando la sonda DIOC. El potencial de membrana mitocondrial disminuye ya en E14.5, una edad anterior a la que se produce mitofagia (Figura 62A, B). La inhibición farmacológica de autofagia/mitofagia en E15.5 no alteró el potencial de membrana mitocondrial (Figura 62 C). Sin embargo, retinas deficientes de *Atg5* si presentan un incremento de DIOC (Figuras 62 D, E). Estos datos sugieren que una posible señal para la inducción de mitofagia es la disminución en el potencial de membrana mitocondrial, pudiendo resultar la deficiencia genética de mitofagia en mecanismos de compensación para incrementar los niveles de DIOC.

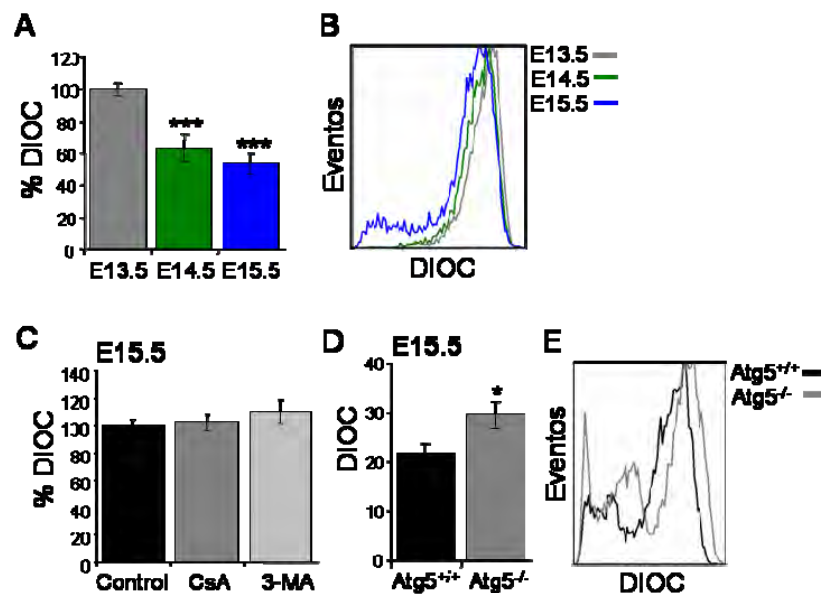


Figura 62. Disminución del potencial de membrana mitocondrial previa a la mitofagia durante el desarrollo de la retina. **A.** Porcentaje de DIOC en retinas embrionarias *in vivo* a E13.5, E14.5 y E15.5. *** $p < 0,001$. **B.** Histograma representativo de los datos en A. **C.** Porcentaje de DIOC en retinas de E15.5 tras cultivo con CsA y 3-MA. **D.** Porcentaje de DIOC en retinas deficientes de *Atg5* a E15.5. * $p < 0,05$. **E.** Histograma representativo de los datos en D.

Además, se realizó un BOFA para estudiar el funcionamiento de la respiración mitocondrial en los diferentes estadios del desarrollo de la retina de ratón. Como se observa en la figura 63A, retinas de E13.5 presentan una respuesta normal a oligomicina, disminuyendo la respiración al inhibir la ATPsintasa. Además la respuesta

a FCCP no incrementa el consumo de oxígeno, por lo que no hay diferencias entre la respiración basal y la respiración máxima que pueden alcanzar las células. Sin embargo, retinas de E14.5 se vuelven insensibles a oligomicina y FCCP, y a partir de E15.5, la ATPsintasa parece funcionar en reverso hidrolizando ATP (como ATPasa), ya que la adición de oligomicina incrementa el consumo de oxígeno. La respuesta a la inhibición de los complejos I y III con rotenona y antimicina A, respectivamente, disminuye en todos los estadios analizados (Figura 63 B-E).

Las células presentan mecanismos para evitar la disminución de ATP ante una disfunción mitocondrial. Uno de ellos es incrementar la expresión del inhibidor fisiológico de la ATPsintasa IF1, para evitar que la bomba funcione en reverso y consuma ATP (Campanella et al, 2009; Formentini et al, 2014). A partir de los datos de transcriptómica, observamos como la expresión de IF1 incrementa progresivamente hasta E14.5 y disminuye drásticamente en E15.5, manteniéndose de ahí en adelante (Figura 63 F). Estos datos podrían indicar que ante la caída del potencial de membrana mitocondrial, retinas de E14.5 incrementan la expresión de IF1 para mantener la viabilidad, lo que tendría como consecuencia una insensibilidad de la mitocondria a oligomicina observada. Esto se relaciona con lo descrito previamente en neuronas de ratones transgénicos con la ATPsintasa inhibida (Formentini et al, 2014). Sin embargo, el hecho de que la expresión de IF1 disminuya en E15.5, pone de manifiesto el funcionamiento en reverso de la ATPsintasa como hemos observado en el BOFA. Además, la inhibición de la ATPasa con oligomicina en este estadio incrementa el potencial de membrana mitocondrial (Figura 63 G, H), lo que indica que los protones cedidos por NADH y FADH₂ a nivel de los complejos I y II de la cadena de transporte electrónico no son transferidos a la matriz mitocondrial para la síntesis de ATP, sino que se acumulan en el espacio intermembrana, lo que confirma la función reversa de la ATPsintasa en retinas de E15.5.

Estudios previos han descrito este funcionamiento de la ATPasa en mitocondrias dañadas despolarizadas que son degradadas por mitofagia (Gunter & Pfeiffer, 1990; Hunter et al, 1976; Kissova et al, 2004; Lemasters, 2005), por lo que las alteraciones a nivel de la cadena de transporte electrónico observadas podrían constituir la señal inductora de mitofagia durante el desarrollo de la retina.

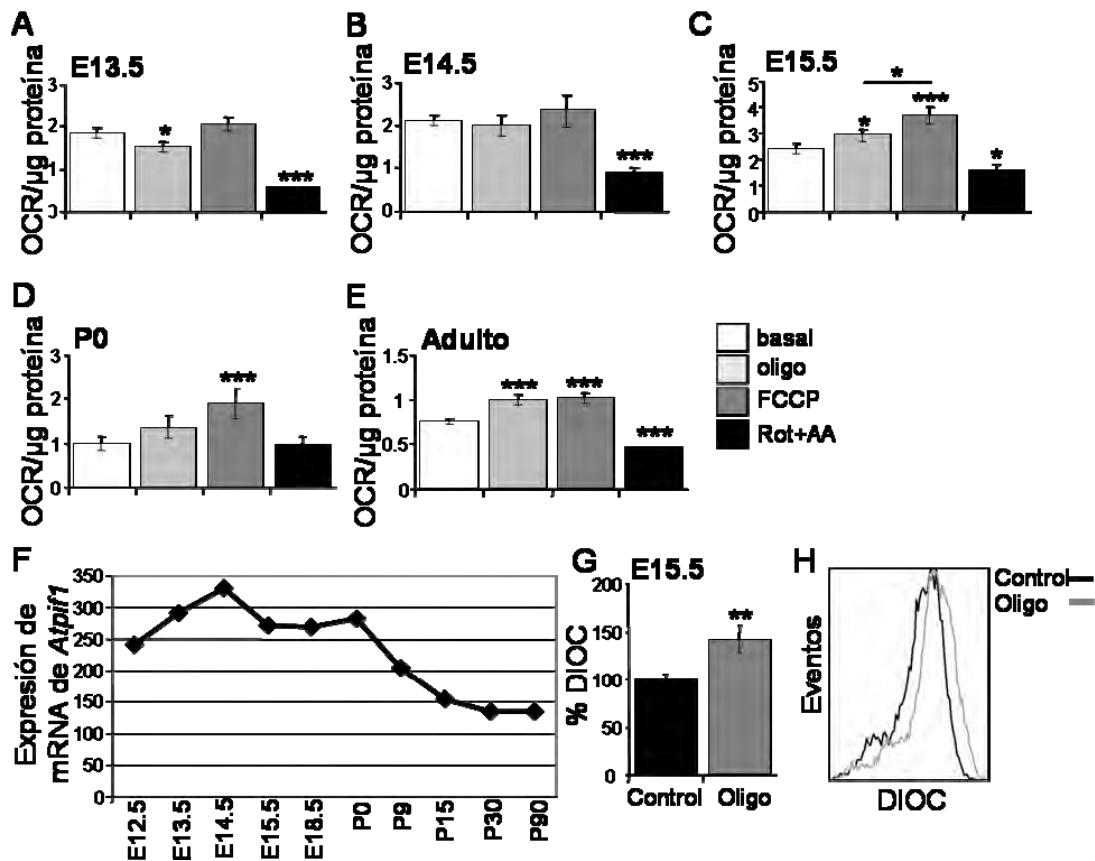


Figura 63. Alteración de la función respiratoria mitocondrial previa a la inducción de mitofagia. A-E. Determinación del consumo de oxígeno consecuencia de la respiración mitocondrial en condiciones basales y tras la adición de oligomicina, FCCP y Rotenona+Antimicina A en retinas de ratón de diferentes estadios: E13.5, E14.5, E15.5, P0 y adulto. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$. F. Expresión de mRNA de *Atpif1* (inhibidor de la ATPsintasa mitocondrial). G. Porcentaje de DIOC en retinas a E15.5 tras la inhibición de la ATPsintasa con oligomicina. H. Histograma representativo de los datos en G.

Como consecuencia de la alteración en la cadena de transporte electrónico, las retinas de E15.5 ponen en marcha un mecanismo que incrementa el consumo de oxígeno, por lo que se podría estar produciendo hipoxia en dicho estadio. Para ello, se realizó un *heatmap* con la expresión del factor inducible por hipoxia (HIF1 α) y genes regulados por dicho factor (Figura 64A). Podemos observar un incremento en la expresión de genes regulados por HIF, como *Adm*, *Egln*, *AldoA*, *Pgk1* y *Slc2a1*, por lo que retinas de E15.5 están sometidas a hipoxia.

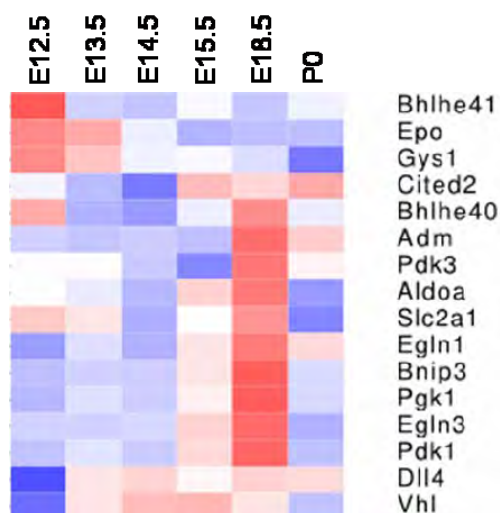
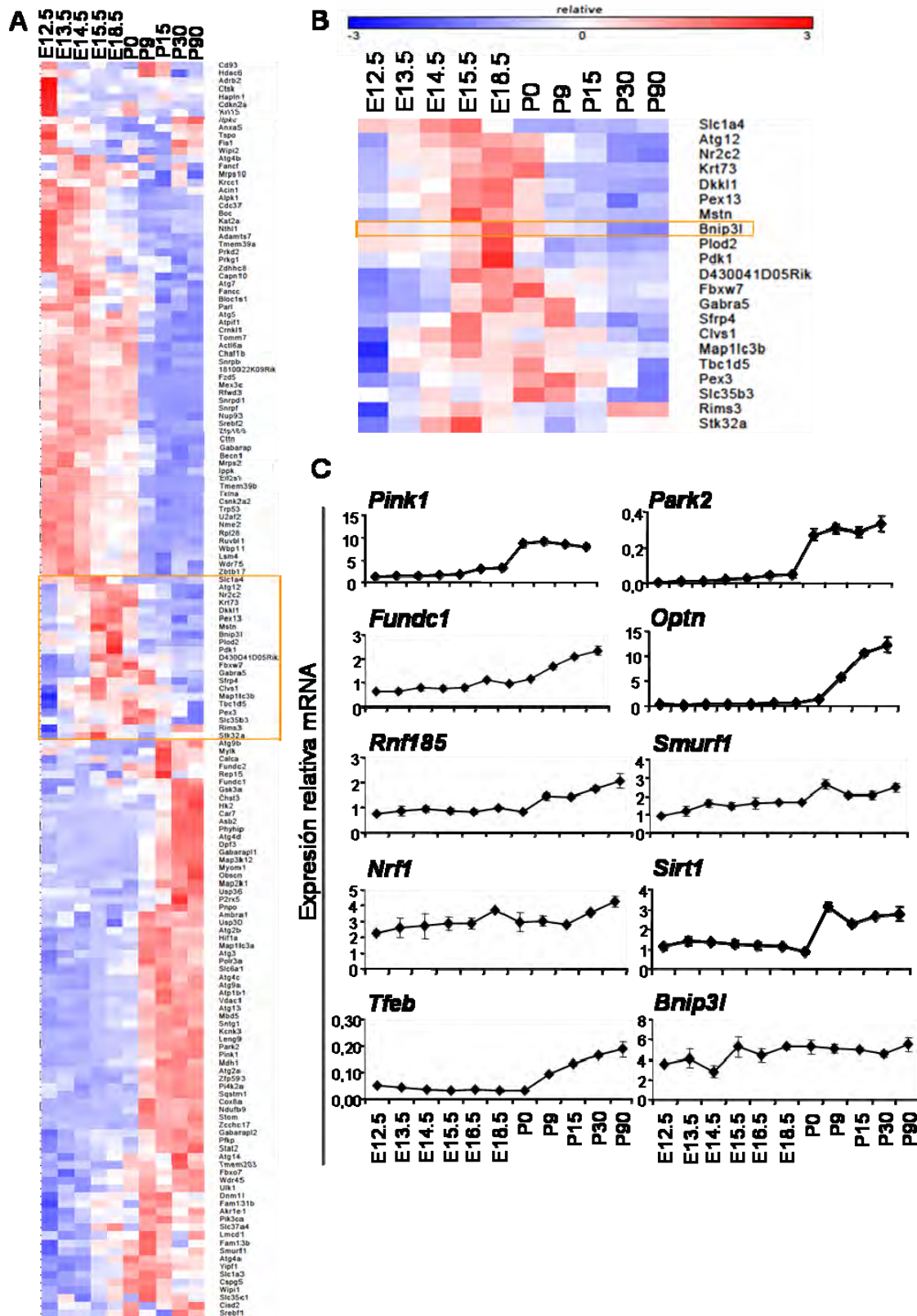


Figura 64. Expresión de genes regulados por HIF1 α durante el desarrollo de la retina.

En relación con la autofagia, HIF1 α regula la expresión de diferentes genes de autofagia, destacando entre ellos los reguladores de mitofagia NIX y BNIP3 (Hamacher-Brady & Brady, 2016). Se ha demostrado que NIX y BNIP3 están implicados en procesos fisiológicos como la maduración de eritrocitos o la generación de células NK de memoria mediante la degradación de mitocondrias (O'Sullivan, 2015; Schweers et al, 2007). A partir de un *heatmap* de reguladores de mitofagia generado con los datos procedentes de transcriptómica y utilizando la base de datos de *gene ontology* (GO0000422), podemos observar un grupo que se expresa fundamentalmente en estadios embrionarios de la retina, otro entre las edades E15.5-P0 y un tercer grupo en edades postnatales (Figura 65 A). Si nos fijamos en el que comprende nuestra edad de interés E15.5 (Figura 65B), podemos observar un incremento en la expresión de NIX. Para confirmar si durante la fisiología de la retina, NIX también es el responsable de la regulación de la mitofagia, realizamos RT-PCR de diferentes reguladores de mitofagia conocidos. En la figura 65C se observa un incremento de la mayoría de ellos a nivel postnatal, siendo NIX el que presenta un incremento en su expresión en E15.5, manteniéndose de ahí en adelante.



Utilizando retinas de animales deficientes de NIX, se ha confirmado el bloqueo de mitofagia mediante inmunotinción de TOMM20 en retinas en plano y en secciones de ojos, así como mediante mitotracker deep red por citometría de flujo (Figuras 66 A-C). Estos datos sugieren que NIX regula el proceso de mitofagia descrito en retinas de E15.5 en respuesta a hipoxia. Los efectos de la mitofagia en diferenciación se han corroborado mediante inmunofluorescencia de β -III-tubulina en secciones de ojos deficientes de NIX (Figura 66D). Estos datos indican que NIX es el regulador del proceso de mitofagia implicado en la regulación de la diferenciación. Habría que determinar si retinas deficientes de NIX presentan una disminución en ECAR y en expresión de enzimas glicolíticas.

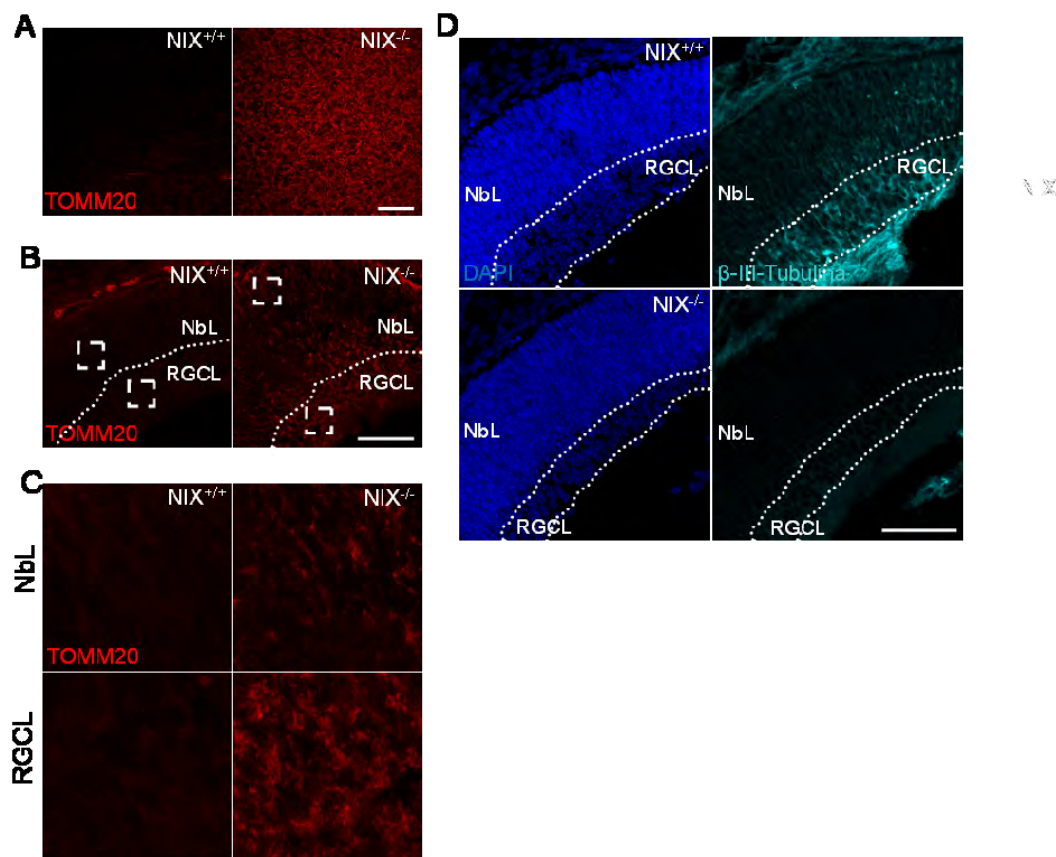


Figura 66. Incremento de masa mitocondrial y disminución de RGCs en retinas deficientes de NIX a E15.5. **A.** Inmunofluorescencia de TOMM20 en retinas $NIX^{+/+}$ y $NIX^{-/-}$ montadas en plano. Barra de escala 50 μ m. **B.** Inmunofluorescencia de TOMM20 en secciones de ojos de embriones a E15.5. La línea discontinua separa las capas NbL y RGCL. Barra de escala 75 μ m. **C.** Ampliación de las áreas señaladas en B. **D.** Inmunofluorescencia de DAPI y β -III-tubulina para la detección de RGCs en secciones de ojos de embriones $NIX^{+/+}$ y $NIX^{-/-}$. Barra de escala 75 μ m.

Para confirmar la regulación de la diferenciación por mitofagia ante una situación de hipoxia, se cultivaron retinas de E13.5 y E15.5 con deferoxamina (DFO), un inductor clásico de hipoxia, en ausencia y presencia de CsA y 3-MA. Mediante inmunofluorescencia de Brn3a en retinas montadas en plano, podemos observar como la inducción química de hipoxia produce un incremento del número de RGCs en E13.5 y en la región menos madura de retinas de E15.5 (Figura 67A, B).

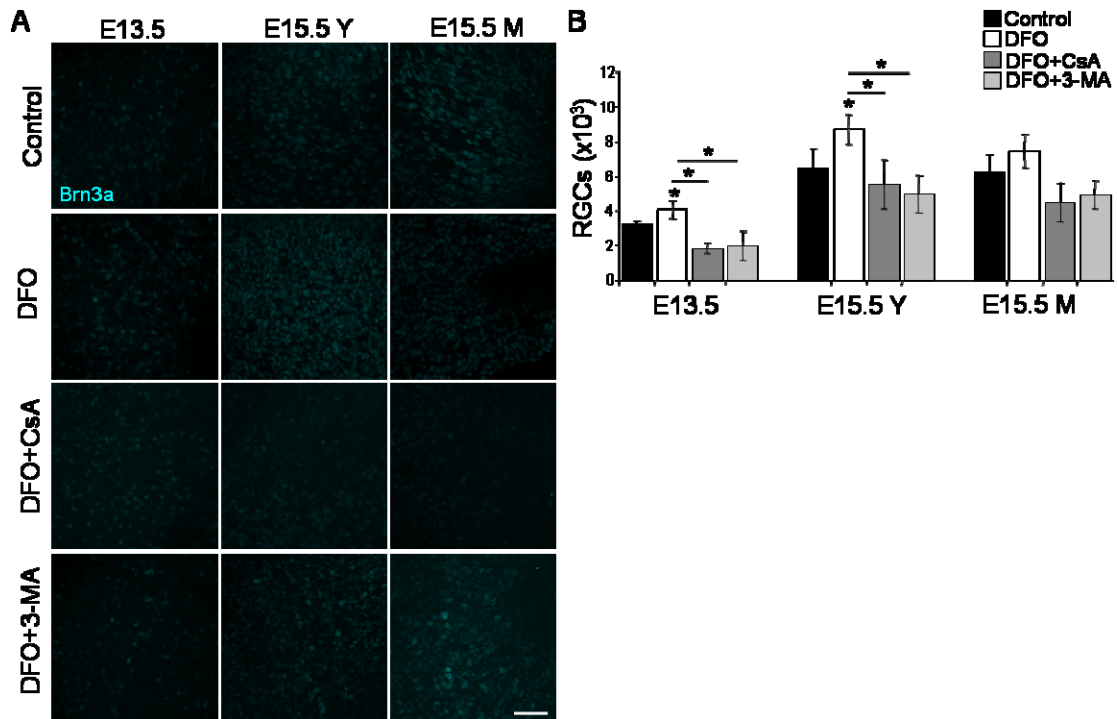


Figura 67. La inducción de hipoxia incrementa la diferenciación de RGCs en retinas de E13.5 y en la región menos madura de retinas en E15.5. A. Imágenes de la región donde se inicia la diferenciación en retinas de E13.5 y de las regiones Y (de *young*, menos madura) y M (de *mature*) de retinas a E15.5 donde se muestra la inmunotinción de Brn3a para la detección de RGCs en retinas en plano. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de RGCs en A. *p<0,05.

Estos efectos son debidos a inducción de mitofagia ya que disminuyen la tinción de TOMM20 en retinas en plano y se bloquean con CsA y 3-MA (Figura 67, 68A). Estos datos confirman que la hipoxia regula la diferenciación de células ganglionares de la retina mediante inducción de mitofagia. Habría que determinar si esa mitofagia mediada por hipoxia está produciendo un cambio metabólico hacia glicólisis durante el desarrollo de la retina.

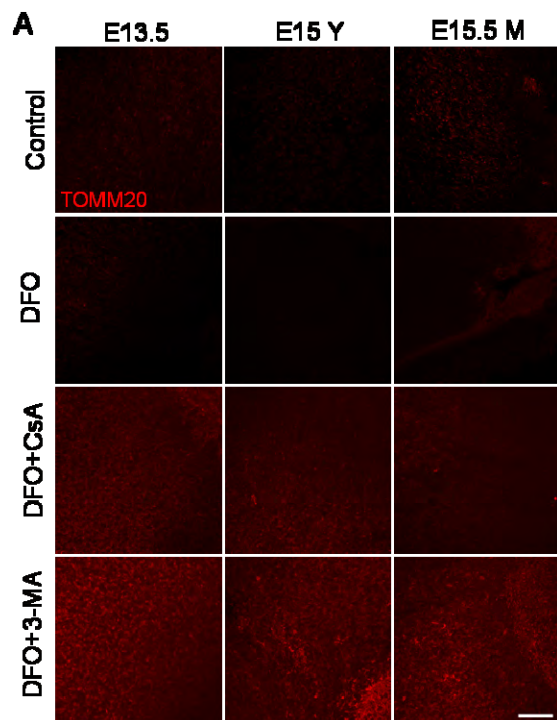


Figura 68. La inducción de hipoxia disminuye la masa mitocondrial por mitofagia en retinas a E13.5 y E15.5. A. Imágenes de la región central de retinas de E13.5 y de las regiones Y (de *young*, menos madura) y M (de *mature*) de retinas a E15.5 donde se muestra la inmunotinción de TOMM20 para la detección de mitocondrias en retinas en plano. Barra de escala 50µm.

Además de *HIF1α*, otros factores de transcripción como *TFEB*, *E2F1*, *FOXO3a*, *CITED2*, *SP1* y *Trp53*, regulan la expresión de NIX. A partir del estudio transcriptómico realizado con retinas de ratón a diferentes estadios, podemos observar como algunos de ellos podrían

también regular el proceso de mitofagia descrito durante el desarrollo de la retina (Figura 69). *FOXO3a* incrementa a partir de E14.5, y *E2F1* a partir de E15.5. Bajo condiciones de hipoxia, *FOXO3a* suprime la expresión de NIX mediada por HIF1-α mediante el cofactor *CITED2*, lo que constituye una regulación negativa compensatoria bajo condiciones de hipoxia (Hamacher-Brady & Brady, 2016). La expresión de *CITED2* incrementa en E15.5, por lo que estos datos reflejan que podría haber una regulación coordinada y controlada de la expresión de NIX por diferentes factores de transcripción durante el desarrollo de la retina en edades en las que observamos la activación de mitofagia.

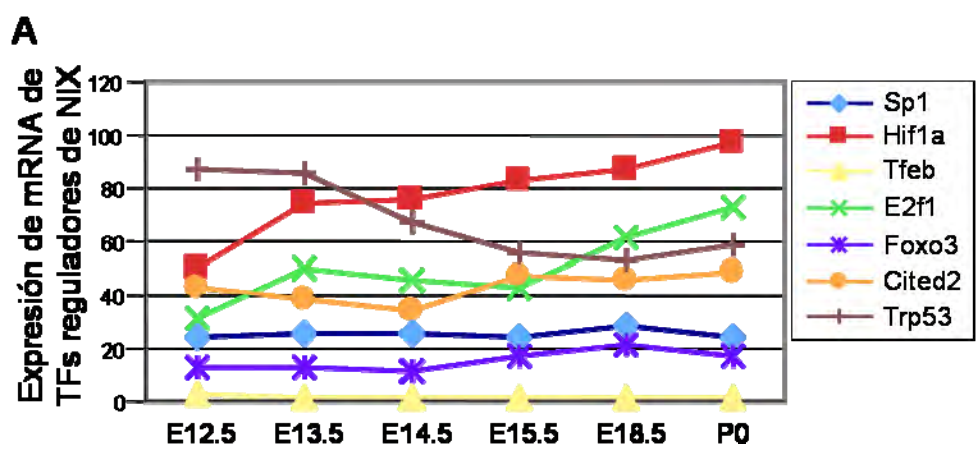


Figura 69. Expresión de factores de transcripción reguladores de la expresión de NIX. A. Expresión determinada mediante el estudio transcriptómico a partir de mRNAs de retinas en distintos estadios.

4.4 Mitofagia y muerte celular en E15.5

Previamente he descrito que la mitofagia basal en la región central y la inducción de mitofagia en retinas de E13.5 inducen muerte celular. Por ello, se determinó si la mitofagia basal observada en E15.5 también estaba implicada en la muerte fisiológica de la retina en dicho estadio. Tanto la inhibición de autofagia/mitofagia como de hipoxia con el inhibidor FM19G11 (Moreno-Manzano et al, 2010), disminuyen el marcaje de TUNEL en toda la retina (Figura 70 A, B). La inhibición de hipoxia en retinas de E13.5 también disminuye la muerte celular en la región central, lo que sugiere que ya en estadios tempranos hay cierto nivel de hipoxia en un área concreta de la retina que regula la muerte neural temprana (Figura 70 C, D).

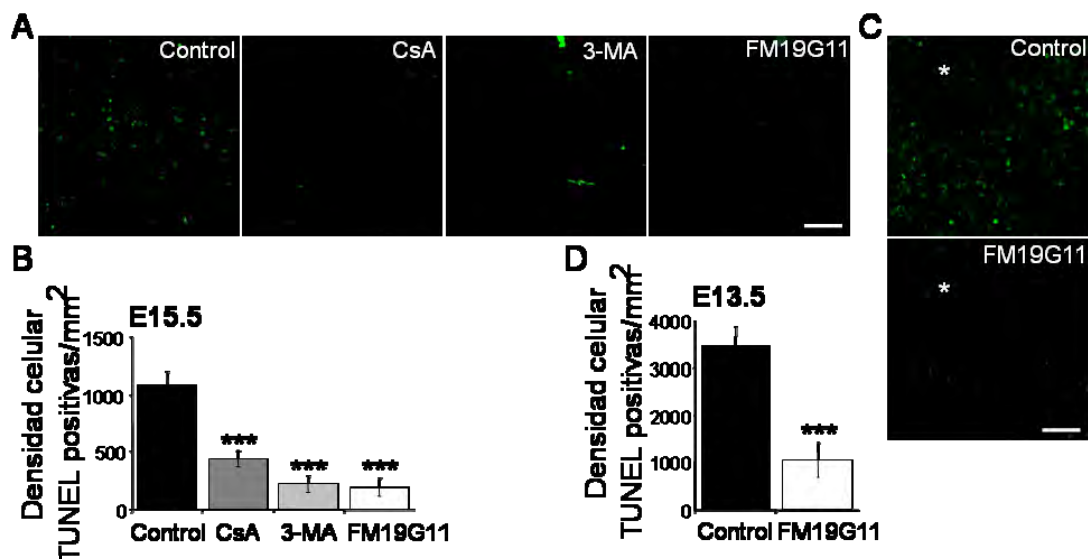


Figura 70. La mitofagia mediada por hipoxia contribuye a la muerte fisiológica durante el desarrollo de la retina. A. C. Imágenes de la región menos madura de retinas de E15.5 y de la región central de retinas a E13.5, respectivamente, donde se muestra la reacción de TUNEL para la detección de muerte celular en retinas en plano. Barra de escala 50µm. **B. D.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en las regiones indicadas de retinas tratadas con CsA, 3-MA y FM19G11. ***p<0,001.

Sin embargo, retinas deficientes de Atg5 presentan un incremento de muerte celular a lo largo del desarrollo embrionario, siendo significativamente mayor a la muerte fisiológica de retinas Atg5^{+/+} en todas las edades estudiadas (Figura 71A, B), lo que puede reflejar otras funciones de la autofagia durante el desarrollo, como previamente hemos comprobado en E13.5.

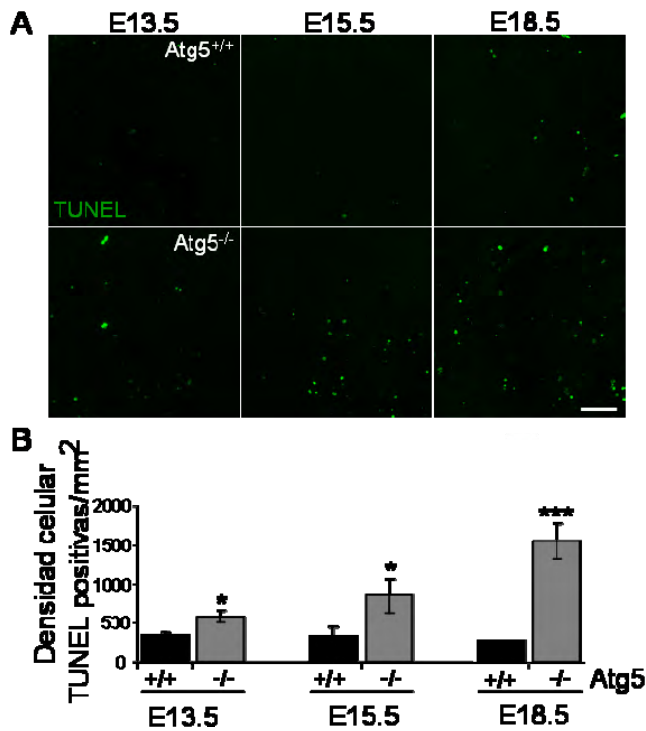


Figura 71. Retinas deficientes de Atg5 presentan un incremento de muerte celular a lo largo del desarrollo embrionario. A. Reacción de TUNEL en retinas Atg5^{+/+} y Atg5^{-/-} a E13.5, E15.5 y E18.5 montadas en plano. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en A. *p<0,05; ***p<0,001.

