



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma  
de Barcelona

---

**Desarrollo de un tratamiento tópico en  
colirio para la retinopatía diabética basado  
en el efecto neuroprotector de GLP-1**

---

Tesis doctoral:  
Joel Sampedro Vida

Directores:  
Patricia Bogdanov Baruj  
Cristina Hernández Pascual  
Rafael Simó Canonge

Tutor:  
Miquel Vila i Bover

Programa de doctorat en Bioquímica, Biología Molecular i Biomedicina  
Departament de Bioquímica i de Biología Molecular  
Universitat Autònoma de Barcelona  
2020







# AGRADECIMIENTOS

Hace ya algunos años que conseguí una beca de la AGAUR para realizar una tesis doctoral en el laboratorio liderado por el Dr. Simó. En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Simó y a la Dra. Hernández por darme la oportunidad de integrarme en su grupo después de aquella entrevista de septiembre de 2015. Mi etapa como doctorando en el laboratorio del edificio Collserola se inició en marzo del 2016. Recuerdo aquél primer día en el que sin prácticamente ninguna experiencia y con mucho nerviosismo, la Dra. Bogdanov me acogió con los brazos abiertos. Muchas gracias a los tres por vuestro apoyo, consejo científico y por haberme permitido asistir y participar en congresos nacionales e internacionales. Gracias al Dr. Vila por aceptar ser mi tutor y a los miembros de mi comisión de seguimiento, la Dra. Meseguer, el Dr. López Soriano y el Dr. Zapata por ayudarme a avanzar en el aprendizaje anual de mi tesis. Gracias Patri por todos los valores que me has enseñado en estos años como disciplina, exigencia, planificación o paciencia. Gracias también por los momentos divertidos y por tu papel de madre preocupándote siempre por mis intereses y para que saque lo mejor de mí, incluso cuando yo estaba en mis momentos más difíciles.

Aprovecho para dar las gracias a todo el personal de Collserola ya que sin ellos nuestro trabajo no tendría sentido: Eulalia, Rosa, Rai, Paco, Andrés, Rashira, Núria... Todos ellos siempre con una sonrisa en la cara haciendo nuestro día a día más llevadero. Muchas gracias también al personal de la UAT y del Servicio de Bioestadística. Muchas gracias Marta Valeri por hacer más amenas las tardes de confocal, eres ya otro miembro más de nuestra familia. Aprovecho para agradecer al Dr. Arranz la posibilidad de analizar los niveles de glutamato por UHPLC en su laboratorio.

Del equipo de Mediterránea, quería dar las gracias a la Dra. García por su conocimiento y nuestras charlas en los CIBER. Además le agradezco gratamente su ayuda ya que sin ella los experimentos con muestras humanas no habrían sido posible. Lorena, gracias por tu ayuda, tus consejos y tu sonrisa cada vez que entro a vuestro laboratorio. ¡Todo el mundo querría tener una Lorena en su laboratorio! Olga y Andrea, compañeras de turismo en el congreso de Lisboa, gracias también por vuestros consejos y vuestra simpatía. Mireia, aunque no trabajamos en el mismo laboratorio parece que nos comprendamos como si fuéramos

compañeros de poyata. Muchos ánimos y mucha fuerza para lo que te espera. Finalmente, Tania, gracias por los pocos, pero intensos momentos compartidos. Gracias también a Elena, Isa y Anna de apoptosis.

De Collserola, quería agradecer al grupo de oftalmología por siempre estar allí dándonos apoyo. Muchas gracias a la Dra. Salas, la Dra. Fontrodona, Jordi y a la ya doctora Badia (¡Al final me superaste!). Mucha suerte con tu nueva vida profesional. Agradecer también a otros compañeros vecinos del VHIR, como Marc, compañero de bus, Patricia, Xingpeng, Rocío, Sandra (mi compañera de corte de ojos), Alba, el Dr. Herance o el Dr. Castro. Dr. Castro muchas gracias por animar siempre la hora de la comida. Ya formas parte de nuestra familia. Y Patricia, gracias por compartir mesa con nosotros y mucha suerte en tu nueva vida como docente.

Respecto al resto de miembros de la familia del lab 144, tengo que hablar primero de Cristina, la Dra. Solà. Gracias por todo y más. Has sido como mi hermana mayor, tanto científicamente como personalmente. Los momentos compartidos no tienen precio. Maria, compañera de viaje en Berlín, y próximamente Dra. Vilà, te deseo mucha suerte en tu etapa doctoral. Seguro que con todo el esfuerzo que pones sacarás una gran tesis adelante. Rosi, vigíleme el laboratorio por favor que sin ti el barco se hunde. Muchas gracias por tu simpatía, tus consejos y en definitiva por ayudarme a crecer. Pep, gracias por tus consejos y nuestras conversaciones que pretenden salvar el mundo a la hora de comer. Lidia, tú lo empezaste todo, y aunque no coincidimos mucho en el laboratorio, pero los momentos que hemos compartido me han ayudado gratamente. Aprovecho para saludar y dar las gracias a otras personas que han pasado por el laboratorio como Angélica, nuestra pequeñaja de máster, Jordi, Jaime, Meri o Marc. Gracias a todos vosotros por haber coincidido en mí camino. Y por último, pero no menos importante, no me puede olvidar de Hugo, mi nuevo hermano pequeño, admiro tu positivismo y tus ganas de trabajar. Te dejo al mando del laboratorio, sé que lo vas a hacer muy bien y vas a traer muchas cosas buenas a este grupo.

Además, daré las gracias a otras personas externas al ámbito profesional pero que también han sido importantes para mí en esta etapa. Hablo de mis amigos que siempre han estado a mi lado desde el principio. Cris, muchas gracias por esas tardes de merienda en las que compartimos vivencias y escapamos de nuestras preocupaciones. Dani, gracias por estar siempre ahí, incluso cuando nos vemos de tanto en tanto, pero siempre intentamos encontrar

un momento para vernos y ponernos al día. Oriol, Ivan y Núria, gracias por compartir momentos divertidos y frikismos conmigo. Estoy deseando de hacer más meriendas de domingo y sesiones de Catán. Anna, Julia, Jaume y Maria, gracias por aceptarme a formar parte de vuestras vidas. Gracias también a Luis, Vero, Tania, Nerea, Aida y Joan.

Por último quiero agradecer a mis padres, mi hermano Marc y mi cuñada Cristina por todo el apoyo que me han dado. Gracias mama y papa por ayudarme a levantar la cabeza cuando yo solo no era capaz. Gracias Marc y Cristina por vuestros consejos estadísticos y por abrirme vuestras puertas en California. Y para acabar, gracias Àlex por querer formar parte de mi familia, por tu paciencia, tu confianza, tu ayuda emocional, tus ganas de volar y escapar del mundo conmigo, y en definitiva por entender el sacrificio de hacer un doctorado.



# ABREVIACIONES

<b>AC</b>	Adenilato ciclasa
<b>ADA</b>	Asociación Americana de Diabetes
<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucleico
<b>cADN</b>	ADN complementario
<b>ADNsa</b>	Deoxiribonucleasa
<b>AGE(s)</b>	Productos de glicosilación avanzada
<b><i>Akr1b1</i></b>	Gen de aldosa reductasa
<b>Akt</b>	Proteína quinasa de tipo B (PKB)
<b><i>ALR2</i></b>	Gen de aldosa reductasa
<b>AMPA</b>	Amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato
<b>AMPK</b>	Proteína quinasa serina/treonina activada por adenosina monofosfato
<b>APE1</b>	Enzima de reparación apurínico/apirimidínico endonucleasa
<b>APP</b>	Proteína precursora de amiloide
<b>APS</b>	Persulfato amónico
<b>AR</b>	Aldosa reductasa
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>ARPE-19</b>	Células de epitelio pigmentario de la retina de origen humano in vitro
<b>ASC</b>	Proteína adaptadora de punto asociada apoptosis
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATPasa</b>	Bomba de adenosín trifosfato
<b>BAD</b>	Promotor de muerte asociado a Bcl-2
<b>Bax</b>	Proteína X asociada a Bcl2
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid assay
<b>BDNF</b>	Factor neurotrófico derivado del cerebroas
<b>BHR</b>	Barrera hematorretiniana
<b>cAMP</b>	Adenosí monofosfato cíclico
<b>CBP</b>	Proteína de unión a CREB
<b>CD</b>	Clusters de diferenciación
<b>CD26</b>	Proteína Dipeptidil peptidasa-4
<b>CD31</b>	Molécula de adhesión celular de endotelio y plaquetas
<b>CD40</b>	Miembro de la familia de receptores de TNF- $\alpha$
<b>CEL</b>	Carboxyethyllysina
<b>CML</b>	Carboxymethyllysina
<b>COX-2</b>	Cyclooxygenasa-2
<b>CRE</b>	Elemento de respuesta activado por cAMP
<b>CREB</b>	Proteína de unión a elemento de respuesta activado por cAMP
<b>CTGF</b>	Factor de crecimiento de tejido conectivo
<b>DAG</b>	Diacilglicerol
<b>DME</b>	Edema macular diabético
<b><i>DPP4</i></b>	Gen humano de Dipeptidil peptidasa-4
<b><i>Dpp4</i></b>	Gen murino de Dipeptidil peptidasa-4
<b>DPP-IV</b>	Proteína Dipeptidil peptidasa-4
<b>DPP-IVi</b>	Fármacos inhibidores de la proteína dipeptidil peptidasa-4
<b>EASD</b>	Asociación Europea para el Estudio de la Diabetes
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>EPAC</b>	Factor intercambiador activado por adenosin monofosfato cíclico
<b>EPCs</b>	Células endoteliales progenitoras
<b>ER</b>	Reticulo endoplasmático
<b>ERG</b>	Electroretinograma
<b>ET-1</b>	Endotelina 1
<b>FADH2</b>	Dinucleótido de flavina y adenina

<b>Fas</b>	Receptor de muerte Fas
<b>FasL</b>	Fas ligando
<b>FDA</b>	U.S. Food and Drug Administration
<b>FGF</b>	Factor de crecimiento de fibroblastos
<b>FID</b>	Federación Internacional de Diabetes
<b>Foxo1A</b>	Proteína O1 con dominio "Forkhead box"
<b>FoxO3a</b>	Proteína O3 con dominio "forkhead box"
<b>GABA</b>	Ácido $\gamma$ -Aminobutírico
<b>GAD</b>	Ácido glutámico descarboxilasa
<b>GADPH</b>	Gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
<b>GCAP1/2</b>	Proteínas 1 y 2 activadoras de guanilato ciclasa
<b>GCL</b>	Capa de células ganglionares
<b>GDP</b>	Guanosín difosfato
<b>GFAP</b>	Proteína ácida fibrilar glial
<b>GFAT</b>	Glutamina fructosa-6 fosfato amidotransferasa
<b>GIP</b>	Polipéptido inhibidor gástrico
<b>GLP-1</b>	Péptido 1 similar al glucagón
<b>GLP-1R</b>	Receptor del péptido 1 similar al glucagón
<b>GLP1R</b>	Gen humano del receptor del péptido 1 similar al glucagón
<b>Glp1r</b>	Gen murino del receptor del péptido 1 similar al glucagón
<b>GLP-1RA(s)</b>	Fármacos agonistas del receptor del péptido 1 similar al glucagón
<b>GLP-2</b>	Péptido 2 similar al glucagón
<b>GLP-2R</b>	Receptor del péptido 2 similar al glucagón
<b>GluN1</b>	Subunidad 1 del receptor de glutamato de tipo AMPA
<b>GluR1</b>	Subunidad 1 del receptor de glutamato de tipo NMDA
<b>GPCRs</b>	Familia de receptores acoplados a proteínas G
<b>GPX</b>	Glutación peroxidasa
<b>GR</b>	Glutación reductasa
<b>GRPP</b>	Péptido similar a glicentina
<b>GSH</b>	Glutación reducido
<b>cGMP</b>	Guanosín monofosfato cíclico
<b>GTP</b>	Guanosín trifosfato
<b>HbA1c</b>	Hemoglobina glicosilada
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Factor $\alpha$ inducible por hipoxia
<b>HMGB1</b>	Proteína con dominio "high-mobility group box -1"
<b>Iba-1</b>	Molécula 1 de adhesión de unión a calcio (AIF-1)
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adhesión intercelular 1
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon $\gamma$
<b>IGF-1</b>	Factor de crecimiento 1 similar a la insulina
<b>IKB<math>\alpha</math></b>	Inhibidor del Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activada de tipo $\alpha$
<b>IKK<math>\alpha</math></b>	Kinasa Ikappa B de tipo $\alpha$
<b>IKK<math>\beta</math></b>	Kinasa Ikappa B de tipo $\beta$
<b>IKK<math>\gamma</math></b>	Subunidad reguladora inhibidora de la kinasa Ikappa B de tipo $\gamma$
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 de tipo $\beta$
<b>IL1b</b>	Gen murino de la Interleucina 1 de tipo $\beta$
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL6</b>	Gen murino de la Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina de tipo 8
<b>IL-R</b>	Receptor de interleucina
<b>INL</b>	Capa nuclear interna
<b>iNOS</b>	Gen de la sintasa de óxido nítrico inducible
<b>IP-1/2</b>	Péptidos 1 y 2 derivados del gen del glucagón
<b>IPL</b>	Capa plexiforme interna
<b>IRBP</b>	Proteína de fotorreceptores de unión a retinoide

<b>JNK</b>	Quinasa c-Jun N-terminal
<b>KATP</b>	Canales de potasio dependientes de adenosin trifosfato
<b>Kir</b>	Canales iónicos rectificadores de potasio
<b>Ki67</b>	Biomarcador de proliferación celular
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido que genera toxicidad
<b>mARN</b>	Ácido ribonucleico mensajero codificante para proteína
<b>MAPK</b>	Proteínas quinasa activadas por mitógeno
<b>MCP-1</b>	Factor quimiotáctico de macrófagos
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas
<b>MMP-9</b>	Metaloproteasa 9
<b>NAD+</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina
<b>NADPH</b>	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
<b>NDNF</b>	Factor neurotrófico derivado de neuronas
<b>NEMO</b>	Modulador esencial de NF- $\kappa$ B
<b>NeuN</b>	Proteína neuronal nuclear utilizado como biomarcador de neurona
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
<b>NFL</b>	Capa de fibras del nervio óptico
<b>NLR</b>	Receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos
<b>NLRP3</b>	Receptor similar a NOD con dominio de pirina
<b><i>Nlrp3</i></b>	Gen murino del receptor similar a NOD con dominio de pirina
<b>NMDA</b>	N-methyl-D-aspartato
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOD</b>	Ratón diabético no obeso
<b>NOS</b>	Especies reactivas de nitrógeno
<b><i>NOX4</i></b>	Gen NADPH oxidasa 4 humano
<b>NPRD</b>	Retinopatía diabética no proliferativa
<b>O-GlcNAc</b>	O-N-Glucosil-Acetilación
<b>OIR</b>	Retinopatía inducida por oxígeno
<b>OLM</b>	Membrana limitante externa
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>ONL</b>	Capa nuclear externa
<b>OPL</b>	Capa plexiforme externa
<b>OPs</b>	Potenciales oscilatorios
<b>P1GF</b>	Factor de crecimiento derivado de placenta
<b>PAI</b>	Inhibidor del activador del plasminógeno
<b>PARP</b>	Polimerasa poli(ADP-ribosa)
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PDGF</b>	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
<b>PECAM-1</b>	Molécula 1 de adhesión de células endoteliales (también conocida como CD-31)
<b>PEDF</b>	Factor de crecimiento derivado del epitelio pigmentario
<b>PGC-1<math>\alpha</math></b>	Receptor activado por el proliferador de peroxisomas
<b>PI3K</b>	Fosfatidilinositol 3-quinasa
<b>PKA</b>	Proteína quinasa activada por Adenosin monofosfato cíclica
<b>PKB</b>	Proteína quinasa de tipo B (Akt)
<b>PKC</b>	Proteína quinasa C
<b>PKC-<math>\alpha</math></b>	Proteína quinasa C alfa
<b>PRD</b>	Retinopatía diabética proliferativa
<b>PS1-KI</b>	Ratón knock-in para presenilin-1
<b>RAGE</b>	Receptor para AGEs
<b>RD</b>	Retinopatía Diabética
<b>RGC-5</b>	Células ganglionares retinianas in vitro
<b>rMc-1</b>	Células de Müller in vitro
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno
<b>RPE</b>	Epitelio pigmentario de la retina

<b>RT-PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa real-time
<b>SCF</b>	Factor de células madre
<b>Ser</b>	Serina
<b>Sirt1</b>	Proteína sirtuina
<b>SDF-1</b>	Factor-1 $\alpha$ derivado de células estromales
<b>SDH</b>	Sorbitol deshidrogenasa
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>SOD</b>	Superóxido Dismutasa
<b>SST</b>	Somatostatina
<b>STZ</b>	Streptozotocina
<b>t-PA</b>	Activador del plasminógeno
<b>T1DM</b>	Diabetes de tipo 1
<b>T2DM</b>	Diabetes de tipo 2
<b>TBST</b>	Solución de Tris 0,1 Tween
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Factor de crecimiento transformante beta
<b>Thr</b>	Treonina
<b>TIMP-1</b>	Inhibidor 1 de las metaloproteasas
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b><i>TNF<math>\alpha</math></i></b>	Gen murino del factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TNFR</b>	Receptor del factor de necrosis tumoral $\alpha$
<b>TSP-1</b>	Factor trombospondin-1
<b>UDP-GlcNAc</b>	Uridin-difosfato N-acetil-glucosamina
<b>VCAM-1</b>	Proteína de adhesión de células vasculares
<b>VEGF</b>	Factor de crecimiento del endotelio vascular
<b><i>VEGF</i></b>	Gen humano del factor de crecimiento del endotelio vascular
<b><i>Vegf</i></b>	Gen murino del factor de crecimiento del endotelio vascular

# ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	V
ABREVIACIONES	IX
ÍNDICE	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS	XVII
ÍNDICE DE TABLAS	XXI
RESUMEN DE LA TESIS	XXIII
ABSTRACT	XXV
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La Retinopatía Diabética	3
1.1.1. Definición y epidemiología	3
1.1.2. Patogénesis de la Retinopatía diabética	4
1.1.3. Fisiopatología de la disfunción de la unidad neurovascular	6
1.1.3.1. Componentes de la unidad neurovascular de la retina	6
1.1.3.2. La afectación de la unidad neurovascular	9
1.1.3.2.1. Disfunción neuronal	10
1.1.3.2.2. Disfunción endotelial y alteraciones microvasculares	11
1.1.3.2.3. Gliosis reactiva	12
1.1.3.3. El papel de la inflamación en la retinopatía diabética	13
1.1.4. Tratamientos actuales	15
1.2. El péptido GLP-1	16
1.2.1. Activación del receptor de GLP-1	19
1.2.1.1. Activación de GLP-1R por la vía de cAMP/CREB y PI3K/Akt	19
1.2.1.2. Evidencias de neuroprotección por los GLP-1RAs	20
1.2.1.3. Evidencias de neuroprotección por inhibición de DPP-IV	22
1.3. Modelo animal	23
1.3.1. Modelos de ratón diabético	23
1.3.1.1. Modelos portadores de una mutación endógena	24
1.3.1.2. Modelos inducidos farmacológicamente	24
1.3.1.3. Modelos con retinopatía proliferativa	25
1.3.2. El ratón db/db como modelo de Retinopatía Diabética	25

1.3.3. Anatomía comparada de la retina en el humano y en el ratón.	26
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
2.1. Hipótesis	31
2.2. Objetivos	31
3. MATERIAL Y MÉTODOS	33
3.1. Estudio con animales	35
3.1.1. Animales de experimentación y condiciones de estabulación	35
3.1.2. Tratamientos	36
3.1.2.1. Administración de GLP-1 en colirio	36
3.1.2.2. Administración de sitagliptina y saxagliptina en colirio	37
3.1.3. Estudio de absorción y distribución de 125I-GLP-1	37
3.1.4. Electroretinograma (ERG)	38
3.1.5. Tomografía de coherencia óptica (OCT)	40
3.1.6. Eutanasia y recogida de muestras	41
3.2. Estudio de proteínas	41
3.2.1. Extracción de proteínas	41
3.2.2. Cuantificación de proteínas	42
3.2.3. Western Blot	43
3.2.4. Deshibridación	47
3.2.5. Cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) acoplada a Espectrometría de masas	47
3.3. Estudio de ácidos nucleicos	48
3.3.1. Extracción de ácido ribonucleico mensajero (mARN)	48
3.3.2. Generación de ácido desoxirribonucleico complementario y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa	49
3.3.3. Nomenclatura de genes	50
3.4. Técnicas de histoquímica	51
3.4.1. Técnica de inmunofluorescencia	51
3.4.1.1. Estudio de la gliosis reactiva	53
3.4.1.2. Estudio de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL	54
3.4.1.3. Estudio de la proliferación celular	54
3.4.1.4. Estudio de la translocación nuclear de NF-κB	55
3.4.2. Estudio de la morfometría de la retina mediante Hematoxilina & Eosina	55
3.4.3. Estudio de la permeabilidad vascular y la neovascularización de la retina mediante la técnica del Evans Blue	56

3.5. Estudio con muestras humanas	56
3.5.1. Obtención de humor vítreo y plasma	56
3.5.2. Obtención de retinas humanas	57
3.5.3. RT-PCR de las muestras humanas	57
3.5.4. ELISA de las muestras humanas	58
3.6. Procesamiento estadístico de los resultados	58
4. RESULTADOS	59
4.1. Estudio de absorción y distribución de GLP-1 tras administración tópica ocular	61
4.1.1. Contenido de <sup>125</sup> I-GLP-1 en el cristalino de ratón	61
4.1.2. Contenido de <sup>125</sup> I-GLP-1 en la retina de ratón	62
4.1.3. Contenido de <sup>125</sup> I-GLP-1 en esclera y coroides de ratón	62
4.2. Efectos de GLP-1 en el animal db/db de 24 semanas de edad	64
4.2.1. Evolución del peso y la glucemia	64
4.2.2. Evaluación in vivo de la función de la retina mediante el electroretinograma	65
4.2.3. Análisis morfológico in vivo mediante Tomografía de Coherencia Óptica	68
4.2.4. Evaluación post-mortem	69
4.2.4.1. Estudio de la activación glial	69
4.2.4.1.1. Gliosis reactiva: Expresión de GFAP	69
4.2.4.1.2. Activación de la microglia	70
4.2.4.2. Evaluación de la apoptosis y la supervivencia neuronal	71
4.2.4.2.1. Cuantificación de células apoptóticas mediante la técnica del TUNEL	71
4.2.4.2.2. Estudio de la expresión de caspasa	72
4.2.4.2.3. Análisis morfológico de la retina mediante Hematoxilina & Eosina	73
4.2.4.2.4. Estudio de la expresión de moléculas de supervivencia neuronal	74
4.2.4.2.5. Recuento de células neuronales en proliferación	76
4.2.4.3. Exploración de las alteraciones microvasculares	79
4.2.4.3.1. Estudio de la integridad de la barrera hematoretiniana mediante la técnica del Evans Blue	79
4.2.4.3.2. Cuantificación de la neovascularización	80
4.2.4.3.3. Estudio de la expresión de VEGF	82
4.2.4.4. Estudio de los mecanismos de acción de GLP-1 en la retina	83
4.2.4.4.1. Excitotoxicidad por glutamato	83
4.2.4.4.2. Estrés oxidativo	86

4.2.4.4.3. Inflamación de la retina	88
4.3. Prevención de la retinopatía diabética por inhibidores de la DPP-IV	94
4.3.1. Expresión de DPP-IV en la retina humana y de ratón	94
4.3.2. Evolución del peso y la glucemia	96
4.3.3. Electroretinograma Ganzfeld	98
4.3.4. Evaluación post-mortem	100
4.3.4.1. Activación glial	100
4.3.4.1.1. Gliosis reactiva: Expresión de GFAP	100
4.3.4.1.2. Activación de la microglia	102x
4.3.4.2. Apoptosis y supervivencia neuronal	103
4.3.4.2.1. Cuantificación de células apoptóticas mediante la técnica del TUNEL	103
4.3.4.2.2. Niveles de glutamato y expresión de GLAST	105
4.3.4.2.3. Expresión de marcadores de supervivencia	107
4.3.4.3. Efectos de los DPP-IVi sobre las alteraciones microvasculares	108
4.3.4.3.1. Ruptura de la barrera hematoretiniana	108
4.3.4.3.2. Expresión de VEGF	111
4.3.4.3.3. Expresión de SDF-1	112
5. DISCUSIÓN	113
5.1. Absorción y distribución de GLP-1 tras la administración tópica	116
5.2. Promoción de la supervivencia e inhibición de la apoptosis	117
5.3. Efectos antiinflamatorios	119
5.4. Reversión de las alteraciones microcirculatorias	121
5.5. Acciones de GLP-1 que podrían ser independientes del GLP-1R	122
5.6. Expresión de DPP-IV por la retina	123
5.7. Efectos de la administración tópica temprana de DPP-IVi	124
5.8. Acciones de DPP-IVi que podrían ser independientes del GLP-1R	124
5.9. Evidencias clínicas sobre el efecto de GLP-1RA y DPP-IVi en la RD	125
6. CONCLUSIONES	129
7. BIBLIOGRAFIA	133

# ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Eventos patogénicos de la RD y estructura de las diferentes capas de la retina.	5
Fig. 2 La unidad neurovascular: células endoteliales, neuronas y células gliales.	6
Fig. 3 Esquema que muestra la fisiopatología de la retinopatía diabética.	10
Fig. 4 Activación de NF- $\kappa$ B	15
Fig. 5 Procesamiento post-traducciona l específico de tejido del gen de GLP-1.	18
Fig. 6 Aspecto macroscópico del ojo de ratón (izquierda) y humano (derecha).	27
Fig. 7 Estructura del ojo humano (arriba) y del ojo de ratón (abajo).	27
Fig. 8 Diseño experimental del estudio de la administración tópica de GLP-1 en ratones db/db entre las 21 y 24 semanas de edad.	36
Fig. 9 Diseño experimental del estudio de la administración de DPP-IVi en ratones db/db entre las 10 y las 12 semanas de edad.	37
Fig. 10 Esquema que muestra la respuesta del ERG con las ondas a y b.	39
Fig. 11 Curva estándar de calibrado a partir de un estándar de albúmina bovina sérica (BSA) de 2 mg/m	43
Fig. 12 Contenido de $^{125}$ I-GLP-1 en cristalino (% de dosis aplicada/g).	61
Fig. 13 Contenido de $^{125}$ I-GLP-1 en la retina (% de dosis aplicada/g).	62
Fig. 14 Contenido de $^{125}$ I-GLP-1 en esclera y coroides (% de dosis aplicada/g).	63
Fig. 15 Comparativa del peso corporal entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	64
Fig. 16 Comparativa de la glucemia entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	64
Fig. 17 Comparativa de la respuesta electroretinográfica entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	66
Fig. 18 Comparativa de los potenciales oscilatorios entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	67
Fig. 19 Comparativa del OCT entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	68
Fig. 20 Comparativa de la activación glial entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	69

Fig. 21 Activación microglial entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	71
Fig. 22 Comparativa de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	72
Fig. 23 Análisis comparativo de la expresión del ratio caspasa 9 activa/caspasa total entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	73
Fig. 24 Análisis morfológico de la retina entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	74
Fig. 25 Análisis comparativo de la expresión de moléculas de supervivencia.	75
Fig. 26 Análisis morfológico de las células positivas para Ki-67 en la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	77
Fig. 27 Análisis ortogonal de la co-localización de las células positivas para Ki-67 y calbindina en la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	78
Fig. 28 Análisis comparativo del whole-mount de la retina entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	79
Fig. 29 Evaluación de neovascularización en los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	80
Fig. 30 Análisis comparativo de una inmunofluorescencia para Ki-67 y CD-31.	81
Fig. 31 Efectos de GLP-1 sobre la expresión proteina de VEGF y la expresión génica de <i>Vegf</i> .	82
Fig. 32 Análisis comparativo de la concentración de glutamato en la retina medida por HPLC.	84
Fig. 33 Efectos de GLP-1 sobre la expresión de GLAST.	84
Fig. 34 Efectos de GLP-1 sobre la expresión del receptor de glutamato GluN1 (NMDA) y GluR1 (AMPA).	86
Fig. 35 Efectos de GLP-1 sobre el marcador de estrés oxidativo 8-hidroxiguanosina.	87
Fig. 36 Efectos de GLP-1 sobre el marcador de estrés oxidativo nitrotirosina.	88
Fig. 37 Efectos de la administración tópica de GLP-1 sobre la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ inducida por la diabetes e inhibición de NF- $\kappa$ B por medio de AMPK.	89

Fig. 38 Análisis ortogonal de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B en la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	90
Fig. 39 Análisis de la expresión de los genes <i>Il1b</i> , <i>Il6</i> , <i>Il18</i> , <i>Tnf</i> y <i>Icam1</i> por RT-PCR.	91
Fig. 40 Análisis comparativo de la expresión de IL-1 $\beta$ y IL-6 entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	92
Fig. 41 Análisis comparativo de la expresión de TNF- $\alpha$ entre los vasos sanguíneos de la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	93
Fig. 42 Análisis comparativo de la expresión del gen <i>Nlrp3</i> y la proteína NLRP3 entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.	93
Fig. 43 Estudio de la concentración proteica de DPP-IV y del gen <i>Dpp4</i> en donantes humanos.	95
Fig. 44 Estudio de la expression del gen <i>Dpp4</i> y la proteína DPP-IV en ratón.	96
Fig. 45 Análisis comparativo del peso corporal entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.	96
Fig. 46 Análisis comparativo de la glucemia entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.	97
Fig. 47 Análisis comparativo del peso corporal entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina y los animales db/+ controles.	97
Fig. 48 Análisis comparativo de la glucemia entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina y los animales db/+ controles.	98
Fig. 49 Análisis comparativo de la respuesta electroretinográfica entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina y los animales db/+ controles.	99
Fig. 50 Análisis comparativo de la respuesta electroretinográfica entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.	100
Fig. 51 Análisis comparativo de la activación glial entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con DPP-IVi y los animales db/+ controles.	101
Fig. 52 Análisis comparativo de la activación microglial.	103
Fig. 53 Análisis comparativo de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina y los animales db/+ controles.	104

Fig. 54 Análisis comparativo de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.	104
Fig. 55 Análisis comparativo de la concentración de glutamato en la retina medida por HPLC.	106
Fig. 56 Efectos de los DPP-IVi sobre la expresión de GLAST.	106
Fig. 57 Análisis comparativo de la expresión de moléculas de supervivencia.	108
Fig. 58 Análisis comparativo de una inmunofluorescencia para albúmina y colágeno IV.	109
Fig. 59 Análisis comparativo del whole-mount de la retina entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.	110
Fig. 60 Efectos de saxagliptina y sitagliptina sobre la expresión de VEGF.	111
Fig. 61 Efectos de GLP-1 sobre la expresión de SDF-1.	112
Fig. 62 Rutas de penetración ocular para fármacos administrados de forma tópica.	116
Fig. 63 Esquema que muestra la activación de la señalización del receptor GLP-1R vía CREB/Akt/GSK3B/ $\beta$ -catenin en interaccionar con el ligando GLP-1.	117
Fig. 64 Esquema que muestra la inhibición de NF- $\kappa$ B por medio de la defosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ .	120

# ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Estudio de la absorción y distribución de <sup>125</sup> I-GLP-1	38
Tabla 2. Solución comercial RIPA.	42
Tabla 3 Tampón de lisis.	42
Tabla 4. Tampón del gel resolutivo.	43
Tabla 5 Tampón del gel concentrador.	43
Tabla 6 Gel resolutivo.	44
Tabla 7 Gel concentrador.	44
Tabla 8 Tampón de carga Laemmli.	44
Tabla 9 Tampón de Electroforesis 5X.	45
Tabla 10 Tampón de Electroforesis 1X.	45
Tabla 11 Tampón de Transferencia 5X.	45
Tabla 12 Tampón de Transferencia 1X.	46
Tabla 13 Lista de anticuerpos utilizados para Western Blot.	46
Tabla 14 Solución de deshibridación	47
Tabla 15 Reactivos para la extracción del mRNA de una neuroretina.	48
Tabla 16 Reactivos para la Máster Mix de la ADNsa por neuroretina.	49
Tabla 17 Reacción de la ADNsa.	49
Tabla 18 Reactivos para la Máster Mix de la transcripción inversa por neuroretina.	49
Tabla 19 Reacción de transcripción inversa.	50
Tabla 20 Lista de cebadores o “ <i>primers</i> ” utilizados en esta tesis	51
Tabla 21. Lista de anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.	53
Tabla 22 Descripción de la expresión de GFAP en la retina.	54
Tabla 23 Datos clínicos de los donantes diabéticos y no diabéticos.	57
Tabla 24 Contenido de <sup>125</sup> I-GLP-1 y porcentaje de dosis/g en el cristalino.	61
Tabla 25 Contenido de <sup>125</sup> I-GLP-1 y porcentaje de dosis/g en la retina.	62
Tabla 26 Contenido de <sup>125</sup> I-GLP-1 y porcentaje de dosis/g en coroides y esclera.	63
Tabla 27 Cuantificación de la activación glial.	70
Tabla 28 Análisis comparativo de la activación glial.	102

Tabla 29 Análisis comparativo del porcentaje de células positivas para el TUNEL respecto el número de células totales en las diferentes capas nucleares de la retina (GCL, INL y ONL).105

Tabla 30 Análisis comparativo del porcentaje de células positivas para el TUNEL respecto el número de células totales en las diferentes capas nucleares de la retina (GCL, INL y ONL).105

## RESUMEN DE LA TESIS

La retinopatía diabética (RD) es la complicación más frecuente de la diabetes y representa la primera causa de ceguera en población en edad laboral en países desarrollados. Se trata de una patología progresiva que afecta a la unidad neurovascular de la retina e implica alteraciones en la microcirculación, la glía y las neuronas de la retina como consecuencia de la propia hiperglucemia y las vías patogénicas que desencadena. Previamente, nuestro grupo demostró que el péptido similar al glucagón (GLP-1) está disminuido en las retinas de donantes diabéticos y es capaz de ejercer efectos neuroprotectores en modelos experimentales de diabetes. El objetivo general de esta tesis es reunir una evidencia preclínica sólida que de soporte científico a ensayos clínicos dirigidos a tratar las etapas iniciales de la RD mediante la administración tópica ocular de fármacos agonistas del receptor del GLP-1 (GLP-1RAs) y fármacos inhibidores de la enzima que metaboliza el GLP-1, la DPP-IV (DPP-IVi), en un modelo de diabetes experimental, el ratón db/db.

Para ello, la tesis se divide en 3 partes:

La primera parte se basa en un estudio de farmacocinética y se demuestra que el GLP-1 administrado de forma tópica ocular se internaliza en el ojo y llega a la retina en un modelo murino.

La segunda parte evalúa si la administración tópica de GLP-1 ejerce efectos protectores sobre las alteraciones de la unidad neurovascular inducidas por la diabetes en un modelo experimental de diabetes. Se demuestra que el tratamiento tópico con GLP-1 es capaz de revertir el daño de la unidad neurovascular cuando ya está establecido. El GLP-1 ejerce efectos antiinflamatorios por inhibición de la activación glial. Este efecto se debe a la reducción de la translocación del factor de transcripción nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) que comporta una disminución de las principales citocinas proinflamatorias. Además, GLP-1 promueve las vías de supervivencia neuronal e induce la expresión de Ki-67 en las neuronas, lo que sugiere que la proliferación neuronal puede tener un papel clave en sus efectos neuroprotectores. Finalmente, la administración tópica del GLP-1 revierte la ruptura de la barrera hemato-retiniana.

La tercera parte de la tesis explora la expresión de DPP-IV en la retina humana y murina, así como los efectos neuroprotectores de la administración tópica de DPP-IVi en la RD. Se demuestra que el gen *DPP4* y la proteína DPP-IV están presentes en la retina humana y murina. Además, la administración tópica de DPP-IVi, saxagliptina y sitagliptina, en el ratón db/db evitó la neurodegeneración, la inflamación glial y la extravasación de albúmina.

En conclusión, los múltiples efectos beneficiosos de la administración tópica ocular de GLP-1 y de los DPP-IVi sugieren que la activación del GLP-1R representa una estrategia excelente para tratar la RD.

## ABSTRACT

Diabetic retinopathy (RD) is the most common complication of diabetes and it is the first cause of blindness in adults of developed countries. RD is a progressive pathology that affects the neurovascular unit of retina in which microvessels, glial cells and neurons are damaged as a consequence of hyperglycemia.

In a previous study, our group showed that: 1) The content of glucagon-like peptide 1 (GLP-1) was decreased in diabetic retinas and, 2) GLP-1 exerted neuroprotective effects in DR experimental model. The overarching aim of this thesis is to achieve preclinical evidence which permit us the the design of clinical trials for treating early stages of DR with either agonists of GLP-1 receptor (GLP-1RAs) or inhibitors of the enzyme DPP-IV (DPP-IVi), which increase the life span of GLP-1. For this purpose, we used the experimental animal model of type 2 diabetes, the db/db mouse (BKS.Cg-Dock7m +/+ Leprdb/J).

On this basis, the thesis project is divided in three parts:

The first part, which involves a pharmacokinetic study with radiolabeled GLP-1, shows that GLP-1 was internalized in the retina after the topical administration in the mouse model.

The second part was aimed at assessing whether the topical administration of GLP-1 exerted protective effects against the advanced neurovascular unit impairment induced by long-term diabetes. The results showed the topical treatment with GLP-1 reverted the damage of neurovascular unit induced by diabetes. GLP-1 had anti-inflammatory effects by inhibiting glial activation, transcription factor NF- $\kappa$ B and main pro-inflammatory cytokines. In addition, GLP-1 upregulated neural survival pathways and enhanced the expression of Ki-67, a proliferation marker. This suggested that neurogenesis could play an important role in beneficial effects of GLP-1. Additionally, the topical treatment reverted blood-retinal barrier disruption.

The third part explored the expression and content of DPP-IV in the human and mouse retina and examined whether the topical administration of sitagliptin or saxagliptin (DPP-IVi) had beneficial effects in retina of the murine experimental model. The results showed that DPP-IV was expressed in the retina, and its inhibition by the treatment prevented neurodegeneration, glial activation and vascular leakage.

In conclusion, the multiple beneficial effects observed with the topical treatment of GLP-1 and DPP-IVi in the experimental model suggest that the activation of GLP-1R might be an excellent target for the study of treatments for RD.

# **1. INTRODUCCIÓN**

---



## 1.1. La Retinopatía Diabética

### 1.1.1. Definición y epidemiología

La Retinopatía Diabética (RD) es una patología progresiva que afecta a la unidad neurovascular de la retina. Implica daños en la microvasculatura, la glía y las neuronas de la retina como consecuencia de la propia hiperglucemia y de las vías que activa [1]. Representa la primera causa de ceguera en población en edad laboral de países desarrollados [2]. Se puede presentar tanto en pacientes con diabetes de tipo 1 (T1DM) como en pacientes con diabetes de tipo 2 (T2DM), y los principales factores de riesgo son la hiperglucemia crónica, la hipertensión, la dislipidemia y la presencia de nefropatía [1]. Provoca alteraciones visuales en estadios avanzados por la aparición de edema, hemorragias oculares y desprendimiento de retina [3].

La enfermedad puede progresar desde estadios no proliferativos (NPRD) en los cuales no hay crecimiento de nuevos vasos sanguíneos hasta una etapa más avanzada que es la retinopatía diabética proliferativa (PRD), caracterizada por la aparición anormal de nuevos vasos sanguíneos. La gran mayoría de pacientes con T2DM no van a desarrollar PRD, sino que es mucho más frecuente la evolución hacia el edema macular (DME), que conduce a un aumento en el grosor de la retina.

Según los datos actualizados de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la prevalencia de diabetes en adultos ha aumentado del 4,7% en 1980 hasta 8,5% en 2014. En 2014 había 422 millones de personas con diabetes en el mundo, y se postula un incremento del 69% en el número de pacientes diabéticos entre 2010 y 2030 [4]. Según la Federación Internacional de Diabetes (FID), en el 2045 el número de pacientes diabéticos podría ascender hasta los 693 millones, por tanto aumentando la prevalencia de 8,5% a 9,9% [5]. La T2DM se desarrolla principalmente como consecuencia de un estilo de vida sedentario, poco ejercicio físico y hábitos alimentarios no saludables, y representa entre el 87% y el 95% de todos los casos de diabetes en los países desarrollados [6].

La RD, que afecta al 3-4% de la población europea, es la complicación más frecuente de la diabetes y la primera causa de ceguera en adultos en edad laboral en países desarrollados. Alrededor de un 35% de la población diabética presenta RD, el 7% sufre de PDR y un 10% un

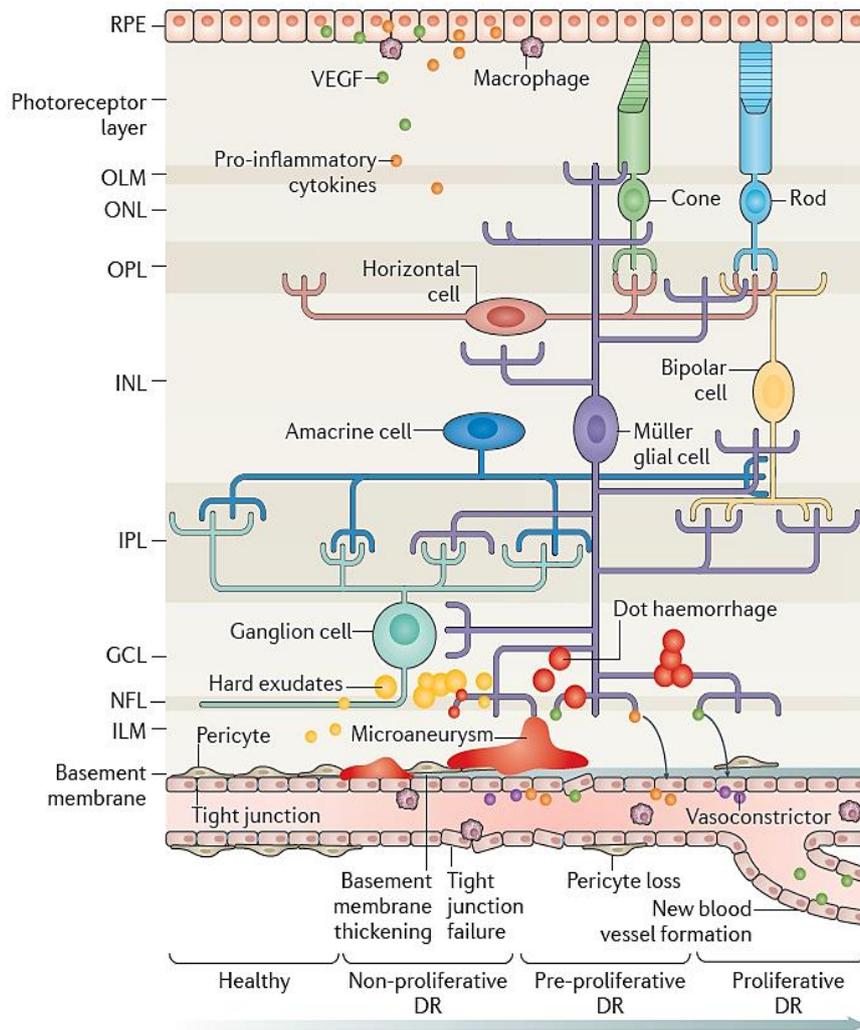
estadio de afectación visual grave con PRD o DME clínicamente significativo [7]. Según la FID, un tercio de los pacientes con T2DM presenta RD [5]. Se sabe que en los pacientes con T1DM hay una mayor probabilidad de que la RD evolucione hacia PRD, en contraposición con los pacientes con T2DM que presentan una mayor prevalencia de DME en estadios avanzados.

Son varios los factores que se han asociado con la aparición y la evolución de la RD. Se considera importante la edad al diagnóstico, grado de control glucémico y el tiempo de evolución de la diabetes [8], así como la hipertensión, la dislipidemia y los factores genéticos entre otros [9]. Se han postulado además algunos polimorfismos génicos como candidatos por participar en la patología de la RD en humanos: *VEGF* [10] [11] [12] [13], NADPH Oxidasa 4 (*NOX4*) [14], sintasa de óxido nítrico inducible (*INOS*) y Aldosa reductasa (*AKR1B1* o *ALR2*) [15] [16] [17].

### **1.1.2. Patogénesis de la Retinopatía diabética**

Aunque en la fase NPRD no se detecta la presencia de vasos sanguíneos de nueva formación, se observan alteraciones microvasculares fundoscópicas debidas a un incremento anormal en la permeabilidad microvascular y la disfunción neuro-glial que precede la afectación de los vasos sanguíneos [18]. En general, la enfermedad evoluciona desde etapas iniciales sin alteraciones microvasculares en el examen oftalmológico hasta una presencia progresiva de microaneurismas, el número de los cuales puede fluctuar en el tiempo. En las etapas más severas se incrementa la permeabilidad y la oclusión vascular pudiéndose desencadenar hemorragias graves [18].

Durante la evolución de las etapas no proliferativas, el aumento de la permeabilidad va acompañado del engrosamiento de la membrana basal y la pérdida de capilares de la retina. Esto es debido a la pérdida de la integridad de los vasos sanguíneos. Más adelante se introducirá el concepto de la barrera hematoretiniana (BHR), que es una barrera funcional que se ve comprometida por la diabetes. La pérdida de los capilares en la retina provoca alteraciones en el flujo sanguíneo que conducen a alteraciones microvasculares que pueden generar isquemia y progresar hacia una fase proliferativa, la PRD, en la cual se forman neovasos (Fig. 1) [18].



**Fig. 1** Eventos patogénicos de la RD y estructura de las diferentes capas de la retina.

Extraído de [18].

Cabe recordar que no todos los pacientes con NPRD evolucionan a una fase PRD. Además, en algunos pacientes la RD puede derivar en DME con independencia de la presencia de neovascularización.

Como consecuencia de la neovascularización de la retina, se produce la contracción del humor vítreo, el cual puede filtrarse a través de la capas de la retina produciendo hemorragias que llevan al desprendimiento de la retina.

### 1.1.3. Fisiopatología de la disfunción de la unidad neurovascular

#### 1.1.3.1. Componentes de la unidad neurovascular de la retina

Se denomina unidad neurovascular a la unidad funcional formada por la interdependencia entre las neuronas, la glía y la vasculatura [19] (Fig. 2). Todos los componentes de la unidad neurovascular están íntimamente ligados de manera que el flujo sanguíneo es regulado dependiendo de las demandas metabólicas del tejido. Este mecanismo, que es conocido como acoplamiento neurovascular, permite dilatar el calibre de la vasculatura retiniana en respuesta a un aumento en la actividad neuronal [20].

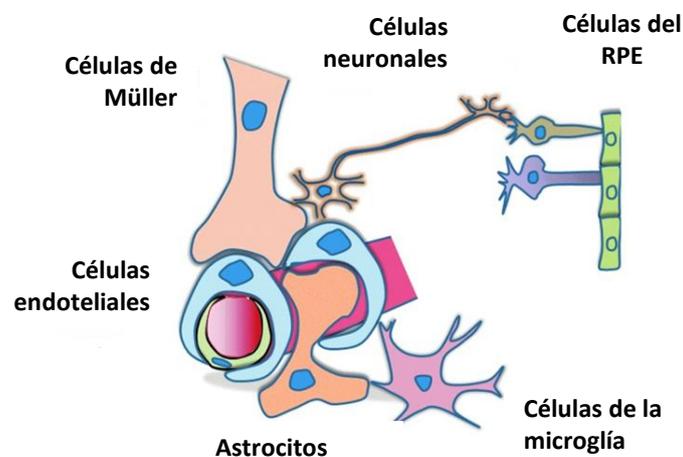


Fig. 2 La unidad neurovascular: células endoteliales, neuronas y células gliales. Modificado de [21].

La unidad neurovascular es posible gracias a que existe una barrera, la BHR, en la que participan no solo células propiamente vasculares, sino que las células gliales también tienen papeles importantes en la regulación del flujo sanguíneo dependiendo de la actividad neuronal. Se trata de una barrera funcional implicada en conservar la homeostasis de la retina regulando el paso de fluidos y moléculas entre las células de la retina y la circulación sistémica. Tiene por tanto una función protectora frente al vertido de moléculas potencialmente dañinas de la sangre al tejido retiniano [22].

Anatómicamente, los diferentes núcleos y axones de las diferentes células dentro de la neuroretina se disponen de una forma estructurada por capas [23] (Fig. 1):

- Capas nucleares: Son las formadas por los núcleos de las diferentes células de la neuroretina.

- Externa (ONL): Contiene los núcleos de los fotorreceptores.
- Interna (INL): Contiene los núcleos de las células bipolares, horizontales, amacrinas y células de Müller.
- Ganglionar (GCL): Contiene los núcleos y los somas de las células ganglionares.
- Capas plexiformes: Son las capas que contienen axones.
  - Externa (OPL): Contienen las sinapsis entre los axones de los fotorreceptores y las dendritas de las células bipolares y horizontales.
  - Interna (IPL): Contienen las sinapsis entre los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares y las amacrinas.
  - Capa de fibras del nervio óptico (NFL): Contiene los axones de las células ganglionares que formaran el nervio óptico. Las fibras se revisten de mielina a medida que el nervio perfora la esclerótica.

Los diferentes tipos neuronales de la retina incluyen las células implicadas en la vía óptica y las células intermediarias:

- Neuronas de la vía óptica retiniana
  - Fotorreceptores: Los fotorreceptores son las células sensoriales de la retina y existen dos tipos: Los bastones, los mayoritarios en la retina murina, son los encargados de percibir la luz tenue y por tanto perciben la gama de grises [24]; y los conos, que se activan con la luz brillante y producen mayor agudeza visual. En el caso de los humanos tienen más relevancia ya que su pigmento, la yodopsina es sensible a los colores del espectro (azul, rojo o verde) [25].
  - Células bipolares: El soma de estas neuronas tiene dos prolongaciones. La apical es dendrítica, y la basal de tipo axón. El axón se subdivide en dos terminales sinápticas y dendríticas que establecen sinapsis con los fotorreceptores [26].
  - Células ganglionares: Neuronas de somas grandes que transmiten por el axón la señal de los fotorreceptores. Más de un millón de axones provenientes de las células ganglionares forman el nervio óptico [27].
- Neuronas de asociación: Sus cuerpos celulares se encuentran en INL, pero establecen contactos sinápticos en las capas plexiformes IPL y OPL.
  - Células horizontales: Neuronas de asociación que liberan GABA inhibiendo los fotorreceptores y las células bipolares en la OPL.

- Células amacrinas: Tienen múltiples prolongaciones pero no tienen axón. Establecen sinapsis con los axones de las células bipolares y las dendritas de las células ganglionares en la IPL [26].

Las células de macroglia están representadas por las células de Müller o astrocitos residentes de la retina y las células de microglia [28].

- Células de Müller o macroglia: Son células radiales situadas transversalmente en todas las capas de la retina [28]. Las células de Müller emiten longitudinalmente proyecciones citoplasmáticas que soportan tanto estructuralmente como metabólicamente el resto de neuronas y vasos de la retina [29]. Las células de Müller proporcionan metabolitos energéticos a las neuronas [30] [31]; evitan la excitotoxicidad de la retina por el glutamato; producen factores neurotróficos y antioxidantes; regulan el equilibrio homeostático hidroeléctrico de la retina y contribuyen a la integridad de la BHR regulando el flujo sanguíneo [28]. Recientemente, se ha descrito su capacidad para regenerar neuronas retinianas [32] ya que tienen propiedades de célula madre progenitora en peces [33], aves [34] e incluso mamíferos [35]. Juegan un papel clave en el desarrollo de la inflamación, ya que con la hiperglucemia se vuelven reactivas (astrogliosis), hiperexpresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) [36] y liberan citocinas proinflamatorias.
- Células de la microglia: Células ameboideas residentes del sistema nervioso y con función inmunitaria innata. Derivan de células madre hematopoyéticas [37] y tienen capacidad para autorenovarse [38]. Juegan un papel inmunitario importante en la defensa contra microorganismos, la iniciación de procesos inflamatorios y la reparación tisular [39]. Además, se ha descrito su participación en la neurogénesis [40] [41] [42], en la función homeostática de las neuronas y la plasticidad sináptica [39] [43] [44].

Finalmente, los vasos sanguíneos de la retina están constituidos por las células del endotelio vascular y los pericitos:

- Células endoteliales: Las células endoteliales que forman los vasos sanguíneos de la retina se unen por uniones adherentes que generan una primera barrera frente a las moléculas de la circulación sistémica. Forman una membrana basal constituida fundamentalmente por colágeno de tipo IV. Con la diabetes, las vías patológicas

inducidas por la hiperglucemia promueven la liberación de citoquinas proinflamatorias por el endotelio.

- Pericitos: Los pericitos son células adyacentes a las células endoteliales de los vasos sanguíneos que juegan un rol en el mantenimiento de la estructura vascular y la BHR. La pérdida de pericitos se ha descrito como una de las principales alteraciones microvasculares de la retinopatía.

La retina tiene un doble sistema de vascularización. Las capas internas son irrigadas por la arteria y vena centrales de la retina, mientras que el epitelio pigmentario y plexiforme externa se irrigan por la red capilar de la lámina coriocalpilar de la coroides.

La BHR externa está formada por complejos de unión zónula ocludens (tight junctions) y zónula adherens (desmosomas) entre la monocapa de células del RPE. Los complejos de unión entre las superficies laterales de las células del RPE reducen el espacio intercelular dificultando el tránsito de moléculas entre retina y coroides garantizando una barrera [22]. Así pues, el paso de nutrientes a los fotorreceptores se realizará únicamente por difusión desde las células epiteliales [45]. La BHR interna está constituida por la zónula ocludens (tight junction) que unen las células endoteliales continuas que forman los vasos sanguíneos de la retina [22]. El endotelio produce también una lámina basal cubierta por prolongaciones de macroglia de tipo astrocito y células de Müller. Además, se pueden encontrar pericitos en contacto con estas células. Tanto las células de la macroglia [46] [47] [48] como los pericitos tienen la capacidad de enviar señales al endotelio para regular el flujo sanguíneo en función de las demandas metabólicas neuronales.

### **1.1.3.2. La afectación de la unidad neurovascular**

La hiperglucemia induce diferentes vías metabólicas [49]:

- Generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) por la cadena respiratoria mitocondrial.
- Incremento de las vías del polirol y la hexosamina.
- Incremento de la síntesis de diacilglicerol (DAG) y activación de proteínas quinasas Ser/Thr de tipo C (PKC).
- Formación de productos de glicosilación avanzada (AGEs)

La activación de estas vías promueve estrés oxidativo e inflamación que afecta a toda la unidad neurovascular, produciéndose una disfunción en el acoplamiento [50]. Como consecuencia de esto, se compromete a todos los integrantes de la unidad neurovascular promoviendo apoptosis neural, alteraciones microvasculares, astrogliosis y activación microglial (Fig. 3).

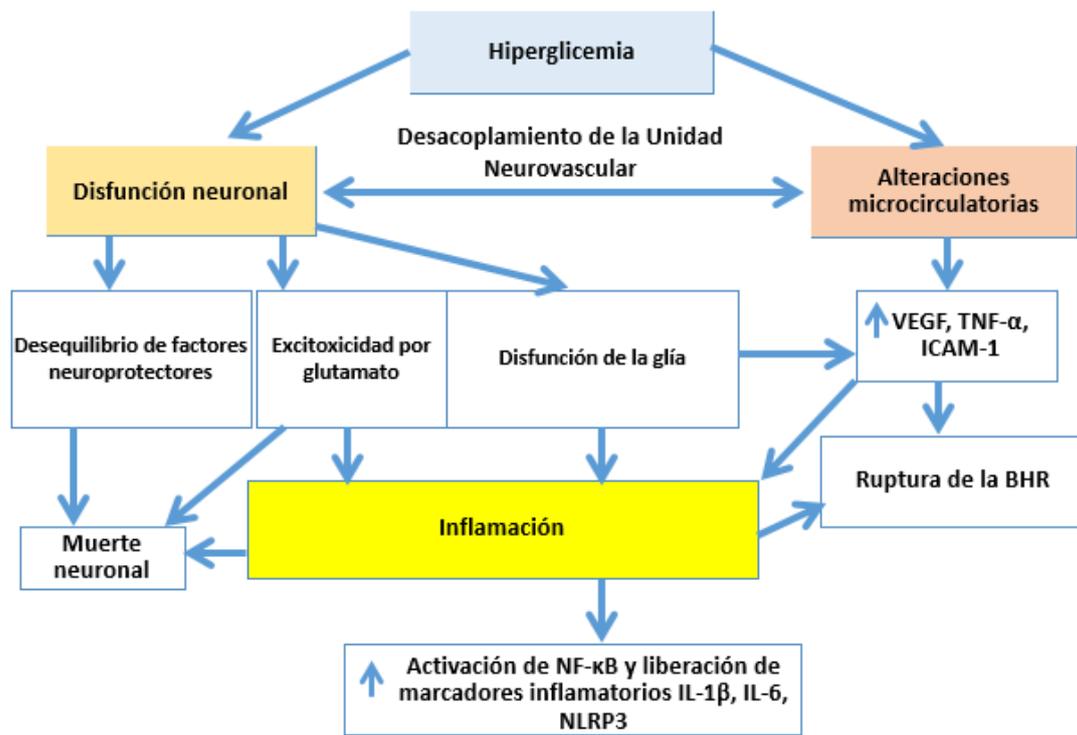


Fig. 3 Esquema que muestra la fisiopatología de la retinopatía diabética.

#### 1.1.3.2.1. Disfunción neuronal

Múltiples evidencias sugieren que la neurodegeneración es un evento temprano en el desarrollo de la RD y podría preceder a las alteraciones microvasculares [19]. Como consecuencia de la patogénesis de la enfermedad, se produce la pérdida de neuronas por apoptosis. Los principales mecanismos que participan en la neurodegeneración inducida por la hiperglucemia son:

- Desequilibrio en la producción retiniana de factores neuroprotectores: Se ha descrito un desequilibrio en la producción de factores que promueven la supervivencia neuronal como BCl-X, PEDF, somatostatina (SST), eritropoyetina o la proteína de fotoreceptores de unión a retinoide (IRBP) [51] [52]. La pérdida de estos factores que

promueven supervivencia junto con el estado basal inflamatorio inducido por la RD promueve la apoptosis [53] [54].

- Acumulación de glutamato extracelular: Los niveles de glutamato, el principal neurotransmisor excitador de la retina, están elevados en la RD. El glutamato en exceso es tóxico ya que sobreactiva principalmente los receptores ionotrópicos del glutamato de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA) produciéndose una acumulación de calcio en las neuronas retinianas que promueve la muerte neuronal. Este proceso es denominado excitotoxicidad por el glutamato [55]. Las células de Müller son las encargadas de su captación en el espacio sináptico mediante la proteína de membrana transportadora de glutamato, también denominada GLAST. El glutamato captado es convertido en glutamina antes de volver a las neuronas, reciclando el sustrato para la síntesis del neurotransmisor.

Además se han descrito algunas alteraciones en la expresión de proteínas sinápticas implicadas en el transporte de vesículas de neurotransmisores como sinapsina-1 o sinaptofisina que podrían contribuir a la disfunción neuronal en la RD [56] [57].

### **1.1.3.2.2. Disfunción endotelial y alteraciones microvasculares**

Las etapas iniciales de la RD incluyen la disrupción de la BHR, el engrosamiento de la membrana basal de los vasos y la pérdida de pericitos y células endoteliales [58].

Como consecuencia de la hiperglucemia y las vías inducidas por ésta, se induce la hiperexpresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en las células de la unidad neurovascular que forman la BHR [59] [60] [61] [62]. El aumento en VEGF juega un papel clave en la ruptura de la BHR [63] induciendo la expresión de diferentes marcadores de inflamación como la proteína de adhesión de células vasculares (VCAM-1) [64] o la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) [65] [66] [67] [68] [69] [70] [71] [72], que conducen a la agregación y la adherencia de leucocitos a la membrana plasmática del endotelio, proceso conocido como leucostasis.

La leucostasis provoca la oclusión de los vasos. Con la reducción del flujo sanguíneo retiniano, la función vasoreguladora de las células endoteliales se ve comprometida. Por consiguiente, el endotelio no es capaz de secretar factores vasoactivos y se produce vasoconstricción de los capilares. En la RD se observa un aumento en la expresión del factor vasoconstrictor

endotelina 1 (ET-1), el cual favorece la oclusión de los vasos y el daño de las uniones adherentes entre las células del endotelio [18]. La oclusión y la vasoconstricción favorecen la disrupción de las uniones adherentes de tipo *tight junction* entre las células endoteliales y por tanto, de la BHR. Como consecuencia de la disrupción de la barrera vascular, se produce la extravasación de líquido del espacio circulatorio al espacio intersticial, produciéndose un engrosamiento de la membrana basal de los vasos. La destrucción gradual de la BHR conlleva a la disfunción de endotelio capilar y compromete por tanto al acoplamiento de la unidad neurovascular [73] [74] [75] [76] [77] [78] [79] [80] [81] [82]. Esto conduce a la inflamación del endotelio y de las células gliales, las cuales expresan marcadores inflamatorios como interleucina 6 (IL-6) o el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) [83]. Estas alteraciones favorecen finalmente la pérdida gradual de los pericitos y las células endoteliales [84].

Uno de los mecanismos por los cuales TNF- $\alpha$  es también un factor clave en la progresión de la enfermedad, es su papel en la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- $\kappa$ B), el cual induce la expresión de más moléculas proinflamatorias como interleucina de tipo 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), TNF- $\alpha$ , el factor quimiotáctico de macrófagos (MCP-1) o ICAM-1 en las células endoteliales y en las células gliales.

#### **1.1.3.2.3. Gliosis reactiva**

Se denomina astrogliosis o gliosis reactiva al proceso de activación glial de las células de Müller. Hasta ahora se desconoce si la gliosis reactiva precede a la apoptosis neuronal, pero lo que sí está claro es que ésta puede favorecer la neurodegeneración causando daño a las neuronas y a los vasos sanguíneos.

Como ya se ha explicado anteriormente, estas células juegan un papel crucial en el mantenimiento de la unidad neurovascular ya que dan tanto un soporte estructural como metabólico al resto de las células de la retina. En condiciones diabéticas estas células hiperexpresan de forma anormal la proteína GFAP a lo largo de sus citoplasmas alargados [36] y esto va acompañado de un incremento en la expresión de VEGF y citoquinas proinflamatorias. El estado inflamatorio de las células de Müller aumenta la permeabilidad vascular por pérdida de las uniones de tipo *tight junction* entre las células endoteliales y las células gliales que forman la BHR contribuyendo a las alteraciones microvasculares [85].

Las células de Müller liberan factores neuroprotectores y captan el glutamato liberado en exceso al espacio sináptico mediante la proteína transportadora GLAST [86]. Así pues, se piensa que la excitotoxicidad por niveles elevados de glutamato de la RD podría deberse en parte por una disminución de la expresión de GLAST por las células de Müller inflamadas, y esto implicaría que se produzca una acumulación del neurotransmisor [85]. Además de alterarse el patrón de expresión de GFAP y VEGF en las células de Müller, otras moléculas como IL-1 $\beta$ , interleucina de tipo 8 (IL-8) [87], IL-6 [88], cyclooxygenasa-2 [89] y acuaporinas [90] son también hiper-expresadas por las células gliales.

