



VNIVERSITAT
DE VALÈNCIA

Programa de Doctorado en Fisiología

TESIS DOCTORAL

**Estudio sobre la capacidad protectora
del polifenol natural pterostilbeno
frente a la retinopatía diabética**

Presentada por:

IVÁN MILLÁN YÁÑEZ

Dirigida por:

Dr. Ángel Luis Ortega Valero

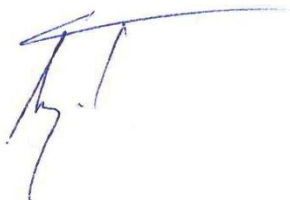
Enero 2021

D. **ÁNGEL LUIS ORTEGA VALERO**, Profesor titular del
Departamento de Fisiología de la Universitat de València

CERTIFICA:

Que la presente memoria, titulada “**Estudio sobre la capacidad protectora del polifenol natural pterostilbeno frente a la retinopatía diabética**”, corresponde al trabajo realizado bajo su dirección por D. **IVÁN MILLÁN YÁÑEZ**, para su presentación como Tesis Doctoral en el Programa de Doctorado en Fisiología de la Universitat de València.

Y para que así conste a los efectos oportunos, firma el presente certificado en Valencia, a 18 de enero de 2021.

A handwritten signature in blue ink, consisting of a horizontal line at the top, followed by a vertical line that curves to the left, and another vertical line that curves to the right, ending in a small hook.

Fdo. Ángel Luis Ortega Valero

AGRADECIMIENTOS

No ha sido nada fácil recorrer el camino hasta llegar a este punto. Muchos son los problemas y dudas que surgen durante el desarrollo de una tesis doctoral, pero son en estos duros momentos donde emergen las personas verdaderamente importantes en la vida, las que te brindan todo el apoyo y ayuda necesaria para seguir adelante y superar cada obstáculo. Es por ello que una parte de mí siempre estará en deuda con todas ellas, a las que quiero agradecer que me hayan acompañado en este viaje.

Tengo que agradecer en primer lugar a mi director/tutor/amigo Ángel el haber llegado al final de esta etapa. Eres el gran causante de que haya decidido embarcarme en el duro e inestable, pero a la vez apasionante y gratificante mundo de la ciencia. Depositaste desde el principio ciegamente toda tu confianza en un chico que apenas había empezado a dar sus primeros pasos en un laboratorio, y gracias a ello, el aprendizaje ha sido meteórico. Me enseñaste a trabajar, a valerme por mí mismo, en resumen, a crecer como persona.

Por supuesto dar las gracias a Isabel Torres, o como te conocemos los amigos, Chabeli. Sin ti seguramente no estaría escribiendo estas palabras, y nunca podré terminar de agradecerte todo lo que haces por mí día a día. Comenzaste siendo una gran amiga para terminar convirtiéndote en una gran “jefa”, y cierto es que no podría pedir más. En uno de los momentos más duros me diste la oportunidad de crecer como investigador, de permanecer en este camino sin tirar la toalla. Contigo he aprendido el verdadero significado de la palabra esfuerzo, de lo que realmente es trabajar para perseguir tus metas, que nadie te regalará nada, y que con sacrificio se crece en esta vida. Espero poder devolverte el favor de apostar por mí y no decepcionarte.

No puedo hablar de Isabel sin mencionar al Dr. Máximo Vento. Gracias por toda la confianza que has depositado en mí, por brindarme la oportunidad de ser parte del grupo de Perinatología, de mostrarme lo que es la excelencia científica y la posibilidad de trabajar junto a científicos tan válidos. Espero que nos deparen grandes éxitos en el futuro y tenga la posibilidad de disfrutar del aprendizaje que me brindas durante el máximo tiempo posible.

Agradecer a toda mi familia, en especial a mis padres por su apoyo incondicional. No existen las palabras que puedan expresar la suerte que tengo de teneros. Habéis sido y sois el pilar en el que he sustentado mi vida. Muchos han sido los momentos críticos en los que he querido renunciar, como tantos otros han sido los que me habéis sujetado y animado para seguir en el camino. Parecía que esta tesis no iba a acabar nunca, pero siempre habéis estado ahí para darme el empujón que necesitaba.

A mi hermano, una de las personas más inteligentes y capaces que conozco, espejo en el que siempre me he querido reflejar. La diferencia de edad me ha hecho estar siempre por detrás, ya sea para lograr un grado, un máster, el doctorado o un trabajo, pero que gracias a ello me has enseñado a superarme y no rendirme.

Tan importante es el trabajo duro como el ambiente en que se desarrolla. Es por ello que tengo que agradecer a todo el laboratorio de Fisiología el buen ambiente generado durante estos años, las risas diarias tanto dentro como fuera del laboratorio, y donde nada habría sido igual sin ir a trabajar con una sonrisa cada día.

Llevar a cabo un doctorado al tiempo que se trabaja no es tarea sencilla, pero estar junto a grandes personas lo hace más fácil. Por ello, tengo que mencionar a mis compañeros del grupo de Perinatología del IIS La Fe, donde el esfuerzo y ganas que muestran en su trabajo son motivo de orgullo y motivación.

No quiero olvidarme del laboratorio de Neurobiología Comparada del Dr. García Verdugo. Reconozco la suerte que he tenido de conocerlos y trabajar junto a vosotros, no puedo referirme a vosotros como compañeros, sino como amigos. Espero poder seguir teniendo el privilegio de trabajar a vuestro lado por mucho más tiempo.

Por último, mencionar a mis amigos y toda la gente que me ha animado en el transcurso de esta etapa, tanto a los que lo hacían con halagos, como a los que me incentivaban diciéndome que no sería capaz de lograrlo.

A todos ellos, muchísimas gracias por haberos cruzado en mi vida.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS	
ABREVIATURAS.....	
ÍNDICE DE FIGURAS	
ÍNDICE DE TABLAS	
RESUMEN.....	
INTRODUCCIÓN.....	
1. DIABETES MELLITUS.....	3
1.1 Tipos de diabetes mellitus	4
1.2 Complicaciones de la diabetes mellitus: Retinopatía diabética.....	5
1.2.1 Epidemiología e impacto económico sociosanitario de la retinopatía diabética.....	6
2. RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	8
2.1 Etiología	8
2.1.1 Formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno: generalidades	8
2.2 Retinopatía diabética y estrés oxidativo	12
3. BIOMARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	15
3.1 Biomarcadores del estado oxidativo. Ratio glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG).....	16
3.2 Biomarcadores de oxidación proteica	16
3.2.1 Carbonilación proteica.....	17
3.2.2 Oxidación y nitración de la tirosina.....	18
3.3 Biomarcadores de oxidación lipídica	18
3.4 Biomarcadores de oxidación al ADN.....	19

4.	CARACTERÍSTICAS ANATOMOFISIOLÓGICAS DE LOS COMPONENTES RETINIANOS	20
4.1	Retina.....	21
4.2	Vascularización retiniana	23
4.3	Barrera hematorretiniana	24
5.	CLASIFICACIÓN Y COMPLICACIONES DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	28
5.1	Retinopatía diabética no proliferativa	30
5.2	Retinopatía diabética proliferativa	31
6.	MECANISMOS MOLECULARES Y FISIOPATOLÓGICOS EN EL DESARROLLO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	33
6.1	Rutas moleculares en el desarrollo de la RD.....	36
6.1.1	Ruta de los polioles.....	36
6.1.2	Vía de los productos finales de glucosilación avanzada.....	38
6.1.3	Ruta de las hexosaminas.....	39
6.1.4	Vía de la proteína quinasa C.....	40
6.1.5	Sistema renina-angiotensina	41
6.1.6	Micro ARN.....	44
7.	DIAGNÓSTICO	45
8.	TRATAMIENTO.....	48
8.1	Tratamiento farmacológico	50
8.1.1	Tratamiento anti-VEGF.....	51
8.1.2	Administración de corticosteroides	51
8.1.3	Bloqueadores del sistema renina-angiotensina.....	53
8.2	Terapia láser	53
8.3	Intervención quirúrgica	55
9.	POLIFENOLES NATURALES CONTRA LA RETINOPATÍA DIABÉTICA	56
9.1	Polifenoles. Origen y clasificación.....	57
9.2	Aplicaciones biomédicas de los polifenoles.....	60

9.3 Pterostilbeno: Origen y estructura química	61
OBJETIVOS	63
MATERIAL Y MÉTODOS.....	67
1. Modelo animal	69
1.1 Inducción de diabetes	69
1.2 Tratamiento de los animales de experimentación.....	70
1.3 Control de la glucemia y el peso.....	71
2. Ensayo farmacocinético de pterostilbeno fosforilado	71
3. Obtención y preparación de muestras	72
4. Análisis bioquímico de plasma de conejo.....	73
5. Ensayos retinográficos	74
6. Análisis de la tortuosidad.....	74
7. Detección y cuantificación de apoptosis (TUNEL-HRP).....	75
8. Determinación de actividades enzimáticas antioxidantes	76
8.1 Catalasa.....	76
8.2 Glutatión peroxidasa.....	77
8.3 Superóxido dismutasa.....	78
8.4. Cuantificación de proteínas	79
9. Determinación del estado oxidativo de las retinas.....	80
9.1 Biomarcadores de estrés oxidativo determinados por UPLC MS/MS	80
9.1.1 GSH/GSSG.....	81
9.1.2 Isoprostanos.....	82
9.1.3 Medición de tirosinas en retina.....	85
9.1.4 Cuantificación proteica de los homogenados	86
9.2 Peroxidación lipídica: 4-hidroxinonal.....	87
9.3 Carbonilación de proteínas	88
9.4 Determinación de peróxido de hidrógeno.....	89
10. Cultivos celulares.....	89

10.1	Estudios de viabilidad celular	90
10.2	Cultivo de la línea celular cAMPNomad GLP1R HEK293.....	91
10.3	Inmunocitoquímica de NRF2.....	91
10.4	Elevación de los niveles de expresión de NQO1 a través de la vía PI3K/GSK3 β	92
11.	Estracción de proteínas y análisis <i>western blot</i>	92
12.	Análisis de expresión génica.....	94
12.1	Extracción de ARN.....	94
12.2	Retrotranscripción de ARN a ADNc (RT-PCR).....	95
12.3	Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT- PCR)	96
13.	Marcaje inmunocitoquímico. Inmunofluorescencia de GLP1R.....	97
14.	Análisis estadístico	97
RESULTADOS	99
1.	Análisis de los efectos del pterostilbeno frente a la exposición a altos niveles de glucosa en pericitos y células endoteliales de retina humana.....	101
2.	Análisis farmacocinético plasmático del pterostilbeno tras la administración subcutánea de su derivado fosforilado	103
3.	Evaluación del peso corporal y niveles de glucosa en sangre.....	105
4.	Análisis de la toxicidad inducida por el tratamiento.....	106
5.	Determinación de la tortuosidad en los vasos sanguíneos de retina de conejo	107
6.	Análisis de la apoptosis en las retinas de los animales de experimentación	110
7.	Análisis de los niveles de ERK en las retinas experimentales.....	112
8.	Estudio del efecto del pterostilbeno frente al estrés oxidativo inducido en las retinas diabéticas.....	113
8.1	Determinación de los niveles de H ₂ O ₂ en cultivos HREC y en retinas de conejo, en función de los niveles de glucosa.....	114
8.2	Determinación del daño oxidativo a proteínas.....	116
8.3	Determinación del daño oxidativo a lípidos	118

9. Análisis de la capacidad del pterostilbeno de modular las defensas antioxidantes	121
9.1. GSH <i>in vitro</i>	121
9.2 GSH <i>in vivo</i>	123
9.3 Actividades de las principales enzimas antioxidantes	125
10. Mecanismos moleculares implicados en el papel antioxidante del pterostilbeno.....	126
10.1 Análisis de la vía; NRF2.....	126
10.2 Cascada molecular PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2	128
11. Reflejo de la activación de NRF2 en la subida de los niveles de NQO1 <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	130
12. Papel de GLP1R como receptor de Pter y activador de la cascada metabólica	132
DISCUSIÓN.....	137
CONCLUSIONES.....	157
BIBLIOGRAFÍA	161
ANEXO.....	201

ABREVIATURAS

•NO:	Óxido nítrico.
3Cl-Tyr:	3-clorotirosina.
3-NO-Tyr:	3-nitrotirosina.
4-HNE:	4-hidroxinonenal.
8-OHdG:	8-hidroxi-2'-desoxiguanosina.
8-oxodG:	8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina.
AA:	Ácido araquidónico.
ACE:	Enzima convertidora de angiotensina (angiotensin-converting enzyme).
AGEs:	Productos finales de glucosilación avanzada (advanced glycation end products).
AGPI:	Ácidos grasos poliinsaturados.
Ang II:	Angiotensina 2.
AT1R:	Receptor de angiotensina tipo 1.
AT2R:	Receptor de angiotensina tipo 2.
ATP:	Trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate)
BAB:	Barrera hematoacuosa (blood aqueous barrier).
BHE:	Barrera hematoencefálica.
BRB:	Barrera hematorretiniana (blood retinal barrier).

BSA:	Albúmina de suero bobino (bovine serum albumin).
CAT:	Catalasa.
CNE:	Capa nuclear externa.
CNI:	Capa nuclear interna.
DAG:	Diacilglicerol.
DAPI:	4,6-diamidino-2-feniindol, diclorhidrato.
DM:	Diabetes mellitus.
DM1:	Diabetes mellitus tipo 1.
DM2:	Diabetes mellitus tipo 2.
EMD:	Edema macular diabético.
EPR:	Epitelio pigmentario de la retina.
ETDRS:	Estudio del tratamiento precoz de la retinopatía diabética (Early Treatment Diabetic Retinopathy Study).
FN:	Fibras nerviosas.
FPR:	Fotocoagulación panretiniana.
FR:	Capa fotoreceptora.
GAPDH:	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa.
GDRPG:	Grupo mundial de proyectos de retinopatía diabética (Global Diabetic Retinopathy Project Group).
GFAT:	Fructosa-6-fosfato amidotransferasa.

GLP1R:	Receptor del péptido 1 similar al glucagón (glucagon-like peptide-1).
GlucN-6-P:	Glucosamina 6-fosfato.
GPx:	Glutación peroxidasa.
GR:	Glutación reductasa.
GSH:	Glutación reducido.
GSSG:	Disulfuro de glutación.
H4B:	Histona 4B.
HbA_{1c}:	Hemoglobina glicosilada.
HCIO:	Ácido hipocloroso.
HG:	Alta glucosa (high glucose).
HIF-1α:	Factor inducible por la hipoxia-1 (hypoxia inducible factor).
HPLC-MS/MS:	Cromatografía líquida-espectrometría de masas (Liquid chromatography–mass spectrometry).
HREC:	Células endoteliales de retina humana (Human Retinal Endothelial Cells).
HRP:	Pericitos de retina humana (Human Retinal Pericytes).
iBRB:	Barrera hematorretiniana interna (inner blood-retina barrier).
IL-1β:	Interleucina-1 β .
IPL:	Capa plexiforme interna.

IsoPs:	Isoprostanos.
L[•]:	Radical lipídico.
LOO[•]:	Peróxido de lípidos.
LOOH:	Hidroperóxido de lípido.
MDA:	Malondialdehído.
NF-κB:	Factor nuclear kappa B.
NOS:	Óxido nítrico sintasa.
NQO1:	NAD(P)H deshidrogenasa quinona 1 (NAD(P)H Quinone Dehydrogenase 1).
NRF2:	Factor nuclear eritroide 2.
O₂^{•-}:	Radical superóxido.
oBRB:	Barrera hematorretiniana externa (outer blood-retinal barrier).
OGT:	ON-Acetil-GluN transferasa.
OH[•]:	Radical hidroxilo.
ONCE:	Organización Nacional de Ciegos Españoles.
ONOO[•]:	Peroxinitrito.
PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas (platelet derived growth factor).
Phe:	Fenilalanina.
PKC:	Proteína quinasa C (protein kinase C).

PLE:	Capa plexiforme externa.
PMA:	Forbol 12-miristato 13-acetato.
PRR:	Receptor (pro) renina.
Pter:	Pterostilbeno.
RAGE:	Receptor para el producto final de glicación avanzada.
RAS:	Sistema renina-angiotensina (renin-angiotensin system).
RD:	Retinopatía diabética.
RDNP:	Retinopatía diabética no proliferativa.
RDP:	Retinopatía diabética proliferativa.
Resv:	Resveratrol.
RL:	Radicales libres.
RNS:	Especies reactivas de nitrógeno (reactive nitrogen species).
ROS:	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species).
SOD:	Superóxido dismutasa.
SOD2:	Superóxido dismutasa mitocondrial.
SOG:	Sobrecarga oral de glucosa.
STZ:	Estreptozotocina.
TJs:	Uniones estrechas (tight junctions).
TNF-α:	Factor de necrosis tumoral alfa.