Por el contrario, retinas deficientes en mitofagia específicamente por deleción de NIX, presentan una disminucón en la muerte celular a E15.5, por lo que la mitofagia mediada por NIX desempeña un papel en la muerte celular (Figura 72 A, B).

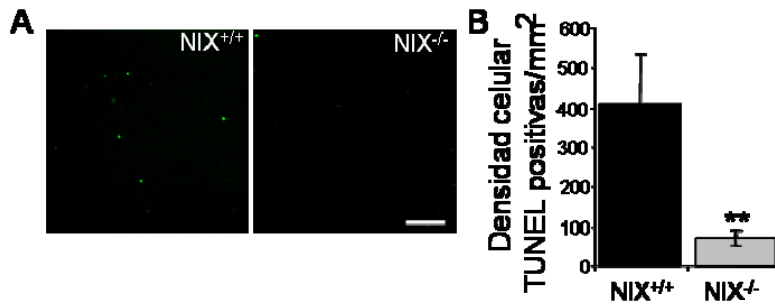


Figura 72. Disminucón de la muerte fisiológica de retinas en E15.5 por deficiencia de NIX. A. Reacción de TUNEL en retinas NIX^{+/+} y NIX^{-/-}. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificacón del número de células TUNEL positivas/mm² en A. **p<0,01.

No obstante, la muerte celular fisiológica de retinas a E15.5, al igual que la muerte neural temprana de retinas a E13.5, también se bloquea al inhibir caspasas con BOC, por lo que de nuevo la mitofagia podría desempeñar un papel promuerte (Figura 73).

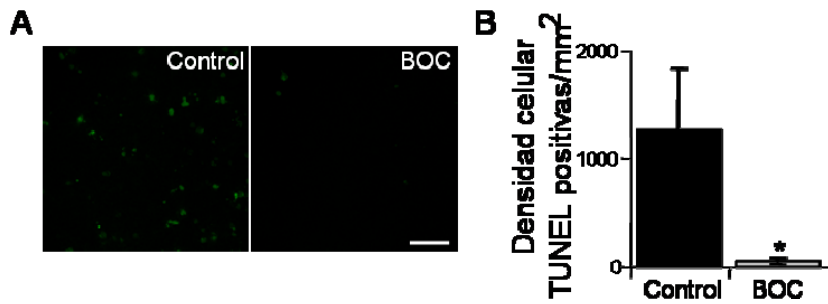


Figura 73. Disminución de la muerte fisiológica de retinas en E15.5 por inhibición de caspasas con BOC. A. Reacción de TUNEL en retinas tras cultivo con BOC. Barra de escala 50µm. **B.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en A. *p<0,05.

A diferencia de retinas en E13.5, ni rapamicina ni EBSS inducen mitofagia en retinas de E15.5, lo que se correlaciona con el hecho de no observar un incremento de muerte celular por inducción de autofagia en este estadio (Figura 74 A, B). Por otro lado, el tratamiento con AO si induce mitofagia en retinas de E15.5, pero disminuye la muerte celular, lo que confirma el papel promueve de la mitofagia inducida por alteraciones en la cadena de transporte electrónico (Figura 74 C-E).

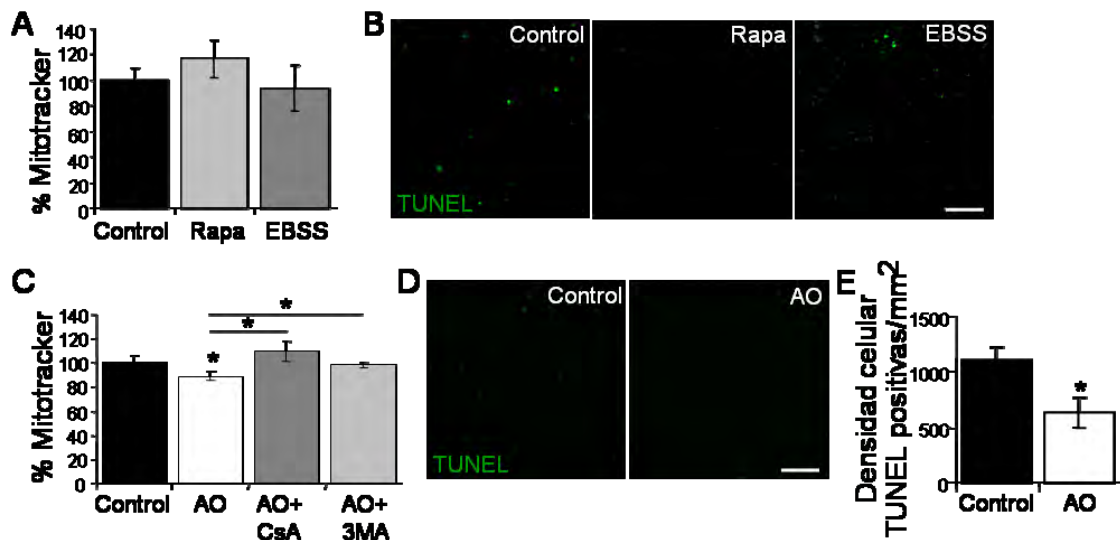


Figura 74. El tratamiento con rapamicina y EBSS no induce mitofagia ni muerte celular en retinas de E15.5. A. Determinación del porcentaje de masa mitocondrial mediante citometría de flujo de retinas en E15.5 tras cultivo con rapamicina y EBSS. **B.** Reacción de TUNEL en retinas de E15.5 tras cultivo con rapamicina y EBSS. Barra de escala 50µm. **C.** Determinación del porcentaje de masa mitocondrial mediante citometría de flujo en retinas de E15.5 tras cultivo con AO en ausencia/presencia de CsA y 3-MA. *p<0,05. **D.** Reacción de TUNEL en retinas de E15.5 tras cultivo con AO. Barra de escala 50µm. **E.** Cuantificación del número de células TUNEL positivas/mm² en D. *p<0,05.

A continuación se determinó si las funciones de la mitofagia en la muerte celular y la diferenciación de RGCs están correlacionadas o, por el contrario, se trata de

procesos independientes. La inhibición de caspasas con BOC no altera la diferenciación de RGCs en retinas de E15.5 a nivel basal ni en retinas de E13.5 con autofagia inducida por rapamicina, por lo que las funciones de la mitofagia en la muerte celular y en la diferenciación asociada a un cambio metabólico parecen ser independientes (Figura 75 A-D).

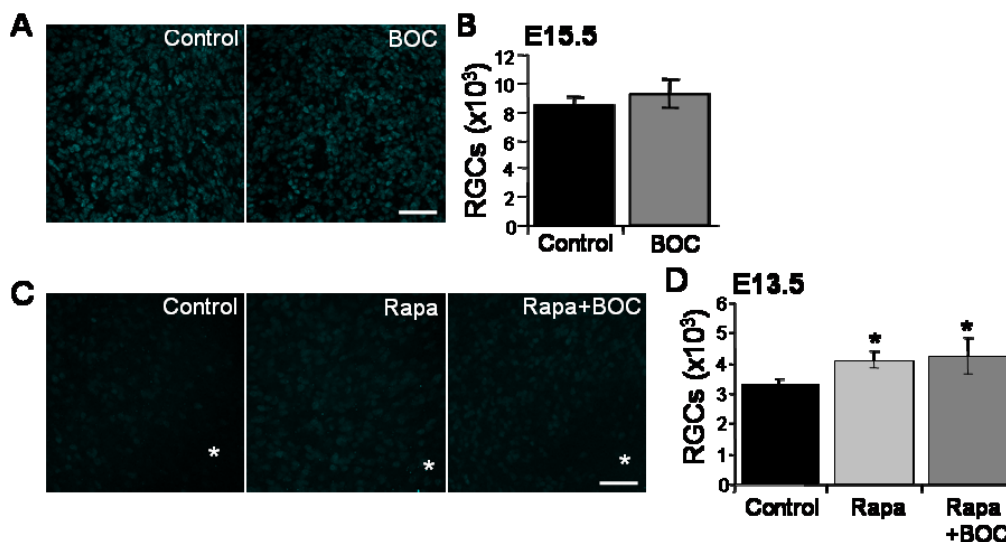


Figura 75. Los efectos de la mitofagia en la diferenciación de las RGCs son independientes de la muerte celular. **A. B.** Inmunotinción y cuantificación de Brn3a para la detección de RGCs en retinas en plano a E15.5 tras cultivo con BOC. Barra de escala 50µm. **C. D.** Inmunotinción y cuantificación de Brn3a para la detección de RGCs en retinas en plano a E13.5 tras cultivo con rapa en ausencia/presencia de BOC. Barra de escala 50µm. *p<0,05.

4.5 Mitofagia durante el desarrollo postnatal de la retina

Una vez determinadas las consecuencias de la mitofagia observada durante el desarrollo embrionario de la retina, estudiamos qué ocurre durante el desarrollo postnatal. A partir del heatmap sobre la expresión de diferentes reguladores moleculares de mitofagia y las PCRs cuantitativas de retinas a diferentes edades, observamos un incremento en la expresión de otras vías implicadas en mitofagia, como PINK1, Parkina, Fundc1, Optineurina y Smurf1 a partir de P9. Mediante citometría de flujo podemos observar un bloqueo de mitofagia en retinas a P9 mediante CsA y 3-MA (Figura 76 A). En retinas a P15 el bloqueo solo se obtiene al inhibir autofagia y MAPK con U0126, que también están implicadas en mitofagia (Chu et al, 2007; Mao et al, 2011) (Figura 76 B). El hecho de que a P9 se produzca un incremento drástico en la expresión de HIF1α que se mantiene de ahí en adelante (ver figura 64), nos lleva a pensar que quizá la hipoxia también este mediando esta segunda oleada de mitofagia durante el desarrollo de la retina.

Además de la disminución del número de células ganglionares por inhibición de mitofagia durante el desarrollo embrionario, se observan alteraciones en la axonogénesis. Por ello, la mitofagia a nivel postnatal podría tener relación con la apertura del ojo y el establecimiento de las primeras conexiones sinápticas para transmitir la información visual. Para este proceso es importante la expresión de semaforinas, que como previamente hemos descrito en el *heatmap* elaborado para la expresión de genes reguladores del desarrollo de RGCs (ver figura 49, RGCs), incrementa en P9 y P15. No obstante, la mitofagia está detectándose en la retina completa, por lo que podría estar mediando también un cambio hacia el metabolismo glicolítico característico de los bastones y la glía de Müller. Estas células empiezan a diferenciarse en estos estadios postnatales, como podemos observar mediante western blot de las proteínas recoverina, para la detección de fotorreceptores, y GFAP, para la detección de las células de Müller (Casson et al, 2013; Young, 1971). (Figura 76C) (Ver figura 49, fotorreceptores).

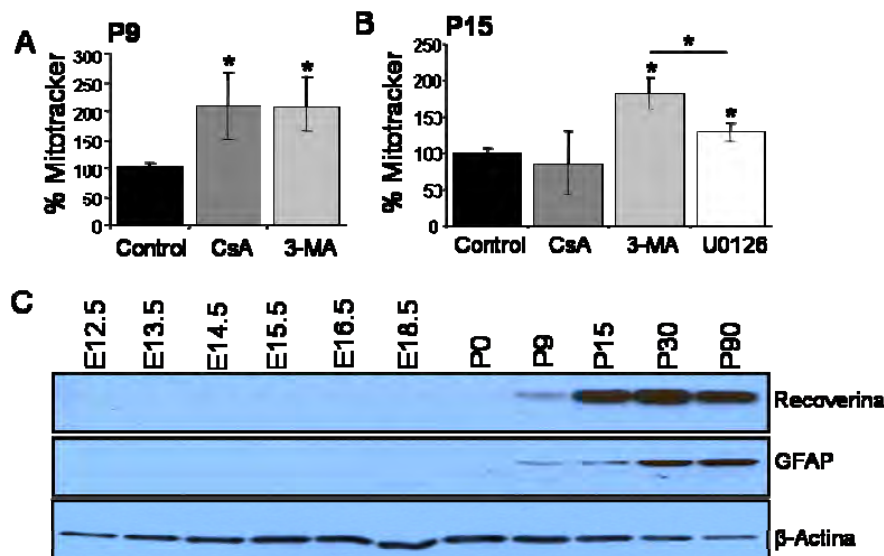


Figura 76. Mitofagia durante el desarrollo postnatal de la retina. A. B. Determinación del porcentaje de masa mitocondrial mediante citometría de flujo de retinas a P9 y P15, respectivamente, tras cultivo con CsA y 3-MA. * $p < 0,05$. C. Western blot para la detección de proteínas de los fotorreceptores (recoverina) y de la glía de Müller (GFAP).

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

1. ESTUDIO DEL FLUJO DE AUTOFAGIA EN RETINA

En esta Tesis Doctoral hemos descrito que en la retina el flujo de autofagia se puede determinar tanto *in vivo* como en *ex vivo*. La inyección intraperitoneal con leupeptina bloquea el flujo basal e inducido por ayuno en retina adulta, demostrando que este compuesto atraviesa la barrera hematorretiniana y que la autofagia es un proceso activo en la retina adulta (Figura 2 de resultados). El hecho de que podamos observar tanto la autofagia basal como la inducida en la retina contrasta con los datos en otras partes del sistema nervioso donde la privación de comida en los animales no induce autofagia. Esto podría deberse por un lado a que la retina presenta una autofagia basal muy elevada y/o a las características metabólicas tan especiales de la retina en comparación con el resto del sistema nervioso. Hay que destacar que las células de la retina con mayor flujo son las células ganglionares, cuyos axones envían la información al cerebro, y los fotorreceptores, las células encargadas de transformar la información visual en impulsos nerviosos (Figura 3 de resultados). Esto está de acuerdo con un reciente trabajo en el que ven que los fotorreceptores y en concreto los conos son las células que presentan mayor incremento de autofagia tras el ayuno (Zhou et al, 2015).

Además, la retina es un buen modelo para estudiar sistema nervioso, ya que puede ser mantenida en cultivos organotípicos así como cultivando el ojo entero del embrión donde el flujo de autofagia es fácilmente modulable (Esteban-Martinez & Boya, 2015) (Figura 5 de resultados). De esa manera, hemos comprobado que en la retina embrionaria, las células ganglionares son las que presentan mayor flujo de autofagia (Figura 6 de resultados). Esto podría ser debido a que la autofagia desempeña un papel esencial en la diferenciación de este tipo celular mediante la eliminación de mitocondrias (Figuras 53, 54 y 66 de resultados), produciéndose la mitofagia fundamentalmente en la capa de células ganglionares (Figuras 51 y 52B, C, E de resultados).

La autofagia basal en el sistema nervioso central es un proceso esencial para la homeostasis ya que ratones deficientes de autofagia en precursores neurales mueren de

neurodegeneración en edad temprana (Hara et al, 2006; Komatsu et al, 2006). Por tanto, la determinación del flujo de autofagia es importante para estudiar la contribución de este proceso en la homeostasis en cada situación, estadio o tipo celular.

2. LA AUTOFAGIA ES ESENCIAL PARA LA ELIMINACIÓN DE LAS CÉLULAS APOPTÓTICAS DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO DE LA RETINA

Los procesos de muerte celular son necesarios para un correcto desarrollo de los tejidos y ocurren de manera prominente durante el desarrollo embrionario. Nuestros datos indican que durante el desarrollo embrionario de la retina de ratón, la autofagia es necesaria para mantener unos niveles de ATP intracelulares suficientes para la exposición de fosfatidilserina en la superficie de células apoptóticas, lo que permite su reconocimiento y degradación por la microglía (Ver figuras 11 y 12 de resultados). El metilpiruvato (MP) es un sustrato del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) permeable a la mitocondria, capaz de incrementar los niveles de ATP intracelular. El hecho de que retinas con autofagia inhibida por tratamiento con 3-MA o deficiencia de Atg5, presentan menores niveles de ATP y de que la presencia de MP en el cultivo restaure los niveles de ATP y evite la acumulación de las células apoptóticas en la periferia de la retina, indica que los nutrientes obtenidos por la autofagia tienen un importante papel en la producción de ATP durante el desarrollo de la retina en dicha región. La distribución de la muerte celular fisiológica y tras la inhibición de autofagia en retinas de E13.5 está representada en la figura 1.

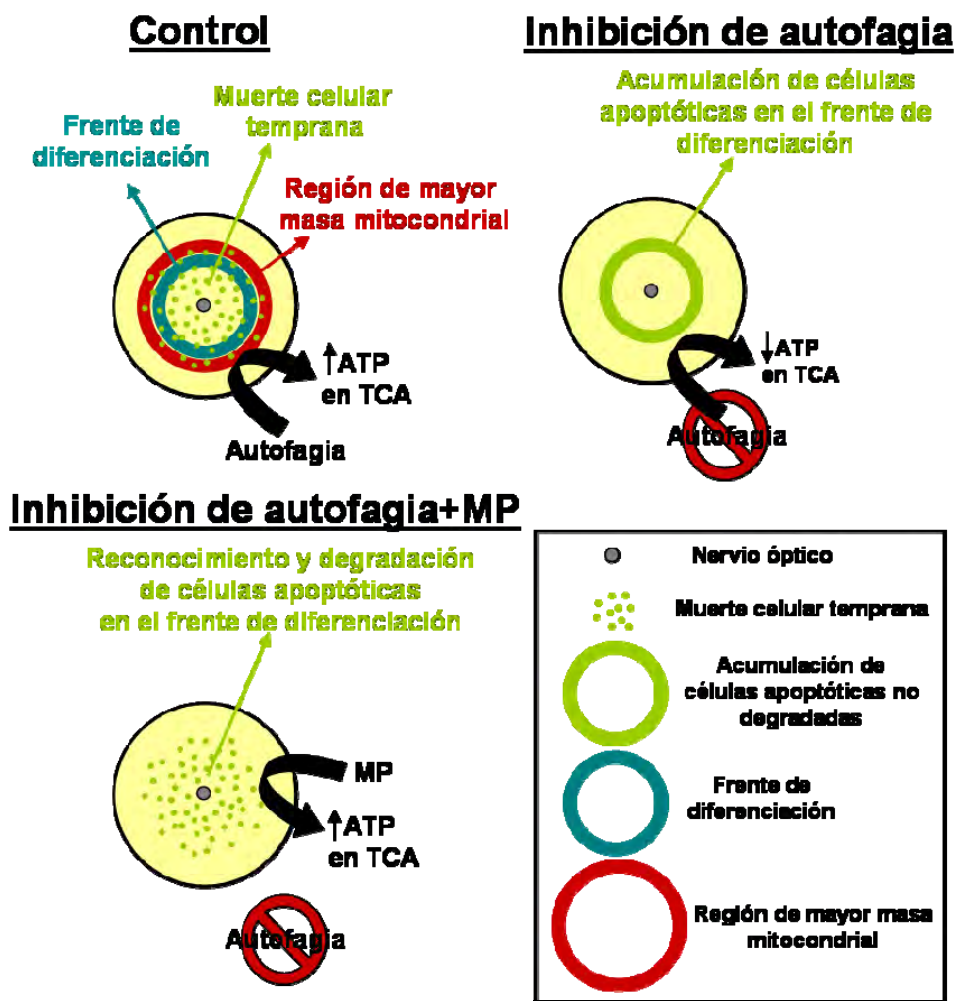


Figura 1. Fenotipo de la inhibición de autofagia en relación a la muerte celular fisiológica localizada en el frente de diferenciación en retinas de E13.5.

Esta función de la autofagia como proceso productor de ATP se ha observado previamente cuando células de ratones $Bax^{-/-}/Bak^{-/-}$ son sometidas a privación de factores de crecimiento, siendo la autofagia esencial para mantener tanto los niveles de ATP como la supervivencia celular en dichas condiciones (Lum et al, 2005). En el caso de las retinas, no hemos modulado la muerte por apoptosis directamente, lo que refleja la interrelación entre la apoptosis y la autofagia en un contexto fisiológico. El ATP es muy importante para la exposición del fosfolípido fosfatidil-serina en la superficie de la membrana externa de las células apoptóticas (Fadok et al, 1992; Venegas & Zhou, 2007; Verhoven et al, 1999) y los aminoácidos, ácidos grasos libres y carbohidratos generados de la degradación lisosomal por autofagia pueden incorporarse en el ciclo de Krebs y contribuir a la generación de ATP (Mizushima & Klionsky, 2007; Singh & Cuervo, 2011). Por tanto, hemos confirmado un papel metabólico de la autofagia para la

eliminación de las células apoptóticas de la retina de ratón en estadios tempranos del desarrollo. Estos datos en la retina embrionaria de ratón son similares a los obtenidos en estudios previos de nuestro laboratorio en retinas de embriones de pollo (Boya et al, 2008; Mellén et al, 2008), por lo que podría tratarse de un mecanismo asociado al proceso de muerte fisiológica. Además, también se ha observado que la autofagia es necesaria para la exposición de fosfatidil-serina en el proceso de muerte que se produce durante la cavitación del embrión, desempeñando un papel en la producción de ATP. En todos estos casos mencionados, el tratamiento con metilpiruvato también es capaz de revertir el fenotipo (Boya et al, 2008; Mellén et al, 2008; Qu et al, 2007). Por otro lado, se ha descrito que el metabolismo es importante durante la diferenciación neuronal temprana de progenitores de bulbo olfativo, durante el cual la autofagia contribuye a la generación de ATP (Vazquez et al, 2012), por lo que los procesos fisiológicos afectados al inhibir autofagia en la retina podrían ser diversos.

Nuestros datos indican que la inhibición de autofagia solo incrementa la muerte celular en el frente de diferenciación, localizado en la periferia de retinas de ratón a E13.5, sin afectar a los procesos de muerte celular que se producen en estadios posteriores del desarrollo de la retina (Figura 13 de resultados). De nuevo estos datos se corresponden con lo observado en la retina de ave (Mellén et al, 2009). Este hecho podría deberse a las diferencias en los niveles de masa mitocondrial observadas en distintas regiones de retinas a E13.5 (Figuras 34 de resultados y 1 de discusión) así como a la disminución de mitocondrias a partir de E15.5 (Figura 42 de resultados), lo que explicaría que en aquellas zonas o estadios de menor masa mitocondrial, los metabolitos generados por autofagia no se emplean para la generación de ATP mediante su incorporación en el TCA. Además, como hemos observado en estadios tardíos del desarrollo de la retina se produce un cambio metabólico hacia glicólisis a partir de E15.5 (Figura 47 de resultados), lo que resalta la idea de que los metabolitos generados por la autofagia no puedan ser incorporados en el TCA para la obtención de energía.

Por otro lado, es posible que las altas demandas energéticas de las células en retinas de E12.5-E13.5 sean responsables del mayor flujo de autofagia que se observa en esas edades tempranas y no durante el desarrollo embrionario tardío (E18.5) (Figura 7 C de resultados). Esto podría reflejar que la autofagia está más activada en condiciones en las que contribuye a la producción de ATP y que esta función está asociada a situaciones metabólicamente muy activas, no siendo un fenómeno universal. Así, la muerte celular fisiológica no se ve afectada por la inhibición de autofagia en

otros estadios mas avanzados del desarrollo como las retinas de E18.5 (Figura 13 de resultados).

Además, hemos observado que la dosis de insulina modula la autofagia en retinas de E13.5, siendo mayor su activación cuanto menor es la dosis de insulina o tras ayuno de aminoácidos mediante cultivo de retinas en EBSS (Figura 19 de resultados). Esta adaptación al ayuno de la autofagia es esencial en el periodo neonatal, durante el cual es crítica la interrupción de suministro de nutrientes a través de la placenta y hay una alta tasa metabólica. Así, ratones deficientes de genes de autofagia, aunque llegan a nacer, mueren en los primeros días de vida debido a su inhabilidad de mantener suficientes concentraciones de aminoácidos para mantener los niveles de ATP y la síntesis de proteínas esenciales (Kuma et al, 2004). Esta hipótesis sobre la función de la autofagia como proceso productor de ATP en función de los requerimientos metabólicos, se relaciona con el efecto diferencial de la wortmanina como inhibidor de autofagia en retinas embrionarias dependiendo de las condiciones nutricionales del cultivo, siendo mayor ante un estrés celular por privación de insulina o ayuno de aminoácidos (Figura 19 de resultados). El hecho de que en condiciones ricas en nutrientes la wortmanina a 6h induce autofagia, se relaciona con lo descrito previamente sobre la estimulación de autofagia por tratamiento con 3-MA en medio rico en nutrientes, pero en este caso, a tiempos mayores a 6h (Wu et al, 2010). Por ello, en nuestras condiciones experimentales de baja dosis de insulina (10nM) y durante 6h, hemos considerado la inhibición de autofagia con 3-MA más específica que la inhibición con wortmanina, ya que el flujo de LC3 está más inhibido con 3-MA (Figura 8A de resultados) que con wortmanina en tales condiciones (Figura 19 de resultados). Por lo tanto en el caso de realizar cultivos es muy importante conocer las condiciones del cultivo y como las retinas responden a diferentes tipos de ayuno.

En los dos modelos genéticos estudiados, retinas deficientes de Ambra1 y de Atg5, hay un incremento de la muerte celular a E13.5 (Figuras 23 y 24 de resultados). En retinas deficientes de Atg5, la muerte celular se acompaña de una disminución de los niveles de ATP y podría rescatarse en presencia de MP (Figura 24 de resultados), destacando el papel metabólico de la autofagia. Por otro lado, en las retinas deficientes de Ambra1 en cultivo, hemos observado una disminución de la exposición de fosfatidilserina y un incremento de los niveles de muerte celular (Figura 23 de resultados). En futuros experimentos, habría que determinar como son los niveles de ATP en retinas

deficientes de Ambra1, y si el suplemento con MP rescata los niveles de muerte celular observados tras la inhibición genética de autofagia.

Previamente se ha descrito el rescate del fenotipo de la diferenciación en el bulbo olfativo de embriones deficientes de Ambra1 y de Atg5 por tratamiento con MP (Vazquez et al, 2012). No obstante, no descartamos que ese incremento de muerte celular se deba también a otros procesos independientemente del bloqueo de la fagocitosis y degradación de las células muertas. De hecho, retinas deficientes de Atg5 presentan un incremento de muerte celular aun mayor en estadios tardíos (E18.5) (Figura 71 de resultados), en los que el bloqueo farmacológico de autofagia no afecta a la muerte celular (Figura 13 de resultados). En el caso de ratones deficientes para Ambra1 producidos por mutagénesis (Ambra1^{gt/gt}), se ha descrito que muestran un incremento en la muerte celular en muchas áreas del cerebro en desarrollo (Cecconi & Levine, 2008), por lo que parece que además de poder presentar un bloqueo del reconocimiento de las células apoptóticas y su degradación lisosomal, la deficiencia de Ambra1 induce muerte celular. Estudios previos han demostrado que Parkina, una E3 ubiquitin ligasa, podría proteger a las neuronas mediante la eliminación por mitofagia de mitocondrias dañadas, que son una fuente de estrés oxidativo. La interacción entre Parkina y Ambra1 es crucial para este proceso, luego es posible que otra de las funciones de Ambra1 en relación con la muerte celular también durante el desarrollo del sistema nervioso esté relacionada con la protección frente al estrés oxidativo (Van Humberbeck et al, 2011).

Por otro lado, hay que destacar que la función de la autofagia en el proceso de fagocitosis de las células apoptóticas en retinas embrionarias de pollo (Mellén et al, 2008) es más compleja en retinas de ratón. En retinas de pollo, la fagocitosis de las células apoptóticas la realizan las células vecinas, mientras que en ratón, la microglía, que ya está presente en la retina en estadios tempranos (Santos et al, 2008), y las células vecinas pueden fagocitar a las células apoptóticas. Es posible que en los modelos genéticos, las células de la microglía desarrollen estrategias para la fagocitosis de las células apoptóticas a pesar de la disminución de la exposición de la fosfatidil-serina. Se ha descrito que macrófagos de ratones deficientes de Atg7 específicamente en células mieloides presentan un incremento en su contenido bacteriano tras la infección, al incrementar la expresión de dos receptores de fagocitosis (Bonilla et al, 2013). Por lo que es posible que las células de la microglía de retinas deficientes de Atg5 y Ambra1 incrementen la expresión de otros receptores de fagocitosis, lo que facilitaría la

incorporación de células apoptóticas a partir del reconocimiento de otras señales de fagocitosis. Además, en un futuro sería interesante determinar si retinas deficientes de Ambra1 y de Atg5 ponen en marcha la fagocitosis asociada a LC3 (LAP). LAP es un proceso en el cual los componentes a degradar son englobados en una estructura de una membrana mediante la actividad del complejo formado por Beclin1 y Vps34, y de los sistemas de conjugación de LC3, sin necesidad de la maduración del autofosoma de doble membrana (Deretic et al, 2013). Para ello, podríamos cultivar retinas deficientes de Atg5 o Ambra1 en presencia de 3-MA y determinar si existen diferencias en la muerte observada en estas retinas en ausencia de 3-MA. Además, recientemente se ha descrito la necesidad de la proteína Rubicon en el proceso de LAP pero no para autofagia (Martinez et al, 2015), por lo que sería interesante comparar el fenotipo de muerte celular en retinas deficientes de Rubicon con el fenotipo de retinas deficientes en Atg5 y Ambra1.

En conclusión, la autofagia presenta un papel metabólico en los estadios tempranos del desarrollo necesario para llevar a cabo procesos dependientes de energía, como la fagocitosis de las células apoptóticas. No obstante, la inhibición crónica de la autofagia puede desencadenar mecanismos de compensación para intentar restaurar la fisiología celular.

3. LA MITOFAGIA ES ESENCIAL PARA EL DESARROLLO DE LA RETINA DE RATÓN

3.1. Un aumento de NIX regula la mitofagia en retinas a E15.5

En esta Tesis Doctoral, hemos demostrado la activación del proceso de degradación selectiva de las mitocondrias por autofagia en estadios determinados del desarrollo. Así, observamos mitofagia fisiológica en la región central de la retina a E13.5 y en la retina completa a E15.5, ya que los niveles de masa mitocondrial aumentan al inhibir la autofagia con 3-MA, la mitofagia con CsA y en retinas deficientes de Atg5 (Figuras 35, 43, 44 y 45 de resultados; figura 2 A de discusión). Además nuestros datos indican que este proceso de mitofagia está regulado por hipoxia y NIX (Figuras 64-69 de resultados, figura 2 A, B de discusión). Además, durante el desarrollo embrionario no se produce un incremento en la expresión de genes

implicados en biogénesis mitocondrial (Figura 46 de resultados), resaltando el papel de la mitofagia en la homeostasis mitocondrial de la retina.