Se ha descrito que las células de Müller inflamadas que expresan IL-1 $\beta$  también presentan caspasa 1 activa y acumulan gliceraldehido fosfato deshidrogenasa (GADPH) en el núcleo [91] [92] [93] y esto ocasiona la muerte de las células por un proceso de piroptosis. Se define como piroptosis un tipo de muerte celular regulada que depende de la formación de poros en la membrana plasmática como consecuencia de la activación de caspasas por vía inflamatoria [94] [95]. La inhibición de caspasa 1 y IL-1 $\beta$  previene la piroptosis de las células de Müller [96]. Se cree que en este proceso participan los complejos proteicos intracelulares denominados inflamomas, los cuales contienen receptores para dominios de oligomerización para la unión a nucleótidos (NLRs) que actúan como sensores inflamatorios [97]. El receptor similar a NOD con dominio de pirina (NLRP3) es el más conocido por su papel en diabetes y en la retinopatía diabética [98] [99] [100] [21] [101] [102].

En condiciones diabéticas, las células de microglia también se activan [103] y migran a las capas nucleares de la retina [104]. Durante la progresión de la RD, la activación de NF- $\kappa$ B en las células de la microglia induce un estado basal de inflamación en el que participan diferentes citoquinas proinflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  entre otras [105] [85].

### **1.1.3.3. El papel de la inflamación en la retinopatía diabética**

Las vías metabólicas inducidas por la hiperglucemia activan las PKC. Las PKC participan en la patogénesis de la RD promoviendo inflamación mediante la activación de las proteínas quinasa activadas por mitógeno (MAPK) que conducen a un hiper-expresión de ET-1 y de VEGF. Como ya se ha comentado anteriormente, esto favorece la rotura de la BHR [106] y la expresión de NF- $\kappa$ B [107].

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B tiene un papel crucial en la inflamación de la RD induciendo la expresión de mediadores de inflamación que participan en el desarrollo de la patología como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ , ICAM-1, entre otros [108] [109]. NF- $\kappa$ B forma parte de una familia de proteínas conservadas denominadas Rel, la localización nuclear o citoplasmática de las cuales está regulada por vías de señalización celular [110]. Están constituidos mayoritariamente por mono o heterodímeros de subunidades RelA (también denominada p65), RelB y c-Rel, todas ellas con un dominio de transactivación, y las subunidades p50 (NF- $\kappa$ B1) y p52 (NF- $\kappa$ B2), las cuales son sintetizadas como precursores p105 y p100.

Las vías dependientes de NF- $\kappa$ B contribuyen a la patología de la RD induciendo la liberación de citocinas y moléculas de adhesión que generan un estado inflamatorio basal. La activación clásica del factor de transcripción, que es la mayoritaria en la RD, es inhibida por la forma desfosforilada de la proteína I $\kappa$ B. I $\kappa$ B secuestra a NF- $\kappa$ B bloqueando su translocación nuclear y por tanto impidiendo su unión con el ADN y la activación de la expresión de genes inflamatorios. En condiciones de hiperglucemia, I $\kappa$ B es fosforilado en los residuos Ser32 y Ser36 por el complejo I $\kappa$ B quinasa (Nemo-IKK). Este complejo está formado por las subunidades catalíticas quinasas I $\kappa$ B de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  (IKK $\alpha$  e IKK $\beta$ ) y la subunidad reguladora inhibidora de la quinasa I $\kappa$ B de tipo  $\gamma$  (IKK  $\gamma$ ), también conocida como modulador esencial de NF- $\kappa$ B (NEMO) [111]. Como consecuencia de esto, I $\kappa$ B fosforilado libera a NF- $\kappa$ B, el cual se une al ADN en las regiones específicas  $\kappa$ B de los promotores de genes inflamatorios (Fig. 4).

Las proteínas I $\kappa$ B e IKK están reguladas por múltiples vías como la señalización derivada de la activación de los receptores de TNF- $\alpha$  (TNFR) o los receptores de interleuquinas (IL-R) entre otros. La fosforilación de I $\kappa$ B es una señal de ubiquitinación y degradación por el 26S proteosoma que deja libre al factor de transcripción para unirse al ADN. La activación alternativa de NF- $\kappa$ B, la cual es minoritaria en la RD, implica el procesamiento de p100 en p52 y la fosforilación por el complejo NIK-IKK [112]. Moléculas anti-inflamatorias como los compuestos químicos metformina [113], citicolina [114] y calcio dobesilato [115], o los ácidos orgánicos de origen vegetal como el ácido gálico o el ácido chebulínico [116] y lípidos derivados de omega-3 como Resolvin D1 [117] [118], han demostrado ser potentes inhibidores de la inflamación inducida por NF- $\kappa$ B en retinas con neurodegeneración.

Además de NF- $\kappa$ B, el complejo del inflamosoma es otro factor clave en la inflamación de la retina inducida por la diabetes. Como ya se ha comentado previamente, el inflamosoma está

formado por el receptor NLRP3, el cual se encuentra asociado a la proteína adaptadora de punto asociada apoptosis (ASC) y al enzima efector procaspasa 1. El inflamosoma activado por las vías patológicas inducidas por la hiperglucemia conduce a una retroalimentación positiva de la inflamación con la maduración de más citoquinas proinflamatorias [119]. Se ha sugerido que la muerte de las células de Müller sería un mecanismo de supervivencia con el fin de disminuir la secreción de IL-1 $\beta$  [120].

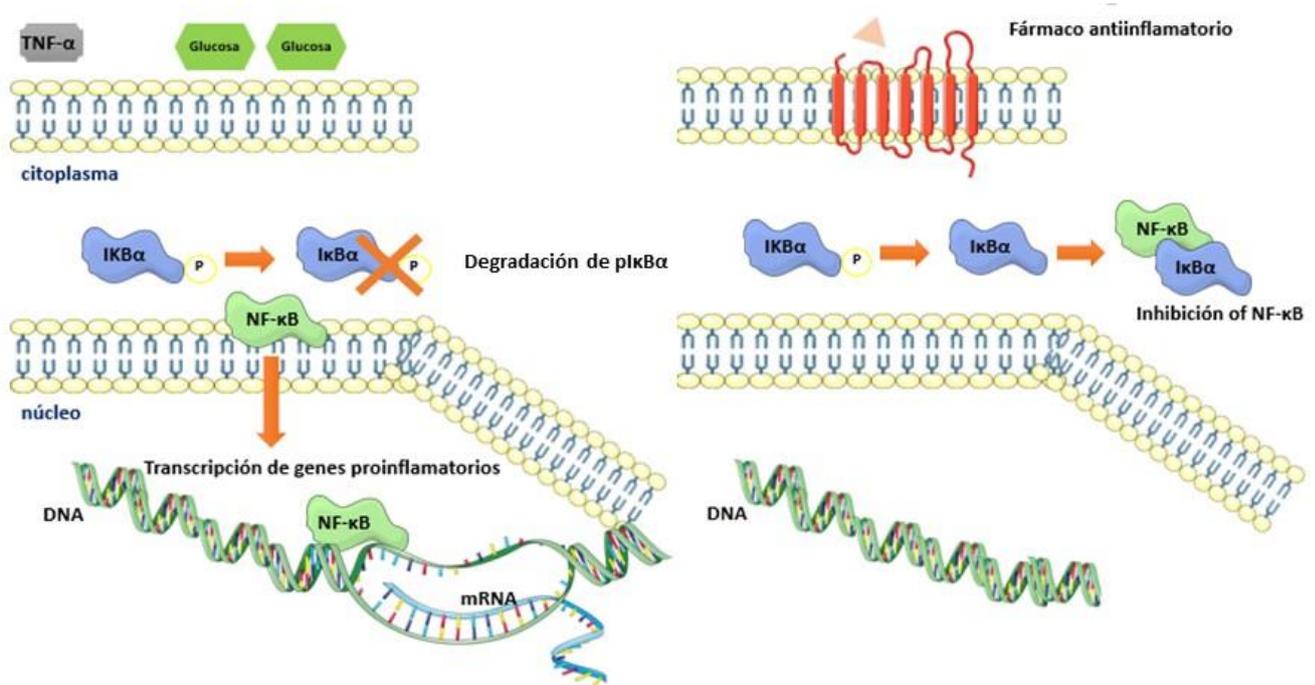


Fig. 4 Activación de NF- $\kappa$ B

#### 1.1.4. Tratamientos actuales

El tratamiento con fotocoagulación con láser se introdujo en los años 60 y en la actualidad continua siendo la principal arma para evitar la progresión de la RD. El problema es que, en muchos casos, este tratamiento pierde efectividad porque se indica demasiado tarde. Por tanto es indispensable realizar exámenes periódicos de fondo de ojo para diagnosticar precozmente la RD e indicar en el momento oportuno el tratamiento con fotocoagulación. La panfotocoagulación puede detener la progresión de la PDR aunque no en todos los casos. Este tratamiento puede tener efectos adversos como la reducción de la visión periférica y una

disminución de la adaptación a la oscuridad. Estos cambios pueden afectar a la capacidad de conducir y reducir la percepción de los colores y contrastes [121] [122] [123].

Los nuevos tratamientos con fármacos anti-VEGF, de administración intravítrea, han mejorado de manera sustancial el pronóstico [124]. Actualmente existen varios agentes anti-VEGF como el ranibizumab o el aflibercept, sin embargo tienen limitaciones ya que el 50% de los pacientes no responde de forma óptima y no están exentos de efectos secundarios [125] [126] [127]. Cuando se producen complicaciones más avanzadas como la hemorragia vítrea o el desprendimiento de retina es necesario recurrir a la cirugía vítreo-retiniana [18].

Así pues, en la actualidad, los tratamientos específicos para la RD van dirigidos a tratar la enfermedad en estadios avanzados. Por ello, es necesario disponer de nuevas estrategias terapéuticas que puedan emplearse en fases más precoces para prevenir la pérdida visual. Estas nuevas terapias deberán basarse en los mecanismos que producen la RD anteriormente mencionados. En este sentido, un abordaje novedoso para prevenir las alteraciones vasculares propias de la RD es la neuroprotección.

Para tratar las primeras etapas de la RD sería inconcebible indicar un tratamiento agresivo como las inyecciones intravítreas. La vía tópica ocular no se había considerado apropiada para la administración de fármacos dirigidos al tratamiento de la RD, debido a la asunción general de que los fármacos no alcanzarían la retina o el humor vítreo en el polo posterior del ojo. Sin embargo, recientes evidencias en modelos animales indican que algunos fármacos administrados en colirio sí que son capaces de llegar a la retina a concentraciones suficientes para producir efectos terapéuticos beneficiosos. Estos resultados abren la posibilidad de desarrollar terapias tópicas para indicar en las primeras etapas de la RD. En este sentido, nuestro grupo ha liderado el primer ensayo clínico utilizando fármacos neuroprotectores en colirio [128].

## **1.2. El péptido GLP-1**

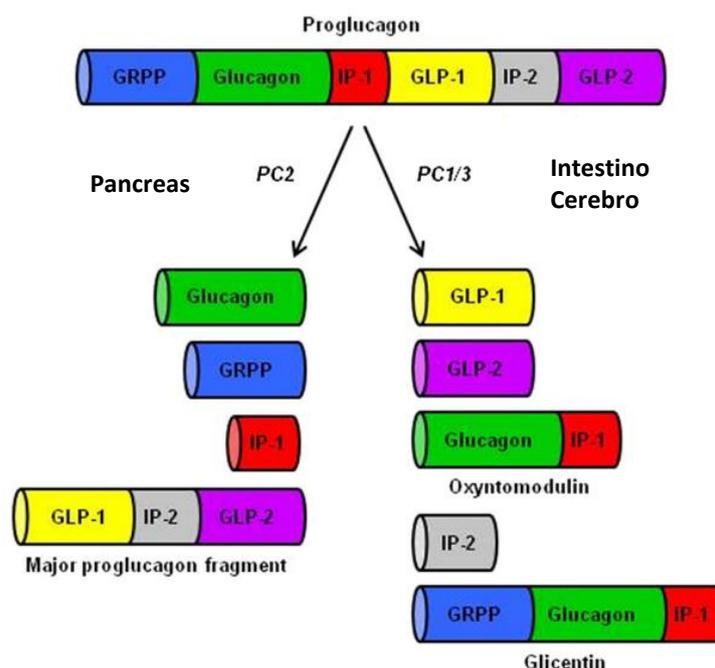
El péptido 1 similar al glucagón (Glucagon-Like Peptide-1) (GLP-1), de 30 aminoácidos, es liberado en respuesta a nutrientes como glucosa, aminoácidos y ácidos grasos por las células L del intestino en la región del íleon [129] y por neuronas preproglucagonérgicas principalmente del núcleo del tracto solitario, el bulbo olfatorio y la formación medular reticular caudal [130] [131]. GLP-1 reduce la hiperglucemia por estimulación de la secreción

pancreática de insulina (efecto incretina) y al mismo tiempo por medio de la inhibición de la secreción del glucagón. Además, regula el vaciado gástrico y participa en la vía de saciedad en el Sistema Nervioso Central controlando la ingesta y la homeostasis de la glucosa [132] [133]. La función de las incretinas, tanto de GLP-1, como del Péptido 2 similar al glucagón (GLP-2) y el Polipéptido inhibidor gástrico (GIP), se encuentra reducida en la T2DM, y esto contribuye a la hiperglucemia postprandial que presentan los pacientes. Cabe destacar que la actividad insulínica de GIP es negligible en comparación con la del péptido GLP-1 [134] [135] [136]. La secuencia de nucleótidos del gen del glucagón codifica para una proteína precursora que por proteólisis por las enzimas convertasas PC1/2/3 produce glucagón, GLP-1 y GLP-2 (Fig. 5). Estas modificaciones pos-traduccionales son específicas de tejido, de manera que las células intestinales o las neuronas producen los péptidos maduros GLP-1 y GLP-2, mientras que por ejemplo las células alfa-pancreáticas generan glucagón pero no GLP-1.

Se ha demostrado que GLP-1 y su receptor, (GLP-1R) se expresan en el Sistema Nervioso central [129] [137] [138] [139] [140] [141] [142] donde al igual que el receptor de GLP-2 (GLP-2R) tendrían papeles clave como señales neuroendocrinas en la regulación de la ingesta y la homeostasis de la glucosa [143].

Nuestro grupo demostró la expresión del GLP-1R en la retina de pacientes humanos y en el modelo de ratón diabético db/db [144]. Además, otros autores han descrito la expresión de GLP-1R en modelos *in vitro* de células de Müller (rMc-1) [145], células ganglionares (RGC-5) [146], ARPE-19 [147] [148] y en modelos *in vivo* de rata [149] [148] y de pollo [150].

Un estudio de Hebsgaard et al. muestra una baja expresión de GLP-1R en la retina de humanos [151]. Estos resultados se podrían explicar en parte a que las muestras control utilizadas en el estudio fueron obtenidas tras enucleación para tratamiento de cáncer extraocular. Las muestras de pacientes diabéticos con PDR tratados con fotocoagulación también procedieron de enucleaciones indicados por dolor. Los pacientes sometidos a enucleación presentan una neurodegeneración muy avanzada asociada a ceguera de manera que en estas condiciones los resultados no son representativos de lo que ocurre en la RD [152].



**Fig. 5 Procesamiento post-traduccionnal específico de tejido del gen de GLP-1.**  
 Extraído de [153].

La vida útil de las formas fisiológicamente activas de GLP-1 (7-36) (7-37) en plasma es inferior a los dos minutos ya que es rápidamente inactivado por el enzima diaminopeptidil peptidasa IV (DPP-IV). La acción de DPP-IV genera una forma inactiva de GLP-1 (9-36) y un dipéptido residual de alanina e histidina [142]. Además, endopeptidasas como la metalopeptidasa neprilisina o la endopeptidasa NEP 24.11 [154] [155] [156] [157] son capaces de metabolizar la forma GLP-1 (9-36) para generar los péptidos inactivos GLP-1 (28-36), GLP-1 (32-36), GLP-1 (28-37) y GLP-1 (32-37) [158].

Sin embargo, como se comentará en el apartado de la discusión, algunos estudios sugieren que las formas inactivas de GLP-1, que no tienen afinidad por el GLP-1R, podrían presentar efectos protectores y estas acciones por tanto, serían independientes del receptor [159] [160] [161] [162] [163] [164] [165] [166] [167] [168] [169] [170].

Debido a sus efectos hipoglucemiantes, los agonistas del receptor de GLP-1 (GLP-1RAs) se utilizan en la clínica para controlar la hiperglucemia en los pacientes con T2DM y se administran por vía subcutánea. Los GLP-1RAs fueron introducidos en la práctica clínica en el año 2005. Todos los GLP-1RAs comercializados liraglutide, exenatida, lixisenatida, etc... se unen y activan específicamente el receptor GLP-1R. Los pacientes tratados con estos fármacos presentan una menor hemoglobina glicosilada (HbA1c) respecto a los pacientes tratados con

placebo y disminuyen de peso [171]. Además, se han demostrado efectos cardioprotectores [172]. La secuencia de aminoácidos de estos péptidos es muy similar a la de la molécula nativa, pero presentan diferentes peculiaridades en su estructura química que les permite ser más resistentes a la degradación catabólica por el enzima DPP-IV. Los GLP-1RAs de corta acción como exenatide y lixisenatide tienen una vida media en plasma de entre 2 y 4 horas y se eliminan por vía renal. Los GLP-1RAs de larga acción en cambio, permiten una activación continua del receptor sin grandes cambios en su concentración en plasma. Esto se debe a cambios en su estructura química como la incorporación de otras moléculas que dificultan la actuación catalítica de la enzima DPP-IV sobre estas moléculas.

Otra estrategia hipoglucemiante posible es la inhibición de la enzima DPP-IV. Mientras que la administración de los GLP-1RAs activa farmacológicamente el receptor, el tratamiento con inhibidores de DPP-IV (DPP-IVi) incrementa los niveles fisiológicos de GLP-1 al inhibir su degradación catabólica. En 2006 se aprobó sitagliptina como primer DPP-IVi. El segundo inhibidor que apareció en el mercado fue saxagliptina. Actualmente, en el mercado europeo se dispone de otros DPP-IVi como vildagliptina, linagliptina y alogliptina [173] [174].

### **1.2.1. Activación del receptor de GLP-1**

#### **1.2.1.1. Activación de GLP-1R por la vía de cAMP/CREB y PI3K/Akt**

La actividad fisiológica clásica de GLP-1 se produce con la interacción con su receptor, GLP-1R, el cual es una proteína transmembrana de la membrana plasmática de diferentes tipos celulares. En el cerebro se ha detectado su expresión en córtex frontal, hipotálamo, tálamo, hipocampo, sustancia nigra y cerebelo [129] [137] [138] [139] [140] [141] [142].

GLP-1R pertenece a la familia de receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). El receptor presenta 7 hélices  $\alpha$  transmembrana, con un dominio carboxilo terminal citoplasmático y un dominio amino terminal extracelular [175] [176]. El mecanismo clásico de activación del receptor implica la interacción de GLP-1R con el GLP-1, o bien un agonista, que desencadena un cambio conformacional y la activación de la vía de GS-Adenilato ciclasa (AC) incrementando los niveles celulares del segundo mensajero celular Adenosin monofosfato cíclico (cAMP) [142] [177]. cAMP activa efectores como la proteína quinasa activada por adenosin monofosfato cíclico (PKA) y el factor intercambiador activado por adenosin

monofosfato cíclico (EPAC). Por vía dependiente de PKA y EPAC, se produce una despolarización de la membrana gracias a la apertura de canales de potasio y un flujo intracelular de calcio por activación de canales de calcio dependientes de voltaje que culminan con una fosforilación de PKA [178]. Por último, se regula la expresión génica por activación de los elementos de respuesta activados por cAMP (CRE) que controlan genes de supervivencia por medio de la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB).

CREB es un factor de transcripción que pertenece a una superfamilia de factores activadores de transcripción. Es activado por fosforilación en la posición Ser133 en respuesta al segundo mensajero cAMP. Una vez fosforilada, se cree que la proteína CREB sufre un cambio conformacional que le permite unirse a la secuencia del promotor de sus genes diana en las regiones específicas CRE. Además, CREB se une a coactivadores como la proteína de unión a CREB (CBP) que le permiten ejercer su efecto regulador. CREB en su forma fosforilada es considerado un regulador general de supervivencia en neuronas ya que su activación promueve la expresión génica de genes que inhiben la apoptosis neuronal [179].

Además de la vía clásica de cAMP, diferentes estudios relacionan la activación del GLP-1R y la inducción de la vía de Fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y la proteína quinasa de tipo B (PKB), también conocida como Akt [180] [181]. Esta proteína forma parte de una familia de proteínas con un dominio central con actividad quinasa en residuos de serina o treonina. Diferentes estudios muestran que GLP-1 puede ejercer efectos sobre diferentes tipos celulares mediante la activación de la vía PI3K/Akt [182] [183] [184] [185] [186] [187]. Múltiples evidencias sugieren que la activación de Akt es esencial para la supervivencia de células neuronales [188] [189] [190] [191] [192]. El estudio de Rajala A. demostró que la activación de Akt es necesaria para la neuroprotección de los fotorreceptores [193]. Además de activar CREB, la fosforilación de Akt induce vías de señalización de supervivencia y de inhibición de la apoptosis por fosforilación de proteínas apoptóticas [194]. Así pues, la fosforilación de Akt es considerada una señal de supervivencia neuronal [195].

### **1.2.1.2. Evidencias de neuroprotección por los GLP-1RAs**

Múltiples evidencias indican que la administración de GLP-1RAs tiene efectos protectores a nivel del sistema nervioso [196] [197] [198] [199]. Un ensayo clínico del 2018 confirma que el agonista exenatide ejerce neuroprotección frente a la isquemia cerebral [200] y hay varios

ensayos clínicos en marcha con el objetivo de comprobar los efectos neuroprotectores y antiinflamatorios de los GLP-1RAs en pacientes con Parkinson (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03659682; NCT04305002; NCT02953665); y en pacientes con Alzheimer (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01843075).

Muchos de estos ensayos clínicos se fundamentan en las evidencias experimentales de la neuroprotección que ejercen los GLP-1RAs en diferentes modelos animales de Alzheimer [201] [202] [203] [204] [205] [206] [207] [208] [209], Parkinson [210] [211] [212] [213] [214] [215] [216], deterioro cognitivo [217] [218] o isquemia cerebral [219] [220]. Todos estos estudios demuestran que los GLP-1Ras son capaces de inhibir la apoptosis y promover la expresión de factores de supervivencia neuronal además de presentar efectos antiinflamatorios en modelos animales.

Destacan el estudio de Bertilsson G. y colaboradores, el cual muestra que el agonista exendin-4 es capaz de promover neurogénesis en el animal adulto con Parkinson normalizando el número de neuronas dopaminérgicas y el desequilibrio en los niveles de dopamina en la sustancia nigra [221] y el de Harkavyi A. y colaboradores en el que exendin-4 también es capaz de detener la progresión de la enfermedad de Parkinson revertiendo la lesiones ya establecidas en la vía dopaminérgica [222]. Otros estudios en animales han mostrado efectos neurotróficos de los GLP-1RA: en los estudios de Perry T. y colaboradores el tratamiento con un GLP-1RA induce el crecimiento de neuritas [223] [224] [225]; y en el de Porter y colaboradores el tratamiento con liraglutide promueve la plasticidad sináptica y la neurogénesis en el hipocampo de ratón con obesidad severa e insulino-resistencia (ob/ob) [226]. Una publicación de Yang J. L. y colaboradores demuestra por primera vez que la neuroprotección de GLP-1 en las enfermedades neurológicas se podría deber en parte a una activación de mecanismos de reparación del ADN. En su estudio muestran que vía Akt, GLP-1 incrementa la actividad del enzima de reparación Apurínico/apirimidínico endonucleasa (APE1) protegiendo del daño por estrés oxidativo [227].

En cuanto a los efectos beneficiosos en la retina, diferentes estudios mostraron que los GLP-1RAs presentan efectos neuroprotectores en la retinopatía inducida por la diabetes aumentando la expresión de marcadores de supervivencia, mejorando la respuesta del electroretinograma y disminuyendo los niveles de marcadores apoptóticos o relacionados con el estrés oxidativo [228] [229] [230] [231] [145] [232].

Sin embargo, es relevante destacar que en los estudios en los que disminuye la glucemia por el tratamiento no es posible discernir si la mejora es debida a la bajada de la glicemia o a un efecto directo de los GLP-1RAs. Por este motivo, los estudios de nuestro grupo se realizan mediante administración tópica. En un estudio previo, comparando diferentes GLP-1RAs, demostramos que la activación de GLP-1R y Akt por vía tópica previene el desarrollo de las alteraciones iniciales de la RD en el ratón diabético db/db [144]. Otros grupos también han demostrado posteriormente que el tratamiento tópico con GLP-1RAs puede detener la neurodegeneración por medio de la activación de GLP-1R y Akt [233].

Además de un papel promotor de la supervivencia y protector frente a la apoptosis, varias publicaciones sugieren una acción antiinflamatoria de GLP-1 disminuyendo la expresión de diferentes marcadores de inflamación como TNF- $\alpha$ , IL- $\beta$  o ICAM-1 en otros [234] [235] [236] [237] [238] [239] [240] [241] [242] [243] [244] [245] [246]. Diversos estudios muestran que el principal mecanismo antiinflamatorio de los GLP-1RAs implica la inhibición del factor de transcripción NF- $\kappa$ B [247] [248] [249] [250] [251]. Recientemente, se ha descrito que la proteína quinasa serina/treonina activada por adenosina monofosfato (AMPK), implicada en la regulación de la homeostasis metabólica, podría participar en la inhibición de la inflamación inducida por NF- $\kappa$ B [252] [253] [254] [255] [113] [256]. De hecho, varios estudios muestran que diferentes GLP-1RAs activan la proteína AMPK en diferentes tipos celulares [257] [258] [259] [260] [261] [262] [263] [264]. Los estudios de Yang, Y. y colaboradores [262] y Krasner y colaboradores [265] muestran por ejemplo que liraglutide tiene efectos beneficiosos por un mecanismo mediado por AMPK. Este hallazgo es muy interesante porque indica que la activación de GLP-1R podría ejercer una acción antiinflamatoria inhibitoria de NF- $\kappa$ B por medio de AMPK, aunque el mecanismo no se ha comprobado en retina.

### **1.2.1.3. Evidencias de neuroprotección por inhibición de DPP-IV**

Ya que los inhibidores de DPP-4 impiden la degradación de GLP-1 y por tanto, incrementan su concentración efectiva disponible, no es de extrañar que también se consideren a los DPP-IVi como fármacos neuroprotectores. Diversas publicaciones muestran que los DPP-4i inhiben la inflamación inducida por NF- $\kappa$ B en diferentes modelos animales [266] [267] [268], promueven la supervivencia neuronal [269] e inducen la proliferación de células madre de tipo neuronal

[270] protegiendo en modelos de enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer y Parkinson [268] [271] [272] [273].

En cuanto a la protección de los DPP-4i en la retina, recientemente se han publicado algunos estudios. Sitagliptina y Linagliptina suprimieron la inflamación inducida por TNF- $\alpha$  en cultivos primarios de células endoteliales de retina bovina [274] y en cultivos primarios de células endoteliales de retinas humanas [275]. Linagliptina tuvo además efectos protectores en la microvasculatura retiniana de ratas diabéticas por STZ mostrando efectos neuroprotectores y antioxidantes [276]. En un modelo animal de retinopatía inducida por oxígeno (OIR), la administración de linagliptina tuvo efectos anti-angiogénicos independientes del GLP-1R. La publicación de Kolibabka y colaboradores muestra que sus efectos protectores estaban mediados por la inhibición de la señalización de VEGF/ERK1-2, y los resultados fueron similares tanto en el ratón *wild-type* C57BL/6J como en un modelo de ratón knock-out para GLP-1R (Glp1r $^{-/-}$ ), demostrando que el DPPiVi podría actuar de forma independiente del receptor [277].

### 1.3. Modelo animal

#### 1.3.1. Modelos de ratón diabético

La mayoría de los modelos animales de diabetes que se utilizan para estudiar la RD se basan en la destrucción de las células  $\beta$  productoras de insulina, de manera que imitan la T1DM. En el caso de la T2DM, algunos modelos inducen diabetes asociada a la obesidad por mutaciones espontáneas o dieta, pero como ocurre en los modelos de T1DM, no replican las fases avanzadas de la RD. Existen modelos que sí presentan neovascularización pero no reproducen la fisiopatología de la RD al no ser diabéticos [278]. Así pues, no existe un modelo completo que reproduzca toda la evolución patológica de la RD, desde una fase no proliferativa hasta una PRD grave, que ocurre en el ser humano. A continuación se presentan los principales modelos de ratón diabético disponibles.

### 1.3.1.1. Modelos portadores de una mutación endógena

- **Ratón db/db (*Lepr<sup>db</sup>*):** Este modelo de ratón presenta una mutación espontánea en el gen de la leptina que se transmite por herencia autosómica recesiva. Como consecuencia, muestran una T2DM asociada a la obesidad. Entre las 4 y las 8 semanas de edad se eleva la glucemia y a partir de las 8-10 semanas de edad comienzan a presentarse las principales complicaciones de la diabetes como la RD. Como características patológicas de la retina, presentan: gliosis reactiva, apoptosis neuronal, pérdida de pericitos y capilares acelulares, micro-roturas de la barrera hematoretinal y alteraciones en el ERG [144] [279]. En el apartado siguiente se hablará ampliamente de este modelo puesto que es el utilizado en el diseño experimental.
- **Ratón Ins2 Akita:** El ratón Akita presenta una mutación dominante en el gen de la insulina 2. Como consecuencia, el animal portador de la mutación tiene hiperglucemia y sufre de hipoinsulinemia. Este modelo exhibe características propias de la RD: se observa una permeabilidad vascular incrementada, leucostasis, adelgazamiento de la IPL y la INL y alteraciones en la morfología de astrocitos y microglía pero no presenta gliosis reactiva, un marcador muy importante de neurodegeneración [280] [281].
- **Ratón diabético no obeso (NOD):** Se trata de un modelo poligénico autoinmune que presenta mutaciones en múltiples genes. Surgió de manera espontánea y presenta a partir de los 8 meses de edad síntomas parecidos de la T1DM [282], reproduciendo la base autoinmune de la enfermedad [283]. Este ratón presenta RD con pérdida de vasos retinianos, proliferación focal de nuevos vasos y un aumento en la expresión de endotelina [284].

### 1.3.1.2. Modelos inducidos farmacológicamente

- **Inducción de la diabetes por estreptozotocina (STZ):** La STZ es tóxica para las células  $\beta$ -pancreáticas tras internalizarse a través de los transportadores de glucosa (GLUT2). La inyección de STZ por vía intraperitoneal provoca la alquilación del ADN con formación de radicales de oxígeno que ocasionan la muerte celular por toxicidad. Esto genera una T1DM con pérdida de la capacidad para sintetizar insulina pero sin una base autoinmune. Estos animales diabéticos presentan una pérdida de pericitos, daño en las células endoteliales, rotura de la BHR y muerte de células ganglionares [285]

[286]. El principal inconveniente de este modelo es que la STZ puede provocar toxicidad directa en la retina además de generar mucha variabilidad en los resultados puesto que cada animal presenta una sensibilidad diferente al fármaco. Ya que los ratones son más resistentes a la STZ que las ratas, existen más publicaciones que utilizan el modelo en rata que en ratón [287] [288] [289].

- Inducción de la diabetes por Alloxano: El alloxano es un compuesto orgánico con una estructura molecular similar a la glucosa que genera radicales de superóxido que también destruyen por toxicidad las células  $\beta$ -pancreáticas [290].

### 1.3.1.3. Modelos con retinopatía proliferativa

La mayoría de modelos que sobreexpresan moléculas angiogénicas y presentan neovascularización no son diabéticos, de manera que no extrapolan los mecanismos patogénicos observados en pacientes diabéticos humanos.

- Retinopatía inducida por oxígeno (OIR): Este modelo es generado al someter los ratones a isquemia por hipoxia después de una exposición de 5 días a una presión parcial de oxígeno del 75% [291] [292] [293] [294].
- Kimba (*trVEGF029*): Es un ratón transgénico que sobreexpresa VEGF [295] [296].
- Akimba (*Ins2Akita VEGF+/+*): Es generado por el cruce de ratones Kimba y ratones Akita [297] [298].

### 1.3.2. El ratón db/db como modelo de Retinopatía Diabética

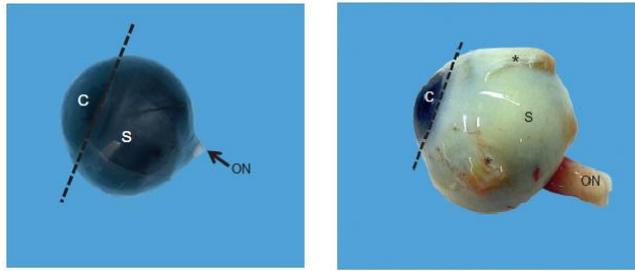
En la presente tesis se trabaja con el ratón db/db (BKS.Cg-*Dock7<sup>m</sup>* +/+ *Lepr<sup>db</sup>*/J) de “Charles River”. Se trata de una cepa congénica que proviene originalmente de “The Jackson Laboratory” con una mutación recesiva espontánea en el gen que codifica para el receptor de la leptina [299]. Los ratones homocigotos con la mutación espontánea (*Lepr<sup>db</sup>*) se convierten en obesos identificables des de las 3-4 semanas de edad. La elevación en sangre de la insulina se produce entre los 10 y 14 días, y la hiperglucemia entre las 4 y las 8 semanas de edad. Los animales heterocigotos no son diabéticos db/+ (BKS.Cg-*Dock7<sup>m</sup>* + *Lepr<sup>db</sup>*/ +); presentan un peso, glucemia e insulinemia normales [299]. La leptina es una molécula pleiotrópica de tipo citocina que regula el apetito y participa en el mecanismo de saciedad a través de su receptor.

La deficiencia del receptor en el ratón db/db produce múltiples efectos como polifagia, polidipsia, poliuria, así como complicaciones neuropáticas y miocárdicas. Estos animales también presentan una supresión de la función reproductora, una inhibición de la función tiroidea, [299] [300] [301], y una deficiencia en la inmunidad mediada por las células T [302] [303].

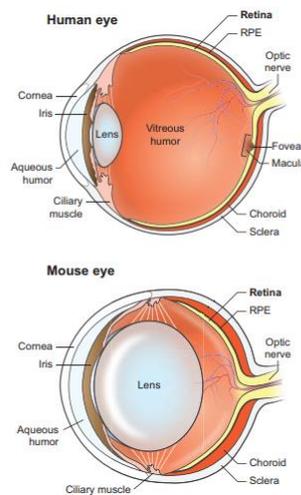
Previamente nuestro grupo realizó un estudio observacional en el ratón db/db para caracterizar la neurodegeneración de la retina que se corresponde con los estados iniciales de la RD en humanos [304]. Se demostró que a partir de las 10 semanas de edad, los ratones db/db empiezan a presentar una disfunción neuronal temprana con inflamación glial y alteraciones funcionales provocados por la hiperglucemia, características que también se encuentran en retinas de pacientes diabéticos con neurodegeneración [304]. Aunque el modelo animal evoluciona hacia una fase en la que se presenta un mayor grado de anomalías microvasculares, como ya se ha comentado, no replica la formación de nuevos vasos sanguíneos propia de la PRD. El ratón db/db, aunque no permite evaluar el tratamiento de la neovascularización característica de la PRD, es un modelo idóneo para estudiar estrategias terapéuticas destinadas a la prevención de la RD o a su tratamiento en fases iniciales.

### **1.3.3. Anatomía comparada de la retina en el humano y en el ratón.**

El globo ocular, que se localiza dentro de las órbitas óseas, se comunica por la parte posterior con el encéfalo por medio del nervio óptico. El ojo de ratón mide unos 4mm de diámetro mientras que el humano mide aproximadamente 25mm [305]. En el ojo humano, la acomodación visual se realiza gracias al cristalino, una lente biconvexa que delimita la cámara posterior bañada por el humor acuoso y la cavidad vítrea, bañada con el cuerpo vítreo [23]. En el ratón en cambio, la lente es esférica y es mucho más grande en proporción con el tamaño del ojo, ocupando casi toda la cámara vítrea [305]. Este hecho junto al pequeño tamaño del ojo de ratón tiene como consecuencia que sea prácticamente imposible poder extraer el cuerpo vítreo del ojo de ratón. En el ratón la esclerótica o esclera, es tan delgada que la capa oscura inferior, la coroides, es visible dándole al ojo una apariencia oscura muy diferente del ojo humano [305], tal y como se puede observar en la Fig. 6.



**Fig. 6 Aspecto macroscópico del ojo de ratón (izquierda) y humano (derecha).  
C: Córnea, S: Esclerótica, ON: Nervio óptico. Modificado de [305]**



**Fig. 7 Estructura del ojo humano (arriba) y del ojo de ratón (abajo).  
Modificado de [306].**

Respecto a la retina, el número de fotorreceptores de tipo cono en el ratón representa el 2,8% del total de fotorreceptores totales de la retina [307], mientras que en el ser humano se ha descrito que el número de conos puede representar desde un 3% hasta un 5% [308] [309]. La principal diferencia entre la retina humana y la de ratón es la mácula. La mácula, cuya zona central es denominada fovea, es una especialización de la retina responsable de la alta resolución en la agudeza visual, y está formada principalmente por células sensibles a la luz de tipo cono [310]. La retina de ratón no presenta fovea ni mácula [306] (Fig. 7). Esto ocasiona que el roedor presente una visión dicromática y no una tricromática como el ser humano.



## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

---



### 2.1. Hipótesis

Resultados previos del grupo mostraron que la retina humana y de ratón expresa GLP-1 y su receptor, y que la diabetes induce una disminución de los niveles proteicos de GLP-1 en la retina. Se demostró que la administración por vía subcutánea de GLP-1RAs previno los principales marcadores de neurodegeneración en retina (apoptosis y gliosis reactiva) en un modelo experimental de diabetes, el ratón db/db.

No obstante, estos efectos beneficiosos podrían ser atribuibles al efecto hipoglucemiante y no por una acción *per se* del fármaco. Por esta razón, se realizó un estudio experimental en el que se administraron diferentes GLP-1RAs por vía tópica ocular. La administración de GLP-1RAs en colirio previno el desarrollo de los estadios iniciales de la RD sin afectar a los niveles de glucemia, demostrando que estos fármacos presentan efectos neuroprotectores independientes de su acción insulínica [144]. Estos resultados abrían la posibilidad de desarrollar una estrategia terapéutica tópica para indicar en las primeras etapas de la RD.

Sin embargo, no se ha evaluado si la administración tópica de GLP-1 sería capaz de revertir las alteraciones de la retina causadas por la diabetes cuando ya están instauradas.

Además, puesto que DPP-IV, la enzima que metaboliza el péptido GLP-1, se podría encontrar a niveles importantes en la retina, la actividad de ésta podría limitar la acción local del fármaco en colirio o del propio GLP-1 producido de forma local en la retina. Así pues, si se demuestra expresión de DPP-IV en la retina la administración tópica de DPP-IVi podría constituir una estrategia terapéutica alternativa. La inhibición del enzima aumentaría la vida media del GLP-1 en el ojo y prevendría la disfunción neuronal y las alteraciones microvasculares iniciales de la RD.

### 2.2. Objetivos

El objetivo general de esta tesis es reunir una evidencia preclínica sólida que de soporte científico a ensayos clínicos dirigidos a tratar las etapas iniciales de la RD mediante la administración tópica ocular de GLP-1RAs y/o DPP-IVi.

Los objetivos específicos son:

1. Demostrar que GLP-1 alcanza la retina tras la administración tópica en colirio en un modelo murino.
2. Evaluar si la administración tópica de GLP-1 revierte los principales marcadores de neurodegeneración inducidos por la diabetes en ratones diabéticos db/db.
3. Explorar los mecanismos asociados al efecto neuroprotector de GLP-1, con especial énfasis a la promoción de vías de supervivencia en la retina.
4. Evaluar si los efectos antiinflamatorios de GLP-1 participan en la protección de la unidad neurovascular.
5. Estudiar si la administración tópica de GLP-1 ejerce efectos beneficiosos sobre la unidad neurovascular y revierte la ruptura de la barrera hematoretiniana.
6. Explorar la expresión génica y proteica de DPP-IV en la retina humana y de ratón db/db.
7. Determinar si la administración tópica de DPP-IVi tiene algún efecto neuroprotector y previene las alteraciones neurovasculares características de la RD.

### **3. MATERIAL Y MÉTODOS**

---



#### 3.1. Estudio con animales

##### 3.1.1. Animales de experimentación y condiciones de estabulación

Tal como se menciona en la introducción de esta tesis, el diseño experimental se realizó con el modelo de ratón db/db (BKS.Cg-Dock7m +/- Leprdb/J) con fenotipo diabético, y el ratón db/+ (db/+; BKS.Cg-Dock7m +/- Leprdb/+) de fenotipo no diabético, o control. Ambos fueron adquiridos en los Laboratorios Charles River (Calco, Italia). Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético del VHIR, de acuerdo con lo establecido por la Asociación de Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) y la directiva del Consejo Europeo (86/609/CEE).

- Para el estudio de radioinmunoanálisis se utilizaron 24 ratones C57BL/6J de 12 semanas.
- Para el estudio de GLP-1 a 21 semanas de edad se utilizaron 50 ratones db/db y 25 ratones db/+.
- Para el estudio de los inhibidores de la DPP-IV se utilizaron 72 ratones db/db y 28 ratones db/+ de 10 semanas de edad.

En ambos estudios, los animales fueron estabulados en el Servicio del Animal de Laboratorio del Institut de Recerca del Hospital Universitario de Vall d'Hebron (VHIR). Al llegar al estabulario, los animales fueron aclimatados durante 1 u 2 semanas antes de su utilización en experimentación. Se realizó una randomización respecto a la variable "glucemia" para disminuir la variabilidad entre los diferentes tratamientos o grupos experimentales. Los ratones fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de 4 por jaula. Previamente a la medición de la glucosa en sangre, se aplicó una crema EMLA (AstraZeneca) en el extremo de la cola que contiene 2,5% de lidocaína y 2,5% de prilocaína, ambos anestésicos locales. La glucemia se midió con el glucómetro FreeStyle Optium Neo (Abbott Diab) y las tiras reactivas de glucemia Freestyle Optium (Abbott Diab). Se hizo un seguimiento del peso y la glucemia de cada grupo experimental a lo largo de las semanas que duraron los tratamientos.

Las condiciones estrictas del estabulario incluyeron una humedad del 60%, una temperatura ambiental de 20°C y un ciclo de 12h/12h de luz y oscuridad al día, a excepción de la previa adaptación al electroretinograma (ERG), como ya se explicará en el apartado

correspondiente. Los animales tuvieron libre acceso a agua filtrada y comida ad libitum de la marca comercial ENVIGO (Global Diet Complete Feed for Rodents, Mucedola) con un 18,5% de proteína, 12% de agua, 5,5% de grasas, 4,5% de fibra, 6% de madera y el resto de carbohidratos. El lecho utilizado fue material absorbente de celulosa de la casa comercial BioFresh (BioFresh Performance Bedding 1/8" Pelleted Cellulose, Absorption Corp) que asegura tanto el enriquecimiento ambiental necesario para el anidamiento de los murinos, como una mejor higiene debido a la capacidad absorbente del material.

### 3.1.2. Tratamientos

#### 3.1.2.1. Administración de GLP-1 en colirio

Se administró el agonista de GLP-1R en colirio preparando previamente la solución del péptido GLP-1 (7-36) amida liofilizado en forma de sal de acetato (4056519; Clinalfa basic, Bachem) diluido en tampón fosfato salino (PBS) estéril pH 7.4. El colirio se conservó a -20°C hasta la administración.

Se administraron 5 microlitros del colirio a una dosis de 2 mg/ml de GLP-1 o bien vehículo (PBS, pH 7.4), en la superficie corneal de cada ojo dos veces al día. El día 21, la gota se aplica 1 hora antes de la eutanasia (Fig. 8).



Fig. 8 Diseño experimental del estudio de la administración tópica de GLP-1 en ratones db/db entre las 21 y 24 semanas de edad.

### 3.1.2.2. Administración de sitagliptina y saxagliptina en colirio

Para estudiar si los DPP-IVi previenen el desarrollo de las primeras alteraciones de la RD temprana, se realizó un tratamiento a la edad de 10 semanas durante 14 días. Se administraron 5  $\mu$ l del colirio con saxagliptina (1 mmol/l; 31.5 mg/ml) (Carbosynth) o sitagliptina (1 mmol/l; 50 mg/ml) (Sigma) diluido en PBS pH 7.4 estéril, o bien vehículo (PBS, pH 7.4), en la superficie corneal de cada ojo a las 10 semanas de edad del ratón y durante 14 días en 2 administraciones diarias (Fig. 9).

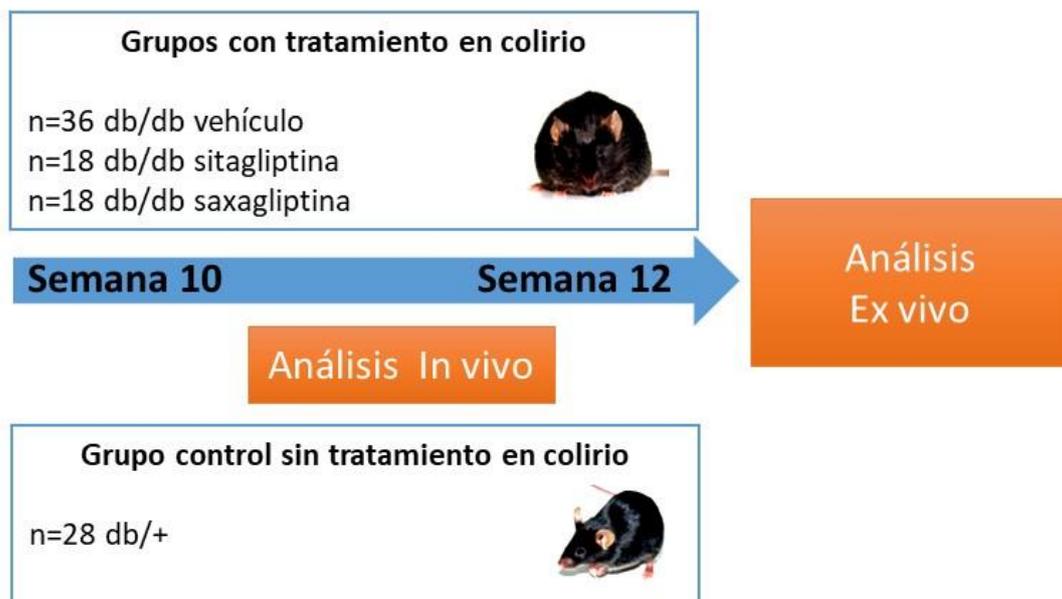


Fig. 9 Diseño experimental del estudio de la administración de DPP-IVi en ratones db/db entre las 10 y las 12 semanas de edad.

### 3.1.3. Estudio de absorción y distribución de $^{125}$ I-GLP-1

Se efectuó un estudio de radioinmunoanálisis con el objetivo de demostrar que GLP-1 se internaliza en el ojo y llega a la retina tras la administración tópica en el ratón. El estudio se basa en la exploración de la absorción y la distribución de  $^{125}$ I-GLP-1 en diferentes compartimentos oculares y sistémicos después de la administración tópica. Se realizó un ensayo con un total de 24 ratones C57BL/6J de 12 semanas de edad distribuidos en 2 grupos: control y tratamiento (n=3), tal y como se muestra en la Tabla 1.

Grupo	Tratamiento	muestreo (h)	Nº de animales
Tratamiento	Dosis única de <sup>125</sup> I-GLP-1 en el ojo derecho	0.5	3
		1	3
		2	3
		4	3
		8	3
		12	3
		24	3
Control	No	0	3

**Tabla 1 Estudio de la absorción y distribución de <sup>125</sup>I-GLP-1**

A cada animal del grupo tratamiento se le aplicaron 5 uL de <sup>125</sup>I-GLP-1 a una concentración de 2 mg/ml. Se emplearon animales control de la radioactividad sin tratamiento (blanco de rd). En cada punto de muestreo, se eutanasiaron los animales y se extrayeron muestras de cristalino, retina, esclera y coroides. Se cuantificó la concentración del GLP-1 en los tejidos por contaje de partículas gamma de <sup>125</sup>I-GLP-1 (RIA) en las instalaciones radioactivas del Parc Científic de Barcelona (IR-PCB).

### 3.1.4. Electroretinograma (ERG)

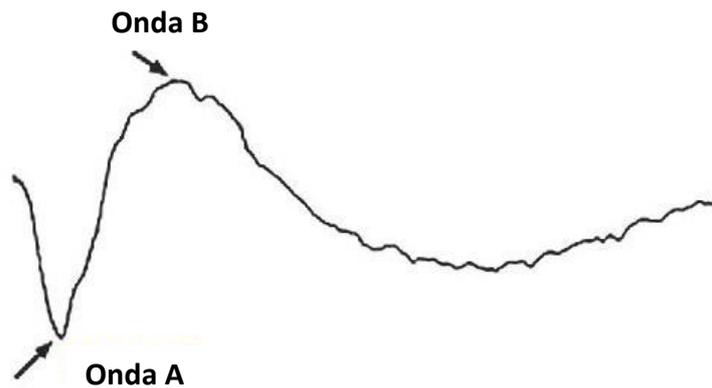
El funcionamiento eléctrico de la retina en respuesta a la luz puede ser evaluado en los modelos animales de ratón mediante la técnica no invasiva del ERG.

El método consiste en excitar el ojo con estímulos de luz en flashes de intensidad creciente para así poder registrar la respuesta fisiológica de la retina con una previa adaptación a la oscuridad. La detección de la luz y su conversión en una señal eléctrica, proceso conocido como fototransducción, tiene lugar en los segmentos externos de conos y bastones [311].

En el animal adaptado a la oscuridad, el potencial eléctrico de la membrana de los fotorreceptores está parcialmente despolarizado, con una liberación basal de neurotransmisor. En estimular la retina con el flash de luz, se produce la hiperpolarización de la membrana plasmática [312] que a nivel fisiológico, se traduce en un impedimento de la liberación del glutamato en la sinapsis. Este cambio es detectado por el cerebro, pues se dejan de activar por sinapsis excitatorias las células bipolares y las células ganglionares [313].

Esto genera en el ERG una rápida onda negativa denominada onda a, seguida de una onda positiva, denominada onda b. La onda a refleja la actividad eléctrica de los fotorreceptores

ante la respuesta al estímulo de luz. La onda b, en cambio, es generada por la actividad de las siguientes células de la vía retiniana, las células bipolares y las ganglionares en respuesta a la sinapsis con los fotorreceptores y los cambios en la apertura de los canales de potasio de las membranas de las células de Müller (Fig. 10). En el ERG también aparecen una serie de ondas de baja amplitud entre las ondas a y b generadas por la actividad eléctrica de las células amacrinas y que se denominan potenciales oscilatorios (OPs).



**Fig. 10** Esquema que muestra la respuesta del ERG con las ondas a y b.

Modificado de la página web: Donnell J. Creel. *The electroretinogram and electro-oculogram: Clinical applications, Webvision, Webvision.med.utah.edu.*

Estudios con ERG muestran que los animales diabéticos presentan una reducción en la amplitud en las ondas a y b, y los OPs, demostrando que la hiperglucemia produce una disfunción neuronal que afecta a su electrofisiología normal y por tanto contribuye al desacoplamiento de la función neurovascular [311]. Por tanto, la técnica del ERG nos permite estudiar la respuesta eléctrica de la retina en respuesta a estímulos de luz. La electrofisiología de la retina se evalúa mediante la plataforma Ganzfeld ERG (Phoenix Research Laboratories, Pleasanton) siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Internacional para la Electrofisiología clínica de la visión (ISCEV) [314].

Los animales fueron adaptados a la oscuridad absoluta durante 16 horas antes de la determinación del ERG. Se anestesiaron con inhalación de 2% isoflurano (AERRANE, Baxter) / 4% en oxígeno, primero en caja de inducción y después con mascarilla buconasal durante el ERG. Durante el procedimiento, se mantuvieron los animales sobre la plataforma atemperada (Micron III) para evitar la hipotermia generada por el anestésico. Las pupilas se dilataron con tropicamida al 1% (Mydriacyl. Alcón Cusí) sobre la superficie corneal. Se insertó por vía subcutánea un electrodo de referencia en la cabeza y un electrodo de tierra en la base de la

cola. Se colocó carboximetilcelulosa para evitar la deshidratación y las lesiones corneales y para mejorar el contacto córnea-electrodo se posicionó al animal de manera que el ojo quedara lo más cerca posible del electrodo de contacto corneal conectado al aparato Ganzfeld©.

Seguidamente, se realizó el registro de la actividad eléctrica de la retina en respuesta a flashes de luz blanca blanca de intensidad creciente comenzando por una intensidad  $0 \text{ cd.s.m}^{-2}$  (señal basal) para comprobar que no hubieran alteraciones que generaran ruido en el ERG. Se midieron la amplitud de las ondas a y b, los potenciales oscilatorios (OPs) y los tiempos implícitos, en respuesta a 10 flashes de cada intensidad. Los datos recogidos fueron posteriormente analizados mediante el software Labscribe©.

Durante todo el procedimiento se mantuvo el ojo contralateral hidratado con lágrimas artificiales para evitar el secado. Una vez finalizado el procedimiento, se inyectó una solución salina por vía subcutánea y se colocó al animal sobre una manta eléctrica durante unos minutos con el fin de evitar la hipotermia y permitir una óptima recuperación. La anestesia inhalatoria permite que el animal se recupere rápidamente en pocos minutos.

### **3.1.5. Tomografía de coherencia óptica (OCT)**

La Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) es una técnica no invasiva e interferométrica, de gran penetración en el tejido que permite obtener imágenes tomográficas “in vivo” basándose en la realización de cortes transversales micrométricos utilizando la luz sobre el tejido. La luz permite obtener imágenes con una resolución axial y lateral de escala micrométrica. De forma simplificada, en OCT un rayo de luz es disparado hacia el tejido y se mide el retraso del eco de la luz al ser reflejado por la microestructuras del tejido. Estas características convierten a esta técnica en un método ideal en oftalmología [315].

El procedimiento de anestesia a realizar durante la OCT fue idéntico al utilizado en el ERG. En este caso, el animal no se adoptó a la oscuridad y en lugar de utilizar electrodos, se colocó la cámara del aparato de OCT (Micron IV. Phoenix Research Labs OCT) directamente sobre la córnea del ratón, previamente dilatada con tropicamida al 1% (Mydriacyl. Alcón Cusí) e hidratada con carboximetilcelulosa (Omni Vision). Cada animal se dispuso en la plataforma atemperada del equipo Micron y el ojo alineado en contacto con la lente del OCT. Con la pupila dilatada se observó con facilidad el nervio óptico y la retina. El software dispone de dos

pantallas, en una se observó la citoarquitectura típica de las capas de la retina generada por la OCT y en la otra un plano general del fondo del ojo. Utilizando el software específico de la casa comercial (Insight, Phoenix Research Labs) se determinó el grosor de las distintas capas de la retina. Por último, la finalización del procedimiento y de recuperación del animal fue idéntico al ERG.

#### **3.1.6. Eutanasia y recogida de muestras**

Para la obtención de las muestras para hacer cortes histológicos de la retina, se realizó una inyección intraperitoneal de anestésico y un sedante analgésico (en la proporción 1 ml ketamina / 0.3 ml xylazina), seguida por una perfusión intracardiaca (10 ml PBS / 5 ml Formaldehído al 4%) que garantiza una óptima fijación de los tejidos. En el resto de animales, se realizó una dislocación cervical. Independientemente del método de anestesia, rápidamente los ojos fueron enucleados mediante unas pinzas de microdissección de cirugía oftalmológica.

Para las muestras destinadas para histoquímica, los ojos se mantuvieron en casetes inmersos en paraformaldehído al 4% durante 5h y posteriormente embebidos en bloques de parafina y seccionados en láminas de 4  $\mu\text{m}$  a lo largo del eje del ojo.

Las muestras para la obtención de proteína o ácido ribonucleico mensajero (mARN) se procesaron rápidamente, separando la neuroretina con pinzas quirúrgicas de microdissección y transportando las muestras en nitrógeno líquido hasta su conservación a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **3.2. Estudio de proteínas**

#### **3.2.1. Extracción de proteínas**

Para la extracción de proteínas es muy importante trabajar en frío, así que las muestras se mantuvieron en hielo. Se preparó un tampón de lisis que con detergentes para el aislamiento de proteínas e inhibidores de proteasas y fosfatasas (Tabla 2 y Tabla 3). Las muestras se disgregaron mecánicamente con jeringuillas y se homogeneizaron adicionando un volumen de 80  $\mu\text{L}$  de tampón por retina. Una vez la retina estuvo bien disgregada, se mantuvo en un agitador rotario a  $4^{\circ}\text{C}$  durante al menos 12h.

<b>Solución RIPA</b>	
NaCl	150mM
IGEPAL CA-630	1%
Sodium Deoxycholate	0,5%
SDS	0,1%
Tris pH 8.0	50mM

**Tabla 2. Solución comercial RIPA.**

<b>Tampón de lisis</b>	
RIPA (Sigma)	878 $\mu$ l
Phenylmethanesulfonylfluoride [PMSF], 1 mmol/l	10 $\mu$ l
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 2 mmol/l	2 $\mu$ l
NaF, 100 mmol/l	100 $\mu$ l
1X protease inhibitor cocktail (Sigma)	10 $\mu$ l
Volumen final	1 ml

**Tabla 3 Tampón de lisis.**

Se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm en una microcentrífuga a 4°C durante 15 minutos, se descartó el pellet y se recogió el sobrenadante. Las proteínas se conservaron a una temperatura de -80°C.

### **3.2.2. Cuantificación de proteínas**

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de “*Bicinchoninine acid assay*” (BCA) (ThermoFisher Scientific 23225) utilizando una curva estándar de calibrado a partir de un estándar de albúmina bovina sérica (BSA) de 2 mg/mL.

El ensayo se basa en la reducción de Cu<sup>+2</sup> a Cu<sup>+1</sup> presente en las muestras que produce un cambio de color, proceso que es conocido como reacción de Biuret. La absorbancia del cambio de color es proporcional a la concentración proteica y se puede determinar mediante un espectrofotómetro lector de placas (Spectra-Max 340) en el intervalo que se observa en la Fig. 11 siguiendo la ley de Lambert-Beer.

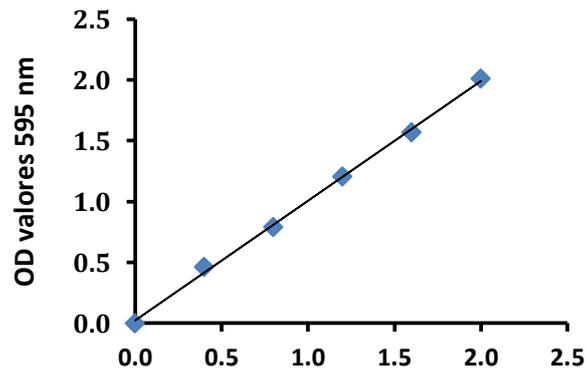


Fig. 11 Curva estándar de calibrado a partir de un estándar de albúmina bovina sérica (BSA) de 2 mg/ml

### 3.2.3. Western Blot

En el western blot, las proteínas de la muestra de retina fueron separadas en un campo eléctrico en función de su tamaño y su forma mediante una electroforesis. El primer paso de la electroforesis fue la preparación de los tampones (Tabla 4 y Tabla 5) para sintetizar los geles de acrilamida. El porcentaje de acrilamida-bisacrilamida (PAGE) (Millipore) en el gel resolutorio o separador varía según el peso molecular de las proteínas estudiadas (10 o 12%) (Tabla 6). El gel concentrador o “de stacking”, con un porcentaje de PAGE al 4% (Tabla 7), presenta poros de gran tamaño que permiten la concentración de las proteínas mientras que el gel separador, de concentración variable, es donde las proteínas se separan en función de su tamaño.

---

#### Tampón del gel resolutorio Ajustar a un pH de 8,54

Tris base 1,5M	45,43g
SDS 0,4%	10ml de la solución de SDS al 10%
H <sub>2</sub> Odd	Enrasar a 250ml

---

Tabla 4. Tampón del gel resolutorio.

---

#### Tampón del gel concentrador Ajustar a un pH de 6,8

Tris base 0,5M	125 ml de la solución Tris 1M
SDS 0,4%	10ml de la solución de SDS al 10%
H <sub>2</sub> Odd	Enrasar a 250ml

---

Tabla 5 Tampón del gel concentrador.

Los geles fueron preparados entre dos cristales fijados por la parte posterior. Para la polimerización de los mismos, se utilizó un iniciador de polimerización como el N,N,N',N'-tetrametiletlenodiamina (TEMED) (Sigma) y el persulfato amónico (APS) (Biorad). Después de pipetear todos los reactivos del gel resolutorio, el volumen fue vertido entre los cristales

incubando durante 15 minutos para la polimerización del gel. Se colocó un peine en la parte superior del gel, que una vez polimerizado formó unas depresiones o pocillos donde se cargan las muestras. A continuación se muestra una tabla con los diferentes tipos de geles (Tabla 6):

<b>Gel resolutivo o separador</b>		
Porcentaje de Acrilamida	10%	12%
Tampón del gel resolutivo (ml)	1,25	1,25
Acrilamida al 40% (ml)	1,25	1,5
H <sub>2</sub> Odd (ml)	2,5	2,25
TEMED (μl)	5	5
APS 20% (μl)	50	50
Volumen final (ml)	5	5

**Tabla 6 Gel resolutivo.**

<b>Gel concentrador o de "stacking"</b>	
Porcentaje de Acrilamida	4%
Tampón del gel concentrador (ml)	0,65
Acrilamida al 40% (ml)	0,27
H <sub>2</sub> Odd (ml)	1,74
TEMED (μl)	10
APS 20% (μl)	30
Volumen final (ml)	2,65

**Tabla 7 Gel concentrador.**

Una vez polimerizados los geles, se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Biorad) en los pocillos. El marcador de peso molecular está formado por proteínas patrón de masa molecular conocida que permiten estimar la masa molecular de las proteínas a evaluar. Según la cantidad de proteína a detectar en el tejido, se cargaron de 20 a 40 μg de proteína diluidos en agua destilada con un volumen total de unos 16 μL. Además, se añadió tampón Laemmli que contiene glicerol, que ayuda a las proteínas a migrar por el gel, y bromofenol, que permite visualizar el frente de la electroforesis (Tabla 8).

<b>Tampón Laemmli</b>	
Glicerol	20%
2-Mercaptoetanol	10%
Azul bromofenol	0,004%
Tris HCl	0,125 M

**Tabla 8 Tampón de carga Laemmli.**

### 3. MATERIAL Y MÉTODOS

El detergente dodecil sulfato sódico (SDS) de los geles se une a las proteínas de forma proporcional a la masa molecular de las mismas y les confiere una carga neta negativa. Esto permite que la electroforesis separe casi exclusivamente las proteínas en función de la masa molecular y por tanto, la movilidad de cada proteína en el gel es proporcional a su masa.

La electroforesis SDS-PAGE fue realizada en una cubeta bañada con tampón de electroforesis (Tabla 9 y Tabla 10) inicialmente a un voltaje de 90 V, y cuando el frente de proteínas avanzó hacia el gel separador se subió el voltaje a 120 V durante aproximadamente 1h 30 min.

---

#### Tampón de Electroforesis 5X (stock solution)

Tris Base	30,2 gr
Glicina	144 gr
SDS	10 gr
H <sub>2</sub> O	Enrasar a 2l

---

Tabla 9 Tampón de Electroforesis 5X.

---

#### Tampón de Electroforesis 1X (working solution)

Tampón de electroforesis 5X	200 ml
H <sub>2</sub> O	Enrasar a 1l

---

Tabla 10 Tampón de Electroforesis 1X.