UDP-GlcNAc:	Difosfato uracil-N-acetilglucosamina.
VEGF:	Factor endotelial de crecimiento vascular (vascular endothelial growth factor).
VLEG:	Grupo de expertos en pérdida de la visión (Vision Loss Expert Group).
γ-Glu-Cys:	γ -glutamilcisteína.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fosforilación oxidativa, producción de ROS, RNS y defensas antioxidantes enzimáticas	11
Figura 2. Reacciones de las principales enzimas antioxidantes en la eliminación de especies oxidantes.....	13
Figura 3. Estructura anatómica del ojo humano.....	20
Figura 4. Composición estructural de las diferentes partes que forman la retina humana.....	22
Figura 5. Representación de la vasculatura retiniana	24
Figura 6. Esquema de la barrera hematoacuosa del ojo.....	25
Figura 7. Esquema de barrera hematorretiniana interna	26
Figura 8. Representación de la barrera hematorretiniana externa.....	27
Figura 9. Clasificación RDNP.....	29
Figura 10. Clasificación RDP	30
Figura 11. Vías bioquímicas clásicas involucradas en la glucotoxicidad de la patogénesis de la RD.....	35
Figura 12. Ruta de los polioles.....	37
Figura 13. Descripción general del RAS y sus acciones sobre la vasculatura retiniana	43
Figura 14. Árbol de decisión en el tratamiento sugerido para el escenario clínico de RDP.....	49
Figura 15. Clasificación de los polifenoles	59
Figura 16. Estructura química del Pter y Resv.....	62
Figura 17. Modelo experimental animal diseñado para el estudio del efecto retinoprotector del Pter en la RDNP.....	70
Figura 18. Liberación de Pter tras la administración subcutánea de Pter fosforilado	71

Figura 19. Obtención y conservación de las muestras de estudio.....	73
Figura 20. Retinógrafo GENESIS-D (Kowa).....	74
Figura 21. Método de análisis de la tortuosidad vascular retiniana.....	75
Figura 22. Detección de ADN fragmentado mediante TUNEL-HRP	76
Figura 23. Reacción kit catalasa.	77
Figura 24. Reacción GPx.....	78
Figura 25. Reacción kit SOD.....	79
Figura 26. Esquema funcionamiento HPLC/MS/MS.	81
Figura 27. Estructura química de analitos y patrón interno	84
Figura 28. Determinación por Elisa competitiva de 4-HNE	87
Figura 29. Líneas celulares empleadas en los estudios in vitro.	90
Figura 30. Extracción de ARN mediante el método fenol-cloroformo	95
Figura 31. Análisis de la capacidad citoprotectora del Pter en cultivos HREC	101
Figura 32. Análisis de la capacidad citoprotectora del Pter en cultivos HRP	102
Figura 33. Estructuras químicas y niveles plasmáticos de Pter tras la administración de sal disódica fosforilada del polifenol	104
Figura 34. Pesos corporales y niveles de glucosa en sangre desde el día previo a la inducción de diabetes y durante las 6 semanas de tratamiento	105
Figura 35. Imágenes retinográficas de los animales de experimentación	108
Figura 36. Tortuosidad en los vasos de la retina en conejo control, diabético y diabético-tratado tras 6 semanas de la inducción de diabetes	109
Figura 37. Análisis de la muerte celular programada in vivo.....	111
Figura 38. Western blot y densitometría pERK1/2 en retina.....	113
Figura 39. Niveles de H ₂ O ₂ presentes in vitro en medios de cultivo de células HREC y en retinas de conejo in vivo.....	115

Figura 40. Efecto del tratamiento con Pter sobre la modificación de tirosinas en retinas de conejo	116
Figura 41. Niveles de proteínas carboniladas presentes en las retinas de los diferentes grupos animales experimentales.....	117
Figura 42. Determinación de los niveles de 4-HNE en retinas de conejo	118
Figura 43. Diagramas de cajas de compuestos de lipoperoxidación	120
Figura 44. Fluorescencia de GSH presente en células HREC	122
Figura 45. Concentraciones de GSH, GSSG y ratio GSH/GSSG en retinas de conejo	123
Figura 46. Niveles de γ -Glu-Cys y expresión de las enzimas encargadas de su síntesis	124
Figura 47. Efecto del Pter sobre la activación de las principales enzimas antioxidantes en conejos diabéticos	125
Figura 48. Translocación nucleo-citosol de NRF2 en células HREC	128
Figura 49. Western blot y densitometrías de la vía PI3K/AKT/GSK3 β en retinas de conejo.....	129
Figura 50. Niveles de ARN de NQO1 en HREC después de 24h.....	130
Figura 51. Western blot y densitometrías de NQO1 en retina de conejo	131
Figura 52. Implicación de GLP1R en el efecto del Pter sobre la activación de la vía PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2	134
Figura 53. Inmunofluorescencia contra GLP1R en retinas de conejos.....	135
Figura 54. Ruta molecular de acción del Pter.....	156

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Clasificación clínica internacional de la RD (GDRPG).....</i>	29
<i>Tabla 2. Recomendaciones clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la RD</i>	47
<i>Tabla 3. Farmacoterapia de la RD y el EMD.</i>	50
<i>Tabla 4. Polifenoles presentes en distintos de alimentos</i>	59
<i>Tabla 5. Anticuerpos usados para western blot.</i>	93
<i>Tabla 6. Primers para RT-PCR de los genes sometidos a estudio.</i>	96
<i>Tabla 7. Medidas bioquímicas en muestras de plasma de conejo de seis semanas tras el inicio del estudio.</i>	107

RESUMEN

La Organización Mundial de la Salud estima que el número de pacientes diabéticos se ha multiplicado por cuatro en los últimos cuarenta años. El estrés oxidativo generado por la diabetes y el mal control metabólico, juegan un papel clave en el desarrollo de la retinopatía diabética (RD), una complicación diabética común que genera pérdida de visión y en el peor de los casos, ceguera. La gran problemática de esta patología reside en que permanece asintomática hasta que alcanza estadios avanzados, complicándose así su tratamiento. Otro contratiempo añadido a la RD son los inconvenientes en sus tratamientos. Las inyecciones intravítreas anti-VEGF o la fotocoagulación con láser. Estos presentan una administración incómoda para los pacientes, además de numerosos efectos secundarios a largo plazo. Por ello es importante enfocar la investigación en la prevención de esta enfermedad con la búsqueda de terapias alternativas.

El presente estudio muestra al pterostilbeno (Pter), un estilbeno natural con gran actividad antioxidante y con efectos beneficiosos en diferentes patologías, incluida la diabetes, como un tratamiento preventivo del desarrollo de RD. Para este trabajo se marcaron como objetivos analizar la capacidad protectora y/o terapéutica del Pter frente a las alteraciones retinianas inducidas por la hiperglucemia, y su posible mecanismo de acción en un modelo experimental animal de diabetes tipo I. Para ello se realizaron ensayos *in vitro* en diferentes líneas celulares de origen retiniano, e *in vivo* en conejos New Zealand con diabetes tipo I inducida.

El Pter protegió las retinas de los conejos diabéticos contra el daño inducido por altos niveles de glucosa en sangre. El polifenol redujo el daño oxidativo de lípidos y proteínas, disminuyó la neurotoxicidad retiniana, y

recuperó la actividad de las principales enzimas antioxidantes, mejorando de esta manera el estado redox. Además, la regulación redox por Pter se asoció con la activación de la vía PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2 y la inhibición de ERK1/2. También se presenta al Pter como un agonista GLP1R, que es capaz de inducir la activación de esta vía protectora. Nuestros resultados muestran, por tanto, que el Pter es un poderoso agente protector que puede retrasar el desarrollo temprano de la RD.

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) se define como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por una hiperglucemia crónica, consecuencia de una deficiencia en la acción y/o secreción de insulina por parte del páncreas (Kharroubi y Darwish 2015).

Según los últimos datos publicados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) a fecha de 2018, el número de personas que presentan DM ha pasado de 108 millones en 1980, a 422 millones en 2014, y la prevalencia en adultos mayores de 18 años del 4,7% al 8,5%. Se valora que la DM, de forma directa, causó 1,6 millones de muertes en 2016, estimándose que fue la séptima causa de mortalidad (OMS 2020).

Por su parte, la Federación Internacional de Diabetes estimó en 2015 que la prevalencia de DM en la población mundial de 20 a 79 años era de un 8,8% y que generaba un gasto de 587.000 millones de €. Se estima que en la actualidad hay 451 millones de personas adultas con DM y que ocasiona 5 millones de muertes entre causas directas e indirectas (Ruiz-García *et al.* 2019). Es la tercera causa de muerte entre las mujeres españolas y la séptima entre los varones (Ruiz-Ramos *et al.* 2006). Para el año 2040 se prevé que un 10,4% de la población mundial (642 millones de personas) tendrá DM y que generará un gasto en salud de más de 660.000 millones de € (Ruiz-García *et al.* 2019).

En España, según el estudio SECCAID (del inglés *Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes*), el coste directo anual de la DM fue de 5.809 millones de €, que resultó el 8,2% del gasto sanitario. Los costes farmacológicos representaron el 38% de este gasto, seguido de un 33% los hospitalarios. Los costes de la DM en atención primaria (consumo de tiras reactivas, determinaciones trimestrales de HbA1c (hemoglobina glicosilada), una visita anual a oftalmología, 8 visitas anuales con enfermería y 4 con el médico de

familia) fue de 1.463 millones de €. El coste total de complicaciones en general fue de 2.143 millones de € (Crespo *et al.* 2013; Ruiz-García *et al.* 2019).

Los costes de la DM representan una proporción muy elevada del total del gasto sanitario español, siendo imprescindible introducir estrategias y medidas para mejorar la eficiencia en el control y el tratamiento de la DM para reducir así sus complicaciones y los enormes costes humanos y económicos asociados a la enfermedad.

1.1 Tipos de diabetes mellitus

La DM es un trastorno metabólico complejo que se asocia con resistencia a la insulina, señalización de insulina alterada, disfunción de las células β , niveles anormales de glucosa, metabolismo lipídico alterado, inflamación subclínica y aumento del estrés oxidativo (Testa *et al.* 2016). La mayoría de los casos de diabetes pueden encuadrarse en dos grandes categorías: DM tipo 1 (DM1), un trastorno autoinmune crónico en el que el sistema inmunitario ataca las células β pancreáticas, lo que resulta en un déficit absoluto en la secreción de insulina, hiperglucemia crónica y complicaciones a largo plazo, y DM tipo 2 (DM2), cuya causa es una combinación entre una resistencia a la acción de la insulina y una respuesta compensatoria de insulina inadecuada e hiperglucemia (C. Chen *et al.* 2017; T. Wu *et al.* 2018). No obstante, la clasificación de la diabetes en un individuo concreto depende a menudo de las circunstancias presentes en el momento del diagnóstico, por lo que en muchas ocasiones es difícil la clasificación dentro de un solo grupo.

1.2 Complicaciones de la diabetes mellitus: Retinopatía diabética

Las complicaciones de la DM son la principal causa de discapacidad y muerte en los pacientes diabéticos (H. Chen *et al.* 2018). Estas pueden dividirse en complicaciones agudas y crónicas. Las complicaciones agudas incluyen hipoglucemia, cetoacidosis diabética, estado hiperosmolar hiperglucémico, coma diabético, convulsiones o pérdida de conciencia. La hiperglucemia crónica de la DM se asocia con daño y disfunción a largo plazo de diferentes órganos, relacionándose con complicaciones específicas como retinopatía diabética (RD) con pérdida potencial de visión, nefropatía que conduce a insuficiencia renal, y neuropatía autonómica, causando síntomas gastrointestinales, genitourinarios y cardiovasculares, y predispone al riesgo de úlceras en los pies y amputaciones (American Diabetes Association 2014). Además, los pacientes con DM presentan un aumento en la incidencia de la enfermedad arteriosclerótica cardiovascular, enfermedad arterial periférica y cerebrovascular (Strain y Paldánus 2018). La DM también se ha asociado a un aumento de los índices de cáncer (Carstensen, Jørgensen, y Friis 2014).

La RD es la enfermedad ocular diabética más común. Esta se da cuando hay cambios en los vasos sanguíneos en la retina. Esta complicación neurovascular es consecuencia de la exposición a la hiperglucemia crónica. La pérdida del control homeostático glucémico puede afectar a todas las estructuras anatómicas oculares, sin embargo, la retina es especialmente sensible, por lo que es la estructura ocular más afectada en el desarrollo de la RD (Aiello, Silva, y Sun 2012; Wong *et al.* 2016).

Generalmente afecta a ambos ojos y las personas que la padecen no se dan cuenta de los cambios en su visión durante las primeras etapas de la enfermedad, pero a medida que avanza causa una pérdida de visión que en

muchos casos no puede revertirse (American Academy of Ophthalmology 2019). Si bien la mejor atención de la DM ha mejorado los resultados, la enfermedad sigue siendo una importante y frecuente causa de ceguera.

1.2.1 Epidemiología e impacto económico sociosanitario de la retinopatía diabética

Con la creciente incidencia global de DM tanto en países desarrollados como en desarrollo, la RD también ha aumentado su prevalencia. Si tomamos como referencia los datos aportados por la OMS de 422 millones de personas afectadas por DM en todo el mundo (OMS 2020), se estima que al menos un tercio de ellas muestra evidencia de RD. Esta patología está presente en el 21% de los diabéticos en el momento del diagnóstico de la DM, siendo además la causa principal de ceguera en el mundo occidental entre la población adulta de 20 a 74 años (Pedro-Botet, Benaiges, y Pedragosa 2012). Poniendo a EE.UU como ejemplo, la RD causa entre 12.000–24.000 nuevos casos de ceguera cada año (Centers for Disease Control and Prevention 2020). El riesgo relativo de padecer ceguera es 20 veces mayor entre la población con diabetes, y aproximadamente el 2% de los pacientes diabéticos perderán la visión completamente después de 15 años y el 8% presentará algún grado de RD (Gómez-Ulla *et al.* 2002).

En referencia a España, la RD sigue siendo una importante causa de ceguera. Entre las personas con DM, la prevalencia oscila entre el 4 y el 11%. La RD proliferativa (RDP) entre el 4 y el 6% y del edema macular diabético (EMD) entre el 1,4 y el 7,9% en la población diabética (Vila, Viguera, y Alemán 2008). Según la Organización Nacional de Ciegos Españoles (ONCE), entre el total de sus afiliados, el 5,3% padece RD, y ocupa el quinto lugar entre las causas más frecuentes de ceguera o disminución de la visión (ONCE 2019).

La RD representa un alto coste social y sanitario. Si bien es cierto que como enfermedad crónica carece de influencia sobre la mortalidad de los pacientes diabéticos, si perjudica notablemente su calidad de vida, tanto a nivel psicológico y funcional, como laboral. A pesar de la prevalencia en aumento de la enfermedad, es difícil estimar su carga económica real. Este gasto se estima a través de la combinación entre el coste médico anual en el tratamiento de la diabetes, así como de sus complicaciones asociadas. A estos hay que sumar la pérdida en la productividad laboral (Lopez-Bastida *et al.* 2013), ya que las personas afectadas se encuentran en una época de la vida de alta productividad.

Con todo ello, se hace necesario la vigilancia de los cambios en los parámetros de salud pública para implementar mejoras tanto en el análisis de los efectos en las medidas tomadas como en los medios de financiación de la salud pública. En esta línea, el Grupo de Expertos en Pérdida de la Visión (VLEG, del inglés *Vision Loss Expert Group*) se ha comprometido a monitorizar el estado de la visión, deterioro y ceguera en el mundo cada 5 años (IAPB Vision Atlas 2019). Un análisis de datos procedentes de 98 países proporcionado por el VLEG, concluye que la prevalencia global de ceguera y de pérdida visual moderada y severa disminuyó entre 1990 y 2015 de forma marcada para muchas patologías (catarata, degeneración macular, glaucoma...) con la excepción de la RD, que aumentó. De este modo, el número de ciegos por RD se duplicó entre 1990 y 2015 de 200.000 a 400.000. De igual manera, el número de personas con pérdida de agudeza visual moderada o severa por RD pasó de 1,4 millones de personas en 1990 a 2,6 millones en 2015, y se estima que en 2020 esa cifra haya alcanzado los 3,2 millones (Flaxman *et al.* 2017).

Vista la gran problemática asociada a esta enfermedad, el diagnóstico e intervención temprana son cruciales para prevenir o mejorar el desarrollo de la RD. En este sentido, el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos que conducen al desarrollo de la RD, así como la prevención de su progresión a

estadios en los que la lesión retiniana es irreparable, deben ser un objetivo prioritario en la lucha contra esta enfermedad (A. Ahmad y Ahsan 2020).

2. RETINOPATÍA DIABÉTICA

2.1 Etiología

El estrés oxidativo contribuye en gran medida a la patogénesis de la RD, considerándose uno de los factores críticos que intervienen en su etiología. Esta implicación se debe a su capacidad para inducir numerosas alteraciones en las vías bioquímicas esenciales para la fisiología normal. La sobreproducción de ROS inducida por hiperglucemia genera inflamación local, disfunción mitocondrial, apoptosis neural y alteraciones microvasculares (MY. Wu *et al.* 2018). Estas modificaciones son responsables de la progresión de la microangiopatía retiniana y, por tanto, afectan tanto la anatomía como a su función.

2.1.1 Formación de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno: generalidades

El estrés oxidativo y nitrosativo es una condición biológica en la cual, existe un desequilibrio entre la formación y la destrucción de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés *reactive oxygen species*) y del nitrógeno (RNS, del inglés *reactive nitrogen species*) (Koopman *et al.* 2010).

Dentro de las ROS se engloban especies no radicalarias y radicalarias, conocidas como radicales libres (RL). Los RL pueden definirse como especies químicas que contienen un único electrón desapareado en su capa de valencia más externa y tienen la capacidad de existir de forma independiente, lo que los hace inestables, de corta duración y altamente reactivos. Debido a la presencia

de este electrón desaparejado, estas especies pueden experimentar fácilmente reacciones químicas que implican donación o aceptación de un electrón de otros compuestos químicos (Lobo *et al.* 2010). Normalmente, a nivel celular se producen varios tipos de RL como resultado de la reacción en cadena de transporte de electrones en las mitocondrias, varios procesos metabólicos y otros medios, como la exposición a ciertas sustancias exógenas como rayos X, excesiva radiación UV, condiciones de estrés a largo plazo, ejercicio físico intenso, dieta inadecuada, gas ozono, fumar etc (Pisoschi y Pop 2015).