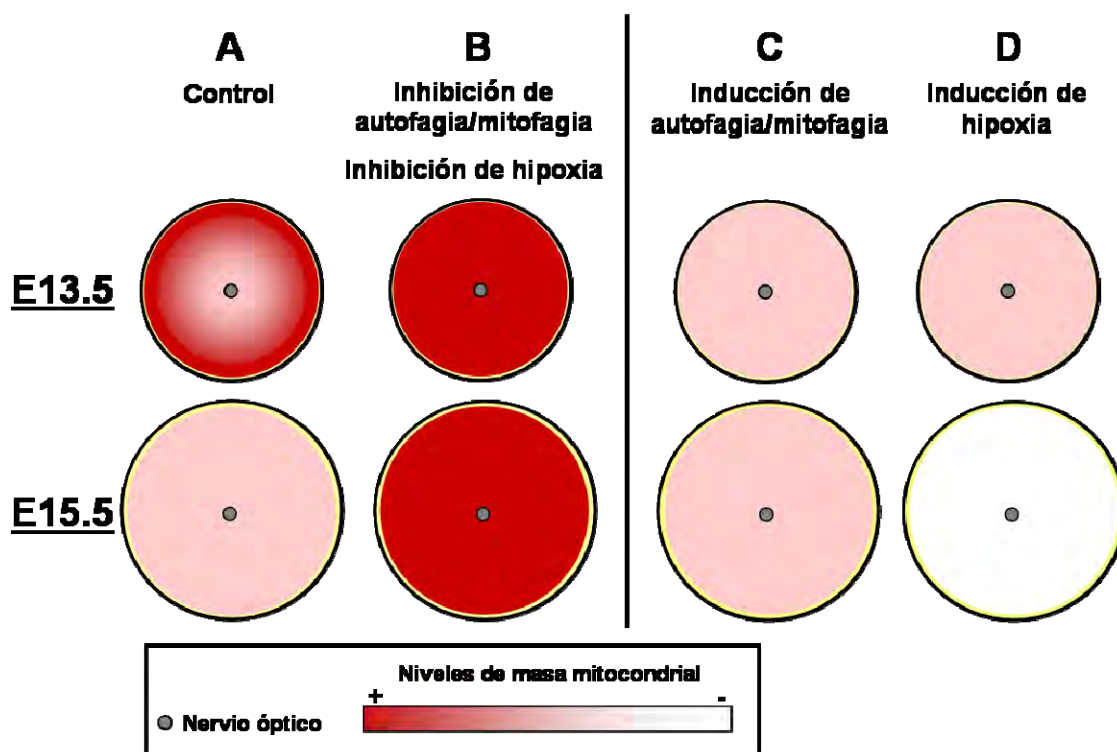


Figura 2. Niveles de masa mitocondrial al bloquear e inducir los procesos de autofagia e hipoxia en retinas de ratón a E13.5 y E15.5. A. Situación control fisiológica. **B.** Inhibición de autofagia con 3-MA y en retinas deficientes de Atg5; inhibición de mitofagia con CsA y retinas deficientes de NIX; inhibición de hipoxia con FM19G11. **C.** Activación de autofagia/mitofagia mediante tratamiento con rapamicina y EBSS. **D.** Inducción de hipoxia con DFO.

Generalmente, NIX está expresado en bajos niveles basales en la mayoría de los tejidos. Un incremento de sus niveles de expresión se ha visto asociado a una disminución de la masa mitocondrial en procesos fisiológicos como durante el desarrollo de la lente (Ashrafi & Schwarz, 2013), la diferenciación de los eritrocitos (Kundu et al, 2008; Sandoval et al, 2008; Schweers et al, 2007) y la generación de células NK de memoria (O’Sullivan, 2015). Por tanto, la expresión de NIX está incrementada en situaciones donde desempeña una función en la homeostasis celular (Aerbajinai et al, 2003; Galvez et al, 2006; Sowter et al, 2001; Yussman et al, 2002). Durante el desarrollo embrionario de la retina, el hecho de que la expresión de NIX presente un incremento entre E15.5-E18.5, mientras que otros reguladores conocidos de mitofagia lo hacen fundamentalmente a nivel postnatal (Figura 65 B de resultados),

sugiere que NIX podría tener un papel diferencial regulando la mitofagia observada durante el desarrollo embrionario de la retina de ratón.

La autofagia puede inducirse por diferentes tipos de estrés celular o vías de señalización, como la privación de nutrientes, el estrés oxidativo y la hipoxia. Se han descrito diferentes factores de transcripción que regulan la expresión de NIX, como *TFEB*, *SP1*, *FOXO3a*, *E2F1* y *HIF1 α* , y la disminución de miR-137 asociada a hipoxia permite la expresión de NIX (Hamacher-Brady & Brady, 2016; Ma et al, 2012). Durante el desarrollo embrionario de la retina, hemos observado un incremento de la expresión de genes regulados por el factor *HIF1 α* , como *Adm*, *Egln*, *AldoA*, *Pgk1* y *Slc2a1* (Figura 64 de resultados), lo que sugiere que se produce hipoxia durante el desarrollo de la retina. Además hemos observado un incremento en *FOXO3a* a partir de E14.5, y de *E2F1* a partir de E15.5 (Figura 69 de resultados). Bajo condiciones de hipoxia, *FOXO3a* suprime la expresión de NIX mediada por HIF1- α mediante el cofactor *CITED2*, lo que constituye una regulación negativa compensatoria bajo condiciones de hipoxia (Hamacher-Brady & Brady, 2016). Estos datos reflejan que podría haber una regulación coordinada y controlada de la expresión de NIX por diferentes factores de transcripción, entre los que *HIF1 α* , que se estabiliza bajo condiciones de hipoxia, parece ser fundamental en dicha regulación. Estos datos sugieren que un incremento de los niveles de hipoxia durante el desarrollo de la retina podría inducir la expresión de NIX para regular los niveles de mitocondrias.

Se ha descrito que la inducción de niveles de HIF1 α en células bajo condiciones de hipoxia es dependiente de mTORC1 y que se puede revertir mediante su inhibición con rapamicina (Brugarolas et al, 2003; Land & Tee, 2007). Nuestros datos indican que mTORC1 está activo en retinas a E15.5 (Figura 7 A de resultados) en las que hemos detectado la mitofagia, lo que podría reflejar que la inducción de HIF1 α en retinas en dicho estadio es dependiente de mTORC1. Además, el tratamiento con rapamicina y el ayuno de aminoácidos por cultivo en EBSS a E15.5 no induce mitofagia (Figura 74 A de resultados; figura 2 C de discusión), lo que podría ser debido a la inhibición de mTORC1. Por el contrario, la disminución de la actividad de mTORC1 a E13.5 y E18.5 observada por blot (Figura 7 A de resultados), podría generar un bucle negativo mediante la inducción de la degradación de HIF1 α , resultando en la normalización de sus niveles con el fin de parar la respuesta aguda a hipoxia (DeYoung et al, 2008). Esto explicaría por qué hay un pico de expresión de NIX entre E15.5 y E18.5, siendo su expresión menor a E13.5 y posterior a E18.5 (Figura 65 B de resultados). De esa

manera, podría haber un control estricto de la degradación mitocondrial de las retinas a E13.5 para que se produzca únicamente en su región central (Figura 35 de resultados), estadio en el cual la masa mitocondrial ya está alterada cuando se modula la hipoxia (Figura 68 de resultados; figura 2 B, D de discusión). Por tanto, es posible que en estadios previos al pico de mitofagia haya limitaciones de oxígeno en la región madura de la retina, donde al igual que en retinas a E15.5, la mitofagia podría estar regulada por HIF1 α . Teniendo en cuenta esta regulación de HIF1 α dependiente de mTORC1, la inducción de mitofagia en toda la retina a E13.5 mediante tratamiento con rapamicina (Figura 37 de resultados; figura 2 C de discusión) podría indicar que otros mecanismos pueden estar implicados en la regulación de la mitofagia inducida por rapamicina. De hecho, se ha descrito que análogos de este compuesto activan a PINK1, el cual posteriormente recluta a OPTN y NDP52 en la mitocondria en ausencia de Parkina.

No obstante, el mecanismo por el cual las células regulan la activación de HIF1 α durante la hipoxia es controvertido. Se ha descrito que se requiere de los ROS generados en el complejo III de la cadena de transporte electrónico para la activación de HIF1 α dependiente de hipoxia (Chandel et al, 2000; Klimova & Chandel, 2008). Bajo condiciones óptimas de funcionamiento mitocondrial, las demandas energéticas y la disponibilidad de sustratos metabólicos y oxígeno son los determinantes centrales de la respiración mitocondrial, de manera que un cambio en la disponibilidad de sustrato o una disminución de los niveles de oxígeno podría alterar la función mitocondrial e inducir mitofagia. Ante la ausencia de oxígeno, se activan una serie de mecanismos adaptativos esenciales para la supervivencia, como un incremento en la expresión de HIF1 α que disminuye el número de mitocondrias y la generación de nueva vasculatura para incrementar la disponibilidad de oxígeno (Klimova & Chandel, 2008).

El mecanismo que regula la activación de HIF1 α y de la mitofagia mediada por NIX durante el desarrollo de la retina descrito en esta Tesis Doctoral está esquematizado en la figura 3 y se explica a continuación:

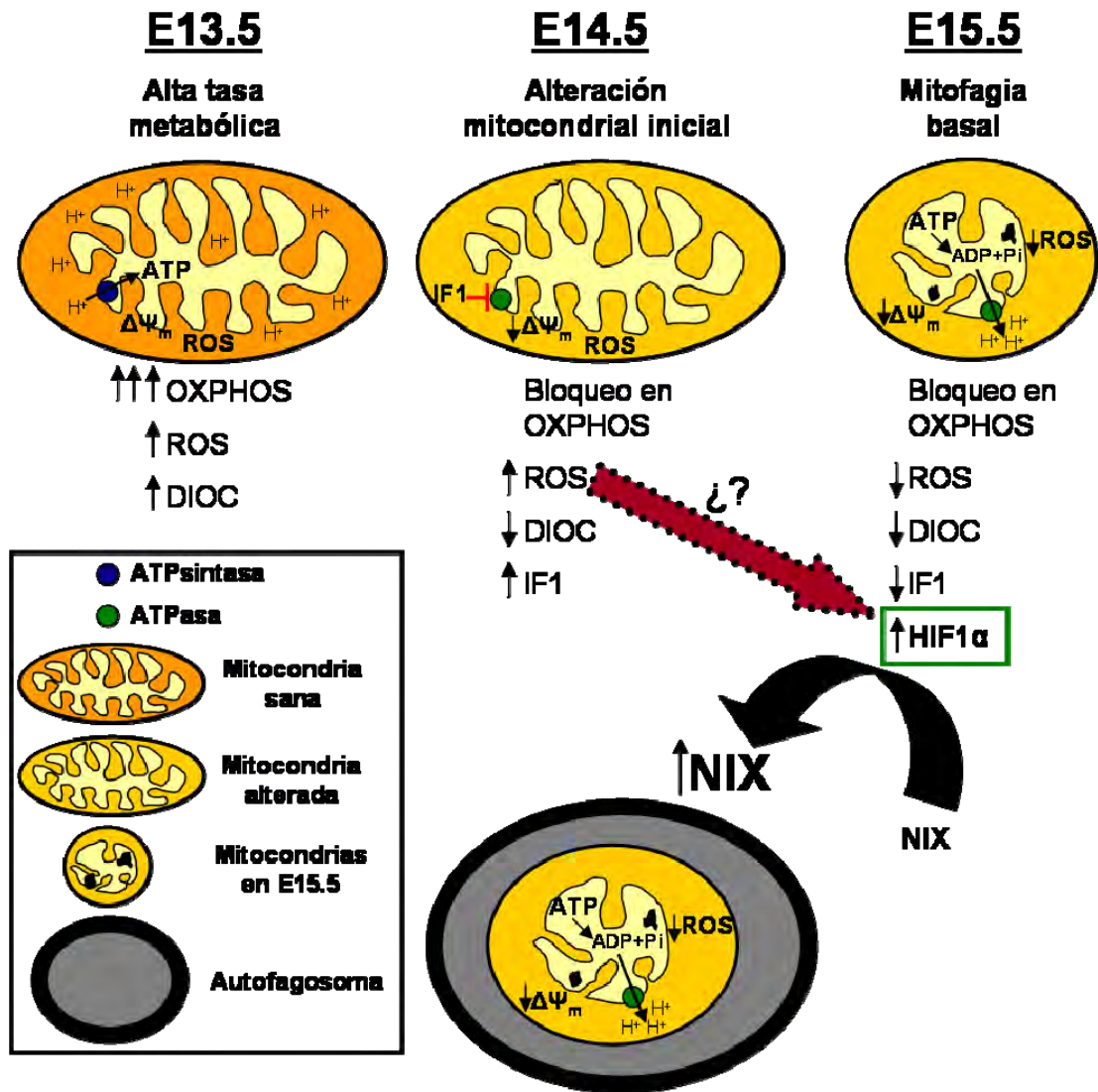


Figura 3. Señal inductora y mecanismo molecular de mitofagia durante el desarrollo de la retina embrionaria de ratón.

Durante el desarrollo de la retina hemos observado que las retinas a E13.5 son metabólicamente muy activas, ya que la respuesta a FCCP no incrementa el consumo de oxígeno, lo que indica que las retinas ya están respirando al nivel máximo (Figura 63 de resultados; figura 3 (E13.5) de discusión). Esto se correlaciona con los elevados niveles de ROS y potencial de membrana mitocondrial en este estadio (Figuras 61A, B y 62 A, B de resultados; figura 3 (E13.5) de discusión). Además, hemos observado una disminución de ROS a partir de E15.5 que no es debida al proceso de mitofagia observado en dicha edad, ya que la deficiencia de Atg5 y la inhibición farmacológica de autofagia con 3-MA no alteran los niveles de ROS (Figura 61 C-E de resultados; figura 3 (E15.5) de discusión). Por el contrario, la inhibición con CsA a E15.5 incrementa el

estrés oxidativo, lo que sugiere que los niveles de ROS están modulándose por cambios en la cadena de transporte electrónico mitocondrial (Figura 61 D, E de resultados). Estos datos junto con la disminución del potencial de membrana mitocondrial en E14.5, previo al pico de mitofagia, indican que hay una alteración mitocondrial que precede a la activación de mitofagia (Figura 62 de resultados; figura 3 (E14.5) de discusión). Como he mencionado anteriormente, los ROS generados en la cadena de transporte electrónico son esenciales para la activación de HIF1 α dependiente de hipoxia, por lo que esta alteración mitocondrial podría desencadenar la hipoxia observada en retinas a E15.5 (Chandel et al, 2000; Klimova & Chandel, 2008).

La transferencia de electrones a través de los complejos de la cadena de transporte electrónico en la membrana interna mitocondrial es esencial para el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial, por lo que la pérdida del mismo ya en retinas de E14.5 podría estar relacionada con una alteración de la actividad de la cadena de transporte electrónico. En el análisis de la función mitocondrial mediante Seahorse, hemos observado que retinas de E14.5 son insensibles a la adición de oligomicina y FCCP (Figura 63 B de resultados). Se ha descrito que durante la hipoxia/isquemia, la respiración mitocondrial está comprometida y se produce una disminución del potencial de membrana mitocondrial (Iijima, 2006). Esto puede promover la actividad reversa de la ATP sintasa, que pasa a funcionar como una ATPasa, consumiendo ATP y translocando protones desde la matriz mitocondrial hacia el espacio intermembrana en un intento de preservar el potencial de membrana. (Campanella et al, 2009; Faccenda & Campanella, 2012; Harman et al, 1990; Rouslin & Broge, 1993). Esa función reversa de la ATP sintasa puede bloquearse a nivel fisiológico mediante un incremento en la expresión del inhibidor IF1 (Campanella et al, 2008). Durante el desarrollo de la retina, hemos observado un incremento progresivo hasta E14.5 en la expresión del inhibidor endógeno de la ATP sintasa IF1. Esto podría explicar por qué en dicho estadio las retinas son insensibles a oligomicina (Figura 63 B y F de resultados; figura 3 (E14.5) de discusión). El hecho de que la expresión de IF1 disminuye a E15.5 (Figura 63 F de resultados; figura 3 (E15.5) de discusión) y de que el bloqueo con oligomicina incrementa el consumo de oxígeno (Figura 63 C de resultados) así como el potencial de membrana mitocondrial (Figura 63 G, H de resultados), sugiere que la ATPsintasa funciona en sentido reverso en dicha edad (Figura 3 (E15.5) de discusión). Estudios previos han descrito que la unión de IF1 a la ATPasa mitocondrial inhibe la hidrólisis de ATP y acelera la disipación del potencial de membrana

mitocondrial, facilitando el reclutamiento de PARK2 para la degradación mitocondrial (Campanella et al, 2009; Matic et al, 2016). En nuestro caso, hemos confirmado el papel de NIX en la mitofagia durante el desarrollo de la retina, por lo que IF1, hipoxia y expresión de NIX podrían funcionar de manera coordinada para inducir finalmente la degradación mitocondrial.

Durante la respiración mitocondrial, el oxígeno puede generar anión superóxido (O_2^-), el precursor de la mayoría de los ROS a nivel del complejo I y III de la cadena de transporte electrónico (Hamacher-Brady & Brady, 2016). La acumulación de ROS durante el metabolismo puede ser perjudicial y producir disfunción mitocondrial. Así, se ha observado una acumulación de mitocondrias disfuncionales que producen ROS en varios tipos de células deficientes de autofagia/mitofagia, como células NK deficientes de NIX (O'Sullivan, 2015), por lo que la autofagia es un proceso que juega un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular mediante la eliminación de mitocondrias disfuncionales (Lu et al, 2013). Además, se ha demostrado que el incremento de los niveles de ROS resulta en la pérdida del potencial de membrana mitocondrial y activación de mitofagia, proceso que se revierte en presencia de antioxidantes, por lo que los ROS constituyen una señal de activación de mitofagia (Wang et al, 2012). Por tanto, es posible que los altos niveles de ROS en retinas a E13.5 y E14.5 también estén implicados en la activación de mitofagia a E15.5 (Figura 3 de discusión). Para ello, sería interesante modular el estado oxidativo mediante antioxidantes y determinar qué ocurre con la mitofagia observada durante el desarrollo de la retina.

Ante una situación de hipoxia, puede no solo haber una limitación de oxígeno sino también de nutrientes, lo que podría determinar los niveles de masa mitocondrial con el fin de prevenir un malfuncionamiento de la mitocondria. Por ello, las respuestas de ayuno deberían llevar a una disminución de la masa mitocondrial (Youle & Narendra, 2011), pero la renovación completa de las mitocondrias podría ser perjudicial para la célula. En levaduras, el cambio de una fuente de carbono no fermentable a una fermentable y mutaciones en la ATP sintasa de la cadena de transporte electrónico, inducen mitofagia (Kanki & Klionsky, 2008; Nowikovsky et al, 2007; Priault et al, 2005). Además, se ha descrito que RAS induce mitofagia como una estrategia de supervivencia mediante la activación de glicólisis para suplir el déficit energético resultado de la deficiencia de glucosa. En este caso, RAS induce la expresión de transportadores de glucosa como GLUT1 y promueve el cambio a metabolismo

glicolítico mediante una reprogramación de la expresión génica. Una vez que se activa la glicólisis, no se necesita gran cantidad de masa mitocondrial para la producción de ATP (Guo et al, 2011). Por otro lado, la estimulación de autofagia en hepatocitos de rata por privación de suero y glucagón, incrementa la despolarización de las mitocondrias, que son englobadas en vacuolas ácidas. Este proceso está inhibido por CsA (He & Lemasters, 2005) y se correlaciona con el hecho de que el ayuno de aminoácidos por cultivo de retinas a E13.5 en EBSS induce mitofagia que se revierte con CsA (Figuras 38 de resultados; figura 2 C de discusión). En las retinas a E18.5, el cultivo mediante EBSS también produce una disminución de la masa mitocondrial, sin embargo, en este caso no se inhibe por CsA (Figura 58 F de resultados), demostrando que el ayuno no siempre lleva a una degradación mitocondrial selectiva. Por tanto, la activación de autofagia no necesariamente significa que se vaya a inducir mitofagia. Así, el cultivo en EBSS no induce mitofagia en retinas a E15.5 (Figura 74 A de resultados), por lo que durante el desarrollo de la retina, la degradación mitocondrial basal a E15.5 parece ser específica de la limitación de oxígeno. Además, como he mencionado previamente, la macroautofagia constitutiva es insensible a los efectos inhibitorios que mTOR, la señalización por insulina, y ciertos aminoácidos ejercen en la macroautofagia inducida por ayuno (Yamamoto et al, 2006), por lo que durante el desarrollo de la retina, el ayuno de aminoácidos no parece ser la señal inductora de mitofagia basal observada en E15.5. Queda por determinar si un ayuno de glucosa si induce esa mitofagia basal. No obstante, se ha descrito que las mitocondrias están protegidas durante la autofagia inducida por ayuno bajo determinadas circunstancias mediante fusión mitocondrial (Gomes et al, 2011). Nuestros datos indican que durante el desarrollo embrionario de la retina se produce una ligera disminución en la expresión de mitofusina 2 entre E14.5 y E15.5, lo que podría favorecer la mitofagia basal a E15.5 al disminuir la fusión mitocondrial. Para confirmarlo, sería interesante determinar los niveles de masa mitocondrial en retinas deficientes de mitofusina 2 *in vivo* y tras cultivo en diferentes condiciones de ayuno.

Por tanto, la mitofagia que se observa durante el desarrollo de la retina está regulada NIX, y la señal inductora parece ser la limitación de oxígeno. No obstante, también hemos observado un incremento en la expresión de otros reguladores de mitofagia, como PINK1, Parkina, Optineurina, FUNDC1, Smurf1... (Figura 65 C) en edades en las que se ha determinado la presencia de mitofagia, por lo que no hay que descartar la cooperación de otros mecanismos de regulación de la mitofagia. Existen

diferentes mecanismos de interrelación entre las vías de mitofagia conocidas hasta la fecha. Se ha descrito que NIX prepara a la mitocondria para la degradación por mitofagia controlando la localización mitocondrial de Parkina bajo despolarización mitocondrial (Ding et al, 2010) y la despolarización mitocondrial con CCCP restaura la mitofagia incluso en reticulocitos deficientes de NIX, demostrando la presencia de mecanismos de compensación independientes de NIX para mediar mitofagia (Gao et al, 2015). Por otro lado, el mecanismo por el cual NIX y BNIP3 inducen mitofagia es controvertido, ya que puede degradar mitocondrias mediante el dominio LIR y además puede promover la despolarización mitocondrial, lo que es suficiente para inducir mitofagia (Elmore et al, 2001; Twig et al, 2008). No obstante, la mayoría de los procesos de mitofagia en los que están implicados otros reguladores, como PINK1 y Parkina, se deben a la necesidad de eliminar mitocondrias ante un daño celular (Lazarou et al, 2012; Lemasters, 2005; Narendra et al, 2008; Narendra et al, 2010; Pickrell & Youle, 2015; Vives-Bauza et al, 2010; Youle & Narendra, 2011). Por el contrario, estudios previos han demostrado que NIX está implicado en procesos de mitofagia programada (Kundu et al, 2008; Sandoval et al, 2008; Schweers et al, 2007), por lo que NIX parece estar implicado en procesos de mitofagia durante la fisiología de distintos tipos celulares.

Entre las funciones de la mitofagia durante el desarrollo destaca la degradación selectiva de las mitocondrias de origen paterno en los oocitos fertilizados, la maduración de eritrocitos, de tejido adiposo y de la lente (Ashrafi & Schwarz, 2013). En neuronas postmitóticas, el control de calidad de mitocondrias regula varias funciones metabólicas vitales como su adecuada distribución en los terminales sinápticos, el mantenimiento de la actividad de la cadena de transporte electrónico y la conectividad eléctrica (Bereiter-Hahn & Jendrach, 2010; Chen & Chan, 2006; Ferree & Shirihai, 2012; Misko et al, 2012; Stowers et al, 2002; Verstreken et al, 2005), la protección de la integridad del ADN mitocondrial (Parone et al, 2008), apoptosis (Suen et al, 2008), así como formación y función de espinas dendríticas y sinapsis (Li et al, 2004).

En esta Tesis Doctoral hemos comprobado que en retinas a E15.5 se produce una situación de hipoxia como consecuencia de una alteración mitocondrial previa, que desencadena el incremento de expresión de NIX y la mitofagia en dicho estadio. A continuación describo las consecuencias fisiológicas de la mitofagia durante el desarrollo de la retina.

3.2. La mitofagia regula la muerte celular fisiológica de la retina en desarrollo

Nuestros datos indican que la inhibición de mitofagia disminuye la muerte fisiológica que se produce en la región central de retinas a E13.5 y en retinas a E15.5. Además, el tratamiento con CsA también reduce los niveles de la muerte celular generada por inducción de autofagia a E13.5 (Figuras 35, 39, 40, 70 y 72 de resultados; figura 4 A-C de discusión). Por otro lado, la muerte celular en todas las situaciones descritas más arriba también se bloquea al inhibir caspasas (Figuras 25, 27, 29, 36, 73 de resultados; figura 4 A, E de discusión), por lo que la mitofagia podría presentar un papel promuerte durante el desarrollo de la retina. Sería necesario combinar la inhibición de caspasas con la inhibición de la mitofagia para esclarecer la relación entre ambos procesos.

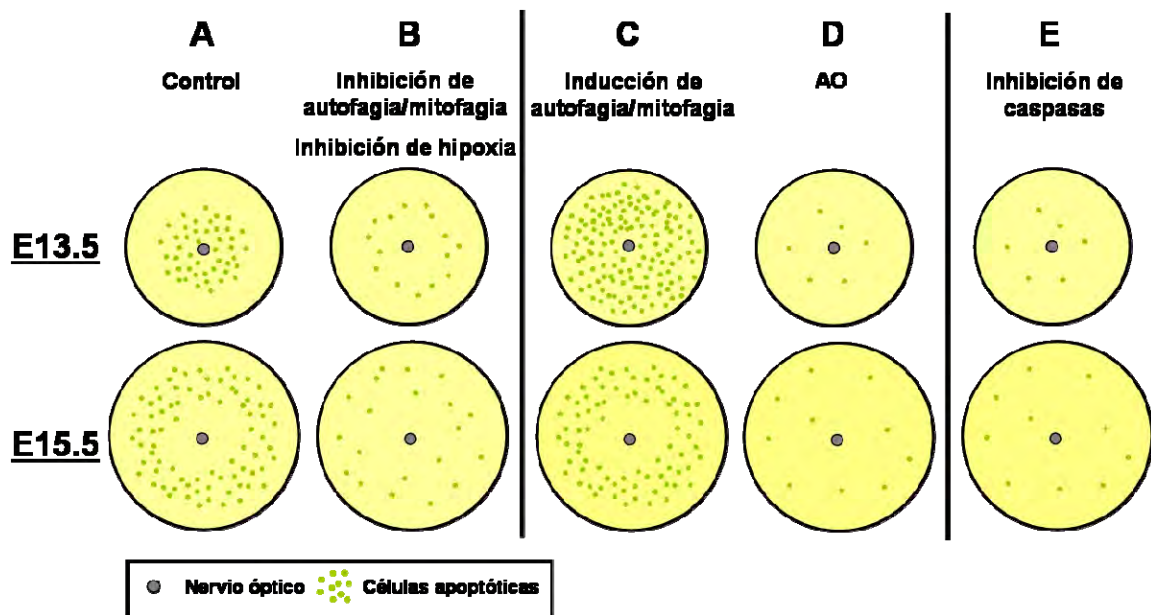


Figura 4. Patrón de distribución de la muerte celular en retinas embrionarias a E13.5 y E15.5 en condiciones basales y tras la modulación de la mitofagia y la apoptosis. A. Situación control fisiológica. **B.** Inhibición de autofagia con 3-MA; inhibición de mitofagia con CsA y retinas deficientes de NIX; inhibición de hipoxia con FM19G11. **C.** Activación de autofagia/mitofagia mediante tratamiento con rapamicina y EBSS. **D.** Inducción específica de mitofagia con AO (antimicina A+oligomicina). **E.** Inhibición de caspasas con BOC.

La autofagia desempeña por lo general un papel citoprotector. La degradación mitocondrial puede evitar la acumulación de mitocondrias generadoras de ROS y la muerte celular. Sin embargo, un incremento de mitofagia puede degradar las mitocondrias funcionales, disminuyendo la capacidad de producir ATP y

desencadenando la muerte celular (Shires & Gustafsson, 2015). Esto explicaría la disminución drástica de ATP (Figura 32 de resultados) y el incremento de muerte celular dependiente de mitofagia observado al inducir autofagia mediante tratamiento con rapamicina, AZD y ayuno de aminoácidos en retinas a E13.5 (Figuras 26, 28, 30, 39 y 49 de resultados; figura 4 B de discusión), cuando el metabolismo depende de la respiración mitocondrial (Figura 63 A de resultados; figura 3 (E13.5) de discusión). Sería interesante determinar si la disminución de los niveles de ATP por inducción de mitofagia con rapamicina y EBSS no se recupera al inhibir caspasas con BOC, lo que reflejaría que la autofagia desempeña un papel promuerte mediante la degradación mitocondrial en retinas que dependen del metabolismo mitocondrial para la producción de ATP.

Algunos estudios previos han descrito la relación entre la mitofagia y la muerte celular. En levaduras, la proteína Uth1p es necesaria para la mitofagia inducida por rapamicina y ayuno de nitrógeno, funcionando como un receptor para la degradación mitocondrial. Su delección, así como la de Atg5, protege a las células de la degradación mitocondrial por inducción de autofagia (Kissova et al, 2004). Además, la delección de Uth1p protege de un tipo de muerte de tipo apoptótico inducida tras la expresión de la proteína proapoptótica Bax, y su ausencia induce resistencia al tratamiento por rapamicina cuando las células crecen en condiciones respiratorias (Camougrand et al, 2003). Por lo que Uth1p presenta una conexión entre apoptosis y mitofagia (Lemasters, 2005). Estos datos son equiparables a la inducción de mitofagia y muerte celular por inducción de autofagia con rapamicina en retinas a E13.5, las cuales dependen de la respiración mitocondrial. En este caso, hemos comprobado que la deficiencia de Atg5 y el tratamiento con 3-MA confieren resistencia al tratamiento con rapamicina (Figura 28 B-E de resultados). Quedaría por determinar si la deficiencia de NIX, que es un receptor de mitofagia en mamíferos al igual que Uth1p lo es en levaduras, protege no solo de la mitofagia y muerte celular basal observada en retinas a E15.5 (Figuras 66 y 72 de resultados; figuras 2 B y 4 B de discusión), sino también de la muerte por inducción de autofagia.

En otras situaciones, como durante la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, la deficiencia genética de PINK1 protege frente a la disfunción mitocondrial y la muerte celular en las células epiteliales del pulmón. Dicha muerte también se reduce en presencia de inhibidores de necrosis o necroptosis, lo que refleja la interrelación entre la mitofagia y los mecanismos de muerte celular (Mizumura et al, 2014). Durante este

proceso, la señal inicial para la activación de mitofagia es la bajada del potencial de membrana mitocondrial como consecuencia de la disfunción mitocondrial. En el caso de la muerte fisiológica durante el desarrollo de la retina, hemos observado un rescate al inhibir caspasas con BOC, al inhibir autofagia y al inhibir el MPTP con CsA, por lo que la bajada del potencial de membrana mitocondrial parece constituir el mecanismo en común de muerte y mitofagia. Sería interesante determinar si la muerte fisiológica de la retina también se revierte con inhibidores de necrosis, como la necrostatina. Además, es necesario determinar el fenotipo de muerte celular tras la utilización simultánea de BOC y 3-MA ó BOC y CsA en retinas a E13.5 y a E15.5 para esclarecer el papel de la mitofagia en la muerte celular durante la fisiología de la retina.

La relación entre la muerte celular y la mitofagia también se ha observado en neuronas de mamíferos tras la muerte inducida por MPP⁺ (Chu et al, 2007). En este caso, el tratamiento con la neurotoxina MPP⁺ induce mitofagia dependiente de MAPK y Atg5, Atg7 y Atg8 en células de neuroblastoma SH-SY5Y. Además, la inhibición de autofagia protege de la muerte inducida por MPP⁺. En este contexto, hay que destacar que al igual que ocurre en retinas a E15.5 en condiciones basales (Figura 62 de resultados; figura 3 (E15.5) de discusión), el tratamiento con MPP⁺ disminuye el potencial de membrana mitocondrial. Por tanto, el descenso del potencial de membrana mitocondrial podría constituir la señal en común que relaciona la muerte celular y la mitofagia durante el desarrollo de la retina y en otras situaciones donde se ha visto un efecto promuerte de la mitofagia. Por otro lado, también se ha descrito un mecanismo de promuerte por mitofagia inducida por ceramida independiente de las señales apoptóticas mitocondriales y de caspasas (Daido et al, 2004; Hamacher-Brady & Brady, 2016). Sin embargo, este no parece ser el caso del papel de la mitofagia en la muerte fisiológica de la retina, ya que como previamente he mencionado, también se previene al inhibir las caspasas. Por tanto, la mitofagia parece desempeñar un papel promuerte en diferentes situaciones, aunque el mecanismo final de muerte celular puede ser diverso.