La transferencia de las proteínas del gel a la membrana de PVDF por acción de un campo eléctrico se realizó en un sándwich bañado en tampón de transferencia con metanol (Tabla 11 y Tabla 12) a un amperaje de 0,4 Amperios durante 1h. La membrana de PVDF se une a todas las proteínas de forma inespecífica, y esta unión está basada en interacciones hidrofóbicas y dipolos entre la membrana y las proteínas. Previamente a la transferencia, la membrana se activó con metanol y tampón de transferencia. Para el montaje del sándwich se colocó un papel de filtro Whatman en el ánodo, la membrana encima, el gel y otro papel de filtro Whatman en el cátodo. Se eliminó el aire con un rodillo para evitar burbujas.

---

#### Tampón de Transferencia 5X (stock solution)

Tris Base	30,2 gr
Glicina	144 gr
H <sub>2</sub> O	Enrasar a 2l

---

Tabla 11 Tampón de Transferencia 5X.

---

**Tampón de Transferencia 1X (working solution)**

Tampón de Transferencia	100 ml
Metanol	100 ml
H <sub>2</sub> O	Enrasar a 500 ml

---

**Tabla 12 Tampón de Transferencia 1X.**

A continuación, con el fin de reducir las uniones inespecíficas, la membrana se bloqueó durante 1h en TBST (Tris-buffered saline 0,1 Tween) al 5% en BSA o leche. Seguidamente, la membrana se incubó con un anticuerpo primario a 4°C durante toda la noche. La Tabla 13 muestra la lista de anticuerpos primarios utilizados en la presente tesis:

---

<b>Anticuerpo</b>	<b>Descripción</b>
<i>Caspase 9</i>	1:1000; ab202068; Abcam, Cambridge, UK
<i>p-AKT</i>	1:1000; #2965; Cell Signaling, Leiden, The Netherlands
<i>AKT</i>	1:5000; #9272; Cell Signaling, Leiden, The Netherlands
<i>p-GSK3β</i>	1:1000; ab75745; Abcam, Cambridge, UK
<i>β-catenin</i>	1:1000; GTX132611; Genetex, California, USA
<i>Bcl-xL</i>	1:1000; 610211; BD Biosciences, Sparks, MD, USA
<i>p-AMPK</i>	1:1000; ab80039; Abcam, Cambridge, UK
<i>AMPK</i>	1:1000; ab133448; Abcam, Cambridge, UK
<i>p-IKβα</i>	1:1000; ab133462; Abcam, Cambridge, UK
<i>IKBα</i>	1:5000; ab32518; Abcam, Cambridge, UK
<i>NF-κB (p65)</i>	1:1000; sc-8008; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA
<i>VEGFA</i>	1:500; ab46154; Abcam, Cambridge, UK
<i>DPP-IV</i>	1:1000; ab28340; Abcam, Cambridge, UK
<i>GFAP</i>	1:10000; ab7260; Abcam, Cambridge, UK
<i>SDF-1</i>	1:500; ab25117; Abcam, Cambridge, UK
<i>Cyclophyline (CYP)</i>	1:10000; BML-SA296; Enzo Life Sciences, Lausen, Switzerland
<i>β-Tubulin</i>	1:10000; #2146; Cell Signaling, Leiden, The Netherlands
<i>Actina</i>	1:10000; ab11003; Abcam, Cambridge, UK

---

**Tabla 13 Lista de anticuerpos utilizados para Western Blot.**

Al día siguiente se efectuaron 3 lavados con TBST de 5-10 minutos, en agitación constante y se prepararon 10mL de anticuerpo secundario (Anti-ratón o anti-conejo, Dako) a una concentración de 1:10.000 en TBST con leche o BSA al 5%. El anticuerpo secundario se incubó con las membranas durante 1 hora a temperatura ambiente, y en agitación constante. El anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano permite el revelado en conjugarse con su sustrato. Se realizaron sucesivos lavados con TBST en agitación constante para lavar el resto de anticuerpo secundario. Se preparó la solución de revelado (WesternBright ECL, Advansta) y con un casete de autoradiografía se reveló la

membrana exponiéndola en un film fotográfico. Se trabajó en una sala oscura con luz roja ya que se produce una reacción de quimioluminiscencia en la que la peroxidasa conjugada con el anticuerpo secundario cataliza la oxidación del luminol en presencia de peróxido de hidrogeno. En colocar el film sobre la membrana, la exposición a la luz que se desprende de la reacción permite detectar la actividad enzimática.

Los films de western se escanearon y las bandas fueron cuantificadas por densitometría mediante el software ImageJ. Los datos obtenidos fueron procesados y analizados mediante el programa estadístico SPSS y Microsoft Office Excel.

#### 3.2.4. Deshibridación

Si se han de detectar dos proteínas del mismo peso molecular en la misma membrana, hace falta una deshibridación de los anticuerpos con un tampón específico conocido como “stripping”. Cada membrana se incubó en un volumen de 10 mL de solución de deshibridación con SDS, Tris HCl y β-mercaptoetanol (Tabla 14) a 50°C durante unos 30 minutos y en agitación constante.

Solución de deshibridación (Ajustar a pH 6.8)	
Tris HCl 1M	12,5 ml
SDS	20 ml de SDS al 10%
H <sub>2</sub> Odd	Enrasar a 100 ml
β-mercaptoetanol	Añadir 80µl en el momento de utilizarlo

Tabla 14 Solución de deshibridación

Finalmente, tras 4 lavados de 15 minutos en TBST al 0,1%, la membrana se bloqueó en TBST con BSA o leche para evaluar otros marcadores.

#### 3.2.5. Cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) acoplada a Espectrometría de masas

El aminoácido glutamato fue separado del volumen homogenado de proteínas de retina mediante cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC) (Agilent 1200 series, Waldbronn, Alemania) acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) (Agilent 6410 Triple Quad, Santa Clara, California, USA) para su cuantificación.

### 3.3. Estudio de ácidos nucleicos

#### 3.3.1. Extracción de ácido ribonucleico mensajero (mARN)

Las retinas fueron obtenidas inmediatamente después de la enucleación y disección del ojo, conservándose congeladas en 140  $\mu$ L de Trizol (TRI Reagent T9234, Sigma) (Tabla 15) hasta la extracción del mARN. Una vez producida la disrupción de la retina con la ayuda de un homogeneizador mecánico para eppendorf (VWR), se añadieron 28  $\mu$ L de cloroformo (Sigma) por retina y se incubaron a temperatura ambiente durante unos 15 minutos. Después de una centrifugación a 12.000 rpm y 4°C durante 15 minutos, la fase acuosa fue transferida a otro eppendorf. La fase acuosa contenía proteínas, mientras que la fase restante, de una coloración rosa debido al Trizol, contenía los ácidos nucleicos.

Seguidamente, por cada retina se añadieron 70  $\mu$ L de isopropanol (2-Propanol 59304, Sigma) y 0,5  $\mu$ L de Glycoblu (GlycoBlue™ Coprecipitant (15 mg/mL) AM9515, ThermoFisher Scientific), el cual facilita la visualización del pellet. Una vez bien mezclado, el volumen se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Después de una centrifugación a 13.000 rpm a 4°C durante 30 minutos, se eliminó el sobrenadante y se lavó el pequeño pellet azul con 140  $\mu$ L de etanol al 75%. A continuación, se realizó otra centrifugación, pero en este caso a 10.000 rpm a 4°C durante 5 minutos. Finalmente, tras descartar el sobrenadante y dejarlo secar, se obtuvo un sedimento de mARN que se resuspendió en 30  $\mu$ L de agua libre de ARNasa (Nuclease-Free Water AM9937, ThermoFisher Scientific).

---

#### Reactivos para la extracción de ARN (cantidad por NR)

Trizol	140 $\mu$ l
Cloroformo	28 $\mu$ l
2-Propanol	70 $\mu$ l
Etanol 75%	140 $\mu$ l
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	30 $\mu$ l

---

Tabla 15 Reactivos para la extracción del mARN de una neuroretina.

Para conocer la calidad y cantidad de mARN en las muestras se empleó el espectrofotómetro Nanodrop y se inocularon 500 ng de cada muestra en un gel al 1% de agarosa (Agarosa D1 media EEO 8021, Laboratorios Conra) que se analizó en el Agilent 2100 Bioanalyzer para comprobar la integridad del mARN.

### 3.3.2. Generación de ácido desoxirribonucleico complementario y reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

El ADN complementario (cADN) de cadena sencilla se sintetiza a partir del mRNA tal como se describe en el kit “*Prime Script® RT Master Mix*”. El primer paso fue incubar en un termociclador a 37°C las muestras con deoxirribonucleasa (ADNsa), enzima que degrada el ADN (Tabla 16). Para finalizar la reacción se añadió 1 µl de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 25mM y se incubó a 65°C durante 10 minutos (Tabla 17). La adición del quelante de cationes EDTA permite inactivar a la enzima ADNsa ya que ésta necesita de cationes para catalizar la reacción química.

---

#### Máster Mix de la ADNsa (cantidad por NR)

ADNsa buffer	1 µl
ADNsa	1 µl
Muestras	2 µl
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	6 µl

---

Tabla 16 Reactivos para la Máster Mix de la ADNsa por neuroretina.

---

#### Reacción de la ADNsa en el termociclador

Reacción ADNsa	30 minutos a 37°C
Añadir EDTA	1 µl por muestra
Inactivación de la reacción	10 minutos a 65°C

---

Tabla 17 Reacción de la ADNsa.

A continuación se realizó la transcripción reversa del mRNA para generar el cADN. A los 10 µl de mRNA tratado con la ADNsa se añadieron 10 µl de la master mix de la transcripción reversa que incluye el enzima retrotranscriptasa, oligonucleótidos y otros compuestos necesarios para la reacción (Tabla 18). Finalmente, la transcripción reversa se volvió a producir en el termociclador tal y como se describe en la Tabla 19.

---

#### Master Mix de la transcripción reversa (cantidad por NR)

10xTampón de Retrotranscripción	2 µl
25x dNTPS mix (100mM)	1 µl
20x Oligo(dT)18	1 µl
RT multiscribe	1 µl
Inhibidor de ARNsa	1 µl
Nuclease-Free H <sub>2</sub> O	4 µl

---

Tabla 18 Reactivos para la Máster Mix de la transcripción inversa por neuroretina.

---

### Reacción de transcripción inversa en el termociclador

Incubación a 25°C	10 minutos
Incubación a 37°C	120 minutos
Incubación a 85°C	5 minutos
Incubación a 10°C	---

---

**Tabla 19** Reacción de transcripción inversa.

El cADN sintetizado se congeló hasta que se realizó la reacción en cadena de la polimerasa real-time (RT-PCR). Para la RT-PCR se sintetizan los cebadores u oligonucleótidos complementarios sentido y anti-sentido de las secuencias de las hebras del ADN opuestas de los genes diana, teniendo en cuenta que deben cumplir unos parámetros de calidad:

- Presentar una especificidad con una longitud de 17-28 bases.
- Presentar un contenido de guanina y citosina de un 50-60% pero manteniendo una composición de bases aleatoria.
- Minimizar la posibilidad de auto-hibraciones por los cebadores.
- Garantizar una temperatura de fusión ( $T_m$ ) adecuada (entre 55 y 70°C).

La RT-PCR utiliza el SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) en el detector 7.900 HT Sequence Detection System en placas de 384 pocillos con los cebadores o “*primers*” específicos que se muestran en la Tabla 20. Para cada muestra, la RT-PCR fue cargada por triplicado y la cuantificación relativa fue calculada utilizando el programa informático ABI SDS 2.0 por el método  $RQ\ 2^{-\Delta\Delta Ct}$  comparando la expresión de cada gen analizado con el gel control *beta-actina*, que es de expresión constitutiva en todas las muestras.

### 3.3.3. Nomenclatura de genes

Para la nomenclatura de los genes en esta tesis se utilizaron los criterios establecidos en agosto de 2018 por el Comité Internacional en Estandarización de Nomenclatura génica en ratones (<http://www.informatics.jax.org/mgihome/nomen/gene.shtml>) y el Comité Internacional de Nomenclatura génica en humanos HUGO (HGNC) (<https://www.genenames.org/>) que establecen lo siguiente:

- En el caso de genes humanos, los genes son representados en cursiva y en mayúscula. Además, los símbolos griegos nunca son utilizados. Ejemplo: El gen que codifica para

la proteína GLP-1R se representa como **GLP1R**. El gen que codifica para la proteína IL-1 $\beta$  humana se representa como **IL1B**.

- En el caso del ratón, los genes se representan en cursiva y minúscula, siendo solo mayúscula la primera letra. Además, los símbolos griegos nunca son utilizados. Ejemplo: El gen que codifica para la proteína GLP-1R murina es **Glp1r**. El gen que codifica para la proteína IL-1 $\beta$  murina se representa como **Il1b**.

<b>"Primers" o cebadores</b>	<b>Secuencia de nucleótidos</b>
<i>Il1b Forward (5'-3')</i>	5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3'
<i>Il1b Reverse (5'-3')</i>	5'-ATCTTTGGGGTCCGTCAACT-3'
<i>Il6 Forward (5'-3')</i>	5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3'
<i>Il6 Reverse (5'-3')</i>	5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'
<i>Tnf Forward (5'-3')</i>	5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'
<i>Tnf Reverse (5'-3')</i>	5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'
<i>Vegfa Forward (5'-3')</i>	5'-GAGTACCCCGACGAGATAGA-3'
<i>Vegfa Reverse (5'-3')</i>	5'-GGCTTTGGTGAGGTTTGAT-3'
<i>Nlrp3 Forward (5'-3')</i>	5'-ATTACCCGCCGAGAAAGG-3'
<i>Nlrp3 Reverse (5'-3')</i>	5'-TCGCAGCAAAGATCCACACAG-3'
<i>Il18 Forward (5'-3')</i>	5'-AGCAGTCCCAACTAAGCAGTA-3'
<i>Il18 Reverse (5'-3')</i>	5'-CAGCCAGTAGAGGATGCTGA-3'
<i>Glast Forward (5'-3')</i>	5'-GGGGCAAAGCACCAAAGAAG-3'
<i>Glast Reverse (5'-3')</i>	5'-GGGACAACCTGTATTGTGAGCC-3'
<i>Dpp4 Forward (5'-3')</i>	5'-ACCGTGGAAGGTTCTTCTGG-3'
<i>Dpp4 Reverse (5'-3')</i>	5'-CACAAAGAGTAGGACTTGACCC-3'
<i>Iba1 Forward (5'-3')</i>	5'-GGACAGACTGCCAGCCTAAG-3'
<i>Iba1 Reverse (5'-3')</i>	5'-GTTTCTCCAGCATTTCGCTTC-3'
<i>Actin Forward (5'-3')</i>	5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAG-3'
<i>Actin Reverse (5'-3')</i>	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'

Tabla 20 Lista de cebadores o "primers" utilizados en esta tesis

### 3.4. Técnicas de histoquímica

#### 3.4.1. Técnica de inmunofluorescencia

Como ya se ha comentado anteriormente, después de procesarse en paraformaldehído al 4% y PBS, el ojo entero fue embebido en bloques de parafina y seccionado en láminas de 4  $\mu$ m a lo largo del eje del ojo.

Se desparafinaron las muestras previamente a los análisis de Inmunofluorescencias realizados. Para ello, las muestras fueron calentadas en una estufa a 65°C durante 1h y sometidas a 4 lavados de 5 minutos en xileno (VWR). A continuación, las muestras se hidrataron en una serie de etanoles (Millipore) a una concentración decreciente (etanol al

100%-etanol al 96%-etanol al 70%-etanol al 50%-agua), se fijaron con metanol ácido (metanol 95%, ácido acético 5%) a -20°C durante 1 minuto, se realizaron 4 lavados con PBS pH 7.4 (Biowest) y posteriormente se realizó el enmascarado de los epítomos mediante la técnica del Antigen Retrieval en tampón citrato (Abcam). A continuación, según la proteína en estudio se realizó una permeabilización con Tritón-X-100 y un bloqueo de 1h con los bloqueantes específicos para la detección de cada biomarcador (BSA 1-10%; NGS 1-10%, etc).

Se adicionó sobre la sección de tejido el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA 1% y se incubó a 4°C durante 12 hs. La reacción continuó con 4 lavados con PBS pH 7.4 y una incubación durante 1 hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario específico de especie para el anticuerpo primario asociado a fluorocromos Alexa Fluor. A continuación, se realizó una contratinción nuclear con Hoechst (ThermoFischer) a una dilución de 1:500. Este compuesto fluorescente que emite en el espectro del azul se une a regiones del ADN ricas en adenina y timina. Por último, las muestras fueron montadas con cubreobjetos inmersas en medio de montaje para fluorescencia Prolong (ThermoFischer).

Las imágenes fueron obtenidas mediante un microscopio de láser confocal FV10000 (Olympus) que contiene 3 láseres de excitación: uno excita el fluorocromo Alexa Fluor 488 (mostrado en verde), otro el Alexa Fluor 594 (mostrado en rojo) y un tercer láser que excita longitudes de onda cercanas a los 346 nm permitiendo hacer visible el Hoechst (mostrado en azul). En casos de inmunofluorescencias combinadas de 2 biomarcadores se utilizó Alexa Fluor 594 y 488 en la misma muestra. Las imágenes fueron adquiridas a una resolución de 1024 x 1024 píxeles. Se evaluaron triplicados por retina y se adquirieron imágenes de 5 campos por retina (3 correspondientes a la parte central, y 2 periféricos). La intensidad relativa de fluorescencia fue cuantificada mediante el software del microscopio confocal FluoView ASW 4.2 (Olympus) e ImageJ (NIH, USA).

A continuación, en la Tabla 21 se presentan todos los anticuerpos primarios y secundarios utilizados en la presente tesis.

Anticuerpos	Descripción
GFAP	rabbit monoclonal; 1:500; ab7260 (Abcam, Cambridge, UK)
Iba-1	rabbit polyclonal; 1:100; #019-19741 (Wako Chemicals, Fujifilm, Neuss, Germany)
Ki67	rabbit polyclonal; 1:500; ab15580 (Abcam, Cambridge, UK)
NeuN	mouse monoclonal; 1:100 ; ab104224 (Abcam, Cambridge, UK)
Calbindina	mouse monoclonal; 1:50 ; Calbindina D-28k (Swant, Marly 1, Switzerland)
NFκB	mouse monoclonal; 1:100; sc-8008 (Santa Cruz, Dallas, Texas, USA)
IL-1β	rabbit polyclonal; 1:100; ab9722 (Abcam, Cambridge, UK)
IL-6	rabbit polyclonal; 1:100; ab7737 (Abcam, Cambridge, UK)
TNF-α	mouse monoclonal; 1:100; ab8348 (Abcam, Cambridge, UK)
CD-31	rabbit polyclonal; 1:50; ab28364 (Abcam, Cambridge, UK)
NLRP3	rabbit polyclonal; 1:200; ab214185 (Abcam, Cambridge, UK)
CD-31	mouse monoclonal; 1:50; ab9498 (Abcam, Cambridge, UK)
VEGFA	rabbit monoclonal; 1:100; ab52917 (Abcam, Cambridge, UK)
GLAST	rabbit monoclonal; 1:100; ab181036 (Abcam, Cambridge, UK)
NMDA (GluN1)	Rabbit polyclonal; 1:100; AGC-001 (Alomone, Jerusalem, Israel)
AMPA (GluR1)	Rabbit polyclonal; 1:100; AGC-004 (Alomone, Jerusalem, Israel)
8-Hidroxiguanosine	rabbit monoclonal; 1:100; ab62623(Abcam, Cambridge, UK)
Nitrotyrosine	mouse monoclonal; 1:50; ab7048 (Abcam, Cambridge, UK)
Albúmina	sheep polyclonal; 1:500; ab8940 (Abcam, Cambridge, UK)
Colágeno IV	rabbit polyclonal; 1:500; ab6586 (Abcam, Cambridge, UK)
Alexa Fluor 594 Goat anti-mouse	goat polyclonal; 1:600; A-11032; Life Technologies (ThermoFisher Scientific) (Waltham, Massachusetts, USA)
Alexa Fluor 594 Donkey anti-sheep	donkey polyclonal; 1:600; A-11016; Life Technologies (ThermoFisher Scientific) (Waltham, Massachusetts, USA)
Alexa Fluor 594 Goat anti-rabbit	goat polyclonal; 1:600; A-110012; Life Technologies (ThermoFisher Scientific) (Waltham, Massachusetts, USA)
Alexa Fluor 488 Goat anti-mouse	goat polyclonal; 1:600; ab150113 (Abcam, Cambridge, UK)
Alexa Fluor 488 Goat anti-rabbit	goat polyclonal; 1:600; ab150081 (Abcam, Cambridge, UK)

Tabla 21. Lista de anticuerpos utilizados para inmunofluorescencia.

### 3.4.1.1. Estudio de la gliosis reactiva

El estudio de la gliosis reactiva se basa en el análisis de la extensión de la expresión anómala de la proteína GFAP por las prolongaciones citoplasmáticas de las células de Müller. Para evaluar el grado de activación glial, se utiliza el sistema presentado en la Tabla 22 en el que se asigna un nivel o “score” 1 cuando GFAP se confina exclusivamente en la GCL; un “score” 2 cuando se mantiene en la GCL y se expresa en algunos procesos de las células de Müller proximales a la GCL; un “score” 3 correspondiente a la expresión de varios procesos citoplasmáticos de las células de Müller pero que no llegan a extenderse hasta la ONL; un “score” 4 cuando algunos de los procesos llegan hasta la ONL; y “score” 5 cuando muchos

procesos citoplasmáticos de las células de Müller llegan hasta la ONL. Este método fue utilizado por primera vez en la publicación de Anderson P. J. [316].

Score	Descripción de la expresión de GFAP
1	La expresión de GFAP se mantiene en la GCL.
2	La expresión se mantiene en la GCL y se expresa en algunos procesos de las células de Müller proximales a la GCL.
3	La expresión de varios procesos citoplasmáticos de las células de Müller pero que no llegan a extenderse hasta la ONL.
4	La expresión de GFAP en algunos de los procesos llegan hasta la ONL.
5	Muchos procesos citoplasmáticos de las células de Müller expresa GFAP hasta la ONL.

Tabla 22 Descripción de la expresión de GFAP en la retina.

### 3.4.1.2. Estudio de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL

El principal marcador bioquímico de la muerte celular por apoptosis es la degradación del ADN por endonucleasas. La técnica del TUNEL "*Terminal Transferase dUTP Nick-End Labeling DeadEnd Fluorometric System kit*" de Promega permite detectar el ADN fragmentado como consecuencia de un proceso apoptótico.

Las muestras fijadas de retina, previamente desparafinadas, fijadas y permeabilizadas en PBS con detergente Tritón X-100, fueron incubadas con la enzima deoxinucleotidil transferasa y nucleótidos dUTP marcados con fluorocromos que se excitan a una longitud de onda de 488 nm. La enzima cataliza la reacción de ligamiento de los nucleótidos marcados con los extremos 3' libres del ADN fragmentado. Como control positivo las muestras fueron tratadas previamente con enzima DNAsa. En el caso del control negativo, las muestras se incubaron sin la enzima. Finalmente, se realizó una contra-tinción nuclear con Hoechst.

En el microscopio confocal se detectaron las células que habían incorporado los nucleótidos porque emitían una señal de una longitud de onda de 515-565 nm (color verde). Finalmente, el número de células positivas de color verde y el número de células totales fue contado.

### 3.4.1.3. Estudio de la proliferación celular

Para el estudio de la proliferación celular el número de células positivas para el marcador Ki-67 fue contado en campos de 60 aumentos (x60). Además, el anticuerpo anti-Ki-67 se incubó en presencia de otros anticuerpos específicos para diferentes tipos celulares de la retina: NeuN fue utilizado como marcador específico de neuronas; CD-31 como marcador del endotelio de los vasos sanguíneos; Calbindina como marcador de células horizontales de la

INL, células amacrinas de la INL y células amacrinas desplazadas de la GCL; y finalmente la proteína quinasa C alfa (PKC- $\alpha$ ) como marcador de células bipolares de la INL.

#### **3.4.1.4. Estudio de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B**

Para el ensayo de la translocación nuclear de NF- $\kappa$ B, diferentes cortes a lo largo del eje Z de las secciones retinianas fueron capturados a 1024 x 1024 píxeles. Proyecciones ortogonales de los mismos fueron evaluadas mediante el software FluoView ASW 4.2 del microscopio de láser confocal para comprobar la localización nuclear del factor de transcripción.

#### **3.4.2. Estudio de la morfometría de la retina mediante Hematoxilina & Eosina**

Para el estudio del número de células totales en las diferentes capas de la retina se evaluaron secciones de retinas teñidas con Hematoxilina & Eosina. Como en el caso de la inmunofluorescencia, las muestras fueron desparafinadas en xilenos (VWR) e hidratadas en una serie de etanoles (Millipore) a una concentración decreciente (etanol al 100%-etanol al 96%-etanol al 70%-etanol al 50%-agua). Después de fijar las muestras con metanol ácido (metanol 95%, ácido acético 5%) a -20°C durante 1 minuto, se realizaron 4 lavados con PBS pH 7.4 (Biowest). Los portaobjetos con la retina fueron sumergidos en hematoxilina (Sigma) durante 10 minutos. Seguidamente, las muestras se lavaron y se sumergieron en eosina (Sigma) durante 30 segundos. Finalmente, tras lavar los portaobjetos, se deshidrataron nuevamente mediante lavados con una serie de etanoles en un orden de concentración creciente antes de ser montados con un cubreobjetos y medio de montaje. Se contó el número de células totales en cada una de las capas nucleares de la retina (GCL, INL y ONL) mediante el software ImageJ, identificándose los núcleos azules y los citoplasmas de color rosado.

El conteo en cada retina se realizó por triplicado en 3 imágenes de las regiones centrales de la retina y 2 imágenes de la región periférica. La región central corresponde a 100-200 micras a ambos lados del nervio óptico y las regiones periféricas en los extremos de la retina superior e inferior.

### **3.4.3. Estudio de la permeabilidad vascular y la neovascularización de la retina mediante la técnica del Evans Blue**

La permeabilidad de la vasculatura retiniana se examinó por la técnica *ex vivo* del Evans Blue. Este compuesto es una sustancia fluorescente que se une a la albúmina de manera irreversible. Al inyectarse por la vena de la cola del animal, permite evaluar el mantenimiento y la integridad de la BHR ya que en el microscopio confocal se pueden observar las extravasaciones de Evans Blue unido a la albúmina. El Evans Blue (E2129 Sigma) fue disuelto en PBS a pH 7,4 e inyectado vía intravenosa a una dosis de 5mg/ml. Después de la inyección, los animales presentaron una coloración azul que confirmó la distribución sistémica de la sustancia.

Dos horas después de la administración del Evans Blue, los ratones fueron eutanasiados por dislocación cervical. Los ojos se enuclearon y extraída la retina, se protegió de la luz rápidamente. La retina completa se montó en un portaobjetos, proceso conocido como *“flat-mount”* o *“whole-mount”* que permite visualizar en el microscopio confocal toda la vasculatura íntegra. Los portaobjetos fueron montados con cubreobjetos y medio de montaje Prolong (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific).

Se adquirieron imágenes digitales de diferentes campos de la retina utilizando el microscopio confocal FV1000 (Olympus) a un aumento de 60x utilizando el láser de 561 nm. Cada imagen se guardó a 1024 X 1024 píxeles dentro del mismo rango de intensidad. Para el análisis cuantitativo de la extravasación de albúmina asociada a Evans Blue, se hizo el recuento del número de extravasaciones en 20 campos a 60x por cada retina. Para el análisis de la neovascularización el número de capilares y de supuestos puntos de neovascularización fueron contados en campos 60x adquiridos con el microscopio confocal FV1000 (Olympus).

## **3.5. Estudio con muestras humanas**

### **3.5.1. Obtención de humor vítreo y plasma**

Para el estudio de la expresión de DPP-IV en humor vítreo y plasma humano, se obtuvieron muestras de pacientes del Hospital Universitario Vall d'Hebron en Barcelona con consentimiento informado para la donación de muestras biológicas y siguiendo el protocolo aprobado por el comité ético del hospital. Para el grupo diabético, se obtuvo el vítreo y el

plasma de 8 pacientes con diabetes de tipo 2 que habían requerido una vitrectomía debido a la avanzada PRD. Las muestras de vítreo de pacientes diabéticos que previamente habían recibido inyecciones intravítreas de corticoides o anti-VEGF no se incluyeron en el estudio. Como grupo control, se emplearon 8 candidatos no diabéticos pero que habían sido sometidos a una vitrectomía por otras patologías.

#### 3.5.2. Obtención de retinas humanas

Las retinas fueron obtenidas del banco de tejidos del Hospital Universitario Vall d'Hebron (Banc de Sang i Teixits) de 8 donantes diabéticos y 8 donantes no diabéticos emparejados por sexo y edad. En el caso de los pacientes diabéticos, se incluyeron las retinas en las que la exploración del fondo ocular durante el año anterior a su muerte no presentó RD. Las características generales de los participantes, la causa de muerte y el tratamiento hipoglucemiante se recogen en la Tabla 23. El período de tiempo entre la muerte y la enucleación del ojo fue de aproximadamente  $3,7h \pm 1,5 h$ . Una vez el ojo fue diseccionado, la retina y el RPE fueron separados y congelados a  $-80^{\circ}C$ .

	Donantes diabéticos (n=8)	Donantes no diabéticos (n=8)	p
Edad (años)	67,4 ± 8,3	66,9 ± 10,3	n.s.
Sexo (M/F)	5/3	4/4	n.s.
Tipo de Diabetes (1/2)	0/8		
Duración de la diabetes (años)	6,2 ± 4,5		
HbA1c (%) *	7,4 ± 1,3		
Tratamiento hipo-glucemiante			
Insulina	3		
Metformina y/o sulfonilureas	8		
Causa de muerte			
Enfermedad Cardiovascular	6	5	
Cancer	1	1	
Otros	1	2	

\* última HbA1c antes de la muerte

Tabla 23 Datos clínicos de los donantes diabéticos y no diabéticos.

#### 3.5.3. RT-PCR de las muestras humanas

El procedimiento general de extracción de mRNA y RT-PCR para evaluar la expresión del mRNA de DPP-IV se describe en el apartado 3.3 de la presente tesis, pero en este caso el

mARN es purificado en columnas RNeasy MinElute column (Quiagen). Los “*primers*” utilizados fueron los siguientes:

*DPP4* (humano)

FW 5'-AGTGGCGTGTTC AAGTGTGG-3' RV 5'-CAAGGTTGTCTTGTGGAGTTGG-3'

*ACTIN* (humano)

FW 5'-GGATGCAGAAGGAGATCACTG-3' RV 5'-CGATCCACACGGAGTACTTG-3'

### **3.5.4. ELISA de las muestras humanas**

Los niveles de DPP-IV en plasma, vítreo, RPE, neuroretina, intestino e hígado se evaluaron por ELISA. Para ello, las proteínas fueron extraídas según el protocolo del apartado 3.2.1 y la concentración total de proteínas fue cuantificada por el ensayo de BCA (según el procedimiento del apartado 3.2.2). El inmunoensayo ELISA con las muestras humanas se realizó mediante un sándwich cuantitativo (R&D Systems) con un límite inferior de detección de 0,016 ng/ml. Primero de todo, se transfirió el anticuerpo anti-DPP-IV diluido en PBS a los micropocillos de la placa del ELISA. Después de lavar y bloquear la placa, se añadió la muestra a los pocillos correspondientes y se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Una vez lavado el anticuerpo, se añadió estreptavidina-HRP y la solución de sustrato para la lectura de la densidad óptica y el procesado de los resultados. La concentración de DPP-IV en la retina, RPE y vítreo fue normalizada en base a la concentración total de proteínas.

### **3.6. Procesamiento estadístico de los resultados**

Las comparaciones de las variables continuas se analizaron mediante la prueba estadística ANOVA y el test post-hoc Bonferroni. Para el análisis comparativo de la extensión de GFAP (variable categórica) se empleó el test de Fisher. El nivel de significación estadística asignado fue  $p < 0,05$  y se empleó el software SPSS (versión 18, Windows 10).

## **4. RESULTADOS**

---



#### 4.1. Estudio de absorción y distribución de GLP-1 tras administración tópica ocular

El estudio de absorción y biodistribución del fármaco marcado radioactivamente ( $^{125}\text{I}$ -GLP-1) permitió confirmar que el GLP-1 administrado por vía tópica alcanzaba la retina. Se analizó la cantidad de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en diferentes compartimentos oculares (cristalino, esclera-coroides y retina) después de sacrificar los animales a diferentes tiempos (0,5h, 1h, 2h, 4h, 8h, 12h y 24h). Los resultados se muestran a continuación.

##### 4.1.1. Contenido de $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en el cristalino de ratón

La Fig. 12 muestra el contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en el cristalino. El fármaco se internalizó en el globo ocular y se distribuyó por el cristalino inmediatamente después de la administración tópica. Tal y como se puede observar en la Tabla 24, no se detectaron niveles de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 después de 1h tras la administración del colirio.

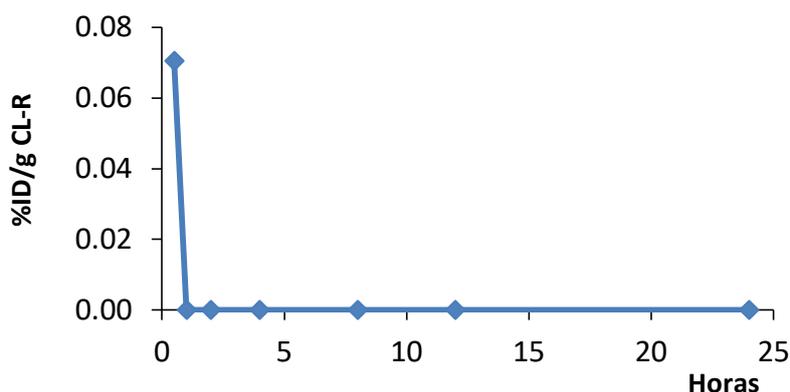


Fig. 12 Contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en cristalino (% de dosis aplicada/g).

Cristalino – Ojo derecho (CL-R)			
Número de grupo	Tiempos de muestro (h)	ng $^{125}\text{I}$ -GLP-1/g	%ID/g
2	0,5	4,3 ± 0,0	0,12 ± 0,00
3	1	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
4	2	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
5	4	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
6	8	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
7	12	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
8	24	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00

Tabla 24 Contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 y porcentaje de dosis/g en el cristalino.

Los valores de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 (ng/g) y el % ID/g se expresan como promedio ± SEM.

#### 4.1.2. Contenido de $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en la retina de ratón

El contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en la retina se representa en la Fig. 13. Tal y como se puede observar en la Tabla 25, se detectaron niveles de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 a los 30 minutos de la administración del colirio y hasta 12h después. El contenido máximo de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en la retina correspondió a las 8h después del tratamiento.

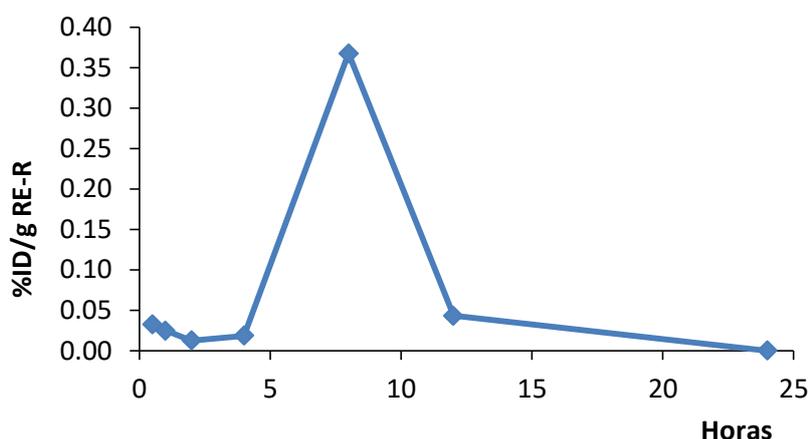


Fig. 13 Contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en la retina (% de dosis aplicada/g).

Retina – Ojo derecho (RE-R)			
Número de grupo	Tiempos de muestreo (h)	ng $^{125}\text{I}$ -GLP-1/g	%ID/g
2	0,5	2,0 ± 0,6	0,03 ± 0,01
3	1	1,1 ± 1,6	0,02 ± 0,03
4	2	0,6 ± 0,7	0,01 ± 0,02
5	4	0,8 ± 0,9	0,02 ± 0,00
6	8	16,5 ± 4,8	0,37 ± 0,11
7	12	3,0 ± 0,2	0,04 ± 0,00
8	24	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00

Tabla 25 Contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 y porcentaje de dosis/g en la retina.

Los valores de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 (ng/g) y el % ID/g se expresan como promedio ± SEM.

#### 4.1.3. Contenido de $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en esclera y coroides de ratón

La Fig. 14 muestra los niveles del compuesto radioactivo en esclera y coroides. Debido a la dificultad en la separación de estos dos tejidos se procesaron juntos. Tal y como se puede observar en la Tabla 26, se detectaron niveles de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 hasta 4h después de la administración del colirio. Sin embargo, el contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 fue máximo inmediatamente después de la administración tópica.

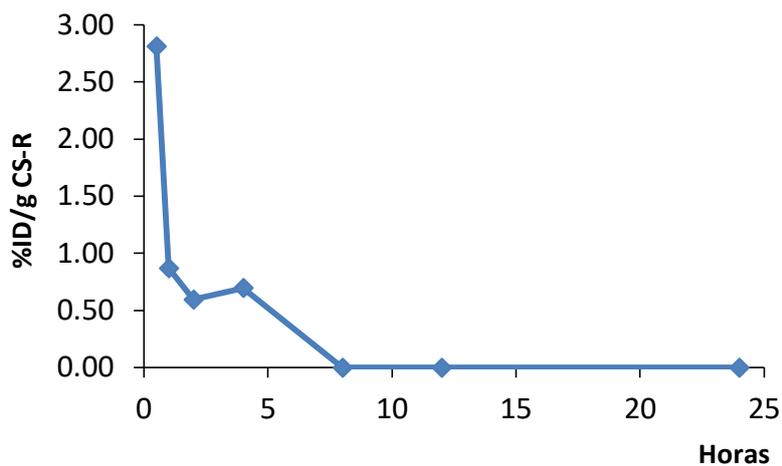


Fig. 14 Contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en esclera y coroides (% de dosis aplicada/g).

Esclera y coroides – Ojo derecho (CS-R)			
Número de grupo	Tiempos de muestro (h)	ng $^{125}\text{I}$ -GLP-1/g	%ID/g
2	0,5	172,9 ± 85,7	2,81 ± 1,39
3	1	39,2 ± 0,0	0,87 ± 0,00
4	2	26,8 ± 19,6	0,59 ± 0,43
5	4	31,3 ± 3,3	0,70 ± 0,07
6	8	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
7	12	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00
8	24	0,0 ± 0,0	0,00 ± 0,00

Tabla 26 Contenido de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 y porcentaje de dosis/g en coroides y esclera. Los valores de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 (ng/g) y el % ID/g se expresan como promedio ± SEM.

## 4.2. Efectos de GLP-1 en el animal db/db de 24 semanas de edad

### 4.2.1. Evolución del peso y la glucemia

Durante todo el tratamiento se realizó un seguimiento semanal del peso corporal y de los niveles de glucosa en sangre de los animales. El peso y la glucemia de los animales diabéticos fue significativamente mayor respecto a los animales controles (Fig. 16). Cabe destacar que el tratamiento tópico, como era previsible, no afectó el peso y la glucemia, pues no se observaron diferencias entre los animales diabéticos tratados con vehículo y GLP-1 (Fig. 16).

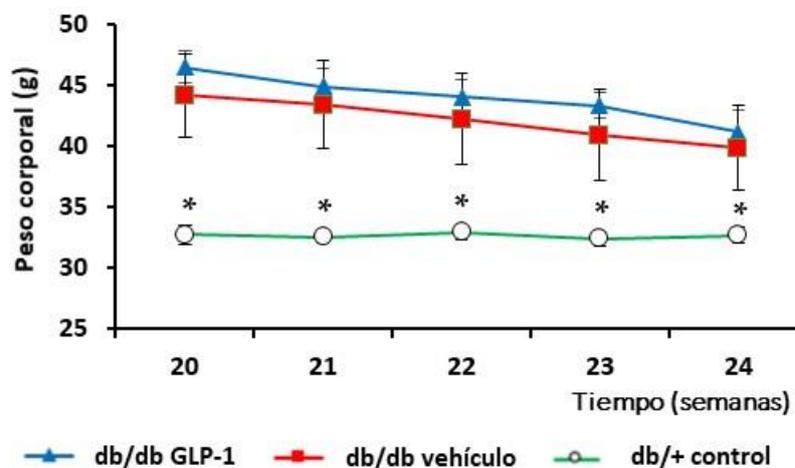


Fig. 15 Comparativa del peso corporal entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Gráfico comparativo del peso en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con GLP-1 (en azul) y los animales db/+ controles (en verde). Resultados expresados como promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db vehículo y db/db GLP-1.

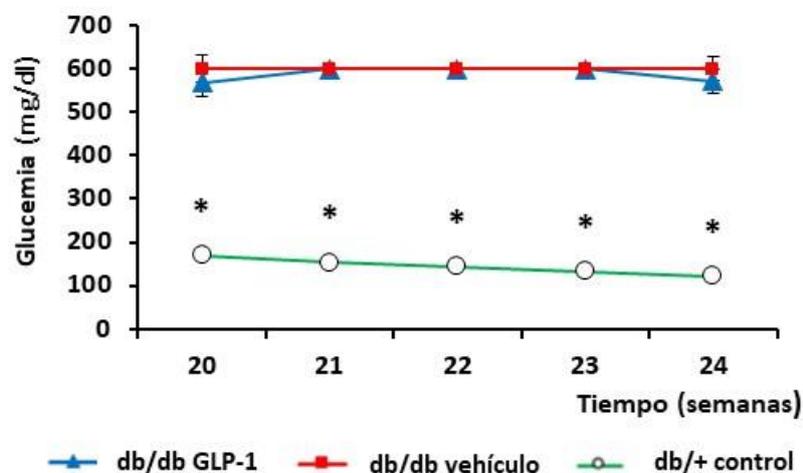
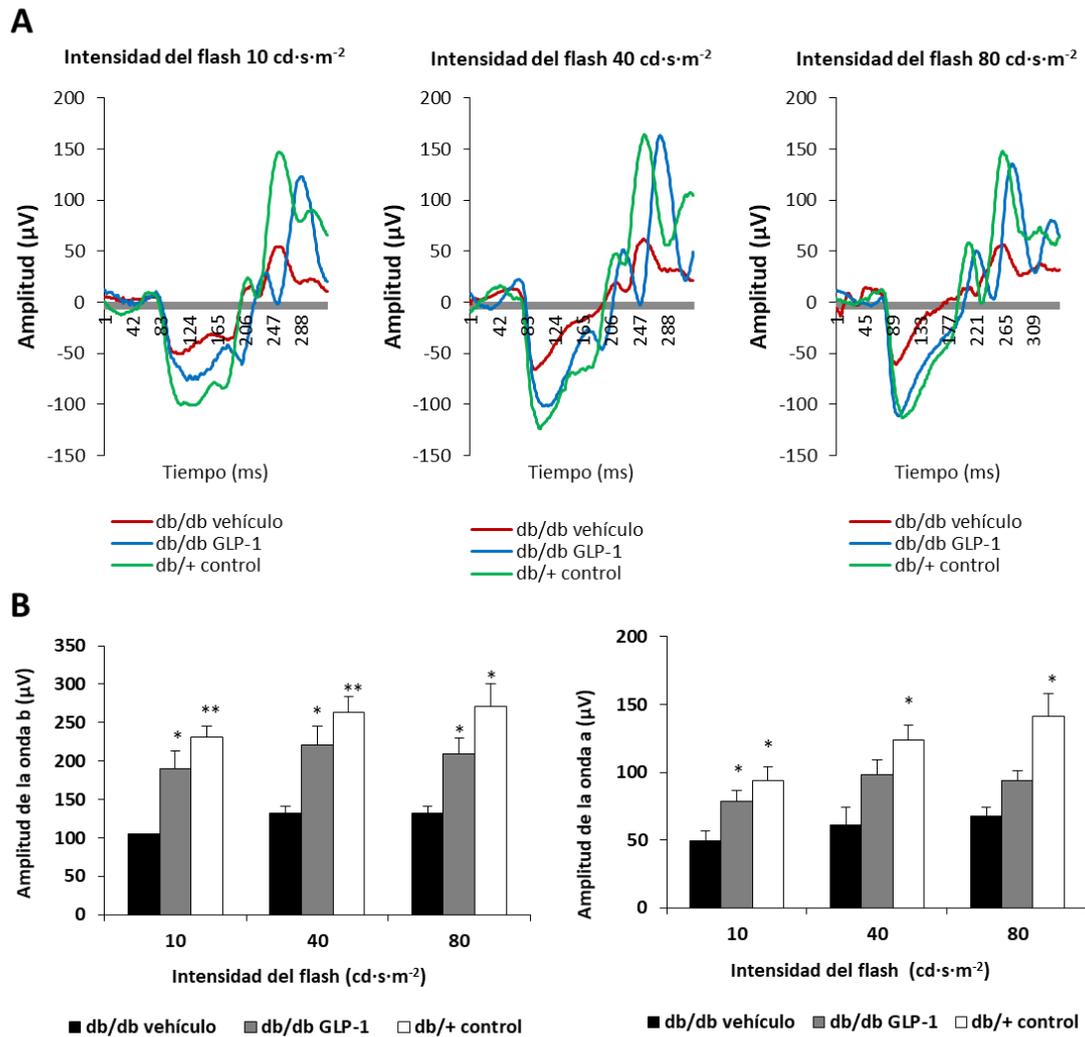


Fig. 16 Comparativa de la glucemia entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Gráfico comparativo de la glucemia en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con GLP-1 (en azul) y los animales db/+ controles (en verde). Resultados expresados como promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db vehículo y db/db GLP-1

### 4.2.2. Evaluación in vivo de la función de la retina mediante el electroretinograma

La amplitud de la onda b, derivada de la función de las células bipolares y las células de Müller fue significativamente menor en todas las intensidades en los animales diabéticos tratados con vehículo en comparación con los animales no diabéticos (Fig. 17a y b). La administración tópica de GLP-1 fue capaz de aumentar la amplitud de la onda b en todas las intensidades (Fig. 17a y b). La amplitud de la onda a, derivada de la función eléctrica de los fotorreceptores, fue también significativamente menor en los animales diabéticos tratados con vehículo en comparación con los animales controles en todas las intensidades (Fig. 17c). Sin embargo, la amplitud de la onda a en los animales diabéticos con el tratamiento tópico con GLP-1 solo fue significativamente mayor que los animales diabéticos tratados con vehículo a  $10 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  de intensidad (Fig. 17c).



**Fig. 17** Comparativa de la respuesta electroretinográfica entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Gráfica representativa de las trazas del ERG a 10  $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ , 40  $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  y 80  $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con GLP-1 (en azul) y los animales db/+ controles (en verde). (B) Análisis cuantitativo de la amplitud de la onda "b" en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Resultados expresados como promedio  $\pm$  SEM. (C) Análisis cuantitativo de la amplitud de la onda "a" en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Resultados expresados como promedio  $\pm$  SEM. \* $p<0.05$  en comparación con el grupo db/db tratado con vehículo; \*\* $p<0.01$  en comparación con el grupo db/db tratado con vehículo.

Los animales diabéticos (db/db tratados con vehículo) (línea roja) presentaron una disminución en la amplitud de la sumatoria de los OPs debido a las anomalías funcionales ocasionadas por la RD en todas las intensidades (10  $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ , 40  $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  y 80  $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ ) respecto a los animales control (línea verde) (Fig. 18). El tratamiento con GLP-1 (línea azul) reflejó la mejora en la actividad sináptica de las neuronas amacrinias y otras neuronas de la

## 4. RESULTADOS

INL, retornando a valores similares a los no diabéticos (Fig. 18a). El análisis cuantitativo de los OPs que se observa en la Fig. 18b denotó un valor de OPs significativamente menor en los animales diabéticos tratados con vehículo. La administración tópica de GLP-1 aumentó significativamente la amplitud de los OPs a altas intensidades (40  $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  y 80  $\text{cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ ). La amplitud en el sumatorio de los potenciales oscilatorios fue menor en los animales diabéticos tratados con vehículo en todas las intensidades (Fig. 18b).

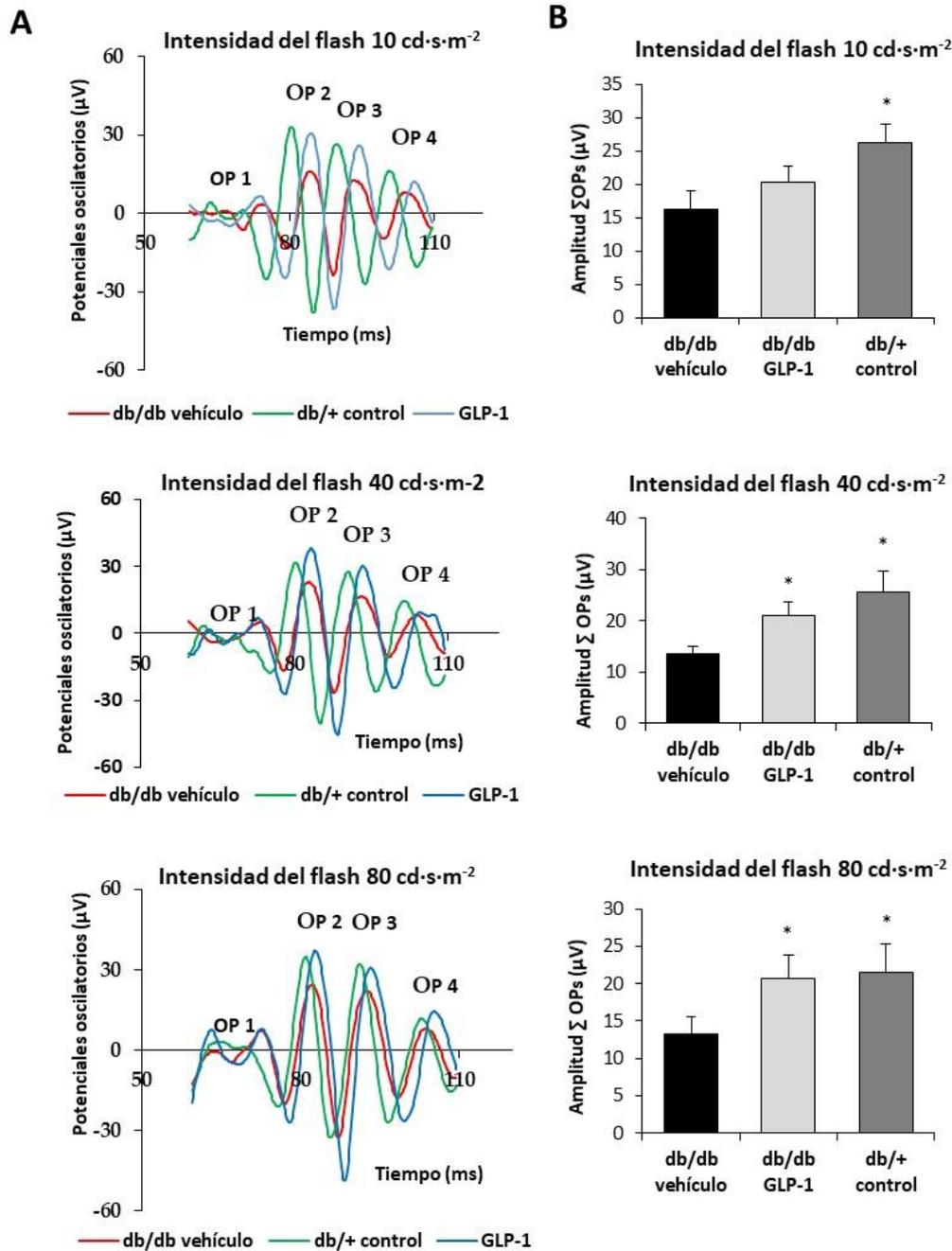


Fig. 18 Comparativa de los potenciales oscilatorios entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Gráfica representativa de los OPs a  $10 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ ,  $40 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ , y  $80 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con GLP-1 (en azul) y los animales db/+ controles (en verde). (B) Análisis cuantitativo de la amplitud del sumatorio de todos los OPs en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco).). Resultados expresados como promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db tratado con vehículo.

### 4.2.3. Análisis morfológico in vivo mediante Tomografía de Coherencia Óptica

En la Fig. 19b se puede observar que el grosor total de la retina así como el de la ONL y la INL en los animales diabéticos fue menor en comparación con los animales controles. La administración tópica de GLP-1 fue capaz de revertir la disminución en el grosor de la retina inducida por la diabetes (Fig. 19b).

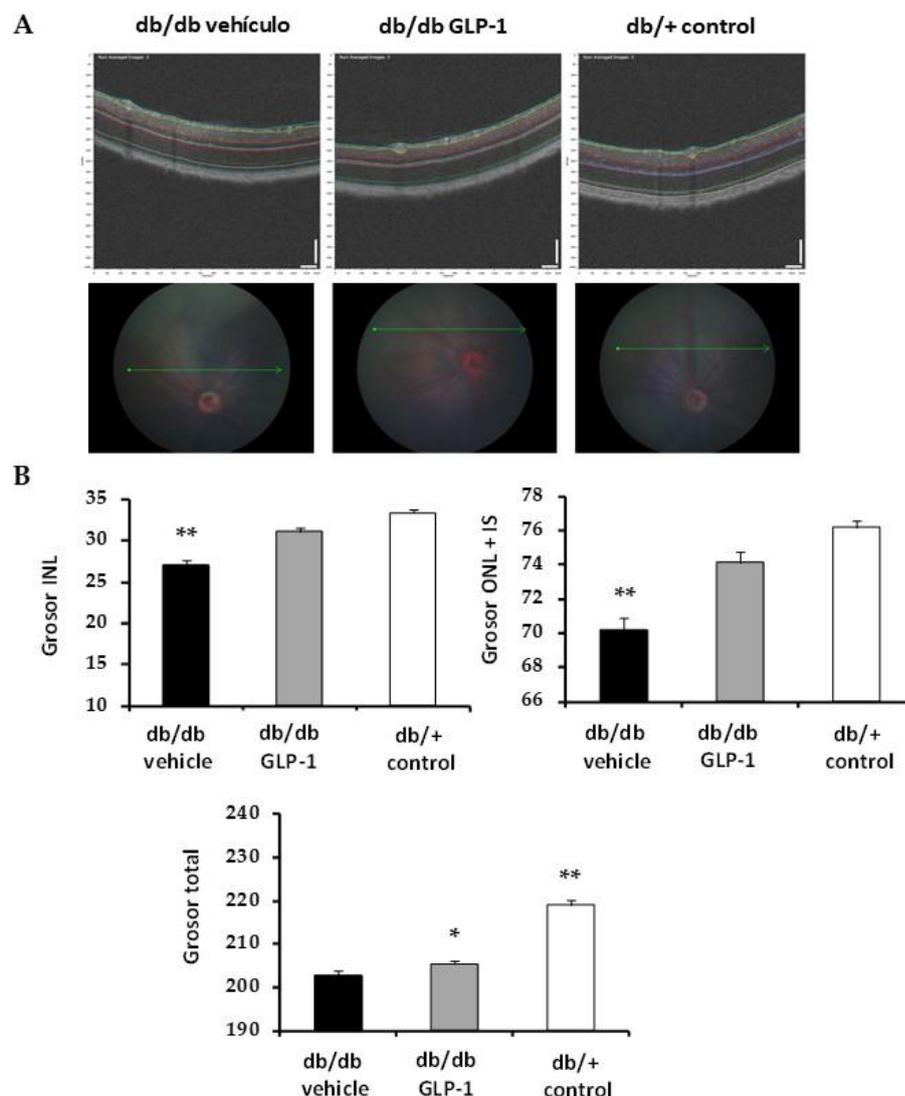


Fig. 19 Comparativa del OCT entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Imagen de fondo de ojo y OCT representativo de la retina de un animal db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. (B) Gráfico comparativo del grosor de la capa de fotorreceptores (ONL + IS), el grosor de la INL y el grosor total de la retina en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Resultados expresados como promedio  $\pm$  SEM. En el grosor de la capas nucleares el grupo db/db vehículo tiene un nivel de significancia del  $**p < 0.01$  en comparación con los otros grupos, mientras que en el grosor total de la retina el grupo db/db GLP-1 tiene una significancia de  $*p < 0.05$  y el grupo db/+ control  $**p < 0.01$  respecto el grupo tratado con vehículo.

#### 4.2.4. Evaluación post-mortem

##### 4.2.4.1. Estudio de la activación glial

###### 4.2.4.1.1. Gliosis reactiva: Expresión de GFAP

La activación de la macroglía se determinó mediante la evaluación de la expresión de GFAP por inmunofluorescencia (Fig. 20) utilizando el sistema explicado en el apartado de técnicas de histoquímica en material y métodos (Tabla 22). En la Fig. 20 y la Tabla 27 observamos que en los animales no diabéticos la expresión de GFAP estaba confinada únicamente en la GCL (“score” 1), en los animales diabéticos tratados con vehículo aumentó su expresión, y además se extendió a las capas exteriores de la retina, hasta “scores” superiores a 3, indicando una activación glial (Fig. 20) (Tabla 27). El tratamiento tópico con GLP-1 durante tres semanas fue capaz de disminuir significativamente la activación glial de manera que la expresión de GFAP fue confinada a los astrocitos en la GCL (Fig. 20) e inferior al “score 2” (Tabla 27).

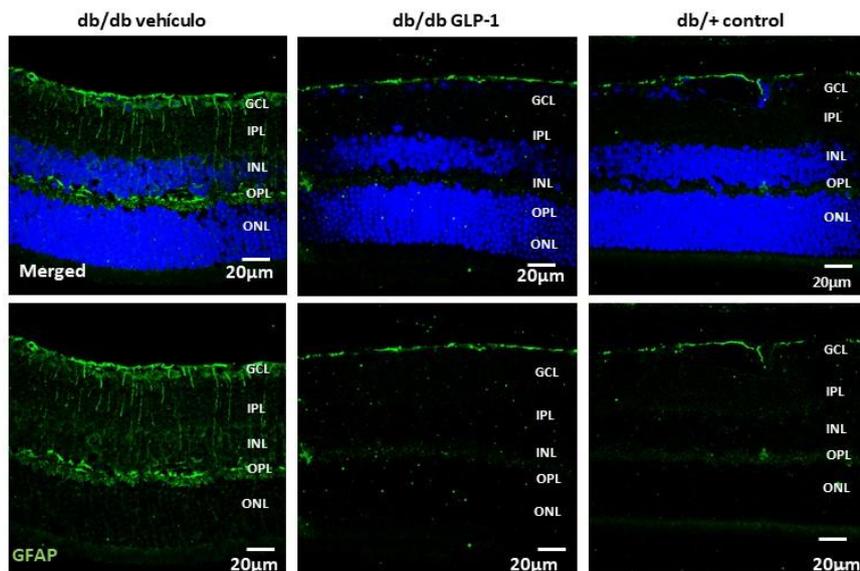


Fig. 20 Comparativa de la activación glial entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

Comparativa de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para GFAP (en verde) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 20µm.

Score	% marcaje positivo para GFAP		
	db/db vehicle	db/db GLP-1	db/+ control
1	0	100	100
2	0	0	0
3	20	0	0
4	40	0	0
5	40	0	0

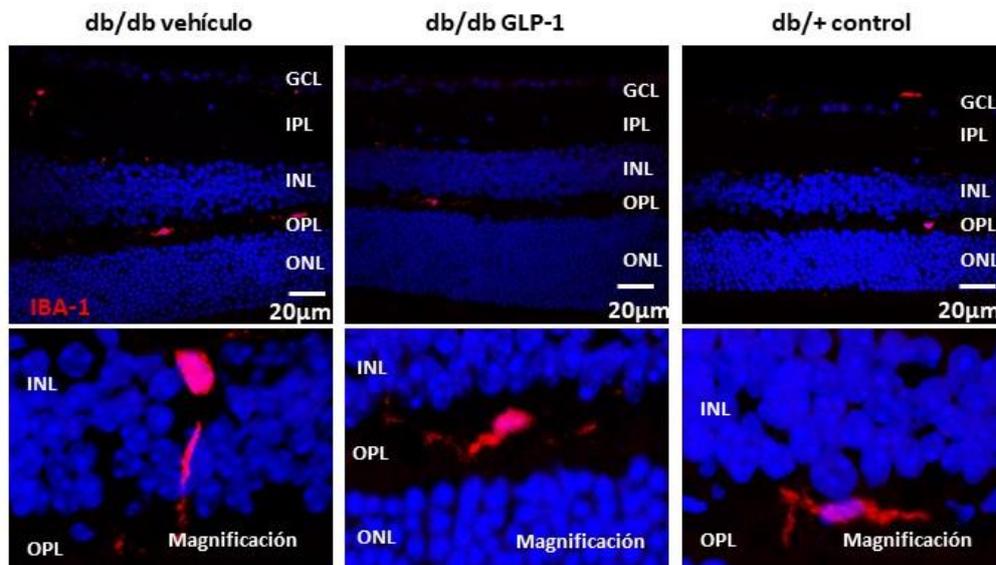
Tabla 27 Cuantificación de la activación glial.

Cuantificación de la activación glial basada en la extensión de GFAP expresado en la retina. (n=10/grupo). Score 1: GFAP se confina exclusivamente en la GCL; score 2: GFAP se mantiene en la GCL y se expresa en algunos procesos de las células de Müller proximales a la GCL; score 3: GFAP se expresa en varios procesos citoplasmáticos de las células de Müller pero no llegan a extenderse hasta la ONL; score 4: algunos de los procesos positivos para GFAP llegan hasta la ONL; score 5: muchos procesos citoplasmáticos de las células de Müller positivos para GFAP llegan hasta la ONL.

#### 4.2.4.1.2. Activación de la microglia

La activación de la microglía se determinó mediante el análisis de Iba-1, principal marcador de células de microglia (Fig. 21a). Se observó que el número de células de microglia retinianas estaba aumentado en el grupo de animales diabéticos tratado con vehículo respecto al resto de grupos debido a la activación microglial generada por la RD (Fig. 21b). Además, se comprobó que mientras en el grupo tratado con el fármaco en colirio y el grupo control las células de microglia se distribuían principalmente por las capas plexiformes, en las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo la microglia se desplazaba hacia la INL (Fig. 21) indicando la activación microglial por el proceso inflamatorio a causa de la RD.

A



B

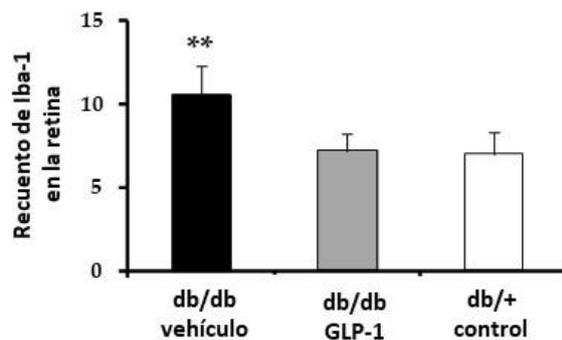


Fig. 21 Activación microglial entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Comparativa y magnificación de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para Iba-1 (en rojo) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30 μm. (B) Cuantificación de células de microglia activadas por sección retiniana en en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), animales db/db tratados con GLP-1 (en gris) y en los animales controles (en blanco). Resultados expresados como promedio ± SEM. \*\*p<0.01 en comparación con el resto de grupos.

#### 4.2.4.2. Evaluación de la apoptosis y la supervivencia neuronal

##### 4.2.4.2.1. Cuantificación de células apoptóticas mediante la técnica del TUNEL

La apoptosis en la retina fue analizada mediante la técnica del TUNEL (Fig. 22a). El número de células apoptóticas en los animales diabéticos tratados con vehículo estaba significativamente aumentado en comparación con los animales controles en las capas INL y

ONL (Fig. 22b). La administración tópica de GLP-1 resultó en una disminución en el número de células apoptóticas en ambas capas nucleares.