Entre los ROS de mayor efecto biológico se encuentran el radical superóxido ($O_2^{\bullet -}$), el radical hidroxilo (OH^{\bullet}), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), radical hidroperóxido y el oxígeno singlete (Kehrer y Klotz 2015).

Podemos encontrar ROS en condiciones fisiológicas, donde existe un equilibrio entre su generación y la eliminación del cuerpo (Martínez-Leo y Segura-Campos 2019). Por ejemplo, los ROS actúan como moléculas señalizadoras que inducen la diferenciación celular y la apoptosis, contribuyendo así al proceso de envejecimiento natural. También participan en la contracción muscular, la regulación del tono vascular y determinan la actividad bactericida y bacteriostática (Ray, Huang, y Tsuji 2012).

En la respiración aeróbica se produce la fosforilación oxidativa, un proceso metabólico mediante el cual las enzimas respiratorias de las mitocondrias sintetizan adenosina trifosfato (ATP) a partir de moléculas orgánicas, como carbohidratos, ácidos grasos o aminoácidos. La oxidación es una parte esencial de la vida aeróbica ya que proporciona energía para el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo de organismos multicelulares (Campbell 2017). El dióxígeno (O_2) tiene propiedades paramagnéticas y, por lo tanto, se somete a un proceso de reducción lenta para adquirir los cuatro electrones necesarios para estabilizar su órbita externa. Sin embargo, en

presencia de metales de transición (por ejemplo, hierro, cobre, zinc, manganeso y selenio), el oxígeno se convierte en RLs altamente reactivos, que oxidan rápidamente a otras moléculas alterando sus estructuras y funciones (Lobo *et al.* 2010). En condiciones normoglucémicas, una pequeña fracción de los electrones utilizados para generar el gradiente de protones y producir ATP, son absorbidos por el oxígeno en los complejos I y III formando el $O_2^{\bullet -}$. De hecho, la cadena de transporte de electrones mitocondrial es la fuente principal de ROS (Wright *et al.* 2004).

El $O_2^{\bullet -}$ es poco reactivo, pero potencialmente tóxico por los intermediarios que puede producir. Entre ellos se encuentra el H_2O_2 , producido por la reducción del $O_2^{\bullet -}$, reacción catalizada por la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2). El H_2O_2 no es un RL, pero a partir de él se produce OH^{\bullet} mediante la reacción de Fenton. Esta reacción se encuentra catalizada por iones de metales de transición como iones de hierro y cobre (Figura 1). El OH^{\bullet} es altamente reactivo, y presenta una semivida corta (Dixon y Stockwell 2014). Además, existen otras enzimas con capacidad de generar ROS como la xantina oxidasa (XO) y la NADPH oxidasa (NOX) (Sies, Berndt, y Jones 2017).

Las mitocondrias también son productoras de RNS a través de la óxido nítrico sintasa mitocondrial (mtNOS), ubicada en la membrana interna de las mitocondrias. Esta enzima cataliza la oxidación de L-arginina a citrulina y óxido nítrico ($\bullet NO$). Bajo el estímulo adecuado, la mitocondria genera una descarga de ROS en el citoplasma e induce la liberación de calcio (Ca^{2+}) desde el retículo endoplásmico. Las mitocondrias actúan como amortiguadores de Ca^{2+} secuestrando su exceso del citosol, lo cual aumenta la concentración en su interior, estimulando la producción de $\bullet NO$ por la mtNOS (Aguirre, López-Bernardo, y Cadenas 2012). Dado que el $\bullet NO$ generado en el citosol difunde

libremente a las mitocondrias, las isoformas NOS del citoplasma también están involucradas en la producción de $\cdot\text{NO}$ intramitocondrial. Los $\text{O}_2^{\cdot-}$ reaccionan con el $\cdot\text{NO}$ y producen peroxinitritos (ONOO^\bullet), una RNS muy agresiva que causa modificaciones irreversibles de los componentes mitocondriales, e induce el estrés nitrativo que contribuye a la disfunción mitocondrial (Cardinali *et al.* 2013) (Figura 1).

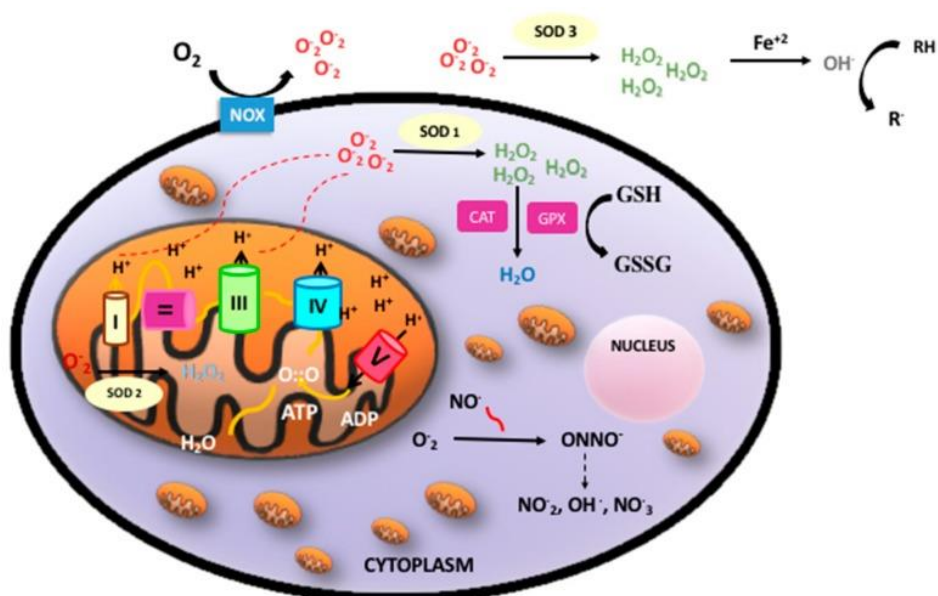


Figura 1. Fosforilación oxidativa, producción de ROS, RNS y defensas antioxidantes enzimáticas (Millán *et al.* 2018).

El estrés oxidativo y nitrosativo a nivel mitocondrial produce la oxidación de proteínas y la formación de radicales lipídicos (L^\bullet) que pueden reaccionar con el O_2 y producir radical peróxido de lípidos (LOO^\bullet) e hidroperóxido de lípidos (LOOH). El malondialdehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE) son los productos finales de peroxidación lipídica más conocidos, que tienen efectos mutagénicos y tóxicos respectivamente (Ayala,

Muñoz, y Argüelles 2014; Lismont *et al.* 2015). Además, las ROS/RNS también reaccionan con el ADNmt dañándolo y reduciendo la síntesis de proteínas. La pérdida de proteínas involucradas en el transporte de electrones contribuye a la generación adicional de especies reactivas y un mayor daño en el ADNmt, generándose un sistema de retroalimentación positiva de daño oxidativo/nitrosativo que altera la función mitocondrial (Mehrzadi *et al.* 2020).

2.2 Retinopatía diabética y estrés oxidativo

El cerebro y los tejidos retinianos son los sistemas de mayor demanda energética del cuerpo debido a la actividad neuronal. Con el 2% de la masa corporal total, el cerebro consume el 20% de la tasa metabólica basal, mientras que la retina consume el 8% (Niven y Laughlin 2008). Es por ello que la retina es uno de los tejidos metabólicamente más activos del organismo, por lo que es tremendamente sensible a las alteraciones en los niveles de O₂ (Wangsa-Wirawan y Linsenmeier 2003). Esta alta actividad hace que las células oculares se encuentren constantemente expuestas a una alta interacción con ROS derivados del metabolismo endógeno (alteraciones en la respiración mitocondrial o infecciones virales), así como del medio externo (por la exposición a radiación ultravioleta, metales o el humo de los cigarrillos) (Heintz *et al.* 2010).

Los ROS generados durante la reacción en cadena de transporte de electrones generalmente no dañan las células del cuerpo, siempre que reaccionen oportunamente por los diversos mecanismos de eliminación de oxidantes. Esta producción de ROS es contrarrestada por la existencia de enzimas (catalasa (CAT), glutatión peroxidasa (GPx), SOD, moléculas con capacidad antioxidante (glutatión (GSH), tiorredoxina, NADPH) y moléculas de bajo peso molecular (α -tocoferol, ácido ascórbico y β -caroteno) que frenan la acción de los ROS (Kisic,

Miric, y Zoric 2014). En condiciones normoglucémicas, el $O_2^{\bullet-}$ se detoxifica en la célula mediante el GSH y las enzimas SOD citosólica y mitocondrial, que convierte el $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 , y la CAT y GPx, que convierten el H_2O_2 en agua. El GSH es un eliminador endógeno de ROS y se convierte en GSSG tras la oxidación. El GSSG se recicla de nuevo a GSH utilizando NADPH como cofactor gracias a la acción de la GSH reductasa (GR) (Figura 2). Pero en condiciones de hiperglucemia se genera un exceso de electrones debido al aumento de la generación de $O_2^{\bullet-}$ y ROS. Estos ROS saturan el sistema de respuesta antioxidante endógeno y dañan el ambiente mitocondrial y citoplásmico. También se ha demostrado que el estrés oxidativo inhibe la liberación de ATP estimulante del \dot{NO} de los eritrocitos, lo que contribuye aún más a la disfunción vascular (J. Carroll *et al.* 2006; JS. Carroll *et al.* 2007).

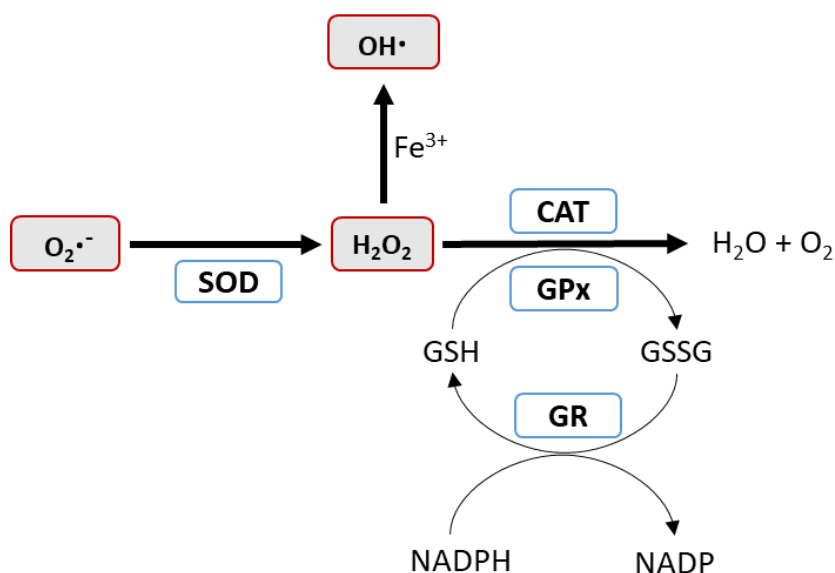


Figura 2. Reacciones de las principales enzimas antioxidantes en la eliminación de especies oxidantes.

El equilibrio redox en la RD, por tanto, se encuentra alterado, y los ROS no pueden ser totalmente neutralizados, lo cual implica daños a diversas proteínas, lípidos, ADN y alteración de la fisiología celular normal, representando una importante amenaza para varias estructuras anatómicas (Cutler 2005; Kowluru 2003). El incremento no homeostático de los niveles de glucosa y la sobreproducción de ROS que desborda las defensas antioxidantes induce neurotoxicidad, un engrosamiento de la membrana basal de los capilares en la retina, un aumento de la permeabilidad vascular, isquemia, aumento en los niveles de factor endotelial de crecimiento vascular (VEGF, del inglés *vascular endothelial growth factor*) y angiogénesis (Romero-Aroca *et al.* 2015; Ushio-Fukai y Nakamura 2008). La formación de nuevos vasos inmaduros y frágiles en la superficie de la retina en estadios avanzados de la enfermedad generan hemorragias vítreas e incluso desprendimientos traccionales de retina, que conducen a pérdidas severas e irreversibles de la visión (Ishida *et al.* 2003).

Además, el estrés oxidativo altera numerosas vías y mecanismos, como el aumento del flujo de la vía poliólica, el aumento de la producción de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs, del inglés *advanced glycation end products*) y la activación de la proteína quinasa C (PKC, del inglés *protein kinase C*), aumentando así las condiciones perjudiciales (Behl, Kaur, y Kotwani 2016). Los efectos sinérgicos de todas las alteraciones mencionadas causan un extenso daño a todas las principales células de la retina: células vasculares (células endoteliales y pericitos), neuronas (fotorreceptores, bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares), glía (células de Müller y astrocitos), microglía y células epiteliales pigmentarias, conduciendo posteriormente a la progresión de la RD (Ahsan 2015).

El estrés oxidativo tiene un efecto particularmente adverso en los sistemas circulatorio, respiratorio y nervioso. Las modificaciones químicas en proteínas (agregación, desnaturalización), lípidos (peroxidación), carbohidratos

y nucleótidos (cambios en la estructura del ADN) causadas por los ROS contribuyen al desarrollo de muchas enfermedades mediadas por ellos, entre las que se encuentra la RD (B. Domènech y Marfany 2020). Por lo tanto, la identificación de biomarcadores de estrés oxidativo y muerte celular en pacientes con DM podría favorecer la predicción, el diagnóstico y la prevención de la RD, y apuntar a nuevas intervenciones terapéuticas.

3. BIOMARCADORES DE DAÑO OXIDATIVO Y NITROSATIVO EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Un biomarcador se ha definido como una molécula biológica que se encuentra en la sangre u otros fluidos corporales o tejidos, y que representa un signo de un proceso normal o anormal de una afección o enfermedad. Por lo tanto, el uso de biomarcadores es útil para ver qué tan bien responde el cuerpo a un tratamiento para una enfermedad o afección. Los biomarcadores pueden ayudar a identificar a las personas con enfermedad subclínica y también a controlar la enfermedad clínica, por ejemplo, para evaluar la respuesta al tratamiento (Simó-Servat, Simó, y Hernández 2016).

El estrés oxidativo y nitrosativo inducen cambios bioquímicos en el suero y los órganos diana de los pacientes diabéticos, incluida la peroxidación lipídica severa, la oxidación de proteínas, el daño oxidativo del ADN y cambios en su estado antioxidante. Por lo tanto, la identificación de los subproductos inducidos por el estrés oxidativo y nitrosativo en el suero, el cuerpo vítreo, el humor acuoso, el tejido fibrovascular en las superficies retinianas, y/o la orina de pacientes diabéticos, podría favorecer la predicción, el diagnóstico y la prevención de complicaciones microvasculares de la diabetes, como la retinopatía (Al-Shabrawey y Smith 2010).

3.1 Biomarcadores del estado oxidativo. Ratio glutatión reducido/oxidado (GSH/GSSG)

El estado antioxidante del paciente diabético juega un papel crucial en la producción de estrés oxidativo y el desarrollo de complicaciones vasculares. El GSH desempeña un papel importante en el mantenimiento del estado redox celular al participar en el intercambio de tiol-disulfuro, que regula una serie de funciones celulares, incluida la expresión génica y la actividad tanto de enzimas individuales como de sistemas enzimáticos. Mientras los niveles de GSH y GSH disulfuro u oxidado (GSSG) son utilizados para la evaluación del estrés oxidativo, el ratio GSH/GSSG es un marcador que representa la capacidad antioxidante de la célula. Mantener una relación GSH/GSSG óptima es esencial para la viabilidad celular. La disminución en la proporción puede servir como un indicador de daño al estado redox celular y de cambios en la regulación génica dependiente del equilibrio redox (DP. Jones y Sies 2015; Kalinina, Chernov, y Novichkova 2014). La alteración del equilibrio intracelular de GSH se observa en varias patologías, incluida la diabetes (Samaha, Said, y Salem 2019).

3.2 Biomarcadores de oxidación proteica

Debido a la gran cantidad de proteínas presentes en el cuerpo, las proteínas representan una gran diana de ROS y RNS. Varios residuos de aminoácidos pueden sufrir modificaciones oxidativas que incluyen: oxidación de residuos que contienen azufre, hidroxilación de grupos aromáticos y alifáticos, nitración de residuos de tirosina, nitrosilación y glutationilación de residuos de cisteína, cloración de grupos aromáticos y grupos amino primarios, y conversión de algunos residuos de aminoácidos a derivados de carbonilo (Davies 2016).

Las modificaciones pueden ser reversibles o no. Si las modificaciones oxidativas de los residuos de proteínas no se reparan o eliminan adecuadamente,

pueden afectar a la estructura tridimensional y las propiedades fisicoquímicas de las proteínas volviéndose tóxicas. Las modificaciones irreversibles de las proteínas incluyen la carbonilación, nitrosilación, ruptura de los anillos de histidina y triptófano, y la hidrólisis del enlace peptídico en presencia de prolina (Marrocco, Altieri, y Peluso 2017). Las modificaciones proteicas más comunes utilizadas como biomarcadores de estrés oxidativo son la carbonilación proteica y la oxidación y nitración de la tirosina.

3.2.1 Carbonilación proteica

La exposición de las proteínas a grupos hidroxilo producto del estrés oxidativo puede originar un proceso de carbonilación proteica con la formación de aldehídos ($RCH=O$) y cetonas ($RR'C=O$) (Morgan, Pattison, y Davies 2012). Las cadenas laterales de los aminoácidos lisina, arginina, prolina y treonina son los principales residuos de aminoácidos susceptibles de producir derivados de carbonilo. Debido a su estabilidad química, la carbonilación de proteínas es un marcador general ampliamente utilizado para medir el daño oxidativo en estudios experimentales y clínicos (Hecker y Wagner 2018).

Otro mecanismo de acción de la proteína carbonilada implica la inhibición de la actividad proteasómica. Las proteínas carboniladas están marcadas para la proteólisis por el proteasoma, pero pueden escapar de la degradación y formar agregados de alto peso molecular que se acumulan con la edad. Dichos agregados carbonilados pueden volverse citotóxicos y se han asociado con una gran cantidad de enfermedades neurodegenerativas, además de la DM (Gonos *et al.* 2018).