En el apartado anterior he explicado como la alteración de la función respiratoria mitocondrial, el descenso en el potencial de membrana mitocondrial y la función reversa de la ATP sintasa, podrían estar desencadenando la activación de la mitofagia mediada por hipoxia y NIX (Figura 3 de discusión). Además, la muerte celular fisiológica de retinas a E13.5 y E15.5 se bloquea al inhibir con 3-MA, CsA, FM19G11 y AO (Figura 4 B y D de discusión). El poro de transición de permeabilidad

mitocondrial (MPTP) propociona una vía común que lleva a mitofagia, apoptosis y necrosis (Kim et al, 2007). Además, muchos estudios corroboran la integración molecular y funcional de la ATPsintasa con la muerte celular (Alavian et al, 2011; Matsuyama et al, 1998; Santamaria et al, 2006; Shchepina et al, 2002), cuyo punto de no retorno es la permeabilización de la membrana interna mitocondrial mediante apertura del denominado poro de transición de permeabilidad (MPTP) (Di Lisa et al, 2011; Galluzzi et al, 2009). Como mecanismo de supervivencia fisiológico, las células pueden incrementar la expresión IF1 para inhibir la ATPasa y evitar la muerte celular (Faccenda et al, 2013; Formentini et al, 2012), lo que mimetiza el efecto inhibitorio de la oligomicina en la apoptosis de retinas a E13.5 y E15.5 (Figura 41 y 74 D, E de resultados; figura 4 D de discusión) (Formentini et al, 2014; Matsuyama et al, 1998; Santamaria et al, 2006; Shchepina et al, 2002). Por ello se podría relacionar la disminución de la expresión de IF1 con el incremento de muerte celular en retinas de E15.5, así como el hecho de que el tratamiento con antimicina+oligomicina disminuye la muerte celular en la región central de retinas en E13.5 y en retina completa a E15.5 (Figura 41 y 74 D, E de resultados). Además, la ciclofilina D, diana de CsA que regula la actividad del MPTP, también interacciona y regula la actividad de la ATP sintasa (Giorgio et al, 2009), por lo que es posible que la inhibición de la mitofagia y la muerte celular en la región central de retinas de ratón a E13.5 y en retina completa a E15.5 con CsA, se deba a una doble función: por prevenir la disminución del potencial de membrana mitocondrial y por su unión a la ATPsintasa. No obstante, la inhibición con 3-MA y FM19G11 también disminuyen el número de células TUNEL positivas (Figuras 35 y 70 de resultados; figura 4 B de discusión), sugiriendo que la mitofagia inducida por la función ATPasa e hipoxia contribuye a la muerte celular. Aunque existe cierta controversia sobre el papel de la autofagia inducida por hipoxia en la muerte celular (Bellot et al, 2009; Mazure & Pouyssegur, 2010), si que se ha descrito en otros modelos (Azad et al, 2008; Song et al, 2012; Zhang, 2008).

En relación a la muerte dependiente de mitofagia, hay que destacar que retinas deficientes de NIX, regulador molecular de la mitofagia en la fisiología de la retina, presentan una disminución en la muerte celular (Figura 72 de resultados; figura 4 A de discusión). Aunque NIX se describió inicialmente como una proteína proapoptótica esencial en la regulación de la muerte celular programada, varias proteínas proapoptóticas incluidas BAX, BAK1, BCL2L1, BCL2L1/BIM o BBC3/PUMA no están implicadas en la mitofagia mediada por NIX, por lo que dicho proceso de

mitofagia podría ser independiente de las vías proapoptóticas (Zhang & Ney, 2009). Existen varios mecanismos por los cuales NIX puede regular la muerte celular: en primer lugar, puede promover la apertura del MPTP, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, generación de ROS y muerte celular. En segundo lugar, NIX pueden unirse a proteínas antiapoptóticas de la familia Bcl-2 promoviendo la interacción entre BAX y BAK. Por último, existe un papel diferencial de NIX en la muerte celular en función de su localización. Así, la unión de NIX al ER incrementa la concentración de calcio en el ER y su entrada en la mitocondria, produciendo finalmente la apertura de MPTP y muerte celular (Zhang & Ney, 2009). Esta muerte celular mediada por NIX localizado en el retículo en contacto con la mitocondria es dependiente de ciclofilina D y no requiere de Bax y Bak, mientras que NIX mitocondrial induce solo apoptosis dependiente de caspasas sin afectar al MPTP (Chen et al, 2010). Teniendo en cuenta estos mecanismos, sería interesante determinar el potencial de membrana mitocondrial en retinas deficientes de NIX, de manera que si fuera superior al de retinas NIX^{+/+}, podríamos intuir que el mecanismo por el cual NIX induce muerte celular es por apertura de MPTP y pérdida del potencial de membrana mitocondrial. Además, esto constituiría una señal común a la inducción de mitofagia y de muerte celular, y explicaría en parte las diferencias observadas en cuanto a muerte celular entre las retinas deficientes de NIX y las deficientes de Atg5, las cuales presentan un incremento en el potencial de membrana mitocondrial y mayor muerte celular (Figuras 62 D, E y 71 de resultados). Por otro lado, sería también interesante determinar si un incremento en la interacción entre NIX y ER, o bien un incremento en los niveles de calcio a nivel de la mitocondria, disminuirían aun mas el potencial de membrana mitocondrial y la masa mitocondrial en retinas a E15.5, lo que iría en relación con el mecanismo descrito por Zhang y Ney (Zhang & Ney, 2009). No obstante, a pesar de sus funciones proapoptóticas, NIX y BNIP3 están altamente expresados en varios tejidos sin inducir muerte celular (Diwan et al, 2007). Por lo tanto, probablemente se requiere de señales adicionales para la inducción de muerte celular mediada por NIX y BNIP3 (Webster et al, 2005).

Por tanto, BNIP3 y NIX presentan una función dual, ya que pueden activar muerte celular pero también participan en la inducción de autofagia (Zhang & Ney, 2009). Como he mencionado previamente, la inducción de autofagia puede ser beneficiosa, pero en ciertas circunstancias está asociada con muerte por autofagia. En este sentido, no está claro si la muerte es debida a un exceso de autofagia/mitofagia o a

una función proapoptótica de NIX (Zhang & Ney, 2009). Es posible que ambos procesos estén relacionados, ya que la función inductora de muerte de NIX, que está mediada por una despolarización mitocondrial, podría servir también como un evento que induce mitofagia. Esto corrobora la inhibición de mitofagia y muerte celular mediante tratamiento con CsA (Figuras 35 y 70 de resultados; figura 4 B de discusión). Sería interesante determinar los niveles de masa mitocondrial y muerte celular en retinas deficientes de NIX tras cultivo con 3-MA y CsA, para poder confirmar la relación entre la muerte celular y la mitofagia mediada por NIX en retinas a E15.5.

Pero por otro lado, también es posible que ambos procesos sean independientes. De hecho, la muerte celular observada en la región central de retinas en E13.5 y en toda la retina en E15.5 no se bloquea en retinas deficientes de Atg5 (Figura 71 de resultados). No obstante, esto podría reflejar otras funciones del proceso de autofagia, no selectiva, o bien otras funciones de Atg5 independientes de autofagia (Codogno et al, 2011), ambas necesarias para la supervivencia celular. Por otro lado, hemos confirmado que la mitofagia podría constituir un mecanismo de muerte durante el desarrollo de la retina, ya que la inducción de autofagia en estadios tempranos (E13.5) reduce la masa mitocondrial e induce muerte celular (Figuras 37-40 de resultados; figura 4 B de discusión), revirtiéndose ambos procesos mediante inhibición de autofagia y de mitofagia. En este estadio, el incremento de muerte observado en retinas tratadas con rapamicina, no se observó en retinas deficientes de Atg5 (Figura 28 D, E de resultados).

Con todos estos datos podemos concluir que la mitofagia y la muerte celular son dos procesos activos durante el desarrollo de la retina, pero se necesitan experimentos adicionales para discernir si se trata de dos procesos independientes o interrelacionados. Además, queda por esclarecer la función exacta de NIX en la muerte celular.

3.3. La mitofagia induce un cambio metabólico durante el desarrollo de la retina de ratón

En un estudio reciente en colaboración con el grupo de Marcos Malumbres (CNIO), hemos demostrado que la mitofagia es necesaria para un cambio metabólico hacia glicólisis durante el arresto mitótico (Domenech et al, 2015; Esteban-Martinez et al, 2015). En esta Tesis Doctoral, hemos estudiado el papel metabólico de la mitofagia observada durante el desarrollo de la retina, ya que en el año 1931 Warburg ya describió que este tejido en ratones adultos presenta un perfil metabólico caracterizado por la generación de ATP mediante la conversión de piruvato a lactato (Warburg, 1931). Para

ello hemos estudiado el metabolismo de la retina durante el desarrollo y hemos determinado los cambios metabólicos que se producen al modular la mitofagia que se produce en retinas a E15.5.

Nuestros datos indican que a lo largo del desarrollo embrionario, se produce un cambio metabólico en la retina a partir de E15.5, en el cual se incrementan los metabolitos de la glicolisis y la producción de lactato, así como la expresión de enzimas glicolíticas (Figura 47 A, B, E, F de resultados). La mitofagia en retinas a E15.5 es responsable de esa reprogramación metabólica, ya que su inhibición disminuye la producción de lactato y la expresión de enzimas glicolíticas como Pfkfb3, Hk2, Gapdh y Pkm (Figura 47 C, D, G). Así, la degradación de mitocondrias puede acelerar la glicólisis, como se ha observado durante la transformación oncogénica y en células pluripotentes, ambas con elevada actividad glicolítica necesaria para el mantenimiento de su alta proliferación (Berridge et al, 2010; Jose, 2011; Liu et al, 2010; Lock et al, 2011). Además, la inducción de mitofagia mediada por MUL1 juega un papel en la modulación del balance energético del músculo esquelético (Lokireddy et al, 2012). Por tanto, son varias las evidencias que sugieren que la mitofagia puede regular el metabolismo, lo que podría tener consecuencias no solo en la función celular en las situaciones mencionadas, si no también durante el desarrollo de la retina. Esta hipótesis la voy a discutir a partir de la Figura 5 (de discusión).

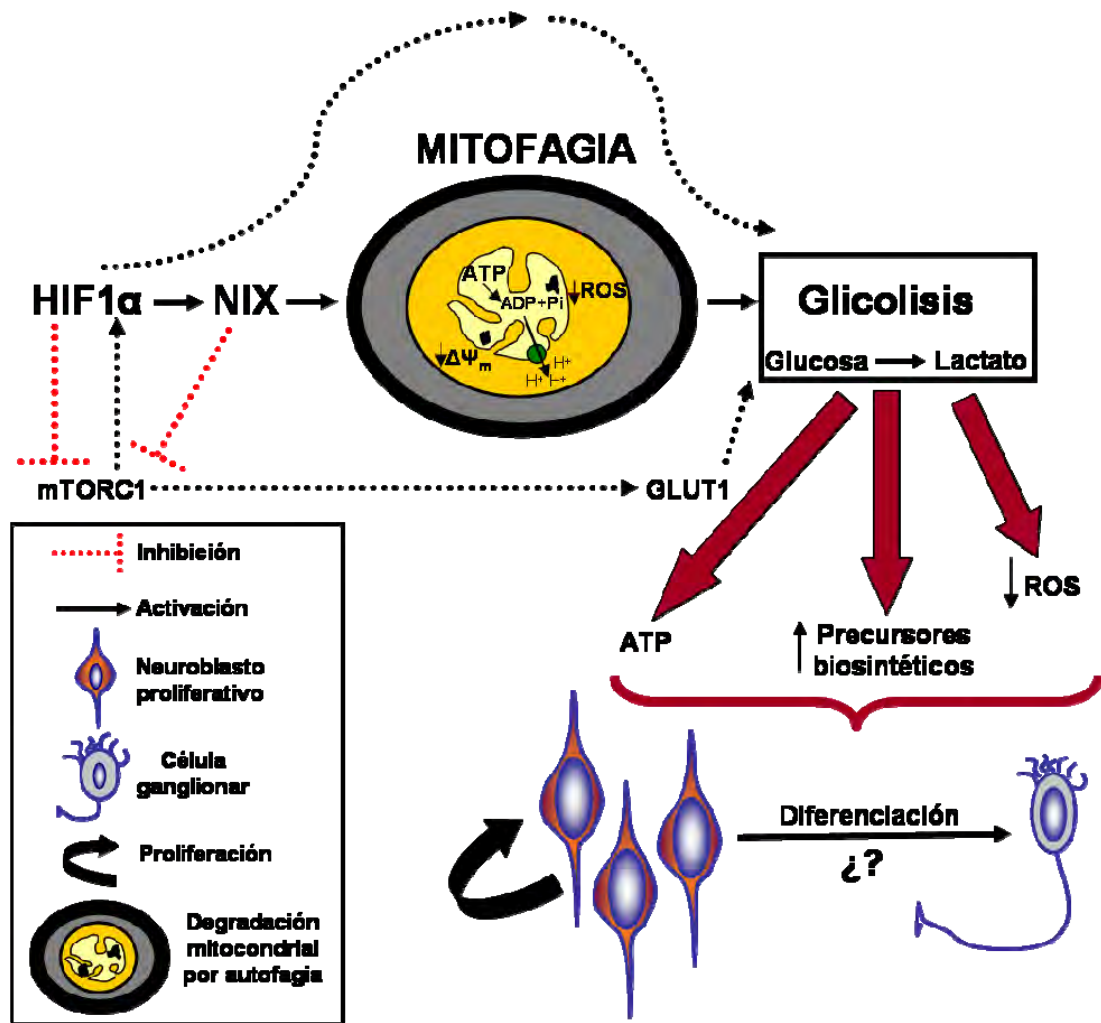


Figura 5. Reprogramación metabólica mediada por mitofagia en retinas a E15.5 y sus posibles efectos sobre la proliferación y diferenciación celular. La mitofagia mediada por hipoxia y NIX produce un cambio metabólico hacia glicolisis, que podría tener consecuencias en el desarrollo de la retina. Las líneas discontinuas representan mecanismos adicionales que podrían incrementar la glicólisis.

En primer lugar, hay que mencionar que es posible que se produzcan varios mecanismos simultáneos para activar la glicolisis durante el desarrollo de la retina. Al igual que en otros tipos celulares como los macrófagos (O'Neill & Hardie, 2013), HIF1 α podría estar modulando directamente el metabolismo en retinas embrionarias además de la mitofagia. Sin embargo, el hecho de que la inhibición de mitofagia disminuye la expresión de enzimas glicolíticas a E15.5 (Figura 47 G de resultados), nos lleva a plantear que la mitofagia, activada como consecuencia de la hipoxia, es un proceso clave en el cambio metabólico a partir de E15.5 (Figura 5 de discusión). Además, esos cambios de expresión génica tras la inhibición de autofagia/mitofagia en retinas a E15.5, se ponen de manifiesto con una reducción en la acidificación por producción de lactato (ECAR) determinado mediante seahorse en retinas a dicha edad

(Figura 47 C, D), demostrando la alteración de la función metabólica a nivel fisiológico por inhibición de mitofagia.

Aunque el cambio metabólico hacia glicólisis lo observamos en retina completa a partir de E15.5 (Figura 47 A de resultados), tras el pico de mitofagia (Figuras 43 y 44 de resultados), es posible que en retinas a E13.5 también se esté iniciando una preferencia por la glicólisis en la región central de la retina, donde la mitofagia también está activa. (Figura 35 de resultados; figura 2 A de discusión).

Otro mecanismo que puede estar participando en el cambio metabólico que hemos descrito en la retina embrionaria es a través de la actividad de mTOR. Para mantener el crecimiento celular mTOR estimula la entrada de glucosa al incrementar la presencia y actividad del transportador de glucosa Glut1 (*Slc2a1*) en la membrana plasmática (Duvel et al, 2010; Edinger & Thompson, 2002; Wieman et al, 2007). En retinas a E15.5, S6 está fosforilado, reflejando la activación de mTOR (Figura 7 A de resultados). Además, mediante el estudio transcriptómico, podemos observar un incremento en la expresión del gen del transportador de glucosa (*Slc2a1*) a partir de E15.5 (Figura 47 E, F de resultados). Por otro lado, se ha descrito que mTORC1 incrementa el flujo glicolítico vía transcripción de genes glicolíticos mediada por HIF1 α (Duvel et al, 2010). Estos datos nos inducen a pensar que podrían estar activándose varias vías de señalización simultáneamente para favorecer el incremento de glicólisis observado en retinas a E15.5 (Figura 5 de discusión). Estos datos podrían resultar contradictorios, ya que mTOR inhibe autofagia. Sin embargo, este hecho es consistente con lo encontrado en numerosas líneas tumorales donde altos niveles de autofagia se encuentran en presencia de activación de mTOR (Guo et al, 2011). Además, la inhibición de mTORC1 no es un prerrequisito para mitofagia en todas las circunstancias (Melser et al, 2013), por lo que es posible que esa acción de mTOR dependa de las circunstancias metabólicas o no afecte en gran medida a la degradación selectiva de mitocondrias. Además, tanto la macroautofagia constitutiva como inducida comparten la misma maquinaria Atg pero diferente regulación (Yamamoto et al, 2006), de manera que la macroautofagia constitutiva es insensible a los efectos inhibitorios que mTOR. Hay que destacar también que BNIP3 y NIX previenen la activación de mTORC1 al unirse directamente e inactivar al activador de mTOR Rheb (Li et al, 2007), por lo que existe una interrelación entre los diferentes mecanismos que pueden regular el cambio metabólico hacia glicólisis.

Un metabolismo preferentemente glicolítico presenta principalmente tres beneficios (Vander Heiden et al, 2009): 1. Capacidad de generar suficiente ATP en hipoxia. 2. Un metabolismo que facilita la incorporación de aminoácidos y ácidos grasos en estructuras celulares nuevas para el crecimiento celular y tisular, más que para ser metabolizados para la producción de energía. 3. Evitar la generación tóxica de ROS (Figura 5 de discusión). Todo esto podría ser importante para el mantenimiento de los progenitores proliferativos y la diferenciación de la retina, ya que el cambio metabólico lo hemos observado en estadios en los que confluyen procesos de proliferación (Figura 7 A, PCNA y 49 A de resultados) y de diferenciación temprana (Figura 49 B-G de resultados). Para ello se requiere no solo de ATP, sino también de precursores biosintéticos derivados de la glicólisis y la ruta de las pentosas fosfato para generar poder reductor (NADPH). De ese modo, el incremento de glicólisis podría no solo favorecer la diferenciación temprana de la retina mediante la generación de neuronas protegidas frente al estrés oxidativo, sino también el mantenimiento de los precursores que van a dar lugar a los tipos celulares de la retina que se diferencian tardíamente. (Figura 5 de discusión). Esto podría explicar por qué a pesar de que la disminución de masa mitocondrial se produce fundamentalmente en la capa de células ganglionares, que son el primer tipo celular diferenciado en la retina (Figura 49 B-G de resultados) (Gao et al, 2014), observamos la activación de mitofagia en la retina completa. (Figura 51 de resultados).

Por tanto, el cambio metabólico hacia glicólisis mediado por mitofagia durante el desarrollo de la retina podría tener consecuencias fisiológicas en células proliferativas y diferenciadas (Figura 5 de discusión). No obstante, no descartamos que en la retina se vuelva a producir posteriormente un metabolismo dependiente de la fosforilación oxidativa. En relación a esta hipótesis, se ha descrito que durante la maduración cardíaca perinatal en ratón, se produce una pérdida de sustratos de carbohidrato a través de la placenta, lo que promueve una transición hacia un metabolismo dependiente de ácidos grasos (Bartelds et al, 2000). Para que se produzca ese cambio en el metabolismo, es necesaria la eliminación de mitocondrias vía mitofagia y posterior incremento en la expresión de genes implicados en la biogénesis mitocondrial (Lehman et al, 2000). De manera similar, durante el desarrollo de la retina se produce un incremento en la expresión de *Ppargc1a* posterior al pico de mitofagia en E15.5 (Figura de 46 A, C de resultados), lo que podría reflejar un incremento de biogénesis mitocondrial para llevar a cabo un metabolismo dependiente de fosforilación oxidativa

en estadios tardíos del desarrollo. En este caso, sería interesante determinar la preferencia de la retina por diferentes sustratos (aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos...) antes y después del proceso de mitofagia. El hecho de que tanto mitofagia como biogénesis mitocondrial ocurran simultáneamente en la célula, podrían parecer efectos contradictorios, pero por otro lado, podrían reflejar un papel en el control de calidad mitocondrial, porque la biogénesis mitocondrial acoplada a una mitofagia activa podría repoblar las mitocondrias funcionales, resultando en la restauración de una población sana de mitocondrias (Fu et al, 2008).

3.4. La mitofagia regula la diferenciación de las células ganglionares de la retina

Una vez descrita la activación de la mitofagia y su implicación en la reprogramación metabólica durante el desarrollo de la retina, hemos querido entender su función en relación con la diferenciación celular. Para ello, hemos modulado la mitofagia y la glicolisis y hemos determinado qué ocurre con la diferenciación de las células ganglionares de la retina, ya que el proceso de mitofagia y el cambio metabólico lo hemos observado en estadios en los que se diferencia este tipo celular (Figuras 43, 44, 47 y 49 de resultados). Todo el estudio de diferenciación de células ganglionares (RGCs) se ha basado en inmunotinción utilizando el anticuerpo frente al factor de transcripción específico de ganglionares Brn3a, y frente a β -III-tubulina. Nuestros datos indican que el cambio metabólico asociado al proceso de mitofagia es esencial para la diferenciación de este tipo celular (Figura 6 de discusión).

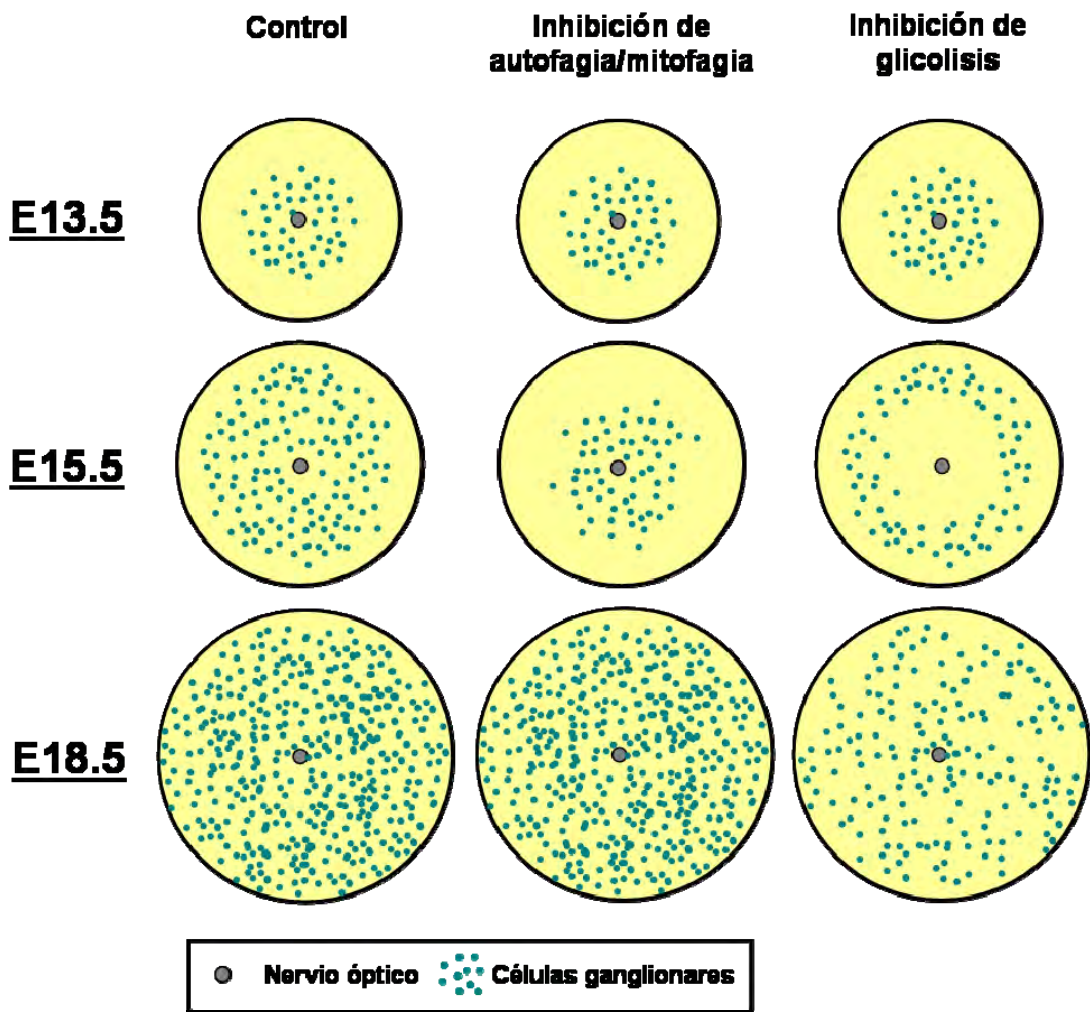


Figura 6. Regulación de la diferenciación de RGCs mediante mitofagia y metabolismo. El esquema refleja la inmunotinción de Brn3a. La inhibición de autofagia/mitofagia disminuye la diferenciación de RGCs en la periferia de la retina de E15.5, región menos madura. Por otro lado, la inhibición de la glicólisis disminuye el número de RGCs en la región central más madura de la retina de E15.5 así como en retinas de E18.5.

La inhibición de autofagia/mitofagia produce una disminución en la diferenciación de células Brn3a positivas en la región periférica de la retina a E15.5, donde se localizan las neuronas ganglionares recién diferenciadas (Figuras 53 A, B, E y 54 A, B, C; figura 6 de discusión). Esto plantea la posibilidad de que la mitofagia sea un proceso asociado al proceso de diferenciación, pudiendo afectar a los progenitores en su última división mitótica o bien a la neurona recién generada. Esta hipótesis se correlaciona con el menor el número de mitocondrias por célula en la capa de RGCs observado mediante microscopía electrónica en ojos de embriones a E15.5 (Figura 52 A-C de resultados).

En cualquier caso, ese proceso de mitofagia es necesario para producir un cambio metabólico esencial para la diferenciación de las células ganglionares en la región más madura de la retina y en estadios embrionarios tardíos. Por ello, la inhibición de glicólisis disminuye el número de células Brn3a positivas fundamentalmente en la región central de la retina de E15.5 (Figura 55 de resultados; figura 6 de discusión), así como en retinas de E18.5 (Figura 58 C de resultados; figura 6 de discusión), sin afectar a la diferenciación de retinas a E13.5 en las que aun no se ha producido un cambio metabólico (Figuras 47 y 54 de resultados; figura 6 de discusión). Puesto que ni la inhibición de mitofagia ni de glicólisis altera la diferenciación temprana de RGCs en retinas de E13.5 (Figuras 54 y 55 de resultados; figura 6 de discusión), deben existir mecanismos adicionales que inician la generación de RGCs en dicho estadio. No obstante, como he mencionado anteriormente, la mitofagia ya está activa en la región central de retinas a E13.5 (Figura 2 A, B de discusión), por lo que es posible que la activación de mitofagia no siempre implique un cambio metabólico hacia glicólisis.

Estudios previos han demostrado que la mitofagia es necesaria para procesos de diferenciación celular, como durante la maduración de eritrocitos, la diferenciación del tejido adiposo blanco y de linfocitos T, así como durante la osteoclastogénesis. Ratones deficientes de NIX presentan eritrocitos con mitocondrias. Por otro lado, ratones deficientes de Atg5 y Atg7 no presentan la eliminación de mitocondrias ni completan el proceso de diferenciación del tejido adiposo (Baerga et al, 2009; Singh et al, 2009; Zhang et al, 2009). Además, tanto Atg5 como Atg7 son cruciales para la diferenciación de linfocitos T en ratones (Lu et al, 2013; Stephenson et al, 2009) y Bnip3 inducido por hipoxia es esencial para la osteoclastogénesis (Zhao et al, 2012). Todos estos estudios destacan la relevancia del proceso de mitofagia en la diferenciación celular.

Durante la diferenciación de eritrocitos, la delección de NIX no altera el número de progenitores hematopoiéticos lo que se correlaciona con el hecho de que esas células no diferenciadas no sufren apoptosis (Pecci et al, 2003; Testa et al, 1996). En el caso de la retina, la muerte celular temprana que en ratón tiene lugar alrededor de E13.5, es un proceso asociado a la diferenciación celular que afecta tanto a células progenitoras como a recién diferenciadas (Boya & de la Rosa, 2005; de la Rosa & de Pablo, 2000; Yeo & Gautier, 2004). En este trabajo hemos descrito la implicación del proceso de mitofagia en esa muerte neural temprana (Figura 35 de resultados; figura 4 A, B de discusión). Sin embargo, las funciones de la mitofagia en la muerte celular y la

diferenciación de RGCs parecen ser independientes, ya que la inhibición de la mitofagia no altera la diferenciación de RGCs en retinas a E13.5 (Figura 54 de resultados; figura 6 de discusión). En el caso de la muerte dependiente de mitofagia en retinas a E15.5 (Figuras 70 A, B y 72 de resultados; figura 4 A, B de discusión), no hemos determinado a qué tipo celular está afectando, pero la proporción de células de doble tinción tunel-brn3a no cambia significativamente, por lo que la muerte podría estar produciéndose en células proliferativas o recién diferenciadas que aun no expresen Brn3a.

Por tanto, es posible que la mitofagia observada en la retina tenga una doble función, cada una de ellas afectando a distintas poblaciones celulares: participar en el proceso de muerte fisiológico que tiene lugar en retinas a E13.5 (en la región central) y a E15.5, y regular un cambio metabólico necesario para la diferenciación de células ganglionares a partir de E15.5. Esta idea se refuerza por el hecho de que la inhibición de la apoptosis con BOC (Figuras 73 y 27 B-D de resultados; figura 4 E de discusión) no altera la diferenciación de RGCs en retinas de E15.5 a nivel basal ni en retinas de E13.5 con mitofagia inducida por rapamicina (Figura 75 de resultados). No obstante, son necesarios experimentos adicionales para confirmar si la muerte por mitofagia y la diferenciación asociada a la degradación mitocondrial y cambio metabólico, son dos procesos relacionados o independientes durante el desarrollo de la retina.

Por otro lado, hemos determinado qué ocurre con la diferenciación de células ganglionares cuando inducimos mitofagia de cuatro maneras diferentes. (Figura 7 de discusión).

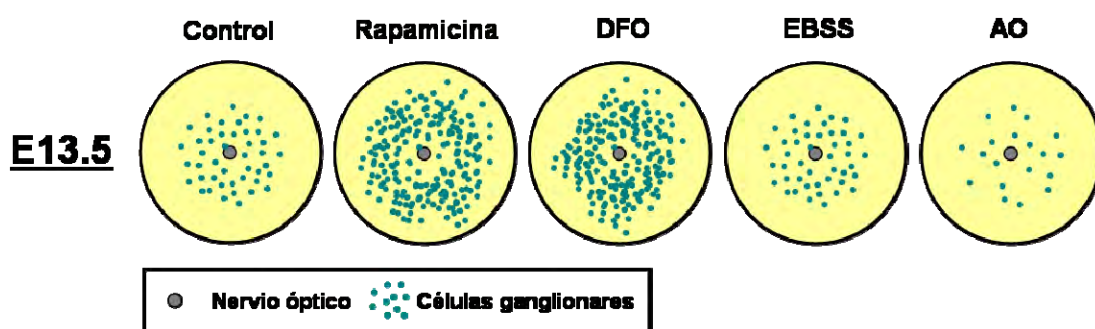


Figura 7. Efectos en la diferenciación de RGCs al inducir mitofagia con diferentes estímulos en retinas de embriones a E13.5.

La inducción de mitofagia por rapamicina incrementa la diferenciación de RGCs en E13.5 (Figura 59 de resultados; figura 7 de discusión). Este efecto es similar al

incremento de la generación de células T-CD8 de memoria durante la fase de contracción tras la infección con LCMV por tratamiento con rapamicina (Araki et al, 2009), fase durante la cual se produce mitofagia mediada por NIX en células NK (O'Sullivan, 2015). Estos datos muestran que el incremento de la degradación mitocondrial por inducción de autofagia puede favorecer o acelerar procesos fisiológicos dependientes de mitofagia. Además, la inducción de mitofagia mediada por hipoxia mediante DFO también incrementa la diferenciación de las RGCs en E13.5 y E15.5 (Figuras 67 y 68 de resultados; figura 7 de discusión). Es posible que esa activación de mitofagia al inducir hipoxia se deba a un incremento en la expresión de NIX/BNIP3, como se ha descrito en la inducción de hipoxia mediante CoCl₂ en una línea de células ganglionares, RGC-5 (Yang et al, 2012), y mediante tratamiento con DFO en diferentes líneas celulares (Park et al, 2013). Por tanto, la inducción de una mitofagia mediada por NIX parece acelerar o favorecer procesos dependientes de esa mitofagia en condiciones basales. Para confirmarlo, habría que determinar el mecanismo molecular por el cual el tratamiento con rapamicina induce mitofagia en retinas a E13.5.