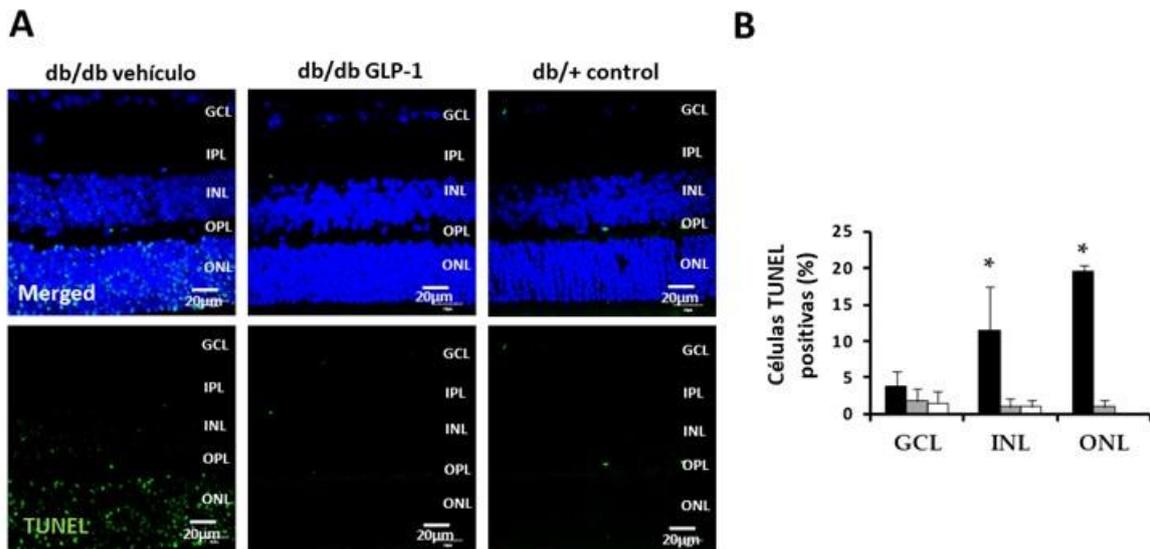


Fig. 22 Comparativa de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Comparativa de una imagen representativa del TUNEL (en verde) en los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y db/+ controles. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 20µm. (B) Cuantificación del porcentaje de células positivas para el TUNEL respecto el número de células totales en las diferentes capas nucleares de la retina (GCL, INL y ONL). Resultados expresados como promedio del porcentaje ± SEM. \*p<0.05 en comparación con los otros grupos experimentales.

#### 4.2.4.2.2. Estudio de la expresión de caspasa

El efecto anti-apoptótico observado con la técnica del TUNEL se confirmó al evaluar la expresión de la proteína caspasa 9 por western blot (Fig. 23). Caspasa 9 es una enzima imprescindible para el inicio de la vía de apoptosis. El ratio de caspasa 9 activa/caspasa 9 total en los animales diabéticos tratados con vehículo estaba incrementado respecto a los animales controles, y la administración tópica de GLP-1 fue capaz de disminuir los niveles de caspasa 9 activa, indicando que GLP-1 revierte la apoptosis caspasa-dependiente (Fig. 23).

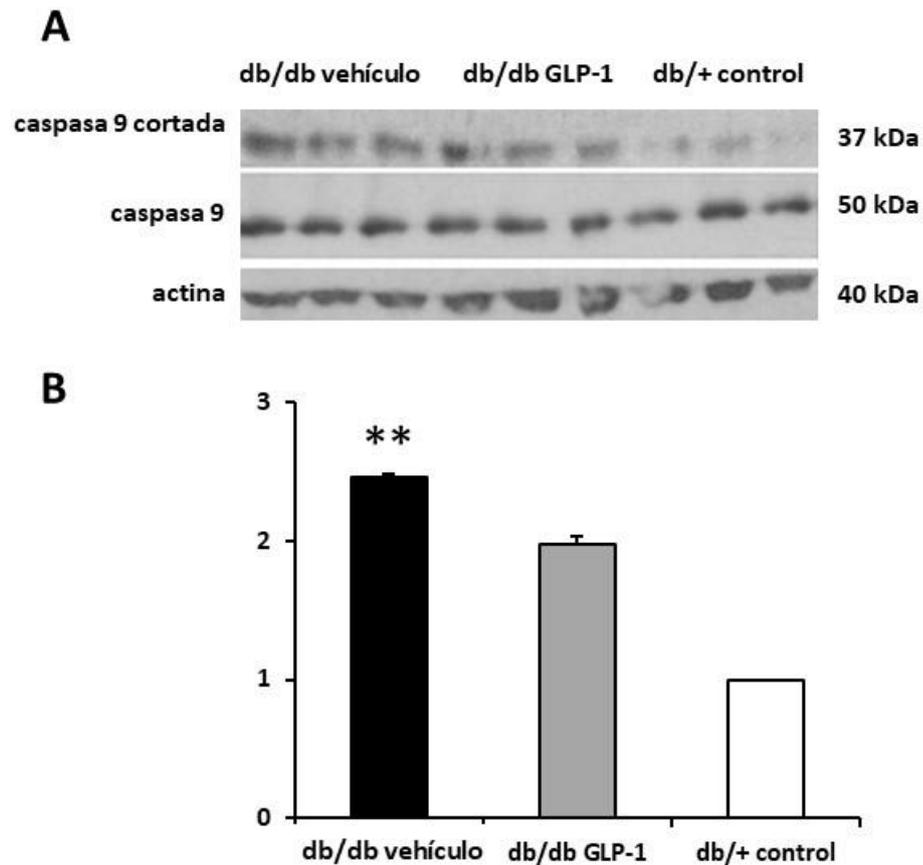


Fig. 23 Análisis comparativo de la expresión del ratio caspasa 9 activa/caspasa total entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Western blot representativo de caspasa 9 activa y caspasa 9 total en los grupos de animales db/db tratado con vehículo, animales db/db tratado con GLP-1 y animales db/+ control.  $\beta$ -Actina fue utilizada como marcador control. (B) Análisis densitométrico del western blot de caspasa 9. Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM respecto al control. \*\* $p < 0.01$  en comparación con los otros grupos experimentales.

#### 4.2.4.2.3. Análisis morfológico de la retina mediante Hematoxilina & Eosina

La pérdida de células de la retina observada mediante el TUNEL fue validada por un análisis morfológico de la retina realizando una tinción de las secciones de la retina con Hematoxilina & Eosina (Fig. 24a). El número de células totales en la GCL, INL y ONL fue menor en los animales diabéticos tratados con vehículo en comparación con los animales no diabéticos debido a la muerte celular generada por la RD. El número de células totales detectadas en los animales diabéticos tratados con GLP-1 fue similar al observado en el grupo control, revertiendo la apoptosis inducida por la diabetes (Fig. 24b).

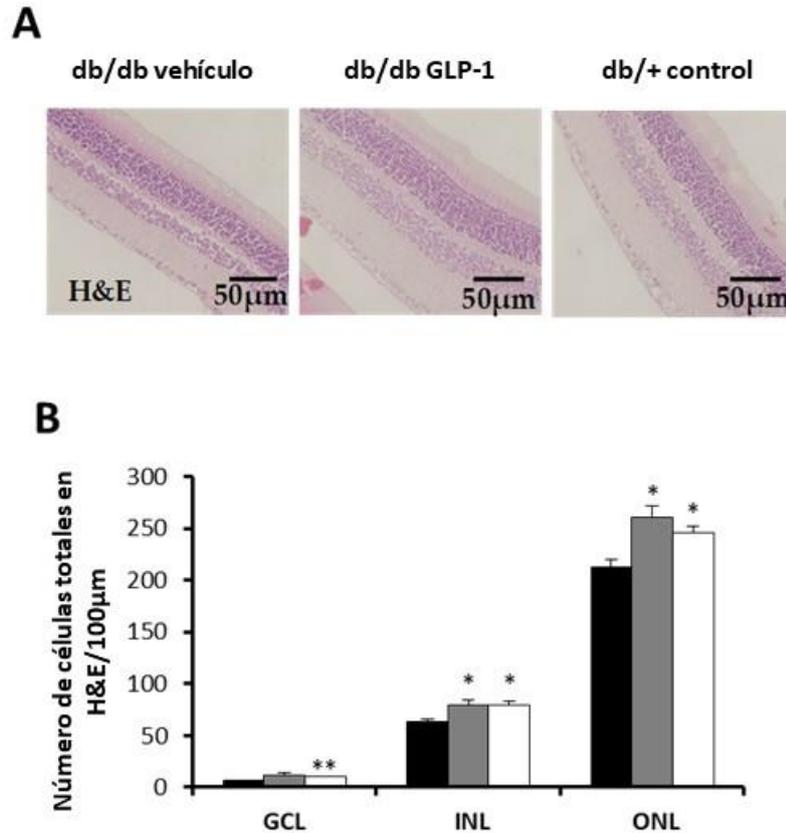


Fig. 24 Análisis morfológico de la retina entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Análisis comparativo de una imagen representativa de Hematoxilina & Eosina en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Barra de escala = 50µm. (B) Cuantificación del número de células totales en GCL, INL y ONL en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Los valores se expresan como promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db tratado con vehículo; \*\* $p < 0.01$  en comparación con el grupo db/db tratado con vehículo.

#### 4.2.4.2.4. Estudio de la expresión de moléculas de supervivencia neuronal

La administración tópica de GLP-1 fue capaz de evitar la inhibición de la fosforilación de Akt inducida por la diabetes que es imprescindible para la supervivencia neuronal tal como se ha comentado en la introducción (Fig. 25). Notablemente, las retinas de los animales diabéticos tratados con GLP-1 presentaron también una mayor expresión de GSK3 $\beta$  fosforilado y  $\beta$ -catenin en comparación con la retina de los animales diabéticos tratados con vehículo (Fig. 25) lo que indica que GLP-1 activa la vía de supervivencia de Akt/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin. Además, el tratamiento con GLP-1 aumentó la fosforilación del factor de transcripción CREB y evitó la inhibición del factor anti-apoptótico Bcl-xL inducida por la diabetes (Fig. 25).

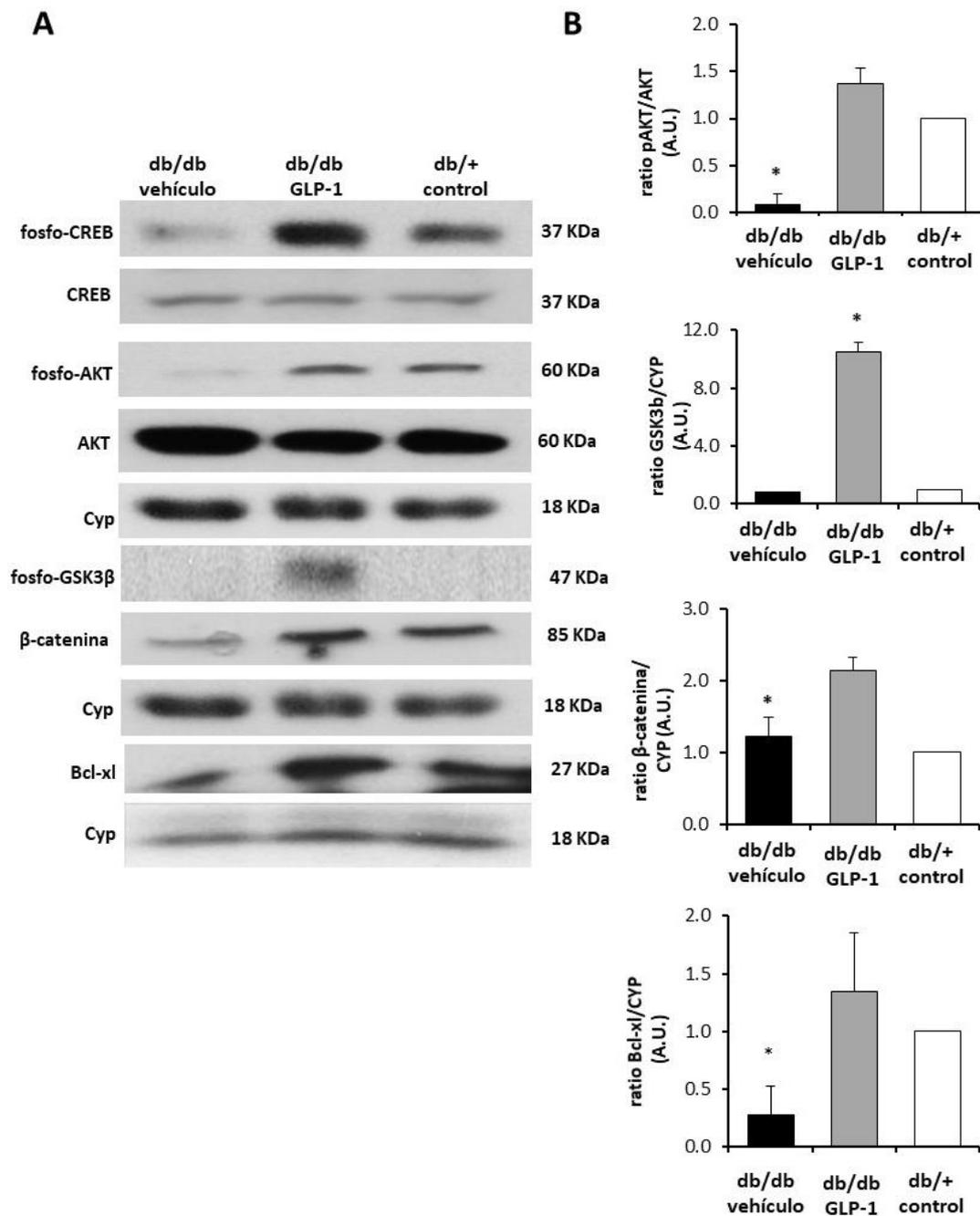


Fig. 25 Análisis comparativo de la expresión de moléculas de supervivencia.

(A) Western blot representativo de la ratio de CREB fosforilado/CREB total, Akt fosforilado/Akt total, GSK3 $\beta$  fosforilado,  $\beta$ -catenin y Bcl-xL entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles. (B) Análisis densitométrico de las bandas de western blot. Cyclophilina (Cyp) fue utilizada como marcador control. Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. La ratio de Akt tuvo una significancia de  $*p < 0.05$  en el grupo db/db GLP-1 en comparación con los otros grupos experimentales. Para GSK3 $\beta$ , el grupo db/db GLP-1 tuvo una significancia de  $*p < 0.05$  en comparación con los otros grupos experimentales. Para  $\beta$ -catenin, el grupo db/db vehículo tuvo una significancia de  $*p < 0.05$  en comparación con el grupo tratado con GLP-1. La expresión de Bcl-xL tuvo una significancia de  $*p < 0.05$  en el grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos experimentales.

#### 4.2.4.2.5. Recuento de células neuronales en proliferación

Después de observar los efectos de GLP-1 revertiendo la apoptosis neuronal ya instaurada en la diabetes de larga evolución y dada su capacidad para activar vías de supervivencia como  $\beta$ -catenin, proteína que se ha relacionado con la proliferación de células progenitoras neurales en el adulto, exploramos si GLP-1 es capaz de actuar sobre la neurogénesis. Para ello, se analizó por inmunofluorescencia y RT-PCR el marcador de proliferación Ki-67 (Fig. 26).

Tras observarse un incremento significativo en la expresión del gen *Ki67* (Fig. 26c), y de la proteína Ki-67 por algunas células de la retina de aspecto neuronal en el grupo de animales diabéticos tratados con GLP-1 (Fig. 26b,d), se realizó una inmunofluorescencia para Ki-67 en combinación con NeuN, un marcador neuronal que marca principalmente células ganglionares y algunas neuronas de la INL (Fig. 26a). La co-inmunofluorescencia reveló el marcaje de ambas proteínas por unas pocas células de la INL principalmente, aunque también se observaron células ganglionares positivas para ambos marcadores.

Identificamos a las células Ki67 positivas como neuronas amacrinas, ya que las células Ki67 positivas colocalizaron con calbindina. El análisis ortogonal reveló que algunas células en proliferación eran también positivas para calbindina (Fig. 27a) tanto en la INL como en la GCL, sugiriendo que las células en proliferación son células de tipo amacrina en la INL y células amacrinas desplazadas en la GCL. La magnificación de la Fig. 27b muestra como en una retina representativa de un animal diabético tratado con GLP-1 el marcaje de Ki-67 coexiste en una célula positiva para calbindina en la GCL y en la INL, mientras que en el grupo diabético tratado con vehículo y el grupo control las neuronas no eran positivas para Ki-67.

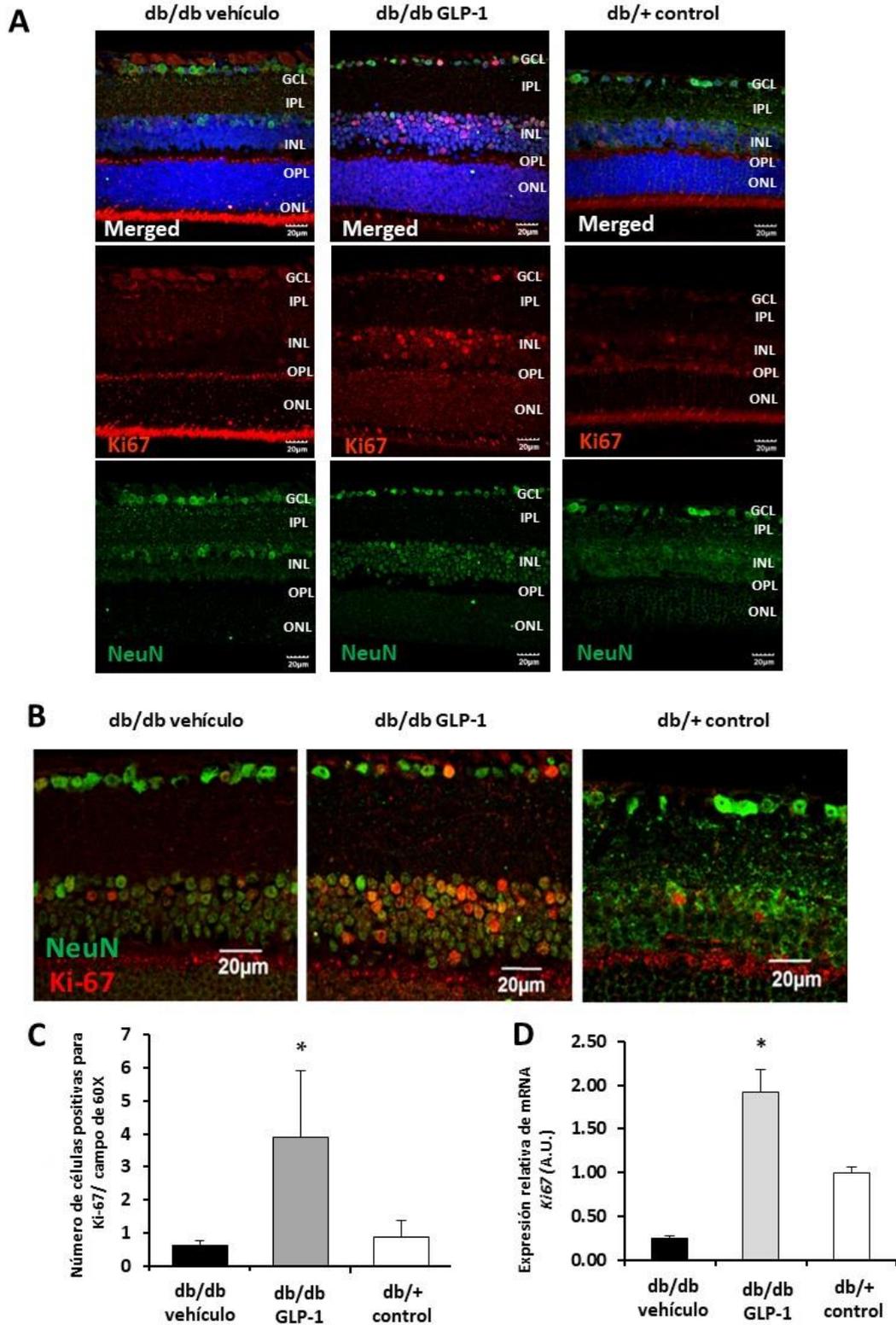


Fig. 26 Análisis morfológico de las células positivas para Ki-67 en la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Análisis comparativo de una imagen representativa de una co-inmunofluorescencia de Ki-67 (en rojo) y NeuN (en verde) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst. Barra de escala = 20µm. (B) Análisis comparativo de una imagen representativa de una co-inmunofluorescencia de Ki-67 (en rojo) y NeuN (en verde) en db/db tratado con vehículo, db/db

tratado con GLP-1 y db/+ control. Barra de escala = 20µm. (C) Gráfico comparativo del número de células positivas para Ki-67 por campo de aumento 60x en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). (D) Gráfico de la expresión génica de *Ki-67* en las retinas de los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db tratado con vehículo.

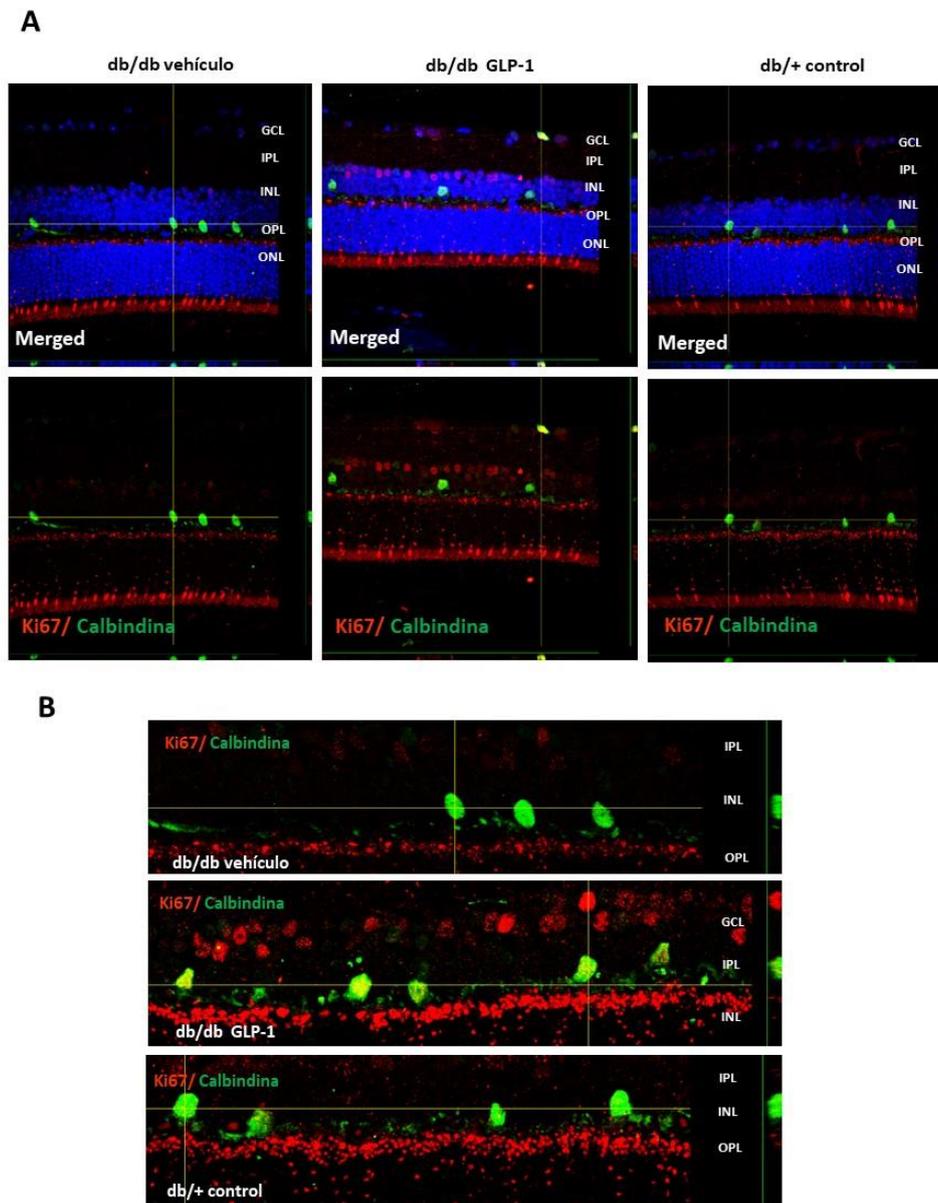


Fig. 27 Análisis ortogonal de la co-localización de las células positivas para Ki-67 y calbindina en la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Análisis comparativo de una imagen ortogonal representativa de Ki-67 (en rojo), calbindina (en verde), y la combinación de ambos (en amarillo) en la retina de db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst. (B) Magnificación ortogonal de Ki-67 (en rojo), calbindina (en verde), y la combinación de ambos (en amarillo) en la retina de db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. En la retina representativa de db/db GLP-1 se observan células en amarillo que son el resultado de una colocalización entre Ki-67 y calbindina.

### 4.2.4.3. Exploración de las alteraciones microvasculares

#### 4.2.4.3.1. Estudio de la integridad de la barrera hematorretiniana mediante la técnica del Evans Blue

El ensayo de Evans Blue se basa en la unión irreversible de esta molécula con la albúmina circulante, hecho que nos permite estudiar la vasculatura y la integridad de la BHR.

Se identificaron focos de extravasación de albúmina asociada a Evans Blue en las retinas de los animales diabéticos (Fig. 28a). Sin embargo, el número de estos focos de extravasación estaba disminuido en las retinas de los animales tratados con GLP-1 hasta niveles comparables al grupo control evidenciando que GLP1 actúa evitando la ruptura de la barrera hematorretiniana inducida por la diabetes (Fig. 28a, b).

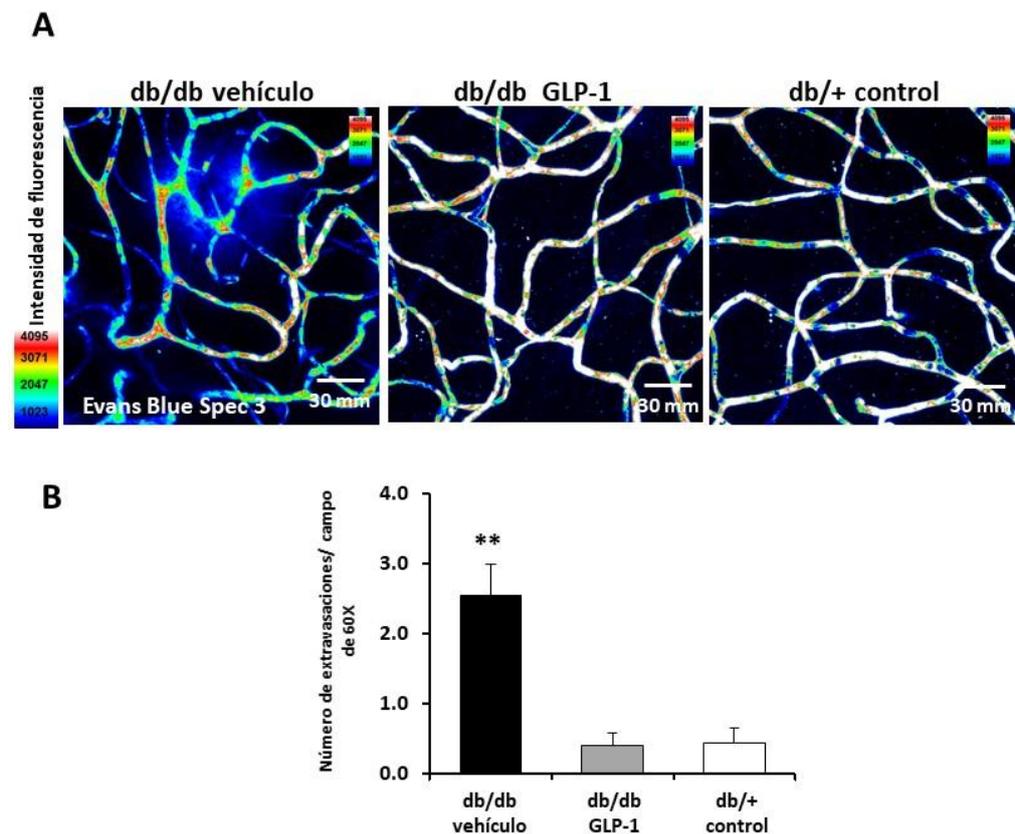


Fig. 28 Análisis comparativo del whole-mount de la retina entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Análisis comparativo de una imagen representativa en spec3 del whole mount de la retina en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Barra de escala = 30μm. (B) Número de extravasaciones por campos de 60X en los animales diabéticos tratados con vehículo (en negro), animales diabéticos tratados con GLP-1 (en gris) y los animales controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \*\* $p < 0.01$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos.

#### 4.2.4.3.2. Cuantificación de la neovascularización

##### 4.2.4.3.2.1. Recuento de ramificaciones capilares y células endoteliales en proliferación

Con el fin de evaluar la formación de nuevos vasos sanguíneos, se contaron el número de ramificaciones capilares y de brotes vasculares (Fig. 29) en los “*whole-mount*” de retina, y el número de células endoteliales en proliferación (Ki-67 positivas) en las secciones retinianas en parafina (Fig. 30). Para identificar las células endoteliales se utilizó el marcador endotelial CD-31. Los valores fueron comparables entre todos los grupos (Fig. 29) y no se observó colocalización entre Ki-67 y CD-31 de manera que no hubo neovascularización (Fig. 30).

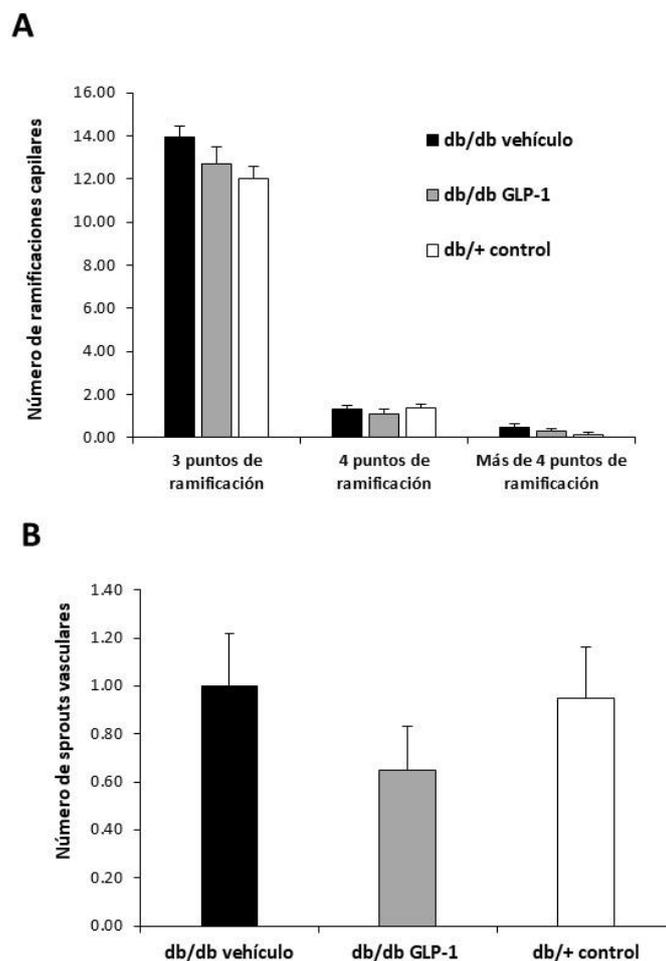


Fig. 29 Evaluación de neovascularización en los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Análisis comparativo del número de ramificaciones capilares y (B) de brotes vasculares entre los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM.

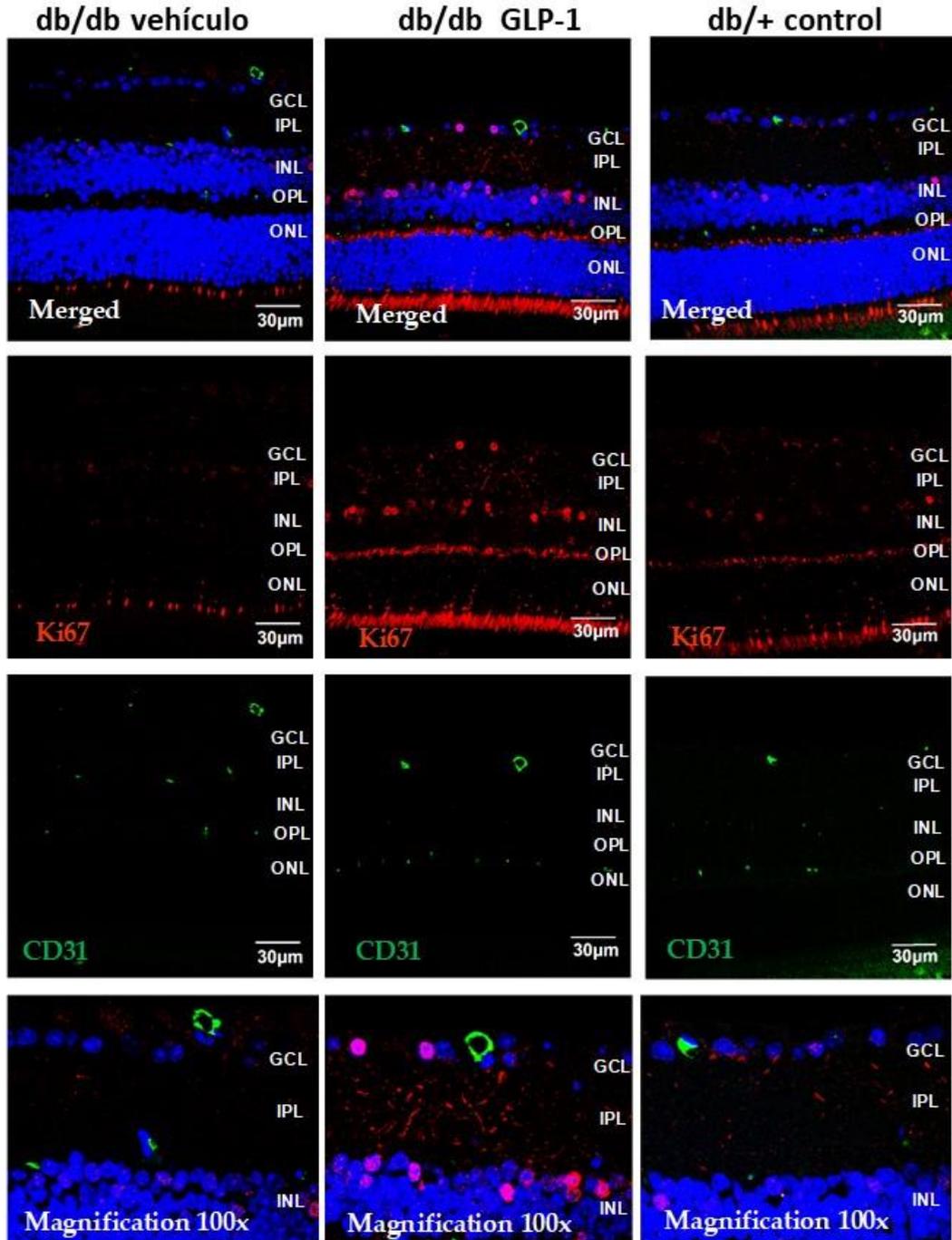


Fig. 30 Análisis comparativo de una inmunofluorescencia para Ki-67 y CD-31.

Imagen representativa de una co-inmunofluorescencia de Ki-67 (en rojo) y células endoreliales CD-31+ (en verde) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst. Barra de escala = 20µm.

#### 4.2.4.3.3. Estudio de la expresión de VEGF

En las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo, la proteína VEGF, estaba sobreexpresada (Fig. 31). El tratamiento con GLP-1 fue capaz de revertir dicho aumento, indicando una reducción en la hperpermeabilidad inducida por la RD (Fig. 31).

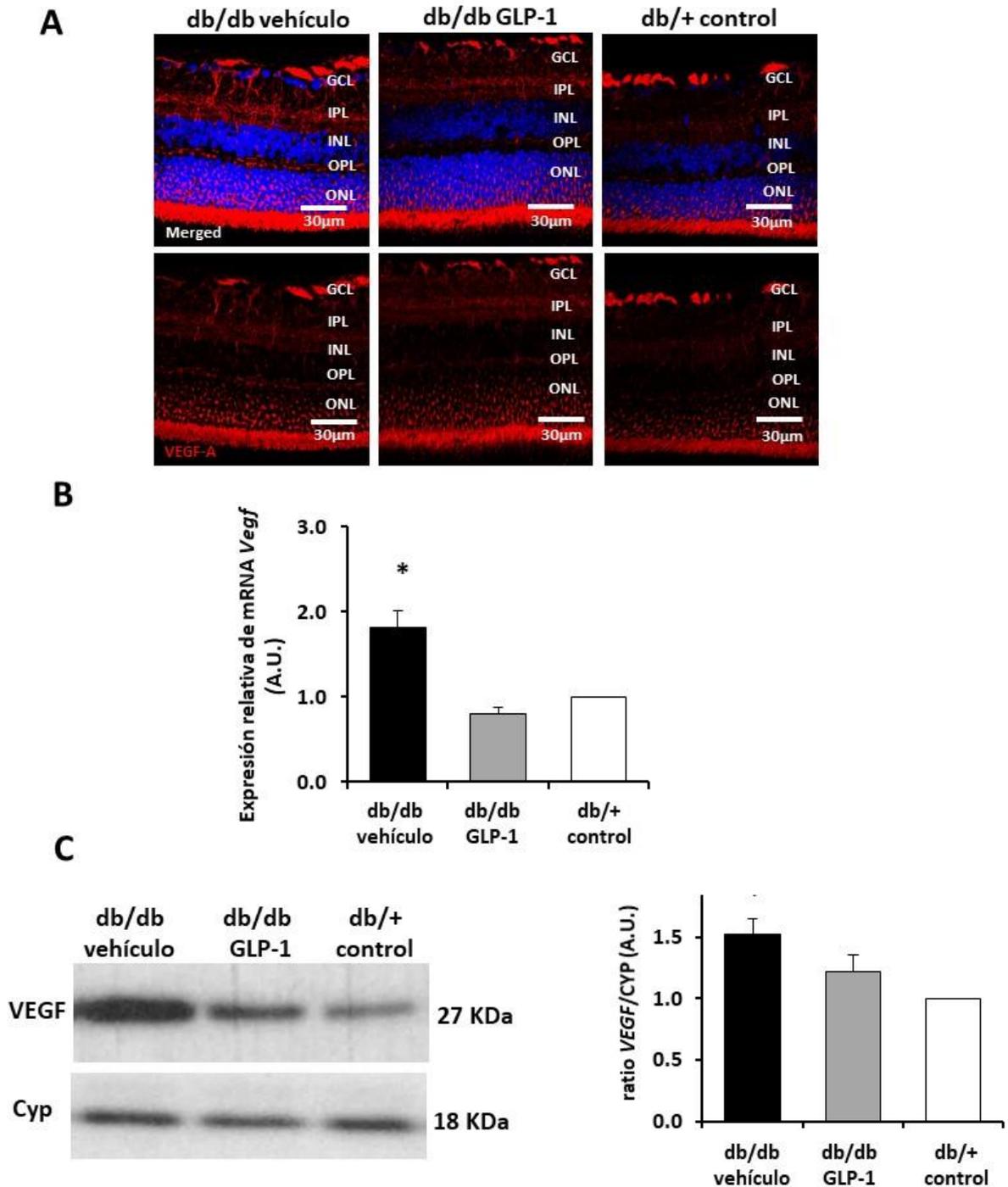


Fig. 31 Efectos de GLP-1 sobre la expresión proteina de VEGF y la expresión génica de *Vegf*.

(A) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para VEGF (en rojo) en

db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30µm. (B) Análisis de la expresión génica de *Vegf* por RT-PCR en db/db vehículo (en negro), db/db GLP-1 (en gris) y db/+ control (en blanco). \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos. (C) Western blot representativo de VEGF en retina y análisis densitométrico del western blot en db/db vehículo (en negro), db/db GLP-1 (en gris) y db/+ control (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. Cyclophilina (Cyp) fue utilizada como marcador control. La significancia entre los grupos db/db vehículo y el resto de grupos fue de \* $p < 0.05$ .

Los niveles de mRNA de *Vegf* en las retinas de los animales tratados con GLP-1 fueron significativamente menores que en las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo (Fig. 31b). La administración tópica de GLP-1 también disminuyó los niveles de proteína en la retina respecto a los animales diabéticos tratados con vehículo (Fig. 31c).

### 4.2.4.4. Estudio de los mecanismos de acción de GLP-1 en la retina

#### 4.2.4.4.1. Excitotoxicidad por glutamato

##### 4.2.4.4.1.1. Niveles de glutamato

Tal como se ha explicado en la introducción, el desequilibrio en la producción de factores neuroprotectores y la acumulación extracelular de glutamato tienen un papel clave en la patogénesis de la RD. Los niveles de glutamato en las retinas de los ratones diabéticos db/db con 12 semanas de edad están elevados significativamente respecto a los animales controles [144]. Este incremento se mantiene a las 24 semanas de edad (Fig. 32). La administración tópica de GLP-1 disminuyó el contenido de glutamato hasta un nivel comparable al control (Fig. 32).

##### 4.2.4.4.1.2. Expresión de GLAST

Los niveles de GLAST, la principal proteína implicada en la recaptación del glutamato estaban disminuidos en las retinas de los animales diabéticos tratados en vehículo en comparación con la de los animales controles. La administración tópica de GLP-1 fue capaz de aumentar tanto la expresión de mRNA como de proteína GLAST en la retina de los animales diabéticos (Fig. 33).

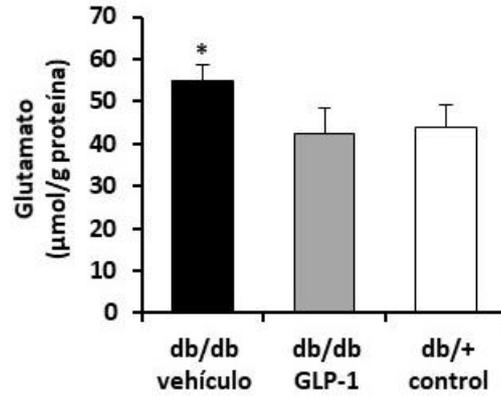


Fig. 32 Análisis comparativo de la concentración de glutamato en la retina medida por HPLC. Niveles de glutamato en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. El grupo tratado con vehículo tiene una significancia de  $*p < 0.05$  respecto el resto de grupos.

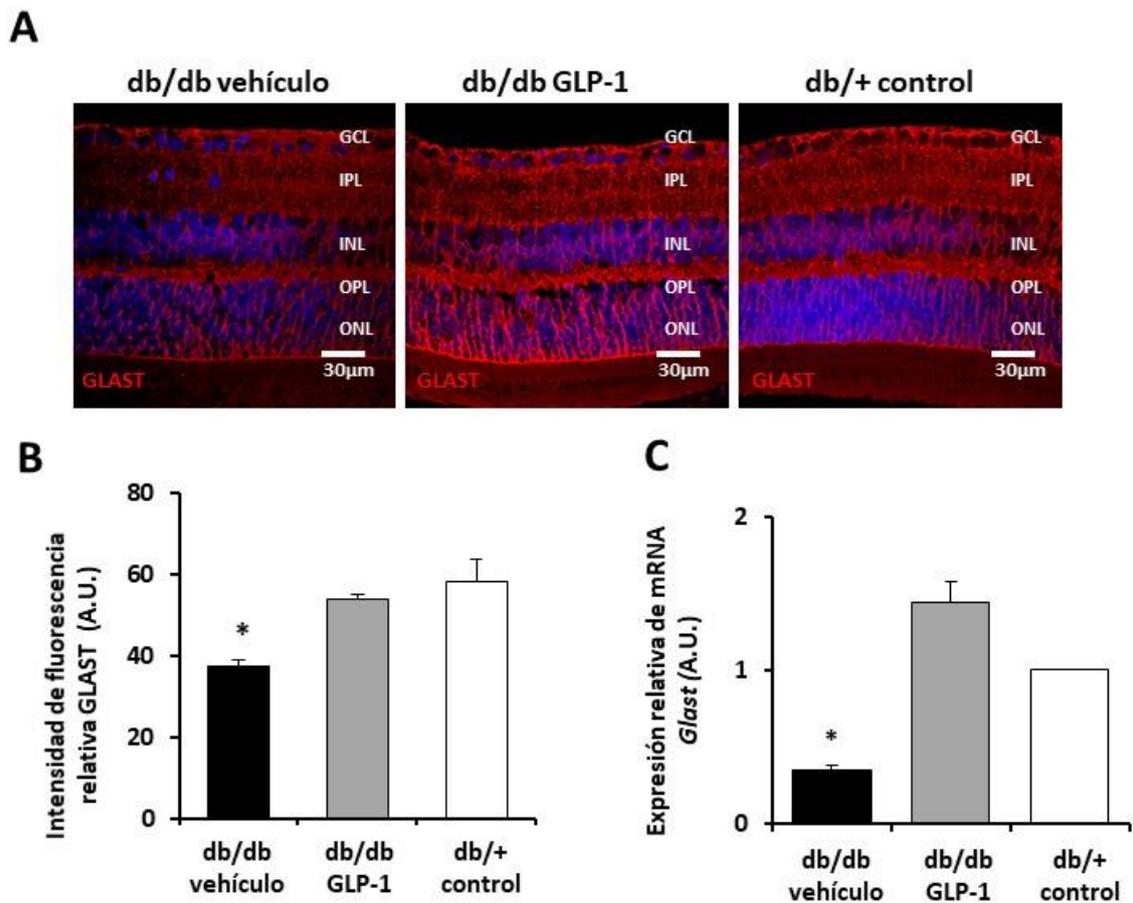
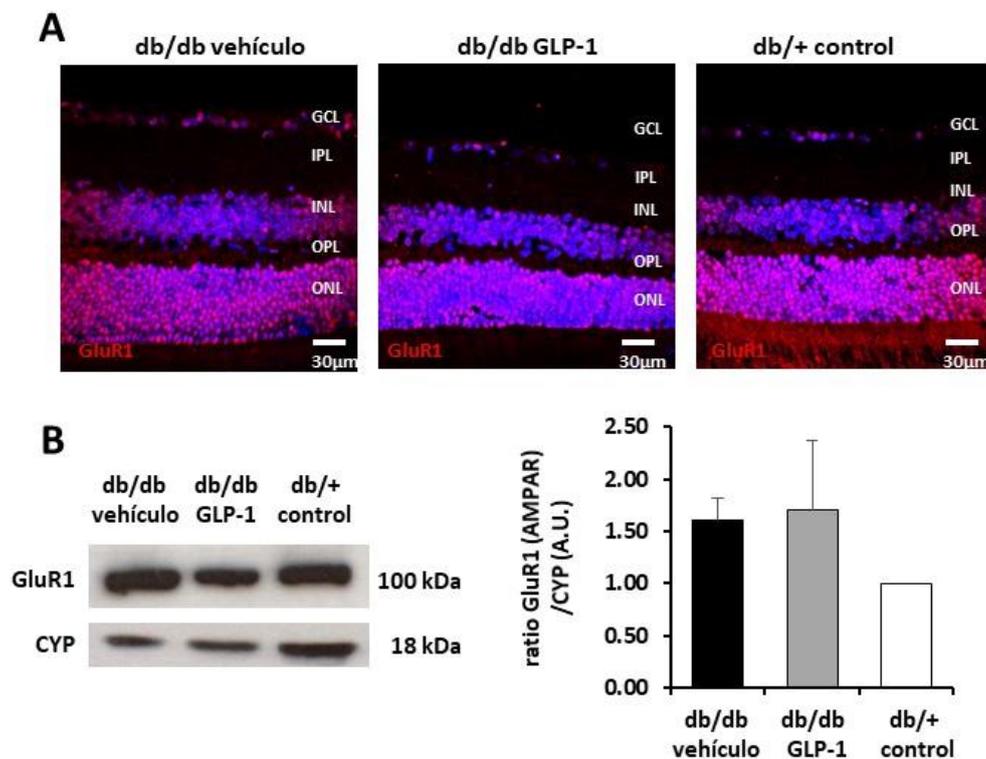


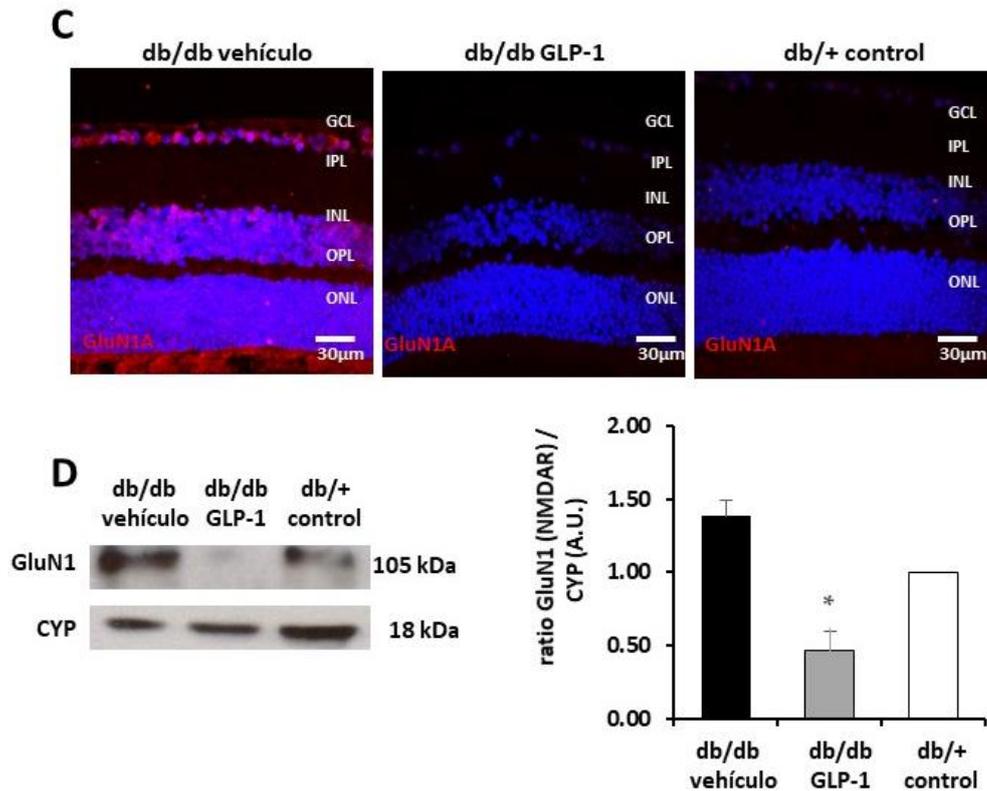
Fig. 33 Efectos de GLP-1 sobre la expresión de GLAST. (A) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para GLAST (en rojo) y (B) cuantificación relativa de la fluorescencia en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratado con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ control (blanco). Los núcleos fueron contra-teñidos con

Hoechst. Barra de escala = 30 $\mu$ m. (C) Análisis de la expresión génica de *Glast* (*Slc1a3*) por RT-PCR en los animales diabéticos tratados con vehículo (en negro), animales diabéticos tratados con GLP-1 (en gris) y los animales controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos.

#### 4.2.4.4.1.3. Expresión del receptor de glutamato de tipo NMDA

La acumulación de glutamato causa excitotoxicidad en la retina por sobre-activación de los receptores ionotrópicos del glutamato de tipo NMDA y de tipo amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato (AMPA). La activación de estos receptores provoca una acumulación de calcio que promueve la muerte neuronal. Mientras que no hemos observado diferencias en el nivel de los receptores AMPA (Fig. 34a,b), sí que encontramos que la subunidad GluN1 del receptor de glutamato de tipo NMDA se encuentra aumentada en las retinas de los animales diabéticos y el tratamiento tópico con GLP-1 es capaz de revertir el aumento, disminuyendo los niveles de proteína GluN1 de forma significativa (Fig. 34c,d).





**Fig. 34 Efectos de GLP-1 sobre la expresión del receptor de glutamato GluN1 (NMDA) y GluR1 (AMPA).** (A) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para GluR1 (en rojo) en db/db tratado con vehículo (en negro), db/db tratado con GLP-1 (en gris) y db/+ control (blanco). Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30µm. (B) Western blot representativo de GluR1 en la retina y análisis densitométrico del western blot de los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). (C) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para GluN1 (en rojo) en db/db tratado con vehículo (en negro), db/db tratado con GLP-1 (en gris) y db/+ control (blanco). Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30µm. (D) Western blot representativo de GluN1 en la retina y análisis densitométrico del western blot de los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Cyclophilina (Cyp) fue utilizada como marcador control. Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db GLP-1 en comparación con el grupo db/db vehículo.

#### 4.2.4.4.2. Estrés oxidativo

Se estudió la expresión de dos marcadores de estrés oxidativo: 8-hidroxiguanosina y nitrotirosina. La 8-hidroxiguanosina es un indicador de los efectos de las ROS sobre el ADN y la nitrotirosina es un indicador de los efectos de las especies reactivas del nitrógeno (NOS) sobre la tirosina que se incrementan en la retina diabética a consecuencia de la hiperglucemia, los niveles de AGEs y las citoquinas proinflamatorias.

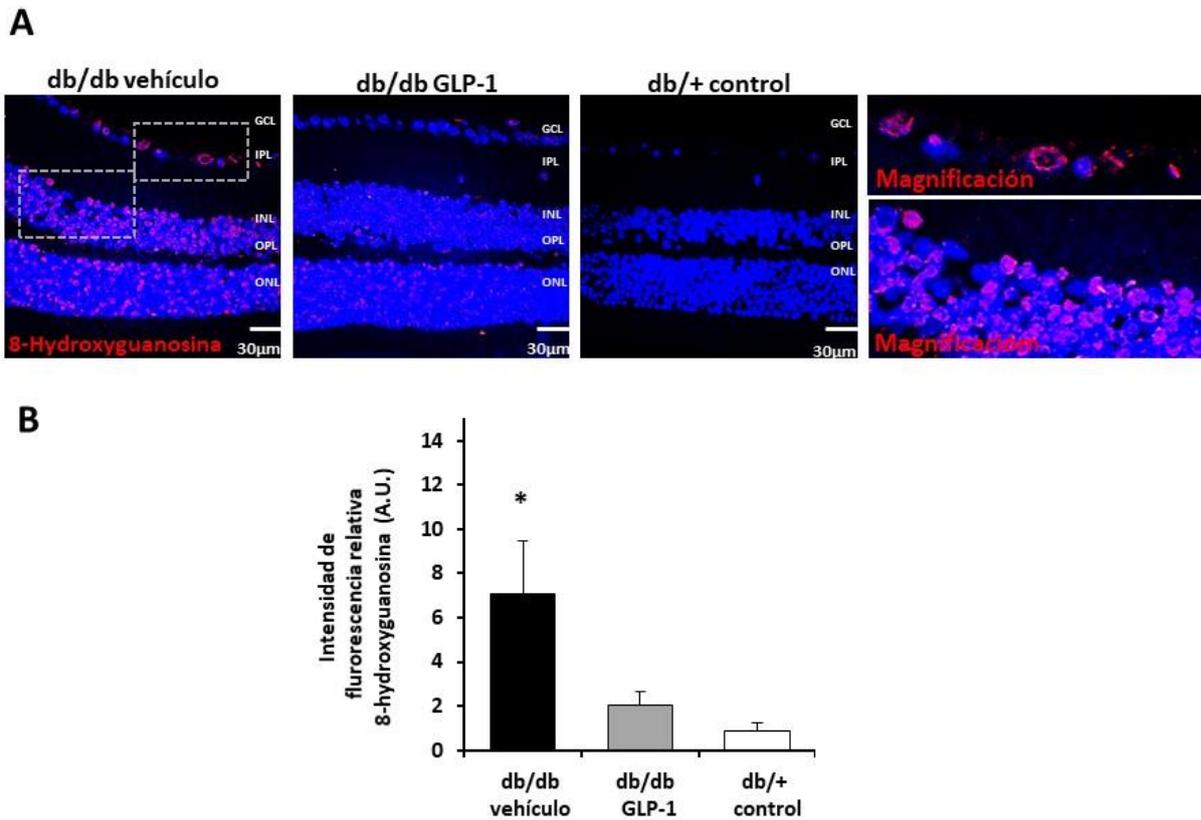
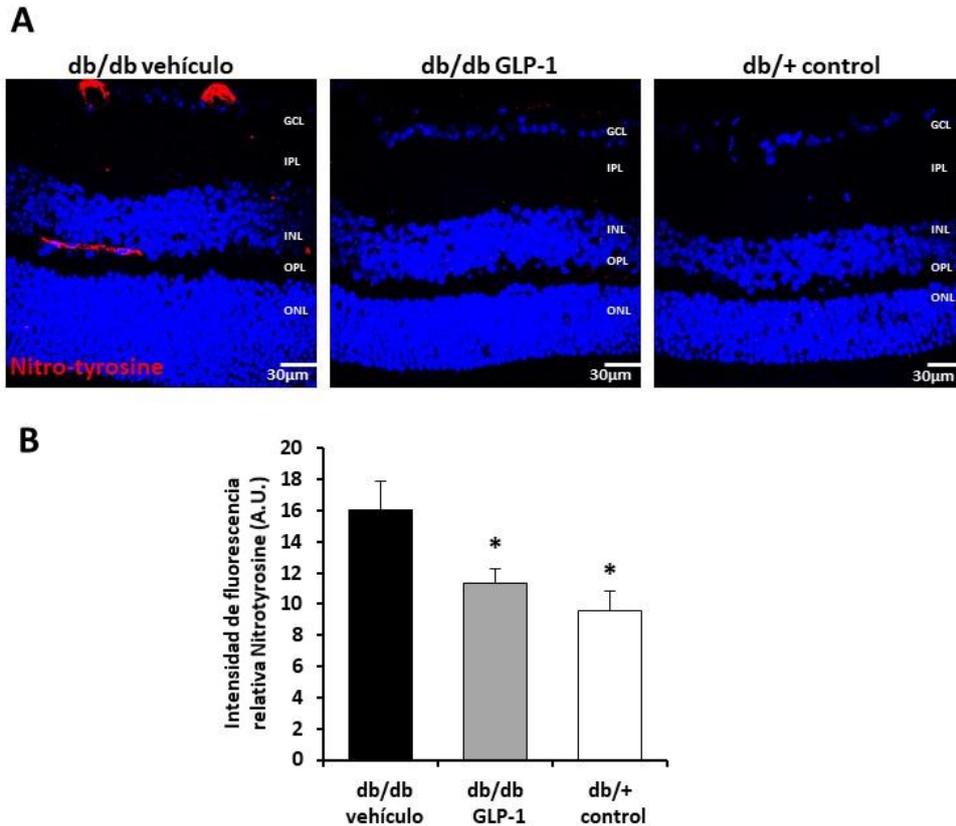


Fig. 35 Efectos de GLP-1 sobre el marcador de estrés oxidativo 8-hidroxi guanosina.

(A) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para 8-Hidroxi guanosina (en rojo) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control, y magnificación de la expresión en el grupo db/db vehículo. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30µm. (B) Cuantificación relativa de fluorescencia de 8-Hidroxi guanosina en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratado con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ control (blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos.

La Fig. 35 y Fig. 36 muestran inmunofluorescencias para 8-hidroxi guanosina y nitrotirosina. Tal y como se puede comprobar en la Fig. 35, los niveles de 8-hidroxi guanosina están aumentados en las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo. La Fig. 36 muestra que los niveles de nitrotirosina también están aumentados en las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo. La administración tópica de GLP-1 fue capaz de disminuir los niveles de 8-hidroxi guanosina y nitrotirosina (Fig. 35 y Fig. 36).



**Fig. 36 Efectos de GLP-1 sobre el marcador de estrés oxidativo nitrotirosina.**

(A) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para nitrotirosina (en rojo) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30µm. (B) Cuantificación relativa de fluorescencia de nitrotirosina en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratado con GLP-1 (en gris) y los animales db/+ control (blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos.

#### 4.2.4.4.3. Inflamación de la retina

##### 4.2.4.4.3.1. Inhibición de NF- $\kappa$ B

Para evaluar los efectos antiinflamatorios de la administración tópica de GLP-1 en la retina se evaluó su efecto sobre NF- $\kappa$ B y sobre las vías que lo modulan como AMPK [265] [266] [317]. Para ello se analizaron las proteínas AMPK, I $\kappa$ B $\alpha$  y NF- $\kappa$ B. Las retinas de los animales diabéticos tratados con GLP-1 mostraron un aumento en el ratio de AMPK fosforilado respecto a los animales diabéticos tratados con vehículo (Fig. 37a,b). En cambio, el ratio de I $\kappa$ B $\alpha$  fosforilada respecto I $\kappa$ B $\alpha$  total estaba disminuido significativamente en las retinas de los animales diabéticos tratados con GLP-1 en comparación con los animales tratados con vehículo (Fig. 37b). Como consecuencia, las retinas de los animales diabéticos tratados con

GLP-1 mostraron una disminución significativa en el contenido de la proteína NF- $\kappa$ B activa (p65) respecto a los animales diabéticos tratados con vehículo (Fig. 37b). El estudio de NF- $\kappa$ B por inmunofluorescencia confirmó que el factor de transcripción se estaba translocando al núcleo en las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo mientras que la administración tópica de GLP-1 disminuyó la translocación (Fig. 38).

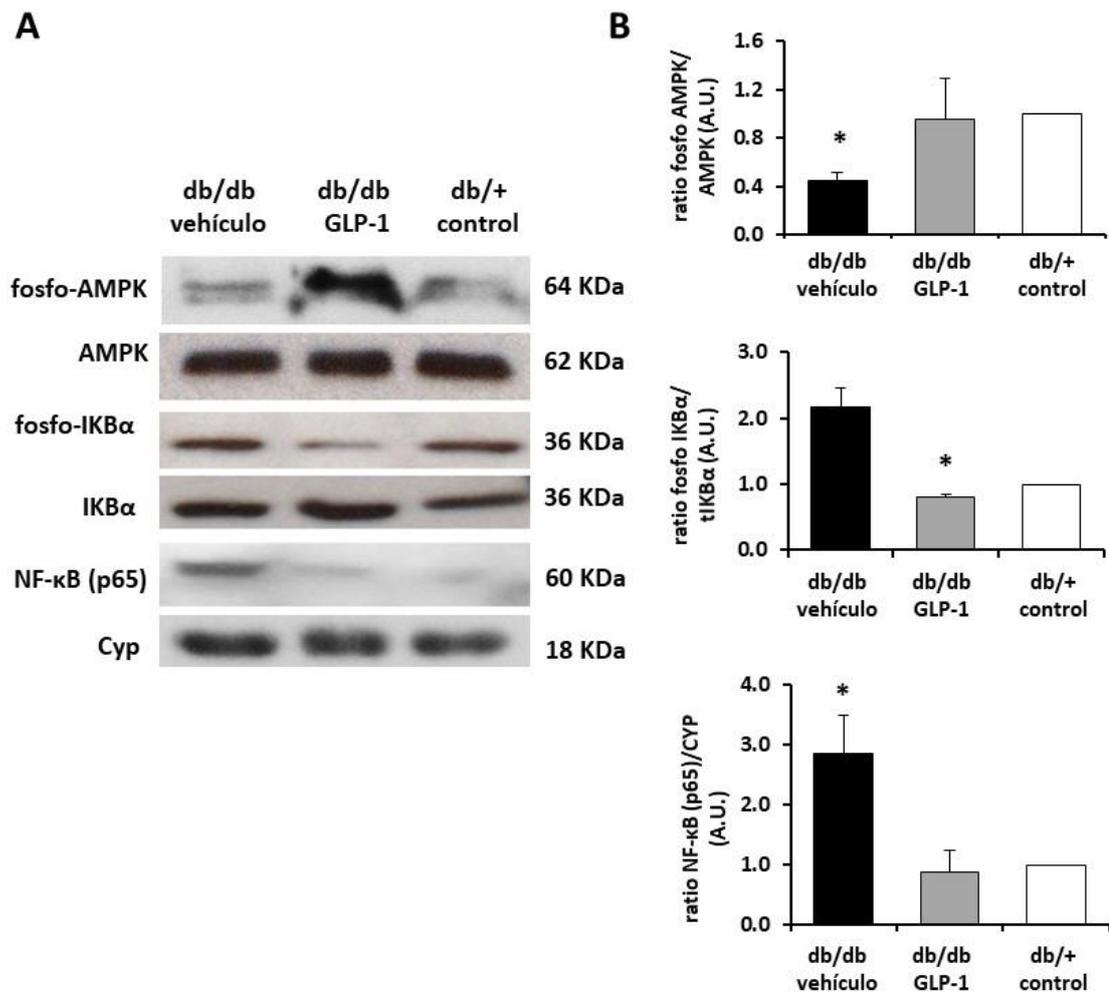


Fig. 37 Efectos de la administración tópica de GLP-1 sobre la fosforilación de IκBα inducida por la diabetes e inhibición de NF- $\kappa$ B por medio de AMPK.