3.2.2 Oxidación y nitración de la tirosina

El aminoácido fenilalanina (Phe) en condiciones fisiológicas se convierte en para-tirosina (p-Tyr) por acción de la enzima Phe hidroxilasa (Matayatsuk *et al.* 2007). Tras la reacción con el OH^\bullet , la Phe puede formar dos isómeros de la p-Tyr, la orto-tirosina (o-Tyr) y la meta-tirosina (m-Tyr). En presencia de ONOO^\bullet se produce la nitración de la p-Tyr, que consiste en el reemplazo del átomo de hidrógeno C3 en el anillo aromático de Tyr con un grupo nitro, convirtiéndose en 3-nitrotirosina (3-NO-Tyr) (Bartesaghi *et al.* 2007). Esta modificación puede generarse a través de varias vías que incluyen la reacción con ROS y RNS como ONOO^\bullet y NO_2^\bullet (Souza, Peluffo, y Radi 2008).

El exceso de 3-NO-Tyr se ha propuesto como un biomarcador para enfermedades inflamatorias, utilizándose como un marcador de estrés oxidativo en la retina (Knight *et al.* 2018). Además, el ataque de ácido hipocloroso (HClO) sobre la p-Tyr da lugar a la 3-Clorotirosina (3Cl-Tyr), siendo utilizada como un marcador de inflamación puesto que indica una activación de la enzima mieloperoxidasa (MPO), que transforma el H_2O_2 en HClO (Torres-Cuevas *et al.* 2016).

3.3 Biomarcadores de oxidación lipídica

Se cree que la peroxidación lipídica de las estructuras celulares juega un papel importante en las complicaciones de la DM, especialmente en la RD. Los niveles elevados de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI) y el aumento de la tasa de oxidación de glucosa en la DM hacen que la retina sea susceptible al estrés oxidativo, originando peroxidación lipídica. (Simó-Servat, Simó, y Hernández 2016). Los AGPI, en particular el ácido linoleico y araquidónico (AA), son objetivos importantes de la peroxidación lipídica. Dependiendo del tipo de AGPI

que sufra oxidación pueden ser varios los productos finales formados, principalmente 4-HNE, MDA e isoprostanos (IsoPs); utilizados frecuentemente como biomarcadores de estrés oxidativo. Los aldehídos derivados de la descomposición de los hidroperóxidos (4-HNE, MDA) son muy reactivos y causan daño a proteínas al reaccionar fácilmente con grupos químicos de ciertos aminoácidos como las cisteínas, lisinas e histidinas, formando aductos de Michael, a menudo denominados productos finales de lipoxidación avanzada (Frijhoff *et al.* 2015).

Los IsoPs F2 son una familia de compuestos similares a las prostaglandinas producidos por la peroxidación no enzimática del AA, catalizada por RL independientemente de su grado de esterificación (Morrow *et al.* 1990). De estos, el 8-iso-PGF_{2α} (también conocida como 8-epi-PGF_{2α} o 15-F_{2t}-isoprostano) destaca por sus efectos adversos en el organismo (Khasawneh *et al.* 2008; Morrow, Minton, y Roberts 1992). 8-iso-PGF_{2α} está presente de forma circulante principalmente unido a los fosfolípidos y se libera por la acción de la fosfolipasa A2 (Joy y Cowley 2008).

3.4 Biomarcadores de oxidación al ADN

Los ROS pueden causar daño en el ADN, siendo el OH[•] el responsable de la mayoría de los daños. El OH[•] puede atacar en las pirimidinas al átomo C5 o al átomo de carbono del grupo metilo, al átomo C8 en el caso de las purinas, o al grupo amino de las adeninas (Cadet, Douki, y Ravanat 2010).

De todas las bases nucleicas, la guanina es la más susceptible al estrés oxidativo. Su daño genera dos modificaciones principalmente: 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG) y 8-oxo-7,8-dihidro-2'-desoxiguanosina (8-oxodG). Los ROS atacan a la guanina o la 2'-desoxiguanosina libre, que en consecuencia genera aductos de radicales. La abstracción de electrones forma 8-OHdG, que a

través de una reacción conocida como tautomerismo cetoenólico, se transforma en el principal producto oxidado 8-oxodG (Urbaniak *et al.* 2020).

La 8-OHdG se usa con frecuencia como marcador de lesión oxidativa del ADN, siendo un factor de riesgo de cáncer, aterosclerosis y DM (Dhama *et al.* 2019). En pacientes diabéticos con hiperglucemia, se ha informado un aumento del 8-OHdG urinaria y el ADN de los leucocitos, relacionándose con la gravedad de la nefropatía y la RD (XG. Zhang *et al.* 2018).

4. CARACTERÍSTICAS ANATOMOFISIOLÓGICAS DE LOS COMPONENTES RETINIANOS

El ojo humano se compone de tres capas diferentes: una capa externa formada por la córnea y la esclerótica, una capa media dividida en una parte anterior (iris y cuerpo ciliar) y una parte posterior (coroides), y una capa interna compuesta por la retina, que recubre la superficie interna del ojo (Figura 3) (Forrester *et al.* 2010).

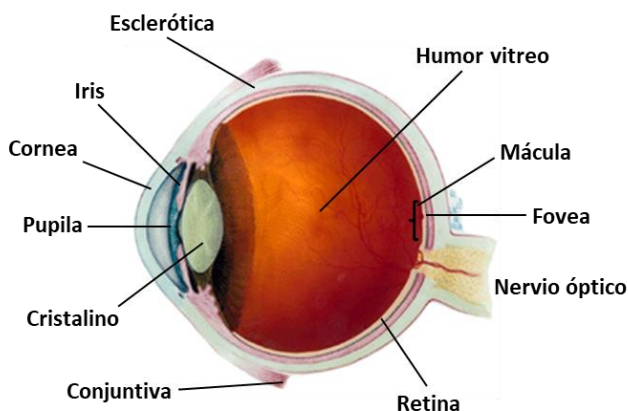


Figura 3. Estructura anatómica del ojo humano.

4.1 Retina

Los principales tipos de células en la retina son las células vasculares (pericitos y células endoteliales), células macrogliales (células de Müller y astrocitos), neuronas (fotorreceptores, células bipolares, células amacrinas, horizontales y ganglionares) y microglía (pertenecientes al sistema fagocítico mononuclear) (Kowluru y Mishra 2015).

La retina se puede dividir en diferentes capas, comenzando con la membrana limitante interna (MLI) que separa el humor vítreo de la retina, seguida de la capa de fibras nerviosas (FN), la capa de células ganglionares (que contiene cuerpos celulares de células ganglionares y amacrinas desplazadas) (GL), la capa plexiforme interna (PLI), el capa nuclear interna (CNI) (compuesta por células bipolares, horizontales y amacrinas), la capa plexiforme externa (PLE), la capa nuclear externa (CNE) (donde se hayan cuerpos celulares de los bastones y conos), la membrana limitante externa (MLE) (lámina fina en la que las células fotorreceptoras establecen uniones estrechas con las células de Müller), la capa fotorreceptora (FR) y, finalmente, el epitelio pigmentario retiniano (EPR). Dentro de la capa externa PLI y de la PLE, ubicada entre las capas de células nerviosas, se producen contactos sinápticos (Kolb, Fernandez, y Nelson 1995; Purves *et al.* 2001) (Figura 4).

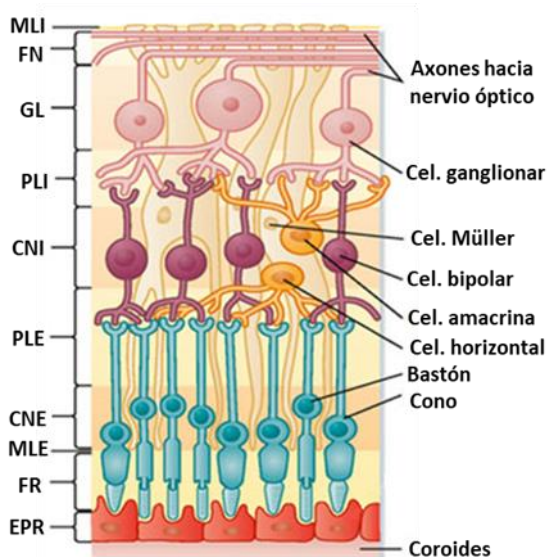


Figura 4. Composición estructural de las diferentes partes que forman la retina humana (Centro de investigación y cirugía ocular – Inof 2017).

La retina es un órgano sensible a la luz y es esencial para la percepción de la visión. La luz penetra en el ojo a través de la córnea y el iris, pasa a través del cuerpo vítreo y se proyecta hacia la retina, donde la señal de luz se convierte en impulsos eléctricos. El ciclo visual ocurre en la interfaz entre la retina y el EPR, lo que lleva a la hiperpolarización de los fotorreceptores (conos y bastones). Los impulsos eléctricos convergen a través de las células bipolares y las células ganglionares en el nervio óptico y luego en la corteza visual (Xu y Chen 2016).

Las células retinianas internas obtienen nutrientes y oxígeno de la circulación retiniana, mientras que las capas retinianas externas (que consisten en los fotorreceptores y el EPR) son avasculares, y necesitan de la circulación coriodesca para obtener los aportes de nutrientes y oxígeno. Para garantizar una buena función visual, esta estructura compleja y sofisticada debe mantenerse

durante toda la vida, e incluso una perturbación menor puede causar una discapacidad visual devastadora (Selvam, Kumar, y Fruttiger 2018).

De forma similar al SNC, donde las células endoteliales y astrocitos forman la barrera hematoencefálica (BHE), en la retina como prolongación del sistema nervioso también nos encontramos con otra barrera, la hematorretiniana (BRB, del inglés *blood retinal barrier*). Ambas permiten el tránsito suficiente de oxígeno y glucosa para la función neuronal al tiempo que restringen el flujo de otras moléculas y células para proteger el entorno nervioso. Estas barreras mantienen la homeostasis neural adecuada y protegen el tejido de la potencial toxicidad transmitida por la sangre (Naylor *et al.* 2019).

4.2 Vascularización retiniana

La retina tiene una intrincada disposición de neuronas y requiere una circulación dedicada a cumplir con sus requisitos metabólicos para el funcionamiento de la neurotransmisión, fototransducción e interacción compleja de metabolitos, factores de crecimiento y agentes vasoactivos. La circulación retiniana es una red de vasos dispuestos geoméricamente con una arquitectura tridimensional compleja (Campochiaro 2015). La sangre alcanza la retina por dos vasculaturas: los vasos coroideos (que suministra el 90% del volumen sanguíneo total a la retina) y los retinianos (que suministra al tercio interno de la retina evitando la mácula) (Kur, Newman, y Chan-Ling 2012). La arteria retiniana central ingresa a través del nervio óptico y se ramifica en la retina interna para formar tres capas capilares: la vasculatura superficial, que se encuentra en la FN, las redes vasculares intermedias y las profundas, localizadas a cada lado del CNI (Sun y Smith 2018) (Figura 5). Esta vascularización asegura el aporte del flujo sanguíneo necesario para el intercambio de gases y nutrientes. La sangre abandona la retina con los productos de desecho celulares a través de la vena retiniana central.

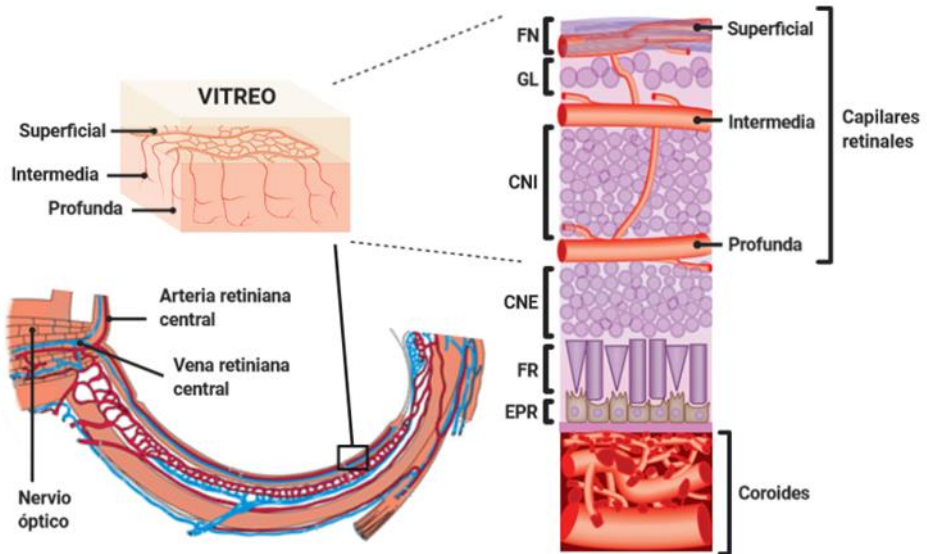


Figura 5. Representación de la vasculatura retiniana. Basada en (Sun y Smith 2018).

4.3 Barrera hematorretiniana

Todo el ojo debe funcionar como el órgano para la visión para el cual está diseñado. Las barreras oculares de la sangre juegan un papel fundamental en la preservación y el mantenimiento del ambiente celular visual. Incluyen 2 sistemas principales: la barrera hematoacuosa (BAB, del inglés *blood aqueous barrier*) y la BRB, que son fundamentales para mantener el ojo como un sitio privilegiado en el cuerpo al regular el contenido de sus fluidos internos y preservar los tejidos oculares internos de las alteraciones en composición que pueden ocurrir a nivel circulatorio (Eshaq *et al.* 2017). Las barreras oculares sanguíneas no solo deben proporcionar un entorno químico adecuado y altamente regulado para los tejidos transparentes avasculares del ojo, sino que también deben servir como una ruta de drenaje para los productos de desecho de la actividad metabólica de los tejidos oculares (Tomi y Hosoya 2010).

La BAB se encuentra formada por uniones estrechas entre la capa epitelial no pigmentada del cuerpo ciliar y el endotelio de la vasculatura del iris. Se encarga de regular los intercambios entre la sangre y el humor acuoso. La barrera es relativamente ineficiente en comparación con la BRB y las moléculas pequeñas pueden alcanzar el humor acuoso por permeación a través de capilares fenestrados en los procesos ciliares. (Janagam, Wu, y Lowe 2017) (Figura 6).

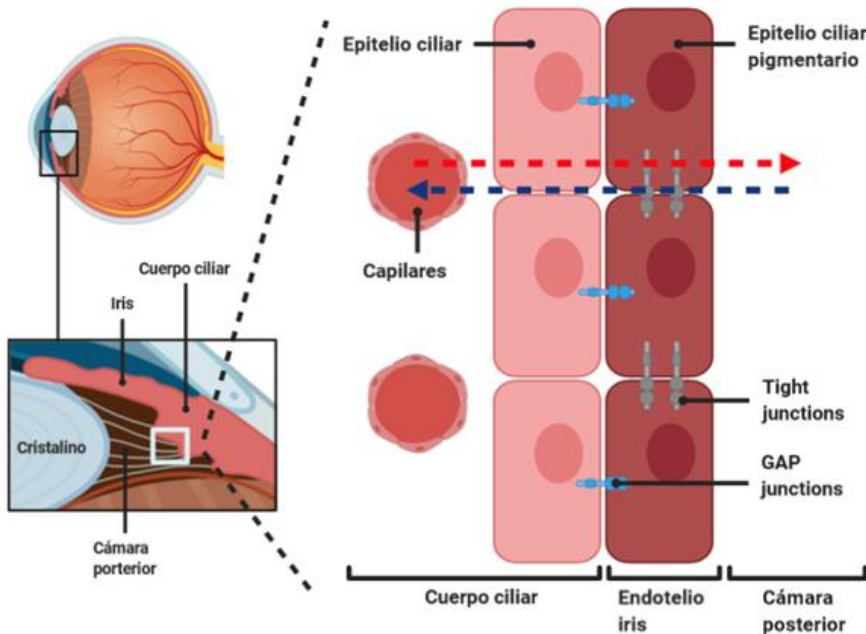


Figura 6. Esquema de la barrera hematoacuosa del ojo.

La BRB presenta unas funciones similares a la BHE, e igual que ella, es particularmente firme y restrictiva. Una barrera fisiológica que regula el flujo de iones, proteínas y agua dentro y fuera de la retina, previniendo el tránsito a la retina de macromoléculas y otros agentes potencialmente dañinos (Díaz-Coránguez, Ramos, y Antonetti 2017). Estructuralmente, la BRB se compone de dos barreras distintas. La BRB externa (oBRB, del inglés *outer blood retinal barrier*), formada a nivel del EPR con la función de regular el transporte entre el

coriocapilar y la retina, y la interna (iBRB, del inglés *inner blood retinal barrier*), que regula el transporte a través de los capilares retinianos. La pérdida del iBRB contribuye a la fisiopatología de varias enfermedades de la retina, incluida la RD (Frey y Antonetti 2011).

La estructura principal de la iBRB se establece por las uniones estrechas (TJs; del inglés *tight junctions*) entre las células endoteliales retinianas vecinas (Chow y Gu 2017). La capa endotelial de la retina funciona como un epitelio y de esta manera se asocia directamente con su diferenciación y con la polarización de la función de la BRB. Esta capa descansa sobre una lámina basal que está cubierta por los procesos de astrocitos y células de Müller (células de sostén) (L. Liu y Liu 2019). Los pericitos también están presentes, encerrados en la lámina basal, en contacto cercano con las células endoteliales (Figura 7). Se considera que los astrocitos, las células de Müller y los pericitos influyen en la actividad de las células endoteliales de la retina y de la iBRB al transmitir a las células endoteliales señales reguladoras que indican los cambios en el microambiente del sistema neuronal de la retina (L. Liu y Liu 2019).