Por otro lado, el cultivo de retinas a E13.5 en EBSS no incrementa la diferenciación de células ganglionares (Figura 60 A, B de resultados; figura 7 de discusión), a pesar de inducir mitofagia en dicho estadio (Figura 38 de resultados; figura 2 C de discusión). Es posible que este efecto se deba a que el ayuno de aminoácidos esté induciendo una mitofagia mediada por otro mecanismo molecular diferente a NIX. De hecho, se ha descrito que el tratamiento con EBSS tras someter a una condición de hipoxia disminuye los niveles de proteína de Bnip3 y NIX al inducir su degradación por macroautofagia (Park et al, 2013). Como he mencionado anteriormente, es posible que ya en retinas de E13.5 exista cierto grado de hipoxia en la región central, por lo que el ayuno de aminoácidos en dicho estadio podría estar favoreciendo la degradación de NIX, activándose otros mecanismos para inducir mitofagia. Además, se ha demostrado que esa degradación de Bnip3 y NIX por autofagia depende de la inhibición de mTORC1, aunque el efecto se ha observado fundamentalmente ante un ayuno de aminoácidos y no por tratamiento con rapamicina (Park et al, 2013). Estos datos podrían explicar las diferencias observadas en el efecto en diferenciación de RGCs en retinas a E13.5 al inducir mitofagia con EBSS y rapamicina.

De igual manera, como se observa en el blot realizado con retinas en diferentes estadios embrionarios y postnatales (Figura 7 A de resultados), S6 está fosforilado en

retinas a E15.5, por lo que mTOR está activo y podría estar evitando la degradación de NIX por autofagia en este estadio en el que hemos observado mitofagia basal dependiente de NIX.

En el caso de la mitofagia inducida por la combinación de antimicina y oligomicina (AO) en retinas a E13.5, se produce una disminución del número de RGCs en toda la retina, siendo este efecto independiente de mitofagia o de MPTP, ya que no se revierte con CsA (Figuras 41 A-C y 60 C, D; figura 7 de discusión). Se ha descrito que la mitofagia inducida por AO está mediada por PINK1-Parkina (Youle & Narendra, 2011), por lo que de nuevo el hecho de que AO no aumente la diferenciación de RGCs puede deberse a que no sea una mitofagia mediada por NIX.

Por tanto, un hecho importante a tener en cuenta es que el tipo estímulo empleado para inducir mitofagia puede tener diferentes consecuencias en la respuesta neuronal a mitofagia. Puede ser que las diferencias observadas en la diferenciación de RGCs al inducir mitofagia con distintos estímulos sean debidas a la activación de diferentes reguladores moleculares de mitofagia. Esto lleva a plantear la cuestión del hecho de si la mitofagia, sea cual sea el mecanismo por el cual se lleva a cabo o el estímulo que le induce, puede tener las mismas consecuencias fisiológicas o no. Para confirmar si el incremento en diferenciación de RGCs al inducir mitofagia solo se produce cuando esa mitofagia está mediada por NIX, habría que determinar el mecanismo molecular de la mitofagia inducida por rapamicina, EBSS y AO en retinas a E13.5. Esto estaría en relación con el papel de NIX, y no de otros reguladores moleculares, en la degradación mitocondrial durante diferentes procesos fisiológicos mencionados anteriormente, y entre los que podemos incluir la diferenciación de las células ganglionares de la retina.

Por último, es posible que las diferencias entre los distintos estímulos inductores de mitofagia se deban a que sus efectos sean diferentes en el metabolismo celular. Para confirmarlo, habría que realizar un análisis metabólico mediante metabolómica y Seahorse de retinas a E13.5 tras el cultivo con los estímulos empleados en la figura 7 de este apartado.

3.5. Mitofagia durante el desarrollo postnatal de la retina

En esta tesis doctoral solo nos hemos centrado en la diferenciación temprana de las células ganglionares de la retina, ya que el pico de mitofagia observado durante el desarrollo embrionario se produce en estadios en los que principalmente se diferencia

este tipo celular (Figuras 43, 44 y 49 de resultados). Además, al estudiar el flujo de autofagia en retinas embrionarias mediante cultivo con HCQ para bloquear la degradación lisosomal, observamos que la autofagia está principalmente activada en la capa de células ganglionares (Figuras 5 y 6 de resultados) (Esteban-Martinez & Boya, 2015).

No obstante, mediante cultivo en presencia de CsA y 3-MA hemos determinado que la mitofagia se vuelve a activar en estadios postnatales, en concreto a P9 y P15 (Figura 76 A, B de resultados). El estudio de autofagia *in vivo* mediante la inyección intraperitoneal de leupeptina en ratones adultos, muestra un incremento de los niveles de fluorescencia de GFP-LC3 también en la capa de células ganglionares (Figuras 2-4 de resultados). Por ello, es posible que la mitofagia observada en retina postnatal contribuya a la maduración de las RGCs, proceso que culmina con el establecimiento de las conexiones sinápticas con núcleos superiores del cerebro (Gao et al, 2014). Para ello es importante la expresión de semaforinas (Gao et al, 2014), que como hemos descrito en el *heatmap* elaborado para la expresión de genes reguladores del desarrollo de RGCs (Figura 49 de resultados, RGCs), incrementa en P9 y P15. Un gran número de mitocondrias residen en las sinapsis terminales, ya que éstas dependen en gran medida de energía (Schon & Przedborski, 2011). Además, la mitofagia es un proceso muy importante en neuronas, ya que permite proporcionar mitocondrias sanas en los procesos distales donde generan energía suficiente y capacidad de reservorio de calcio necesario para la transmisión sináptica (Amadoro et al, 2014). Aunque la degradación mitocondrial se produce fundamentalmente en los somas (Ashrafi & Schwarz, 2013), también se ha observado una degradación local de mitocondrias despolarizadas en los axones antes de su transporte al soma (Wang et al, 2011), por lo que es posible que la mitofagia observada a P9 y P15 contribuya al establecimiento de las primeras sinapsis de las RGCs con el cerebro. Este hecho se relaciona con la alteración de la axonogénesis temprana en retinas embrionarias con la autofagia/mitofagia inhibida (Figuras 53 y 54 de resultados).

No obstante, nuestro método basado en citometría de flujo (Mauro-Lizcano et al, 2015) solo permite la detección de mitofagia en la retina completa, por lo que podría estar afectando también a otros tipos celulares de la retina. A nivel postnatal, los picos de mitofagia observados se corresponden con la apertura del ojo en el ratón, por lo que la exposición a la luz, así como los ROS generados como consecuencia, podría inducir la expresión de otras vías de mitofagia, implicadas en la degradación de mitocondrias

dañadas. Dado que los fotorreceptores son las células encargadas de detectar y convertir la luz en señales visuales, es posible que esa mitofagia postnatal afecte principalmente a este tipo celular. De hecho, mediante el estudio del flujo de autofagia *in vivo* de retinas adultas, hemos observado la activación de autofagia principalmente en la capa de fotorreceptores (Figura 3 de resultados). Este dato junto con el hecho de que en estadios postnatales se produce la diferenciación de fotorreceptores (Figura 49 E de resultados), nos hace pensar que la mitofagia podría estar modulando también el cambio hacia un metabolismo glicolítico, característico de los fotorreceptores (Casson et al, 2013; Warburg, 1956; Winkler, 1981).

Los conos son las células encargadas de la visión en color y la percepción visual en condiciones de luz. Este tipo de fotorreceptores deben generar mayores niveles de ATP en comparación con los bastones (Chertov et al, 2011; Nihira et al, 1995; Okawa et al, 2008; Perkins et al, 2004), para lo que la autofagia podría estar implicada mediante la generación de metabolitos que se incorporan en el ciclo de Krebs, como hemos descrito en retina embrionaria (Figura 12 de resultados). Además, conos deficientes de *Atg5* presentan una acumulación de mitocondrias dañadas e incremento de ROS tanto en condiciones basales como ante un daño por luz, y finalmente muerte celular, sin afectar a la viabilidad y función de los bastones (Zhou et al, 2015). Estos datos confirman la importancia de la mitofagia para mantener unas mitocondrias sanas para mantener las altas demandas energéticas de los conos durante la función visual.

4. EL CAMBIO METABÓLICO REGULA LA DIFERENCIACIÓN CELULAR

La diferenciación de las células ganglionares sigue un patrón centro-periférico y es probable que los progenitores localizados adyacentes a las neuronas diferenciadas en la región central estén expuestos a diferentes señales que los progenitores localizados en la periferia, lejos del frente de diferenciación. En este sentido, se conoce que existen diferencias en la expresión génica entre estas dos regiones de la retina (Adler & Cantosoler, 2007; Koso et al, 2006; Koso et al, 2007). Por ello, no resulta sorprendente que la modulación de mitofagia afecte fundamentalmente a la diferenciación temprana (Figura 54 A-C de resultados; figura 6 de discusión), mientras que la inhibición de la glicolisis con 2-DG y 3-PO afecta a neuronas maduras de la región central de retinas en E15.5 así como a RGCs de retinas en E18.5 (Figuras 55 y 58 C, D de resultados; figura 6 de

discusión). Esto refuerza la hipótesis de que la mitofagia precede al cambio metabólico. En cualquier caso, hemos determinado que lo que resulta determinante en la regulación de la diferenciación de las células ganglionares es un cambio metabólico hacia glicolisis, ya que la inhibición de este proceso disminuye el número de células Brn3a positivas. Además, el hecho de que este efecto solo se observe en la región central de las retinas a E15.5 y en retinas a E18.5, sugiere que el metabolismo glicolítico es necesario para el mantenimiento de las RGCs más maduras. Esto explicaría el incremento de RGCs más acusado en la región madura de la retina observado en retinas deficientes de L2AKO (Figura 56 B-D de resultados; figura 8 de discusión), que presentan un mayor flujo glicolítico que retinas *wildtype* (Figura 56 A), en relación con lo que ocurre en el hígado de ratones deficientes de LAMP-2A (Tasset & Cuervo, 2016). En la figura 8 están reflejadas las diferentes regiones de la retina de E15.5 en función de su metabolismo glicolítico y como está afectada la diferenciación de RGCs en retinas deficientes de L2A.

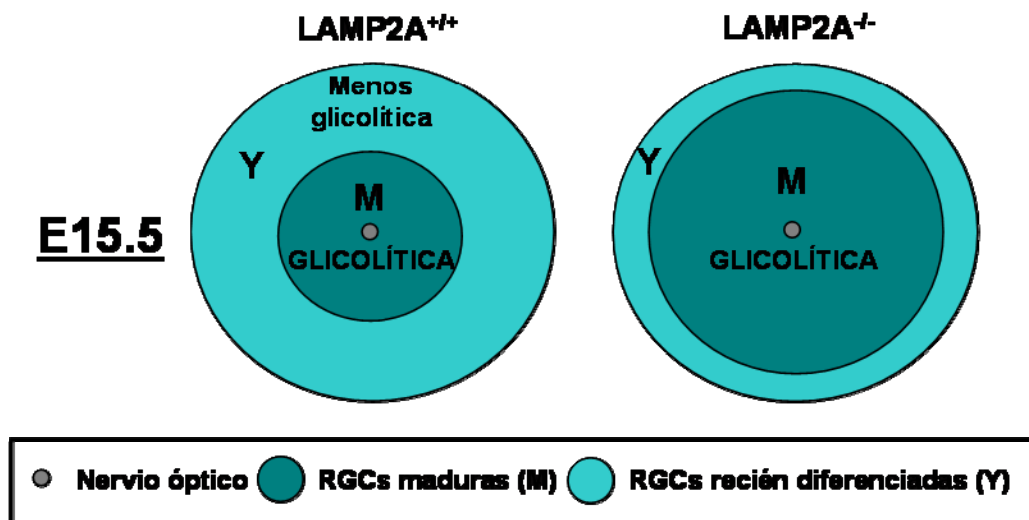


Figura 8. Representación esquemática de la distribución de las RGCs recién diferenciadas y maduras en función del estado glicolítico de la retina.

Como he descrito previamente, en el mecanismo inductor de mitofagia durante el desarrollo de la retina interviene el incremento de la expresión de HIF1 α (Figura 3 de discusión). Hay que destacar que este factor de transcripción, que se activa en respuesta a hipoxia, se degrada vía CMA (Ferreira, 2015). El hecho de que la expresión de LAMP-2A sea mayor en estadios tempranos del desarrollo (Figura 56 F de resultados), en los que la retina depende en gran medida del metabolismo oxidativo (Figura 63 A de

resultados; figura 3 de discusión), y disminuya en el estadio en el que se induce mitofagia (E15.5) (Figura 56 F de resultados), podría constituir un mecanismo necesario para evitar la degradación de HIF1 α vía CMA y permitir así la inducción de mitofagia, el cambio metabólico hacia glicólisis y la diferenciación de las células ganglionares. Según esta hipótesis, retinas deficientes de L2A no degradarían HIF1 α e inducirían una mayor mitofagia. Sin embargo, hemos observado que retinas de embriones L2A^{-/-} presentan un incremento de masa mitocondrial y una disminución en la expresión de NIX (Figura 57 D, E de resultados), lo que podría reflejar la existencia de otros mecanismos de regulación de NIX independientes de hipoxia en retinas deficientes de LAMP-2A. Todos estos datos sugieren que la mitofagia debe estar estrictamente regulada durante el desarrollo de la retina y que existe una estrecha relación entre metabolismo y masa mitocondrial, de manera que cualquier alteración en uno de los dos procesos, tiene consecuencias para el otro y viceversa. Esta relación recíproca entre metabolismo y mitofagia también se ha observado al inhibir la glicólisis en retinas de E15.5 (Figura 57 A-C de resultados).

En esta Tesis Doctoral hemos querido entender la relación entre la mitofagia y el metabolismo en distintos modelos que presentan efecto Warburg, como la retina y los macrófagos proinflamatorios de tipo M1. Cuando se produce una disminución de oxígeno, las células reprograman su metabolismo para producir ATP mediante la conversión de piruvato a lactato. No obstante, este proceso se puede dar también en presencia de oxígeno, denominándose entonces glicólisis aerobia, y es característico de las células tumorales y otros tipos celulares como la retina y los macrófagos de tipo M1 (El Kasmi & Stenmark, 2015; Galvan-Pena & O'Neill, 2014; Jones & Thompson, 2007; Krawczyk et al, 2010; Ng et al, 2014; Palsson-McDermott, 2013; Warburg, 1931). Nuestros datos indican que al igual que en retina, la mitofagia es un proceso activo en macrófagos proinflamatorios M1, pero no en macrófagos antiinflamatorios M2 (Figura 48 A-G). En el proceso de polarización hacia macrófagos proinflamatorios M1, HIF1 α desempeña un importante papel modulando el cambio metabólico hacia glicólisis e incrementando la expresión de genes inflamatorios (El Kasmi & Stenmark, 2015). Habría que determinar si en este modelo, HIF1 α también esté incrementando la expresión de NIX para inducir la mitofagia que hemos observado en macrófagos proinflamatorios M1, lo que podría facilitar el incremento de glicólisis.

Por tanto, la relevancia de la mitofagia dependiente de hipoxia y NIX está en que podría constituir un mecanismo general para modular el metabolismo en diferentes tipos celulares que presentan efecto Warburg. En este sentido, las células inflamatorias del sistema inmune, como células dendríticas, linfocitos T y macrófagos M1 presentan un perfil metabólico dependiente de glicólisis cuando se activan (Palsson-McDermott, 2013) y este cambio metabólico permite generar ATP más rápidamente así como intermediarios metabólicos para la biosíntesis de proteínas inflamatorias (Palsson-McDermott, 2013). Además, se ha descrito que el tratamiento con rapamicina favorece la polarización hacia macrófagos de tipo M1 (Mercalli et al, 2013), lo que podría ser debido a la activación de la mitofagia. Estos datos junto con el bloqueo de mitofagia y cambio de fenotipo que hemos observado en macrófagos M1 tratados con CsA y 3-MA, resalta la importancia del proceso de mitofagia en la fisiología celular. Así, esta reprogramación metabólica en macrófagos, células dendríticas y células T podría tener una relevancia en la patogénesis de enfermedades inflamatorias y metabólicas, por lo que la modulación de la mitofagia podría constituir una estrategia terapéutica. De hecho, recientemente se ha descrito que la inflamación produce daño mitocondrial, lo que desencadena la activación de mitofagia mediada por Parkina y p62, evitando la muerte celular de macrófagos por producción excesiva de IL-1 β . De esa manera, los macrófagos regulan su propia actividad inflamatoria para mantener la homeostasis y favorecer la reparación tisular (Zhong et al, 2016).

Por otro lado, esta relación entre la mitofagia y el metabolismo podría ser también importante en el contexto de las células pluripotentes, ya que la función mitocondrial y su integridad son determinantes del destino de las células madre (Parker et al, 2009). Hasta la fecha se ha descrito que las células *stem* se localizan en un nicho en hipoxia, ideal para su mantenimiento porque estas células dependen fundamentalmente de la glicólisis y tienen baja actividad mitocondrial (Simsek et al, 2010). Por tanto la reprogramación celular hacia un estado de pluripotencia implica un cambio metabólico hacia glicólisis (Folmes et al, 2011). Además, un estudio reciente muestra que en efecto la mitofagia interviene en la reprogramación de las células iPS favoreciendo la glicólisis (Ma et al, 2015), lo que destaca el papel de la mitofagia en el cambio metabólico en diversos contextos.

Sin embargo, no se ha determinado si al igual que ocurre con la diferenciación de RGCs de la retina, la diferenciación de las células *stem* está también favorecida por

la activación de mitofagia. Se ha descrito que a medida que las células *stem* proliferan y se diferencian, las demandas energéticas aumentan, y el promedio de contenido mitocondrial de la célula necesita incrementarse para permitir esos cambios (Joshi & Kundu, 2013). No obstante, es posible que esto dependa del tipo celular, ya que como hemos descrito en esta Tesis Doctoral, durante la diferenciación de las RGCs de la retina se produce un incremento de glicólisis mediado por mitofagia. En este sentido, podría ser interesante estudiar el papel de la mitofagia en un sistema de diferenciación general como las células *stem*, en el que es posible que la mitofagia sea clave para la diferenciación de algunos tipos particulares de células y no de otras.

En un estudio preliminar que hemos llevado a cabo a partir de cuerpos embrioides de células madre embrionarias, hemos observado un incremento de la masa mitocondrial al bloquear autofagia/mitofagia durante las primeras horas de la diferenciación (Figura 9 de discusión), por lo que no descartamos que la mitofagia, además de intervenir en la reprogramación somática por su implicación en el cambio metabólico hacia glicólisis, desempeñe un papel en la diferenciación celular de células madre.

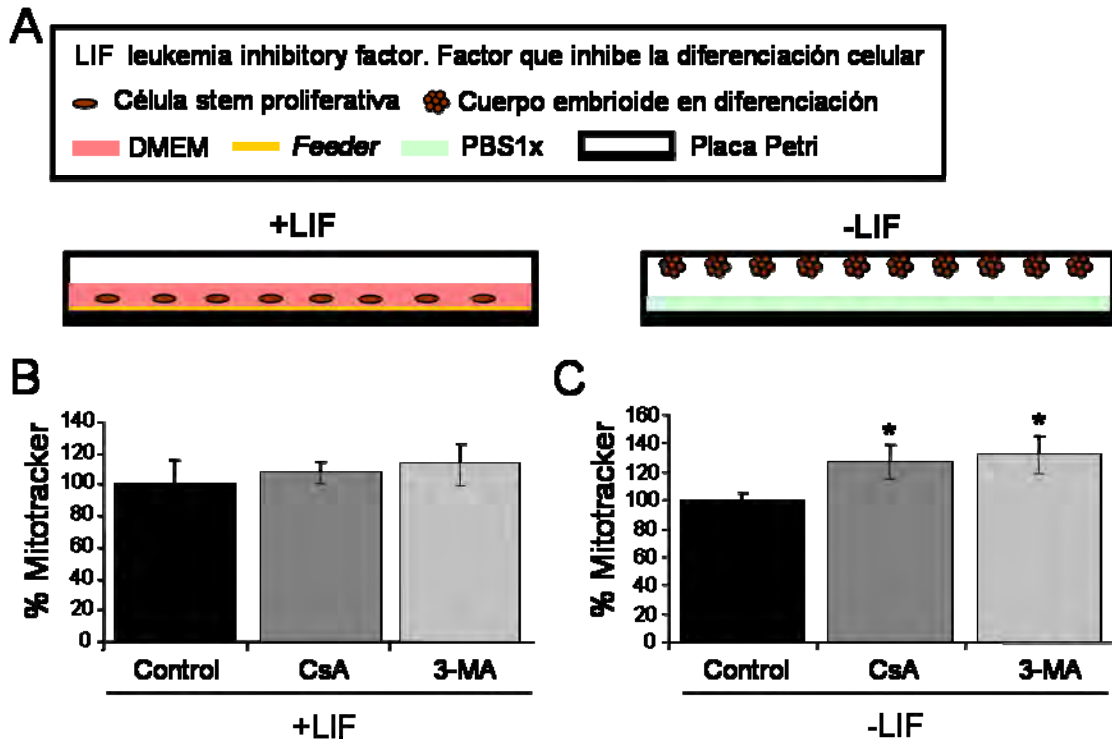
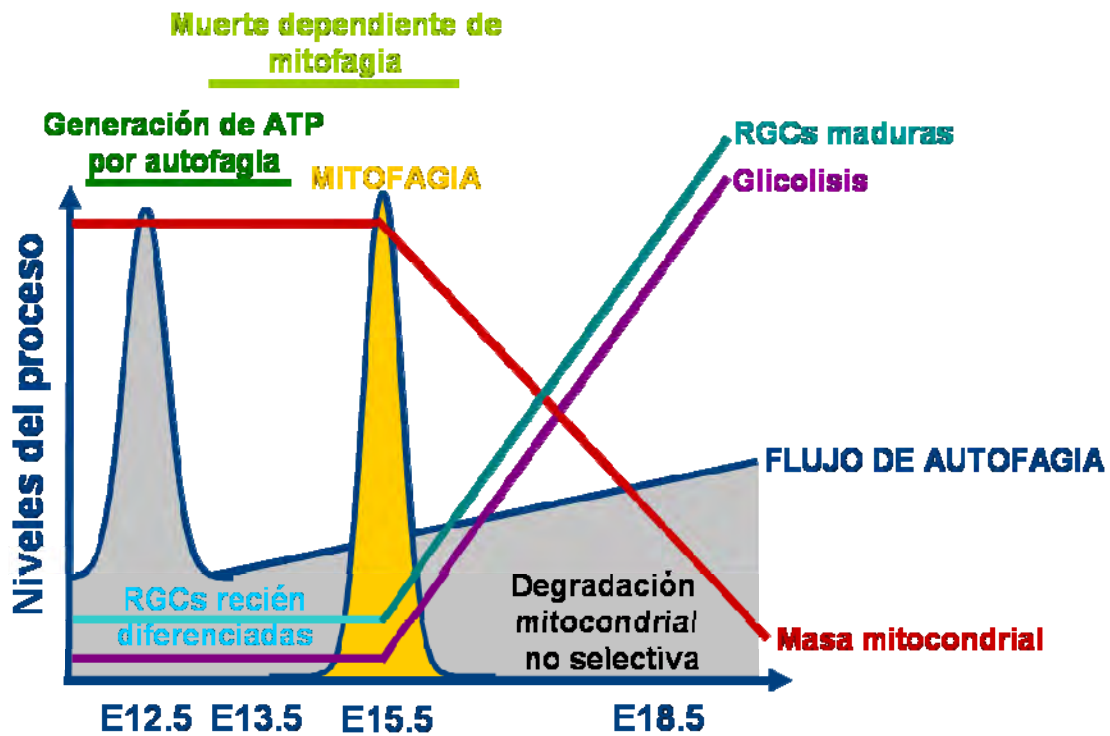


Figura 9. Mitofagia durante la diferenciación temprana de células stem. A. Esquema representativo del cultivo de células stem embrionarias en presencia y ausencia de LIF, un factor que inhibe la diferenciación celular. B. Células stem embrionarias que se cultivan en presencia de LIF no presentan alteraciones en la masa mitocondrial al inhibir autofagia/mitofagia. C. Células de cuerpos embrioides al inicio de la diferenciación tienen un incremento de la masa mitocondrial al inhibir mitofagia.

Por tanto, los datos mostrados en esta Tesis Doctoral nos permiten concluir que la mitofagia puede constituir un mecanismo fisiológico que puede no solo regular el contenido mitocondrial, si no también procesos tan relevantes como el metabolismo y la diferenciación celular. El estudio completo de la mitofagia, el metabolismo, la diferenciación y la muerte celular en retina, nos ha permitido avanzar en la comprensión otros modelos fisiológicos. En la figura 10 se muestra la distribución temporal de todos los procesos descritos en este trabajo durante el desarrollo de la retina.



Desarrollo embrionario de la retina

Figura 10. Distribución temporal de los procesos en los que la autofagia desempeña una función para el correcto desarrollo embrionario de la retina de ratón. En los estadios iniciales del desarrollo (E12.5-E13.5), la autofagia contribuye a la generación de ATP para el mantenimiento de las funciones celulares. Por otro lado, hemos determinado la activación del proceso de mitofagia en la región central de retinas a E13.5 y en retina completa a E15.5, lo que contribuye a la muerte fisiológica de la retina en desarrollo. Además, esa mitofagia es necesaria para un cambio metabólico hacia glicolisis necesario para la diferenciación de RGCs.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. La autofagia es un proceso activo en la retina de ratón, siendo mayor el flujo de autofagia en etapas embrionarias, y en concreto, en las células ganglionares de la retina.
2. El bloqueo de autofagia en etapas tempranas del desarrollo de la retina de ratón disminuye los niveles de ATP necesarios para la exposición de PS en las células apoptóticas durante la muerte fisiológica asociada al desarrollo. Como consecuencia, se produce una acumulación de células apoptóticas en el frente de diferenciación de las RGCs.
3. La inducción de autofagia incrementa la muerte celular dependiente de caspasas siguiendo un patrón centro-periferia. Este aumento de muerte se bloquea al inhibir mitofagia y caspasas.
4. En estadios tempranos del desarrollo de la retina (E13.5), existe una distribución diferencial de la masa mitocondrial, siendo ésta mayor en el frente de diferenciación y menor en la región central más madura de la retina.
5. A lo largo del desarrollo de la retina, se produce una disminución de la masa mitocondrial como consecuencia de la activación del proceso de mitofagia en un punto muy concreto del desarrollo, E15.5. Entre los reguladores moleculares de mitofagia, NIX está implicado en la degradación mitocondrial durante el desarrollo de la retina.
6. La muerte celular fisiológica en la región central de retinas en E13.5 depende del proceso de la degradación mitocondrial, ya que la inhibición de mitofagia bloquea la muerte celular. De igual manera, el bloqueo de mitofagia rescata la muerte fisiológica de retinas de ratón en E15.5.
7. La señal inductora de mitofagia necesaria para el incremento en la expresión de NIX es la hipoxia generada por las alteraciones a nivel de la cadena de

transporte electrónico y fosforilación oxidativa previas a la mitofagia. Los ROS generados como consecuencia del metabolismo mitocondrial en estadios tempranos del desarrollo, podrían desencadenar las alteraciones en la cadena de transporte electrónico mitocondrial.

8. La mitofagia que se produce en retinas de E15.5 está implicada en favorecer un cambio metabólico hacia glicólisis necesario para la apropiada diferenciación de las células ganglionares de la retina. Ese cambio metabólico mediado por mitofagia, también podría estar implicado en la polarización de macrófagos hacia tipo proinflamatorio M1 y en la diferenciación temprana de células *stem*.
9. Retinas deficientes de CMA muestran un incremento en la diferenciación de las células ganglionares, posiblemente por su mayor actividad glicolítica.
10. Durante el desarrollo embrionario de la retina, existe una interrelación entre metabolismo y autofagia, de manera que la inhibición de la glicólisis incrementa la masa mitocondrial. Además, retinas deficientes de CMA presentan un incremento de glicólisis así como de masa mitocondrial, debido a la disminución de la expresión de NIX.
11. La mitofagia es necesaria para la muerte celular asociada al desarrollo de la retina así como para la diferenciación de las células ganglionares. A pesar de que la muerte por apoptosis es necesaria para una correcta diferenciación celular durante el desarrollo de la retina, las funciones de la mitofagia en muerte celular y diferenciación de células ganglionares parecen ser independientes.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Adler R, Canto-Soler MV (2007) Molecular mechanisms of optic vesicle development: complexities, ambiguities and controversies. *Dev Biol* **305**: 1-13

Aerbajinai W, Giattina M, Lee YT, Raffeld M, Miller JL (2003) The proapoptotic factor Nix is coexpressed with Bcl-xL during terminal erythroid differentiation. *Blood* **102**: 712-717

Agathocleous M, Harris WA (2009) From progenitors to differentiated cells in the vertebrate retina. *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 45-69

Agathocleous M, Love NK, Randlett O, Harris JJ, Liu J, Murray AJ, Harris WA (2012) Metabolic differentiation in the embryonic retina. *Nat Cell Biol* **14**: 859-864

Alavian KN, Li H, Collis L, Bonanni L, Zeng L, Sacchetti S, Lazrove E, Nabili P, Flaherty B, Graham M, Chen Y, Messerli SM, Mariggio MA, Rahner C, McNay E, Shore GC, Smith PJ, Hardwick JM, Jonas EA (2011) Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nat Cell Biol* **13**: 1224-1233

Alvaro AR, Rosmaninho-Salgado J, Santiago AR, Martins J, Aveleira C, Santos PF, Pereira T, Gouveia D, Carvalho AL, Grouzmann E, Ambrosio AF, Cavadas C (2007) NPY in rat retina is present in neurons, in endothelial cells and also in microglial and Muller cells. *Neurochem Int* **50**: 757-763

Amadoro G, Corsetti V, Florenzano F, Atlante A, Bobba A, Nicolin V, Nori SL, Calissano P (2014) Morphological and bioenergetic demands underlying the mitophagy in post-mitotic neurons: the pink-parkin pathway. *Front Aging Neurosci* **6**: 18

Ames A, 3rd (1992) Energy requirements of glutamatergic pathways in rabbit retina. *Journal of Neuroscience*

Aniento F, Roche E, Cuervo AM, Knecht E (1993) Uptake and degradation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by rat liver lysosomes. *J Biol Chem* **268**: 10463-10470

Araki K, Turner AP, Shaffer VO, Gangappa S, Keller SA, Bachmann MF, Larsen CP, Ahmed R (2009) mTOR regulates memory CD8 T-cell differentiation. *Nature* **460**: 108-112

Arias E, Cuervo AM (2011) Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Curr Opin Cell Biol* **23**: 184-189

Arrasate M, Finkbeiner S (2012) Protein aggregates in Huntington's disease. *Exp Neurol* **238**: 1-11

- Ashrafi G, Schwarz TL (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* **20**: 31-42
- Azad MB, Chen Y, Henson ES, Cizeau J, McMillan-Ward E, Israels SJ, Gibson SB (2008) Hypoxia induces autophagic cell death in apoptosis-competent cells through a mechanism involving BNIP3. *Autophagy* **4**: 195-204
- Baerga R, Zhang Y, Chen PH, Goldman S, Jin S (2009) Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* **5**: 1118-1130
- Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, Brunskill EW, Sayen MR, Gottlieb RA, Dorn GW, Robbins J, Molkentin JD (2005) Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* **434**: 658-662
- Bandyopadhyay U, Kaushik S, Varticovski L, Cuervo AM (2008) The chaperone-mediated autophagy receptor organizes in dynamic protein complexes at the lysosomal membrane. *Mol Cell Biol* **28**: 5747-5763
- Bar-Peled L, Sabatini DM (2014) Regulation of mTORC1 by amino acids. *Trends Cell Biol* **24**: 400-406
- Bartelds B, Knoester H, Smid GB, Takens J, Visser GH, Penninga L, van der Leij FR, Beaufort-Krol GC, Zijlstra WG, Heymans HS, Kuipers JR (2000) Perinatal changes in myocardial metabolism in lambs. *Circulation* **102**: 926-931
- Bassett EA, Wallace VA (2012) Cell fate determination in the vertebrate retina. *Trends Neurosci* **35**: 565-573
- Bejarano-Escobar R, Alvarez-Hernan G, Morona R, Gonzalez A, Martin-Partido G, Francisco-Morcillo J (2015) Expression and function of the LIM-homeodomain transcription factor Islet-1 in the developing and mature vertebrate retina. *Exp Eye Res* **138**: 22-31
- Bellot G, Garcia-Medina R, Gounon P, Chiche J, Roux D, Pouyssegur J, Mazure NM (2009) Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol* **29**: 2570-2581
- Bereiter-Hahn J, Jendrach M (2010) Mitochondrial dynamics. *Int Rev Cell Mol Biol* **284**: 1-65
- Berridge MV, Herst PM, Tan AS (2010) Metabolic flexibility and cell hierarchy in metastatic cancer. *Mitochondrion* **10**: 584-588
- Blackshaw S, Harpavat S, Trimarchi J, Cai L, Huang H, Kuo WP, Weber G, Lee K, Fraioli RE, Cho SH, Yung R, Asch E, Ohno-Machado L, Wong WH, Cepko CL (2004) Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol* **2**: E247