(A) Western blot representativo de AMPK fosforilado, AMPK total, IκBα fosforilado, IκBα total y NF- $\kappa$ B (p65) en la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles. Cyclophilina (Cyp) fue utilizada como marcador control. (B) Análisis densitométrico de los western blots. Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. La significancia entre los grupos db/db vehículo y db/db GLP-1 fue de \* $p < 0.05$

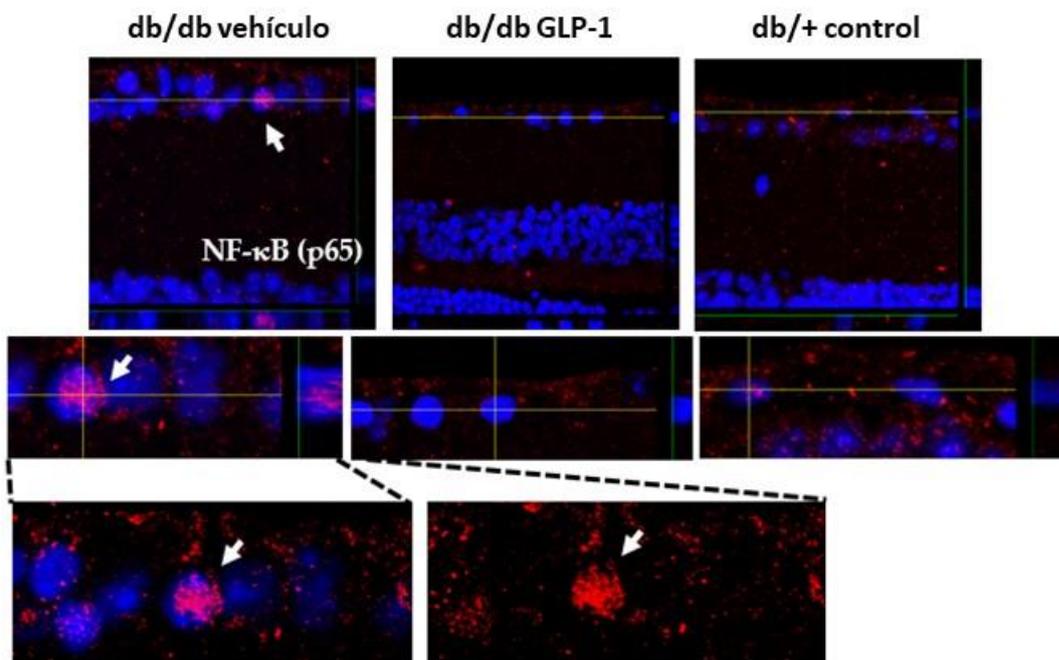


Fig. 38 Análisis ortogonal de la translocación nuclear de NF-κB en la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Análisis comparativo de una imagen ortogonal representativa de NF-κB (en rojo) en la retina de db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst. En el caso del grupo db/db vehículo se muestra una magnificación de la translocación nuclear de NF-κB.

#### 4.2.4.4.3.2. Expresión del inflamosoma y citocinas pro-inflamatorias

Como consecuencia de la activación de NF-κB y la inflamación inducida por la diabetes, las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo mostraron un aumento en la expresión génica (Fig. 39) y proteica (Fig. 40) de citocinas proinflamatorias como IL-1β, IL-6, ICAM-1 o TNF-α. La administración tópica de GLP-1 ejerció un efecto antiinflamatorio disminuyendo significativamente los niveles de los genes *Il1β*, *Il6* y *Icam1* (Fig. 39). La expresión de *Tnfα* estaba aumentada en los animales diabéticos tratados con vehículo y GLP-1 fue capaz de disminuirla, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas (Fig. 39 y Fig. 41). Finalmente, se observó un aumento en la expresión génica del receptor del inflamosoma *Nlrp3* en las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo, así como de la expresión del gen de la IL-18 (*Il18*) (Fig. 39 y Fig. 42), que está regulada por NLRP3

[318]. La administración tópica de GLP-1 ejerció un efecto antiinflamatorio disminuyendo significativamente la expresión de ambos marcadores inflamatorios (Fig. 40, Fig. 41 y Fig. 42).

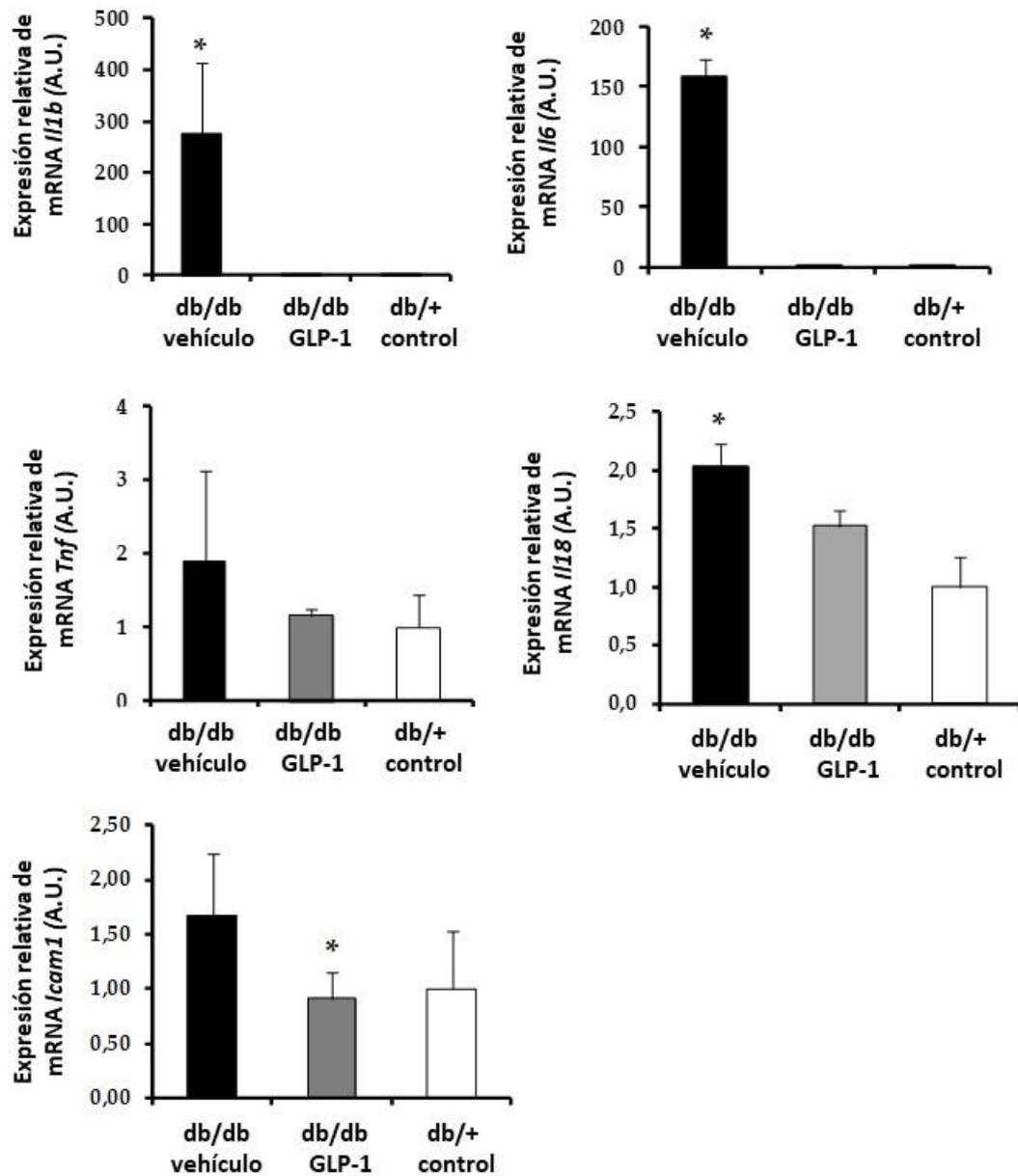


Fig. 39 Análisis de la expresión de los genes *Il1b*, *Il6*, *Il18*, *Tnf* y *Icam1* por RT-PCR.

Niveles de expresión de mRNA de los genes *Il1b*, *Il6*, *Il18*, *Tnf* y *Icam1* en los animales diabéticos tratados con vehículo (en negro), animales diabéticos tratados con GLP-1 (en gris) y los animales controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos.

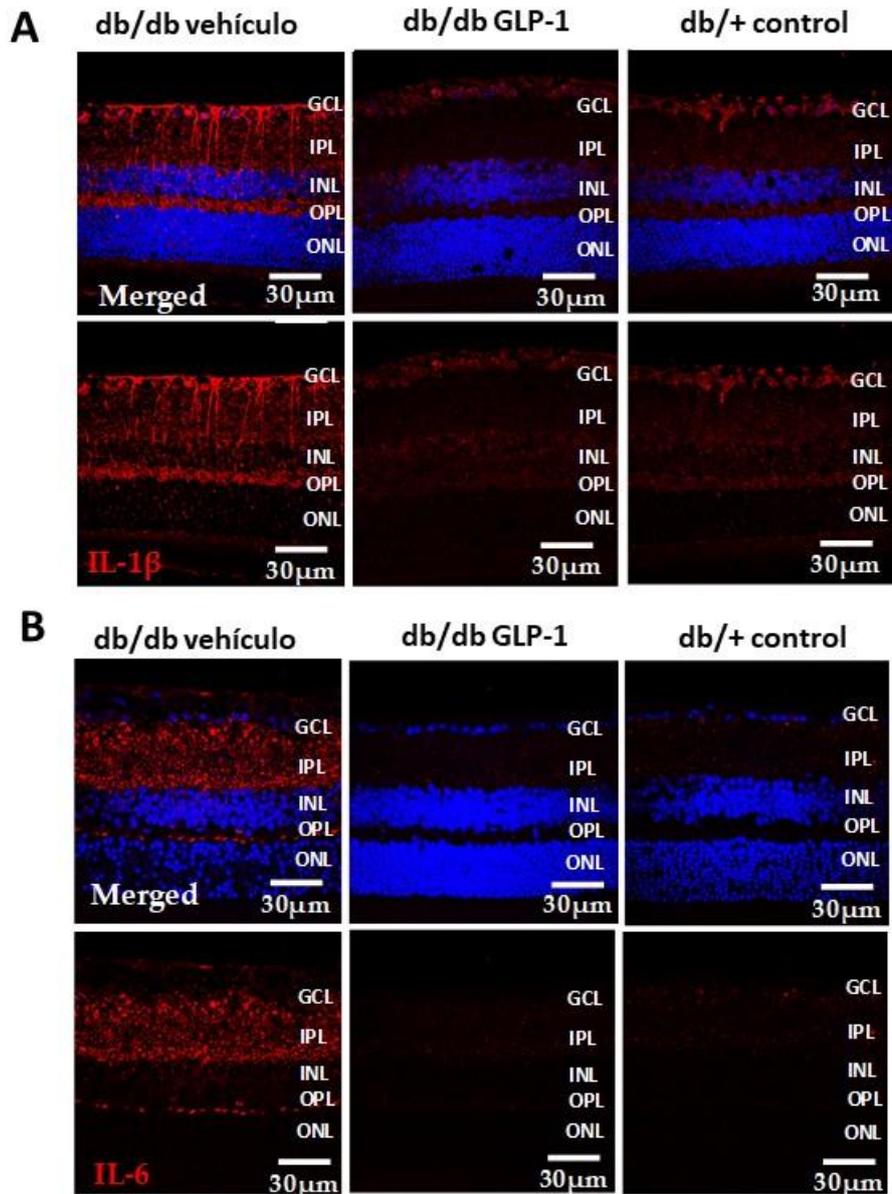


Fig. 40 Análisis comparativo de la expresión de IL-1 $\beta$  y IL-6 entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Inmunofluorescencia para IL-1 $\beta$  (en rojo) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30 $\mu$ m. (B) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para IL-6 (en rojo) en db/db tratado con vehículo db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30 $\mu$ m.

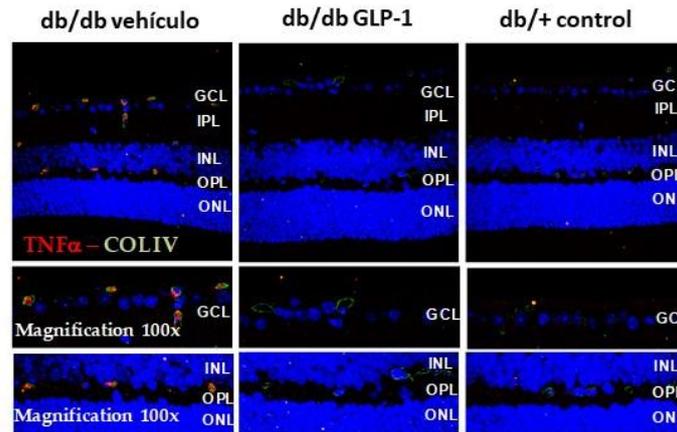


Fig. 41 Análisis comparativo de la expresión de TNF- $\alpha$  entre los vasos sanguíneos de la retina de los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Inmunofluorescencia para TNF- $\alpha$  expresado por las células endoteliales (en rojo) y el colágeno de la membrana basal (en verde) de los vasos sanguíneos de la retina en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 20 $\mu$ m.

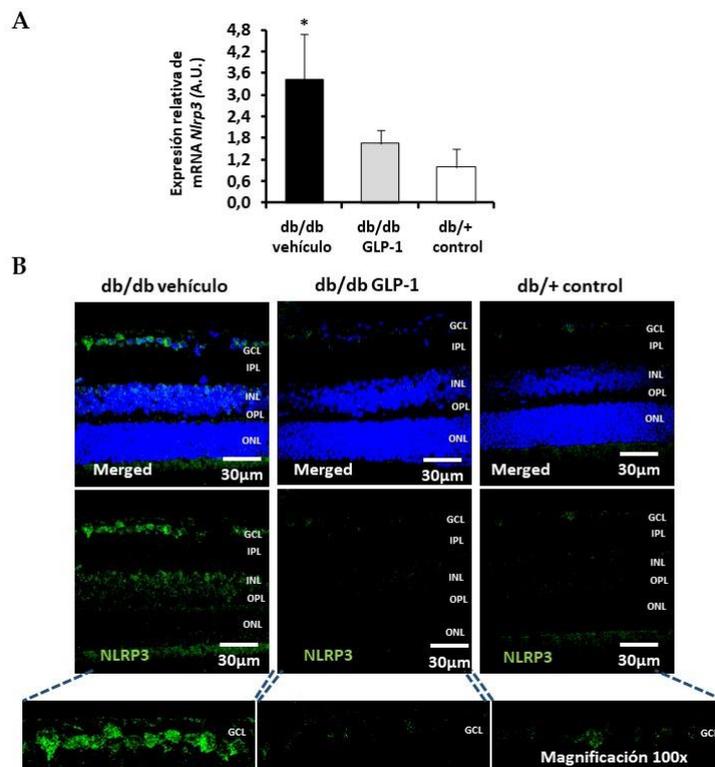


Fig. 42 Análisis comparativo de la expresión del gen *Nlrp3* y la proteína NLRP3 entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con GLP-1 y los animales db/+ controles.

(A) Análisis comparativo de los niveles de expresión de mRNA de *Nlrp3* en los animales diabéticos tratados con vehículo (en negro), animales diabéticos tratados con GLP-1 (en gris) y los animales controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos. (B) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para NLRP3 en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con GLP-1 y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 30 $\mu$ m.

### **4.3. Prevención de la retinopatía diabética por inhibidores de la DPP-IV**

#### **4.3.1. Expresión de DPP-IV en la retina humana y de ratón**

Con el objetivo de responder si el enzima DPP-IV se expresa en la retina, se estudió su expresión génica y proteica en donantes humanos. Los niveles plasmáticos de DPP-IV fueron más altos que en cuerpo vítreo (Fig. 43a). Se detectó DPP-IV en cuerpo vítreo, retina y RPE siendo mayor la concentración proteica en el RPE de los donantes diabéticos respecto a los donantes no diabéticos (Fig. 43b). Los niveles de mRNA de *DPP4* en los tejidos oculares fueron significativamente muy inferiores a los detectados en intestino e hígado, los controles positivos (Fig. 43c). La expresión génica también estaba aumentada significativamente en el RPE de los donantes diabéticos en comparación con los donantes no diabéticos, sin embargo no se observaron diferencias significativas en la neuroretina (Fig. 43c).

Finalmente, no se encontraron diferencias en la expresión del gen murino *Dpp4* y la proteína DPP-4 en la retina de los ratones diabéticos y los ratones controles (Fig. 44). Por la dificultad técnica que implica trabajar con una muestra tan pequeña como es la monocapa epitelial del RPE, no se pudo obtener el RPE murino que es donde realmente se observan las diferencias significativas en los donantes humanos.

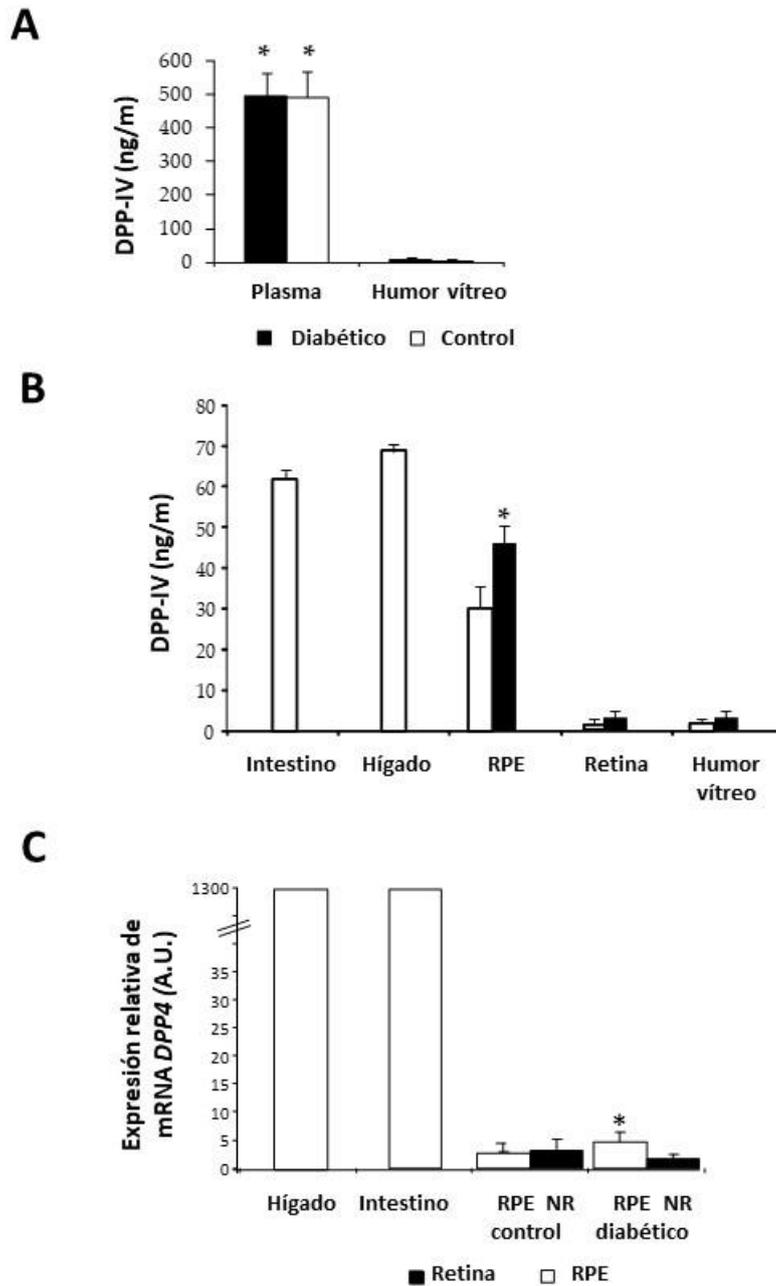


Fig. 43 Estudio de la concentración proteica de DPP-IV y del gen *Dpp4* en donantes humanos.

(A) Análisis comparativo de la concentración proteica de DPP-IV (ng/ml) en plasma y cuerpo vítreo de donantes diabéticos (en negro) y donantes no diabéticos (en blanco). (B) Análisis comparativo de la concentración proteica de DPP-IV (ng/ml) en RPE, neuroretina y vítreo de donantes diabéticos (en negro) y donantes no diabéticos (en blanco). Como controles positivos se utilizaron intestino e hígado. (C) Análisis comparativo de los niveles de expresión de mRNA de *DPP4* en RPE y neuroretina de donantes diabéticos (en negro) y donantes no diabéticos (en blanco). Como controles positivos se utilizaron intestino e hígado. Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en el RPE de los donantes diabéticos en comparación con los donantes no diabéticos.

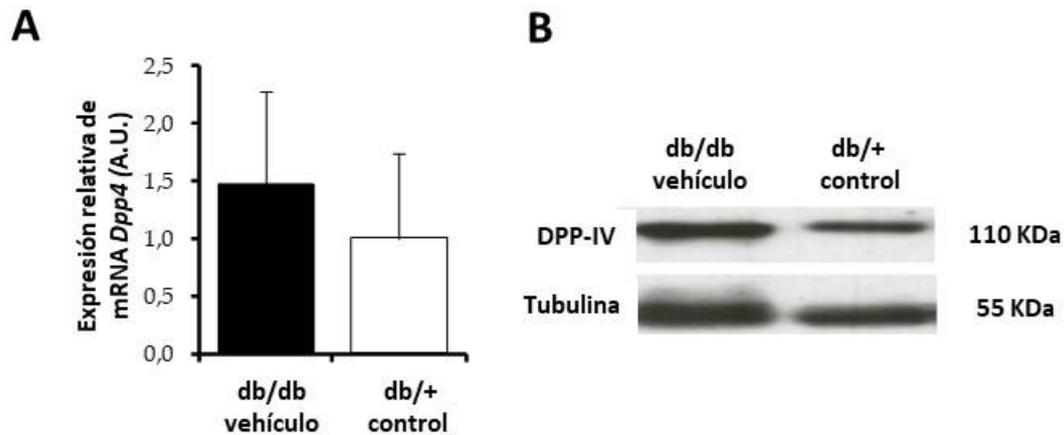


Fig. 44 Estudio de la expresión del gen *Dpp4* y la proteína DPP-IV en ratón.

(A) Análisis comparativo de los niveles de expresión de mRNA de *Dpp4* en neuroretina de ratones diabéticos (en negro) y ratones no diabéticos (en blanco). (B) Western blot representativo para DPP-IV en la retina de ratón. Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM.

### 4.3.2. Evolución del peso y la glucemia

El tratamiento con sitagliptina (Fig. 45 y Fig. 46) o saxagliptina (Fig. 47 y Fig. 48) no modificó el peso o la glucosa plasmática, ya que la administración fue tópica, sin cambios a nivel sistémico. Así pues, los resultados observados en el tratamiento con DPP-4i fueron debido a efectos locales de los fármacos en la retina independientes de su función hipoglucemiante.

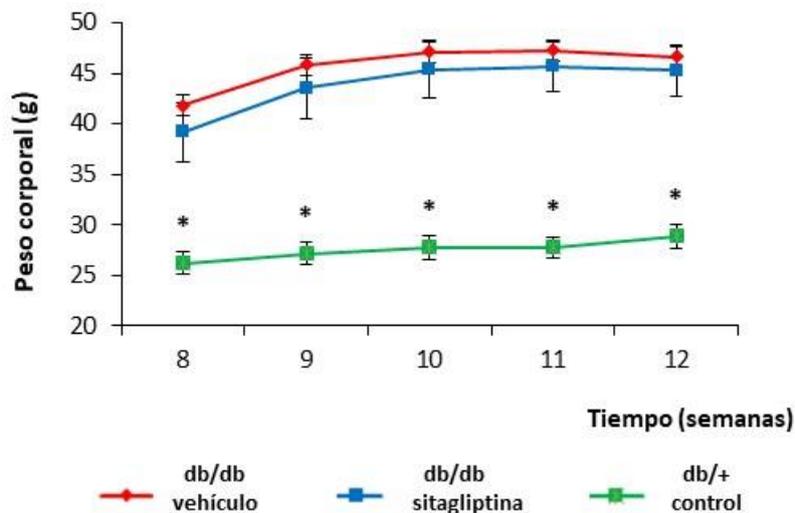


Fig. 45 Análisis comparativo del peso corporal entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.

(A) Gráfico comparativo del peso en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con sitagliptin (en azul) y los animales db/+ controles (en verde). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db vehículo y db/db GLP-1.

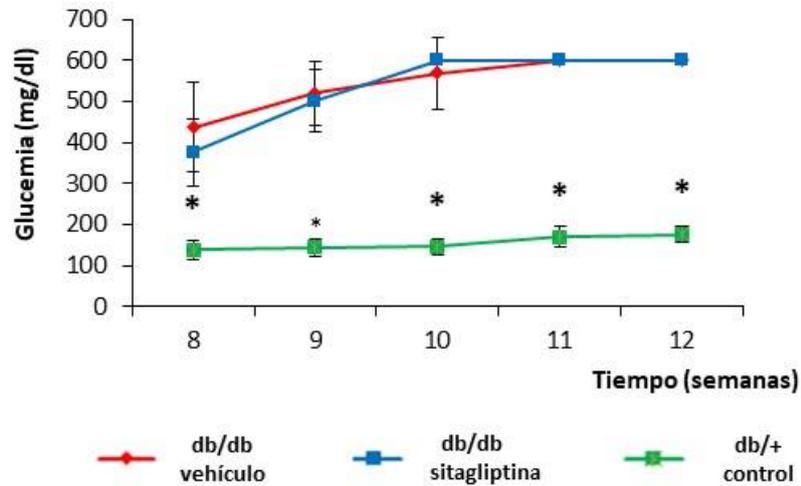


Fig. 46 Análisis comparativo de la glucemia entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.

(A) Gráfico comparativo del promedio  $\pm$  SEM de la glucemia en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con sitagliptin (en azul) y los animales db/+ controles (en verde). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db vehículo y db/db GLP-1.

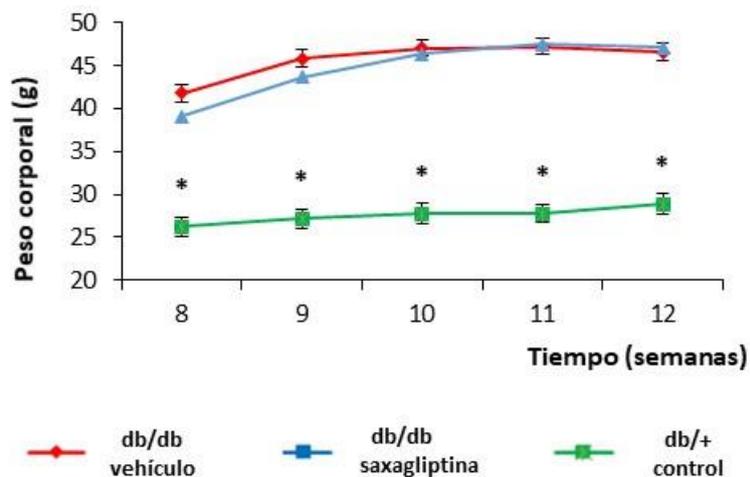


Fig. 47 Análisis comparativo del peso corporal entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina y los animales db/+ controles.

(A) Gráfico comparativo del promedio  $\pm$  SEM del peso en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con saxagliptina (en azul) y los animales db/+ controles (en verde). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db vehículo y db/db GLP-1.

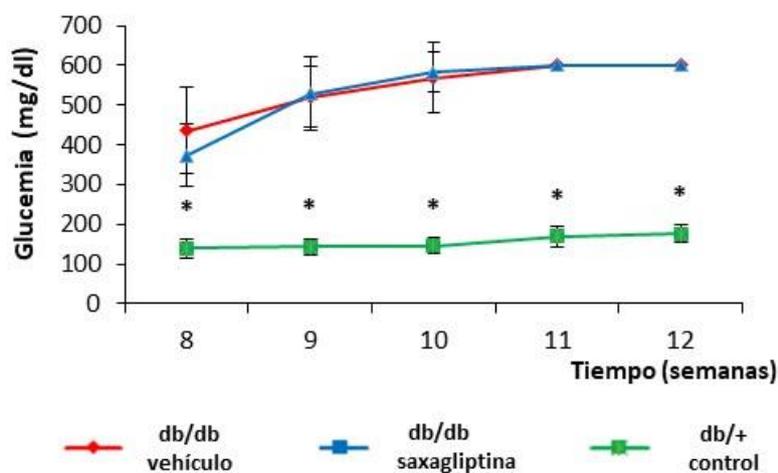


Fig. 48 Análisis comparativo de la glucemia entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina y los animales db/+ controles.

(A) Gráfico comparativo del promedio  $\pm$  SEM de la glucemia en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con saxagliptina (en azul) y los animales db/+ controles (en verde). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db vehículo y db/db GLP-1.

### 4.3.3. Electroretinograma Ganzfeld

Detectamos una reducción en las ondas a y b del ERG en los ratones diabéticos (Fig. 49a) (en rojo) a intensidad baja, media y alta, debido a las alteraciones funcionales ocasionadas por la RD. El tratamiento con saxagliptina (verde) fue capaz de recuperar las ondas a y b (Fig. 49a). La amplitud de la onda b fue significativamente menor en todas las intensidades en los animales diabéticos tratados con vehículo en comparación con los animales no diabéticos (Fig. 49b). La administración tópica de saxagliptina fue capaz de aumentar la amplitud de la onda b en las intensidades más altas ( $40 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  y  $80 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$ ). La amplitud de la onda a fue también significativamente menor en los animales diabéticos tratados con vehículo en comparación con los animales controles en todas las intensidades (Fig. 49b). La amplitud de la onda a en los animales diabéticos con el tratamiento tópico con saxagliptina fue significativamente mayor que los animales diabéticos tratados con vehículo a  $40 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  y  $80 \text{ cd}\cdot\text{s}\cdot\text{m}^{-2}$  de intensidad.

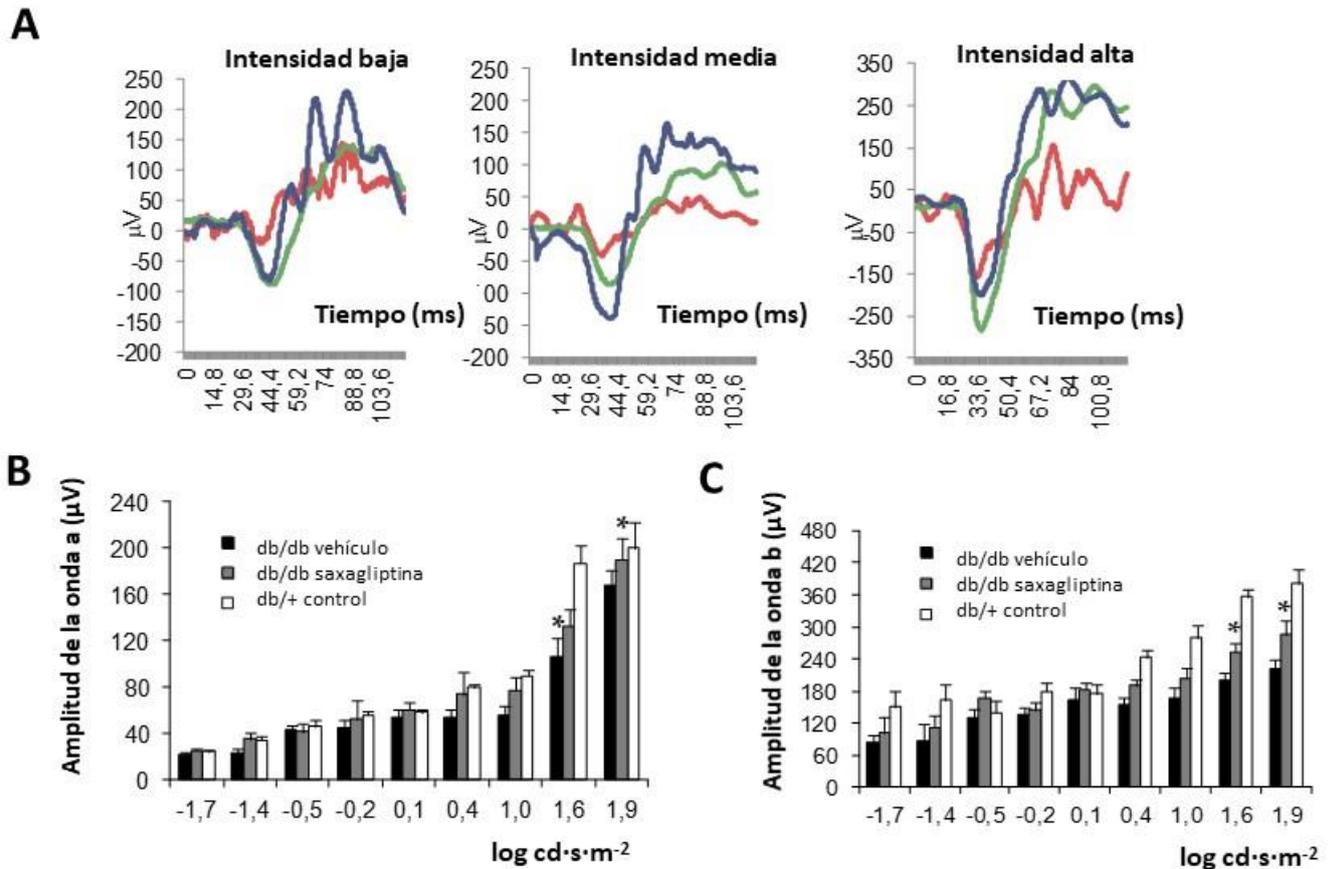


Fig. 49 Análisis comparativo de la respuesta electroretinográfica entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina y los animales db/+ controles.

(A) Gráfica representativa del ERG a baja, media y alta intensidad en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con saxagliptina (en verde) y los animales db/+ controles (en azul). (B) Gráfico comparativo de la amplitud de la onda b y la onda a (C) en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con saxagliptina (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db tratado con vehículo.

El tratamiento con sitagliptina (verde) fue capaz de recuperar las ondas a y b (Fig. 50a). En los animales diabéticos tratados con vehículo, la amplitud de la onda b fue significativamente menor en casi todas las intensidades en comparación con los animales no diabéticos excepto a  $40 \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$  y  $80 \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$  (Fig. 50b). La administración tópica de sitagliptina fue capaz de aumentar la amplitud de la onda b a intensidades de  $0.3 \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ ,  $1.25 \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$  y  $10 \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$ . (Fig. 50b). La amplitud de la onda a fue significativamente menor en los animales diabéticos tratados con vehículo en comparación con los animales controles en todas las intensidades (Fig. 50b). La amplitud de la onda a en los animales diabéticos con el tratamiento tópico con sitagliptina fue significativamente mayor que los animales diabéticos tratados con vehículo a  $2.5 \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$  y  $10 \text{ cd} \cdot \text{s} \cdot \text{m}^{-2}$  de intensidad.

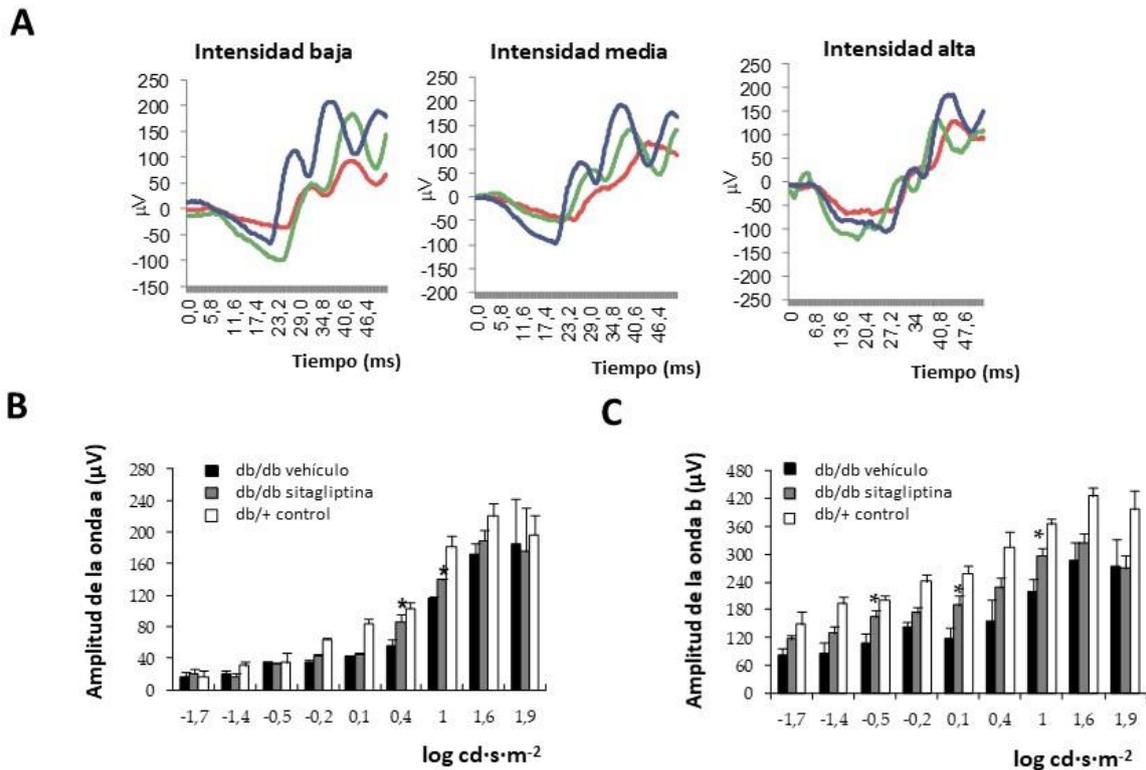


Fig. 50 Análisis comparativo de la respuesta electroretinográfica entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.

(A) Gráfica representativa del ERG a baja, media y alta intensidad en los animales db/db tratados con vehículo (en rojo), db/db tratados con sitagliptin (en verde) y los animales db/+ controles (en azul). (B) Gráfico comparativo de la amplitud de la onda b y la onda a (C) en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con sitagliptin (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el grupo db/db tratado con vehículo.

#### 4.3.4. Evaluación post-mortem

##### 4.3.4.1. Activación glial

###### 4.3.4.1.1. Gliosis reactiva: Expresión de GFAP

La gliosis reactiva se evaluó mediante la expresión de GFAP. En la Fig. 51, que muestra una inmunofluorescencia representativa para GFAP (Fig. 51), se puede observar gliosis activa en los animales diabéticos, que es revertida por el tratamiento tópico con saxagliptina (Fig. 51a) y con sitagliptina (Fig. 51c). Mientras que en los animales no diabéticos la expresión de GFAP se observaba confinada únicamente en la GCL (“score” 1), en los animales diabéticos tratados con vehículo aumentó su expresión, y además se extendió a las capas exteriores de la retina hasta “scores” superiores a 3, indicando una activación glial (Fig. 51a,c) (Tabla 28). El

tratamiento tópico con los DPP-IVi fue capaz de disminuir significativamente la activación glial de manera que la expresión de GFAP fue menor (Fig. 51b,d) y siempre fue inferior al “score” 2 (Tabla 28).

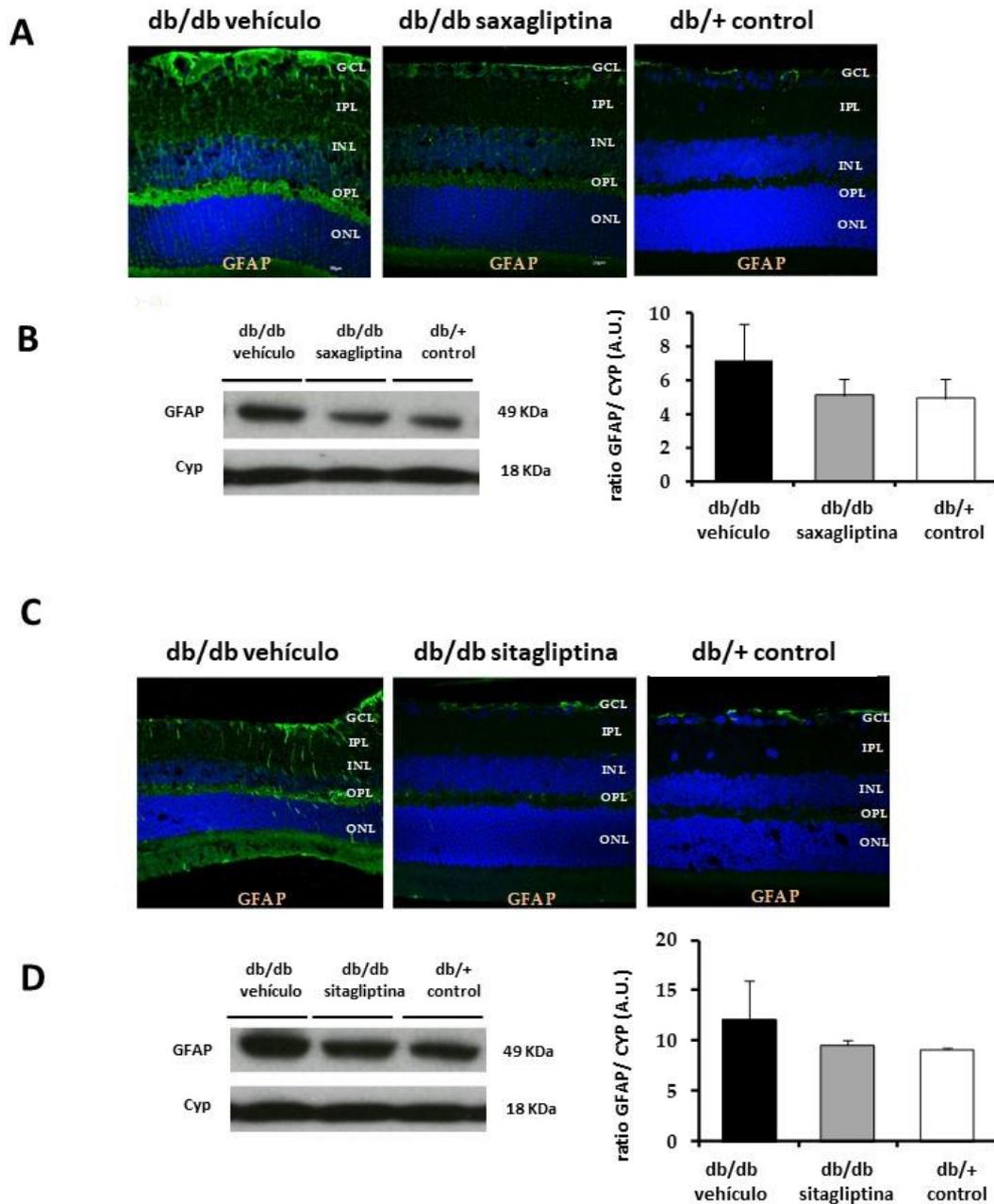


Fig. 51 Análisis comparativo de la activación glial entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con DPP-IVi y los animales db/+ controles.

(A) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para GFAP (en verde) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con saxagliptina y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. (B) Western blot representativo y análisis densitométrico de los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con saxagliptina (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). (C) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para GFAP (en verde) en db/db

tratado con vehículo, db/db tratado con sitagliptin y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. (D) Western blot representativo y análisis densitométrico de los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con sitagliptin (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Todos los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. Cyclophilina (Cyp) fue utilizada como marcador control en los western blots.

% marcaje GFAP positivo			
Score	db/db vehicle	db/db saxagliptina	db/+ control
1	0	100	100
2	0	0	0
3	20	0	0
4	40	0	0
5	40	0	0

Score	db/db vehicle	db/db sitagliptina	db/+ control
1	0	100	100
2	0	0	0
3	20	0	0
4	40	0	0
5	40	0	0

Tabla 28 Análisis comparativo de la activación glial.

Porcentaje de secciones retinianas por grupo experimental (animales db/db tratados con vehículo, animales db/db tratados con saxagliptina, animales db/db tratados con sitagliptina y animales db/+ control) y por “score” de activación glial. *Score 1*: GFAP se confina exclusivamente en la GCL; *Score 2*: GFAP se mantiene en la GCL y se expresa en algunos procesos de las células de Müller proximales a la GCL; *Score 3*: GFAP se expresa en varios procesos citoplasmáticos de las células de Müller pero no llegan a extenderse hasta la ONL; *Score 4*: algunos de los procesos positivos para GFAP llegan hasta la ONL; *Score 5*: muchos procesos citoplasmáticos de las células de Müller positivos para GFAP llegan hasta la ONL.

#### 4.3.4.1.2. Activación de la microglia

Además de una prevención de la inflamación de la macroglia por el tratamiento tópico con sitagliptina y saxagliptina, el número de células de microglia también se vio reducido con el tratamiento tópico. Se evaluó por inmunofluorescencia la expresión de Iba-1, principal marcador de células de microglia (Fig. 52a) y se observó que el número de células de microglia retinales estaba aumentado en el grupo de animales diabéticos tratado con vehículo respecto a los grupos diabéticos tratados con saxagliptin y sitagliptina y al grupo control (Fig. 52b).

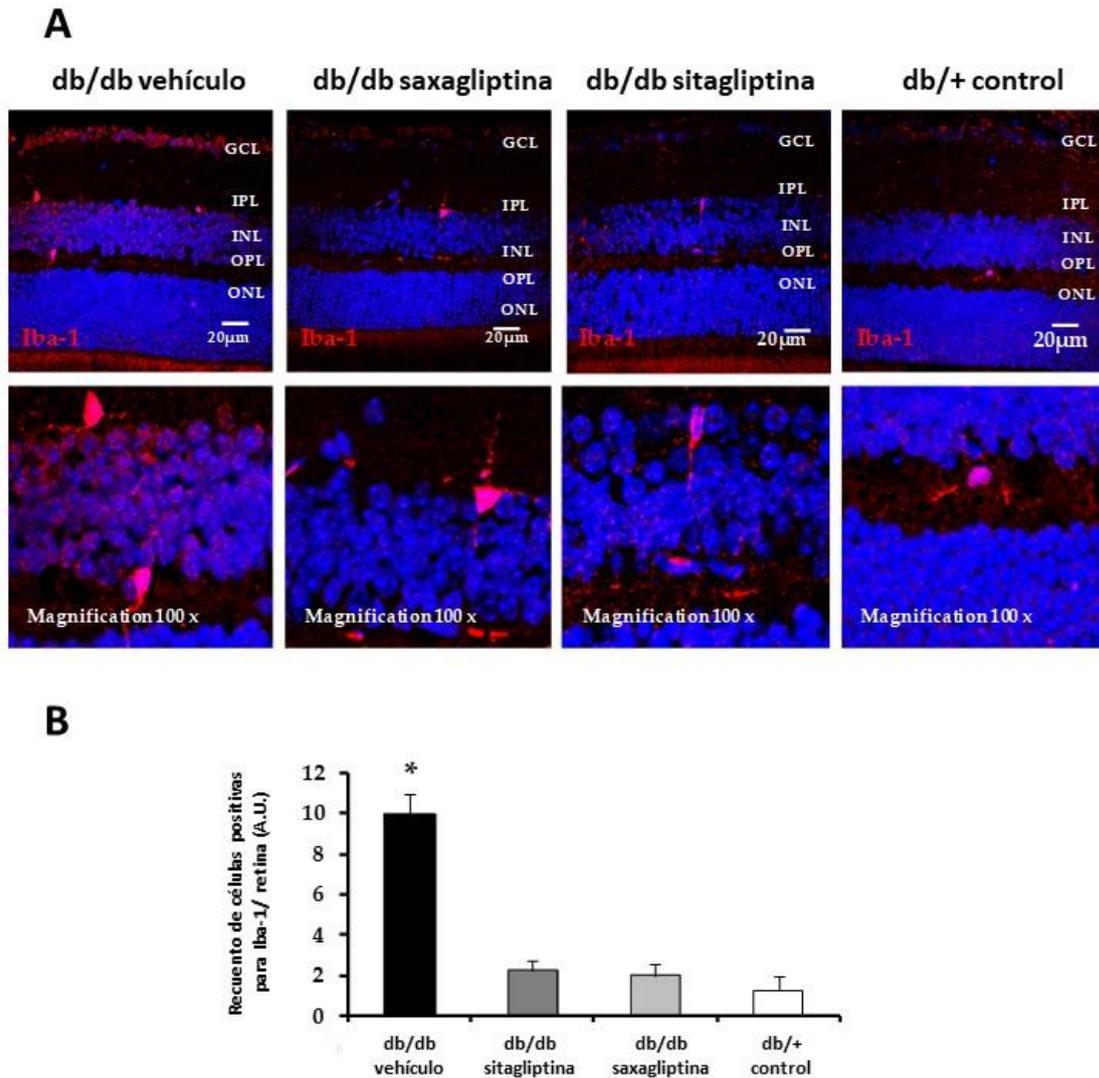


Fig. 52 Análisis comparativo de la activación microglial.

(A) Análisis comparativo y magnificación de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para Iba-1 (en rojo) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con saxagliptina, db/db tratado con sitagliptin y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. Barra de escala = 20µm. (B) Recuento de células de microglia activas por sección retinianas en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con saxagliptina (en gris claro), db/db tratados con sitagliptin (en gris oscuro) y los animales db/+ controles (en blanco). Todos los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  en comparación con el resto de grupos.

#### 4.3.4.2. Apoptosis y supervivencia neuronal

##### 4.3.4.2.1. Cuantificación de células apoptóticas mediante la técnica del TUNEL

El número de células apoptóticas en los animales diabéticos tratados con vehículo estaba significativamente aumentado en comparación con los animales controles en las capas GCL, INL y ONL (Fig. 53 y Fig. 54). La administración tópica de los DPP-IVi resultó en una prevención

en el número de células apoptóticas en todas las capas nucleares (Fig. 53 y Fig. 54; Tabla 29 y Tabla 30).

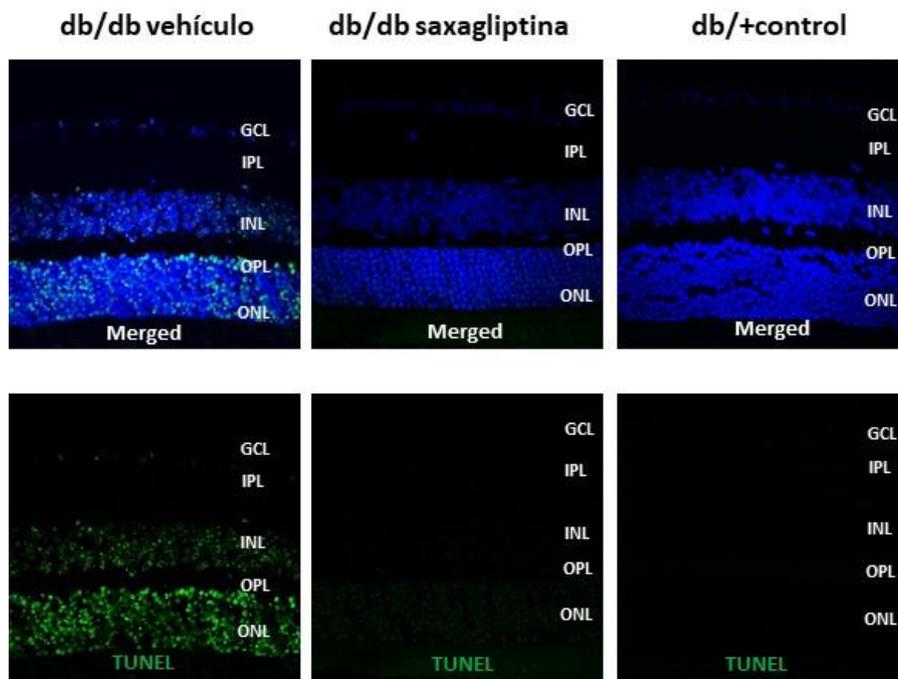


Fig. 53 Análisis comparativo de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina y los animales db/+ controles.

Imagen representativa del TUNEL (en verde) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con saxagliptina y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst.

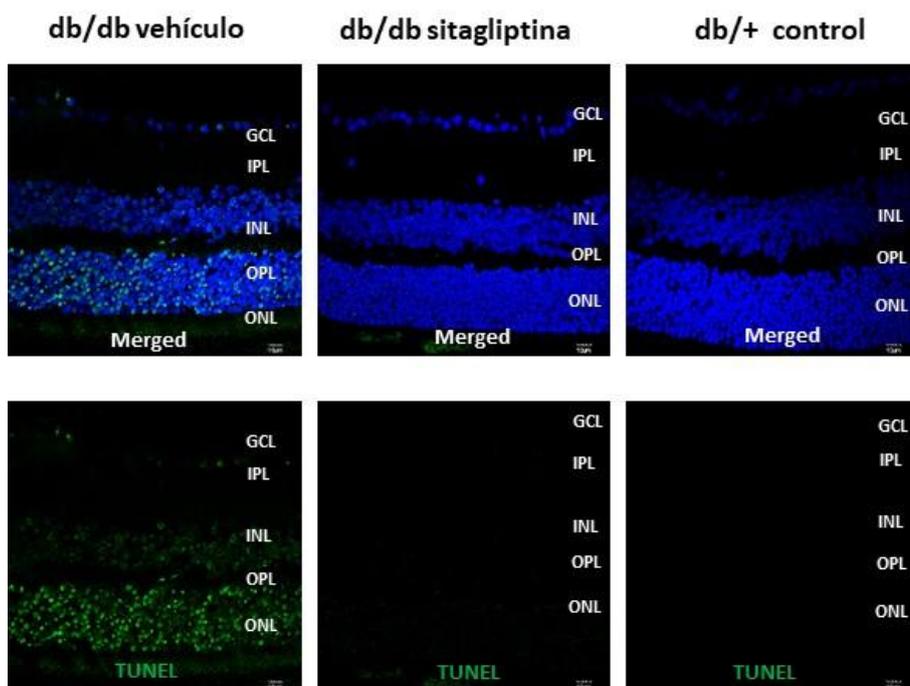


Fig. 54 Análisis comparativo de la apoptosis mediante la técnica del TUNEL entre los animales db/db tratados

con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.

Imagen representativa del TUNEL (en verde) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con sitagliptin y db/+ control. Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst.

	% células TUNEL positivas		
	db/db vehículo	db/db saxagliptina	db/+ control
GCL	3,63± 2,17	0,04± 0,01	0,25± 0,02
INL	12,77± 15,72	0,86± 1,07	0,65± 0,04
ONL	28,09± 6,66	11,39± 9,36	1,24± 0,14

Tabla 29 Análisis comparativo del porcentaje de células positivas para el TUNEL respecto el número de células totales en las diferentes capas nucleares de la retina (GCL, INL y ONL).

Todos los valores se expresan en forma de porcentaje ± SEM.

	% células TUNEL positivas		
	db/db vehículo	db/db sitagliptina	db/+ control
GCL	4,87± 0,89	2,75± 0,88	1,00± 0,71
INL	15,50± 4,03	4,00± 1,42	1,00± 0,71
ONL	30,62± 8,39	5,12± 5,12	3,25± 1,11

Tabla 30 Análisis comparativo del porcentaje de células positivas para el TUNEL respecto el número de células totales en las diferentes capas nucleares de la retina (GCL, INL y ONL).

Todos los valores se expresan en forma de porcentaje ± SEM.

#### 4.3.4.2.2. Niveles de glutamato y expresión de GLAST

Los niveles de glutamato en las retinas de los ratones diabéticos db/db con 12 semanas de edad están elevados significativamente respecto a los animales controles (Fig. 55). La administración tópica de los DPP-IVi disminuyó el contenido de glutamato hasta un nivel casi comparable al control pero sin diferencias significativas en el caso de saxagliptina (Fig. 55).

Los niveles de GLAST estaban disminuidos en las retinas de los animales diabéticos tratados en vehículo en comparación con la de los animales controles. La administración tópica de los DPP-IVi previno la disminución de tanto la expresión de mRNA de *Glaxt*, como de la proteína GLAST en la retina de los animales diabéticos (Fig. 56).

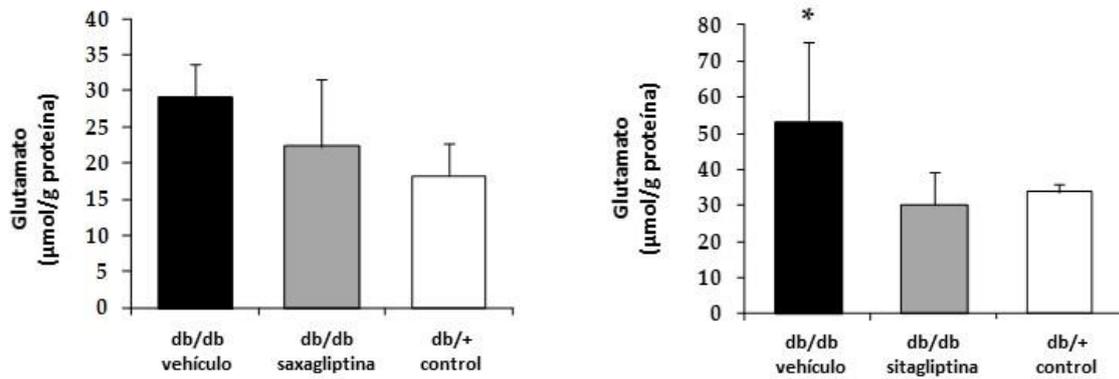


Fig. 55 Análisis comparativo de la concentración de glutamato en la retina medida por HPLC.

Niveles de glutamato en los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con saxagliptina y sitagliptin (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Todos los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  entre el grupo db/db vehículo y el grupo db/+ control.

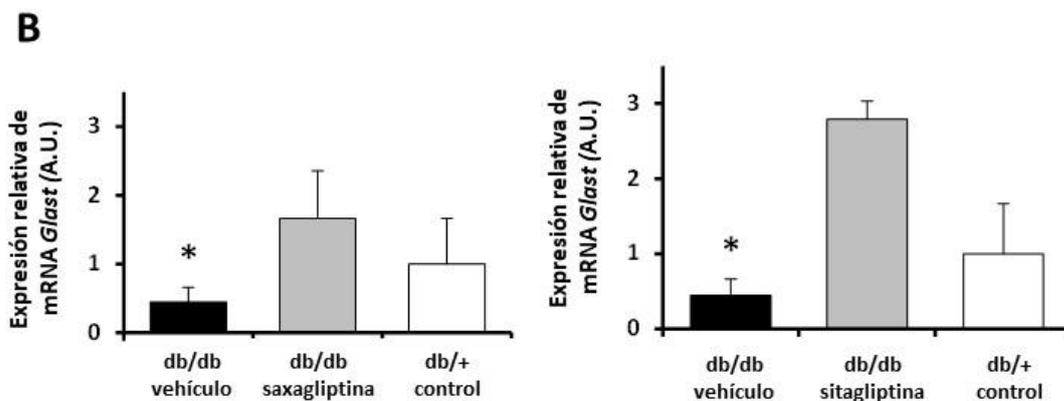
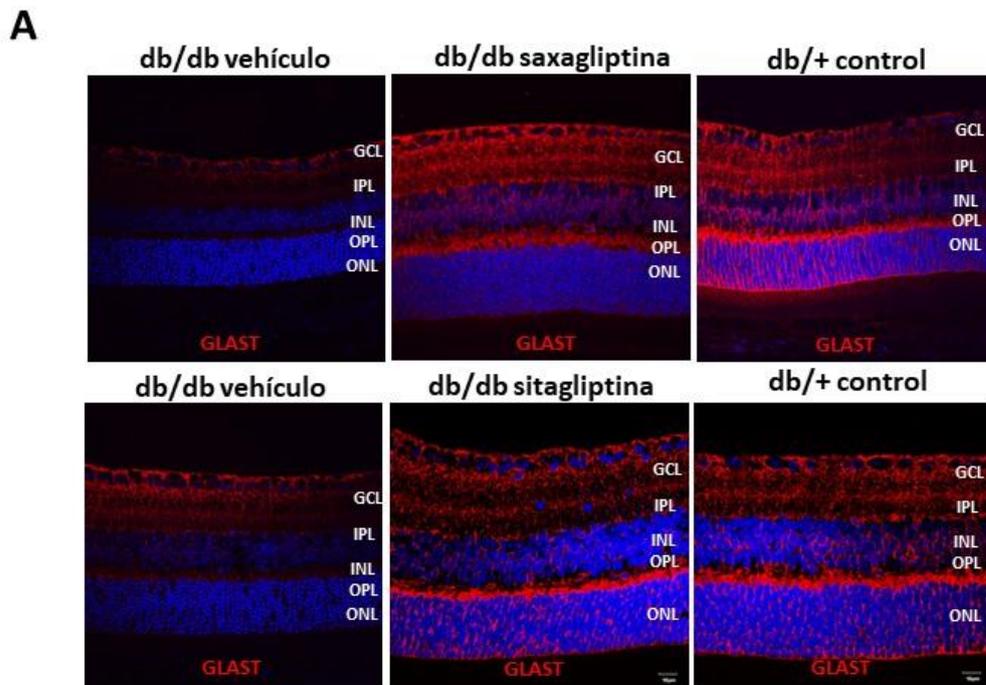


Fig. 56 Efectos de los DPP-IVi sobre la expresión de GLAST.

(A) Análisis comparativo de una imagen representativa de la inmunofluorescencia para GLAST (en rojo) y

cuantificación relativa de la fluorescencia en db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratado con saxagliptina y sitagliptin (en gris) y db/+ control (blanco). Los núcleos fueron contra-teñidos con Hoechst. (B) Análisis de la expresión génica de *Glast* (*Slc1a3*) por RT-PCR en db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con saxagliptina y sitagliptin (en gris) y db/+ control (en blanco). Todos los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos.

### 4.3.4.2.3. Expresión de marcadores de supervivencia

La administración tópica de los inhibidores fue capaz de inhibir significativamente la disminución en el ratio de fosforilación de Akt inducido por la diabetes e imprescindible para la supervivencia neuronal. Notablemente, el tratamiento con saxagliptina y sitagliptina redujo la disminución en la expresión del factor anti-apoptótico Bcl-xL inducida por la diabetes. En la Fig. 57a se muestra un western blot representativo en db/db tratados con vehículo, db/db tratados con saxagliptina, db/db tratados con siitagliptina y db/+ controles.