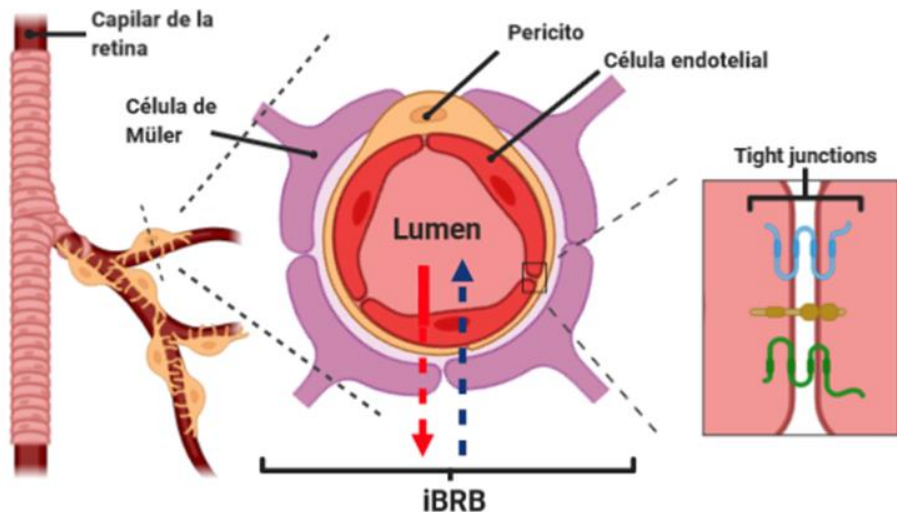


Figura 7. Esquema de barrera hematorretiniana interna

La oBRB es establecida por TJs entre las células del EPR (Chen *et al.* 2019). El EPR se compone de una sola capa de células pigmentarias que están unidas lateralmente hacia sus vértices por TJs entre las paredes celulares laterales adyacentes (Figura 8). El EPR que descansa sobre la membrana de Bruch subyacente (capa más interna de la coroides), la cual separa la retina neural de los coriocapilares fenestrados y desempeña un papel fundamental en la regulación del acceso de nutrientes de la sangre a los fotorreceptores, así como en la eliminación de productos de desecho y el mantenimiento de la adhesión retiniana (Fields *et al.* 2019). La relación metabólica de las vellosidades apicales EPR y los fotorreceptores se considera crítica para el mantenimiento de la función visual (Fields *et al.* 2019).

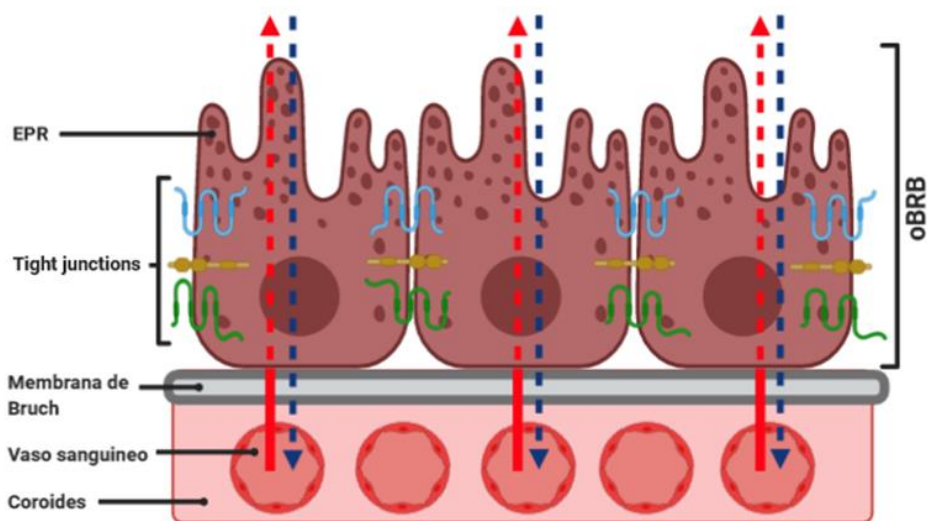


Figura 8. Representación de la barrera hematorretiniana externa.

Tanto en la iBRB como en la oBRB, las TJs celulares restringen el movimiento paracelular de fluidos y moléculas entre la sangre y la retina, y las células endoteliales y las células del EPR regulando activamente los movimientos hacia adentro y hacia afuera. Como resultado, los niveles en el plasma sanguíneo de aminoácidos o ácidos grasos fluctúan en un amplio rango

mientras que sus concentraciones en la retina permanecen relativamente estables (Kubo, Akanuma, y Hosoya 2018).

5. CLASIFICACIÓN Y COMPLICACIONES DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Con el objeto de estadiar la RD, el *Early Treatment Diabetic Retinopathy Study* (ETDRS) (Sin autor 1991) describió la progresión de la enfermedad en términos del desarrollo de lesiones oculares visibles en fotografías de fondo de ojo. Este sistema de clasificación fotográfica tiene más niveles de los que podrían ser necesarios para la atención clínica, y las definiciones específicas de los estadios que se detallan requieren de comparación con fotografías estándar, por lo que son difíciles de recordar y aplicar en un entorno clínico. Debido a esta complejidad, la clasificación propuesta por el ETDRS no se maneja habitualmente en la práctica clínica. En su lugar, la clasificación más utilizada en la práctica clínica diaria es la propuesta por un grupo de expertos del *Global Diabetic Retinopathy Project Group* (GDRPG), la cual está basada en los resultados del ETDRS y proporciona una base de manejo sencilla y adecuada para el diagnóstico de la RD (Wilkinson *et al.* 2003). La RD se clasifica en etapas no proliferativas (RDNP) y RD proliferativas (RDP) en función de la presencia de cambios oftalmológicos visibles y la manifestación de la neovascularización retiniana (Santiago *et al.* 2018) (Tabla 1).

Sin RD aparente	Ausencia de microaneurismas
RDNP leve (Figura 9)	Solo microaneurismas
RDNP moderada (Figura 9)	<ul style="list-style-type: none"> • Microaneurismas asociados a menos de 20 hemorragias intrarretinianas en cada uno de los 4 cuadrantes • Exudados duros • Exudados algodonosos • Arrosamiento venoso en un solo cuadrante
RDNP severa (Figura 9)	<p>Microaneurismas junto a uno de los siguientes hallazgos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Hemorragias intrarretinianas severas (>20) en cada uno de los 4 cuadrantes • Arrosamiento venoso ≥ 2 cuadrantes • Anomalías microvasculares intrarretinianas en ≥ 1 cuadrante
RDP (Figura 10)	Neovasos o hemorragia prerretiniana o hemovítreo

Tabla 1. Clasificación clínica internacional de la RD (GDRPG) (Muñoz de Escalona-Rojas, Quereda-Castañeda, y García-García 2016).

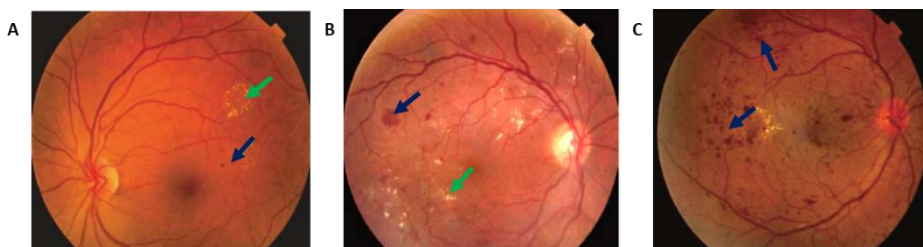


Figura 9. Clasificación RDNP. RDNP leve con microaneurismas (flecha azul) y exudados (flecha verde) (A). RDNP moderada con hemorragias retinales (flecha azul) y exudados (flecha verde) (B). RDNP severa hemorragias retinales severas (C) (Aiello, Silva, y Sun 2012).

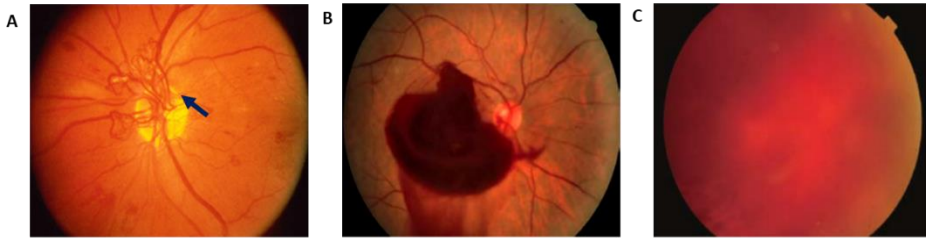


Figura 10. Clasificación RDP. RDP con neovascularización sobre el nervio óptico (A). RDP con hemorragia pre-retinal vítrea (B). RDP con hemorragia vítrea densa y masiva que impide la visión de la retina (C) (Aiello, Silva, y Sun 2012).

5.1 Retinopatía diabética no proliferativa

La RDNP es la etapa clasificada más temprana de la RD. En este nivel de evolución de la enfermedad se produce la dilatación de los capilares sanguíneos pudiendo llegar a romperse. Ocasionalmente, depósitos de colesterol u otras grasas presentes en la sangre pueden entrar en la retina. Entre las alteraciones que se producen se incluyen (Stitt *et al.* 2016):

- **Microaneurismas:** Pequeñas protuberancias en los vasos sanguíneos de la retina que con frecuencia dejan escapar líquidos.
- **Hemorragias de la retina:** Pequeñas manchas de sangre que entran a la retina.
- **Exudados duros:** Depósitos blancos o blanco amarillentos (céreos) de tamaño variable que se localizan entre la capa plexiforme externa y la nuclear interna de la retina. Depósitos extracelulares de lípidos y lipoproteínas.
- **Exudado macular:** Es la inflamación o engrosamiento de la mácula a causa de las roturas vasculares en la retina. Este proceso afecta a la funcionalidad macular.

- **Isquemia macular:** Se produce la oclusión capilar por lo que la mácula no recibe suficiente sangre y se disminuye la nitidez en la visión.

En la etapa RDNP se sugiere que el sexo, el inicio y la duración de la DM1, así como los niveles de HbA1c son los indicadores clave implicados en el desarrollo de RDNP (Ola *et al.* 2012). La maculopatía diabética acompaña a la etapa RDNP, y ha sido considerada como la razón principal de la pérdida de visión. La etapa RDNP es principalmente consecuencia de condiciones hiperglucémicas que debilitan las paredes capilares y producen microaneurismas. Esto es seguido por la ruptura de los vasos que conduce a la acumulación de depósitos grasos y subproductos lipídicos (Al-Kharashi 2018). A continuación, se observa una obstrucción en la capa de fibra nerviosa que produce manchas blancas esponjosas conocidas como exudados blandos o algodonosos. La etapa RDNP varía de leve, moderada a severa, donde los microaneurismas son seguidos por hemorragias y exudados junto con complicaciones microvasculares severas (Hendrick, Gibson, y Kulshreshtha 2015).

5.2 Retinopatía diabética proliferativa

La RDNP es seguida por un estado proliferativo del tejido retiniano como consecuencia de las condiciones isquémicas surgidas. La RDP sucede principalmente cuando la oclusión de los vasos sanguíneos en la retina es considerable. En un intento de aumentar el suministro sanguíneo para cubrir el requerimiento metabólico, la retina libera señales angiogénicas, creando así nuevos vasos sanguíneos o neovascularización (Zheng, He, y Congdon 2012). Estos vasos recién formados presentan alteraciones funcionales notables ya que presentan fugas, son frágiles y están mal dirigidos. Con la edad, la contracción del humor vítreo hace que se rompan masivamente y provoquen una pérdida repentina de la visión. Además, el aumento de la fuerza traccional que puede

ejercer posibilita que se produzca un desprendimiento de retina. La RDP puede causar una pérdida de la visión más severa que la RDNP, ya que puede afectar tanto la visión central como la periférica. Durante la RDP se inducen las siguientes alteraciones (Muñoz de Escalona-Rojas, Quereda-Castañeda, y García-García 2016):

- **Hemorragia vítrea:** Los nuevos y delicados vasos sanguíneos sangran dentro del vítreo, impidiendo que los rayos de luz lleguen a la retina. Si la hemorragia es pequeña, es posible que se vean manchas oscuras y flotantes. Una hemorragia muy grande puede bloquear la visión, permitiendo sólo ver la diferencia entre claro y oscuro.
- **Desprendimiento de la retina por tracción:** Cuando el tejido cicatriza por una neovascularización, se encoge, la retina se arruga y puede desprenderse de su posición normal.
- **Glaucoma neovascular:** Si una serie de vasos de la retina se cierran puede ocurrir una neovascularización en el iris. Los nuevos vasos sanguíneos pueden bloquear el flujo normal de líquido en el ojo, aumentando la presión en el ojo y causando daños al nervio óptico.

El desprendimiento de retina y esta neovascularización junto con la proliferación del tejido fibrovascular, es una característica de la etapa RDP. A pesar de las graves complicaciones en esta fase, el EMD es la principal causa de la pérdida de agudeza visual en la DM y, aunque puede ocurrir en cualquier etapa, es más frecuente en las fases avanzadas de la enfermedad (Joussen, Smyth, y Niessen 2007). Además puede ocurrir de forma independiente a la RD, por lo que debe evaluarse como tal (Maheshwary *et al.* 2010).

Independientemente de estas variadas etapas que caracterizan la RD, el principal cambio progresivo que conduce a la retinopatía en pacientes diabéticos sigue siendo especulativo en términos de complicaciones microvasculares y

bioquímicas que conducen al estrés oxidativo/nitrosativo (Mahajan, Arora, y Sandhir 2019).

6. MECANISMOS MOLECULARES Y FISIOPATOLÓGICOS EN EL DESARROLLO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

La RD es una enfermedad multifactorial con una etiología compleja. Los mecanismos exactos por los cuales los altos niveles de glucosa en la sangre producen complicaciones de la DM no están del todo claros. Sin embargo, se sabe que la hiperglucemia tiene efectos metabólicos que inducen daño microvascular a la retina, por ello se entiende a la RD como una microangiopatía (Shafabakhsh *et al.* 2019). Aunque en general la RD afecta a los pequeños vasos retinianos (arteriolas, capilares y vénulas precapilares), también pueden verse afectados los vasos retinianos más grandes. Se ha relacionado directamente la duración y magnitud de la hiperglucemia con la aparición de la microangiopatía. Las células endoteliales microvasculares son objetivos del daño hiperglucémico, pues no son capaces de reducir la velocidad de transporte de glucosa cuando las concentraciones son altas, generando una hiperglucemia intracelular que da lugar a una disfunción endotelial (Stehouwer 2018). Los cambios dentro de los capilares retinianos incluyen engrosamiento de la membrana basal, disfunción de las células epiteliales debido a la pérdida de TJs epiteliales, pérdida de pericitos, agregación plaquetaria, aumento de la permeabilidad, oclusión de los capilares y formación de microaneurismas (Semeraro *et al.* 2019). El microaneurisma es el sello distintivo de la enfermedad microvascular retiniana en pacientes diabéticos. Se ha sugerido que pueden resultar de dilataciones asimétricas de la pared capilar donde se debilita o daña después de la pérdida de

los pericitos de soporte y aumentos localizados de la presión hidrostática (Scanlon 2015).

En su conjunto, el daño de las células del endotelio vascular con alteraciones de la membrana basal capilar y con la pérdida de pericitos, parece que es uno de los factores más importantes en el desarrollo de la enfermedad, al ocasionar la rotura de la iBRB y aumentar la permeabilidad (C. Li *et al.* 2017). Debido a la pérdida de pericitos, se genera una disminución en la microcirculación de la retina que conduce a una situación de isquemia e hipoxia. Como consecuencia, se produce la activación de ciertos receptores y la liberación de mediadores como el VEGF. La sobreproducción de VEGF estimula la formación de neovasos defectuosos con permeabilidad aumentada, contribuyendo a la aparición de exudados, la formación de edema y el desarrollo de fibrosis en los tejidos (Hammes 2018; Rossino, Dal Monte, y Casini 2019). Muchos de los efectos de la hipoxia están mediados por el factor inducible por hipoxia-1 α (HIF-1 α), un factor de transcripción sensible al oxígeno, siendo el VEGF un producto “aguas abajo” de HIF-1 α (Arjamaa y Nikinmaa 2006).

El daño que ocasiona la hiperglucemia podría explicarse mediante unos mecanismos interrelacionados que ocurren de forma simultánea o escalonada en el interior de la célula endotelial. Clásicamente, las alteraciones bioquímicas a las que se les atribuye el desarrollo de la RD incluyen: un mayor flujo de la ruta de polioles, incremento de los AGEs, aumento de la ruta de hexosaminas y activación de la PKC (Figura 11). En la actualidad, los diversos estudios han ampliado estas alteraciones a la sobreexpresión del sistema renina-angiotensina (RAS, del inglés *renin-angiotensin system*) y modificaciones epigenéticas (Frank 2004; Mahajan, Arora, y Sandhir 2019; Threatt *et al.* 2013).