- Boland B, Kumar A, Lee S, Platt FM, Wegiel J, Yu WH, Nixon RA (2008) Autophagy induction and autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease. *J Neurosci* **28**: 6926-6937
- Bonilla DL, Bhattacharya A, Sha Y, Xu Y, Xiang Q, Kan A, Jagannath C, Komatsu M, Eissa NT (2013) Autophagy regulates phagocytosis by modulating the expression of scavenger receptors. *Immunity* **39**: 537-547
- Boya P (2012) Lysosomal Function and Dysfunction: Mechanism and Disease. *Antioxid Redox Signal* **17**: 766-774
- Boya P, de la Rosa EJ (2005) Cell death in early neural life. *Birth Defects Res C Embryo Today* **75**: 281-293
- Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini J, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P, Kroemer G (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**: 1025-1040.
- Boya P, Mellen MA, de la Rosa EJ (2008) How autophagy is related to programmed cell death during the development of the nervous system. *Biochem Soc Trans* **36**: 813-817
- Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat Cell Biol* **15**: 713-720
- Braschi E, Zunino R, McBride HM (2009) MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* **10**: 748-754
- Brugarolas JB, Vazquez F, Reddy A, Sellers WR, Kaelin WG, Jr. (2003) TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell* **4**: 147-158
- Camougrand N, Grelaud-Coq A, Marza E, Priault M, Bessoule JJ, Manon S (2003) The product of the UTH1 gene, required for Bax-induced cell death in yeast, is involved in the response to rapamycin. *Mol Microbiol* **47**: 495-506
- Campanella M, Casswell E, Chong S, Farah Z, Wieckowski MR, Abramov AY, Tinker A, Duchen MR (2008) Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab* **8**: 13-25
- Campanella M, Parker N, Tan CH, Hall AM, Duchen MR (2009) IF(1): setting the pace of the F(1)F(o)-ATP synthase. *Trends Biochem Sci* **34**: 343-350
- Carreira RS, Lee Y, Ghochani M, Gustafsson AB, Gottlieb RA (2010) Cyclophilin D is required for mitochondrial removal by autophagy in cardiac cells. *Autophagy* **6**: 462-472
- Casson RJ, Chidlow G, Han G, Wood JP (2013) An explanation for the Warburg effect in the adult mammalian retina. *Clin Experiment Ophthalmol* **41**: 517

- Cayouette M, Poggi L, Harris WA (2006) Lineage in the vertebrate retina. *Trends Neurosci* **29**: 563-570
- Cecconi F, Levine B (2008) The role of autophagy in mammalian development: cell makeover rather than cell death. *Dev Cell* **15**: 344-357
- Codogno P, Mehrpour M, Proikas-Cezanne T (2011) Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**: 7-12
- COHEN LH NW (1960) Glucose catabolism of rabbit retina before and after development of visual function. *J Neurochem*
- Corti O, Brice A (2013) Mitochondrial quality control turns out to be the principal suspect in parkin and PINK1-related autosomal recessive Parkinson's disease. *Curr Opin Neurobiol* **23**: 100-108
- Cross MJ, Stewart A, Hodgkin MN, Kerr DJ, Wakelam MJ (1995) Wortmannin and its structural analogue demethoxyviridin inhibit stimulated phospholipase A2 activity in Swiss 3T3 cells. Wortmannin is not a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* **270**: 25352-25355
- Cuadros MA, Rios A (1988) Spatial and temporal correlation between early nerve fiber growth and neuroepithelial cell death in the chick embryo retina. *Anat Embryol (Berl)* **178**: 543-551
- Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy: selectivity pays off. *Trends Endocrinol Metab* **21**: 142-150
- Cuervo AM, Dice JF (1996) A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* **273**: 501-503
- Cuervo AM, Dice JF (2000) Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic* **1**: 570-583
- Cuervo AM, Terlecky SR, Dice JF, Knecht E (1994) Selective binding and uptake of ribonuclease A and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by isolated rat liver lysosomes. *J Biol Chem* **269**: 26374-26380
- Cui K, Luo X, Xu K, Ven Murthy MR (2004) Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **28**: 771-799
- Cunningham JT, Rodgers JT, Arlow DH, Vazquez F, Mootha VK, Puigserver P (2007) mTOR controls mitochondrial oxidative function through a YY1-PGC-1alpha transcriptional complex. *Nature* **450**: 736-740
- Chandel NS, McClintock DS, Feliciano CE, Wood TM, Melendez JA, Rodriguez AM, Schumacker PT (2000) Reactive oxygen species generated at mitochondrial complex III

stabilize hypoxia-inducible factor-1alpha during hypoxia: a mechanism of O2 sensing. *J Biol Chem* **275**: 25130-25138

Chavarria T, Valenciano AI, Mayordomo R, Egea J, Comella JX, Hallbook F, de Pablo F, de la Rosa EJ (2007) Differential, age-dependent MEK-ERK and PI3K-Akt activation by insulin acting as a survival factor during embryonic retinal development. *Dev Neurobiol* **67**: 1777-1788

Chen H, Chan DC (2005) Emerging functions of mammalian mitochondrial fusion and fission. *Hum Mol Genet* **14 Spec No. 2**: R283-289

Chen H, Chan DC (2006) Critical dependence of neurons on mitochondrial dynamics. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 453-459

Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* **18**: R169-176

Chen Y, Lewis W, Diwan A, Cheng EH, Matkovich SJ, Dorn GW, 2nd (2010) Dual autonomous mitochondrial cell death pathways are activated by Nix/BNIP3L and induce cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 9035-9042

Chertov AO, Holzhausen L, Kuok IT, Couron D, Parker E, Linton JD, Sadilek M, Sweet IR, Hurley JB (2011) Roles of glucose in photoreceptor survival. *J Biol Chem* **286**: 34700-34711

Chinnadurai G, Vijayalingam S, Gibson SB (2008) BNIP3 subfamily BH3-only proteins: mitochondrial stress sensors in normal and pathological functions. *Oncogene* **27 Suppl 1**: S114-127

Chow RL, Lang RA (2001) Early eye development in vertebrates. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**: 255-296

Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, Tyurin VA, Yanamala N, Shrivastava IH, Mohammadyani D, Qiang Wang KZ, Zhu J, Klein-Seetharaman J, Balasubramanian K, Amoscato AA, Borisenko G, Huang Z, Gusdon AM, Cheikhi A, Steer EK, Wang R, Baty C, Watkins S, Bahar I, Bayir H, Kagan VE (2013) Cardioliipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* **15**: 1197-1205

Chu CT, Zhu J, Dagda R (2007) Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy and autophagic stress: implications for neurodegeneration and cell death. *Autophagy* **3**: 663-666

Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y, Kondo S (2004) Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* **64**: 4286-4293

Danial NN, Korsmeyer SJ (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**: 205-219

De Duve C, Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol* **28**: 435-492

- de la Rosa EJ, de Pablo F (2000) Cell death in early neural development: beyond the neurotrophic theory. *Trends in Neurosciences* **23**: 454-458
- Debnath J, Baehrecke EH, Kroemer G (2005) Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* **1**: 66-74
- Debnath JKaJ (2015) Autophagy at the crossroads of catabolism and anabolism. *Nature reviews molecular cell biology* **16**: 461-472
- Deretic V, Saitoh T, Akira S (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **13**: 722-737
- Deval E, Noel J, Lay N, Alloui A, Diochot S, Friend V, Jodar M, Lazdunski M, Lingueglia E (2008) ASIC3, a sensor of acidic and primary inflammatory pain. *Embo J* **27**: 3047-3055
- DeYoung MP, Horak P, Sofer A, Sgroi D, Ellisen LW (2008) Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev* **22**: 239-251
- Di Lisa F, Carpi A, Giorgio V, Bernardi P (2011) The mitochondrial permeability transition pore and cyclophilin D in cardioprotection. *Biochim Biophys Acta* **1813**: 1316-1322
- Diaz B, Pimentel B, de Pablo F, de la Rosa EJ (1999) Apoptotic cell death of proliferating neuroepithelial cells in the embryonic retina is prevented by insulin. *European Journal of Neuroscience* **11**: 1624-1632
- Ding WX, Ni HM, Li M, Liao Y, Chen X, Stolz DB, Dorn GW, 2nd, Yin XM (2010) Nix is critical to two distinct phases of mitophagy, reactive oxygen species-mediated autophagy induction and Parkin-ubiquitin-p62-mediated mitochondrial priming. *J Biol Chem* **285**: 27879-27890
- Ding WX, Yin XM (2012) Mitophagy: mechanisms, pathophysiological roles, and analysis. *Biol Chem* **393**: 547-564
- Diwan A (2007) Unrestrained erythroblast development in Nix^{-/-} mice reveals a mechanism for apoptotic modulation of erythropoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Diwan A, Krenz M, Syed FM, Wansapura J, Ren X, Koesters AG, Li H, Kirshenbaum LA, Hahn HS, Robbins J, Jones WK, Dorn GW (2007) Inhibition of ischemic cardiomyocyte apoptosis through targeted ablation of Bnip3 restrains postinfarction remodeling in mice. *J Clin Invest* **117**: 2825-2833
- Diwan A, Matkovich SJ, Yuan Q, Zhao W, Yatani A, Brown JH, Molkenstein JD, Kranias EG, Dorn GW, 2nd (2009) Endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk in NIX-mediated murine cell death. *J Clin Invest* **119**: 203-212

Diwan A, Wansapura J, Syed FM, Matkovich SJ, Lorenz JN, Dorn GW, 2nd (2008) Nix-mediated apoptosis links myocardial fibrosis, cardiac remodeling, and hypertrophy decompensation. *Circulation* **117**: 396-404

Domenech E, Maestre C, Esteban-Martinez L, Partida D, Pascual R, Fernandez-Miranda G, Seco E, Campos-Olivas R, Perez M, Megias D, Allen K, Lopez M, Saha AK, Velasco G, Rial E, Mendez R, Boya P, Salazar-Roa M, Malumbres M (2015) AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat Cell Biol* **17**: 1304-1316

Duchen MR (2004) Mitochondria in health and disease: perspectives on a new mitochondrial biology. *Mol Aspects Med* **25**: 365-451

Duvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD (2010) Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell* **39**: 171-183

Dyall SD, Brown MT, Johnson PJ (2004) Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* **304**: 253-257

Edinger AL, Thompson CB (2002) Akt maintains cell size and survival by increasing mTOR-dependent nutrient uptake. *Mol Biol Cell* **13**: 2276-2288

Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, Asara JM, Fitzpatrick J, Dillin A, Viollet B, Kundu M, Hansen M, Shaw RJ (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science* **331**: 456-461

El Kasmi KC, Stenmark KR (2015) Contribution of metabolic reprogramming to macrophage plasticity and function. *Semin Immunol* **27**: 267-275

Elmore SP, Qian T, Grissom SF, Lemasters JJ (2001) The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes. *Faseb J* **15**: 2286-2287

Elliott MR, Ravichandran KS (2010) Clearance of apoptotic cells: implications in health and disease. *J Cell Biol* **189**: 1059-1070

Esteban-Martinez L, Boya P (2015) Autophagic flux determination in vivo and ex vivo. *Methods* **75**: 79-86

Esteban-Martinez L, Domenech E, Boya P, Salazar-Roa M, Malumbres M (2015) Mitophagy in mitosis: More than a myth. *Autophagy* **11**: 2379-2380

Fabricius C, Berthold CH, Rydmark M (1993) Axoplasmic organelles at nodes of Ranvier. II. Occurrence and distribution in large myelinated spinal cord axons of the adult cat. *J Neurocytol* **22**: 941-954

- Faccenda D, Campanella M (2012) Molecular Regulation of the Mitochondrial F(1)F(o)-ATP synthase: Physiological and Pathological Significance of the Inhibitory Factor 1 (IF1). *Int J Cell Biol* **2012**: 367934
- Faccenda D, Tan CH, Seraphim A, Duchen MR, Campanella M (2013) IF1 limits the apoptotic-signalling cascade by preventing mitochondrial remodelling. *Cell Death Differ* **20**: 686-697
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM (1992) Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* **148**: 2207-2216
- Fatokun AA, Stone TW, Smith RA (2008) Prolonged exposures of cerebellar granule neurons to S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) induce neuronal damage independently of peroxynitrite. *Brain Res* **1230**: 265-272
- Ferree A, Shirihai O (2012) Mitochondrial dynamics: the intersection of form and function. *Adv Exp Med Biol* **748**: 13-40
- Ferreira J (2015) K63 linked ubiquitin chain formation is a signal for HIF1A degradation by Chaperone-Mediated Autophagy. *Sci Rep*
- Fimia G, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K, Cecconi F (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**: 1121-1125
- Fishwick KJ, Li RA, Halley P, Deng P, Storey KG (2010) Initiation of neuronal differentiation requires PI3-kinase/TOR signalling in the vertebrate neural tube. *Dev Biol* **338**: 215-225
- Folmes CD, Nelson TJ, Martinez-Fernandez A, Arrell DK, Lindor JZ, Dzeja PP, Ikeda Y, Perez-Terzic C, Terzic A (2011) Somatic oxidative bioenergetics transitions into pluripotency-dependent glycolysis to facilitate nuclear reprogramming. *Cell Metab* **14**: 264-271
- Formentini L, Pereira MP, Sanchez-Cenizo L, Santacatterina F, Lucas JJ, Navarro C, Martinez-Serrano A, Cuezva JM (2014) In vivo inhibition of the mitochondrial H⁺-ATP synthase in neurons promotes metabolic preconditioning. *Embo J* **33**: 762-778
- Formentini L, Sanchez-Arago M, Sanchez-Cenizo L, Cuezva JM (2012) The mitochondrial ATPase inhibitory factor 1 triggers a ROS-mediated retrograde prosurvival and proliferative response. *Mol Cell* **45**: 731-742
- Forte M, Bernardi P (2005) Genetic dissection of the permeability transition pore. *J Bioenerg Biomembr* **37**: 121-128
- Fu X, Wan S, Lyu YL, Liu LF, Qi H (2008) Etoposide induces ATM-dependent mitochondrial biogenesis through AMPK activation. *PloS one* **3**: e2009

- Fullgrabe J, Klionsky DJ, Joseph B (2014) The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 65-74
- Galvan-Pena S, O'Neill LA (2014) Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* **5**: 420
- Galvez AS, Brunskill EW, Marreez Y, Benner BJ, Regula KM, Kirschenbaum LA, Dorn GW, 2nd (2006) Distinct pathways regulate proapoptotic Nix and BNip3 in cardiac stress. *J Biol Chem* **281**: 1442-1448
- Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G (2009) Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* **10**: 481-494
- Gan L (1999) POU domain factor Brn-3b is essential for retinal ganglion cell differentiation and survival but not for initial cell fate specification. *Developmental biology* **210**: 469-480
- Gao F, Chen D, Si J, Hu Q, Qin Z, Fang M, Wang G (2015) The mitochondrial protein BNIP3L is the substrate of PARK2 and mediates mitophagy in PINK1/PARK2 pathway. *Hum Mol Genet* **24**: 2528-2538
- Gao Z, Mao CA, Pan P, Mu X, Klein WH (2014) Transcriptome of Atoh7 retinal progenitor cells identifies new Atoh7-dependent regulatory genes for retinal ganglion cell formation. *Dev Neurobiol* **74**: 1123-1140
- Geisler S, Holmstrom KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ, Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**: 119-131
- Giorgio V, Bisetto E, Soriano ME, Dabbeni-Sala F, Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P, Lippe G (2009) Cyclophilin D modulates mitochondrial F0F1-ATP synthase by interacting with the lateral stalk of the complex. *J Biol Chem* **284**: 33982-33988
- Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* **13**: 589-598
- Gong G, Song M, Csordas G, Kelly DP, Matkovich SJ, Dorn GW, 2nd (2015) Parkin-mediated mitophagy directs perinatal cardiac metabolic maturation in mice. *Science* **350**: aad2459
- Graw J (2010) Eye development. *Curr Top Dev Biol* **90**: 343-386
- Green DR, Galluzzi L, Kroemer G (2011) Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging. *Science* **333**: 1109-1112
- Gunter TE, Pfeiffer DR (1990) Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* **258**: C755-786

Guo JY, Chen HY, Mathew R, Fan J, Strohecker AM, Karsli-Uzunbas G, Kamphorst JJ, Chen G, Lemons JM, Karantza V, Coller HA, Dipaola RS, Gelinas C, Rabinowitz JD, White E (2011) Activated Ras requires autophagy to maintain oxidative metabolism and tumorigenesis. *Genes Dev* **25**: 460-470

Hamacher-Brady A, Brady NR (2016) Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci* **73**: 775-795

Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, Gustafsson AB (2012) Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J Biol Chem* **287**: 19094-19104

Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H, Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**: 885-889

Harada T, Harada C, Kohsaka S, Wada E, Yoshida K, Ohno S, Mamada H, Tanaka K, Parada LF, Wada K (2002) Microglia-Muller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* **22**: 9228-9236

Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 774-785

Harman AW, Nieminen AL, Lemasters JJ, Herman B (1990) Cytosolic free magnesium, ATP and blebbing during chemical hypoxia in cultured rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **170**: 477-483

He C, Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet* **43**: 67-93

He L, Lemasters JJ (2005) Dephosphorylation of the Rieske iron-sulfur protein after induction of the mitochondrial permeability transition. *Biochem Biophys Res Commun* **334**: 829-837

Henson PM, Hume DA (2006) Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. *Trends Immunol* **27**: 244-250

Hock MB, Kralli A (2009) Transcriptional control of mitochondrial biogenesis and function. *Annu Rev Physiol* **71**: 177-203

Hollenbeck PJ (2005) Mitochondria and neurotransmission: evacuating the synapse. *Neuron* **47**: 331-333

Hoon M, Okawa H, Della Santina L, Wong RO (2014) Functional architecture of the retina: development and disease. *Prog Retin Eye Res* **42**: 44-84

Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, Guan JL, Oshiro N, Mizushima N (2009) Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell* **20**: 1981-1991

Humphrey MF, Moore SR (1996) Microglial responses to focal lesions of the rabbit retina: correlation with neural and macroglial reactions. *Glia* **16**: 325-341

Hunter DR, Haworth RA, Southard JH (1976) Relationship between configuration, function, and permeability in calcium-treated mitochondria. *J Biol Chem* **251**: 5069-5077

Iijima T (2006) Mitochondrial membrane potential and ischemic neuronal death. *Neurosci Res* **55**: 234-243

Itakura E, Kishi C, Inoue K, Mizushima N (2008) Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* **19**: 5360-5372

Iwai-Kanai E, Yuan H, Huang C, Sayen MR, Perry-Garza CN, Kim L, Gottlieb RA (2008) A method to measure cardiac autophagic flux in vivo. *Autophagy* **4**: 322-329

Jensen AM, Raff MC (1997) Continuous observation of multipotential retinal progenitor cells in clonal density culture. *Dev Biol* **188**: 267-279

Jo HS, Kang KH, Joe CO, Kim JW (2012) Pten coordinates retinal neurogenesis by regulating Notch signalling. *Embo J* **31**: 817-828

Jones RG, Thompson CB (2007) Revving the engine: signal transduction fuels T cell activation. *Immunity* **27**: 173-178

Joo JH, Dorsey FC, Joshi A, Hennessy-Walters KM, Rose KL, McCastlain K, Zhang J, Iyengar R, Jung CH, Suen DF, Steeves MA, Yang CY, Prater SM, Kim DH, Thompson CB, Youle RJ, Ney PA, Cleveland JL, Kundu M (2011) Hsp90-Cdc37 chaperone complex regulates Ulk1- and Atg13-mediated mitophagy. *Mol Cell* **43**: 572-585

Jose C (2011) Choosing between glycolysis and oxidative phosphorylation: a tumor's dilemma? *Biochim Biophys Acta*

Joshi A, Kundu M (2013) Mitophagy in hematopoietic stem cells: the case for exploration. *Autophagy* **9**: 1737-1749

Kageyama Y, Zhang Z, Roda R, Fukaya M, Wakabayashi J, Wakabayashi N, Kensler TW, Reddy PH, Iijima M, Sesaki H (2012) Mitochondrial division ensures the survival of postmitotic neurons by suppressing oxidative damage. *J Cell Biol* **197**: 535-551

Kanki T, Klionsky DJ (2008) Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J Biol Chem* **283**: 32386-32393

Kaushik S, Cuervo AM (2012) Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* **22**: 407-417

Kiffin R, Christian C, Knecht E, Cuervo AM (2004) Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol Biol Cell* **15**: 4829-4840

Kim HT, Kim JW (2012) Compartmentalization of vertebrate optic neuroepithelium: external cues and transcription factors. *Mol Cells* **33**: 317-324

Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**: 245-253

Kissova I, Deffieu M, Manon S, Camougrand N (2004) Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* **279**: 39068-39074

Klimova T, Chandel NS (2008) Mitochondrial complex III regulates hypoxic activation of HIF. *Cell Death Differ* **15**: 660-666

Klionsky DJ (2007) Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 931-937

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akira S, Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Albert ML, Albin RL, Alegre-Abarrategui J, Aleo MF, Alirezaei M, Almasan A, Almonte-Becerril M, Amano A, Amaravadi R, Amarnath S, Amer AO, Andrieu-Abadie N, Anantharam V, Ann DK, Anoopkumar-Dukie S, Aoki H, Apostolova N, Arancia G, Aris JP, Asanuma K, Asare NY, Ashida H, Askanas V, Askew DS, Auberger P, Baba M, Backues SK, Baehrecke EH, Bahr BA, Bai XY, Bailly Y, Baiocchi R, Baldini G, Balduini W, Ballabio A, Bamber BA, Bampton ET, Banhegyi G, Bartholomew CR, Bassham DC, Bast RC, Jr., Batoko H, Bay BH, Beau I, Bechet DM, Begley TJ, Behl C, Behrends C, Bekri S, Bellaire B, Bendall LJ, Benetti L, Berliocchi L, Bernardi H, Bernassola F, Besteiro S, Bhatia-Kissova I, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Boise LH, Bonaldo P, Boone DL, Bornhauser BC, Bortolucci KR, Bossis I, Bost F, Bourquin JP, Boya P, Boyer-Guittaut M, Bozhkov PV, Brady NR, Brancolini C, Brech A, Brenman JE, Brennand A, Bresnick EH, Brest P, Bridges D, Bristol ML, Brookes PS, Brown EJ, Brumell JH, Brunetti-Pierri N, Brunk UT, Bulman DE, Bultman SJ, Bultynck G, Burbulla LF, Bursch W, Butchar JP, Buzgariu W, Bydlowski SP, Cadwell K, Cahova M, Cai D, Cai J, Cai Q, Calabretta B, Calvo-Garrido J, Camougrand N, Campanella M, Campos-Salinas J, Candi E, Cao L, Caplan AB, Carding SR, Cardoso SM, Carew JS, Carlin CR, Carmignac V, Carneiro LA, Carra S, Caruso RA, Casari G, Casas C, Castino R, Cebollero E, Cecconi F, Celli J, Chaachouay H, Chae HJ, Chai CY, Chan DC, Chan EY, Chang RC, Che CM, Chen CC, Chen GC, Chen GQ, Chen M, Chen Q, Chen SS, Chen W, Chen X, Chen YG, Chen Y, Chen YJ, Chen Z, Cheng A, Cheng CH, Cheng Y, Cheong H, Cheong JH, Cherry S, Chess-Williams R, Cheung ZH, Chevet E, Chiang HL, Chiarelli R, Chiba T, Chin LS, Chiou SH, Chisari FV, Cho CH, Cho DH, Choi AM, Choi D, Choi KS, Choi ME, Chouaib S, Choubey D, Choubey V, Chu CT, Chuang TH, Chueh SH, Chun T, Chwae YJ, Chye ML, Ciarcia R, Ciriolo MR, Clague MJ, Clark RS, Clarke PG, Clarke R, Codogno P, Coller HA, Colombo MI, Comincini S,

Condello M, Condorelli F, Cookson MR, Coombs GH, Coppens I, Corbalan R, Cossart P, Costelli P, Costes S, Coto-Montes A, Couve E, Coxon FP, Cregg JM, Crespo JL, Cronje MJ, Cuervo AM, Cullen JJ, Czaja MJ, D'Amelio M, Darfeuille-Michaud A, Davids LM, Davies FE, De Felici M, de Groot JF, de Haan CA, De Martino L, De Milito A, De Tata V, Debnath J, Degterev A, Dehay B, Delbridge LM, Demarchi F, Deng YZ, Dengjel J, Dent P, Denton D, Deretic V, Desai SD, Devenish RJ, Di Gioacchino M, Di Paolo G, Di Pietro C, Diaz-Araya G, Diaz-Laviada I, Diaz-Meco MT, Diaz-Nido J, Dikic I, Dinesh-Kumar SP, Ding WX, Distelhorst CW, Diwan A, Djavaheri-Mergny M, Dokudovskaya S, Dong Z, Dorsey FC, Dosenko V, Dowling JJ, Doxsey S, Dreux M, Drew ME, Duan Q, Duchosal MA, Duff K, Dugail I, Durbeej M, Duszenko M, Edelstein CL, Edinger AL, Egea G, Eichinger L, Eissa NT, Ekmekcioglu S, El-Deiry WS, Elazar Z, Elgendy M, Ellerby LM, Eng KE, Engelbrecht AM, Engelder S, Erenpreisa J, Escalante R, Esclatine A, Eskelinen EL, Espert L, Espina V, Fan H, Fan J, Fan QW, Fan Z, Fang S, Fang Y, Fanto M, Fanzani A, Farkas T, Farre JC, Faure M, Fechheimer M, Feng CG, Feng J, Feng Q, Feng Y, Fesus L, Feuer R, Figueiredo-Pereira ME, Fimia GM, Fingar DC, Finkbeiner S, Finkel T, Finley KD, Fiorito F, Fisher EA, Fisher PB, Flajolet M, Florez-McClure ML, Florio S, Fon EA, Fornai F, Fortunato F, Fotedar R, Fowler DH, Fox HS, Franco R, Frankel LB, Franssen M, Fuentes JM, Fueyo J, Fujii J, Fujisaki K, Fujita E, Fukuda M, Furukawa RH, Gaestel M, Gailly P, Gajewska M, Galliot B, Galy V, Ganesh S, Ganetzky B, Ganley IG, Gao FB, Gao GF, Gao J, Garcia L, Garcia-Manero G, Garcia-Marcos M, Garmyn M, Gartel AL, Gatti E, Gautel M, Gawriluk TR, Gegg ME, Geng J, Germain M, Gestwicki JE, Gewirtz DA, Ghavami S, Ghosh P, Giammarioli AM, Giatromanolaki AN, Gibson SB, Gilkerson RW, Ginger ML, Ginsberg HN, Golab J, Goligorsky MS, Golstein P, Gomez-Manzano C, Goncu E, Gongora C, Gonzalez CD, Gonzalez R, Gonzalez-Estevez C, Gonzalez-Polo RA, Gonzalez-Rey E, Gorbunov NV, Gorski S, Goruppi S, Gottlieb RA, Gozuacik D, Granato GE, Grant GD, Green KN, Gregorc A, Gros F, Grose C, Grunt TW, Gual P, Guan JL, Guan KL, Guichard SM, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Gunst J, Gustafsson AB, Halayko AJ, Hale AN, Halonen SK, Hamasaki M, Han F, Han T, Hancock MK, Hansen M, Harada H, Harada M, Hardt SE, Harper JW, Harris AL, Harris J, Harris SD, Hashimoto M, Haspel JA, Hayashi S, Hazelhurst LA, He C, He YW, Hebert MJ, Heidenreich KA, Helfrich MH, Helgason GV, Henske EP, Herman B, Herman PK, Hetz C, Hilfiker S, Hill JA, Hocking LJ, Hofman P, Hofmann TG, Hohfeld J, Holyoake TL, Hong MH, Hood DA, Hotamisligil GS, Houwerzijl EJ, Hoyer-Hansen M, Hu B, Hu CA, Hu HM, Hua Y, Huang C, Huang J, Huang S, Huang WP, Huber TB, Huh WK, Hung TH, Hupp TR, Hur GM, Hurley JB, Hussain SN, Hussey PJ, Hwang JJ, Hwang S, Ichihara A, Ilkhanizadeh S, Inoki K, Into T, Iovane V, Iovanna JL, Ip NY, Isaka Y, Ishida H, Isidoro C, Isobe K, Iwasaki A, Izquierdo M, Izumi Y, Jaakkola PM, Jaattela M, Jackson GR, Jackson WT, Janji B, Jendrach M, Jeon JH, Jeung EB, Jiang H, Jiang JX, Jiang M, Jiang Q, Jiang X, Jimenez A, Jin M, Jin S, Joe CO, Johansen T, Johnson DE, Johnson GV, Jones NL, Joseph B, Joseph SK, Joubert AM, Juhasz G, Juillerat-Jeanneret L, Jung CH, Jung YK, Kaarniranta K, Kaasik A, Kabuta T, Kadowaki M, Kagedal K, Kamada Y, Kaminsky VO, Kampinga HH, Kanamori H, Kang C, Kang KB, Kang KI, Kang R, Kang YA, Kanki T, Kanneganti TD, Kanno H, Kanthasamy AG, Kanthasamy A, Karantza V, Kaushal GP, Kaushik S, Kawazoe Y, Ke PY, Kehrl JH, Kelekar A, Kerkhoff C, Kessel DH, Khalil H, Kiel JA, Kiger AA, Kihara A, Kim DR, Kim DH, Kim EK, Kim HR, Kim JS, Kim JH, Kim JC, Kim JK, Kim PK, Kim SW, Kim YS, Kim Y, Kimchi A, Kimmelman AC, King JS, Kinsella TJ, Kirkin V, Kirshenbaum LA, Kitamoto K, Kitazato K, Klein L, Klimecki WT, Klucken J, Knecht E, Ko BC, Koch JC, Koga H, Koh JY, Koh YH, Koike M, Komatsu M, Kominami E,