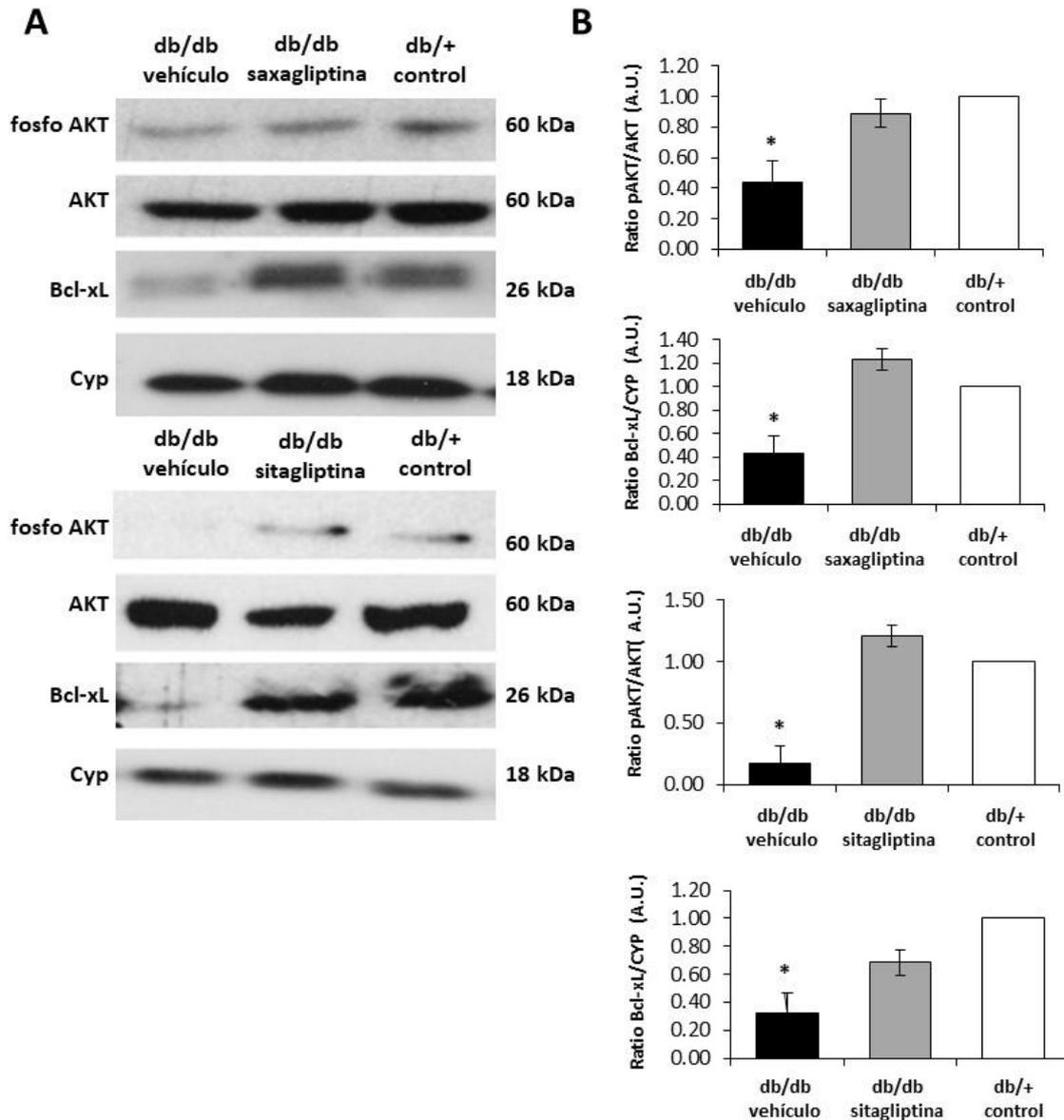


Fig. 57 Análisis comparativo de la expresión de moléculas de supervivencia.

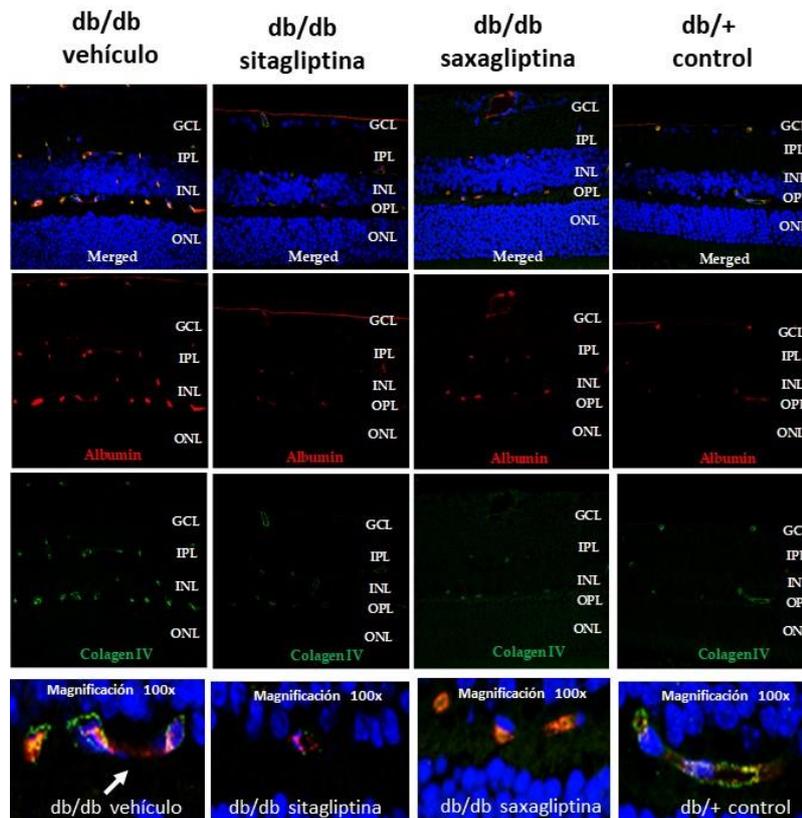
(A) Western blot representativo del ratio Akt fosforilado/Akt total y Bcl-xL y (B) análisis densitométrico entre los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con saxagliptina o con sitagliptina (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Cyclophilina (Cyp) fue utilizada como marcador control. Todos los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos.

#### 4.3.4.3. Efectos de los DPP-IVi sobre las alteraciones microvasculares

##### 4.3.4.3.1. Ruptura de la barrera hematoretiniana

La co-inmunofluorescencia para albúmina y colágeno IV, que marca la membrana basal de los vasos sanguíneos, nos permitió identificar un aumento en la localización extravascular de

albúmina de la retina de los animales diabéticos tratados con vehículo en comparación con los animales no diabéticos. La administración tópica de los fármacos DPP-IVi resultó en una disminución de la extravasación de albúmina, revelando una prevención de la ruptura de la BHR (Fig. 58).



**Fig. 58** Análisis comparativo de una inmunofluorescencia para albúmina y colágeno IV.

Imagen representativa de una co-inmunofluorescencia de albúmina (en rojo) y la membrana basal de los vasos sanguíneos (en verde) en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con saxagliptina, db/db sitagliptina y db/+ control. Los núcleos fueron contrateñidos con Hoechst. Se muestra una magnificación a 100X donde se puede observar extravasación en la retina del animal diabetic tratado con vehículo.

El efecto beneficioso de la administración tópica de sitagliptina sobre la extravasación de albúmina fue verificado mediante la técnica de Evans Blue (Fig. 59).

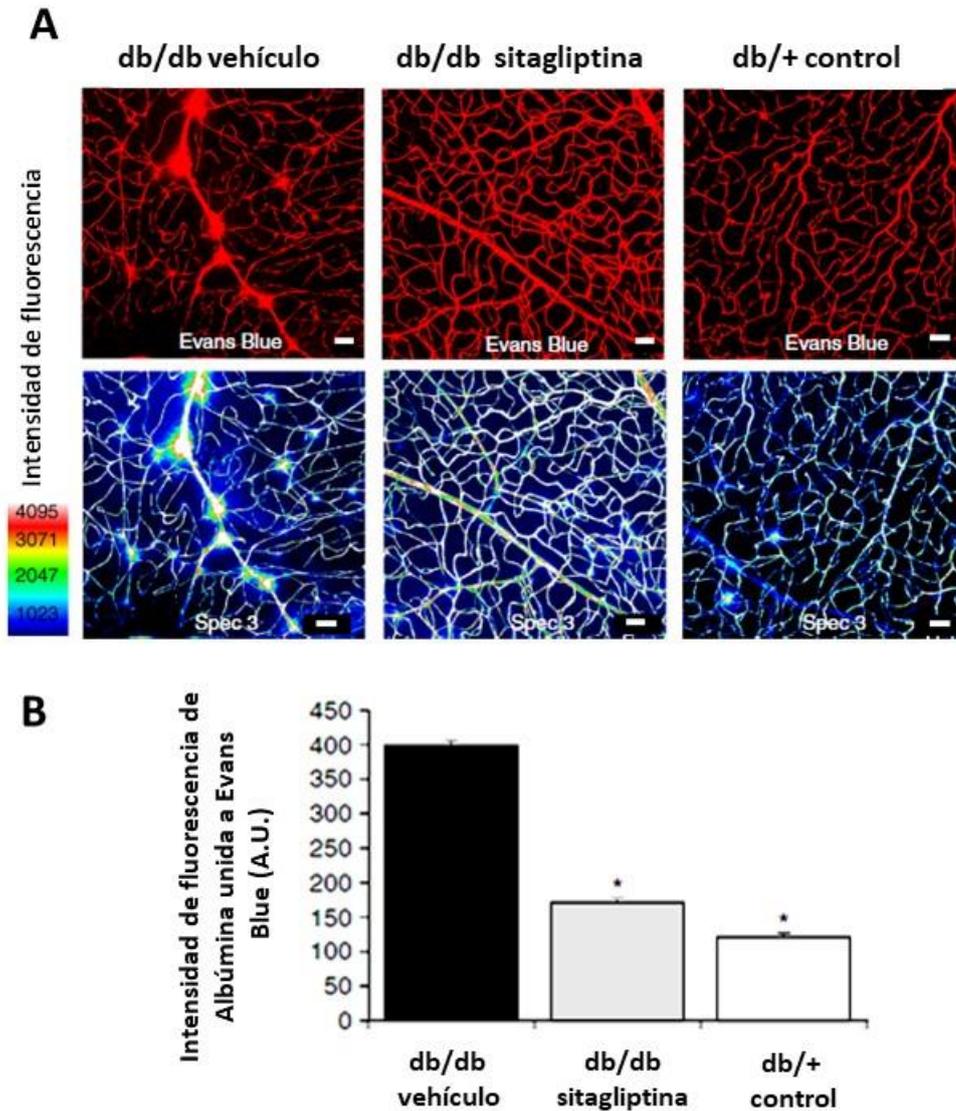


Fig. 59 Análisis comparativo del whole-mount de la retina entre los animales db/db tratados con vehículo, db/db tratados con sitagliptin y los animales db/+ controles.

(A) Imagen representativa del whole-mount de retina y una imagen idéntica en spec3 en db/db tratado con vehículo, db/db tratado con sitagliptin y db/+ control. Barra de escala = 30µm. (B) Análisis comparativo de la fluorescencia de Evans Blue por fuera de la vasculatura en los animales diabéticos tratados con vehículo (en negro), diabéticos tratados con sitagliptin (en gris) y controles (en blanco). Todos los valores se expresan en forma de promedio ± SEM. \*p<0.05 en comparación con el grupo db/db vehículo.

Tal y cómo se ha comentado previamente, esta técnica permite evaluar “*ex vivo*” la integridad de la BHR en el *whole mount* de retina. Se identificaron extravasaciones de albúmina asociada a Evans Blue en las retinas de los animales diabéticos tratados con vehículo, y estas fueron prevenidas significativamente en administrar sitagliptina por vía tópica en los animales diabéticos hasta niveles comparables a los animales controles (Fig. 59).

## 4.3.4.3.2. Expresión de VEGF

Debido a que en un estudio en ratones con diabetes inducida por STZ se había comunicado que sitagliptina podía promover alteraciones microvasculares [319], se evaluaron por western blot los niveles de las proteínas angiogénicas VEGF y factor-1 $\alpha$  derivado de células estromales (SDF-1), el cual es sustrato del enzima DPP-IV. La proteína VEGF estaba sobre-expresada en la retina de los animales diabéticos tratados con vehículo (Fig. 60a) y la administración tópica de saxagliptina y sitagliptina disminuyó los niveles de mRNA de *Vegf* respecto a los animales diabéticos tratados con vehículo (Fig. 60b).

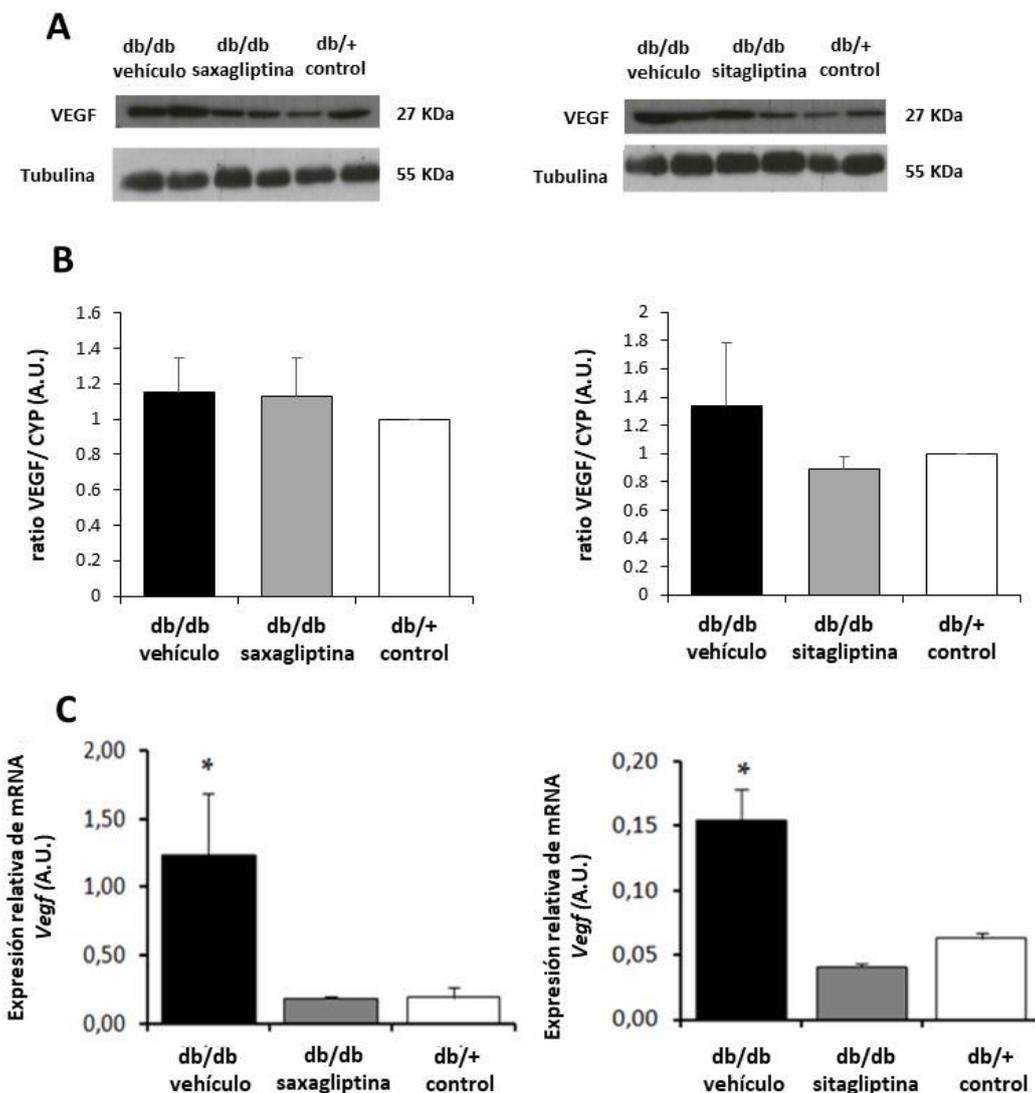


Fig. 60 Efectos de saxagliptina y sitagliptina sobre la expresión de VEGF.

(A) Western blot representativo de VEGF en retina (B) y análisis densitométrico del western blot de los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con saxagliptina y sitagliptina (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Tubulina fue utilizada como marcador control. Todos los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. (C) Análisis comparativo de los niveles de expresión de mRNA de *Vegf*

en los animales diabéticos tratados con vehículo (en negro), animales diabéticos tratados con saxagliptina y sitagliptina (en gris) y los animales controles (en blanco). Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM. \* $p < 0.05$  del grupo db/db vehículo en comparación con los otros grupos.

#### 4.3.4.3.3. Expresión de SDF-1

La Fig. 61 muestra un western blot representativo para SDF-1 en la retina de los animales diabéticos tratados con vehículo, saxagliptina, sitagliptina y en los animales controles. Los resultados revelaron que sitagliptina y saxagliptina no ejercieron ningún efecto sobre la expresión de SDF-1 ya que los niveles de proteína eran similares en todas las muestras. Así pues se puede concluir que la administración tópica de los DPP-IVi no pareció ejercer efectos promotores de la angiogénesis.

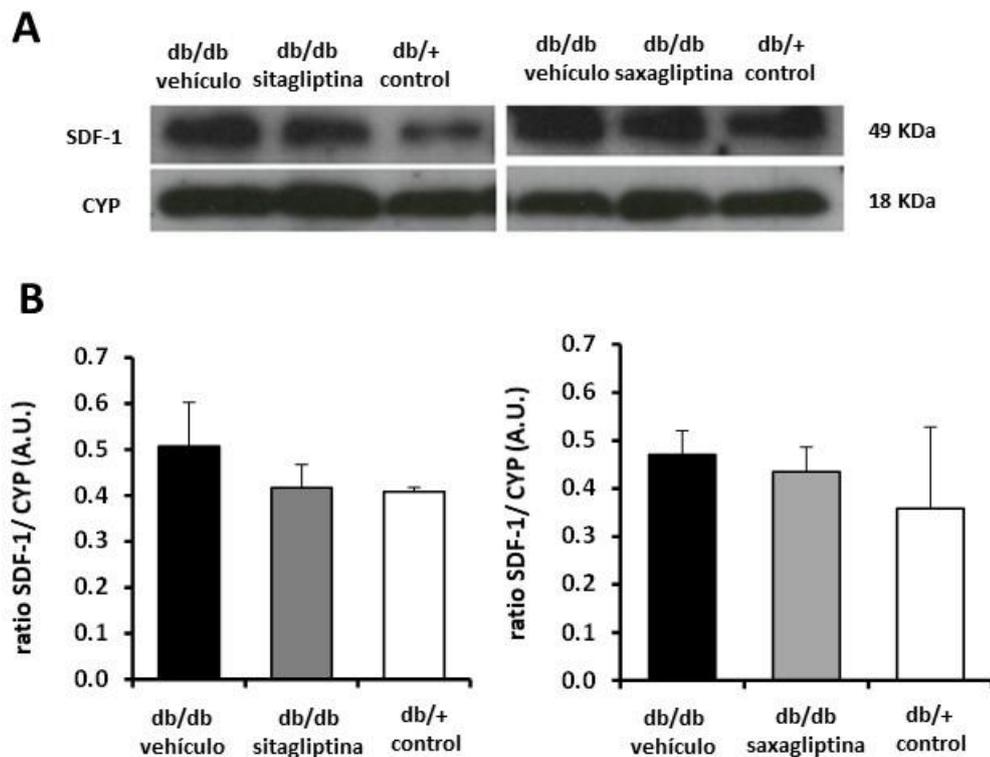


Fig. 61 Efectos de GLP-1 sobre la expresión de SDF-1.

(A) Western blot representativo de SDF-1 en la retina (B) y análisis densitométrico del western blot de los animales db/db tratados con vehículo (en negro), db/db tratados con saxagliptina y sitagliptina (en gris) y los animales db/+ controles (en blanco). Tubulin fue utilizada como marcador control. Los valores se expresan en forma de promedio  $\pm$  SEM.

## 5. DISCUSIÓN

---



En la presente tesis doctoral se demuestra que tanto el GLP-1 como los fármacos DPP-IVi (sitagliptina y saxagliptina) administrados por vía tópica ocular previenen y retrogradan las alteraciones retinianas causadas por la diabetes y este efecto es independiente de la disminución de la glucemia. Aunque GLP-1 es capaz de atravesar la BHR, una de las razones de escoger esta vía de administración fue porque tras la administración de GLP-1 en colirio la concentración del mismo que alcanza la circulación sistémica es insignificante y no es capaz de reducir los niveles de glucemia en los animales diabéticos. Así mismo, la administración de DPP-IVi por vía tópica ocular tampoco es capaz de disminuir la glucemia. Así pues, podemos afirmar que todos los efectos observados en el grupo de animales tratados con GLP-1 o con DPP-IVi son efectos directos de la señalización del GLP-1R a nivel de la retina y no son consecuencia de la disminución de la glicemia. Por tanto, los estudios experimentales en los que se ha empleado la administración sistémica de los GLP-1RAs no pueden evaluar de forma específica el efecto de estos fármacos sobre la RD, ya que al disminuir la glucemia no se puede discernir si los efectos positivos se deben al mejor control de la diabetes o a la acción directa del fármaco.

Además, la ruta ocular permite limitar la acción del fármaco en el ojo y minimizar los posibles efectos indeseables a nivel sistémico. Sin embargo, la administración intraocular de fármacos (ej. Inyecciones intravítreas) no puede utilizarse en fases iniciales de la RD por sus potenciales complicaciones oculares (ej. endoftalmitis). Por tanto, la administración tópica ocular parece ser la ruta ideal de administración para etapas no avanzadas de la RD. En este sentido, nuestro grupo ha coordinado el primer ensayo clínico (EUROCONDOR. No NCT01726075) destinado a evaluar la eficacia de la administración de agentes neuroprotectores en colirio para tratar la neurodisfunción de la retina inducida por la diabetes [320]. El seguimiento fue de 2 años por lo que no hubo tiempo suficiente para evaluar su utilidad en la aparición de las alteraciones vasculares. Sin embargo, se observó que en el grupo de pacientes que presentaban neurodisfunción de la retina el tratamiento neuroprotector fue capaz de frenar su progresión [321].

El colirio permite la auto-administración de forma sencilla, así que el tratamiento tópico con GLP-1 podría ser utilizado por la mayoría de pacientes diabéticos. Por último, el colirio podría ser administrado en aquellos pacientes en los que los GLP-1RAs no están recomendados por

sus efectos sistémicos adversos (principalmente gastrointestinales) o por no estar indicados por las características de su diabetes (ej. T1DM o diabetes pancreatopriva).

### 5.1. Absorción y distribución de GLP-1 tras la administración tópica

El estudio de absorción y biodistribución del fármaco marcado radioactivamente ( $^{125}\text{I}$ -GLP-1) demuestra que el fármaco GLP-1 administrado por vía tópica se internaliza en el ojo. Se detectan niveles de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 en esclera, coroides, cristalino y retina, así pues, se puede afirmar que el GLP-1 alcanza el tejido diana, la retina, tras la administración en colirio.

La distribución de los niveles del compuesto radioactivo en los diferentes compartimentos oculares muestra que el fármaco penetra por vía trans-escleral y desde aquí pasa a retina y cristalino. Por tanto, no penetra por vía transcorneal. En la revisión de Boddu, S. H. S. se señala la vía trans-escleral (en rojo en la Fig. 62) como una vía de entrada a la retina [322].

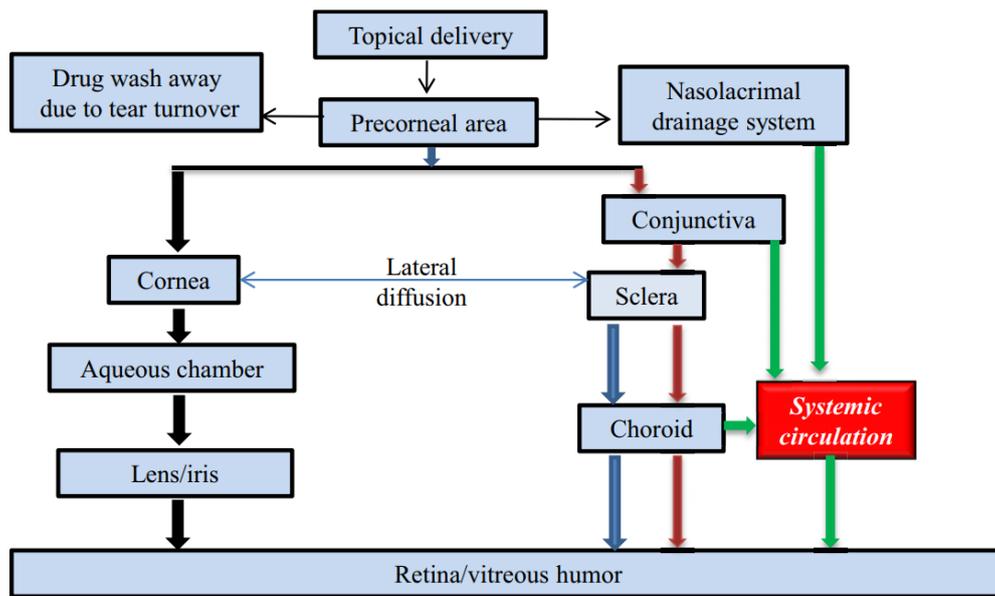


Fig. 62 Rutas de penetración ocular para fármacos administrados de forma tópica. Extraído de [322].

Aunque a partir de la conjuntiva y la coroides un fármaco se puede distribuir a la circulación sistémica, los estudios de absorción y biodistribución no revelaron cantidades de  $^{125}\text{I}$ -GLP-1 significativas en sangre. Tampoco se observaron efectos sobre la glucemia tras la administración del fármaco lo que indica que, al menos el fármaco activo, no llega de forma relevante a la circulación sistémica. Finalmente, la farmacocinética ocular justifica una pauta

posológica de tratamiento 2 veces al día, ya que el fármaco se distribuye por el tejido diana a unos niveles máximos a las 8h tras la administración.

## 5.2. Promoción de la supervivencia e inhibición de la apoptosis

Tal y como nuestro grupo demostró en estudios previos en ratón db/db de 12 semanas de edad, los GLP-1RAs como liraglutide promueven la supervivencia en la retina diabética: inhiben la apoptosis, previenen la disminución en la expresión proteica de Bcl-xL y la disminución en la fosforilación de Akt inducida por la diabetes. Se conoce extensamente que la activación de la vía de Akt en las neuronas es esencial para su supervivencia. Por ejemplo, el estudio de Rajala y colaboradores muestra que Akt confiere neuroprotección ya que inhibe la muerte por apoptosis de los fotorreceptores [193].

Los resultados obtenidos en la presente tesis demuestran que a la edad de 24 semanas (después de 20 semanas de diabetes) el tratamiento tópico con GLP-1 no sólo incrementa significativamente estos dos marcadores de supervivencia sino que activa completamente la vía de PI3K/Akt/GSK3B/ $\beta$ -catenina con fosforilación de GSK3B y un aumento en  $\beta$ -catenina (Fig. 63).

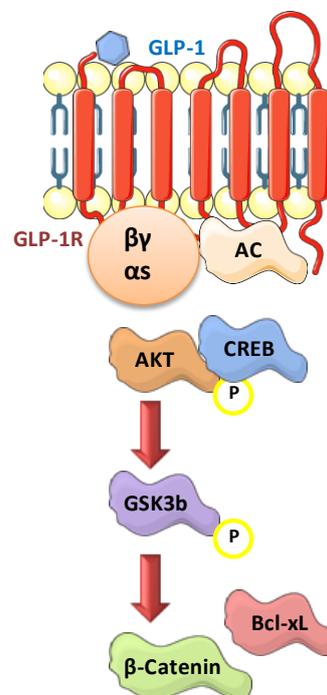


Fig. 63 Esquema que muestra la activación de la señalización del receptor GLP-1R vía CREB/Akt/GSK3B/ $\beta$ -catenina en interaccionar con el ligando GLP-1.

La estabilización de  $\beta$ -catenina resulta en una activación de genes relacionados con la supervivencia celular, proliferación e incluso se relaciona con la promoción de la neurogénesis. Se cree que  $\beta$ -catenina y su participación en la vía de señalización de Wnt podría jugar un papel importante en la neurogénesis promoviendo la proliferación de células madre que se diferencian en neuronas activas [323] en la zona subventricular del ventrículo lateral y la zona subgranular del hipocampo, principalmente, en cerebros de roedores adultos [324] [325] [326] [327] [328] [329] [330].

De hecho, se ha sugerido que los GLP-1RAs incrementan la proliferación neuronal participando en la recuperación funcional de algunos desordenes cerebrales en el adulto. En el estudio del grupo de Porter y colaboradores, se demostró que el tratamiento con liraglutide promueve la plasticidad sináptica y la neurogénesis en el hipocampo del ratón *ob/ob* [226]. Sin embargo, en ese estudio la vía de administración fue subcutánea, y por tanto, se podría discutir si los efectos observados podrían ser debidos a una mejora en los niveles de glucemia en el día 21 de tratamiento (disminuyó la glicemia un 21% en comparación con los animales tratados con vehículo) y no por otros efectos pleiotrópicos del fármaco.

La investigación de Darsalia y colaboradores también mostró que el agonista exendin-4 incrementó la proliferación de las células madre neurales en el cuerpo estriado de ratas diabéticas de tipo 2 (Goto-Kakizaki) en un modelo de derrame cerebral. En este caso, la vía de administración fue intraperitoneal, y por tanto, también se redujo la glucemia [331].

En nuestro estudio observamos que la administración tópica de GLP-1 es capaz de prevenir el adelgazamiento de la retina inducido por la diabetes y restaurar el número de células neurales hasta unos niveles comparables a los detectados en los animales no diabéticos. Estos efectos beneficiosos se relacionan con un incremento significativo en la expresión de Ki-67 por algunas neuronas de la GCL y la INL de las retinas tratadas con GLP-1. El patrón de expresión de la proteína Ki-67 es de localización nuclear y se relaciona con el ARN ribosómico, de manera que es considerado como un buen biomarcador de proliferación celular. La inactivación de Ki-67 inhibe la síntesis del ARN ribosómico y bloquea la proliferación [332]. Recientemente nuestro grupo ha demostrado que GLP-1 restaura la expresión génica disminuida por la diabetes de genes implicados en proliferación, regulación del ciclo celular y reparación del DNA tales como los genes *Babam2*, *Uhrf2*, *Tmpo*, *Ercc6* y *Ndnf*. La compleja interacción de estos mecanismos sugiere que el GLP-1 actúa en múltiples vías celulares, y por tanto está

incidiendo en distintos mecanismos patogénicos [333]. Por tanto, nuestros resultados indican que GLP-1 no es sólo un agente neuroprotector sino que además podría tener un papel importante en la neurogénesis. Así pues, el tratamiento con GLP-1RAs podría ser útil frente a otras patologías del sistema nervioso central como las enfermedades neurodegenerativas.

Además, nuestros resultados de electrofisiología de la retina mediante ERG muestran un incremento en la amplitud de la onda "a" en los animales diabéticos tratados con GLP-1, dato que refleja la reversión y la recuperación de la actividad eléctrica de los fotorreceptores. Por tanto, podemos afirmar que la protección de la supervivencia neuronal vía Akt que observamos en los ratones diabéticos tratados con GLP-1 iría acompañada de la inhibición de la apoptosis y la mejora de la funcionalidad de la retina. Sin embargo, puesto que no observamos expresión de Ki-67 en los fotorreceptores no se puede afirmar que se esté produciendo un proceso de proliferación celular en estas células sensoriales. El tratamiento tópico con GLP-1 también ejerció efectos beneficiosos sobre los OPs, aumentando su amplitud respecto a los animales diabéticos tratados con vehículo. Este hallazgo es muy interesante ya que los OPs se asocian con la función eléctrica de las células amacrinas y el análisis ortogonal del marcaje con Ki-67, NeuN y Calbindina reveló que algunas de las células en proliferación eran células ganglionares y células amacrinas.

Finalmente, remarcar que actualmente en el laboratorio se está evaluando la regulación génica por el tratamiento con GLP-1 mediante un estudio de transcriptómica, y el análisis preliminar revela como ya se ha mencionado previamente que la expresión génica de genes implicados en proliferación, regulación del ciclo celular y reparación del DNA está aumentada en el grupo de animales diabéticos tratados con GLP-1 [333]. Esto iría en consonancia con los resultados obtenidos en la presente tesis. Sin embargo, deberían realizarse más estudios para confirmar los resultados en otros modelos experimentales y explorar los mecanismos específicos implicados.

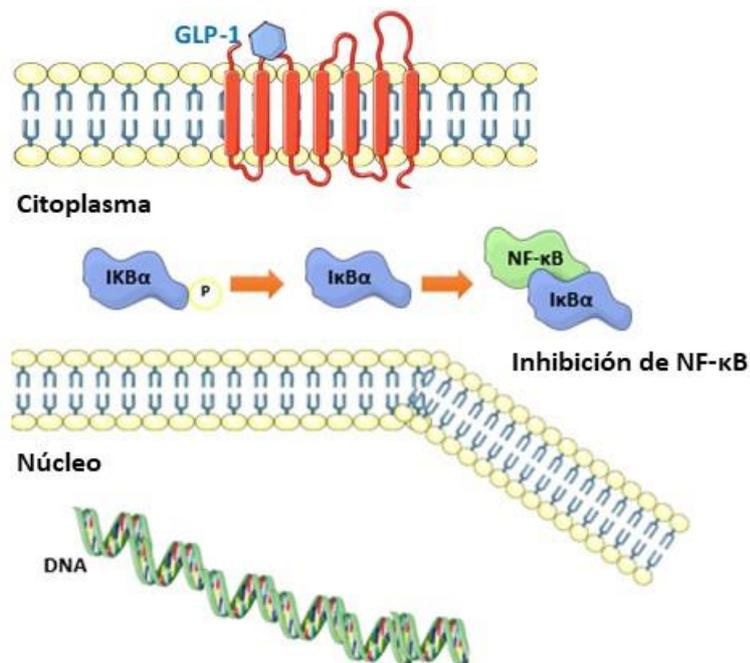
### **5.3. Efectos antiinflamatorios**

La acción antiinflamatoria de GLP-1 parece tener un papel destacado en los efectos beneficiosos del fármaco. La administración de GLP-1 en colirio ejerce una inhibición de la expresión génica y proteica de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  y el factor quimiotáctico ICAM-1. Además, inhibe la translocación nuclear del factor de transcripción NF- $\kappa$ B, que a su vez

regula las citocinas anteriores. Finalmente, produce una disminución de la gliosis reactiva y de la activación del complejo inflamosoma, con una disminución de NLRP3, y como consecuencia, una disminución de IL-18.

Estos resultados abren una nueva línea de estudio de las acciones de los GLP-1RAs en otras enfermedades oculares en las cuales la inflamación juegue un rol importante. Siempre se han descrito los efectos anti-apoptóticos y promotores de supervivencia ejercidos por la activación de GLP-1R pero no hay datos previos publicados sobre su capacidad para inhibir la inflamación en la retina.

Hemos observado que GLP-1 impide la activación de NF- $\kappa$ B a través de la defosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  y la fosforilación de AMPK (Fig. 64) lo que va en línea con los resultados de otros estudios previamente publicados que muestran GLP-1 como un agente antiinflamatorio [247] [248] [249] [250] [251].



**Fig. 64** Esquema que muestra la inhibición de NF- $\kappa$ B por medio de la defosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$ .

Se ha descrito que algunos agonistas, como liraglutide, o DPP-IVi, como sitagliptina, inhiben NF- $\kappa$ B a través de la activación de AMPK [265] [267] [266] [258] [259] [260] [261] [262] [263] [264]. En el caso de liraglutide se ha visto en células endoteliales transformadas de origen murino (SVEC4) o en células endoteliales de vena umbilical humana [265]; y en el caso de sitagliptina en un modelo de ratón diabético con STZ [267] y en un modelo de ratón con

aterosclerosis por una mutación en el gen de la apolipoproteína E [266]. El incremento en el ratio de fosforilación de AMPK por GLP-1 es capaz de inhibir NF- $\kappa$ B a través de la reducción de la fosforilación de I $\kappa$ B $\alpha$  en la retina del ratón db/db. La acción antiinflamatoria de GLP-1 acompaña a la reversión de los cambios estructurales como la extravasación de la albúmina, la gliosis reactiva o la disminución de VEGF.

El mecanismo por el cual AMPK inactiva NF- $\kappa$ B es desconocido pero podría implicar la fosforilación o defosforilación de proteínas intermedias como la proteína 1 $\alpha$  coactivadora del receptor activado por el proliferador de peroxisomas (PGC-1 $\alpha$ ), la proteína O3 con dominio “forkhead box” (FoxO3a) y la proteína SIRT1 [334] [335] [336] las cuales podrían participar en la regulación de NF- $\kappa$ B y su inhibidor I $\kappa$ B en la vía de señalización de IKK/I $\kappa$ B.

AMPK activa FoxO3a, y la sobreexpresión de este factor en células en cultivo con exposición de TNF- $\alpha$  evita la activación de NF- $\kappa$ B [337] e induce la expresión de  $\kappa$ B-Ras1, un inhibidor de NF- $\kappa$ B [338]. La sobreexpresión de PGC-1 $\alpha$  disminuye la expresión y secreción de citocinas proinflamatorias inducidas por el factor de transcripción [339] [340] [341] y SIRT1 podría inhibir directamente la subunidad RelA/p65 del complejo NF- $\kappa$ B mediante la desacetilación en residuos de lisina, señal que induciría la degradación proteosómica de p65 [342] [343] [344]. Otro mecanismo posible podría implicar a la fosfatasa serina/treonina 2A (PP2A). La defosforilación in vitro del complejo IKK por la PP2A inhibe NF- $\kappa$ B [345]. PP2A es una fosfatasa muy interesante por dos razones: se ha observado que se encuentra disminuida en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer [346] [347]; y participa en la progresión del ciclo celular, ya que su activación induce la reentrada al ciclo celular de neuronas [348], de manera que sería una importante vía de estudio.

### 5.4. Reversión de las alteraciones microcirculatorias

En la presente tesis doctoral se muestran evidencias sólidas de que la administración tópica de GLP-1 no sólo tiene efectos beneficiosos frente a los principales marcadores de neurodegeneración presentes en la RD, sino que además protege la vasculatura. En concreto, el tratamiento impide la extravasación de albúmina, de manera que está ejerciendo protección frente a las alteraciones microcirculatorias que aparecen en la RD como consecuencia de la disrupción de la BHR interna.

En un estudio previo en ratones db/db con 12 semanas de edad, la administración tópica de GLP-1 durante dos semanas fue capaz de prevenir el aumento del factor angiogénico VEGF inducido por una diabetes de corta evolución (tras 8 semanas de diabetes). En el estudio realizado en esta tesis, en animales de 24 semanas de edad, la hiperexpresión de VEGF persiste en los ratones diabéticos y el tratamiento tópico con GLP-1 es capaz de inhibir este factor aún cuando los cambios patológicos de la unidad neurovascular ya se han instaurado en las semanas previas.

En el edema diabético se produce un aumento del grosor de la retina. Sin embargo, el grosor de la retina en los animales diabéticos db/db es menor en comparación con los animales controles no diabéticos. Este hallazgo es debido a que en las etapas analizadas predomina el efecto de la neurodegeneración, con adelgazamiento de las capas nucleares de la retina (ONL y INL) sobre el efecto de extravasación vascular. Como ya se ha comentado en la introducción, una limitación de los modelos murinos de diabetes, como el modelo db/db, es que no presenta mácula ni la neovascularización característica de la PRD humana. Sin embargo, podemos afirmar que la administración tópica de GLP-1 revierte las alteraciones microvasculares características de la RD. Nuestros resultados indican que los efectos antiinflamatorios podrían jugar un papel clave en la acción protectora microvascular del fármaco.

### **5.5. Acciones de GLP-1 que podrían ser independientes del GLP-1R**

Los efectos beneficiosos que se observan con la administración tópica de GLP-1 podrían implicar mecanismos independientes del receptor que no deberían ser descartados.

Algunas publicaciones muestran que la forma inactivada por DPP-IV, el GLP-1 (9-36), a pesar de perder afinidad por el GLP-1R [161] y no presentar efectos insulino-trópicos [162], presenta acciones antioxidantes y antiapoptóticas a nivel cardiovascular [163] [164] [165] [166] y a nivel de cardiomiocitos [167]. Los metabolitos de GLP-1 también tienen efectos sobre la plasticidad neuronal en el cerebro [168] [169]. Un estudio en hepatocitos [170] muestra que el nonapéptido GLP-1 (28-36) podría ejercer protección en estas células por una vía independiente del GLP-1R.

Tomas E. y colaboradores sugieren que el nonapéptido GLP-1 podría entrar dentro del citoplasma de los hepatocitos por medio de un transportador desconocido y actuar

directamente a nivel de las mitocondrias inhibiendo el estrés oxidativo [170]. Nuestros resultados demuestran la activación del GLP-1R pero deberían diseñarse nuevos experimentos, que implicarían la utilización de antagonistas de GLP-1 como exendin 9-39 o modelos knockout, para confirmar la existencia en retina de efectos independientes del GLP-1R y ampliar la evidencia preclínica de los mecanismos de acción de este péptido.

### 5.6. Expresión de DPP-IV por la retina

En el presente estudio se analiza por primera vez en retina humana la expresión génica y proteica de DPP-IV. Tanto los niveles de mRNA de *DPP4* como de proteína, son mucho más bajos en retina que en otros tejidos como intestino o hígado. Los niveles de DPP-IV en el humor vítreo fueron 100 veces más bajos que en el plasma. Sin embargo, la concentración más elevada de DPP-IV en el RPE de donantes diabéticos en comparación con donantes no diabéticos indica que la disponibilidad de GLP-1 en la retina diabética podría estar reducida debido a una mayor concentración de la enzima catabólica. Además, la expresión de DPP-IV en la retina podría reducir la disponibilidad del GLP-1 administrado en colirio, ya que como se ha comentado previamente, éste alcanzaría la retina por una vía trans-escleral atravesando la coroides y el RPE. De esta manera, la administración tópica que combine GLP-1 y un DPP-IVi, podría ser una estrategia terapéutica más efectiva.

Puesto que los niveles de GLP-1 en la retina son menores en pacientes diabéticos en comparación con los sujetos no diabéticos [144], es razonable administrar GLP-1 para compensar su déficit o bien un DPP-IVi que aumente su biodisponibilidad en la retina. Cabe destacar que dado que el GLP-1 sistémico cruza la BHR, la administración de DPP-IVi no solo podría tener importancia para aumentar las acciones locales autocrinas o paracrinas del GLP-1 producido en la propia retina, sino también del GLP-1 sistémico que también es susceptible a la degradación por DPP-IV al llegar a la retina.

Nuestro grupo demostró que la administración tópica de DPP-IVi en una edad temprana fue capaz de prevenir la disfunción retinal causada por la diabetes.

## 5.7. Efectos de la administración tópica temprana de DPP-IVi

Tal y como se planteó en nuestra hipótesis inicial, la administración tópica de sitagliptina y saxagliptina tuvo la capacidad de prevenir la neurodegeneración de la retina del ratón db/db sin afectar los niveles de glucosa en sangre.

Se observó un incremento en la fosforilación de Akt, característico de la activación del GLP-1R. Además, se observaron otros efectos beneficiosos como un aumento del factor de supervivencia Bcl-xL, una disminución de la apoptosis, una inhibición de la gliosis reactiva y una disminución de la cantidad de microglia. Finalmente, el tratamiento previno la extravasación de albúmina, estudiada mediante la técnica del Blue Evans y la co-inmunofluorescencia de albúmina y el colágeno IV de la membrana basal de los vasos sanguíneos.

Tal como sucede con los GLP-1RAs, la administración de DPP-IVi previno la disminución de la expresión de GLAST inducida por la diabetes, reduciendo la concentración extracelular de glutamato y por tanto evitando la excitotoxicidad por el glutamato que es una de las causas principales de la neurodegeneración. Los resultados del estudio funcional mediante ERG fueron concordantes con los observados en los estudios histopatológicos. Nuestros resultados sugieren que el aumento de la vida media de GLP-1 probablemente es el principal mecanismo involucrado en el efecto beneficioso de los DPP-IVi aunque no se pueden descartar otros mecanismos independientes de GLP-1.

## 5.8. Acciones de DPP-IVi que podrían ser independientes del GLP-1R

El enzima actúa sobre otros sustratos además de GLP-1 por lo que los DPP-IVi podrían activar otras vías de señalización que han sido poco investigadas.

Por ejemplo, Dietrich y colaboradores [349] demostraron que el DPP-IVi linagliptina tiene efectos protectores frente a la neurodegeneración inducida por altos niveles de glucosa en un modelo animal de *Caenorhabditis elegans* que no presenta GLP-1R. Por tanto, sería muy interesante seguir estudiando las acciones de los DPP-IVi en modelos *in vitro* que bloqueen la expresión del receptor con antagonistas o bien modelos de animales *knock-out* (*GLP-1R<sup>KO</sup>*).

Se ha publicado que DPP-IV puede activar directamente el receptor del factor de coagulación II (F2RL1), también conocido como Par2, el cual es un receptor acoplado a proteínas G que se

expresa en las células ganglionares de la retina [350] y promueve la inflamación y la angiogénesis. Por tanto, una inhibición del enzima con los fármacos sitagliptina o saxagliptina podría estar teniendo un efecto antiinflamatorio independiente de la señalización de GLP-1. Así pues, F2RL1 podría ser un mediador de la acción de los DPP-IVi que debería ser estudiado. Otro efecto antiinflamatorio no mediado por GLP-1 que podrían ejercer los DPP-IVi sería el bloqueo del catabolismo del antagonista del receptor de IL-1 $\beta$  (IL-1RA). Este antagonista competitivo del receptor de la citocina es un sustrato de DPP-IV [351], de manera que la inhibición del enzima disminuiría la acción proinflamatoria de IL-1 $\beta$ .

Por último, se ha comunicado que la administración intraperitoneal de 70  $\mu$ g/kg de sitagliptina dos veces al día durante 5 días provocó la extravasación de albúmina en retinas de animales diabéticos tratados con STZ [319]. El principal mecanismo que se propone es la activación de la vía SDF-1 $\alpha$ /CXCR4/Src/VE-cadherin. Sin embargo, nuestros resultados no muestran efecto de sitagliptina y saxagliptina sobre la expresión proteica de SDF-1.

En conjunto, parece que los inhibidores del enzima DPP-IV serían una buena alternativa terapéutica para la RD aunque faltan estudios para esclarecer los mecanismos implicados.

### 5.9. Evidencias clínicas sobre el efecto de GLP-1RA y DPP-IVi en la RD

Hasta la fecha no se ha realizado ningún ensayo clínico diseñado para examinar el efecto de los GLP-1RAs o de los DPP-4i sobre la RD ni por vía tópica ocular ni por vía sistémica.

Respecto a los DPP-IVi, se han realizado varios ensayos clínicos pero con el objetivo de estudiar sus efectos a nivel cardiovascular (EXAMINE\_NCT00968708; TECOS\_NCT00790205; SAVOR-TIMI 53\_NCT01107886). Sin embargo, en un estudio clínico piloto sí que se analizó el efecto del tratamiento oral con saxagliptina en 50 pacientes con T2DM sin RD (NCT01319357) [352]. En este ensayo se demostró que el tratamiento durante 6 semanas normalizó el flujo capilar de la retina tras exposición a luz intermitente, “*flicker-light exposure*”.

Respecto a los GLP-1RAs, dos ensayos clínicos, el ensayo LEADER que utilizó liraglutide (NCT01179048), y el ensayo SUSTAIN-6, que utilizó semaglutide (NCT01720446), han cuestionado los efectos beneficiosos obtenidos en los estudios experimentales con los GLP-1RAs. Liraglutide redujo el ratio de incidencia y mortalidad por causa cardiovascular en pacientes con T2DM. Sin embargo, se produjo un aumento no significativo ( $p=0.33$ ) en el

desarrollo de RD en el grupo de pacientes tratados con liraglutide. En el caso de semaglutide, también se obtuvieron efectos beneficiosos a nivel cardiovascular, pero las complicaciones por RD severa se incrementaron significativamente respecto al grupo tratado con placebo ( $p=0.002$ ). El grupo tratado con semaglutide mostró un mayor índice de efectos adversos oculares severos como hemorragias vítreas, ceguera y mayor necesidad de fotocoagulación o de tratamiento con inyecciones antivítreas. Estos eventos, que se recogieron como efectos adversos, se observaron ya a los pocos meses de iniciarse el estudio. En este sentido, algunos estudios recientes muestran que GLP-1 podría estimular la proliferación de células endoteliales progenitoras [353] o ejercer efectos angiogénicos [354] [355]. Así pues, se podría especular que el empeoramiento de la RD que se observó en los ensayos LEADER y SUSTAIN-6 podría ser parcialmente debido a la inclusión de pacientes diabéticos que ya presentaban una NPRD o una PRD y en los que el GLP-1RA habría promovido fenómenos angiogénicos. Sin embargo, hasta ahora no se ha publicado ningún efecto angiogénico de GLP-1RAs en retina. Por el contrario, nuestros estudios muestran que la administración tópica de GLP-1 en el ratón db/db disminuye la expresión de VEGF a 12 [144] y 24 semanas de edad [356]. Sin embargo, deberían realizarse más estudios con diferentes GLP-1RAs por vía tópica o intravítrea para explorar un posible efecto angiogénico independiente de su poder hipoglucemiante.

Es interesante remarcar que como el ensayo clínico SUSTAIN-6 no estaba destinado a evaluar los efectos oculares, a la hora de la randomización no se estratificó en función de la presencia de retinopatía ni el grado de la misma. Este es un punto crucial porque es determinante conocer el estado inicial de la RD para extraer conclusiones sobre su progresión en cada brazo terapéutico. En el SUSTAIN-6 se describió un empeoramiento de la RD tras la intensificación rápida del control [357]. Como era de esperar, en los pacientes tratados con semaglutide se produjo un mayor descenso de la glucemia que en el grupo control. Si por azar, en el grupo de semaglutide se situaron más pacientes con RD severa, la mejoría rápida del control glucémico pudo contribuir a explicar los efectos adversos registrados sobre la progresión de la RD.

Cabe mencionar nuestros resultados recientes con semaglutide que se presentaron en el congreso de la EASD (*European Association for the Study of Diabetes*) en septiembre de 2020 [358]. En resumen, la administración tópica de semaglutide en ratones db/db previno la gliosis reactiva, la inflamación, la apoptosis neuronal y las alteraciones microcirculatorias de manera

que se demuestra que el fármaco no produce efectos deleterios en la retina sino que, por el contrario, ejerce efectos protectores sobre la unidad neurovascular.

Finalmente, la presente tesis evidencia que los efectos beneficiosos de los GLP-1RAs sobre la unidad neurovascular se deben a su capacidad antiinflamatoria y a la activación de vías de supervivencia. La complejidad de los mecanismos involucrados en la patogénesis de la RD sugiere que aquellos tratamientos que afectan a múltiples vías podrían ser más efectivos que aquellos que bloquean mecanismos individuales. Los efectos beneficiosos duales de GLP-1 y de los DPP-IVi, observados a nivel neuronal y vascular en nuestro modelo experimental, muestran que la activación de GLP-1R podría ser una estrategia terapéutica excelente para los estadios no avanzados de la RD.

Los resultados obtenidos suponen un grueso de evidencia preclínica para avanzar en el desarrollo clínico de tratamientos basados en la administración tópica de GLP-1, de DPP-IVi, o bien una combinación de los dos, para el tratamiento de la RD. En este sentido, cabe destacar que los resultados obtenidos en esta tesis han formado parte del dossier presentado a la Agencia Española del Medicamento y Productos Sanitarios (AEMPs) para solicitar la realización de un ensayo clínico Fase I para evaluar la seguridad de la administración de GLP-1 en colirio en humanos (Ensayo clínico de fase I, de dosis única y múltiple ascendente, aleatorizado (2:1), doble ciego, controlado con placebo, en paralelo, para evaluar la seguridad y tolerabilidad de la administración tópica ocular, de dos dosis de FAB120 en participantes con diabetes tipo 2. EUDRACT: 2019-002502-52). Este ensayo clínico ha sido aprobado y se iniciará el próximo mes de Septiembre en el Hospital Universitario Vall d'Hebron.



## **6. CONCLUSIONES**

---



1. El estudio de absorción y biodistribución demuestra que el GLP-1 administrado por vía tópica ocular alcanza la retina por vía transescleral y justifica el inicio de las fases de desarrollo clínico.
2. El tratamiento con GLP-1 en colirio revierte los principales marcadores de neurodegeneración (apoptosis neuronal y gliosis activa) inducidos por la diabetes en los ratones db/db. Los efectos protectores de GLP-1 sobre la unidad neurovascular se correlacionan con una mejora en la función de la retina evaluada mediante el electroretinograma.
3. La administración tópica de GLP-1 en el ratón db/db promueve vías de supervivencia asociadas a la activación de la proteína Akt e induce la proliferación de neuronas en la retina diabética, indicando que la neurogénesis podría ser un mecanismo de neuroprotección clave frente a la neurodegeneración inducida por la diabetes.
4. Los efectos antiinflamatorios de GLP-1 a través de la inhibición de NF- $\kappa$ B por medio de AMPK e I $\kappa$ B $\alpha$  juegan un papel esencial en la protección de la unidad neurovascular. Este efecto se traduce en una disminución en la expresión de mediadores proinflamatorios como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, ICAM-1 y NLRP3.
5. El tratamiento con GLP-1 en colirio revierte la ruptura de la barrera hematoretiniana y el aumento de VEGF inducido por la diabetes.
6. DPP-IV se expresa en la retina humana y de ratón. Los niveles de expresión génica y proteica de DPP-IV se encuentran aumentados en el epitelio pigmentario de la retina (RPE) de los pacientes diabéticos.
7. La inhibición de DPP-IV por la administración tópica de saxagliptina y sitagliptina previene las alteraciones iniciales de la retinopatía diabética en el animal db/db. Los efectos beneficiosos de saxagliptina y sitagliptina pueden ser atribuidos al aumento de GLP-1 en la retina, pero otros mecanismos independientes de GLP-1 no pueden descartarse.



## **7. BIBLIOGRAFIA**

---



- [1] S. D. Solomon, E. Chew, E. J. Duh, L. Sobrin, J. K. Sun, B. L. Vanderbeek, C. C. Wykoff y T. W. Gardner, «Diabetic Retinopathy: A position statement by the American Diabetes Association.,» *Diabetes Care*, vol. 40, nº 3, pp. 412-418, 2017.
- [2] P. H. Scanlon, *Diabetic retinopathy: Medicine*, Elsevier, 2015, pp. 13-19.
- [3] M. M. Nentwich y M. W. Ulbig, «Diabetic retinopathy - ocular complications of diabetes mellitus.,» *World J. Diabetes*, nº 6, pp. 489-499, 2015.
- [4] W. H. Organization, «World Health Organization,» [En línea]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs312/es>. [Último acceso: 6 12 2018].
- [5] N. H. Cho, J. E. Shaw, S. Karuranga, Y. Huang, J. D. da Rocha Fernandes, A. W. Ohlrogge y B. Malanda, «IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045.,» *Diabetes Res. Clin. Pract.*, nº 138, pp. 271-281, 2018.
- [6] S. A. Ross, G. Dzida, J. Vora, K. Khunti, M. Kaiser y R. J. Ligthelm, «Impact of weight gain on outcomes in type 2 diabetes.,» *Current Medical Research and Opinion*, vol. 27, nº 7, pp. 1431-1438, 2011.
- [7] J. W. Yau, S. L. Rogers y R. Kawasaki, «Global prevalence and major risk factors of diabetic retinopathy.,» *Diabetes Care*, nº 35, pp. 556-564, 2012.
- [8] B. E. Klein, «Overview of epidemiologic studies of diabetic retinopathy.,» *Ophthalmic Epidemiol.*, vol. 14, nº 4, pp. 179-183, 2007.
- [9] D. S. Fong, L. Aiello y T. W. Gardner, «Retinopathy in diabetes.,» *Diabetes care*, nº 27, 2004.
- [10] F. I. Errera, L. H. Canani, M. E. Silva, E. Yeh, W. Takahashi, K. G. Santos, K. E. Souto, B. Tschiedel, I. Roisenberg, J. L. Gross y M. R. Passos-Bueno, «Functional vascular endothelial growth factor - 634G>C SNP is associated with proliferative diabetic retinopathy: a case-control study in a Brazilian population of European ancestry.,» *Diabetes care*, vol. 30, nº 2, pp. 275-279, 2007.
- [11] X. J. Xie, Y. M. Yang, J. K. Jiang y Y. Q. Lu, «Association between the vascular endothelial growth factor single nucleotide polymorphisms and diabetic retinopathy risk: A meta-analysis.,» *J. Diabetes*, vol. 9, nº 8, pp. 738-753, 2017.
- [12] Y. Zeng, F. Dai, K. Yang, Y. Tang, M. Xu y Y. Zhou, «Association between a vascular endothelial growth factor gene polymorphism (rs2146323) and diabetic retinopathy: a meta-analysis.,» *BMC Ophthalmol.*, vol. 15, nº 163, 2015.
- [13] L. Han, L. Zhang, W. Xing, R. Zhuo, X. Lin, Y. Hao, Q. Wu y J. Zhao, «The associations between VEGF gene polymorphisms and diabetic retinopathy susceptibility: a meta-analysis of 11 case-control studies.,» *J. Diabetes Res.*, nº 805801, 2014.
- [14] W. Meng, K. P. Shah, S. Pollack, I. Toppila, H. L. Hebert y M. I. McCarthy et al, «A genome-wide association study suggests new evidence for an association of the NADPH Oxidase 4 (NOX4) gene with severe diabetic retinopathy in type 2 diabetes.,» *Acta Ophthalmol.*, vol. 96, nº 7, pp. 811-819, 2018.
- [15] M. Cao, Z. Tian, L. Zhang, R. Liu, Q. Guan y J. Jiang, «Genetic association of AKR1B1 gene polymorphism rs759853 with diabetic retinopathy risk: A meta-analysis.,» *Gene*, vol. 676, pp. 73-78, 2018.
- [16] S. Uthra, R. Raman, B. N. Mukesh, S. A. Rajkumar, P. Kumari, P. Lakshmipathy, P. Gnanamoorthy, T. Sharma, C. A. McCarty y G. Kumaramanckavel, «Diabetic retinopathy: Validation study of ALR2, RAGE, iNOS and TNFB gene variants in a south Indian cohort.,» *Ophthalmic Genet.*, vol. 31, nº 4, pp. 244-251, 2010.
- [17] G. Kumaramanickavel, S. Sripriya, V. R. R., N. Upadyay, S. Badrinath, V. Rajendran, B. Sukumar, V. Ramprasad y T. Sharma, «Inducible nitric oxide synthase gene and diabetic retinopathy in Asian Indian patients.,» *Clin Genet.*, vol. 61, nº 5, pp. 344-348, 2002.
- [18] T. Y. Wong, C. M. Cheung, M. Larsen, S. Sharma y R. Simó, «Diabetic retinopathy.,» *Nat Rev Dis Primers.*, vol. 17, nº 2, p. 16012, 2016.
- [19] S. A. G. T. Simó R, «Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter?,» *Diabetologia.*, vol. 61, nº 9, pp. 1902-1912, 2018.
- [20] C. E. Riva, E. Logean y B. Falsini, «Visually evoked hemodynamical response and assessment of neurovascular coupling in the optic nerve and retina.,» *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 24, pp. 183 - 215, 2005.

- [21] I. N. Mohamed, T. Ishrat, S. C. Fagan y A. B. El-Remessy, «Role of inflammasome activation in the pathophysiology of vascular diseases of the neurovascular unit.,» *Antioxid. Redox. Signal.*, vol. 22, nº 13, pp. 1188 - 1206, 2015.
- [22] A. Daruich, A. Matet, A. Moulin, L. Kowalczyk, M. Nicolas, A. Sellam, P. R. Rothschild, S. Omri, E. Gélizé, L. Jonet, K. Delaunay, Y. De Kozak, M. Berdugo, M. Zhao, P. Crisanti y F. Behar-Cohen, «Mechanisms of macular edema: Beyond the surface.,» *Prog. Retin. Eye Res.*, vol. 63, pp. 20 - 68, 2018.
- [23] A. Stevens y J. Love, *Texto y atlas de histología*, Harcourt Brace, 1998.
- [24] J. Tinsley, M. Molodtsov, R. Prevedel, D. Wartmann, J. Espigule-Pons, M. Lauwers y A. Vaziri, «Direct detection of a single photon by humans.,» *Nat Commun*, vol. 7, nº 12172, 2016.
- [25] D. L. Nelson y M. M. Cox, Lehninger. *Principios de Bioquímica.*, 6º ed., Omega.
- [26] M. Helmstaedter, K. L. Briggman, S. Turaga, V. Jain, H. Seung y W. Denk, «Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina.,» *Nature*, nº 500, pp. 168-174, 2013.
- [27] D. Y. Yu, S. J. Cringle, C. Balaratnasingam, W. H. Morgan, P. K. Yu y E. N. Su, «Retinal ganglion cells: Energetics, compartmentation, axonal transport, cytoskeletons and vulnerability.,» *Prog. Retin. Eye Res.*, nº 36, pp. 217-246, 2013.
- [28] A. Bringmann, T. Pannicke, B. Biedermann, M. Francke, I. Iandiev, J. Grosche y A. Reichenbach, «Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism.,» *Neurochemistry International*, vol. 54, nº 3-4, pp. 143-160, 2009.
- [29] P. V. Subirada, M. C. Paz, M. E. Ridano, V. E. Lorenc, M. V. Vaglianti, P. F. Barcelona, J. D. Luna y M. C. Sánchez, «A journey into the retina: Müller glia commanding survival and death.,» *European Journal of Neuroscience*, vol. 47, nº 12, pp. 1429-1443, 2018.
- [30] K. J. Lindsay, J. Du, S. R. Sloat, L. Contreras, J. D. Linton, S. J. Turner, M. Sadilek, J. Satrústegui y J. B. Hurley, «Pyruvate kinase and aspartate-glutamate carrier distributions reveal key metabolic links between neurons and glia in retina.,» *Proc Natl Acad Sci U S A.*, vol. 111, nº 43, pp. 15579-15584, 2014.
- [31] J. B. Hurley, K. J. Lindsay y J. Du, «Glucose, lactate, and shuttling of metabolites in vertebrate retinas.,» *J. Neurosci. Res.*, vol. 93, nº 7, pp. 1079-1092, 2015.
- [32] D. Goldman, «Müller glia cell reprogramming and retina regeneration.,» *Nat. Rev. Neurosci.*, vol. 15, nº 7, pp. 431-442, 2014.
- [33] J. R. Lenkowski y P. A. Raymond, «Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish.,» *Prog. Retin. Eye Res.*, nº 40, pp. 94-123, 2014.
- [34] S. Hayes, B. R. Nelson, B. Buckingham y T. A. Reh, «Notch signaling regulates regeneration in the avian retina.,» *Dev. Biol.*, vol. 1, nº 312, pp. 300-311, 2007.
- [35] K. M. Beach, J. Wang y D. C. Otteson, «Regulation of stem cell properties of Müller glia by JAK/STAT and MAPK signaling in the mammalian retina.,» *Stem cells int.*, 2017.
- [36] M. Mizutani, C. Gerhardinger y M. Lorenzi, «Müller cell changes in human diabetic retinopathy.,» *Diabetes*, vol. 47, nº 3, pp. 445-449, 1998.
- [37] K. Saijo y C. Glass, «Microglial cell origin and phenotypes in health and disease.,» *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 11, nº 11, pp. 775-787, 2011.
- [38] A. B., J. L. Bennett, C. Krieger, W. Tetzlaff y F. M. V. Rossi, «Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life.,» *Nat. Neurosci.*, vol. 10, nº 12, pp. 1538-1543, 2007.
- [39] M. E. Tremblay, B. Stevens, A. Sierra, H. Wake, A. Bessis y A. Nimmerjahn, «The role of microglia in the healthy brain.,» *J. Neurosci.*, vol. 31, nº 45, pp. 16064-16069, 2011.
- [40] A. Sierra, J. M. Encinas, J. J. Deudero, J. Chancey, G. Enikolopov, L. Overstreet-Wadiche, S. Tsirka y M. Maletic-Savatic, «Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis.,» *Cell Stem Cell*, vol. 7, nº 4, pp. 483-495, 2010.
- [41] S. Sellner, R. Paricio-Montesinos, A. Spies, A. Masuch, D. Erny, L. Harsan, D. Elverfeldt, M. Schwabenland, K. Biber, O. Staszewski, S. Lira, S. Jung, M. Prinz y T. Blank, «Microglial CX3CR1 promotes adult neurogenesis by inhibiting Sirt1/p65 signaling independent of CX3CL1.,» *Acta Neuropathol. Commun.*, vol. 4, nº 1, p. 102, 2016.