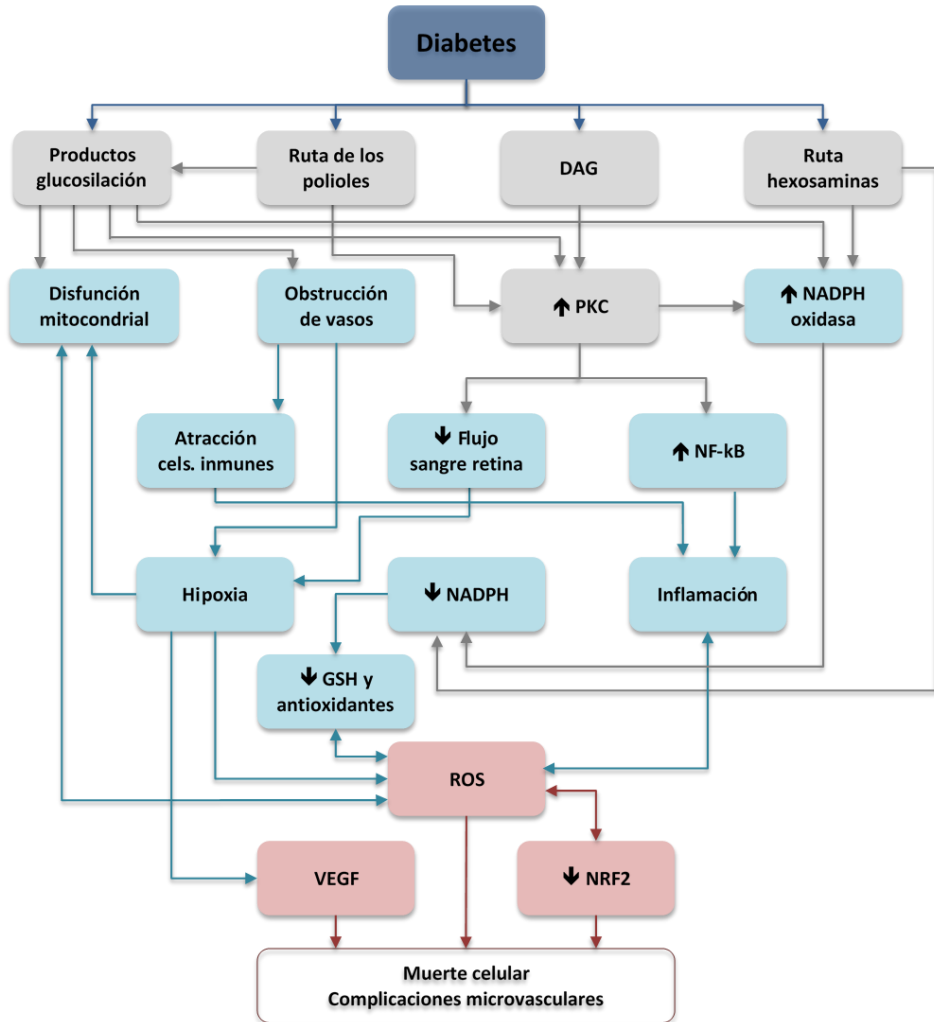


Figura 11. Vías bioquímicas clásicas involucradas en la glucotoxicidad de la patogénesis de la RD (Rodríguez et al. 2019).

Los efectos generales de estas anomalías metabólicas se hipotetizan como resultado del aumento de la producción de ROS y RNS, y el daño oxidativo y nitrosativo asociado, siendo los mediadores clave en la inducción de disfunciones vasculares y lesiones relacionadas a la circulación retiniana (Tarr et al. 2013).

Es importante señalar que, gracias a los avances en el conocimiento de la patogenia de esta enfermedad, se sabe que la RD no se reduce al daño microvascular. Cada vez son más los estudios que sugieren que la neurodegeneración es un evento precoz en el desarrollo de la RD y que puede incluso preceder al daño vascular anteriormente descrito. De hecho, se ha visto que muchas de las alteraciones inducidas por la DM pueden contribuir a que se produzca una degeneración neuronal (Heng *et al.* 2013).

6.1 Rutas moleculares en el desarrollo de la RD

6.1.1 Ruta de los polioles

Esta vía se basa en la conversión del exceso de glucosa en sorbitol, usando NADPH como cofactor en una reacción catalizada por la enzima aldosa reductasa. El gen de esta enzima presenta un polimorfismo asociado (C106T) a una mayor susceptibilidad a la RD en individuos con DM1 (Zhou *et al.* 2015). Debido al aumento en su producción y a la impermeabilidad de la membrana a este poliol, se acumula y genera daño osmótico (Willermain *et al.* 2018). El sorbitol formado se convierte posteriormente en fructosa por la acción de la sorbitol deshidrogenasa. La fructosa producida, es fosforilada por la fructosa-3-fosfato, que a su vez se descompone en 3-desoxiglucosona. Ambas moléculas son fuertes agentes glicosilantes que dan como resultado la formación de AGEs (Lorenzi 2007) (Figura 12).

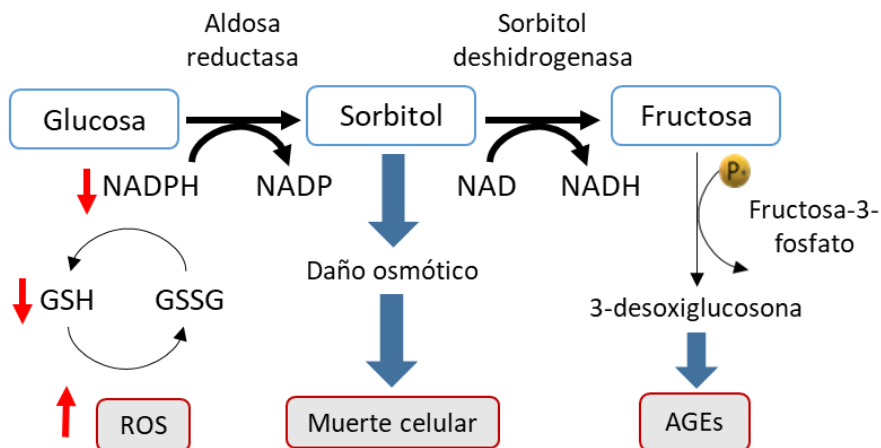


Figura 12. Ruta de los polioles. El exceso de glucosa aumenta la producción de sorbitol, el agotamiento de NADPH y la síntesis de AGEs, dando como resultado el aumento de ROS y el daño celular.

Otro agravante en el daño derivado del aumento del flujo de la ruta del polirol, reside en agotamiento del NADPH celular, lo que afecta a los niveles de GSH y $\cdot\text{NO}$ reducidos, resultando en un desequilibrio redox (Lorenzi 2007). En la retina, el GSH desempeña un papel protector esencial en la reducción del estrés oxidativo al que está sometido diariamente, por lo que esta disminución en la regeneración de GSH es crítica (Ganea y Harding 2006).

Se ha sugerido que la vía del polirol es el único mecanismo de toxicidad de glucosa responsable del espectro de anomalías tanto neurales y como vasculares. Numerosos estudios han indicado que el aumento de los niveles de sorbitol y fructosa en la retina es capaz de mediar el aumento de la apoptosis neuronal (Giri *et al.* 2018). De hecho, aunque la ruta del polirol es una ruta menor del metabolismo de la glucosa, se considera que juega un papel fundamental en la RD.

6.1.2 Vía de los productos finales de glucosilación avanzada

La hiperglucemia desarrollada durante la diabetes desencadena la formación de AGEs, un grupo heterogéneo de moléculas deletéreas producto de la unión no enzimática de glucosa con grupos amino libres de proteínas, lípidos y ácidos (Giacco y Brownlee 2010). Los AGEs se unen a sus receptores transmembrana denominados RAGE (receptor para el producto final de glicación avanzada) y desencadenan una cascada de señales inflamatorias (Brownlee 2001). La inflamación puede conducir a un daño vascular irreversible capaz de persistir mucho después de que se hayan restablecido las condiciones glucémicas normales, un estado grave conocido como "memoria metabólica" (Filla y Edwards 2016). Los RAGE se encuentran en células como los macrófagos, células endoteliales vasculares y células vasculares del músculo liso, y cuya unión afecta a su funcionalidad (Mahajan, Arora, y Sandhir 2019).

Los AGEs se acumulan en la circulación debido a su aclaramiento renal ineficaz. A esto contribuyen además los AGEs exógenos presentes en la dieta, que también se acumulan en los pacientes diabéticos (Mahajan, Arora, y Sandhir 2019). Su acumulación genera un aumento en el engrosamiento de los vasos y agregación plaquetaria, provocando una obstrucción del vaso que conduce a una isquemia responsable de la inducción de factores de crecimiento y neovascularización, y activación de señales intracelulares como MAPK/NF- κ B, que se han relacionado con la apoptosis de las células retinianas y la inflamación vascular (Sun *et al.* 2017; Xu *et al.* 2018).

Los AGEs son fundamentales en la inducción de la producción de ROS al alterar proteínas, enzimas y material genético de las mitocondrias por glicación (Manigrasso *et al.* 2014). Además, el estrés oxidativo acelera la formación de AGEs, y aunque el cuerpo humano es capaz de degradarlos por ubiquitinación y autofagia, puede resultar insuficiente para evitar su acúmulo

(Bejarano y Taylor 2019). En la retina diabética, la glicosilación de proteínas en forma de AGEs puede conducir a la reticulación de proteínas y modificaciones de la matriz extracelular, por lo que tienen un papel destructivo al alterar la química de sus proteínas estructurales (Giacco y Brownlee 2010).

6.1.3 Ruta de las hexosaminas

Otra vía crucial implicada en la patogénesis de la RD es la vía de la hexosamina, que en sí misma es una rama menor de la glucólisis. La glutamina proporciona un grupo amino a la fructosa-6-fosfato generada mediante la glucólisis. Ello conduce a la formación de glucosamina 6-fosfato (GlucN-6-P), reacción catalizada por la fructosa-6-fosfato amidotransferasa (GFAT) (Jones *et al.* 2014). La GlucN-6-P se acetila y se isomeriza a N-acetilglucosamina 6-fosfato y finalmente se convierte, por la acción enzimática de ON-Acetil-GluN transferasa (OGT) en difosfato uracil-N-acetilglucosamina (UDP-GlcNAc), que puede formar proteoglicanos, glucolípidos y glicoproteínas (Buse 2006).

De manera similar a la ruta del polirol, en presencia de niveles elevados de glucosa se genera una gran cantidad de ROS, lo que puede inhibir la actividad de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y resultar en la entrada de productos glucolíticos a la vía de la hexosamina (Du *et al.* 2003). La glucosamina producida por la hexosamina activada aumenta la producción de H₂O₂, que deriva en un aumento de la oxidación, cambios en el endotelio celular, mayor permeabilidad vascular y angiogénesis. La inhibición de GAPDH también induce la actividad de la vía AGE a través de las interacciones con metilglioxal intracelular; un subproducto de la glucólisis, lo que lleva al aumento del estrés oxidativo retiniano (MY. Wu *et al.* 2018).

6.1.4 Vía de la proteína quinasa C

La PKC es una familia de quinasas dependientes de AMPc con alteración de su actividad bajo condiciones hiperglucémicas y con acción demostrada en la RD. Se cree que muchas de las alteraciones microvasculares en los ojos de pacientes con diabetes surgen de la activación de la PKC (Clarke y Dodson 2007). Se han identificado varias isoformas de PKC en los sistemas biológicos las cuales pueden subdividirse en tres grupos: las isoformas convencionales (PKC- α , β 1, β 2 y γ), que se activan mediante fosfatidilserina, calcio y diacilglicerol (DAG) o ésteres de forbol como el forbol 12-miristato-13-acetato (PMA); las nuevas PKC (PKC- δ , θ , η y ϵ), activadas por fosfatidilserina, DAG o PMA; y las PKC atípicas (PKC- ζ y ι/λ), que no son activados por calcio, DAG o PMA (Steinberg 2008).

Varios estudios han demostrado, que la activación de la vía PKC puede conducir al daño de las células endoteliales al aumentar la permeabilidad endotelial, cambiar la biodisponibilidad de NO, reducir la producción de prostaglandinas, inducir la expresión de VEGF e inducir la producción de tromboxano y endotelina-1 (Amadio *et al.* 2010; Das Evcimen y King 2007; Noh y King 2007). El estado hiperglucémico induce la síntesis DAG, lo que conduce a la activación de la vía PKC. Se ha demostrado que varias isoformas de PKC se activan durante la patogénesis de RD, como PKC- α , β , δ y ϵ (Idris, Gray, y Donnelly 2001). La activación de PKC- β induce la liberación de NO, endotelina-1 y VEGF en las células endoteliales, lo que aumenta la permeabilidad vascular de la retina y disminuye el flujo sanguíneo causando EMD. La activación de PKC- δ induce la formación de ROS y activa la vía p38 y MAPK, que promueve la expresión de la fosfatasa-1 que contiene la región 2 del dominio de homología de Src (SHP-1, del inglés *Src homology region 2 domain-containing phosphatase 1*) y NF- κ B, inhibiendo así la expresión del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, del inglés *platelet derived growth factor*) y

activando la señalización de caspasa, que finalmente lleva a la pérdida de pericitos retinianos y a la formación de microaneurismas (Safi *et al.* 2014; MY. Wu *et al.* 2018).

La PKC contribuye al daño de los capilares retinianos al activar la NAD(P)H-oxidasa (NOX). El $O_2^{\bullet -}$ producido interactúa con el $\bullet NO$ y forma $ONOO\bullet$ que, a su vez, puede oxidar la histona 4B (H4B) para producir el desacoplamiento NOS endotelial y la producción de $ONOO\bullet$ con disfunción endotelial posterior (Rodríguez *et al.* 2019).

6.1.5 Sistema renina-angiotensina

En las primeras etapas de la RD se produce la ruptura de la BRB, y una explicación a su posible causa es la alteración en la permeabilidad vascular por el RAS (Kim *et al.* 2009).

El RAS se consideró originalmente como un mecanismo regulador de la presión arterial sistémica al controlar la homeostasis hidroelectrolítica (RAS circulatorio). También hay numerosos órganos capaces de producir de forma local componentes del RAS (RAS tisular) como en los ojos, el cerebro, los vasos, las glándulas suprarrenales, los testículos y los riñones (Bader y Ganten 2008). El RAS tisular funciona de forma paracrina, y cuando se activa de forma crónica desencadena una serie de acciones patogénicas significativas que incluyen la estimulación de fibrosis, inflamación, proliferación celular, neovascularización y estrés oxidativo (Montezano *et al.* 2014). Son varios los daños en los órganos resultantes de la activación del RAS tisular, sin embargo, el mecanismo molecular detallado para su activación sigue siendo desconocido (Kanda y Ishida 2019).

El primer paso en la actividad del RAS circulatorio es la síntesis de preprorenina en las células yuxtglomerulares del riñón, su escisión en prorenina

y su posterior liberación como prorenina o renina. La enzima renina actúa sobre el angiotensinógeno producido en el hígado para liberar la angiotensina I (Ang I), la cual dará lugar a Ang II gracias a la actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ACE) ubicada en las células endoteliales, mayoritariamente en el endotelio pulmonar (Wilkinson-Berka *et al.* 2019). La Ang II actúa sobre dos receptores principales, el receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) y el tipo 2 (AT2R) (Wilkinson-Berka *et al.* 2019). En términos generales, la activación a través de AT1R causa vasoconstricción de los vasos retinianos, mientras que la activación a través de AT2R se asocia con vasodilatación (Downie *et al.* 2009) (Figura 13).

El RAS tisular se caracteriza por su independencia en el procesamiento de la prorenina para adquirir actividad renina, y requiere de un paso alternativo que incluye el receptor (pro) renina (PRR). La unión de este receptor con la prorenina desencadena lo que se conoce como sistema de prorenina asociado al receptor (RAPS), que no solo conduce a la activación del RAS tisular, sino también a la transducción de la señal intracelular, regulando así la expresión de diversos agentes patógenos como VEGF-A a través de la señal ERK1/2 (Kanda y Ishida 2019; Nguyen *et al.* 2002), ligando de quimiocinas C-C 2 (CCL) y molécula de adhesión intercelular, todos los cuales han sido verificados como responsables de la patogénesis de la RD (Nagai *et al.* 2007).

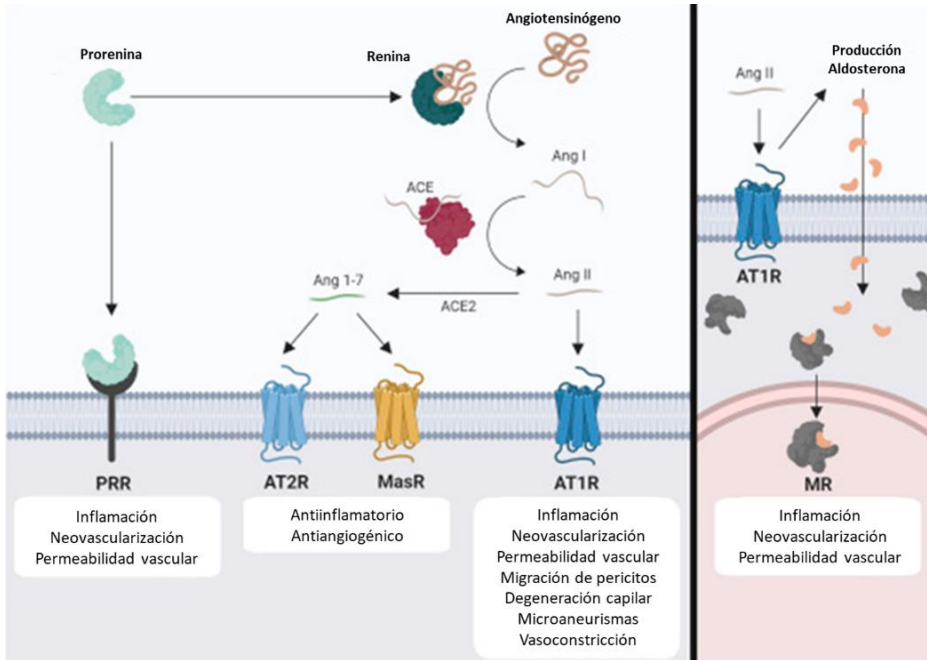


Figura 13. Descripción general del RAS y sus acciones sobre la vasculatura retiniana (Wilkinson-Berka et al. 2019).