Kong HJ, Kong WJ, Korolchuk VI, Kotake Y, Koukourakis MI, Kouri Flores JB, Kovacs AL, Kraft C, Krainc D, Kramer H, Kretz-Remy C, Krichevsky AM, Kroemer G, Kruger R, Krut O, Ktistakis NT, Kuan CY, Kucharczyk R, Kumar A, Kumar R, Kumar S, Kundu M, Kung HJ, Kurz T, Kwon HJ, La Spada AR, Lafont F, Lamark T, Landry J, Lane JD, Lapaquette P, Laporte JF, Laszlo L, Lavandero S, Lavoie JN, Layfield R, Lazo PA, Le W, Le Cam L, Ledbetter DJ, Lee AJ, Lee BW, Lee GM, Lee J, Lee JH, Lee M, Lee MS, Lee SH, Leeuwenburgh C, Legembre P, Legouis R, Lehmann M, Lei HY, Lei QY, Leib DA, Leiro J, Lemasters JJ, Lemoine A, Lesniak MS, Lev D, Levenson VV, Levine B, Levy E, Li F, Li JL, Li L, Li S, Li W, Li XJ, Li YB, Li YP, Liang C, Liang Q, Liao YF, Liberski PP, Lieberman A, Lim HJ, Lim KL, Lim K, Lin CF, Lin FC, Lin J, Lin JD, Lin K, Lin WW, Lin WC, Lin YL, Linden R, Lingor P, Lippincott-Schwartz J, Lisanti MP, Liton PB, Liu B, Liu CF, Liu K, Liu L, Liu QA, Liu W, Liu YC, Liu Y, Lockshin RA, Lok CN, Lonial S, Loos B, Lopez-Berestein G, Lopez-Otin C, Lossi L, Lotze MT, Low P, Lu B, Lu Z, Luciano F, Lukacs NW, Lund AH, Lynch-Day MA, Ma Y, Macian F, MacKeigan JP, Macleod KF, Madeo F, Maiuri L, Maiuri MC, Malagoli D, Malicdan MC, Malorni W, Man N, Mandelkow EM, Manon S, Manov I, Mao K, Mao X, Mao Z, Marambaud P, Marazziti D, Marcel YL, Marchbank K, Marchetti P, Marciniak SJ, Marcondes M, Mardi M, Marfe G, Marino G, Markaki M, Marten MR, Martin SJ, Martinand-Mari C, Martinet W, Martinez-Vicente M, Masini M, Matarrese P, Matsuo S, Matteoni R, Mayer A, Mazure NM, McConkey DJ, McConnell MJ, McDermott C, McDonald C, McInerney GM, McKenna SL, McLaughlin B, McLean PJ, McMaster CR, McQuibban GA, Meijer AJ, Meisler MH, Melendez A, Melia TJ, Melino G, Mena MA, Menendez JA, Menna-Barreto RF, Menon MB, Menzies FM, Mercer CA, Merighi A, Merry DE, Meschini S, Meyer CG, Meyer TF, Miao CY, Miao JY, Michels PA, Michiels C, Mijaljica D, Milojkovic A, Minucci S, Miracco C, Miranti CK, Mitroulis I, Miyazawa K, Mizushima N, Mograbi B, Mohseni S, Molero X, Mollereau B, Mollinedo F, Momoi T, Monastyrska I, Monick MM, Monteiro MJ, Moore MN, Mora R, Moreau K, Moreira PI, Moriyasu Y, Moscat J, Mostowy S, Mottram JC, Motyl T, Moussa CE, Muller S, Munger K, Munz C, Murphy LO, Murphy ME, Musaro A, Mysorekar I, Nagata E, Nagata K, Nahimana A, Nair U, Nakagawa T, Nakahira K, Nakano H, Nakatogawa H, Nanjundan M, Naqvi NI, Narendra DP, Narita M, Navarro M, Nawrocki ST, Nazarko TY, Nemchenko A, Netea MG, Neufeld TP, Ney PA, Nezis IP, Nguyen HP, Nie D, Nishino I, Nislow C, Nixon RA, Noda T, Noegel AA, Nogalska A, Noguchi S, Notterpek L, Novak I, Nozaki T, Nukina N, Nurnberger T, Nyfeler B, Obara K, Oberley TD, Oddo S, Ogawa M, Ohashi T, Okamoto K, Oleinick NL, Oliver FJ, Olsen LJ, Olsson S, Opota O, Osborne TF, Ostrander GK, Otsu K, Ou JH, Ouimet M, Overholtzer M, Ozpolat B, Paganetti P, Pagnini U, Pallet N, Palmer GE, Palumbo C, Pan T, Panaretakis T, Pandey UB, Papackova Z, Papassideri I, Paris I, Park J, Park OK, Parys JB, Parzych KR, Patschan S, Patterson C, Pattingre S, Pawelek JM, Peng J, Perlmutter DH, Perrotta I, Perry G, Pervaiz S, Peter M, Peters GJ, Petersen M, Petrovski G, Phang JM, Piacentini M, Pierre P, Pierrefite-Carle V, Pierron G, Pinkas-Kramarski R, Piras A, Piri N, Plataniias LC, Poggeler S, Poirot M, Poletti A, Pous C, Pozuelo-Rubio M, Praetorius-Ibba M, Prasad A, Prescott M, Priault M, Produit-Zengaffinen N, Progulsk-Fox A, Proikas-Cezanne T, Przedborski S, Przyklenk K, Puertollano R, Puyal J, Qian SB, Qin L, Qin ZH, Quaggin SE, Raben N, Rabinowich H, Rabkin SW, Rahman I, Rami A, Ramm G, Randall G, Randow F, Rao VA, Rathmell JC, Ravikumar B, Ray SK, Reed BH, Reed JC, Reggiori F, Regnier-Vigouroux A, Reichert AS, Reiners JJ, Jr., Reiter RJ, Ren J, Revuelta JL, Rhodes CJ, Ritis K, Rizzo E, Robbins J, Roberge M, Roca H, Roccheri MC, Rocchi S, Rodemann HP, Rodriguez de Cordoba S, Rohrer B, Roninson IB, Rosen K, Rost-

Roszkowska MM, Rouis M, Rouschop KM, Rovetta F, Rubin BP, Rubinsztein DC, Ruckdeschel K, Rucker EB, 3rd, Rudich A, Rudolf E, Ruiz-Opazo N, Russo R, Rusten TE, Ryan KM, Ryter SW, Sabatini DM, Sadoshima J, Saha T, Saitoh T, Sakagami H, Sakai Y, Salekdeh GH, Salomoni P, Salvaterra PM, Salvesen G, Salvioli R, Sanchez AM, Sanchez-Alcazar JA, Sanchez-Prieto R, Sandri M, Sankar U, Sansanwal P, Santambrogio L, Saran S, Sarkar S, Sarwal M, Sasakawa C, Sasnauskiene A, Sass M, Sato K, Sato M, Schapira AH, Scharl M, Schatzl HM, Scheper W, Schiaffino S, Schneider C, Schneider ME, Schneider-Stock R, Schoenlein PV, Schorderet DF, Schuller C, Schwartz GK, Scorrano L, Sealy L, Seglen PO, Segura-Aguilar J, Seiliez I, Seleverstov O, Sell C, Seo JB, Separovic D, Setaluri V, Setoguchi T, Settembre C, Shacka JJ, Shanmugam M, Shapiro IM, Shaulian E, Shaw RJ, Shelhamer JH, Shen HM, Shen WC, Sheng ZH, Shi Y, Shibuya K, Shidoji Y, Shieh JJ, Shih CM, Shimada Y, Shimizu S, Shintani T, Shirihai OS, Shore GC, Sibirny AA, Sidhu SB, Sikorska B, Silva-Zacarin EC, Simmons A, Simon AK, Simon HU, Simone C, Simonsen A, Sinclair DA, Singh R, Sinha D, Sinicrope FA, Sirko A, Siu PM, Sivridis E, Skop V, Skulachev VP, Slack RS, Smaili SS, Smith DR, Soengas MS, Soldati T, Song X, Sood AK, Soong TW, Sotgia F, Spector SA, Spies CD, Springer W, Srinivasula SM, Stefanis L, Steffan JS, Stendel R, Stenmark H, Stephanou A, Stern ST, Sternberg C, Stork B, Stralfors P, Subauste CS, Sui X, Sulzer D, Sun J, Sun SY, Sun ZJ, Sung JJ, Suzuki K, Suzuki T, Swanson MS, Swanton C, Sweeney ST, Sy LK, Szabadkai G, Tabas I, Taegtmeyer H, Tafani M, Takacs-Vellai K, Takano Y, Takegawa K, Takemura G, Takeshita F, Talbot NJ, Tan KS, Tanaka K, Tang D, Tanida I, Tannous BA, Tavernarakis N, Taylor GS, Taylor GA, Taylor JP, Terada LS, Terman A, Tettamanti G, Thevissen K, Thompson CB, Thorburn A, Thumm M, Tian F, Tian Y, Tocchini-Valentini G, Tolkovsky AM, Tomino Y, Tonges L, Tooze SA, Tournier C, Tower J, Towns R, Trajkovic V, Travassos LH, Tsai TF, Tschan MP, Tsubata T, Tsung A, Turk B, Turner LS, Tyagi SC, Uchiyama Y, Ueno T, Umekawa M, Umemiya-Shirafuji R, Unni VK, Vaccaro MI, Valente EM, Van den Berghe G, van der Klei IJ, van Doorn W, van Dyk LF, van Egmond M, van Grunsven LA, Vandenabeele P, Vandenbergh WP, Vanhorebeek I, Vaquero EC, Velasco G, Vellai T, Vicencio JM, Vierstra RD, Vila M, Vindis C, Viola G, Viscomi MT, Voitsekhovskaja OV, von Haefen C, Votruba M, Wada K, Wade-Martins R, Walker CL, Walsh CM, Walter J, Wan XB, Wang A, Wang C, Wang D, Wang F, Wang G, Wang H, Wang HG, Wang HD, Wang J, Wang K, Wang M, Wang RC, Wang X, Wang YJ, Wang Y, Wang Z, Wang ZC, Wansink DG, Ward DM, Watada H, Waters SL, Webster P, Wei L, Wehl CC, Weiss WA, Welford SM, Wen LP, Whitehouse CA, Whitton JL, Whitworth AJ, Wileman T, Wiley JW, Wilkinson S, Willbold D, Williams RL, Williamson PR, Wouters BG, Wu C, Wu DC, Wu WK, Wytenbach A, Xavier RJ, Xi Z, Xia P, Xiao G, Xie Z, Xu DZ, Xu J, Xu L, Xu X, Yamamoto A, Yamashina S, Yamashita M, Yan X, Yanagida M, Yang DS, Yang E, Yang JM, Yang SY, Yang W, Yang WY, Yang Z, Yao MC, Yao TP, Yeganeh B, Yen WL, Yin JJ, Yin XM, Yoo OJ, Yoon G, Yoon SY, Yorimitsu T, Yoshikawa Y, Yoshimori T, Yoshimoto K, You HJ, Youle RJ, Younes A, Yu L, Yu SW, Yu WH, Yuan ZM, Yue Z, Yun CH, Yuzaki M, Zabirnyk O, Silva-Zacarin E, Zacks D, Zacksenhaus E, Zaffaroni N, Zakeri Z, Zeh HJ, 3rd, Zeitlin SO, Zhang H, Zhang HL, Zhang J, Zhang JP, Zhang L, Zhang MY, Zhang XD, Zhao M, Zhao YF, Zhao Y, Zhao ZJ, Zheng X, Zhivotovsky B, Zhong Q, Zhou CZ, Zhu C, Zhu WG, Zhu XF, Zhu X, Zhu Y, Zoladek T, Zong WX, Zorzano A, Zschocke J, Zuckerbraun B (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445-544

Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880-884

Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K, Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol* **169**: 425-434

Kon M, Kiffin R, Koga H, Chapochnik J, Macian F, Varticovski L, Cuervo AM (2011) Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Sci Transl Med* **3**: 109ra117

Koso H, Ouchi Y, Tabata Y, Aoki Y, Satoh S, Arai K, Watanabe S (2006) SSEA-1 marks regionally restricted immature subpopulations of embryonic retinal progenitor cells that are regulated by the Wnt signaling pathway. *Dev Biol* **292**: 265-276

Koso H, Satoh S, Watanabe S (2007) c-kit marks late retinal progenitor cells and regulates their differentiation in developing mouse retina. *Dev Biol* **301**: 141-154

Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, Cross JR, Jung E, Thompson CB, Jones RG, Pearce EJ (2010) Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood* **115**: 4742-4749

Kroemer G (2015) Autophagy: a druggable process that is deregulated in aging and human disease. *J Clin Invest* **125**: 1-4

Kroemer G, Marino G, Levine B (2010) Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* **40**: 280-293

Ktistakis NT, Tooze SA (2016) Digesting the Expanding Mechanisms of Autophagy. *Trends Cell Biol*

Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T, Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**: 1032-1036

Kundu M, Lindsten T, Yang CY, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA, Thompson CB (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **112**: 1493-1502

Kurihara Y, (2012) Mitophagy play san essential role in reducing mitochondrial production of ROS and mutation of mitocooondrial DNA by maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J biol chem*

KUWABARA T (1961) Retinal glycogen. *Arch Ophthalmol*

Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**: 759-774

- Land SC, Tee AR (2007) Hypoxia-inducible factor 1alpha is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem* **282**: 20534-20543
- Lazarou M, Jin SM, Kane LA, Youle RJ (2012) Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Dev Cell* **22**: 320-333
- Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI, Youle RJ (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* **524**: 309-314
- Lehman JJ, Barger PM, Kovacs A, Saffitz JE, Medeiros DM, Kelly DP (2000) Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 promotes cardiac mitochondrial biogenesis. *J Clin Invest* **106**: 847-856
- Lemasters JJ (2005) Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* **8**: 3-5
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**: 323-335
- Levine B, Yuan J (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**: 2679-2688
- Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang CY, Swanson J, You M, Guan KL (2007) Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J Biol Chem* **282**: 35803-35813
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* **119**: 873-887
- Lin J (2005) Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab*
- Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, Ma Q, Zhu C, Wang R, Qi W, Huang L, Xue P, Li B, Wang X, Jin H, Wang J, Yang F, Liu P, Zhu Y, Sui S, Chen Q (2012) Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **14**: 177-185
- Liu W, Lagutin O, Swindell E, Jamrich M, Oliver G (2010) Neuroretina specification in mouse embryos requires Six3-mediated suppression of Wnt8b in the anterior neural plate. *J Clin Invest* **120**: 3568-3577
- Livesey FJ, Cepko CL (2001) Vertebrate neural cell-fate determination: lessons from the retina. *Nat Rev Neurosci* **2**: 109-118

- Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM, Debnath J (2011) Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol Biol Cell* **22**: 165-178
- Lokireddy S, Wijesoma IW, Teng S, Bonala S, Gluckman PD, McFarlane C, Sharma M, Kambadur R (2012) The ubiquitin ligase Mul1 induces mitophagy in skeletal muscle in response to muscle-wasting stimuli. *Cell Metab* **16**: 613-624
- Lu H, Li G, Liu L, Feng L, Wang X, Jin H (2013) Regulation and function of mitophagy in development and cancer. *Autophagy* **9**: 1720-1736
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T, Thompson CB (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **120**: 237-248
- Lv L, Li D, Zhao D, Lin R, Chu Y, Zhang H, Zha Z, Liu Y, Li Z, Xu Y, Wang G, Huang Y, Xiong Y, Guan KL, Lei QY (2011) Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol Cell* **42**: 719-730
- Ma T, Li J, Xu Y, Yu C, Xu T, Wang H, Liu K, Cao N, Nie BM, Zhu SY, Xu S, Li K, Wei WG, Wu Y, Guan KL, Ding S (2015) Atg5-independent autophagy regulates mitochondrial clearance and is essential for iPSC reprogramming. *Nat Cell Biol* **17**: 1379-1387
- Ma X, Godar RJ, Liu H, Diwan A (2012) Enhancing lysosome biogenesis attenuates BNIP3-induced cardiomyocyte death. *Autophagy* **8**: 297-309
- Mammucari C, Milan G, Romanello V, Masiero E, Rudolf R, Del Piccolo P, Burden SJ, Di Lisi R, Sandri C, Zhao J, Goldberg AL, Schiaffino S, Sandri M (2007) FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo. *Cell Metab* **6**: 458-471
- Mao K, Wang K, Zhao M, Xu T, Klionsky DJ (2011) Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **193**: 755-767
- Marino G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G (2014) Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**: 81-94
- Marquardt T (2001) Pax6 is required for the multipotent state of retinal progenitor cells. *Cell* **105** (1): 43-55
- Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D, Cuervo AM (2010) Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci* **13**: 567-576
- Martinez J, Malireddi RK, Lu Q, Cunha LD, Pelletier S, Gingras S, Orchard R, Guan JL, Tan H, Peng J, Kanneganti TD, Virgin HW, Green DR (2015) Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol* **17**: 893-906

Matic I, Cocco S, Ferraina C, Martin-Jimenez R, Florenzano F, Crosby J, Lupi R, Amadoro G, Russell C, Pignataro G, Annunziato L, Abramov AY, Campanella M (2016) Neuroprotective coordination of cell mitophagy by the ATPase Inhibitory Factor 1. *Pharmacol Res* **103**: 56-68

Matsui M, Yamamoto A, Kuma A, Ohsumi Y, Mizushima N (2006) Organelle degradation during the lens and erythroid differentiation is independent of autophagy. *Biochem Biophys Res Commun* **339**: 485-489

Matsuyama S, Xu Q, Velours J, Reed JC (1998) The Mitochondrial F₀F₁-ATPase proton pump is required for function of the proapoptotic protein Bax in yeast and mammalian cells. *Mol Cell* **1**: 327-336

Mauro-Lizcano M, Esteban-Martinez L, Seco E, Serrano-Puebla A, Garcia-Ledo L, Figueiredo-Pereira C, Vieira HL, Boya P (2015) New method to assess mitophagy flux by flow cytometry. *Autophagy* **11**: 833-843

Mazure NM, Pouyssegur J (2010) Hypoxia-induced autophagy: cell death or cell survival? *Curr Opin Cell Biol* **22**: 177-180

McNeill H, Craig GM, Bateman JM (2008) Regulation of neurogenesis and epidermal growth factor receptor signaling by the insulin receptor/target of rapamycin pathway in *Drosophila*. *Genetics* **179**: 843-853

Melser S, Chatelain EH, Lavie J, Mahfouf W, Jose C, Obre E, Goorden S, Priault M, Elgersma Y, Rezvani HR, Rossignol R, Benard G (2013) Rheb regulates mitophagy induced by mitochondrial energetic status. *Cell Metab* **17**: 719-730

Mellén MA, de la Rosa EJ, Boya P (2008) The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium. *Cell Death Differ* **15**: 1279-1290

Mellén MA, de la Rosa EJ, Boya P (2009) Autophagy is not universally required for phosphatidyl-serine exposure and apoptotic cell engulfment during neural development. *Autophagy* **5**: 964-972

Mercalli A, Calavita I, Dugnani E, Citro A, Cantarelli E, Nano R, Melzi R, Maffi P, Secchi A, Sordi V, Piemonti L (2013) Rapamycin unbalances the polarization of human macrophages to M1. *Immunology* **140**: 179-190

Michael S (2012) Crosstalk between mitochondrial dysfunction and mitochondrial abundance. *J Cell Physiol*

Michiorri S, Gelmetti V, Giarda E, Lombardi F, Romano F, Marongiu R, Nerini-Molteni S, Sale P, Vago R, Arena G, Torosantucci L, Cassina L, Russo MA, Dallapiccola B, Valente EM, Casari G (2010) The Parkinson-associated protein PINK1 interacts with Beclin1 and promotes autophagy. *Cell Death Differ* **17**: 962-974

Mihaylova MM, Shaw RJ (2011) The AMPK signalling pathway coordinates cell growth, autophagy and metabolism. *Nat Cell Biol* **13**: 1016-1023

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* **16**: 1215

Misko AL, Sasaki Y, Tuck E, Milbrandt J, Baloh RH (2012) Mitofusin2 mutations disrupt axonal mitochondrial positioning and promote axon degeneration. *J Neurosci* **32**: 4145-4155

Mitchell P, Moyle J (1967) Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* **213**: 137-139

Mizumura K, Cloonan SM, Nakahira K, Bhashyam AR, Cervo M, Kitada T, Glass K, Owen CA, Mahmood A, Washko GR, Hashimoto S, Ryter SW, Choi AM (2014) Mitophagy-dependent necroptosis contributes to the pathogenesis of COPD. *J Clin Invest* **124**: 3987-4003

Mizushima N, Klionsky DJ (2007) Protein turnover via autophagy: implications for metabolism. *Annu Rev Nutr* **27**: 19-40

Mizushima N, Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* **12**: 823-830

Mizushima N, Levine B, Cuervo AM, Klionsky DJ (2008) Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **451**: 1069-1075

Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y (2004) In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol Biol Cell* **15**: 1101-1111

MJ G (2013) Rheb and mammalian target of rapamycin in mitochondrial homeostasis. *Open Biology*

Morcillo J, Martinez-Morales JR, Trousse F, Fermin Y, Sowden JC, Bovolenta P (2006) Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development* **133**: 3179-3190

Moreno-Manzano V, Rodriguez-Jimenez FJ, Acena-Bonilla JL, Fustero-Lardies S, Erceg S, Dopazo J, Montaner D, Stojkovic M, Sanchez-Puelles JM (2010) FM19G11, a new hypoxia-inducible factor (HIF) modulator, affects stem cell differentiation status. *J Biol Chem* **285**: 1333-1342

Morris RL, Hollenbeck PJ (1993) The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci* **104 (Pt 3)**: 917-927

Mortimore GE, Lardeux BR, Adams CE (1988) Regulation of microautophagy and basal protein turnover in rat liver. Effects of short-term starvation. *J Biol Chem* **263**: 2506-2512

- Mu X, Fu X, Beremand PD, Thomas TL, Klein WH (2008) Gene regulation logic in retinal ganglion cell development: *Isl1* defines a critical branch distinct from but overlapping with *Pou4f2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 6942-6947
- Mu X, Fu X, Sun H, Beremand PD, Thomas TL, Klein WH (2005) A gene network downstream of transcription factor *Math5* regulates retinal progenitor cell competence and ganglion cell fate. *Dev Biol* **280**: 467-481
- Narendra D, Tanaka A, Suen DF, Youle RJ (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**: 795-803
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen DF, Gautier CA, Shen J, Cookson MR, Youle RJ (2010) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* **8**: e1000298
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S (2003) Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**: 481-490
- Ney PA (2015) Mitochondrial autophagy: Origins, significance, and role of BNIP3 and NIX. *Biochim Biophys Acta*
- Ng SK, Casson RJ, Burdon KP, Craig JE (2014) Chromosome 9p21 primary open-angle glaucoma susceptibility locus: a review. *Clin Experiment Ophthalmol* **42**: 25-32
- Ng SK, Wood JP, Chidlow G, Han G, Kittipassorn T, Peet DJ, Casson RJ (2015) Cancer-like metabolism of the mammalian retina. *Clin Experiment Ophthalmol* **43**: 367-376
- Nickells RW (2012) The cell and molecular biology of glaucoma: mechanisms of retinal ganglion cell death. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **53**: 2476-2481
- Nickells RW, Howell GR, Soto I, John SW (2012) Under pressure: cellular and molecular responses during glaucoma, a common neurodegeneration with axonopathy. *Annu Rev Neurosci* **35**: 153-179
- Nihira M, Anderson K, Gorin FA, Burns MS (1995) Primate rod and cone photoreceptors may differ in glucose accessibility. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **36**: 1259-1270
- Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S (2009) Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* **461**: 654-658
- Noda NN, Inagaki F (2015) Mechanisms of Autophagy. *Annu Rev Biophys* **44**: 101-122
- Noda T, Ohsumi Y (1998) Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J Biol Chem* **273**: 3963-3966
- Noell W (1959) The visual cell: electric and metabolic manifestations of its life processes. *Am J Ophthalmol*

Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Lohr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dotsch V, Ney PA, Dikic I (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* **11**: 45-51

Nowikovsky K, Reipert S, Devenish RJ, Schweyen RJ (2007) Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ* **14**: 1647-1656

O'Neill LA, Hardie DG (2013) Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature* **493**: 346-355

O'Sullivan TE (2015) BNIP3- and BNIP3L-Mediated Mitophagy Promotes the Generation of Natural Killer Cell Memory. *Immunity* **43**: 331-342

Okawa H, Sampath AP, Laughlin SB, Fain GL (2008) ATP consumption by mammalian rod photoreceptors in darkness and in light. *Curr Biol* **18**: 1917-1921

Orenstein SJ, Cuervo AM (2010) Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 719-726

Orenstein SJ, Kuo SH, Tasset I, Arias E, Koga H, Fernandez-Carasa I, Cortes E, Honig LS, Dauer W, Consiglio A, Raya A, Sulzer D, Cuervo AM (2013) Interplay of LRRK2 with chaperone-mediated autophagy. *Nat Neurosci* **16**: 394-406

Orvedahl A, Sumpter R, Jr., Xiao G, Ng A, Zou Z, Tang Y, Narimatsu M, Gilpin C, Sun Q, Roth M, Forst CV, Wrana JL, Zhang YE, Luby-Phelps K, Xavier RJ, Xie Y, Levine B (2011) Image-based genome-wide siRNA screen identifies selective autophagy factors. *Nature* **480**: 113-117

Ozeki H, Ogura Y, Hirabayashi Y, Shimada S (2000) Apoptosis is associated with formation and persistence of the embryonic fissure. *Curr Eye Res* **20**: 367-372

Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N (2015) Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature* **521**: 525-528

Palsson-McDermott E (2013) The Warburg effect then and now: from cancer to inflammatory diseases. *Bioessays*

Park CW, Hong SM, Kim ES, Kwon JH, Kim KT, Nam HG, Choi KY (2013) BNIP3 is degraded by ULK1-dependent autophagy via MTORC1 and AMPK. *Autophagy* **9**: 345-360

Parker GC, Acsadi G, Brenner CA (2009) Mitochondria: determinants of stem cell fate? *Stem Cells Dev* **18**: 803-806

Parone PA, Da Cruz S, Tondera D, Mattenberger Y, James DI, Maechler P, Barja F, Martinou JC (2008) Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PloS one* **3**: e3257

- Pecci A, Travaglino E, Klersy C, Invernizzi R (2003) Apoptosis in relation to CD34 antigen expression in normal and myelodysplastic bone marrow. *Acta Haematol* **109**: 29-34
- Penfold PL, Provis JM (1986) Cell death in the development of the human retina: phagocytosis of pyknotic and apoptotic bodies by retinal cells. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* **224**: 549-553
- Pequignot MO, Provost AC, Salle S, Taupin P, Sainton KM, Marchant D, Martinou JC, Ameisen JC, Jais JP, Abitbol M (2003) Major role of BAX in apoptosis during retinal development and in establishment of a functional postnatal retina. *Dev Dyn* **228**: 231-238
- Perkins GA, Ellisman MH (2011) Mitochondrial configurations in peripheral nerve suggest differential ATP production. *J Struct Biol* **173**: 117-127
- Perkins GA, Ellisman MH, Fox DA (2004) The structure-function correlates of mammalian rod and cone photoreceptor mitochondria: observations and unanswered questions. *Mitochondrion* **4**: 695-703
- Perkins GA, Tjong J, Brown JM, Poquiz PH, Scott RT, Kolson DR, Ellisman MH, Spiro GA (2010) The micro-architecture of mitochondria at active zones: electron tomography reveals novel anchoring scaffolds and cristae structured for high-rate metabolism. *J Neurosci* **30**: 1015-1026
- Pickrell AM, Youle RJ (2015) The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron* **85**: 257-273
- Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, Kroemer G (2013) Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors. *Semin Cancer Biol* **23**: 310-322
- Powis G, Bonjouklian R, Berggren MM, Gallegos A, Abraham R, Ashendel C, Zalkow L, Matter WF, Dodge J, Grindey G, et al. (1994) Wortmannin, a potent and selective inhibitor of phosphatidylinositol-3-kinase. *Cancer Res* **54**: 2419-2423
- Priault M, Salin B, Schaeffer J, Vallette FM, di Rago JP, Martinou JC (2005) Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ* **12**: 1613-1621
- Prigione A, Adjaye J (2010) Modulation of mitochondrial biogenesis and bioenergetic metabolism upon in vitro and in vivo differentiation of human ES and iPS cells. *Int J Dev Biol* **54**: 1729-1741
- Qian W (2010) Alterations in bioenergetics due to changes in mitochondrial DNA copy number. *Methods* **51**: 452-457
- Qu X, Zou Z, Sun Q, Luby-Phelps K, Cheng P, Hogan RN, Gilpin C, Levine B (2007) Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell* **128**: 931-946

Roque RS, Imperial CJ, Caldwell RB (1996) Microglial cells invade the outer retina as photoreceptors degenerate in Royal College of Surgeons rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **37**: 196-203

Rouslin W, Broge CW (1993) Mechanisms of ATP conservation during ischemia in slow and fast heart rate hearts. *Am J Physiol* **264**: C209-216

Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM, Santambrogio L (2011) Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* **20**: 405-406

Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M, Wang J (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **454**: 232-235

Santamaria G, Martinez-Diez M, Fabregat I, Cuezva JM (2006) Efficient execution of cell death in non-glycolytic cells requires the generation of ROS controlled by the activity of mitochondrial H⁺-ATP synthase. *Carcinogenesis* **27**: 925-935

Santos AM, Calvente R, Tassi M, Carrasco MC, Martin-Oliva D, Marin-Teva JL, Navascues J, Cuadros MA (2008) Embryonic and postnatal development of microglial cells in the mouse retina. *J Comp Neurol* **506**: 224-239

Santos RX, Correia SC, Wang X, Perry G, Smith MA, Moreira PI, Zhu X (2010) A synergistic dysfunction of mitochondrial fission/fusion dynamics and mitophagy in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* **20 Suppl 2**: S401-412

Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**: 473-477

Scardigli R, Baumer N, Gruss P, Guillemot F, Le Roux I (2003) Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene Neurogenin2 by Pax6. *Development* **130**: 3269-3281

Scarpulla RC, Vega RB, Kelly DP (2012) Transcriptional integration of mitochondrial biogenesis. *Trends Endocrinol Metab* **23**: 459-466

Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Radi M, Botta M (2011) ATP-competitive inhibitors of mTOR: an update. *Curr Med Chem* **18**: 2995-3014

Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *Embo J* **26**: 1749-1760

Schneider JL, Cuervo AM (2013) Chaperone-mediated autophagy: dedicated saviour and unfortunate victim in the neurodegeneration arena. *Biochem Soc Trans* **41**: 1483-1488

- Schneider JL, Suh Y, Cuervo AM (2014) Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation. *Cell Metab* **20**: 417-432
- Schoenwolf GC (2009) Larsen's Human Embryology. 4th Edition.: 687
- Schon EA, Przedborski S (2011) Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* **70**: 1033-1053
- Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, Kundu M, Opferman JT, Cleveland JL, Miller JL, Ney PA (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**: 19500-19505
- Semenza GL (2007) Life with oxygen. *Science* **318**: 62-64
- Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Selvam SP, Ramshesh VK, Peterson YK, Lemasters JJ, Szulc ZM, Bielawski J, Ogretmen B (2012) Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol* **8**: 831-838
- Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**: 1429-1433
- Shchepina LA, Pletjushkina OY, Avetisyan AV, Bakeeva LE, Fetisova EK, Izyumov DS, Saprunova VB, Vyssokikh MY, Chernyak BV, Skulachev VP (2002) Oligomycin, inhibitor of the F₀ part of H⁺-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis. *Oncogene* **21**: 8149-8157
- Shires SE, Gustafsson AB (2015) Mitophagy and heart failure. *J Mol Med (Berl)* **93**: 253-262
- Shvets E, Fass E, Elazar Z (2008) Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy* **4**
- Simsek T, Kocabas F, Zheng J, Deberardinis RJ, Mahmoud AI, Olson EN, Schneider JW, Zhang CC, Sadek HA (2010) The distinct metabolic profile of hematopoietic stem cells reflects their location in a hypoxic niche. *Cell Stem Cell* **7**: 380-390
- Singh R, Cuervo AM (2011) Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* **13**: 495-504
- Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, Tang Y, Pessin JE, Schwartz GJ, Czaja MJ (2009) Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J Clin Invest* **119**: 3329-3339
- Solaini G, Baracca A, Lenaz G, Sgarbi G (2010) Hypoxia and mitochondrial oxidative metabolism. *Biochim Biophys Acta* **1797**: 1171-1177

Song ZC, Zhou W, Shu R, Ni J (2012) Hypoxia induces apoptosis and autophagic cell death in human periodontal ligament cells through HIF-1alpha pathway. *Cell Prolif* **45**: 239-248

Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL (2001) HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer Res* **61**: 6669-6673

Stephenson LM, Miller BC, Ng A, Eisenberg J, Zhao Z, Cadwell K, Graham DB, Mizushima NN, Xavier R, Virgin HW, Swat W (2009) Identification of Atg5-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in Atg5-deficient T lymphocytes. *Autophagy* **5**: 625-635

Stowers RS, Megeath LJ, Gorska-Andrzejak J, Meinertzhagen IA, Schwarz TL (2002) Axonal transport of mitochondria to synapses depends on mltin, a novel Drosophila protein. *Neuron* **36**: 1063-1077

Suen DF, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* **22**: 1577-1590

Susmita Kaushik UB, Sunandini Sridhar, Roberta Kiffin, Marta Martinez-Vicente, Maria Kon, Samantha J. Orenstein, Esther Wong, Ana Maria Cuervo (2011) Chaperone-mediated autophagy at a glance. *Journal of Cell Science*

Syed F, Odley A, Hahn HS, Brunskill EW, Lynch RA, Marreez Y, Sanbe A, Robbins J, Dorn GW, 2nd (2004) Physiological growth synergizes with pathological genes in experimental cardiomyopathy. *Circ Res* **95**: 1200-1206

Tasset I, Cuervo AM (2016) Role of chaperone-mediated autophagy in metabolism. *Febs J*

Testa U, Fossati C, Samoggia P, Masciulli R, Mariani G, Hassan HJ, Sposi NM, Guerriero R, Rosato V, Gabbianelli M, Pelosi E, Valtieri M, Peschle C (1996) Expression of growth factor receptors in unilineage differentiation culture of purified hematopoietic progenitors. *Blood* **88**: 3391-3406

Tooze SA, Yoshimori T (2010) The origin of the autophagosomal membrane. *Nat Cell Biol* **12**: 831-835

Tornquist P, Alm A (1979) Retinal and choroidal contribution to retinal metabolism in vivo. A study in pigs. *Acta Physiol Scand* **106**: 351-357

Turner DL, Cepko CL (1987) A common progenitor for neurons and glia persists in rat retina late in development. *Nature* **328**: 131-136