- [42] J. Vukovic, M. Colditz, D. G. Blackmore, M. J. Ruitenberg y P. F. Bartlett, «Microglia modulate hippocampal neural precursor activity in response to exercise and aging.,» *J. Neurosci.*, vol. 32, nº 19, pp. 6435-6443, 2012.
- [43] K. Kierdorf y M. Prinz, «Microglia in the steady state.,» *J. Clin. Investig.*, nº 127, pp. 3201-3209, 2017.
- [44] H. Wake, A. J. Moorhouse, S. Jinno, S. Kohsaka y J. Nabekura, «Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals.,» *J. Neurosci.*, nº 29, pp. 3974-3980, 2009.
- [45] M. Díaz-Coránguez, C. Ramos y D. A. Antonetti, «The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development.,» *Vision Res.*, vol. 139, pp. 123 - 137, 2017.
- [46] M. R. Metea y E. A. Newman, «Glial cells dilate and constrict blood vessels: a mechanism of neurovascular coupling.,» *J Neurosci.*, vol. 26, nº 11, pp. 2862-2870, 2006.
- [47] E. A. Newman, «Glial cell regulation of neuronal activity and blood flow in the retina by release of gliotransmitters.,» *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, vol. 370, nº 1672, 2015.
- [48] F. S. Sorrentino, M. Allkabes, G. Salsini, C. Bonifazzi y P. Perri, «The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy.,» *Life Sci.*, vol. 162, pp. 54 - 59, 2016.
- [49] M. Brownlee, «Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.,» *Nature*, vol. 414, p. 813-820, 2001.
- [50] T. W. Gardner y J. R. Davila, «The neurovascular unit and the pathophysiologic basis of diabetic retinopathy.,» *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 255, nº 1, pp. 1 - 6, 2017.
- [51] Y. M. I. D. T. D. F. A. R. A. A. S. N. T. H. Hasnan J, «Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus.,» *Singapore Med J*, vol. 51, nº 1, 2010.
- [52] F. Cipollone, F. Chiarelli, A. Iezzi y e. al., «Relationship between reduced bcl-2 expression in circulating mononuclear cells and early nephropathy in type 1 diabetes.,» *Int J Immunopathol Pharmacol*, vol. 18, nº 4, pp. 625-635, 2005.
- [53] S. X. Zhang, J. J. Wang, G. Gao, K. Parke y J. X. Ma, «Pigment epithelium-derived factor downregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and inhibits VEGF-VEGF receptor 2 binding in diabetic retinopathy.,» *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 37, pp. 1 - 12, 2006.
- [54] D. Cervia, E. Catalani, M. Dal Monte y G. Casini, «Vascular endothelial growth factor in the ischemic retina and its regulation by somatostatin.,» *J. Neurochem.*, vol. 120, pp. 818 - 829, 2012.
- [55] J. Kusari, S. X. Zhou, E. Padillo, K. Clarke, G. Gil y D. W., «Inhibition of vitreoretinal VEGF elevation and blood-retinal barrier breakdown in streptozotocin-induced diabetic rats by brimonidine.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 51, pp. 1044 - 1051, 2010.
- [56] D. T. S., W. B. N., K. S. R. y B. A. J., «Post-translational processing of synaptophysin in the rat retina is disrupted by diabetes.,» *PLoS One.*, vol. 7, nº 9, 2012.
- [57] V. H. D., B. R. M., P. K., E. R. W., F. W. M. y B. A. J., «Diabetes downregulates presynaptic proteins and reduces basal synapsin I phosphorylation in rat retina.,» *Eur J Neurosci.*, vol. 28, nº 1, pp. 1 - 11, 2008.
- [58] A. W. Stitt, N. Lois, R. J. Medina, P. Adamson y T. M. Curtis, «Advances in our understanding of diabetic retinopathy.,» *Clin Sci (Lond)*, vol. 125, nº 1, pp. 1 - 17, 2013.
- [59] M. G. Rossino, M. Dal Monte y G. Casini, «Relationships Between Neurodegeneration and Vascular Damage in Diabetic Retinopathy.,» *Front Neurosci.*, vol. 13, nº 1172, 2019.
- [60] M. Lu, M. Kuroki, S. Amano, M. Tolentino, K. Keough, I. Kim, R. Bucala y A. P. Adamis, «Advanced glycation end products increase retinal vascular endothelial growth factor expression.,» *J. Clin. Invest.*, vol. 101, pp. 1219 - 1224, 1998.
- [61] B. B. Gao, A. Clermont, S. Rook, S. J. Fonda, V. J. Srinivasan, M. Wojtkowski, J. G. Fujimoto, R. L. Avery, P. G. Arrigg, S. E. Bursell, L. P. Aiello y E. P. Feener, «Extracellular carbonic anhydrase mediates hemorrhagic retinal and cerebral vascular permeability through prekallikrein activation.,» *Nat. Med.*, vol. 13, pp. 181 - 188, 2007.
- [62] M. Hangai, S. He, S. Hoffmann, J. I. Lim, S. J. Ryan y D. R. Hinton, «Sequential induction of angiogenic growth factors by TNF-alpha in choroidal endothelial cells.,» *J. Neuroimmunol.*, vol. 171, pp. 45 - 56, 2006.

- [63] T. Qaum, Q. Xu, A. M. Jousen, M. W. Clemens, W. Qin, K. Miyamoto, H. Hassessian, S. J. Wiegand, J. Rudge, G. D. Yancopoulos y A. P. Adamis, «VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 42, pp. 2408 - 2413, 2001.
- [64] K. Miyamoto, S. Khosrof, S. E. Bursell, Y. Moromizato, L. P. Aiello, Y. Ogura y A. P. Adamis, «Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced retinal vascular permeability is mediated by intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1).,» *Am. J. Pathol.*, vol. 156, 1733 - 1739.
- [65] J. Adamiec-Mroczek y J. Oficjalska-Mlynczak, «Assessment of selected adhesion molecule and proinflammatory cytokine levels in the vitreous body of patients with 2 diabetes role of the inflammatory-immune process in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy.,» *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 246, nº 12, pp. 1665 - 1670, 2008.
- [66] Y. Yan, L. Zhu, L. Hong, J. Deng, Y. Song y X. Chen, «The impact of ranibizumab on the level of intercellular adhesion molecule type 1 in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy.,» *Acta Ophthalmol.*, vol. 94, nº 4, pp. 358 - 364, 2016.
- [67] H. Funatsu, H. Yamashita, K. Sakata, H. Noma, T. Mimura, M. Suzuki, S. Eguchi y S. Hori, «Vitreous levels of vascular endothelial growth factor and intercellular adhesion molecule 1 are related to diabetic macular edema.,» *Ophthalmology*, vol. 112, nº 5, pp. 806 - 816, 2005.
- [68] G. A. Limb, J. Hickman-Casey, R. D. Hollifield y A. H. Chignell, «Vascular adhesion molecules in vitreous from eyes with proliferative diabetic retinopathy.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 40, nº 10, pp. 2453 - 2457, 1999.
- [69] P. Esser, M. Bresgen, R. Fischbach, K. Heimann y P. Wiedemann, «Intercellular adhesion molecule-1 levels in plasma and vitreous from patients with vitreoretinal disorders.,» *Ger. J. Ophthalmol.*, vol. 4, nº 5, pp. 269 - 274, 1995.
- [70] P. Murugeswari, D. Shukla, A. Rajendran, R. Kim, P. Namperumalsamy y V. Muthukkaruppan, «Proinflammatory cytokines and angiogenic and anti-angiogenic factors in vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy and eales' disease.,» *Retina*, vol. 28, nº 6, pp. 817 - 824, 2008.
- [71] R. Maier, M. Weger, E. M. Haller-Schober, Y. El-Shabrawi, A. Wedrich, A. Theisl, R. Aigner, A. Barth y A. Haas, «Multiplex bead analysis of vitreous and serum concentrations of inflammatory and proangiogenic factors in diabetic patients.,» *Mol. Vis.*, vol. 14, pp. 637 - 643, 2008.
- [72] A. D. Meleth, E. Agrón, C. C. Chan, G. F. Reed, K. Arora, G. Byrnes, K. G. Csaky, F. L. Ferris y E. Y. Chew, «Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 46, nº 11, pp. 4295 - 4301, 2005.
- [73] A. M. Jousen , T. Murata, A. Tsujikawa, B. Kirchhof, S. E. Bursell y A. P. Adamis, «Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina.,» *Am. J. Pathol.*, vol. 158, nº 1, pp. 147 - 152, 2001.
- [74] R. Talahalli, S. Zarini, J. Tang, G. Li , R. Murphy, T. S. Kern y R. A. Gubitosi-Klug, «Leukocytes regulate retinal capillary degeneration in the diabetic mouse via generation of leukotrienes.,» *J. Leukoc. Biol.*, vol. 93, nº 1, pp. 135 - 143, 2013.
- [75] D. S. McLeod, D. J. Lefer, C. Merges y G. A. Luty, «Enhanced expression of intracellular adhesion molecule-1 and P-selectin in the diabetic human retina and choroid.,» *Am. J. Pathol.*, vol. 147, pp. 642 - 653, 1995.
- [76] S. Y. Kim, M. A. Johnson, D. S. McLeod, T. Alexander, B. C. Hansen y G. A. Luty, «Neutrophils are associated with capillary closure in spontaneously diabetic monkey retinas.,» *Diabetes*, vol. 54, pp. 1534 - 1542.
- [77] A. Canton, E. M. Martinez-Caceres, C. Hernandez, C. Espejo, J. Garcia-Arumi y R. Simo, «CD4-CD8 and CD28 expression in T cells infiltrating the vitreous fluid in patients with proliferative diabetic retinopathy: a flow cytometric analysis.,» *Arch. Ophthalmol.*, vol. 122, pp. 743 - 749, 2004.
- [78] F. C. Barouch, K. Miyamoto, J. R. Allport, K. Fujita, S. E. Bursell, L. P. Aiello, F. W. Luscinskas y A. P. Adamis, «Integrin-mediated neurotrophil adhesion and retinal leukostasis in diabetes.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 41, pp. 1153 - 1158, 2000.
- [79] A. Del Maschio, A. Zanetti, M. Corada, Y. Rival, L. Ruco, M. G. Lampugnani y E. Dejana, «Polymorphonuclear leukocyte adhesion triggers the disorganization of endothelial cell-to-cell adherens junctions.,» *J. Cell. Biol.*, vol. 135, pp. 497 - 510, 1996.

- [80] S. J. Bolton, D. C. Anthony y V. H. Perry, «Loss of the tight junction proteins occludin and zonula occludens-1 from cerebral vascular endothelium during neutrophil-induced blood-brain barrier breakdown in vivo.,» *Neuroscience*, vol. 86, pp. 1245 - 1257, 1998.
- [81] A. M. Jousseaume, V. Poulaki, W. Qin, B. Kirchhof, N. Mitsiades, S. J. Wiegand, J. Rudge, G. D. Yancopoulos y A. P. Adamis, «Retinal vascular endothelial growth factor induces intercellular adhesion molecule-1 and endothelial nitric oxide synthase expression and initiates early diabetic retinal leukocyte adhesion in vivo.,» *Am. J. Pathol.*, vol. 160, pp. 501 - 509, 2002.
- [82] S. Jain, V. Saxena, V. K. Khanna, K. Shukla y C. H. Meyer, «Status of serum VEGF and ICAM-1 and its association with external limiting membrane and inner segment outer segment junction disruption in type 2 diabetes mellitus.,» *Mol. Vis.*, vol. 19, pp. 1760 - 1768, 2013.
- [83] G. A. Limb, A. H. Chignell, W. Green, F. LeRoy y D. C. Dumonde, «Distribution of TNF alpha and its reactive vascular adhesion molecules in fibrovascular membranes of proliferative diabetic retinopathy.,» *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 80, nº 2, pp. 168 - 173, 1996.
- [84] A. M. Jousseaume, V. Poulaki, N. Mitsiades, W. Y. Cai, I. Suzuma, J. Pak, S. T. Ju, S. L. Rook, P. Esser, C. S. Mitsiades, B. Kirchhof, A. P. Adamis y L. P. Aiello, «Suppression of Fas-FasL-induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model streptozotocin-induced diabetes.,» *FASEB. J.*, vol. 17, pp. 76-78, 2003.
- [85] N. J. Coorey, W. Shen, S. H. Chung, L. Zhu y M. C. Gillies, «The role of glia in retinal vascular disease.,» *Clin. Exp. Optom.*, vol. 95, nº 3, pp. 266 - 281, 2012.
- [86] T. Rauen, W. R. Taylor, K. Kuhlbrodt y M. Wiessner, «High-affinity glutamate transporters in the rat retina: a major role of the glial glutamate transporter GLAST-1 in transmitter clearance.,» *Cell Tissue Res.*, vol. 291, nº 1, pp. 19 - 31, 1998.
- [87] X. Liu, F. Ye, H. Xiong, D. Hu, G. A. Limb, T. Xie, L. Peng, W. Yang, Y. Sun, M. Zhou, E. Song y D. Y. Zhang, «IL-1 $\beta$  upregulates IL-8 production in human Müller cells through activation of the p38 MAPK and ERK1/2 signaling pathways.,» *Inflammation*, vol. 37, nº 5, pp. 1486 - 1495, 2014.
- [88] X. Liu, F. Ye, H. Xiong, D. N. Hu, G. A. Limb, T. Xie, L. Peng, P. Zhang, Y. Wei, W. Zhang, J. Wang, H. Wu, P. Lee, E. Song y D. Y. Zhang, «IL-1 $\beta$  induces IL-6 production in retinal Müller cells predominantly through the activation of p38 MAPK/NF- $\kappa$ B signaling pathway.,» *Exp. Cell. Res.*, vol. 331, nº 1, pp. 223 - 231, 2015.
- [89] Y. Du, V. P. Sarthy y T. S. Kern, «Interaction between NO and COX pathways in retinal cells exposed to elevated glucose and retina of diabetic rats.,» *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 287, nº 4, pp. 735 - 741, 2004.
- [90] M. Fukuda, Y. Nakanishi, M. Fuse, N. Yokoi, Y. Hamada, M. Fukagawa, A. Negi y M. Nakamura, «Altered expression of aquaporins 1 and 4 coincides with neurodegenerative events in retina of spontaneously diabetic Torii rats.,» *Exp. Eye Res.*, vol. 90, nº 1, pp. 17 - 25, 2010.
- [91] L. L. Kusner, V. P. Sarthy y S. Mohr, «Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: a role in high glucose-induced apoptosis in retinal Müller cells.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45, nº 5, pp. 1553 - 1561, 2004.
- [92] E. C. Yego, J. A. Vincent, V. Sarthy, J. V. Busik y S. Mohr, «Differential regulation of high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation in Müller cells by IL-1 $\beta$  and IL-6.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 50, nº 4, pp. 1920 - 1928, 2009.
- [93] E. C. Yego y S. Mohr, «Siah-1 protein is necessary for high glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation and cell death in Müller cells.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 285, nº 5, pp. 3181 - 3190, 2010.
- [94] L. Galluzzi, I. Vitale, S. A. Aaronson, J. M. Abrams, D. Adam, P. Agostinis, E. S. Alnemri, L. Altucci, I. Amelio y D. W. Andrews, «Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death.,» *Cell Death Differ.*, vol. 25, nº 3, pp. 486-541, 2018.
- [95] L. Sborgi, S. Rühl, E. Mulvihill, J. Pipercevic, R. Heilig, H. Stahlberg, C. J. Farady, D. J. Müller, P. Broz y S. Hiller, «GSDMD membrane pore formation constitutes the mechanism of pyroptotic cell death.,» *EMBO J.*, vol. 35, nº 16, pp. 1766 - 1778, 2016.
- [96] D. J. Feenstra, E. C. Yego y S. Mohr, «Modes of retinal cell death in diabetic retinopathy.,» *J. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 4, nº 5, p. 298, 2013.

- [97] K. E. Trueblood, S. Mohr y G. R. Dubyak, «Send to purinergic regulation of high-glucose-induced caspase-1 activation in the rat retinal Müller cell line rMC-1.,» *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, vol. 305, nº 5, pp. 1213 - 1223, 2011.
- [98] L. Lu, L. Qianyi, C. Wei, L. Jingwen, L. Chunxia y Z. Zhi, «Vitamin D3 protects against Diabetic Retinopathy by inhibiting high-glucose-induced activation of the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome pathway.,» *J. Diabetes Res.*, vol. 8193523, 2018.
- [99] Y. Yin, F. Chen, W. Wang, H. Wang y X. Zhang, «Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy eats: Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B signaling pathway.,» *Mol. Vis.*, vol. 23, pp. 242 - 250, 2017.
- [100] R. Ward y A. Ergul, «Relationship of endothelin-1 and NLRP3 inflammasome activation in HT22 hippocampal cells in diabetes.,» *Life Sci.*, vol. 159, pp. 97 - 103, 2016.
- [101] S. S. Chaurasia, R. R. Lim, B. H. Parikh, Y. S. Wey, B. B. Tun, T. Y. Wong, C. D. Luu, R. Agrawal, A. Ghosh, A. Mortellaro, E. Rackoczy, R. R. Mohan y V. A. Barathi, «The NLRP3 inflammasome may contribute to pathologic neurovascularization in the advanced stages of diabetic retinopathy.,» *Sci. Rep.*, vol. 8, nº 1, p. 2847, 2018.
- [102] J. Klen, K. Goričar, A. Janež y V. Dolžan, «NLRP3 inflammasome polymorphism and macrovascular complications in Type 2 diabetes patients.,» *J. Diabetes Res.*, vol. 616747, 2015.
- [103] A. I. Arroba y Á. M. Valverde, «Modulation of microglia in the retina: new insights into diabetic retinopathy.,» *Acta Diabetol.*, vol. 54, nº 6, pp. 527 - 533, 2017.
- [104] X. X. Zeng, Y. K. Ng y E. A. Ling, «Neuronal and microglial response in the neuroretina of streptozotocin-induced diabetic rats.,» *Vis. Neurosci.*, vol. 17, pp. 463-471, 2000.
- [105] J. G. Grigsby, S. M. Cardona, C. E. Pouw, A. Muniz, A. S. Mendiola, A. T. Tsin, D. M. Allen y A. E. Cardona, «The role of microglia in diabetic retinopathy.,» *J. Ophthalmol.*, nº 705783, 2014.
- [106] K. J. Way, N. Katai y G. L. King, «Protein kinase C and the development of diabetic vascular complications.,» *Diabet. Med.*, vol. 18, pp. 945-959, 2001.
- [107] A. W. Stitt, «The role of advanced glycation in the pathogenesis of diabetic retinopathy.,» *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 75, nº 1, pp. 95 - 108, 2003.
- [108] O. Simó-Servat, C. Hernández y R. Simó, «Usefulness of the vitreous fluid analysis in the translational research of diabetic retinopathy.,» *Mediators Inflamm.*, 2012.
- [109] H. L. Pahl, «Activators and target genes of Rel/NF- $\kappa$ B transcription factors.,» *Oncogene*, vol. 18, nº 49, pp. 6853 - 6866, 1999.
- [110] A. Birbach, P. Gold, B. R. Binder, E. Hofer, R. de Martin y J. A. Schmid, «Signaling molecules of the NF- $\kappa$ B pathway shuttle constitutively between cytoplasm and nucleus.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 277, nº 13, pp. 10842 - 10851, 2002.
- [111] T. J. Kindt, *Inmunología de Kuby*, McGraw-Hill, 2007.
- [112] S. Patel y D. Santani, «Role of NF- $\kappa$ B in the pathogenesis of diabetes and its associated complications.,» *Pharmacol. Rep.*, vol. 61, nº 4, pp. 595 - 603, 2009.
- [113] N. L. Huang, S. H. Chiang, C. H. Hsueh, Y. J. Liang, Y. J. Chen y L. P. Lai, «Metformin inhibits TNF- $\alpha$ -induced I $\kappa$ B kinase phosphorylation, I $\kappa$ B- $\alpha$  degradation and IL-6 production in endothelial cells through PI3K-dependent AMPK phosphorylation.,» *Int. J. Cardiol.*, vol. 134, pp. 169 - 175, 2009.
- [114] P. Bogdanov, J. Sampedro, C. Solà-Adell, O. Simó-Servat, C. Russo, L. Varela-Sende, R. Simó y C. Hernández, «Effects of Liposomal formulation of Citicoline in experimental Diabetes-induced retinal neurodegeneration.,» *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, nº 8, 2018.
- [115] P. Bogdanov, C. Solà-Adell, C. Hernández, M. García-Ramírez, J. Sampedro, O. Simó-Servat, M. Valeri, C. Pasquali y R. Simó, «Calcium dobesilate prevents the oxidative stress and inflammation induced by diabetes in the retina of db/db mice.,» *Journal of Diabetes and its Complications*, vol. 31, nº 10, pp. 1481 - 1490, 2017.
- [116] S. Shanmuganathan y N. Angayarkanni, «Chebulagic acid Chebulinic acid and Gallic acid, the active principles of Triphala, inhibit TNF $\alpha$  induced pro-angiogenic and pro-inflammatory activities in retinal capillary endothelial cells by inhibiting p38, ERK and NF $\kappa$ B phosphorylation.,» *Vascul. Pharmacol.*, vol. 108, pp. 23 - 35, 2018.

- [117] Y. Yin, F. Chen, W. Wang, H. Wang y X. Zhang, «Resolvin D1 inhibits inflammatory response in STZ-induced diabetic retinopathy rats: Possible involvement of NLRP3 inflammasome and NF- $\kappa$ B signaling pathway.,» *Mol. Vis.*, vol. 23, pp. 242 - 250, 2017.
- [118] K. Kaarniranta y A. Salminen, «NF- $\kappa$ B signaling as a putative target for w-3 metabolites in the prevention of age-related macular degeneration (AMD).,» *Experimental Gerontology*, vol. 44, nº 11, pp. 685 - 688, 2009.
- [119] J. Yu, H. Nagasu, T. Murakami, H. Hoang, L. Broderick, H. M. Hoffman y T. Horng, «Inflammasome activation leads to caspase-1-dependent mitochondrial damage and block of mitophagy.,» *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol. 111, nº 43, pp. 15514 - 15519, 2014.
- [120] B. A. Coughlin, D. J. Feenstra y S. Mohr, «Müller cells and diabetic retinopathy.,» *Vision. Res.*, vol. 139, pp. 93 - 100, 2017.
- [121] M. Henricsson y A. Heijl, «The effect of panretinal laser photocoagulation on visual acuity, visual fields and on subjective visual impairment in preproliferative and early proliferative diabetic retinopathy.,» *Acta Ophthalmologica (Copenh.)*, vol. 75, nº 10, pp. 608-610, 1991.
- [122] C. Canning, P. Polkinghorne, A. Ariffin y Z. Gregor, «Panretinal laser photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy: the effect of laser wavelength on macular function.,» *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 75, nº 10, pp. 608-610, 1991.
- [123] M. Subash, O. Comyn, A. Samy, D. Qatarnah, S. Antonakis, M. Mehat y J. Tee et al, «The effect of multispot laser panretinal photocoagulation on retinal sensitivity and driving eligibility in patients with diabetic retinopathy.,» *JAMA Ophthalmol.*, vol. 134, nº 6, pp. 666-672, 2016.
- [124] S. Sivaprasad, P. Hykin, A. T. Prevost, J. Vasconcelos, A. Riddell, J. Ramu, C. Murphy, J. Kelly, R. T. Edwards, S. T. Yeo, J. Bainbridge, D. Hopkins y B. White-Alao, «Intravitreal aflibercept compared with panretinal photocoagulation for proliferative diabetic retinopathy: the CLARITY non-inferiority RCT.,» *NIHR Journals Library*.
- [125] Y. Zhao y R. P. Singh, «The role of anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) in the management of proliferative diabetic retinopathy.,» *Drugs Context.*, vol. 7, nº 212532, 2018.
- [126] Q. D. Nguyen, D. M. Brown y D. M. Mascus et al., «Ranibizumab for diabetic macular edema: results from 2 phase III randomized trials: RISE and RIDE.,» *Ophthalmology*, vol. 119, nº 4, pp. 789-801, 2012.
- [127] J. S. Heier, J. F. Korobelnik y D. M. Brown et al, «Intravitreal aflibercept for diabetic macular edema: 148-week results from the VISTA and VIVID studies.,» *Ophthalmology.*, vol. 123, nº 11, pp. 2376-2385, 2016.
- [128] R. Simó, C. Hernández, M. Porta y e. al., «Effects of Topically Administered Neuroprotective Drugs in Early Stages of Diabetic Retinopathy: Results of the EUROCONDOR Clinical Trial.,» *Diabetes*, vol. 68, nº 2, pp. 457-463, 2019.
- [129] T. Perry y N. H. Greig, «The glucagon-like peptides: a double-edged therapeutic sword?,» *Trends in Pharmacological Sciences*, vol. 24, nº 7, pp. 377 - 383, 2003.
- [130] S. Trapp y J. E. Richards, «The gut hormone glucagon-like peptide-1 produced in brain: is this physiologically relevant?,» *Curr. Opin. Pharmacol.*, vol. 13, nº 6, pp. 964 - 969, 2013.
- [131] M. K. Holt, J. E. Richards, D. R. Cook, D. I. Brierley, D. L. Williams, F. Reimann, F. M. Gribble y S. Trapp, «Preproglucagon neurons in the Nucleus of the Solitary Tract are the main source of brain GLP-1, mediate stress-induced hypophagia, and limit unusually large intakes of food.,» *Diabetes*, vol. 68, nº 1, pp. 21 - 33, 2019.
- [132] M. D. Turton, D. O'Shea, I. Gunn, S. A. Beak, C. M. Edwards, K. Meeran, S. J. Choi, G. M. Taylor, M. M. Heath, P. D. Lambert, J. P. Wilding, D. M. Smith, M. A. Ghatei, J. Herbert y S. R. Bloom, «A role for glucagon-like peptide 1 in the central regulation of feeding.,» *Nature*, vol. 379, pp. 69 - 72, 1996.
- [133] T. Perry, D. K. Lahiri, D. Chen, J. Zhou, K. T. Shaw, J. M. Egan y N. H. Greig, «A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: A promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells.,» *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 300, pp. 958 - 966, 2002.
- [134] D. J. Drucker y M. A. Nauck, «The incretin system: glucagon-like peptide-1 receptor agonists and dipeptidyl peptidase-4 inhibitors in type 2 diabetes.,» *Lancet*, vol. 368, pp. 1696 - 1705, 2006.
- [135] J. J. Holst, T. Vilsboll y C. F. Deacon, «The incretin system and its role in type 2 diabetes mellitus.,» *Mol. Cell. Endocrinol.*, vol. 297, pp. 127 - 136, 2009.

- [136] M. Nauck, F. Stockmann, R. Ebert y W. Creutzfeldt, «Reduced incretin effect in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes.,» *Diabetologia*, vol. 29, pp. 46 - 52, 1986.
- [137] J. Malik y N. Roohi, «GLP-1, a powerful physiological incretin: an update.,» *J. Biol. Regul. Homeost. Agents*, vol. 32, nº 5, pp. 1171 - 1176, 2018.
- [138] C. B. G. Salinas, T. T. Lu, S. Gabery, K. Marstal, T. Alanentalo, A. J. Mercer, A. Cornea, K. Conradsen, J. Hecksher-Sørensen, A. B. Dahl, L. B. Knudsen y A. Secher, «Integrated brain atlas for unbiased mapping of nervous system effects following liraglutide treatment.,» *Sci. Rep.*, vol. 8, nº 1, 2018.
- [139] A. Secher, J. Jelsing, A. F. Baquero, J. Hecksher-Sørensen, M. A. Cowley, L. S. Dalbøge, G. Hansen, K. L. Grove, C. Pyke, K. Raun, L. Schäffer, M. Tang-Christensen, S. Verma, B. M. Witgen, N. Vrang y L. Bjerre Knudsen, «The arcuate nucleus mediates GLP-1 receptor agonist liraglutide-dependent weight loss.,» *J. Clin. Invest.*, vol. 124, nº 10, pp. 4473 - 4488, 2014.
- [140] R. Goke, P. J. Larsen, J. D. Mikkelsen y S. P. Sheikh, «Distribution of GLP-1 binding sites in the rat brain: Evidence that exendin-4 is a ligand of brain GLP-1 binding sites.,» *Eur. J. Neurosci.*, vol. 7, pp. 2294 - 2300, 1995.
- [141] F. Satoh, S. A. Beak, C. J. Small, M. Falzon, M. A. Ghatei, S. R. Bloom y D. M. Smith, «Characterization of human and rat glucagon-like peptide-1 receptors in the neurointermediate lobe: Lack of coupling to either stimulation or inhibition of adenylyl cyclase.,» *Endocrinology*, vol. 141, pp. 1301 - 1309, 2000.
- [142] L. L. Baggio y D. J. Drucker, «Biology of incretins: GLP-1 and GIP.,» *Gastroenterology*, vol. 132, pp. 2131 - 2157, 2007.
- [143] G. X., «The CNS glucagon-like peptide-2 receptor in the control of energy balance and glucose homeostasis.,» *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, vol. 307, nº 6, pp. 585 - 596, 2014.
- [144] C. Hernández, P. Bogdanov, L. Corraliza, M. García-Ramírez, C. Solà-Adell, J. A. Arranz, A. I. Arroba, A. M. Valverde y R. Simó, «Topical administration of GLP-1 receptor agonists prevents retinal neurodegeneration in experimental diabetes.,» *Diabetes*, vol. 65, pp. 172 - 187, 2016.
- [145] Y. Zhang, J. Zhang, Q. Wang y e. al., «Intravitreal injection of exendin-4 analogue protects retinal cells in early diabetic rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52:278– 285».
- [146] M. Hao, H. Y. Kuang, Z. Fu, X. Y. Gao, Y. Liu y W. Deng, «Exenatide prevents high-glucose-induced damage of retinal ganglion cells through a mitochondrial mechanism.,» *Neurochem. Int.*, vol. 61, nº 1, pp. 1 - 6, 2012.
- [147] A. Puddu, R. Sanguineti, F. Montecucco y G. L. Viviani, «Retinal pigment epithelial cells express a functional receptor for glucagon-like peptide-1 (GLP-1).,» *Mediators Inflamm.*, vol. 975032, 2013.
- [148] D. I. Kim, M. J. Park, J. H. Choi, S. K. Lim, H. J. Choi y S. H. Park, «Hyperglycemia-induced GLP-1R downregulation causes RPE cell apoptosis.,» *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 59, pp. 41 - 51, 2015.
- [149] Y. Zhang, Q. Wang, J. Zhang, X. Lei, G. Xu y W. Ye, «Protection of exendin-4 analogue in early experimental diabetic retinopathy.,» *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 247, pp. 699 - 706, 2009.
- [150] F. A. J., G. Omar, N. Walton, T. Verrill y C. Unson, «Glucagon-expressing neurons within the retina regulate the proliferation of neural progenitors in the circumferential marginal zone of the avian eye.,» *The Journal of Neuroscience*, vol. 25, nº 44, p. 10157 – 10166, 2005.
- [151] J. Hebsgaard, C. Pyke, E. Yildirim, L. Knudsen, S. Heegaard y P. Kvist, «Glucagon-like peptide-1 receptor expression in the human eye.,» *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 20, nº 9, pp. 2304 - 2308, 2018.
- [152] R. Simó y C. Hernández, «Glucagon-like peptide-1 receptor expression in the human eye.,» *Diabetes Obes Metab.*, vol. 21, nº 2, pp. 446-447, 2019.
- [153] V. Guglielmi y P. Sbraccia, «GLP-1 receptor independent pathways: emerging beneficial effects of GLP-1 breakdown products.,» *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity.*, vol. 22, nº 2, p. 231 – 240, 2016.
- [154] J. A. Windeløv, N. J. Wewer Albrechtsen, R. E. Kuhre, S. L. Jepsen, D. Hornburg, J. Pedersen, E. P. Jensen, K. D. Galsgaard, M. Winther-Sørensen, A. Ørgaard, C. F. Deacon, M. Mann, H. B. Kissow y J. J. Holst, «Why is it so difficult to measure glucagon-like peptide-1 in a mouse?,» *Diabetologia*, vol. 60, nº 10, pp. 2066 - 2075, 2017.
- [155] M. Packer, «Augmentation of glucagon-like peptide-1 receptor signalling by neprilysin inhibition: potential implications for patients with heart failure.,» *Eur. J. Heart Fail.*, vol. 20, nº 6, pp. 973 - 977, 2018.

- [156] A. Plamboeck, J. J. Holst, R. D. Carr y C. F. Deacon, «Neutral endopeptidase 24.11 and dipeptidyl peptidase IV are both mediators of the degradation of glucagon-like peptide 1 in the anaesthetised pig.,» *Diabetologia*, vol. 48, pp. 1882 - 1890, 2005.
- [157] K. Hupe-Sodmann, G. P. McGregor, R. Bridenbaugh, R. Göke, B. Göke, H. Thole, B. Zimmermann y K. Voigt, «Characterisation of the processing by human neutral endopeptidase 24.11 of GLP-1(7–36) amide and comparison of the substrate specificity of the enzyme for other glucagon-like peptides.,» *Regul. Pept.*, vol. 58, pp. 149 - 156, 1995.
- [158] «GLP-1 receptor independent pathways: emerging beneficial effects of GLP-1 breakdown products.,» *Eating and Weight Disorders - Studies on Anorexia, Bulimia and Obesity.*, vol. 22, nº 2, p. 231 – 240, 2016.
- [159] K. Ban, M. H. Noyan-Ashraf, J. Hofer, S. S. Bolz, D. J. Drucker y M. Husain, «Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways.,» *Circulation*, vol. 117, pp. 2340 - 2350, 2008.
- [160] K. Ban, K. H. Kim, C. K. Cho, M. Sauvé, E. P. Diamandis, P. H. Backx, D. J. Drucker y M. Husain, «Glucagon-like peptide (GLP)-1(9–36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9–39) yet does not require the known GLP-1 receptor.,» *Endocrinology*, vol. 151, pp. 1520 - 1531, 2010.
- [161] D. A. Sandoval y D. A. D'Alessio, «Physiology of proglucagon peptides: role of glucagon and GLP-1 in health and disease.,» *Physiol. Rev.*, vol. 95, pp. 513 - 548, 2015.
- [162] J. J. Meier, A. Gethmann, M. A. Nauck, O. Götz, F. Schmitz, C. F. Deacon, B. Gallwitz, W. E. Schmidt y J. J. Holst, «The glucagon-like peptide-1 metabolite 337 GLP-1-(9-36) amide reduce postprandial glycemia independently of gastric emptying and insulin secretion in humans.,» *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 290, pp. 1118 - 1123, 2006.
- [163] K. Ban, M. H. Noyan-Ashraf, J. Hofer, S. S. Bolz, D. J. Drucker y M. Husain, «Cardioprotective and vasodilatory actions of glucagon-like peptide 1 receptor are mediated through both glucagon-like peptide 1 receptor-dependent and -independent pathways.,» *Circulation*, vol. 117, nº 18, p. 2340 – 2350, 2008.
- [164] D. P. Sonne, T. Engstrøm y M. Treiman, «Protective effects of GLP-1 analogues exendin-4 and GLP-1(9–36) amide against ischemia–reperfusion injury in rat heart.,» *Regul. Pept.*, vol. 146, pp. 243 - 249, 2008.
- [165] R. E. Kuc, J. J. Maguire, K. Siew, S. Patel, D. R. Derksen, V. Margaret Jackson, K. M. O'Shaughnessey y A. P. Davenport, «Characterization of [<sup>125</sup>I]GLP-1(9-36), a novel radiolabeled analog of the major metabolite of glucagon-like peptide 1 to a receptor distinct from GLP1-R and function of the peptide in murine aorta.,» *Life Sci.*, vol. 102, nº 2, pp. 134 - 138, 2014.
- [166] L. A. Nikolaidis, D. Elahi, Y. T. Shen y R. P. Shannon, «Active metabolite of GLP-1 mediates myocardial glucose uptake and improves left ventricular performance in conscious dogs with dilated cardiomyopathy.,» *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, vol. 289, pp. 401 - 408, 2005.
- [167] K. Ban, K. H. Kim, C. K. Cho, M. Sauvé, E. P. Diamandis, P. H. Backx, D. J. Drucker y M. Husain, «Glucagon-like peptide (GLP)-1(9–36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9–39) yet does not require the known GLP-1 receptor.,» *Endocrinology*, vol. 151, pp. 1520 - 1531, 2010.
- [168] S. M. Day, W. Yang, S. Ewin, X. Zhou y T. Ma, «Glucagon-like peptide-1 cleavage product GLP-1 (9-36) amide enhances hippocampal long-term synaptic plasticity in correlation with suppression of Kv4.2 expression and eEF2 phosphorylation.,» *Hippocampus*, vol. 27, nº 12, pp. 1264 -1274, 2017.
- [169] T. Ma, X. Du, J. E. Pick, G. Sui, M. Brownlee y E. Klann, «Glucagon-like peptide-1 cleavage product GLP-1(9–36) amide rescues synaptic plasticity and memory deficits in Alzheimer's disease model mice.,» *J. Neurosci.*, vol. 32, nº 40, p. 13701 – 13708, 2012.
- [170] E. Tomas, V. Stanojevic y J. F. Habener, «GLP-1-derived nonapeptide GLP-1(28–36)amide targets to mitochondria and suppresses glucose production and oxidative stress in isolated mouse hepatocytes.,» *Regulatory Peptides*, vol. 167, pp. 177 - 184, 2011.
- [171] Q. Ji, «Treatment strategy for type 2 diabetes with obesity: Focus on glucagon-like peptide-1 receptor agonists.,» *Clin. Ther.*, vol. 39, nº 6, pp. 1244 - 1264, 2017.
- [172] M. A. Bethel, R. A. Patel, P. Merrill, Y. Lokhnygina, J. B. Buse, R. J. Mentz, N. J. Pagidipati, J. C. Chan, S. M. Gustavson, N. Iqbal, A. P. Maggioni, P. Öhman, N. R. Poulter, A. Ramachandran, B. Zinman, A. F. Hernandez, R. R. Holman y E. S. Group, «Cardiovascular outcomes with glucagon-like peptide-1 receptor agonists in patients with type 2 diabetes: a meta-analysis.,» *Lancet Diabetes Endocrinol.*, vol. 6, nº 2, pp. 105 - 113, 2017.

- [173] D. X. Brown y M. Evans, «Choosing between GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors: A pharmacological perspective.,» *Journal of Nutrition and Metabolism*, vol. 2012, nº 381713, 2012.
- [174] D. Dicker, «DPP-4 inhibitors: impact on glycemic control and cardiovascular risk factors.,» *Diabetes care*, vol. 34, pp. 276 - 278, 2011.
- [175] M. E. Doyle y J. M. Egan, «Mechanisms of action of glucagon-like peptide 1 in the pancreas.,» *Pharmacol. Ther.*, vol. 113, nº 3, pp. 546 - 593, 2007.
- [176] J. I. Hwang, S. Yun, M. J. Moon, C. R. Park y J. Y. Seong, «Molecular evolution of GPCRs: GLP-1/ GLP-1 receptors.,» *J. Mol. Endocrinol.*, vol. 52, nº 3, pp. 15 - 27, 2014.
- [177] B. D. Green, V. A. Gault, P. R. Flatt, P. Harriott, B. Greer y F. P. O'Harte, «Comparative effects of GLP-1 and GIP on cAMP production, insulin secretion, and in vivo antidiabetic actions following substitution of Ala8/Ala2 with 2-aminobutyric acid.,» *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 428, pp. 136 - 143, 2004.
- [178] T. Tsuboi, X. G. da Silva, G. G. Holz, L. S. Jouaville, A. P. Thomas y G. A. Rutter, «Glucagon-like peptide-1 mobilizes intracellular Ca<sup>2+</sup> and stimulates mitochondrial ATP synthesis in pancreatic MIN6 beta-cells.,» *Biochem. J.*, vol. 369, pp. 287 - 299, 2003.
- [179] M. R. Walton y I. Dragnow, «Is CREB a key to neuronal survival?,» *Trends Neurosci.*, vol. 23, pp. 48 - 53, 2000.
- [180] K. Du y M. Montminy, «CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB.,» *J Biol Chem.*, vol. 273, nº 49, pp. 32377 - 32379, 1998.
- [181] H. Hui, A. Nourparvar, X. Zhao y R. Perfetti, «Glucagon-like peptide-1 inhibits apoptosis of insulin-secreting cells via a cyclic 5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase A- and a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway.,» *Endocrinology*, vol. 144, nº 4, pp. 1444 - 1455, 2003.
- [182] Q. Wang y P. L. Brubaker, «Glucagon-like peptide-1 treatment delays the onset of diabetes in 8 week-old db/db mice.,» *Diabetologia*, vol. 45, p. 1263 - 1273, 2002.
- [183] X. Wu, S. Li, P. Xue y Y. Li, «Liraglutide, a GLP-1Ra, facilitates osteogenic proliferation and differentiation in MC3T3-E1 cells through PI3K/protein kinase B (AKT), ERK1/2, and cAMP/PKA signaling pathways involving  $\beta$ -catenin.,» *Exp. Cell. Res.*, vol. 360, nº 2, pp. 281 - 291, 2017.
- [184] L. Gao, S. L. Li y Y. K. Li, «Liraglutide Promotes the Osteogenic Differentiation in MC3T3-E1 Cells Via Regulating the Expression of Smad2/3 Through PI3K/Akt and Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathways.,» *DNA Cell. Biol.*, 2018.
- [185] J. Meng, X. Ma, N. Wang, M. Jia, L. Bi, Y. Wang, M. Li, H. Zhang, X. Xue, Z. Hou, Y. Zhou, Z. Yu, G. He y X. Luo, «Activation of GLP-1 Receptor Promotes Bone Marrow Stromal Cell Osteogenic Differentiation through  $\beta$ -Catenin.,» *Stem Cell Reports.*, vol. 6, nº 4, pp. 579 - 591, 2016.
- [186] X. Ye, S. Cheng, Y. Dong, J. Ren, L. Su, J. Liu, J. Zhou, Q. Liu y N. Zhu, «Exendin-4 promotes proliferation of adipose-derived stem cells through PI3K/Akt-Wnt signaling pathways.,» *Neurosci. Lett.*, vol. 685, pp. 196 - 202, 2018.
- [187] Y. Ying, H. Zhu, Z. Liang, X. Ma y S. Li, «GLP1 protects cardiomyocytes from palmitate-induced apoptosis via Akt/GSK3b/ $\beta$ -catenin pathway.,» *Journal of Molecular Endocrinology.*, vol. 55, nº 3, pp. 245 - 262, 2015.
- [188] M. Abbasi, V. Gupta, N. Chitranshi, Y. You, Y. Dheer, M. Mirzaei y S. Graham, «Regulation of brain-derived neurotrophic factor and growth factor signaling pathways by tyrosine phosphatase Shp2 in the retina: A brief review.,» *Front. Cell. Neurosci.*, vol. 12, nº 85, pp. 1 - 10, 2018.
- [189] N. Nakano, S. Matsuda, M. Ichimura, A. Minami, M. Ogino, T. Murai y Y. Kitagishi, «PI3K/AKT signaling mediated by G protein coupled receptors is involved in neurodegenerative Parkinson's disease.,» *Int. J. Mol. Med.*, vol. 39, nº 2, pp. 253 - 260, 2017.
- [190] J. Y. Ahn, «Neuroprotection signaling of nuclear akt in neuronal cells.,» *Exp. Neurobiol.*, vol. 23, nº 3, pp. 200 - 206, 2014.
- [191] D. Heras-Sandoval, J. Pérez-Rojas, J. Hernández-Damián y J. Pedraza-Chaverri, «The role of PI3K/AKT/mTOR pathway in the modulation of autophagy and the clearance of protein aggregates in neurodegeneration.,» *Cell Signal.*, vol. 26, nº 12, pp. 2694 - 2701, 2014.
- [192] A. Barber, M. Nakamura, E. Wolpert, C. Reiter, G. Seigel, D. Antonetti y T. Gardner, «Insulin rescues retinal neurons from apoptosis by a phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-mediated mechanism that reduces the activation of caspase-3.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 276, pp. 32814 - 32821, 2001.

- [193] A. Rajala, V. K. Gupta, R. E. Anderson y R. V. Rajala, « Light activation of the insulin receptor regulates mitochondrial hexokinase. A possible mechanism of retinal neuroprotection.,» *Mitochondrion*, vol. 13, nº 6, pp. 566 - 576, 2013.
- [194] D. R. Plas, S. Talapatra, A. L. Edinger, J. C. Rathmell y C. B. Thompson, «Akt and Bcl-xL promote growth factor-independent survival through distinct effects on mitochondrial physiology.,» *J Biol Chem.*, vol. 13, nº 276, pp. 12041-12048, 2001.
- [195] S. R. Datta, A. Brunet y M. E. Greenberg, «Cellular survival: a play in three Akts.,» *Genes & Development*, vol. 13, pp. 2905 - 2927, 1999.
- [196] M. Grieco, A. Giorgi, M. Gentile y e. al., « Glucagon-Like Peptide-1: A Focus on Neurodegenerative Diseases.,» *Front Neurosci.*, vol. 13, 2019.
- [197] H. C., «Novel dual GLP-1/GIP receptor agonists show neuroprotective effects in Alzheimer's and Parkinson's disease models.,» *Neuropharmacology*, vol. 136, pp. 251-259, 2018.
- [198] A. Harkavyi y P. S. Whitton, «Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation as a means of neuroprotection.,» *Br. J. Pharmacol.*, vol. 159, p. 495 – 501, 2010.
- [199] D. Athauda y T. Foltynie, «The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action.,» *Drug Discovery Today.*, vol. 21, nº 5, pp. 802-818, 2016.
- [200] C. Muller, N. W. Cheung, H. Dewey, L. Churilov, S. Middleton, V. Thijs, E. I. Ekinci, C. Levi, R. Lindley, G. Donnan, M. Parsons y C. Bladin, «Treatment with exenatide in acute ischemic stroke trial protocol: A prospective, randomized, open label, blinded end-point study of exenatide vs. standard care in post stroke hyperglycemia.,» *Int. J. Stroke*, vol. 13, nº 8, pp. 857 - 862, 2018.
- [201] Y. Li, T. Perry, M. S. Kindy, B. K. Harvey, D. Tweedie, H. W. Holloway, K. Powers, H. Shen, J. M. Egan, K. Sambamurti, A. Brossi, D. K. Lahiri, M. P. Mattson, B. J. Hoffer, Y. Wang y N. H. Greig, «GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism.,» *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, p. 1285 –1290., 2009.
- [202] M. Wiciński, M. Socha, B. Malinowski, E. Wódkiewicz, M. Walczak, K. Górski, M. Słupski y K. Pawlak-Osińska, «Liraglutide and its Neuroprotective Properties-Focus on Possible Biochemical Mechanisms in Alzheimer's Disease and Cerebral Ischemic Events.,» *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 20, nº 5, 2019 .
- [203] H. H. Hansen, K. Fabricius, P. Barkholt, M. L. Niehoff, J. E. Morley, J. Jelsing, C. Pyke, L. B. Knudsen, S. A. Farr y N. Vrang, «The GLP-1 Receptor agonist liraglutide improves memory function and increases hippocampal CA1 neuronal numbers in a senesce-accelerated mouse model of Alzheimer's disease.,» *J. Alzheimers Dis.*, vol. 46, pp. 877 - 888, 2015.
- [204] P. L. McClean y C. Holscher, «Lixisenatide, a drug developed to treat type 2 diabetes, shows neuroprotective effects in a mouse model of Alzheimer's disease.,» *Neuropharmacology*, vol. 86, pp. 241 - 258, 2014.
- [205] T. Li, J. J. Jiao, C. Hölscher, M. N. Wu, J. Zhang, J. Q. Tong, X. F. Dong, X. S. Qu, Y. Cao, H. Y. Cai, Q. Su y J. S. Qi, «A novel GLP-1/GIP/Gcg triagonist reduces cognitive deficits and pathology in the 3xTg mouse model of Alzheimer's disease.,» *Hippocampus.*, vol. 28, nº 5, pp. 358 - 372, 2018.
- [206] X. Wang, L. Wang, R. Jiang, Y. Yuan, Q. Yu y Y. Li, «Exendin-4 antagonizes A $\beta$ 1–42-induced suppression of long-term potentiation by regulating intracellular calcium homeostasis in rat hippocampal neurons.,» *Brain Res.*, vol. 1627, pp. 101 - 108, 2015.
- [207] P. L. McClean y C. Holscher, « Liraglutide can reverse memory impairment, synaptic loss and reduce plaque load in aged APP/PS1 mice, a model of Alzheimer's disease.,» *Neuropharmacology*, vol. 76, pp. 57 - 67, 2014.
- [208] H. Y. Cai, Z. J. Wang, C. Holscher, L. Yuan, J. Zhang, P. Sun, J. Li, W. Yang, M. N. Wu y J. S. Qi, « Lixisenatide attenuates the detrimental effects of amyloid  $\beta$  protein on spatial working memory and hippocampal neurons in rats.,» *Behav. Brain Res.*, 2017.
- [209] X. Y. Liu, L. X. Wang, Z. Chen y L. B. Liu, « Liraglutide prevents  $\beta$ -amyloid-induced neurotoxicity in SH-SY5Y cells via a PI3K-dependent signaling pathway.,» *Neurol. Res.*, vol. 38, pp. 313 - 319, 2016.
- [210] D. S. Kim, H. I. Choi, Y. Wang, Y. Luo, B. J. Hoffer y N. H. Greig, «A New Treatment Strategy for Parkinson's Disease through the Gut-Brain Axis: The Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Pathway.,» *Cell Transplant.*, vol. 26, nº 9, pp. 1560 - 1571, 2017.

- [211] D. Athauda y T. Foltynie, «The glucagon-like peptide 1 (GLP) receptor as a therapeutic target in Parkinson's disease: mechanisms of action.,» *Drug Discov. Today.* , vol. 21, nº 5, pp. 802 - 818, 2016.
- [212] H. Xiong, C. Zheng, J. Wang, J. Song, G. Zhao, H. Shen y Y. Deng, «The neuroprotection of liraglutide on Alzheimer-like learning and memory impairment by modulating the hyperphosphorylation of tau and neurofilament proteins and insulin signaling pathways in mice.,» *J. Alzheimers Dis.* , vol. 37, pp. 623 - 635, 2013.
- [213] H. H. Hansen, P. Barkholt, K. Fabricius, J. Jelsing, D. Terwel, C. Pyke, L. B. Knudsen y N. Vrang, «The GLP-1 receptor agonist liraglutide reduces pathology-specific tau phosphorylation and improves motor function in a transgenic hTauP301L mouse model.,» *Brain Res.* , vol. 1634, pp. 158 - 170, 2016.
- [214] L. Zhang, L. Zhang, L. Li y C. Hölscher, «Semaglutide is Neuroprotective and Reduces  $\alpha$ -Synuclein Levels in the Chronic MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease.,» *J. Parkinsons Dis.* , vol. 9, nº 1, pp. 157 - 171, 2019.
- [215] Y. Li, T. Perry, M. S. Kindy, B. K. Harvey, D. Tweedie, H. W. Holloway, K. Powers, H. Shen, J. M. Egan, K. Sambamurti, A. Brossi, D. K. Lahiri, M. P. Mattson, B. J. Hoffer, Y. Wang y N. H. Greig, «GLP-1 receptor stimulation preserves primary cortical and dopaminergic neurons in cellular and rodent models of stroke and Parkinsonism.,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, nº 4, pp. 1285 - 1290, 2009.
- [216] S. Kim, M. Moon y S. Park, «Exendin-4 protects dopaminergic neurons by inhibition of microglial activation and matrix metalloproteinase-3 expression in an animal model of Parkinson's disease.,» *J. Endocrinol.*, vol. 202, pp. 431 - 439, 2009.
- [217] M. Bomba, A. Granzotto, V. Castelli, N. Massetti, E. Silvestri, L. M. T. Canzoniero, A. Cimini y S. L. Sensi, «Exenatide exerts cognitive effects by modulating the BDNF-TrkB neurotrophic axis in adult mice.,» *Neurobiol. Aging.* , vol. 64, pp. 33 - 43, 2018.
- [218] M. Bomba, D. Ciavardelli, E. Silvestri, L. M. Canzoniero, R. Lattanzio, P. Chiappini, M. Piantelli, C. Di Ilio, A. Consoli y S. L. Sensi, «Exenatide promotes cognitive enhancement and positive brain metabolic changes in PS1-KI mice but has no effects in 3xTg-AD animals.,» *Cell Death Dis.* , vol. 4, 2013.
- [219] H. Zhu, Y. Zhang, Z. Shi, D. Lu, T. Li, Y. Ding, Y. Ruan y A. Xu, «The neuroprotection of liraglutide against ischaemia-induced apoptosis through the activation of the PI3K/AKT and MAPK pathways.,» *Sci. Rep.* , vol. 6, nº 26859, 2016.
- [220] W. Dong, Y. Miao, A. Chen, M. Cheng, X. Ye, F. Song y G. Zheng, «Delayed administration of the GLP-1 receptor agonist liraglutide improves metabolic and functional recovery after cerebral ischemia in rats.,» *Neurosci. Lett.* , vol. 641, pp. 1 - 7, 2017.
- [221] G. Bertilsson, C. Patrone, O. Zachrisson, A. Andersson, K. Dannaeus, J. Heidrich, J. Kortessmaa, A. Mercer, E. Nielsen, H. Rönholm y L. Wikström, «Peptide hormone exendin-4 stimulates subventricular zone neurogenesis in the adult rodent brain and induces recovery in an animal model of Parkinson's disease.,» *J. Neurosci. Res.*, vol. 86, nº 2, pp. 326 -338, 2008.
- [222] A. Harkavyi, A. Abuirmeileh, R. Lever, A. E. Kingsbury, C. S. Biggs y P. S. Whitton, «Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease.,» *J. Neuroinflammation*, vol. 5, nº 19, 2008.
- [223] T. Perry, D. K. Lahiri, D. Chen, J. Zhou, K. T. Shaw, J. M. Egan y N. H. Greig, «A novel neurotrophic property of glucagon-like peptide 1: A promoter of nerve growth factor-mediated differentiation in PC12 cells.,» *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 300, pp. 958 - 966, 2002.
- [224] T. Perry, N. J. Haughey, M. P. Mattson, J. M. Egan y N. H. Greig, «Protection and reversal of excitotoxic damage by glucagon-like peptide-1 and exendin-4.,» *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, vol. 302, pp. 881 - 888, 2002.
- [225] T. Perry, D. K. Lahiri, K. Sambamurti, D. Chen, M. P. Mattson, J. M. Egan y N. H. Greig, «Glucagon-like peptide-1 decreases endogenous amyloid-beta peptide (A $\beta$ ) levels and protects hippocampal neurons from death induced by A $\beta$  and iron.,» *J. Neurosci. Res.* , vol. 72, nº 5, pp. 603 - 612, 2003 .
- [226] W. D. Porter, P. R. Flatt, C. Hölscher y V. A. Gault, «Liraglutide improves hippocampal synaptic plasticity associated with increased expression of Mash1 in ob/ob mice.,» *Int. J. Obes.*, vol. 37, pp. 678 - 684, 2013.
- [227] J. L. Yang, W. Chen, Y. P. Chen, C. Y. Kuo y S. D. Chen, «Activation of GLP-1 receptor enhances neuronal base excision repair via PI3K-AKT-induced expression of apurinic/apyrimidinic endonuclease 1.,» *Theranostics* , vol. 6, pp. 2015 - 2027, 2016.

- [228] Y. Liu y N. Shao, «Protection of exenatide for retinal ganglion cells with different glucose concentrations.,» *Peptides*, vol. 37, pp. 25 - 31, 2012.
- [229] Y. Zeng, K. Yang, F. Wang y e. al., «The glucagon like peptide 1 analogue, exendin4, attenuates oxidative stress-induced retinal cell death in early diabetic rats through promoting Sirt1 and Sirt3 expression.,» *Exp. Eye Res.*, vol. 151, p. 203 – 211, 2016.
- [230] Y. Fan, K. Liu, Q. Wang, Y. Ruan, Y. Zhang y W. Ye, «Exendin-4 protects retinal cells from early diabetes in Goto-Kakizaki rats by increasing the Bcl-2/Bax and Bcl-xL/Bax ratios and reducing reactive gliosis.,» *Mol. Vis.*, vol. 20, p. 1557 – 1568, 2014.
- [231] Y. Zhang, Q. Wang, J. Zhang, X. Lei, G. T. Xu y W. Ye, «Protection of exendin-4 analogue in early experimental diabetic retinopathy.,» *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 247, pp. 699 - 706, 2009.
- [232] Y. Fan, K. Liu, Q. Wang, Y. Ruan, W. Ye y Y. Zhang, «Exendin-4 alleviates retinal vascular leakage by protecting the blood-retinal barrier and reducing retinal vascular permeability in diabetic Goto-Kakizaki rats.,» *Exp. Eye Res.*, vol. 127, pp. 104 - 116, 2014.
- [233] X. Shu, Y. Zhang, M. Li, X. Huang, Y. Yang, J. Zeng, Y. Zhao, X. Wang, W. Zhang y Y. Ying, «Topical ocular administration of the GLP-1 receptor agonist liraglutide arrests hyperphosphorylated tau-triggered diabetic retinal neurodegeneration via activation of GLP-1R/Akt/GSK3 $\beta$  signaling.,» *Neuropharmacology*, vol. 20, n $^{\circ}$  153, pp. 1 - 12, 2019.
- [234] Y. Zhao, Y. Xie y W. Li, «Liraglutide exerts potential anti-inflammatory effect in type 1 diabetes by inhibiting ifn- $\gamma$  production via suppressing JAK-STAT pathway.,» *Endocr. Metab. Immune Disord. Drug Targets.*, 2019.
- [235] Y. Diz-Chaves, L. Toba, J. Fandiño, L. C. González-Matías, L. M. Garcia-Segura y F. Mallo, «The GLP-1 analog, liraglutide prevents the increase of proinflammatory mediators in the hippocampus of male rat pups submitted to maternal perinatal food restriction.,» *J. Neuroinflammation.*, vol. 15, n $^{\circ}$  1, p. 337, 2018.
- [236] M. Wolak, T. Staszewska, M. Juszcak, M. Galdyszyńska y E. Bojanowska, «Anti-inflammatory and pro-healing impacts of exendin-4 treatment in Zucker diabetic rats: Effects on skin wound fibroblasts.,» *Eur. J. Pharmacol.*, vol. 842, pp. 262 - 269, 2019.
- [237] M. Dorecka, K. Siemianowicz, T. Francuz, W. Garczorz, A. Chyra, A. Klych y W. Romaniuk, «Exendin-4 and GLP-1 decreases induced expression of ICAM-1, VCAM-1 and RAGE in human retinal pigment epithelial cells.,» *Pharmacol. Rep.*, vol. 65, n $^{\circ}$  4, pp. 884 - 890, 2013.
- [238] P. Chen, X. Xu, L. Lin, Y. Yu, S. Chen, X. Chen y Z. Shao, «Treatment with liraglutide, a glucagon-like peptide-1 analogue, improves effectively the skin lesions of psoriasis patients with type 2 diabetes: a prospective cohort study.,» *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 2019.
- [239] M. Buysschaert, M. Baeck, V. Preumont, L. Marot, E. Hendrickx, A. Van Belle y L. Dumoutier, «Improvement of psoriasis during glucagon -like peptide-1 analogue therapy in type 2 diabetes is associated with decreasing dermal  $\gamma\delta$  T-cell number: a prospective case-series study.,» *Br. J. Dermatol.*, vol. 171, n $^{\circ}$  1, pp. 155 - 161, 2014.
- [240] G. Rakipovski, B. Rolin, J. Nøhr, I. Klewe, K. S. Frederiksen, R. Augustin, J. Hecksher-Sørensen, C. Ingvorsen, J. Poley-Wolf y L. B. Knudsen, «The GLP-1 analogs Liraglutide and Semaglutide reduce atherosclerosis in ApoE $^{-/-}$  and LDLr $^{-/-}$  mice by a mice by a mechanism that includes inflammatory pathways.,» *J.A.C.C. Basic Transl. Sci.*, vol. 3, n $^{\circ}$  6, pp. 844 - 857, 2018.
- [241] Y. Cai, X. Hu, B. Yi, T. Zhang y Z. Wen, «Glucagon-like peptide-1 receptor agonist protects against hyperglycemia-induced cardiocytes injury by inhibiting high mobility group box 1 expression.,» *Mol. Biol. Rep.*, vol. 39, pp. 10705 - 10711, 2012.
- [242] H. Chen, D. Simar, K. Pegg, S. Saad, C. Palmer y M. J. Morris, «Exendin-4 is effective against metabolic disorders induced by intrauterine and postnatal overnutrition in rodents.,» *Diabetologia.*, vol. 57, pp. 614 - 622, 2014.
- [243] C. Daousi, J. H. Pinkney, J. Cleator, J. P. Wilding y L. R. Ranganath, «Acute peripheral administration of synthetic human GLP-1 (7-36 amide) decreases circulating IL-6 in obese patients with type 2 diabetes mellitus: A potential role for GLP-1 in modulation of the diabetic pro-inflammatory state?,» *Regul. Pept.*, vol. 183, pp. 54 - 61, 2013.