El PRR puede unirse tanto a la renina como a la prorenina, sin embargo, la afinidad de unión a la prorenina es mucho menor (Nguyen y Muller 2010). La estimulación del PRR ejerce sus acciones independientemente de Ang II para promover eventos que incluyen inflamación y proliferación. El RAS también posee una vía contrarreguladora a través del receptor AT2R y Mas (MasR) (Figura 13). La unión de Ang II al AT2R, opuestamente a la unión Ang II con AT1R, disminuye la fibrosis y la inflamación por su acción vasodilatadora ya comentada (Patel et al. 2016).

Además, la escisión de Ang II por un homólogo de ACE, ACE2, produce angiotensina 1-7 que se une al AT2R y al MasR, antagonizando parcialmente los efectos de AT1R. Este eje protector ACE2/Ang 1-7/MasR se puede regular durante la enfermedad para reducir la disponibilidad y las acciones perjudiciales

de Ang II (Kaschina, Namsolleck, y Unger 2017). La Ang II también estimula la liberación de aldosterona de las células de la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales, hormona de importante función en la homeostasis electrolítica a través del receptor de mineralocorticoides (MR) (Barrera-Chimal, Girerd, y Jaisser 2019).

6.1.6 Micro ARN

Los miARN son secuencias cortas endógenas de ARN (aproximadamente 21–23 nucleótidos) que no codifican ninguna proteína. Los miARN pueden modular la expresión génica a nivel transcripcional y postranscripcional, induciendo la degradación del ARN mensajero (ARNm) tras su unión a la región no traducida (UTR, del inglés *untranslated region*) 3' de sus dianas en el espacio intracelular. Los estudios han mostrado que los miARN se expresan en todos los tipos de células humanas y que participan en procesos biológicos esenciales como el crecimiento celular, la diferenciación y la apoptosis (Gong y Su 2017). Es más, los miARN regulan casi todos los procesos celulares y de desarrollo como la regulación de las respuestas inmunes y la inflamación (Nejad, Stunden, y Gantier 2018). Se ha descubierto que un solo miARN puede modular la expresión de varios ARNm. Además, más del 60% de los ARNm tienen sitios de unión para múltiples miARN (Shafabakhsh *et al.* 2019) haciendo más compleja la comprensión del papel de estas moléculas en la biología celular.

A partir de estudios recientes, se ha mostrado que los miARN desempeñan funciones críticas en la proliferación, migración y apoptosis de las células de la retina, seguidas de la patogénesis de la RD, por lo que las alteraciones epigenéticas participan en el desarrollo de la RD (Gong *et al.* 2017). Además, estos miARN pueden estar involucrados en la patogénesis de la RD cuyos genes diana son factores de señalización de inflamación y angiogénesis,

en parte, a través de la mediación de VEGF (Gong y Su 2017), mostrándose partícipes en la progresión de la enfermedad. De hecho, hay algunos miARNs que se han encontrado disminuidos en modelos animales de RD, como miARN-146a, miARN-200b y miARN-29b, cuyos genes diana son fibronectina (implicada en fibrosis y engrosamiento de la membrana basal), VEGF (un factor angiogénico) y PAX (un activador de una vía proapoptótica), respectivamente (Feng *et al.* 2011; Silva *et al.* 2011).

7. DIAGNÓSTICO

La RD es en gran parte asintomática, lo que significa que la patología puede estar avanzada de forma significativa en el momento en que los pacientes perciben una pérdida de visión. Por lo tanto, es necesario un diagnóstico temprano que detecte los primeros signos antes de que la enfermedad progrese a estadios más graves (Stitt *et al.* 2013). El desarrollo de la RD es un proceso lento en las fases iniciales. Se necesita un período mínimo de entre cinco a diez años de hiperglucemia mantenida para que comiencen a manifestarse las lesiones microangiopáticas. Además, en su progresión influyen determinados factores de riesgo. Estos factores pueden dividirse en modificables (hiperglucemia, hipertensión, hiperlipidemia y obesidad) y no modificables (duración de DM, pubertad, embarazo, cirugía de cataratas, tipo de DM y antecedentes familiares de RD), pero entre todos ellos destaca por su importancia el grado de control metabólico (Shrote y Diagavane 2015). Se ha demostrado que por cada reducción del 1% en la HbA1c, el desarrollo de RD disminuye en un 40% (Mohamed, Gillies, y Wong 2007), y si el nivel de HbA1c se mantiene por debajo del 7,6% (60 mmol/mol), parece prevenir la RDP durante 20 años en pacientes con DM1 (Nordwall *et al.* 2015). Por ello, para evitar el daño irreparable de la retina causado por la hiperglucemia crónica se considera crucial la detección y el control estricto de la DM.

Para el diagnóstico de la DM se utilizan 3 parámetros: la sobrecarga oral de glucosa (SOG), la glucemia plasmática y los niveles de HbA1c. Los puntos de corte para considerar la aparición de DM se han establecido en una glucemia plasmática basal ≥ 126 mg/dl, una glucemia plasmática 2 horas tras una SOG ≥ 200 mg/dl, o una HbA1c $\geq 6,5\%$. Además, una medición de glucemia plasmática ≥ 200 mg/dl en cualquier momento, acompañada de síntomas de hiperglucemia, también se considera un parámetro diagnóstico (Díaz Naya y Delgado Álvarez 2016).

Como se ha mencionado, la RD tiene una gran carga asintomática, debido a ello, desde el momento del diagnóstico de la DM se debe mantener un control periódico de la enfermedad con el objetivo de detectar su aparición temprana. Con este fin, se han establecido una serie de recomendaciones, las cuales marcan los tiempos en los que se debe aplicar un examen ocular completo para el correcto seguimiento y detección de la RD (Hendrick, Gibson, y Kulshreshtha 2015) (Tabla 2).

Recomendaciones para la detección temprana de la RD
Para las personas con DM1 diagnosticada después de la pubertad, la detección de RD debe iniciarse 5 años después del diagnóstico de diabetes.
Para las personas diagnosticadas con DM1 antes de la pubertad, la detección de RD debe iniciarse en la pubertad, a menos que existan otras consideraciones que sugieran la necesidad de un examen previo.
La detección de RD en personas con DM2 debe iniciarse en el momento del diagnóstico de la enfermedad.
<p>La detección posterior de RD en individuos depende del nivel de retinopatía.</p> <ol style="list-style-type: none"> En aquellos que no muestran evidencia de retinopatía, la detección debe realizarse todos los años. En aquellos con DM1, cada 1 a 2 años; en aquellos con DM2, debe determinarse por cumplimiento anticipado. Una vez que se detecta RDNP, el examen debe realizarse al menos una vez al año para RDNP leve, o con mayor frecuencia (de 3 a 6 meses) para RD moderada o grave. Para RDNP grave, RDP y EMD clínicamente significativo, el examen generalmente se realiza cada 2 a 4 meses.
<p>Para DM diagnosticada antes del embarazo, se realiza un examen ocular completo durante el primer trimestre del embarazo.</p> <ol style="list-style-type: none"> Si hay una RD mínima o una RDNP de leve a moderada, se recomienda un intervalo de seguimiento de 3 a 12 meses. Para RDNP grave, se recomienda un intervalo de 1 a 3 meses. La revisión y el tratamiento oftálmicos deben realizarse de manera expedita (generalmente dentro de 1-4 semanas) para pacientes con RDP y EMD.

Tabla 2. Recomendaciones clínicas para el diagnóstico y seguimiento de la RD (Hendrick, Gibson, y Kulshreshtha 2015).

La modalidad de detección recomendada para la RD y el estadio en el que se encuentra se realiza mediante biomicroscopía con lámpara de hendidura dilatada con lente o fundoscopia dilatada, que incluye un examen estereoscópico

del polo posterior por un oftalmólogo u optometrista (Hendrick, Gibson, y Kulshreshtha 2015).

8. TRATAMIENTO

En las primeras etapas de la RD la única estrategia terapéutica es un control estricto de los factores de riesgo (principalmente la glucosa en sangre y la presión arterial) para prevenir el desarrollo de la patología o detener su progresión (Hernández *et al.* 2017). Los tratamientos actualmente disponibles son aplicables sólo en etapas muy avanzadas donde la vista se encuentra amenazada, e incluyen: fotocoagulación con láser, inyecciones intravítreas de corticosteroides o agentes anti-VEGF y cirugía vitreorretiniana; todos ellos opciones invasivas (Calderon *et al.* 2017).

En general, la farmacoterapia, tanto ocular como sistémica, es el modo principal de intervención de la RD y el EMD. La terapia con láser convencional se ha convertido en una intervención secundaria, pero sigue siendo la opción de primera línea cuando el coste y la carga del tratamiento farmacológico son limitados. Aunque todos los tratamientos dependen en última instancia de la situación clínica específica en la que se encuentre el paciente, se han sugerido unas pautas en la aplicación de la terapia a seguir (Figura 14) (Mansour *et al.* 2020).

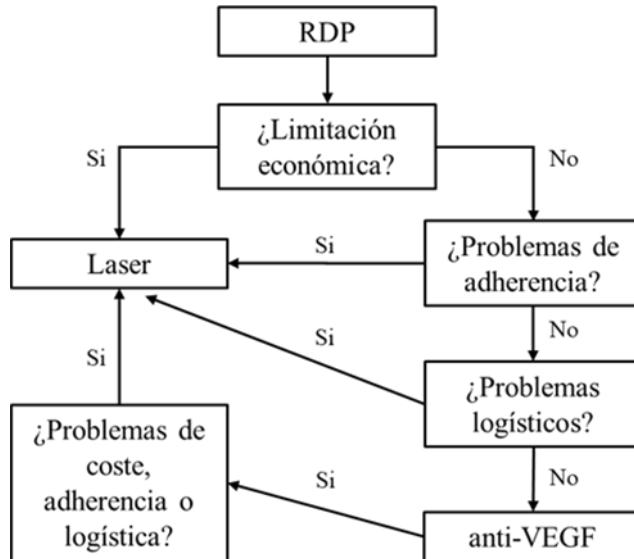


Figura 14. Árbol de decisión en el tratamiento sugerido para el escenario clínico de RDP. Modificado de (Mansour et al. 2020).

Un volumen creciente de datos respalda el papel del proceso inflamatorio en la patogénesis de la RD y sus complicaciones, que incluyen tanto el aumento de la permeabilidad vascular de la retina como la neovascularización. La inflamación también puede contribuir a la neurodegeneración de la retina. La evidencia de que la inflamación de bajo grado desempeña un papel fundamental en la patogénesis del EMD ha abierto nuevas vías y objetivos para el desarrollo de tratamientos mejorados. Los compuestos antiinflamatorios como los glucocorticoides intravítreos, medicamentos antiinflamatorios tópicos no esteroideos (AINEs), antioxidantes, inhibidores de moléculas inflamatorias, bloqueadores del RAS y terapias antiinflamatorias naturales, pueden considerarse para reducir la tasa de administración de agentes antineovascularizantes en el tratamiento de RD (Semeraro et al. 2019).

8.1 Tratamiento farmacológico

La farmacoterapia para la RD y el EMD se puede subdividir por clase de fármacos y vía de administración (Tabla 3). La clase más importante de fármacos son los que actúan disminuyendo los efectos del VEGF, seguidos de los corticosteroides. Mucho menos importantes son los bloqueadores de los receptores de angiotensina sistémicos y los fibratos. Hasta ahora, los medicamentos antiinflamatorios no esteroideos tópicos se han demostrado ineficaces en el manejo de EMD a largo plazo (Mansour *et al.* 2020).

Vía de administración	Tipo de fármaco					
	Anti-VEGF	Corticosteroides	Inhibidores RAS	Bloqueadores del receptor de angiotensina	Fibratos	AINEs
Intravitreal	Bevacizumab (anticuerpo) Aflibercept (proteína de fusión recombinante) Ranibizumab (anticuerpo) Pegaptanib (aptámero) Conbercept (proteína de fusión recombinante)	Dexametasona Fluocinolona Triamcinolona	-	-	-	Diclofenaco
Periocular	-	Triamcinolona	-	-	-	-
Topical	-	-	-	-	-	Nepafenaco Ketorolaco
Oral	-	-	Enalapril	Losartan Candesatan	Fenofibrato	-

Tabla 3. Farmacoterapia de la RD y el EMD.

Actualmente, las tres clases principales de agentes farmacológicos utilizados son los corticosteroides, los antagonistas del VEGF y los agentes que están involucrados en la modulación de las vías bioquímicas de poliol, de la

PKC, y cambios en la estructura y función de macromoléculas a través de la formación de AGE, aunque estas últimas requieren de mayores estudios para su aplicación regular (Semeraro *et al.* 2019).

8.1.1 Tratamiento anti-VEGF

La terapia con inyecciones intravítreas de fármacos anti-VEGF se ha convertido en el tratamiento por excelencia para la RD y sus complicaciones angiogénicas. Los agentes anti-VEGF más comunes utilizados en el tratamiento de EMD son el anticuerpo monoclonal ranibizumab (Lucentis®), el anticuerpo de larga duración bevacizumab (Avastin®), el aptámero pegaptanib (Macugen®) y la proteína de fusión recombinante aflibercept (Eylea®) (Diabetic Retinopathy Clinical Research Network *et al.* 2015; Sultan *et al.* 2011). Sin embargo, estos medicamentos no tienen ningún efecto sobre la patogénesis de la RD y deben administrarse a través de inyecciones intravítreas invasivas frecuentes durante muchos años (se estima que sean alrededor de 12-15 inyecciones en los primeros tres años de tratamiento) (Elman *et al.* 2012). Además, las terapias anti-VEGF son costosas y están asociadas con un compromiso financiero/protocolo de administración/beneficio para el paciente considerable para la institución clínica (Semeraro *et al.* 2019). También llevan asociados efectos adversos como la susceptibilidad a la aparición de endoftalmitis, flotadores vítreos y aumento transitorio de la presión intraocular (Diabetic Retinopathy Clinical Research Network *et al.* 2015).

8.1.2 Administración de corticosteroides

Considerando la participación de los procesos inflamatorios en la patogénesis de la RD, los fármacos antiinflamatorios son una atractiva opción para el tratamiento de la enfermedad (Gologorsky, Thanos, y Vavvas 2012).

Debido a sus efectos antiinflamatorios y antiangiogénicos, los corticosteroides se han incluido en el tratamiento de RD y EMD. Varios mediadores de la inflamación se encuentran regulados positivamente en la RD, juegan un papel importante en su patogénesis y pueden ser modulados con corticosteroides como son: el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la interleucina-1 β (IL-1 β) y el VEGF (B. Kumar *et al.* 2012). Entre sus efectos, los corticosteroides reducen la permeabilidad vascular y la ruptura de la BRB, impiden la adhesión de los leucocitos a las paredes vasculares, inhiben la transcripción y traducción del gen VEGF y disminuyen rápidamente el EMD (Falcão, Falcão-Reis, y Rocha-Sousa 2010).

El modo principal de suministro es a través de la ruta intravítrea para evitar las limitaciones que presenta la BRB. Sin embargo, estas inyecciones suelen asociarse con efectos adversos relacionados con los esteroides, incluidos la catarata, la elevación de la presión intraocular, el glaucoma y los efectos secundarios menos comunes relacionados con la inyección, como son el desprendimiento de retina, hemorragia vítrea y endoftalmitis (Quiram, Gonzales, y Schwartz 2006). Además, su efectividad a corto plazo y transitoria son factores limitantes en la aplicación de este tratamiento. Con frecuencia, se necesitan nuevas inyecciones a diferentes intervalos de tiempo cuando cesan los efectos antiedematosos, dependiendo de la vida media del esteroide que se esté usando. Actualmente, se utilizan varios esteroides diferentes para tratar el EMD, como la triamcinolona, la fluocinolona y la dexametasona (Kaštelan *et al.* 2013).

Los efectos secundarios asociados al uso crónico y la necesidad de reinyecciones han llevado al desarrollo de nuevos métodos de administración intravítrea como la liberación sostenida. Esta técnica sitúa un implante en la parte posterior del ojo con una aguja del calibre 25. Las formulaciones de liberación lenta evitan la necesidad de inyecciones repetidas, permitiendo el uso de pequeñas cantidades de corticosteroides con menos efectos secundarios

(Kompella, Kadam, y Lee 2010). Existen dispositivos tanto no biodegradables, como biodegradables, donde los polímeros que lo componen se degradan lentamente con el tiempo, lo que evita complicaciones secundarias en la cirugía al retirarlos en comparación con los no biodegradables (Kuno y Fujii 2010).

8.1.3 Bloqueadores del sistema renina-angiotensina

El RAS también es una diana terapéutica en la RD ya que está involucrado tanto en la DM como en la inflamación de la retina inducida por la hipertensión. Además el RAS interrelaciona con otros agentes etiológicos como son el estrés oxidativo y los AGE (Sjølie y Chaturvedi 2002). Varios ensayos que han utilizado inhibidores de RAS en RD muestran resultados inconsistentes. De hecho, existen estudios como el llevado a cabo por Mauer *et al.*, en el que el uso de inhibidores de la ACE, como el enalapril, o la monoterapia con bloqueadores de los receptores de angiotensina, como con el losartán, demostraron ralentizar la progresión y el inicio de la RD (Mauer *et al.* 2009). Sin embargo, otros trabajos como el de Wang *et al.* 2015 muestran unos efectos moderados sobre la progresión y regresión de la RD en comparación con pacientes normotensos. Por lo tanto, se necesitan más estudios para aclarar el papel de ECA y bloqueadores de los receptores de angiotensina en el tratamiento de la RD antes de que se comprenda completamente su utilidad clínica.

8.2 Terapia láser

El tratamiento con láser de fotocoagulación de rejilla, focal o panretiniana (FPR) ha sido la herramienta más eficaz para retrasar la progresión de la RD durante los últimos 30 años (Wang y Lo 2018).