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J* **27**: 433-446

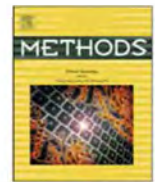
- Valenciano AI, Boya P, de la Rosa EJ (2008) Early neural cell death: numbers and cues from the developing neuroretina. *Int J Dev Biol*
- Van Humbeeck C, Cornelissen T, Hofkens H, Mandemakers W, Gevaert K, De Strooper B, Vandenberghe W (2011) Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy. *J Neurosci* **31**: 10249-10261
- Van Laar VS, Berman SB (2013) The interplay of neuronal mitochondrial dynamics and bioenergetics: implications for Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* **51**: 43-55
- van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedmann M (1998) A function for lipoxigenase in programmed organelle degradation. *Nature* **395**: 392-395
- Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB (2009) Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* **324**: 1029-1033
- Varum S, Rodrigues AS, Moura MB, Momcilovic O, Easley CA, Ramalho-Santos J, Van Houten B, Schatten G (2011) Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts. *PloS one* **6**: e20914
- Vazquez P, Arroba AI, Cecconi F, de la Rosa EJ, Boya P, De Pablo F (2012) Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells. *Autophagy* **8**: 187-199
- Venegas V, Zhou Z (2007) Two alternative mechanisms that regulate the presentation of apoptotic cell engulfment signal in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* **18**: 3180-3192
- Verhoven B, Krahling S, Schlegel RA, Williamson P (1999) Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell Death Differ* **6**: 262-270
- Verstreken P, Ly CV, Venken KJ, Koh TW, Zhou Y, Bellen HJ (2005) Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* **47**: 365-378
- Viale A, Pettazzoni P, Lyssiotis CA, Ying H, Sanchez N, Marchesini M, Carugo A, Green T, Seth S, Giuliani V, Kost-Alimova M, Muller F, Colla S, Nezi L, Genovese G, Deem AK, Kapoor A, Yao W, Brunetto E, Kang Y, Yuan M, Asara JM, Wang YA, Heffernan TP, Kimmelman AC, Wang H, Fleming JB, Cantley LC, DePinho RA, Draetta GF (2014) Oncogene ablation-resistant pancreatic cancer cells depend on mitochondrial function. *Nature* **514**: 628-632
- Vivas AP, Bomfim LE, Pinto CA, Nicolau UR, Alves FA (2014) Oral metastasis of metaplastic breast carcinoma in a patient with neurofibromatosis 1. *Case Rep Oncol Med* **2014**: 719061
- Vives-Bauza C, Zhou C, Huang Y, Cui M, de Vries RL, Kim J, May J, Tocilescu MA, Liu W, Ko HS, Magrane J, Moore DJ, Dawson VL, Grailhe R, Dawson TM, Li C, Tieu

- K, Przedborski S (2010) PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 378-383
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* **269**: 5241-5248
- Wang SW, Kim BS, Ding K, Wang H, Sun D, Johnson RL, Klein WH, Gan L (2001) Requirement for math5 in the development of retinal ganglion cells. *Genes Dev* **15**: 24-29
- Wang Y, Nartiss Y, Steipe B, McQuibban GA, Kim PK (2012) ROS-induced mitochondrial depolarization initiates PARK2/PARKIN-dependent mitochondrial degradation by autophagy. *Autophagy* **8**: 1462-1476
- Wang YC, Lee CM, Lee LC, Tung LC, Hsieh-Li HM, Lee-Chen GJ, Su MT (2011) Mitochondrial dysfunction and oxidative stress contribute to the pathogenesis of spinocerebellar ataxia type 12 (SCA12). *J Biol Chem* **286**: 21742-21754
- Warburg O (1931) The metabolism of tumours. *British Journal of Surgery* **19**
- Warburg O (1956) On the origin of cancer cells. *Science* **123**: 309-314
- Webster KA, Graham RM, Bishopric NH (2005) BNip3 and signal-specific programmed death in the heart. *J Mol Cell Cardiol* **38**: 35-45
- Weinberg SE, Chandel NS (2015) Targeting mitochondria metabolism for cancer therapy. *Nat Chem Biol* **11**: 9-15
- Wieman HL, Wofford JA, Rathmell JC (2007) Cytokine stimulation promotes glucose uptake via phosphatidylinositol-3 kinase/Akt regulation of Glut1 activity and trafficking. *Mol Biol Cell* **18**: 1437-1446
- Winkler BS (1981) Glycolytic and oxidative metabolism in relation to retinal function. *J Gen Physiol* **77**: 667-692
- Winkler BS (1995) A quantitative assessment of glucose metabolism in the isolated rat retina. *Les Seminaires ophthalmologiques DIPSEN: Vision et Adaptation Elsevier*
- Winkler BS, Arnold MJ, Brassell MA, Puro DG (2000) Energy metabolism in human retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **41**: 3183-3190
- Wong PM, Puente C, Ganley IG, Jiang X (2013) The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* **9**: 124-137
- Wu F, Kaczynski TJ, Sethuramanujam S, Li R, Jain V, Slaughter M, Mu X (2015) Two transcription factors, Pou4f2 and Isl1, are sufficient to specify the retinal ganglion cell fate. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E1559-1568

- Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM (2010) Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* **285**: 10850-10861
- Yamamoto A, Cremona ML, Rothman JE (2006) Autophagy-mediated clearance of huntingtin aggregates triggered by the insulin-signaling pathway. *J Cell Biol* **172**: 719-731
- Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, Schmidt SD, Wesson DW, Bandyopadhyay U, Jiang Y, Pawlik M, Peterhoff CM, Yang AJ, Wilson DA, St George-Hyslop P, Westaway D, Mathews PM, Levy E, Cuervo AM, Nixon RA (2011) Therapeutic effects of remediating autophagy failure in a mouse model of Alzheimer disease by enhancing lysosomal proteolysis. *Autophagy* **7**: 788-789
- Yang L, Tan P, Zhou W, Zhu X, Cui Y, Zhu L, Feng X, Qi H, Zheng J, Gu P, Fan X, Chen H (2012) N-acetylcysteine protects against hypoxia mimetic-induced autophagy by targeting the HIF-1alpha pathway in retinal ganglion cells. *Cell Mol Neurobiol* **32**: 1275-1285
- Yang Z, Klionsky DJ (2010a) Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* **12**: 814-822
- Yang Z, Klionsky DJ (2010b) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* **22**: 124-131
- Yeo W, Gautier J (2004) Early neural cell death: dying to become neurons. *DevBiol* **274**: 233-244
- Youle RJ, Narendra DP (2011) Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**: 9-14
- Youle RJ, van der Bliek AM (2012) Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**: 1062-1065
- Young RW (1971) The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *J Cell Biol* **49**: 303-318
- Young RW (1985) Cell differentiation in the retina of the mouse. *Anat Rec* **212**: 199-205
- Yussman MG, Toyokawa T, Odley A, Lynch RA, Wu G, Colbert MC, Aronow BJ, Lorenz JN, Dorn GW, 2nd (2002) Mitochondrial death protein Nix is induced in cardiac hypertrophy and triggers apoptotic cardiomyopathy. *Nat Med* **8**: 725-730
- Zagozewski JL, Zhang Q, Eisenstat DD (2014) Genetic regulation of vertebrate eye development. *Clin Genet* **86**: 453-460
- Zhang H (2008) Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *Journal of Biological Chemistry* **283**

- Zhang J, Ney PA (2009) Role of BNIP3 and NIX in cell death, autophagy, and mitophagy. *Cell Death Differ* **16**: 939-946
- Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M, Jin S (2009) Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 19860-19865
- Zhao Y, Chen G, Zhang W, Xu N, Zhu JY, Jia J, Sun ZJ, Wang YN, Zhao YF (2012) Autophagy regulates hypoxia-induced osteoclastogenesis through the HIF-1alpha/BNIP3 signaling pathway. *J Cell Physiol* **227**: 639-648
- Zhong Z, Umemura A, Sanchez-Lopez E, Liang S, Shalpour S, Wong J, He F, Boassa D, Perkins G, Ali SR, McGeough MD, Ellisman MH, Seki E, Gustafsson AB, Hoffman HM, Diaz-Meco MT, Moscat J, Karin M (2016) NF-kappaB Restricts Inflammasome Activation via Elimination of Damaged Mitochondria. *Cell* **164**: 896-910
- Zhou Z, Vinberg F, Schottler F, Doggett TA, Kefalov VJ, Ferguson TA (2015) Autophagy supports color vision. *Autophagy* **11**: 1821-1832
- Zoncu R, Bar-Peled L, Efeyan A, Wang S, Sancak Y, Sabatini DM (2011) mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science* **334**: 678-683
- Zoratti M, Szabo I (1995) The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* **1241**: 139-176
- Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ (2006) Mitochondrial ROS-induced ROS release: an update and review. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 509-517

ANEXOS



Autophagic flux determination *in vivo* and *ex vivo*



Lorena Esteban-Martínez, Patricia Boya*

Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 October 2014

Received in revised form 19 January 2015

Accepted 19 January 2015

Available online 30 January 2015

Keywords:

Autophagic flux

Retina

Cerebellum

Liver

GFP-LC3 mice

In vivo autophagy determination

Ex vivo autophagy determination

ABSTRACT

Autophagy is a highly dynamic process that mediates the degradation of cellular constituents inside lysosomes. It is characterized by the formation of autophagosomes, double membrane organelles that engulf cytosolic components and organelles and degrade their contents upon fusion with lysosomes. Upregulation of autophagy in response to specific stimuli can be determined by evaluating autophagic flux. This is achieved by comparing the number of autophagosomes in the absence and presence of lysosomal inhibitors. While the determination of autophagic flux in isolated cells is well-documented, few studies have described its determination in tissues or *in vivo*. Here, we describe the evaluation of autophagic flux both *in vivo* and *ex vivo* in several tissues, after treatment with lysosomal inhibitors and exposure to classical autophagy-inducing stimuli. This method uses LC3 lipidation, as determined by Western blot, fluorescence microscopy and flow cytometry. Our findings demonstrate that autophagic flux can be evaluated *in vivo* and *ex vivo* in several tissues.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Autophagy is an intracellular recycling pathway that mediates the degradation of intracellular constituents inside lysosomes. This process constitutes an intracellular quality control mechanism as well as a response to a wide range of stimuli that endanger the cell [1]. Autophagy begins with the formation of an autophagosome, a double-membrane structure that engulfs entire organelles and parts of the cytosol, and subsequently fuses with a lysosome to trigger the degradation of the enclosed material. The degradation products, which include amino acids, lipids, and nucleotides, are released into the cytoplasm by permeases present in the lysosomal membrane and are then used for anabolic reactions to sustain cellular functions [1]. Autophagy is regulated by the Atg family

of proteins, which participate in all stages of the autophagy process; induction, autophagosome formation, lysosomal fusion and autophagolysosome formation, and finally, degradation [2].

A major hallmark of autophagy is the formation of autophagosomes, and this can be directly determined by visualization of the autophagosomal binding protein MAP-LC3 (microtubule associated protein LC3) [3]. During autophagosome formation LC3, the mammalian ortholog of Atg8, is lipidated by covalent attachment of phosphatidyl ethanolamine, a process mediated by the protein Atg7. This lipidation process can be detected by Western blot; the conjugated form of LC3 (LC3-II) progresses through the gel more rapidly than the non-conjugated form, and is visualized as a lower molecular-weight band [4], thus allowing determination of the free and autophagosome-bound forms of LC3. The association of LC3 with autophagosomes can also be determined as an increase in LC3 puncta as visualized using specific antibodies or by measuring fluorescence in cells transduced with GFP-LC3 expression vectors [3]. In tissues autophagy is often evaluated using GFP-LC3 transgenic mice, which express the GFP-LC3 reporter in all cells of the body via a constitutive promoter [5]. Using these mice Mizushima and co-workers demonstrated the presence of autophagy *in vivo* and showed that nutrient starvation induced this process in most tissues including the liver, heart, pancreas, muscle and kidneys but not in the brain [5].

While LC3 levels serve as a read-out of autophagosome number at specific time points, they do not provide useful information about autophagy *per se*, as autophagosome levels can also be increased by blocking autophagy in later stages of the process

Abbreviations: ATP, adenosine triphosphate; BBB, blood brain barrier; BRB, blood retinal barrier; BGT, BSA/glycine/Triton X-100; BSA, bovine serum albumin; CNS, central nervous system; DABCO, 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle's Medium; E, embryonic day; EBSS, Earl's balanced salt solution; GCL, ganglion cell layer; GFAP, glial fibrillary acidic protein; GFP, green fluorescent protein; HBSS, Hanks' balanced salt solution; HCQ, hydroxychloroquine; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; IS, inner segment; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; Leu, leupeptin; Nbl, neuroblast layer; ON, optic nerve; ONL, outer nuclear layer; OPL, outer plexiform layer; PBS, phosphate buffered saline; PFA, paraformaldehyde; Rapa, rapamycin; RGCs, retinal ganglion cells; RPE, retinal pigment epithelium.

* Corresponding author.

E-mail addresses: lesteban@cib.csic.es (L. Esteban-Martínez), pboya@cib.csic.es (P. Boya).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.01.008>

1046-2023/© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

New method to assess mitophagy flux by flow cytometry

Marta Mauro-Lizcano,^{1,#} Lorena Esteban-Martínez,^{1,#} Esther Seco,¹ Ana Serrano-Puebla,¹ Lucía García-Ledo,¹ Cláudia Figueiredo-Pereira,² Helena L A Vieira,^{2,3} and Patricia Boya^{1,*}

¹Department of Cellular and Molecular Biology; Centro de Investigaciones Biológicas; CSIC; Madrid, Spain; ²CEBMC; Faculdade de Ciências Médicas; Universidade Nova de Lisboa; Lisboa, Portugal; ³Instituto de Biologia Experimental e Tecnológica (IBET); Oeiras, Portugal

[#]These authors contributed equally to this work.

Keywords: astrocyte primary culture, autophagic flux, autophagy, flow cytometry, neurodegeneration, mitochondria, mitophagic flux, mitophagy, retina

Abbreviations: $\Delta\Psi$, mitochondrial membrane potential; 3MA, 3-methyladenine; Atg, autophagy-related; CCCP, carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone; Co, control; COX4I1, cytochrome c oxidase subunit IV isoform 1; CsA, cyclosporin A; E, embryonic day; EBSS, Earle's balanced salt solution; FIS, fisetin; HCQ, hydroxychloroquine; LC3, MAP1LC3/LC3; KO, knockout; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; MTD, MitoTracker Deep Red; MTR, mechanistic target of rapamycin; NAM, nicotinamide; N+L, ammonium chloride + leupeptin; P, postnatal day; PARK2, Parkin RBR E3 ubiquitin protein ligase; PINK1, PTEN-induced putative kinase 1; PHEN, 1,10-phenanthroline; Rapa, rapamycin; TIMM23, translocase of inner mitochondrial membrane 23 homolog (yeast); TOMM20, translocase of outer mitochondrial membrane 20 homolog (yeast); TOMM40, translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (yeast); WM, wortmannin; WT, wild type

*Correspondence to: Patricia Boya; Email: patricia.boya@csic.es

Submitted: 04/22/2014

Revised: 03/09/2015

Accepted: 03/16/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1034403>

Mitochondrial autophagy, also known as mitophagy, is an autophagosome-based mitochondrial degradation process that eliminates unwanted or damaged mitochondria after cell stress. Most studies dealing with mitophagy rely on the analysis by fluorescence microscopy of mitochondrial-autophagosome colocalization. However, given the fundamental role of mitophagy in the physiology and pathology of organisms, there is an urgent need for novel quantitative methods with which to study this process. Here, we describe a flow cytometry-based approach to determine mitophagy by using MitoTracker Deep Red, a widely used mitochondria-selective probe. Used in combination with selective inhibitors it may allow for the determination of mitophagy flux. Here, we test the validity of the use of this method in cell lines and in primary cell and tissue cultures.

Introduction

Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, is a cell process that specifically targets mitochondria to autophagosomes for subsequent degradation in lysosomes.¹ Mitophagy is the only known pathway through which complete, damaged, and dysfunctional mitochondria are eliminated.² The presence of mitochondria inside autophagosomes was observed more than 50 y ago³ and has more recently been demonstrated using fluorescence in vivo microscopy by Elmore and coworkers, who coined the term mitophagy.^{4,5} Mitophagy is responsible for the specific elimination of

mitochondria during the maturation of erythrocytes, the only mature cells that are completely devoid of these organelles.⁶ It had been proposed that mitophagy is responsible for the disappearance of paternal mitochondria in the developing embryo,^{7,8} although this idea has been recently challenged.⁹

Mitophagy is most commonly induced in vitro in mammalian cells using the uncoupler CCCP (carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone), which reduces mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$ m).¹⁰ Mitochondria are then targeted for lysosomal degradation, which requires the interaction of PARK2/PARKIN-PINK1 proteins. Following mitochondrial depolarization PINK1 is stabilized at the mitochondrial membrane where it recruits PARK2, which in turn ubiquitinates several proteins that target the mitochondria for degradation.¹¹ Mitophagy can also be triggered by the activation of specific mitochondrial receptors; these are proteins that harbor a MAP1LC3/LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3)-interacting region/LIR, which forms a bridge linking the mitochondria to the autophagosome.¹² The most commonly described receptors are BNIP3,^{13,14} BNIP3L/NIX,¹⁵ yeast Atg32¹⁶ and FUNDC1.¹⁷ Other proteins implicated in mitophagy include AMBRA1,¹⁸ AMFR,¹⁹ SMURF1,²⁰ HK1,²¹ VDAC²² and the small GTPase RHEB.²³ Lipids also participate in the formation of bridges between mitochondria and autophagosomes. Cardiolipin, a lipid of the inner mitochondrial membrane, is externalized to the outer membrane, where it acts as an “eat-me” signal, triggering mitophagy.²⁴ Several drugs have been

Mitophagy in mitosis: More than a myth

Lorena Esteban-Martínez,^{1,2,#} Elena Doménech,^{1,#} Patricia Boya,^{2,*} María Salazar-Roa,^{1,*} and Marcos Malumbres¹

¹Cell Division and Cancer Group; Spanish National Cancer Research Centre (CNIO); Madrid, Spain; ²Department of Cellular and Molecular Biology; Centro de Investigaciones Biológicas; Madrid, Spain

[#]These two authors contributed equally to this work.

An attractive strategy for cancer therapy is to stop cell proliferation by means of agents that directly arrest the cell cycle. Microtubule poisons such as taxanes block mitosis, eventually leading to cell death in a process frequently known as mitotic catastrophe. However, some cells are able to bypass this mitotic arrest and survive, thus contributing to chemoresistance to those therapies. We have recently observed that mitotic arrest induces an early autophagic flux response that results in autophagy-dependent mitochondrial degradation and a dramatic energetic deficit. The subsequent increase in the AMP/ATP ratio results in the activation of the metabolic sensor AMPK followed by phosphorylation and activation of PFKFB3, an enzyme required for glycolysis. Thus, mitophagy can be considered as a critical effector of the therapeutic effect of mitotic therapies, while both AMPK and PFKFB3 are critical for survival. The manipulation of these molecular routes may therefore have therapeutic benefits in the presence of microtubule poisons.

recently found that autophagy also plays critical roles in cell survival during prolonged mitotic arrest (Fig. 1). This process is induced a few hours after mitotic arrest and has a strong impact on mitotic cell death. Knockdown of the autophagy regulators ULK1, PIK3C3/Vps34 and BECN1/Beclin1, as well as treatment with the class III PtdIns3K inhibitor 3-methyladenine, blocks mitotic cell death to a similar extent as caspase inhibition. In fact, autophagy is likely upstream of apoptosis as caspase inhibitors do not prevent autophagosome formation, whereas autophagy inhibitors delay caspase activation during mitotic cell death. *Bax Bak1* double-knockout cells also die during prolonged mitotic arrest suggesting the presence of both caspase-dependent and -independent pathways in this process. Interestingly, induction of autophagy by knocking down RPTOR or treating cells with AKT-MTOR inhibitors increases cell death in mitotic arrested cells, indicating a pro-death role in this particular setting. Autophagy is mainly a prosurvival mechanism, and cell death is frequently prevented by a safety mechanism that leads to the activation of MTOR after prolonged stimuli, thus resulting in autophagy attenuation. However, protein synthesis is limited during mitosis due to the lack of general transcription and translation so it could be speculated that the normal controls that limit the autophagy-dependent degradation of intracellular components are absent during mitotic arrest.

The productive autophagic flux observed as early as 3 h after mitotic arrest results in a marked decrease in mitochondrial numbers. Using a quantitative

Keywords: cancer therapy, cell cycle, glycolysis, microtubule poisons, mitophagy, mitosis

*Correspondence to: Patricia Boya; Email: pboya@cib.csic.es; María Salazar-Roa; Email: msalazar@cnio.es

Submitted: 10/02/2015

Revised: 10/05/2015

Accepted: 10/09/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/1554862720151108509>

Punctum to: Doménech E, Maestre C, Esteban-Martínez L, Partida D, Pascual R, Fernández-Miranda G, Seco E, Campos-Olivas R, Pérez M, Megias D, Allen K, López M, Saha AK, Velasco G, Rial E, Méndez R, Boya P, Salazar-Roa M, Malumbres M. (2015) AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest. *Nat Cell Biol* 2015; 17: 1304–1316; PMID: 26322630; doi:10.1038/ncb3231.

The special structural requirements that accompany chromosome segregation during mitosis make cells very sensitive to cell death during this process. Multiple lines of evidence suggest that mitotic cell death is caspase-dependent although the presence of undefined caspase-independent processes has also been suggested. Whether autophagy was or not present in mitosis has been a matter of debate in the past few years. Using a combination of genetic and chemical models, as well as time-lapse microscopy to monitor progression throughout the cell cycle, we

AMPK and PFKFB3 mediate glycolysis and survival in response to mitophagy during mitotic arrest

Elena Doménech¹, Carolina Maestre¹, Lorena Esteban-Martínez², David Partida¹, Rosa Pascual³, Gonzalo Fernández-Miranda³, Esther Seco², Ramón Campos-Olivas⁴, Manuel Pérez⁵, Diego Megias⁵, Katherine Allen⁶, Miguel López^{7,8}, Asish K. Saha⁶, Guillermo Velasco⁹, Eduardo Rial¹⁰, Raúl Méndez³, Patricia Boya², María Salazar-Roa^{1,11} and Marcos Malumbres^{1,11}

Blocking mitotic progression has been proposed as an attractive therapeutic strategy to impair proliferation of tumour cells. However, how cells survive during prolonged mitotic arrest is not well understood. We show here that survival during mitotic arrest is affected by the special energetic requirements of mitotic cells. Prolonged mitotic arrest results in mitophagy-dependent loss of mitochondria, accompanied by reduced ATP levels and the activation of AMPK. Oxidative respiration is replaced by glycolysis owing to AMPK-dependent phosphorylation of PFKFB3 and increased production of this protein as a consequence of mitotic-specific translational activation of its mRNA. Induction of autophagy or inhibition of AMPK or PFKFB3 results in enhanced cell death in mitosis and improves the anti-tumoural efficiency of microtubule poisons in breast cancer cells. Thus, survival of mitotic-arrested cells is limited by their metabolic requirements, a feature with potential implications in cancer therapies aimed to impair mitosis or metabolism in tumour cells.

Chromosome segregation requires a marked reorganization of cellular structures including centrosome duplication and generation of the microtubule spindle, disassembly of the Golgi apparatus, breakdown of the nuclear envelope and chromosome condensation. At this stage, transcription is strongly suppressed, translation is limited to a subset of messenger RNAs, and the absence of the nuclear envelope temporally maintains on hold multiple regulatory mechanisms that are based on the separation of the nuclear and cytoplasmic compartments¹. Progression through mitosis is monitored by the spindle assembly checkpoint (SAC), a regulatory pathway that delays mitotic exit until all chromosomes are bipolarly attached to the spindle^{2,3}. The target of the SAC is the anaphase-promoting complex/cyclosome (APC/C), an E3 ubiquitin ligase that, when activated by Cdc20, targets for degradation the separase inhibitor securin, and the Cdk1 activatory subunit cyclin B. Stable bipolar attachment of chromosomes satisfies the SAC releasing APC/C–Cdc20 inhibition and resulting in Cdk1 inhibition and activation of separase, thus leading to chromosome segregation and the reformation of two new nuclei^{4,5}.

Disruption of the mechanisms that regulate the proper attachment of chromosomes to the bipolar spindle results in mitotic arrest in a SAC-dependent manner. Thus, inhibition of mitotic kinases such as Aurora A or Plk1, or treatment of cells with microtubule poisons that disrupt the proper dynamics of the spindle, results in mitotic arrest, a feature that may be used to prevent tumour cell proliferation. Yet, the success of mitotic-targeted therapies is limited by the low mitotic index of human tumours, and mitotic slippage; that is, the ability of cells to exit from mitosis in the presence of mitotic blockers^{6,7}. As mitotic slippage is APC/C–Cdc20-dependent⁸, targeting the mitotic exit machinery has been proposed as an efficient method to prevent resistance to anti-mitotic drugs^{9–11}.

Although death in mitosis is at least partially mediated by apoptosis, the molecular pathways that control survival or death in mitosis are not well understood^{12,13}. Here we show that death in mitosis is modulated by the energetic balance that counteracts the loss of mitochondrial mass during mitotic arrest. Using Cdc20-knockout cells or human cells treated with microtubule poisons, we describe here that

¹Cell Division and Cancer Group, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), Madrid 28029, Spain. ²Department of Cellular and Molecular Biology, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, E-28040 Madrid, Spain. ³ICREA and Institute for Research in Biomedicine (IRB), Barcelona 08028, Spain. ⁴Spectroscopy and Nuclear Magnetic Resonance Unit, CNIO, Madrid 28029, Spain. ⁵Confocal Microscopy Unit, CNIO, Madrid 28029, Spain. ⁶Division of Endocrinology, Diabetes & Nutrition, Boston University School of Medicine, Boston, Massachusetts 02215, USA. ⁷Department of Physiology, CIMUS, University of Santiago de Compostela-Instituto de Investigación Sanitaria, Santiago de Compostela 15782, Spain. ⁸CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición (CIBEROBN), 15706, Spain. ⁹Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Biology, Complutense University, and Instituto de Investigaciones Sanitarias San Carlos (IISCS), 28040 Madrid, Spain. ¹⁰Department of Cellular and Molecular Medicine, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, E-28040 Madrid, Spain. ¹¹Correspondence should be addressed to M.S.-R. or M.M. (e-mail: msalazar@cnio.es or malumbres@cnio.es)

Received 8 August 2014; accepted 24 July 2015; published online 31 August 2015; DOI: 10.1038/nclb3231



Autophagy



ISSN: 1554-8627 (Print) 1554-8635 (Online) Journal homepage: <http://www.tandfonline.com/loi/kaup20>

Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition)

Daniel J Klionsky, Kotb Abdelmohsen, Akihisa Abe, Md Joynal Abedin, Hagai Abeliovich, Abraham Acevedo Arozena, Hiroaki Adachi, Christopher M Adams, Peter D Adams, Khosrow Adeli, Peter J Adhihetty, Sharon G Adler, Galila Agam, Rajesh Agarwal, Manish K Aghi, Maria Agnello, Patrizia Agostinis, Patricia V Aguilar, Julio Aguirre-Ghiso, Edoardo M Airoidi, Slimane Ait-Si-Ali, Takahiko Akematsu, Emmanuel T Akporiaye, Mohamed Al-Rubeai, Guillermo M Albaiceta, Chris Albanese, Diego Albani, Matthew L Albert, Jesus Aldudo, Hana Algül, Mehrdad Alirezaei, Iraide Alloza, Alexandru Almasan, Maylin Almonte-Beceril, Emad S Alnemri, Covadonga Alonso, Nihal Altan-Bonnet, Dario C Altieri, Silvia Alvarez, Lydia Alvarez-Erviti, Sandro Alves, Giuseppina Amadoro, Atsuo Amano, Consuelo Amantini, Santiago Ambrosio, Ivano Amelio, Amal O Amer, Mohamed Amessou, Angelika Amon, Zhenyi An, Frank A Anania, Stig U Andersen, Usha P Andley, Catherine K Andreadi, Nathalie Andrieu-Abadie, Alberto Anel, David K Ann, Shailendra Anoopkumar-Dukie, Manuela Antonioli, Hiroshi Aoki, Nadezda Apostolova, Saveria Aquila, Katia Aquilano, Koichi Araki, Eli Arama, Agustin Aranda, Jun Araya, Alexandre Arcaro, Esperanza Arias, Hirokazu Arimoto, Aileen R Ariosa, Jane L Armstrong, Thierry Arnould, Ivica Arsov, Katsuhiko Asanuma, Valerie Askanas, Eric Asselin, Ryuichiro Atarashi, Sally S Atherton, Julie D Atkin, Laura D Attardi, Patrick Auberger, Georg Auburger, Laure Aurelian, Riccardo Autelli, Laura Avagliano, Maria Laura Avantaggiati, Limor Avrahami, Suresh Awale, Neelam Azad, Tiziana Bachetti, Jonathan M Backer, Dong-Hun Bae, Jae-sung Bae, Ok-Nam Bae, Soo Han Bae, Eric H Baehrecke, Seung-Hoon Baek, Stephen Baghdiguian, Agnieszka Bagniewska-Zadworna, Hua Bai, Jie Bai, Xue-Yuan Bai, Yannick Bailly, Kithiganahalli Narayanaswamy Balaji, Walter Balduini, Andrea Ballabio, Rena Balzan, Rajkumar Banerjee, Gábor Bánhegyi, Haijun Bao, Benoit Barbeau, Maria D Barrachina, Esther Barreiro, Bonnie Bartel, Alberto Bartolomé, Diane C Bassham, Maria Teresa Bassi, Robert C Bast Jr, Alakananda Basu, Maria Teresa Batista, Henri Batoko, Maurizio Battino, Kyle Bauckman, Bradley L Baumgarner, K Ulrich Bayer, Rupert Beale, Jean-François Beaulieu, George R. Beck Jr, Christoph Becker, J David Beckham, Pierre-André Bédard, Patrick J Bednarski, Thomas J Begley, Christian Behl, Christian Behrends, Georg MN Behrens, Kevin E Behrns, Eloy Bejarano, Amine Belaid, Francesca Belleudi, Giovanni Bénard, Guy Berchem, Daniele Bergamaschi, Matteo Bergami, Ben Berkhout, Laura Berliocchi, Amélie Bernard, Monique Bernard, Francesca Bernassola, Anne Bertolotti, Amanda S Bess, Sébastien Besteiro, Saverio Bettuzzi, Savita Bhalla, Shalmoli Bhattacharyya, Sujit K Bhutia, Caroline Biagosch, Michele Wolfe Bianchi, Martine Biard-Piechaczyk, Viktor Billes, Claudia Bincoletto, Baris Bingol, Sara W Bird, Marc Bitoun, Ivana Bjedov, Craig Blackstone, Lionel Blanc, Guillermo A Blanco, Heidi Kiil Blomhoff,

Funciones de la autofagia en el desarrollo de la retina: metabolismo, diferenciación y muerte celular

*En esta Tesis Doctoral hemos querido entender el papel de la autofagia y la mitofagia en el desarrollo de la retina de ratón. Nuestros datos muestran que la autofagia es un proceso activo durante el desarrollo de la retina de ratón, sobre todo en los estadios embrionarios iniciales, siendo las células ganglionares las que presentan un mayor flujo de autofagia. Este proceso presenta diversas funciones durante la fisiología de la retina embrionaria. En primer lugar, hemos demostrado que existen diferencias en los niveles de masa mitocondrial en las retinas de embriones en E13.5 debido a la degradación de mitocondrias por mitofagia únicamente en la región central de la retina en dicho estadio. Por otro lado hemos demostrado que **la autofagia es necesaria para mantener unos niveles de ATP adecuados para la exposición de fosfatidil-serina en la superficie de las células apoptóticas**, lo que permite su reconocimiento y degradación. Esta función no es universal, ya que la inhibición de autofagia no produce una acumulación de células apoptóticas en la región central, donde la masa mitocondrial es menor. Por otro lado, la mitofagia que se produce en la zona central de la retina contribuye a la muerte neural temprana localizada en dicha región.*

*Además, esa degradación mitocondrial se produce de manera generalizada en toda la retina en un estadio del desarrollo mas avanzado, E15.5, debido a la activación del proceso de **mitofagia** regulado por **hipoxia** y **NIX**. En este caso, la mitofagia no solo contribuye a la **muerte fisiológica** de la retina, si no que también es responsable de un **cambio metabólico** hacia glicólisis necesario para la correcta **diferenciación de las células ganglionares** de la retina. Además, existe una estrecha relación entre el metabolismo, la masa mitocondrial y la diferenciación, ya que la modulación directa de la glicólisis produce cambios en los niveles de mitocondrias y altera la diferenciación de células ganglionares. Ese cambio metabólico mediado por mitofagia, también podría estar implicado en la polarización de macrófagos hacia tipo proinflamatorio M1 y en la diferenciación temprana de células stem.*



UNIVERSIDAD