- [244] H. Chen, D. Simar, K. Pegg, S. Saad, C. Palmer y M. J. Morris, «Exendin-4 is effective against metabolic disorders induced by intrauterine and postnatal overnutrition in rodents.,» *Diabetologia.*, vol. 57, pp. 614 - 622, 2014.
- [245] T. Kim Chung le, T. Hosaka, M. Yoshida, N. Harada, H. Sakaue, T. Sakai y Y. Nakaya, «Exendin-4, a GLP-1 receptor agonist, directly induces adiponectin expression through protein kinase A pathway and prevents inflammatory adipokine expression.,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 390, pp. 613 - 618, 2009.
- [246] V. Parthasarathy y C. Hölscher, «The type 2 diabetes drug liraglutide reduces chronic inflammation induced by irradiation in the mouse brain.,» *Eur. J. Pharmacol.* , vol. 700, pp. 42 - 50, 2013.
- [247] Y. Lee, M. S. Park, J. S. Choung, S. S. Kim, H. H. Oh, C. S. Choi, S. Y. Ha, Y. Kang, Y. Kim y H. S. Jun, «Glucagon-like peptide-1 inhibits adipose tissue macrophage infiltration and inflammation in an obese mouse model of diabetes.,» *Diabetologia.*, vol. 55, nº 9, pp. 2456 - 2468, 2012.
- [248] Y. Hattori, T. Jojima, A. Tomizawa, H. Satoh, S. Hattori, K. Kasai y T. Hayashi, «A glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analogue, liraglutide, upregulates nitric oxide production and exerts anti-inflammatory action in endothelial cells.,» *Diabetologia*, vol. 53, pp. 2256 - 2263, 2010.
- [249] R. Kodera, K. Shikata, H. U. Kataoka, T. Takatsuka, S. Miyamoto, M. Sasaki, N. Kajitani, S. Nishishita, K. Sarai, D. Hirota y e. al., «Glucagon-like peptide-1 receptor agonist ameliorates renal injury through its anti-inflammatory action without lowering blood glucose level in a rat model of type 1 diabetes.,» *Diabetologia.* , vol. 54, pp. 965 - 978, 2011.
- [250] A. Shiraki, J. Oyama, H. Komoda, M. Asaka, A. Komatsu, M. Sakuma, K. Kodama, Y. Sakamoto, N. Kotooka y T. e. a. Hirase, «The glucagon-like peptide 1 analog liraglutide reduces TNF- $\alpha$ -induced oxidative stress and inflammation in endothelial cells.,» *Atherosclerosis*, vol. 221, pp. 375 - 382, 2012.
- [251] Y. Dai, J. L. Mehta y M. Chen, «Glucagon-like peptide-1 receptor agonist liraglutide inhibits endothelin-1 in endothelial cell by repressing nuclear factor-kappa B activation.,» *Cardiovasc. Drugs Ther.* , vol. 27, pp. 371 - 380, 2013.
- [252] A. Bai, A. G. Ma, M. Yong, C. R. Weiss, Y. Ma, Q. Guan, C. N. Bernstein y Z. Peng, «AMPK agonist downregulates innate and adaptative immune responses in TNBS-induced murine acute and relapsing colitis.,» *Biochem. Pharmacol.*, vol. 80, pp. 1708 - 1717, 2010.
- [253] Z. Yang, B. B. Kahn, H. Shi y B. Xue, «Macrophage alpha1 AMPactivated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 285, pp. 19051 - 19059, 2010.
- [254] Y. Hattori, K. Suzuki, S. Hattori y K. Kasai, «Metformin inhibits cytokine-induced nuclear factor kB activation via AMP activated protein kinase activation in vascular endothelial cells.,» *Hypertension*, vol. 47, pp. 1183 - 1188, 2006.
- [255] J. M. Cacicedo, N. Yagihashi, J. F. J. Keaney, N. B. Ruderman y Y. Ido, «AMPK inhibits fatty acid-induced increases in NF-kB transactivation in cultured human umbilical vein endothelial cells.,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 324, pp. 1204 - 1209, 2004.
- [256] M. Katerelos, S. J. Mudge, D. Stapleton, R. B. Auwardt, S. A. Fraser, C. G. Chen, B. E. Kemp y D. A. Power, «5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside and AMP-activated protein kinase inhibit signalling through NF-kB.,» *Immunol. Cell. Biol.*, vol. 88, pp. 754 - 760, 2010.
- [257] W. H. Li S, D. Han, M. Zhang, N. Li, W. Yu, D. Sun, Z. Sun, S. Ma, E. Gao, C. Li, M. Shen y F. Cao, «ZP2495 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice through improvement of cardiac metabolism and mitochondrial function: the possible involvement of AMPK-FoxO3a signal pathway.,» *Oxid. Med. Cell Longev.*, nº 6451902, 2018.
- [258] J. Yang, Z. Wang y X. Zhang, «GLP-1 receptor agonist impairs keratinocytes inflammatory signals by activating AMPK.,» *Exp. Mol. Pathol.*, vol. 107, pp. 124 - 128, 2019.
- [259] C. C. Chang, T. C. Lin, H. L. Ho, C. Y. Kuo, H. H. Li, T. A. Korolenko, W. J. Chen, T. J. Lai, Y. J. Ho y C. L. Lin, «GLP-1 analogue liraglutide attenuates mutant Huntingtin-induced neurotoxicity by restoration of neuronal insulin signaling.,» *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, nº 9, 2018.
- [260] M. Kondo, K. Tanabe, K. Amo-Shiinoki, M. Hatanaka, T. Morii, H. Takahashi y Y. Tanizawa, «Activation of GLP-1 receptor signalling alleviates cellular stresses and improves beta cell function in a mouse model of Wolfram syndrome.,» *Diabetologia.*, vol. 61, nº 10, pp. 2189 - 2201, 2018.

- [261] S. Li, H. Wu, D. Han, M. Zhang, N. Li, W. Yu, D. Sun, Z. Sun, S. Ma, E. Gao, C. Li, M. Shen y F. Cao, «ZP2495 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic mice through improvement of cardiac metabolism and mitochondrial function: The possible involvement of AMPK-FoxO3a signal pathway.,» *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2018.
- [262] Y. Yang, H. Fang, G. Xu, Y. Zhen, Y. Zhang, J. Tian, G. Zhang, D. Zhang y J. Xu, «Liraglutide improves cognitive impairment via the AMPK and PI3K/Akt signaling pathways in type 2 diabetic rats.,» *Mol. Med. Rep.*, vol. 18, nº 2, pp. 2249 - 2457, 2018.
- [263] J. Honda, T. Kimura, S. Sakai, H. Maruyama, K. Tajiri, N. Murakoshi, S. Homma, T. Miyauchi y K. Aonuma, «The glucagon-like-peptide-1 receptor agonist liraglutide improves hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice partly via normalization of reduced ET(B) receptor expression.,» *Physiol. Res.*, vol. 67, pp. 175 - 184, 2018.
- [264] Z. Liu, M. Zhang, T. Zhou, Q. Shen y X. Qin, «Exendin-4 promotes the vascular smooth muscle cell re-differentiation through AMPK/SIRT1/FOXO3a signaling pathways.,» *Atherosclerosis.*, vol. 276, pp. 58 - 66, 2018.
- [265] N. M. Krasner, Y. Ido, N. B. Ruderman y J. M. Cacicedo, « Glucagon-like peptide-1 (GLP-1) analog liraglutide inhibits endothelial cell inflammation through a calcium and AMPK dependent mechanism.,» *PLoS One.*, vol. 9, nº 5, 2014.
- [266] Y. Zeng, C. Li, M. Guan, Z. Zheng, J. Li, W. Xu, L. Wang, F. He y Y. Xue, «The DPP-4 inhibitor sitagliptin attenuates the progress of atherosclerosis in apolipoprotein-E-knockout mice via AMPK and MAPK-dependent mechanisms.,» *Cardiovasc Diabetol.*, vol. 13, nº 32, 2014.
- [267] S. Tang, H. Su, Q. Zhang, H. Tang, C. Wang, Q. Zhou, W. Wei, H. Zhu y Y. Wang, «Sitagliptin inhibits endothelin-1 expression in the aortic endothelium of rats with streptozotocin-induced diabetes by suppressing the nuclear factor- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  system through the activation of AMP-activated protein kinase.,» *Int. J. Mol. Med.*, vol. 37, nº 6, pp. 1558 - 1566, 2016.
- [268] R. M. Abdelsalam y M. M. Safar, «Neuroprotective effects of vildagliptin in rat rotenone Parkinson's disease model: role of RAGE-NF $\kappa$ B and Nrf2-antioxidant signaling pathways.,» *J. Neurochem.*, vol. 133, nº 5, pp. 700 - 707, 2015.
- [269] B. DellaValle, G. S. Brix, B. Brock, M. Gejl, J. Rungby y A. Larsen, «Oral administration of sitagliptin activates CREB and is neuroprotective in murine model of brain trauma.,» *Front Pharmacol.*, vol. 7, nº 450, 2016.
- [270] V. Darsalia, A. Olverling, M. Larsson, S. Mansouri, D. Nathanson, T. Nyström, T. Klein, Å. Sjöholm y C. Patrone, «Linagliptin enhances neural stem cell proliferation after stroke in type 2 diabetic mice.,» *Regul. Pept.*, vol. 190, pp. 25 - 31, 2014.
- [271] N. N. Nassar, M. Y. Al-Shorbagy, H. H. Arab y D. M. Abdallah, «Saxagliptin: A novel antiparkinsonian approach.,» *Neuropharmacology*, vol. 89, pp. 308 - 317, 2015.
- [272] J. Kosaraju, R. M. D. Holsinger, L. Guo y K. Y. Tam, «Linagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Mitigates Cognitive Deficits and Pathology in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease.,» *Mol. Neurobiol.*, vol. 54, nº 8, pp. 6074 - 6084, 2017.
- [273] E. Kornelius, C. L. Lin, H. H. Chang, H. H. Li, W. N. Huang, Y. S. Yang, Y. L. Lu, C. H. Peng y C. N. Huang, « DPP-4 inhibitor linagliptin attenuates A $\beta$ -induced cytotoxicity through activation of AMPK in neuronal cells.,» *C. N. S. Neurosci. Ther.*, vol. 21, nº 7, pp. 549 - 557, 2015.
- [274] A. Gonçalves, L. Almeida, A. P. Silva, C. Fontes-Ribeiro, A. F. Ambrósio, A. Cristóvão y R. Fernandes, «The dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) inhibitor sitagliptin ameliorates retinal endothelial cell dysfunction triggered by inflammation.,» *Biomed. Pharmacother.*, vol. 102, pp. 833 - 838, 2018.
- [275] H. Li, J. Zhang, L. Lin y L. Xu, «Vascular protection of DPP-4 inhibitors in retinal endothelial cells in in vitro culture.,» *Int. Immunopharmacol.*, vol. 66, pp. 162 - 168, 2019.
- [276] N. Dietrich, M. Kolibabka, S. Busch, P. Bugert, U. Kaiser, J. Lin, T. Fleming, M. Morcos, T. Klein, A. Schlotterer y H. P. Hammes, «The DPP4 Inhibitor Linagliptin Protects from Experimental Diabetic Retinopathy.,» *PLoS One.*, vol. 11, nº 12, 2016.
- [277] M. Kolibabka, N. Dietrich, T. Klein y H. P. Hammes, «Anti-angiogenic effects of the DPP-4 inhibitor linagliptin via inhibition of VEGFR signalling in the mouse model of oxygen-induced retinopathy.,» *Diabetologia*, vol. 61, nº 11, pp. 2412 - 2421, 2018.

- [278] A. Giocanti-Auregan, R. Tadayoni, A. L., P. J. T. y D. J. D'Amico, «Mouse models of diabetic retinopathy: systematic review of the literature.,» *J Fr Ophthalmol.*, vol. 36, nº 3, pp. 268 - 276, 2013.
- [279] A. K. Cheung, M. K. Fung, A. C. Lo, T. T. Lam, K. F. So, S. S. Chung y S. K. Chung, «Aldose reductase deficiency prevents diabetes-induced blood-retinal barrier breakdown, apoptosis, and glial reactivation in the retina of db/db mice.,» *Diabetes*, vol. 54, nº 11, pp. 3119 - 3125, 2005.
- [280] A. J. Barber, D. A. Antonetti, T. S. Kern, C. E. Reiter, R. S. Soans, J. K. Krady, S. W. Levison, T. W. Gardner y S. K. Bronson, «The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 46, nº 6, pp. 2210 - 2218, 2005.
- [281] W. S. Wright, A. Singh Yadav, R. M. McElhatten y N. R. Harris, «Retinal blood flow abnormalities following six months of hyperglycemia in the Ins2(Akita) mouse.,» *Exp. Eye Res.*, vol. 98, pp. 9 - 15, 2012.
- [282] M. S. Anderson y J. A. Bluestone, «The NOD mouse: a model of immune dysregulation.,» *Ann. Rev. Immunol.*, vol. 23, pp. 447 - 485, 2005.
- [283] R. J. Chaparro y T. P. Dilorenzo, «An update on the use of NOD mice to study autoimmune (Type 1) diabetes.,» *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, vol. 6, pp. 939 - 955, 2010.
- [284] S. G. Shaw, J. P. Boden, E. Biecker, J. Reichen y B. Rothen, «Endothelin antagonism prevents diabetic retinopathy in NOD mice: a potential role of the angiogenic factor adrenomedullin.,» *Exp Biol Med (Maywood)*, vol. 231, nº 6, pp. 1101 - 1105, 2006.
- [285] R. A. Feit-Leichman, R. Kinouchi, M. Takeda, Z. Fan, S. Mohr, T. S. Kern y D. F. Chen, «Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 46, nº 11, pp. 4281 - 4287, 2005.
- [286] P. M. Martin, P. Roon, T. K. Van Ells, V. Ganapathy y S. B. Smith, «Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45, nº 9, pp. 3330 - 3336, 2004.
- [287] A. J. Barber, E. Lieth, S. A. Khin, D. A. Antonetti, A. G. Buchanan y T. W. Gardner, «Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin.,» *J. Clin. Invest.*, vol. 102, nº 4, pp. 783 - 791, 1998.
- [288] X. X. Zeng XX, Y. K. Ng y E. A. Ling, «Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats.,» *Vis. Neurosci.*, vol. 17, nº 3, pp. 463 - 471, 2000.
- [289] K. Kohzaki, A. J. Vingrys y B. V. Bui, «Early inner retinal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 49, nº 8, pp. 3595 - 3604, 2008.
- [290] T. Szkudelski, «The mechanism of Alloxan and Streptozotocin action in B cells of the rat pancreas.,» *Physiol. Res.*, vol. 50, pp. 536 - 546, 2001.
- [291] L. E. .. Smith, E. Wesolowski y A. McLellan, «Oxygen-induced retinopathy in the mouse.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 35, pp. 101 - 111, 1994.
- [292] C. K. Chan, L. N. Pham, J. Zhou, C. Spee, S. J. Ryan y D. R. Hinton, «Differential expression of pro- and antiangiogenic factors in mouse strain-dependent hypoxia-induced retinal neovascularization.,» *Lab. Invest.*, vol. 85, pp. 721 - 733, 2005.
- [293] K. M. Connor, N. M. Krah y R. J. Dennison, «Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis.,» *Nat. Protoc.*, vol. 4, pp. 1565 - 1573, 2009.
- [294] E. A. Pierce, R. L. Avery, E. D. Foley, L. P. Aiello y L. E. Smith, «Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization.,» *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, vol. 92, pp. 905 - 909, 1995.
- [295] L. B. Tee, M. A. Penrose, J. E. O'Shea, C. M. Lai, E. P. Rakoczy y S. A. Dunlop, «VEGF-induced choroidal damage in a murine model of retinal neovascularisation.,» *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 92, nº 6, pp. 832 - 838, 2008.
- [296] N. Binz, I. S. Ali Rahman, H. R. Chinnery, R. McKeone, K. M. Simpson, T. P. Speed, C. M. Lai y P. E. Rakoczy, «Effect of vascular endothelial growth factor upregulation on retinal gene expression in the Kimba mouse.,» *Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 41, nº 3, pp. 251 - 262, 2013.
- [297] E. P. Rakoczy, I. S. Ali Rahman, N. Binz, C. R. Li, N. N. Vagaja, M. de Pinho y C. M. Lai, «Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization.,» *Am. J. Pathol.*, vol. 177, nº 5, pp. 2659 - 2670, 2010.

- [298] J. Wisniewska-Kruk, I. Klaassen, I. M. Vogels, A. L. Magno, C. M. Lai, C. J. Van Noorden, R. O. Schlingemann y E. P. Rakoczy, «Molecular analysis of blood-retinal barrier loss in the Akimba mouse, a model of advanced diabetic retinopathy.,» *Exp Eye Res.*, vol. 122, pp. 123 - 131, 2014.
- [299] «The Jakson Laboratory,» [En línea]. Available: <https://www.jax.org/strain/000642>. [Último acceso: 19 4 2020].
- [300] G. Fantuzzi y R. Faggioni, « Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis.,» *J. Leukoc. Biol.*, vol. 68, nº 4, pp. 437 - 446, 2000.
- [301] R. S. Ahima, D. Prabakaran, C. Mantzoros, D. Qu, B. Lowell, E. Maratos-Flier y J. S. Flier, «Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting.,» *Nature*, vol. 382, pp. 250 - 252, 1996 .
- [302] M. Kimura, S. Tanaka, F. Isoda, K. Sekigawa, T. Yamakawa y H. Seki-hara, «T lymphopenia in obese diabetic (db/db) mice is non-selective and thymus independent.,» *Life Sci.*, vol. 62, pp. 1243 - 1250, 1998.
- [303] R. Tsuboi y D. B. Rifkin, «Recombinant basic fibroblast growth factor stimulates wound healing in healing impaired db/db mice.,» *J. Exp.Med.*, vol. 172, pp. 245 - 251, 1990.
- [304] P. Bogdanov, L. Corraliza, J. A. Villena, A. R. Carvalho, J. Garcia-Arumí, D. Ramos, J. Ruberte, R. Simó y C. Hernández, «The db/db mouse: a useful model for the study of diabetic retinal neurodegeneration.,» *PLoS One*, vol. 16, nº 9, 2014.
- [305] P. M. Treuting, R. Wong, D. C. Tu y I. Phan, Comparative anatomy and histology. A mouse and human atlas., Elsevier, 2012, pp. 395-418.
- [306] S. Veleri, C. Lazar, B. Chang, P. Sieving, E. Banin y A. Swaroop, «Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: Insights from mouse models.,» *Dis Model Mech*, vol. 8, nº 2, pp. 109-129, 2015.
- [307] A. Ortín-Martínez, F. M. Nadal-Nicolás, M. Jiménez-López, J. J. Alburquerque-Béjar, L. Nieto-López, D. García-Ayuso, M. P. Villegas-Pérez, M. Vidal-Sanz y M. Agudo-Barriuso, «Number and distribution of mouse retinal cone photoreceptors: differences between an albino (Swiss) and a pigmented (C57/BL6) strain.,» *PLoS One.*, vol. 9, nº 7, pp. 1 - 12, 2014.
- [308] R. S. Molday y O. L. Moritz, «Photoreceptors at a glance,» *J. Cell. Sci.*, vol. 128, pp. 4039-4045, 2015.
- [309] J. M. Berg, J. L. Tymoczko y L. Stryer, Biochemistry, 5th edition, Nueva York: W H Freeman, 2002, p. Sección 32.3 "Photoreceptor Molecules in the Eye Detect Visible Ligh".
- [310] J. Hall, Guyton & Hall. Fisiología médica, Elsevier Saunders.
- [311] F. Vinberg, J. Chen y V. J. Kefalov, «Regulation of calcium homeostasis in the outer segments of rod and cone photoreceptors.,» *Progress in Retinal and Eye Research*, 2018.
- [312] V. Y. Arshavsky, T. D. Lamb y E. N. Pugh, «G proteins and phototransduction.,» *Annu. Rev. Physiol.*, nº 64, pp. 153-187, 2002.
- [313] K. A. Martemyanov y A. P. Sampath, «The transduction cascade in retinal ON-bipolar cells: Signal processing and disease.,» *Annu. Rev. Vis. Sci.*, nº 3, pp. 25-51, 2017.
- [314] D. L. McCulloch, M. F. Marmor, M. G. Brigell, R. Hamilton, G. E. Holder, R. Tzekov y M. Bach, «ISCEV Standard for full-field clinical electroretinography.,» *Doc. Ophthalmol.*, vol. 130, nº 1, pp. 1 - 12, 2015.
- [315] C. Griñó, F. Lugo, M. León, S. Ligeró, J. M. Ruiz y J. Montero, «Tomografía de Coherencia Óptica (OCT) Funcionamiento y utilidad en patología macular (I).,» *Gaceta Óptica*, vol. 427, 2016.
- [316] P. J. Anderson, H. Watts, C. Hille, K. Philpott, P. Clark, M. C. S. Gentleman y L. S. Jen, «Glial and endothelial blood-retinal barrier responses to amyloid-beta in the neural retina of the rat,» *Clin. Ophthalmol.*, vol. 2, pp. 801 - 816, 2008.
- [317] S. Tang, H. Su, Q. Zhang, H. Tang, C. Wang, Q. Zhou, W. Wei, H. Zhu y Y. Wang, «Sitagliptin inhibits endothelin-1 expression in the aortic endothelium of rats with streptozotocin-induced diabetes by suppressing the nuclear factor- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  system through the activation of AMP-activated protein kinase.,» *Int. J. Mol. Med.*, vol. 37, nº 6, pp. 1558 - 1566, 2016.
- [318] Y. Yang, H. Wang, M. Kouadir, H. Song y F. Shi, «Recent advances in the mechanisms of NLRP3 inflammasome activation and its inhibitors.,» *Cell Death Dis.*, vol. 10, nº 2, 2019.
- [319] C. S. Lee, Y. G. Kim, H. J. Cho, J. Park, H. Jeong, S. E. Lee, S. P. Lee, H. J. Kang y H. S. Kim, «Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor increases vascular leakage in retina through VE-cadherin phosphorylation.,» *Sci Rep.*, vol. 6, nº 29393, 2016.

- [320] A. R. Santos, L. Ribeiro, F. Bandello, R. Lattanzio, C. Egan, U. Frydkjaer-Olsen, J. García-Arumí, J. Gibson y e. al., «Functional and Structural Findings of Neurodegeneration in Early Stages of Diabetic Retinopathy: Cross-sectional Analyses of Baseline Data of the EUROCONDOR Project.,» *Diabetes*, vol. 66, nº 9, pp. 2503 - 2510, 2017.
- [321] R. Simó, C. Hernández, M. Porta, F. Bandello, J. Grauslund y S. P. e. a. Harding, «Effects of Topically Administered Neuroprotective Drugs in Early Stages of Diabetic Retinopathy. Results of the EUROCONDOR Clinical Trial.,» *Diabetes*, 2019.
- [322] S. H. S. Boddu, H. Gupta y S. Patel, «Drug delivery to the back of the eye following topical administration: an update on research and patenting activity.,» *Recent Pat. Drug Deliv. Formul.*, vol. 8, pp. 27 - 36, 2014.
- [323] L. Zhang, X. Yang, S. Yang y J. Zhang, «The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the adult neurogenesis.,» *European Journal of Neurosc.*, vol. 33, pp. 1 - 8, 2011.
- [324] B. Gong, L. Jiao, X. Du, Y. Li, M. Bi, Q. Jiao y H. Jiang, «Ghrelin promotes midbrain neural stem cells differentiation to dopaminergic neurons through Wnt/ $\beta$ -catenin pathway.,» *J Cell Physiol.*, 2020.
- [325] L. Sun, H. Zhang, W. Wang, Z. Chen, S. Wang, J. Li, G. Li, C. Gao y X. Sun, «Astragaloside IV Exerts Cognitive Benefits and Promotes Hippocampal Neurogenesis in Stroke Mice by Downregulating Interleukin-17 Expression via Wnt Pathway.,» *Front Pharmacol.*, vol. 11, nº 421, 2020.
- [326] A. Mishra, S. Singh, V. Tiwari, Parul y S. Shukla, «Dopamine D1 receptor activation improves adult hippocampal neurogenesis and exerts anxiolytic and antidepressant-like effect via activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathways in rat model of Parkinson's disease.,» *Neurochem Int.*, vol. 122, pp. 170 - 186, 2019.
- [327] C. W. Qiu, Z. Y. Liu, K. Hou, S. Y. Liu, Y. X. Hu, L. Zhang, F. L. Zhang y e. al., «Wip1 knockout inhibits neurogenesis by affecting the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in focal cerebral ischemia in mice.,» *Exp Neurol.*, vol. 309, pp. 44 - 53, 2018.
- [328] Z. Qu, F. Su, X. Qi, J. Sun, H. Wang, Z. Qiao, H. Zhao y Y. Zhu, «Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway mediated aberrant hippocampal neurogenesis in kainic acid-induced epilepsy.,» *Cell Biochem Funct.*, vol. 35, nº 7, pp. 472 - 476, 2018.
- [329] A. Alvarez-Buylla y D. Lim, «For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain.,» *Neuron*, vol. 41, p. 683–686, 2004.
- [330] D. Lie, H. Song, S. Colamarino, G. Ming y F. Gage, «Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases.,» *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 44, p. 399–421, 2004.
- [331] V. Darsalia, S. Mansouri, H. Orsäter, A. Olverling, N. Nozadze, C. Kappe, K. Iverfeldt, L. M. Tracy, N. Grankvi, Å. Sjöholm y C. Patrone, «Glucagon-like peptide-1 receptor activation reduces ischaemic brain damage following stroke in Type 2 diabetic rats.,» *Clin. Sci.*, vol. 122, pp. 473 - 483, 2012.
- [332] T. Scholzen y J. Gerdes, «The Ki-67 protein: from the known and the unknown.,» *Journal of Cellular Physiology*, vol. 182, nº 3, pp. 311 - 322, 2000.
- [333] P. Bogdanov, H. Ramos, J. Sampedro, A. Rivera, C. Hernández y R. Simó, «Understanding new mechanisms of action of GLP-1 in diabetic retinas of db/db mice.,» de *10th CIBERDEM ANNUAL MEETING*, Barcelona, 2019.
- [334] A. Salminen, K. Kaarniranta y A. Kauppinen, «AMPK and HIF signaling pathways regulate both longevity and cancer growth: the good news and the bad news about survival mechanisms.,» *Biogerontology*, vol. 17, nº 4, pp. 655 - 680, 2016.
- [335] A. Salminen, J. M. Hyttinen y K. Kaarniranta, «AMP-activated protein kinase inhibits NF- $\kappa$ B signaling and inflammation: impact on healthspan and lifespan.,» *J. Mol. Med.*, vol. 89, nº 7, pp. 667 - 676, 2011.
- [336] C. Cantó y J. Auwerx, «PGC-1 $\alpha$ , SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure.,» *Curr. Opin. Lipidol.*, vol. 20, nº 2, pp. 98 - 105, 2009.
- [337] E. L. Greer, P. R. Oskoui, M. R. Banko, J. M. Maniar, M. P. Gygi, S. P. Gygi y A. Brunet, «The energy sensor AMP-activated protein kinase directly regulates the mammalian FOXO3 transcription factor.,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 282, pp. 30107 - 30119, 2007.
- [338] H. Y. Lee, S. W. Youn, J. Y. Kim, K. W. Park, C. I. Hwang, W. Y. Park, B. H. Oh, Y. B. Park, K. Walsh, J. S. Seo y H. S. Kim, «FOXO3a turns the tumor necrosis factor receptor signaling towards apoptosis through reciprocal regulation of c-Jun N-terminal kinase and NF- $\kappa$ B.,» *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 28, nº 1, pp. 112 - 120, 2008.

- [339] P. S. Eisele, S. Salatino, J. Sobek, M. O. Hottiger y C. Handschin, «The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator 1 $\alpha/\beta$  (PGC-1) coactivators repress the transcriptional activity of NF- $\kappa$ B in skeletal muscle cells.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 288, n<sup>o</sup> 4, pp. 2246 - 2260, 2013.
- [340] H. J. Kim, K. G. Park, E. K. Yoo, Y. H. Kim, Y. N. Kim, H. S. Kim, H. T. Kim, J. Y. Park, K. U. Lee, W. G. Jang, J. G. Kim, B. W. Kim y I. K. Lee, «Effects of PGC-1 $\alpha$  on TNF- $\alpha$ -induced MCP-1 and VCAM-1 expression and NF- $\kappa$ B activation in human aortic smooth muscle and endothelial cells.,» *Antioxid. Redox. Signal.*, vol. 9, pp. 301 - 307, 2007.
- [341] X. Palomer, D. Alvarez-Guardia, R. Rodriguez-Calvo, T. Coll, J. C. Laguna, M. M. Davidson, T. O. Chan, A. M. Feldman y M. Vazquez Carrera, «TNF- $\alpha$  reduces PGC-1 $\alpha$  expression through NF- $\kappa$ B and p38MAPK leading to increased glucose oxidation in human cardiac cell model.,» *Cardiovasc. Res.*, vol. 81, pp. 703 - 712, 2009.
- [342] A. Kauppinen, T. Suuronen, J. Ojala, K. Kaarniranta y A. Salminen, «Antagonistic crosstalk between NF- $\kappa$ B and SIRT1 in the regulation of inflammation and metabolic disorders.,» *Cellular Signalling*, vol. 25, n<sup>o</sup> 10, pp. 1939 - 1948, 2013.
- [343] F. Yeung, J. E. Hoberg, C. S. Ramsey, M. D. Keller, D. R. Jones, R. A. Frye y M. W. Mayo, «Modulation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and cell survival by the SIRT1 deacetylation.,» *EMBO J.*, vol. 23, pp. 2369 - 2380, 2004.
- [344] S. R. Yang, J. Wright, M. Bauter, K. Seweryniak, A. Kode y I. Rahman, «Sirtuin regulates cigarette smoke-induced proinflammatory mediator release via RelA/p65 NF- $\kappa$ B in macrophages in vitro and in rat lungs in vivo: implications for chronic inflammation and aging.,» *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, vol. 292, pp. 567 - 576, 2007.
- [345] A. E. Kray, R. S. Carter, K. N. Pennington, R. J. Gomez, L. E. Sanders, J. M. Llanes, W. N. Khan, D. W. Ballard y B. E. Wadzinski, «Positive regulation of I $\kappa$ B kinase signaling by protein serine/threonine phosphatase 2A.,» *J Biol Chem.*, vol. 280, n<sup>o</sup> 43, pp. 35974 -35982, 2005.
- [346] V. Vogelsberg-Ragaglia, T. Schuck, J. Q. Trojanowski y V. M. Lee, «PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus.,» *Exp. Neurol.*, vol. 168, n<sup>o</sup> 2, pp. 402 - 412, 2001.
- [347] E. Sontag, A. Luangpirom, C. Hladik y e. al., «Altered expression levels of the protein phosphatase 2A A $\beta$ C enzyme are associated with Alzheimer disease pathology.,» *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 63, n<sup>o</sup> 4, pp. 287 - 301, 2004.
- [348] L. Trinkle-Mulcahy y A. I. Lamond, «Mitotic phosphatases: no longer silent partners.,» *Curr. Opin. Cell. Biol.*, vol. 18, n<sup>o</sup> 6, pp. 623 - 631, 2006.
- [349] N. Dietrich, M. Kolibabka, S. Busch, P. Bugert, U. Kaiser, J. Lin, T. Fleming, M. Morcos, T. Klein, A. Schlotterer y H. P. Hammes, «The DPP4 inhibitor linagliptin protects from experimental diabetic retinopathy.,» *PLoS One*, vol. 11, n<sup>o</sup> 12, 2016.
- [350] N. Wronkowitz, S. W. Görgens, T. Romacho, L. A. Villalobos, C. F. Sánchez-Ferrer, C. Peiró, H. Sell y J. Eckel, «Soluble DPP4 induces inflammation and proliferation of human smooth muscle cells via protease-activated receptor 2.,» *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, n<sup>o</sup> 9, pp. 1613 - 1621, 2014.
- [351] H. Zhang, S. Maqsudi, A. Rainczuk, N. Duffield, J. Lawrence, F. M. Keane, D. Justa-Schuch, R. Geiss-Friedlander, M. D. Gorrell y A. N. Stephens, «Identification of novel dipeptidyl peptidase 9 substrates by two-dimensional differential in-gel electrophoresis.,» *FEBS J.*, vol. 282, n<sup>o</sup> 19, pp. 3737 - 3757, 2015.
- [352] C. Ott, U. Raff, S. Schmidt, I. Kistner, S. Friedrich, P. Bramlage, J. M. Harazny y R. E. Schmieder, «Effects of saxagliptin on early microvascular changes in patients with type 2 diabetes.,» *Cardiovasc. Diabetol.*, vol. 13, n<sup>o</sup> 19, 2014.
- [353] X. Xiao-Yun, M. Zhao-Hui, C. Ke, H. Hong-Hui y X. Yan-Hong, «Glucagon-like peptide-1 improves proliferation and differentiation of endothelial progenitor cells via upregulating VEGF generation.,» *Med. Sci. Monit.*, vol. 17, pp. 35 - 41, 2011.
- [354] K. N. Aronis, J. P. Chamberland y C. S. Mantzoros, «GLP-1 promotes angiogenesis in human endothelial cells in a dose-dependent manner, through the Akt, Src and PKC pathways.,» *Metabolism*, vol. 62, pp. 1279 - 1286, 2013.
- [355] H. M. Kang, I. Sohn, J. Jung, J. W. Jeong y C. Park, «Exendin-4 protects hindlimb ischemic injury by inducing angiogenesis.,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 465, pp. 758 - 763, 2015.

- [356] J. Sampedro, P. Bogdanov, H. Ramos, C. Solà-Adell, M. Turch, M. Valeri, O. Simó-Servat, C. Lagunas, R. Simó y C. Hernández, «New insights into the mechanisms of action of topical administration of GLP-1 in an experimental model of diabetic retinopathy.,» *Journal of Clinical Medicine*, vol. 8, nº 3, 2019.
- [357] S. R. y C. Hernández, «GLP-1R as a Target for the Treatment of Diabetic Retinopathy: Friend or Foe?,» *Diabetes*, vol. 66, nº 6, pp. 1453 - 1460, 2017.
- [358] R. Simó, P. Bogdanov, H. Ramos, J. Huerta y C. Hernández, «Effects of topical administration (eye drops) of semaglutide on retinal neuroinflammation and vascular leakage in experimental diabetes.,» de *EASD*, Viena, 2020.
- [359] D. Mustafi, A. Engel y K. Palczewski, «Structure of cone photoreceptors.,» *Prog Retin Eye Res*, nº 28, pp. 289-302, 2009.
- [360] J. I. Korenbrot, M. Mehta, N. Tserentsoodol, J. H. Postlethwait y T. I. Rebrik, «EML1 (CNG-modulin) controls light sensitivity in darkness and under continuous illumination in zebrafish retinal cone photoreceptors.,» *J. Neurosci*, nº 33, pp. 17763-17776, 2013.
- [361] B. M. Kevany y K. Palczewski, «Phagocytosis of retinal rod and cone photoreceptors.,» *Physiology*, nº 25, pp. 8-15, 2010.
- [362] D. Sinha, M. Valapala, P. Shang, S. Hose, R. Grebe, G. A. Luty, J. S. Zigler, K. Kaarniranta y J. T. Handa, «Lysosomes: Regulators of autophagy in the retinal pigmented epithelium.,» *Exp. Eye Res.*, nº 144, pp. 46-53, 2016.
- [363] J. S. Diamond, «Inhibitory interneurons in the retina: Types, circuitry and function.,» *Annual Review of Vision Science*, vol. 3, nº 1, pp. 1-24, 2017.
- [364] T. Baden, P. Berens, K. Franke, M. R. Rosón, M. Bethge y T. Euler, «The functional diversity of retinal ganglion cells in the mouse.,» *Nature*, nº 529, pp. 345-350, 2016.
- [365] M. E. Tremblay, B. Stevens, A. Sierra, H. Wake, A. Bessis y A. Nimmerjahn, «The role of microglia in the healthy brain.»
- [366] Diabetes complications trial research group, D. M. Nathan, S. Genuth, J. Lachin, P. Cleary, O. Crofford, M. Davis, L. Rand y C. Siebert, «The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus.,» *N. Engl. J. Med.*, vol. 329, nº 14, pp. 977-986, 1993.
- [367] J. Chua, A. R. Chia, M. L. Chee, R. E. K. Man, G. S. W. Tan, E. L. Lamoureux, T. Y. Wong, M. F. Chong y L. Schmetterer, «The relationship of dietary fish intake to diabetic retinopathy and retinal vascular caliber in patients with type 2 diabetes.,» *Sci. Rep.*, vol. 8, nº 1, 2018.
- [368] M. Long, C. Wang y D. Liu, «Glycated hemoglobin A1C and vitamin D and their association with diabetic retinopathy severity.,» *Nutr. Diabetes*, vol. 7, nº 6, 2017.
- [369] P. J. Oates y B. L. Mylari, «Aldose reductase inhibitors: therapeutic implications for diabetic complications.,» *Expert Opinion on Investigational Drugs*, vol. 8, nº 12, pp. 2095-2119, 1999.
- [370] S. Senthilkumari, R. Sharmila, G. Chidambaranathan y A. Vanniarajan, «Epalrestat, an aldose reductase inhibitor prevents glucose-induced toxicity in human retinal pigment epithelial cells in vitro.,» *J. Ocul. Pharmacol. Ther.*, vol. 33, nº 1, pp. 34-41, 2017.
- [371] Y. Ding, S. Yuan, X. Liu, P. Mao, C. Zhao, Q. Huang, R. Zhang, Y. Fang, Q. Song, D. Yuan, P. Xie, Y. Liu y Q. Liu, «Protective effects of astragaloside IV on db/db mice with diabetic retinopathy.,» *PLoS One*, nº 234, pp. 254-260, 2014.
- [372] C. Sampath, S. Sang y M. Ahmedna, «In vitro and in vivo inhibition of aldose reductase and advanced glycation end products by phloretin, epigallocatechin 3-gallate and 6-gingerol.,» *Biomed. Pharmacother.*, nº 84, pp. 502-513, 2016.
- [373] K. C. Chang, A. Snow, D. V. Labarbera y J. M. Petrash, «Aldose reductase inhibition alleviates hyperglycemic effects on human retinal pigment epithelial cells.,» *Chem. Biol. Interact.*, nº 234, 2015.
- [374] A. S. Grewal, S. Bhardwaj, D. Pandita, V. Lather y B. S. Sekhon, «Updates on aldose reductase inhibitors for management of diabetic complications and non-diabetic diseases.,» *Mini Rev. Med. Chem.*, vol. 16, nº 2, pp. 120-162, 2016.
- [375] M. M. Guzyk, A. A. Tykomyrov, V. S. Nedzvetsky, I. V. Prischepa, T. V. Grinenko, L. V. Yanitska y T. M. Kuchmerovska, «Poly(ADP-Ribose) Polymerase-1 (PARP-1) inhibitors reduce reactive gliosis and improve angiotensin levels in retina of diabetic rats.,» *Neurochem. Res.*, vol. 41, nº 10, pp. 2526-2537, 2016.

- [376] M. M. Byun, B. Kang, Y. S. Yoo y C. K. Joo, «Poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition improves corneal epithelial innervation and wound healing in diabetic rats.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 56, nº 3, pp. 1948-1955, 2015.
- [377] G. Mohammad, M. M. Siddiquei y A. M. Abu El-Asrar, «Poly (ADP-ribose) polymerase mediates diabetes-induced retinal neuropathy.,» *Mediators Inflamm.*, vol. 2013, p. 510451, 2013.
- [378] V. R. Drel, W. Xu, J. Zhang, P. F. Kador, T. K. Ali, J. Shin, U. Julius, B. Slusher, A. B. El-Remessy y I. G. Obrosova, «Poly(ADP-ribose)polymerase inhibition counteracts cataract formation and early retinal changes in streptozotocin-diabetic rats.,» *Invest. Ophthalmol. and Vis. Sci.*, vol. 50, nº 4, pp. 1778-1790, 2009.
- [379] M. Nakamura, A. J. Barber, D. A. Antonetti, K. F. LaNoue, K. A. Robinson, M. G. Buse y T. W. Gardner, «Excessive hexosamines block the neuroprotective effect of insulin and induce apoptosis in retinal neurons.,» *J. Biol. Chem.*, vol. 276, nº 47, pp. 43748-43755, 2001.
- [380] W. Y. Wani, J. C. Chatham, V. Darley-Usmar, L. L. McMahon y J. Zhang, «O-GlcNAcylation and neurodegeneration.,» *Brain Res. Bull.*, nº 133, pp. 80-87, 2017.
- [381] M. R. Bond y J. A. Hanover, «A little sugar goes a long way: the cell biology of O-GlcNAc.,» *J. Cell. Biol.*, vol. 208, nº 7, pp. 869-880, 2015.
- [382] T. Issad y M. Kuo, «O-GlcNAc modification of transcription factors, glucose sensing and glucotoxicity.,» *Trends. Endocrinol. Metab.*, vol. 19, nº 10, pp. 380-389, 2008.
- [383] S. S. Solomon, G. Majumdar, A. Martinez-Hernandez y R. Raghov, «A critical role of Sp1 transcription factor in regulating gene expression in response to insulin and other hormones.,» *Life Sci.*, vol. 83, nº 9, pp. 305-312, 2008.
- [384] M. Lafontaine-Lacasse, G. Doré y F. Picard, «Hexosamines stimulate apoptosis by altering SIRT1 action and levels in rodent pancreatic  $\beta$ -cells.,» *J. Endocrinol.*, vol. 208, nº 1, pp. 41-49, 2011.
- [385] Y. Zhang, Y. Qu, T. Niu, H. Wang y K. Liu, «O-GlcNAc modification of Sp1 mediates hyperglycaemia-induced ICAM-1 up-regulation in endothelial cells.,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 484, nº 1, pp. 79-84, 2017.
- [386] C. Rosse, M. Linch, S. Kermorgant, A. J. Cameron, K. Boeckeler y P. J. Parker, «PKC and the control of localized signal dynamics.,» *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, vol. 11, nº 2, pp. 103-112, 2010.
- [387] H. L. Deissler y G. E. Lang, «The protein kinase C inhibitor: Ruboxistaurin.,» *Des. Ophthalmol.*, vol. 55, pp. 295-301, 2016.
- [388] H. B. Song, H. O. Jun, J. H. Kim, Y. S. Yu, K. W. Kim y J. H. Kim, «Suppression of protein kinase C- $\zeta$  attenuates vascular leakage via prevention of tight junction protein decrease in diabetic retinopathy.,» *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 444, nº 1, pp. 63-68, 2014.
- [389] J. K. Krady, A. Basu, C. M. Allen, Y. Xu, K. F. LaNoue, T. W. Gardner y S. W. Levison, «Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy.,» *Diabetes*, vol. 54, pp. 1559-1565, 2005.
- [390] T. Oshitari, S. Yamamoto, N. Hata y S. Roy, «Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy.,» *Brit. J. Ophthalmol.*, vol. 92, pp. 552 - 555, 2008.
- [391] A. M. Abu-El-Asrar, L. Dralands, L. Missotten, I. A. Al-Jadaan y K. Geboes, «Expression of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes.,» *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 45, nº 8, pp. 2760 - 2766, 2004.
- [392] E. V. Famiglietti, E. G. Stopa, E. D. McGookin, P. Song, V. LeBlanc y B. W. Streeten, «Immunocytochemical localization of vascular endothelial growth factor in neurons and glial cells of human retina.,» *Brain Res.*, vol. 969, pp. 195 - 204, 2003.
- [393] M. Hangai, S. He, S. Hoffmann, J. I. Lim, S. J. Ryan y D. R. Hinton, «Sequential induction of angiogenic growth factors by TNF-alpha in choroidal endothelial cells.,» *J. Neuroimmunol.*, vol. 171, pp. 45 - 56, 2006.
- [394] J. F. Navarro y C. Mora-Fernandez, «The role of TNF-alpha in diabetic nephropathy: pathogenic and therapeutic implications.,» *Cytokine Growth Factor Rev.*, vol. 17, pp. 441 - 450, 2006.
- [395] N. Demircan, B. G. Safran, M. Soyulu, A. A. Ozcan y S. Sizmaz, «Determination of vitreous interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) levels in proliferative diabetic retinopathy.,» *Eye*, vol. 20, nº 12, pp. 1366 - 1369, 2006.

- [396] A. M. Jousseaume, V. Poulaki, N. Mitsiades, B. Kirchhof, K. Koioizumi, S. Döhmen y A. P. Adamis, «Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression.,» *FASEB J.*, vol. 16, nº 3, pp. 438 - 440, 2002.
- [397] J. A. Vincent y S. Mohr, «Inhibition of caspase-1/ interleukin-1beta signaling prevents degeneration of retinal capillaries in diabetes and galactosemia.,» *Diabetes*, vol. 56, nº 1, pp. 224 - 230, 2007.
- [398] R. A. Kowluru, G. Mohammad, J. M. Santos, S. Tewari y Q. Zhong, «Interleukin-1beta and mitochondria damage, and the development of diabetic retinopathy.,» *J. Ocul. Biol. Dis. Infor.*, vol. 4, pp. 3 - 9, 2011.
- [399] R. A. Kowluru y S. Odenbach, «Role of interleukin-1beta in the pathogenesis of diabetic retinopathy.,» *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 88, nº 10, pp. 1343 - 1347, 2004.
- [400] M. C. Mocan, S. Kadayifcilar y B. Eldem, «Elevated intravitreal interleukin-6 levels in patients with proliferative diabetic retinopathy.,» *Can. J. Ophthalmol.*, vol. 41, nº 6, pp. 747 - 752, 2006.
- [401] H. Noma, H. Funatsu, T. Mimura, S. Harino, T. Sone y S. Hori, «Increase of vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in the aqueous humour of patients with macular oedema and central retinal vein occlusion.,» *Acta Ophthalmol.*, vol. 88, nº 6, pp. 646 - 651, 2010.
- [402] D. Boeri, M. Maiello y M. Lorenzi, «Increased prevalence of microthromboses in retinal capillaries of diabetic individuals.,» *Diabetes*, vol. 50, pp. 1432 - 1439, 2001.
- [403] K. Yamashiro, A. Tsujikawa, S. Ishida, T. Usui, Y. Kaji, Y. Honda, Y. Ogura y A. P. Adamis, «Platelets accumulate in the diabetic retinal vasculature following endothelial death and suppress blood-retinal barrier breakdown.,» *Am. J. Pathol.*, vol. 163, pp. 253 - 259, 2003.
- [404] S. L. Wu, D. M. Zhan, S. H. Xi y X. L. He, «Roles of tissue plasminogen activator and its inhibitor in proliferative diabetic retinopathy.,» *Int. J. Ophthalmol.*, vol. 7, nº 5, pp. 764 - 767, 2014.
- [405] B. C. Albenis y M. P. Mattson, «Evidence for the involvement of TNF and NF-kB in hippocampal synaptic plasticity.,» *Synapse*, vol. 35, nº 2, pp. 151 - 159, 2000.
- [406] B. Kaltschmidt, D. Ndiaye, M. Korte, S. Pothion, L. Arbibe, M. Prüllage, J. Pfeiffer, A. Lindecke, V. Staiger, A. Israël, C. Kaltschmidt y S. Mémet, «NF-kappaB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A / CREB signaling.,» *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, nº 8, pp. 2936 - 2946, 2006.
- [407] M. C. Boersma, E. C. Dresselhaus, L. M. De Biase, A. B. Mihalas, D. E. Bergles y M. K. Meffert, «A requirement for Nuclear Factor-kappaB in Developmental and Plasticity-Associated Synaptogenesis.,» *J. Neurosci.*, vol. 31, nº 14, pp. 5414 - 5425, 2011.
- [408] E. S. Heckscher, R. D. Fetter, K. W. Marek, S. D. Albin y G. W. Davis, «NF-kappaB, IkappaB, and IRAK control glutamate receptor density at the Drosophila NMJ.,» *Neuron*, vol. 55, nº 6, pp. 859 - 873, 2007.
- [409] J. Adamiec-Mroczek y J. Oficjalska-Mlynczak, «Assessment of selected adhesion molecule and proinflammatory cytokine levels in the vitreous body of patients with type 2 diabetes - role of the inflammatory-immune process in the pathogenesis of proliferative diabetic retinopathy.,» *Graefes Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, vol. 246, nº 12, pp. 1665 - 1670, 2008.
- [410] K. Kovacs, K. V. Marra, G. Yu, S. Wagley, J. Ma, G. C. Teague, N. Nandakumar, K. Lashkari y J. G. Arroyo, «Angiogenic and inflammatory vitreous biomarkers associated with increasing levels of retinal ischemia.,» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 56, nº 11, pp. 6523 - 6530, 2015.
- [411] I. Klaassen, R. J. van Geest, E. J. Kuiper, J. van Noorden y R. O. Schlingemann, «The role of CTGF in diabetic retinopathy.,» *Experimental Eye Research*, vol. 133, pp. 37 - 48, 2015.
- [412] A. M. El-Asrar, M. I. Nawaz, D. Kangave, K. Geboes, M. S. Ola, S. Ahmad y M. Al-Shabrawey, «High-mobility group box-1 and biomarkers of inflammation in the vitreous from patients with proliferative diabetic retinopathy.,» *Mol. Vis.*, vol. 17, pp. 1829 - 1838, 2011.
- [413] X. L. Chen, X. D. Zhang, Y. Y. Li, X. M. Chen, D. R. Tang y R. J. Ran, «Involvement of HMGB1 mediated signalling pathway in diabetic retinopathy: evidence from type 2 diabetic rats and ARPE-19 cells under diabetic condition.,» *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 97, nº 12, pp. 1598 - 1603, 2013.
- [414] L. P. Aiello, J. M. Northrup, B. A. Keyt, H. Takagi y M. A. Iwamoto, «Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells.,» *Arch. Ophthalmol.*, vol. 113, pp. 1538 - 1544, 1995.
- [415] T. Takahashi, C. Kalka, H. Masuda, D. Chen, M. Silver, M. Kearney, M. Magner, J. M. Isner y T. Asahara, «Ischemia- and cytokine-induced mobilization of bone marrow-derived endothelial progenitor cells for neovascularization.,» *Nat. Med.*, vol. 5, nº 4, pp. 434 - 438, 1999.

- [416] V. Asnagli, R. Lattanzio, G. Mazzolari, M. R. Pastore, A. Ramoni, A. Maestroni, D. Ruggieri, L. Luzi, R. Brancato y G. Zerbini, «Increased clonogenic potential of circulating endothelial progenitor cells in patients with type 1 diabetes and proliferative retinopathy.,» *Diabetologia*, vol. 49, nº 5, pp. 1109 - 1111, 2006.
- [417] I. G. Lee, S. L. Chae y J. C. Kim, «Involvement of circulating endothelial progenitor cells and vasculogenic factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy.,» *Eye*, vol. 20, nº 5, pp. 546 - 552, 2006.
- [418] S. Brunner, G. H. Schernthaner, M. Satler, M. Elhenicky, F. Hoellerl, K. E. Schmid-Kubista, F. Zeiler, S. Binder y G. Schernthaner, «Correlation of different circulating endothelial progenitor cells to stages of diabetic retinopathy: first in vivo data.,» *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 50, nº 1, pp. 392 - 398, 2009.
- [419] N. Lois, R. V. McCarter, C. O'Neill, R. J. Medina y A. W. Stitt, «Endothelial progenitor cells in diabetic retinopathy.,» *Front. Endocrinol.*, vol. 5, nº 44, 2014.
- [420] K. Tan, E. Lessieur, A. Cutler, P. Nerone, A. Vasanji, K. Asosingh, S. Erzurum y B. Anand-Apte, «Impaired function of circulating CD34+ CD45- cells in patients with proliferative diabetic retinopathy.,» *Experimental Eye Research*, vol. 91, nº 2, pp. 229 - 237, 2010.
- [421] S. Tran, R. Retnakaran, B. Zinman y C. K. Kramer, «Efficacy of glucagon-like peptide-1 receptor agonists compared to dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for the management of type 2 diabetes: A meta-analysis of randomized clinical trials.,» *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 20, pp. 68 - 76, 2018.
- [422] R. M. Bergenstal, C. Wysham, L. MacConell, J. Malloy, B. Walsh, P. Yan, K. Wilhelm, J. Malone, L. E. Porter y D.-2. S. Group., «Efficacy and safety of exenatide once weekly versus sitagliptin or pioglitazone as an adjunct to metformin for treatment of type 2 diabetes (DURATION-2): a randomised trial.,» *The Lancet*, vol. 376, nº 9739, pp. 431 - 439, 2010.
- [423] R. E. Pratley, M. Nauck, T. Bailey, E. Montanya, R. Cuddihy, S. Filetti, A. B. Thomsen, R. E. Søndergaard, M. Davies y 1.-L.-D.-4. S. Group, «Liraglutide versus sitagliptin for patients with type 2 diabetes who did not have adequate glycaemic control with metformin: a 26-week, randomised, parallel-group, open-label trial.,» *The Lancet*, vol. 375, nº 9724, pp. 1447 - 1456, 2010.
- [424] T. Reid, «Choosing GLP-1 receptor agonists or DPP-4 inhibitors: weighing the clinical trial evidence.,» *Clinical Diabetes*, vol. 30, nº 1, pp. 3 - 12, 2012.
- [425] J. Morales, «The pharmacologic basis for clinical differences among GLP-1 receptor agonists and DPP-4 inhibitors.,» *Postgraduate Medicine*, vol. 123, nº 6, pp. 189 - 201, 2011.
- [426] T. Karagiannis, P. Paschos, K. Paletas, D. R. Matthews y A. Tsapas, «Dipeptidyl peptidase-4 inhibitors for treatment of type 2 diabetes mellitus in the clinical setting: systematic review and meta-analysis.,» *BMJ*, vol. 344, 2012.
- [427] W. M. Steinberg, J. B. Buse, M. L. M. Ghorbani, D. D. Ørsted, M. A. Nauck, L. S. Committee y L. T. Investigators, «Amylase, lipase, and acute pancreatitis in people with type 2 diabetes treated with liraglutide: Results from the LEADER randomized trial.,» *Diabetes Care*, vol. 40, nº 7, pp. 966 - 972, 2017.
- [428] H. Storgaard, F. Cold, L. L. Gluud, T. Vilsbøll y F. K. Knop, «Glucagon-like peptide-1 receptor agonists and risk of acute pancreatitis in patients with type 2 diabetes.,» *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 19, nº 6, pp. 906 - 908, 2017.
- [429] R. Garg, W. Chen y M. Pendergrass, «Acute pancreatitis in type 2 diabetes treated with exenatide or sitagliptin: a retrospective observational pharmacy claims analysis.,» *Diabetes Care*, vol. 33, nº 11, pp. 2349 - 2354, 2010.
- [430] D. D. Dore, J. D. Seeger y K. A. Chan, «Use of a claims-based active drug safety surveillance system to assess the risk of acute pancreatitis with exenatide or sitagliptin compared to metformin or glyburide.,» *Current Medical Research and Opinion*, vol. 25, nº 4, pp. 1019 - 1027, 2009.
- [431] G. Xu, D. A. Stoffers, J. F. Habener y S. Bonner-Weir, «Exendin-4 stimulates both beta-cell replication and neogenesis, resulting in increased beta-cell mass and improved glucose tolerance in diabetic rats.,» *Diabetes*, vol. 48, nº 12, pp. 2270 - 2276, 1999.
- [432] L. Farilla, H. Hui, C. Bertolotto, E. Kang, A. Bulotta, U. Di Mario y R. Perfetti, «Glucagon-like peptide-1 promotes islet cell growth and inhibits apoptosis in Zucker diabetic rats.,» *Endocrinology*, vol. 143, pp. 4397 - 4408, 2002.

- [433] W. J. Song, M. Seshadri, U. Ashraf, T. Mdluli, P. Mondal, M. Keil, M. Azevedo, L. S. Kirschner, C. A. Stratakis y M. A. Hussain, «Snapin mediates incretin action and augments glucose-dependent insulin secretion.,» *Cell. Metabolism*, vol. 13, nº 3, pp. 308 - 319, 2011.
- [434] P. E. MacDonald, A. M. Salapatek y M. B. Wheeler, «Glucagon-like peptide-1 receptor activation antagonizes voltage-dependent repolarizing K(+) currents in beta-cells: a possible glucose-dependent insulinotropic mechanism.,» *Diabetes*, vol. 51, pp. 443 - 447, 2002.
- [435] D. A. Cunha, L. Ladrière, F. Ortis, M. Igoillo-Esteve, E. N. Gurzov, R. Lupi, P. Marchetti, D. L. Eizirik y M. Cnop, «Glucagon-like peptide-1 agonists protect pancreatic beta-cells from lipotoxic endoplasmic reticulum stress through upregulation of BiP and JunB.,» *Diabetes*, vol. 58, nº 12, pp. 2851 - 2862, 2009.
- [436] D. Verouhis, N. Saleh, M. Settergren, P. Sörensson, A. Gourine y J. Pernow, «Remote ischemic conditioning protect against endothelial ischemia-reperfusion injury via a glucagon-like peptide-1 receptor-mediated mechanism in humans.,» *Int. J. Cardiol.*, vol. 274, pp. 40 - 44, 2019.
- [437] M. V. Basalay, S. Mastitskaya, A. Mrochek, G. L. Ackland, A. G. Del Arroyo, J. Sanchez, P. O. Sjoquist, J. Pernow, A. V. Gourine y A. Gourine, «Glucagon-like peptide 1 (GLP-1) mediates cardioprotection by remote ischaemic conditioning.,» *Cardiovasc. Res.*, vol. 112, nº 3, pp. 669 - 676, 2016.
- [438] C. De Ciuceis, C. Agabiti-Rosei, C. Rossini, S. Caletti, M. A. Coscignano, G. Ferrari-Toninelli, G. Ragni, C. Cappelli, B. Cerudelli, P. Airò, M. Scarsi, A. Tincani, E. Porteri y D. Rizzoni, «Microvascular density and circulating endothelial progenitor cells before and after treatment with incretin mimetics in diabetic patients.,» *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.*, 2018.
- [439] W. B. White y W. L. Baker, «Cardiovascular effects of incretin-based therapies.,» *Annu. Rev. Med.*, vol. 67, pp. 245 - 260, 2016.
- [440] D. J. Drucker, «The cardiovascular biology of glucagon-like peptide 1.,» *Cell. Metab.*, vol. 24, pp. 15 - 30, 2016.
- [441] A. Cameron-Vendrig, A. Reheman, M. A. Siraj, X. R. Xu, Y. Wang, X. Lei, T. Afroze, E. Shikatani, O. El-Mounayri, H. Noyan, R. Weissleder, H. Ni y M. Husain, «Glucagon-like peptide 1 receptor activation attenuates platelet aggregation and thrombosis.,» *Diabetes*, vol. 65, pp. 1714 - 1723, 2016.
- [442] A. E. Hogan, G. Gaoatswe, L. Lynch, M. A. Corrigan, C. Woods, J. O'Connell y D. O'Shea, «Glucagon-like peptide 1 analogue therapy directly modulates innate immune-mediated inflammation in individuals with type 2 diabetes mellitus.,» *Diabetologia*, vol. 57, pp. 781 - 784, 2014.
- [443] G. Lacobellis, M. Mohseni, S. D. Bianco y P. K. Banga, «Liraglutide causes large and rapid epicardial fat reduction.,» *Obesity*, vol. 25, pp. 311 - 316, 2017.
- [444] A. K. Bose, M. M. Mocanu, R. D. Carr RD, C. L. Brand y D. M. Yellon, «Glucagon-like peptide 1 can directly protect the heart against ischemia/reperfusion injury.,» *Diabetes*, vol. 54, pp. 146 - 151, 2005.
- [445] M. DeNicola, J. Du, Z. Wang, N. Yano, L. Zhang y Y. Wang, «Stimulation of glucagon-like peptide-1 receptor through exendin-4 preserves myocardial performance and prevents cardiac remodeling in infarcted myocardium.,» *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, vol. 307, pp. 630 - 643, 2014.
- [446] L. Zhang, X. Yang, S. Yang y J. Zhang, «The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in the adult neurogenesis.,» *Eur. J. Neurosci.*, vol. 33, nº 1, pp. 1 - 8, 2011.
- [447] R. Tadayoni, M. Paques, A. Gaudric y E. Vicaut, «Erythrocyte and leukocyte dynamics in the retinal capillaries of diabetic mice.,» *Exp. Eye Res.*, vol. 77, pp. 497 - 504, 2003.
- [448] H. Kodama, M. Fujita y I. Yamaguchi, «Development of hyperglycaemia and insulin resistance in conscious genetically diabetic (C57BL/KsJ-db/db) mice.,» *Diabetologia*, vol. 37, pp. 739 - 744, 1994.
- [449] M. Konopleva, A. Mikhail, Z. Estrov, S. Zhao, D. Harris, G. Sanchez-Williams, S. M. Kornblau, J. Dong, K. O. Kliche, S. Jiang, H. R. Snodgrass, E. H. Estey y M. Andreeff, «Expression and function of leptin receptor isoforms in myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: proliferative and anti-apoptotic activities.,» *Blood*, vol. 93, nº 5, pp. 1668 - 1676, 1999.
- [450] J. A. Portillo, J. A. Greene, G. Okenka, Y. Miao, N. Sheibani, T. S. Kern y C. S. Subauste, «CD40 promotes the development of early diabetic retinopathy in mice.,» *Diabetologia*, vol. 57, nº 10, pp. 2222-2231, 2014.
- [451] L. L. Baggio y D. J. Drucker, «Biology of incretins: GLP-1 and GIP.,» *Gastroenterology*, vol. 132, pp. 2131 - 2157, 2007.

- [452] A. Harkavyi, A. Abuirmeileh, R. Lever, A. E. Kingsbury, C. S. Biggs y P. S. Whitton, «Glucagon-like peptide 1 receptor stimulation reverses key deficits in distinct rodent models of Parkinson's disease.,» *J. Neuroinflamm.*, vol. 5, nº 19, 2008.
- [453] Y. Fan, K. Liu, Q. Wang, Y. Ruan, Y. Zhang y W. Ye, «Exendin-4 protects retinal cells from early diabetes in Goto-Kakizaki rats by increasing the Bcl-2/Bax and Bcl-xL/Bax ratios and reducing reactive gliosis.,» *Mol. Vis.*, vol. 20, pp. 1557 - 1568, 2014.
- [454] K. Ban, K. H. Kim, C. Cho, M. Sauvé, E. P. Diamandis, P. H. Backx, D. J. Drucker y M. Husain, «Glucagon-like peptide (GLP)-1(9–36)amide-mediated cytoprotection is blocked by exendin(9–39) yet does not require the known GLP-1 receptor.,» *Endocrinology*, vol. 151, pp. 1520 - 1531, 2010.
- [455] H. Wang, J. Xu, J. Chen, L. P. J. y W. Zheng, «Role of IGF-1 signaling in the pathology of diabetic retinopathy.,» *Ther. Targets ofr Neurol. Dis.*, vol. 2, pp. 1 - 8, 2015.
- [456] M. Kolibabka, N. Dietrich, T. Klein y H. P. Hammes, «Anti-angiogenic effects of the DPP-4 inhibitor linagliptin via inhibition of VEGFR signalling in the mouse model of oxygen-induced retinopathy.,» *Diabetologia.*, vol. 61, nº 11, pp. 2412 - 2421, 2018.
- [457] C. Ott, U. Raff, S. Schmidt, I. Kistner, S. Friedrich, P. Bramlage, J. M. Harazny y R. E. Schmieder, «Effects of saxagliptin on early microvascular changes in patients with type 2 diabetes.,» *Cardiovasc Diabetol.*, vol. 13, nº 19, 2014.
- [458] E. Sontag, A. Luangpirom, C. Hladik, I. Mudrak, E. Ogris, S. Speciale y C. L. White, «Altered expression levels of the protein phosphatase 2A ABAc enzyme are associated with Alzheimer disease pathology.,» *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 63, nº 4, pp. 287 - 301, 2004.
- [459] «The DPP4 inhibitor linagliptin protects from experimental diabetic retinopathy.,» *PLoS One.*, vol. 11, nº 12, 2016.
- [460] A. Gonçalves, E. Leal, A. Paiva, E. Teixeira Lemos, F. Teixeira, C. F. Ribeiro, F. Reis y A. F. F. R. Ambrósio, «Protective effects of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor sitagliptin in the blood-retinal barrier in a type 2 diabetes animal model.,» *Diabetes Obes. Metab.*, vol. 14, nº 5, pp. 454 - 463, 2012.
- [461] A. Gonçalves, C. Marques, E. Leal, C. F. Ribeiro, F. Reis, A. F. Ambrósio y R. Fernandes, «Dipeptidyl peptidase- IV inhibition prevents blood retinal barrier breakdown, inflammation and neuronal cell death in the retina of type 1 diabetic rats.,» *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1842, pp. 1454 - 1463, 2014.
- [462] L. S. Goldstein, « Kinesin molecular motors: Transport pathways, receptors, and human disease.,» *PNAS*, vol. 98, nº 13, pp. 6999 - 7003, 2001.
- [463] A. Bringmann, T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. Skatchkov, N. Osborne y A. Reichenbach, « Müller cells in the healthy and diseased retina.,» *Progress in Retinal and Eye Research.*, vol. 25, nº 4, pp. 397 - 424, 2006.
- [464] U. E. Johansson, S. Eftekhari y K. Warfvinge, «A battery of cell- and structure-specific markers for the adult porcine retina.,» *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 58, nº 4, p. 377–389, 2010.
- [465] V. V. Gusel'nikova y D. E. Korzhevskiy, «NeuN as a neuronal nuclear antigen and neuron differentiation marker.,» *Acta Naturae.*, vol. 7, nº 2, pp. 42 - 47, 2015.