La FPR a menudo se usa en la RDP para disminuir la demanda de oxígeno y reducir la neovascularización. La FPR posibilita la eliminación de la

retina hipóxica y/o el aumento de la difusión de O₂ desde la coroides para complementar la circulación retiniana comprometida. Además, el tratamiento con láser disminuye la producción de factores vasoproliferativos e inhibe la neovascularización. La técnica implica la aplicación de puntos láser dispersos entre 200–500 µm sobre toda la retina periférica; respetando la mácula central. En el caso del EMD, los puntos láser son aplicados en zonas de microaneurismas en el área macular para reducir la exudación (Ellis *et al.* 2019).

El uso de la terapia con láser para controlar la enfermedad de la retina relacionada con la DM desempeña una función importante. Esta suele ser empleada en aquellas situaciones en las que el uso de la farmacoterapia está contraindicado, haya un mal seguimiento de las visitas del paciente, la respuesta ante el tratamiento anti-VEGF sea ineficaz, o si la paciente está embarazada (Mansour *et al.* 2020). Además, presenta ventajas como su bajo coste y reducido número de visitas, que generalmente se sitúan entre una y cuatro sesiones.

Si bien el tratamiento con FPR puede controlar en gran medida la neovascularización y prevenir la ceguera, es incapaz de restablecer la visión y, además, presentan sus propios efectos perjudiciales para la vista (Lee, Wong, y Sabanayagam 2015). Dada su naturaleza destructiva, la terapia con láser causa daño permanente a las células de la retina, lo que lleva a efectos secundarios que incluyen: pérdida moderada de la visión, edema macular, disminución del campo visual, reducción de la visión del color, reducción de la visión nocturna y disminución de la sensibilidad al contraste (Fong, Girach, y Boney 2007). En algunos casos, el uso de la fotocoagulación con láser previa y agentes intravítreos anti-VEGF pueden inducir cambios fibróticos en la neovascularización retiniana preexistente, causando un desprendimiento traccional de retina con la necesidad de cirugía temprana para evitar la ceguera permanente (Helbig 2007).

8.3 Intervención quirúrgica

La intervención quirúrgica se encuentra reservada para aquellas situaciones que no responden a la farmacoterapia, el láser, la terapia combinada o casos que han tenido formas crónicas y graves de EMD, cuando el daño retiniano es irreversible. El uso de la vitrectomía es por tanto crucial en escenarios como: hemorragias vítreas que no desaparecen, desprendimiento de retina traccional en la RDP y anomalías en la interfaz vitreoretiniana que impiden la resolución del edema macular (Sharma *et al.* 2016).

Antes de proceder a la intervención vitreoretiniana, todos los pacientes deben someterse a un examen oftalmológico exhaustivo de ambos ojos, pues la medición de la agudeza visual preoperatoria es importante para la predicción de la mejora visual tras la cirugía (Summanen 1989). Además, para facilitar la intervención, se suele incluir como complemento preoperatorio de la vitrectomía una inyección intravítrea de agentes anti-VEGF, como bevacizumab, ranibizumab o aflibercept, en aquellos pacientes donde no haya contraindicaciones, ya que provocan una rápida involución de la neovascularización activa (Zhao *et al.* 2011). La fotocoagulación intraoperatoria también reduce el impulso isquémico retiniano y previene las neovascularizaciones activas (Mansour *et al.* 2020).

La cirugía puede ayudar a prevenir el desarrollo de futuras complicaciones de la RD. Se ha demostrado que la extracción de la mayoría del cuerpo vítreo junto con la membrana hialoide durante la vitrectomía quirúrgica, mejora la oxigenación retiniana, reduce el crecimiento de las membranas fibrovasculares debido a la falta de armazón para la proliferación, aumenta el recambio de citocinas intraoculares y elimina las barreras mecánicas en la salida de líquidos y metabolitos, así como los impedimentos a la penetración

intrarretiniana de los medicamentos administrados por vía intravítrea (Nakajima *et al.* 2015).

Sin embargo, a pesar de los avances en la instrumentación y el refinamiento de la técnica quirúrgica, la vitrectomía diabética sigue siendo una de las condiciones más difíciles, incluso para los cirujanos más experimentados. Esto se debe esencialmente a la variabilidad en la anatomía quirúrgica que presenta cada caso. Además, presenta consecuencias postoperatorias, como desprendimiento de retina reatológico, desarrollo inevitable de cataratas, reproliferación de las membranas fibrovasculares diabéticas, hemorragia vítrea, aparición de membranas epirretinianas, presión intraocular elevada y glaucoma neurovascular (Khuthaila *et al.* 2013; Lahey, Francis, y Kearney 2003; Sharma *et al.* 2016). De hecho, debido a su bajo coste, el uso de la vitrectomía para RD y EMD se realiza ampliamente en regiones del mundo donde los recursos económicos son más limitados, e incluso en naciones relativamente ricas para pacientes con seguro médico insuficiente (Mansour *et al.* 2020).

9. POLIFENOLES NATURALES CONTRA LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Todos estos tratamientos mencionados son caros, incómodos para los pacientes, requieren un especialista vitreoretinal, tienen una limitada efectividad debida a los protocolos de administración utilizados y presentan un significativo número de efectos secundarios (Stitt *et al.* 2016). Pese a los beneficios que estas terapias muestran en el retraso de la progresión de la RD y la mejora de visión, el daño a los vasos sanguíneos de la retina y las funciones de las células neuronales es irreversible (Rodríguez *et al.* 2019). Aún después de los avances realizados en el tratamiento de la retinopatía, muchos pacientes aún alcanzan etapas avanzadas de la enfermedad, por lo tanto, se hace necesario investigar

nuevos enfoques terapéuticos capaces tanto de prevenir, como de retrasar la aparición de las primeras etapas de RD.

Teniendo en cuenta las limitaciones y los efectos secundarios de los tratamientos actuales, ha habido un intento continuo de comprender los mecanismos moleculares que contribuyen a la aparición y los cambios observados en las retinas diabéticas. Por lo tanto, muchos investigadores han dirigido sus esfuerzos hacia una mejor comprensión de los cambios microvasculares en la RD para desarrollar una prevención y/o tratamiento farmacológico más efectivo. En esta tendencia de búsqueda de nuevos tratamientos se erige como alternativa el uso de los polifenoles naturales.

9.1 Polifenoles. Origen y clasificación

Los polifenoles son compuestos naturales sintetizados exclusivamente por plantas. Se encuentran ampliamente distribuidos entre sus tejidos, donde existen principalmente en forma de glucósidos, aunque también en forma libre como agliconas, con características químicas relacionadas con sustancias fenólicas y fuertes propiedades antioxidantes. De hecho, los polifenoles son los antioxidantes mayoritarios en la dieta, estando presentes en multitud de alimentos (Guasch-Ferré *et al.* 2017; Singla *et al.* 2019) (Tabla 4).

Estructuralmente se encuentran caracterizados por tener en su composición al menos dos anillos de fenilo y uno o más grupos hidroxilo (Han, Shen, y Lou 2007). Esta descripción comprende una gran cantidad de compuestos de diferente complejidad. De forma simplificada, los polifenoles pueden clasificarse en flavonoides y no flavonoides, y subdividirse en diferentes subclases dependiendo del número de unidades de fenol dentro de su estructura molecular, grupos sustituyentes y/o tipo de enlace entre unidades de fenol

(Cardona *et al.* 2013). Estas formas químicas determinan el peso molecular y, a su vez, la biodisponibilidad y la bioactividad.

Los polifenoles flavonoides comparten la estructura básica de los difenilpropanos (C6-C3-C6), en los que los anillos fenólicos (A y B) generalmente están unidos por un anillo heterocíclico (C) (Khoddami, Wilkes, y Roberts 2013) (Figura 15). Pueden dividirse en flavonoles, flavanoles, flavanonas, flavonas, antocianidinas e isoflavonas (Rienks *et al.* 2018) (Figura 15).

Aunque el esqueleto estructural de polifenoles contiene varios grupos hidroxilo en anillos aromáticos, la estructura básica de los no flavonoides es un anillo aromático único (Khoddami, Wilkes, y Roberts 2013). Los compuestos no flavonoides se dividen en ácidos fenólicos, estilbenos y lignanos (Rienks *et al.* 2018) (Figura 15). La clase principal en este grupo está representada por ácidos fenólicos, predominantemente ácido benzoico y derivados del ácido cinámico. Estas moléculas rara vez existen en su forma libre, encontrándose en forma conjugada con otros polifenoles, glucosa, ácido quínico o componentes estructurales de la planta (Amarowicz *et al.* 2009).

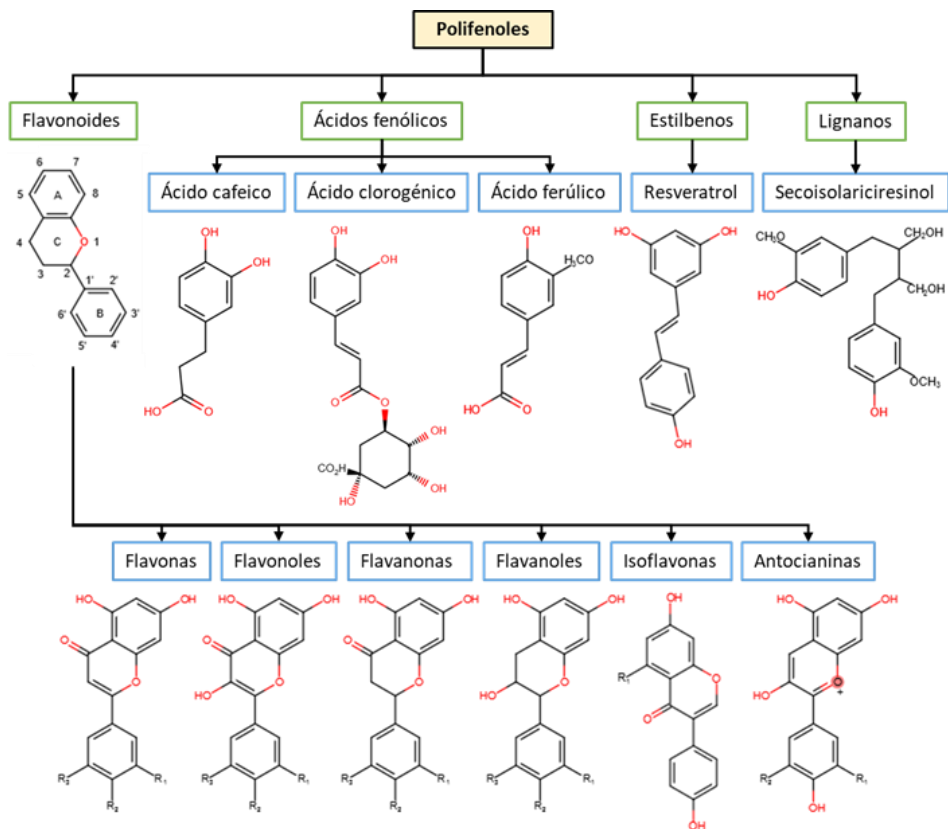


Figura 15. Clasificación de los polifenoles. Basada en (Kim, Keogh, y Clifton 2016).

Polifenoles flavonoides		Polifenoles no flavonoides	
Tipo	Alimentos	Tipo	Alimentos
Flavonoles	Cebollas, col rizada, puerros, brócoli, manzanas	Ácidos fenólicos	Café, té, parte externa de frutas
Flavanoles	Uvas, té	Estilbenos	Uvas, almendras, frijoles, arándanos, cacahuets, moras, ciruelas, frijoles
Flavanonas	Cítricos	Lignanos	Linaza, cereales
Flavonas	Perejil, apio		
Antocianinas	Bayas, uvas negras		
Isoflavonas	Soja		

Tabla 4. Polifenoles presentes en distintos alimentos.

La estructura química básica de los estilbenos consiste en dos anillos de benceno unidos por un doble enlace. Estos compuestos presentan una gran diversidad en sus estructuras fenólicas, un factor determinante para sus tasas de absorción y metabolismo (Durazzo *et al.* 2019).

9.2 Aplicaciones biomédicas de los polifenoles

El interés los polifenoles ha crecido en los últimos años, y diferentes estudios han demostrado que presentan beneficios farmacológicos en la prevención y el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades, incluyendo cáncer, dislipidemia, DM, degeneración cardiovascular y dolor (Fraga *et al.* 2019). Deben su potencial a diversas acciones farmacológicas que hacen de estos compuestos unos potentes agentes quimiopreventores, antineoplásicos, antidiabéticos, antiateroscleróticos, antioxidantes, antiinflamatorios y neuroprotectores. Estas actividades se derivan de interacciones biológicas a un nivel fundamental tanto para el control de las expresiones de los genes como para la modulación de la actividad enzimática (Joseph *et al.* 2008).

La RD está asociada a mecanismos oxidativos e inflamatorios inducidos por la hiperglucemia que derivan en una situación hipóxica y en una neoangiogénesis retiniana acompañada por un aumento de los niveles de VEGF, además de otros procesos que siguen sin esclarecerse. Por ello, se ha sugerido y demostrado que los antioxidantes polifenólicos, como el resveratrol (Resv, 3,5,4'-trihidroxiestilbeno), podrían ser una buena aproximación terapéutica (I. Ahmad y Hoda 2020). De hecho, en clínica se emplean complementos alimenticios como el Retilut®, el cual contiene Resv entre otros compuestos antioxidantes.

Varios estudios sobre los mecanismos moleculares involucrados en la protección mediada por estilbenos como el Resv contra el estrés oxidativo, han

indicado a la vía Nrf2/ARE junto con el segundo mensajero cAMP como reguladores clave de la defensa antioxidante celular (Reinisalo *et al.* 2015). Los estilbenos pueden activar la translocación del factor de transcripción Nrf2 al núcleo y la activación de genes diana asociados con la defensa antioxidante y la autofagia (Breuss, Atanasov, y Uhrin 2019).

9.3 Pterostilbeno: Origen y estructura química

El pterostilbeno (Pter) (3,5-dimetoxi-4'-hidroxiestilbeno) se encuentra clasificado como bencilideno, concretamente como estilbeno, y biológicamente se ubica dentro de las fitoalexinas; polifenoles naturales producidos por una variedad de plantas segregados en respuesta a perturbaciones ambientales tales como infección viral, microbiana y fúngica o exposición excesiva a los rayos ultravioletas (Bavaresco *et al.* 1999).

El Pter es un compuesto liposoluble que existe en formas *cis* y *trans*, siendo la forma *trans* la más abundante. Inicialmente se aisló del duramen (corazón del tronco) del sándalo rojo, *Pterocarpus santalinus* (Seshadri 1972), aunque también se produce en otras plantas del mismo género como el *P. marsupium* (kino de la india), un árbol originario de la India, Nepal y Sri Lanka, cuyo duramen ha sido utilizado en la medicina tradicional por sus propiedades medicinales (Maurya *et al.* 2004). El Pter también se encuentra en las hojas de *Vitis vinifera* (Langcake, Cornford, y Pryce 1979), en frutos como los arándanos (Rimando *et al.* 2002), y algunos tipos de uvas entre las que se encuentran las variedades *Chardonnay* y *Gamay* (Adrian *et al.* 2000) cuando se encuentran infectadas por hongos, y en las variedades sanas e inmaduras de *Pinot noir* y *Gamay* (Pezet y Pont 1988). Otra planta en la que se ha descubierto este polifenol es *Guibourtia tessmanii*, una planta con flores que se encuentra en África central y se utiliza en la medicina popular (Fuendjiep *et al.* 2002).

El polifenol natural Pter es un análogo estructural del Resv (Figura 16) que presenta los grupos hidroxilos de las posiciones 3' y 5' metilados y el de la posición 4' libre. Estos aspectos estructurales condicionan sus propiedades farmacocinéticas, farmacodinámicas y condicionan su acción biológica en diferentes sentidos: a) el grupo hidroxilo en posición 4' es esencial para su actividad (Stivala *et al.* 2001) y por tanto muchas de las acciones descritas para el Resv pueden ser aplicables al Pter; b) al no tener libres los hidroxilos en posición 3 y 5 tiene menor probabilidad de metabolizarse en fase II y por tanto el Pter tiene una semivida biológica más elevada (14 minutos resveratrol vs 96 minutos Pter) (Asensi *et al.* 2002; Ferrer *et al.* 2005), c) la presencia de los grupos metilados en dicha ubicación condiciona su actividad biológica (Ferrer *et al.* 2005; Mena *et al.* 2012), le proporciona una mayor lipofilia y, por tanto, mayor capacidad de atravesar todas las membranas. Por todo esto, se considera que el Pter presenta una actividad con efectos biológicos beneficiosos superiores al resveratrol (Sirerol *et al.* 2015).

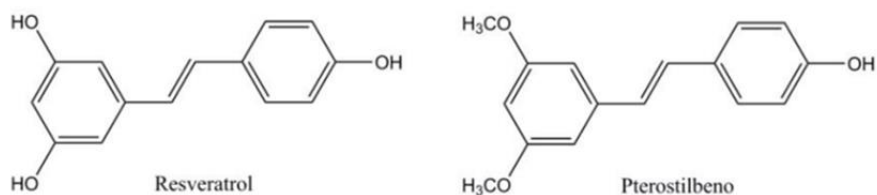


Figura 16. Estructura química del Pter y Resv.

OBJETIVOS

Debido a la importancia etiológica del estrés oxidativo en el desarrollo de la RD, el presente estudio tiene como **objetivo general**, el análisis de la capacidad protectora y/o terapéutica del antioxidante natural Pter frente a la RDNP y los posibles mecanismos moleculares implicados. Para lograrlo se han marcado los siguientes objetivos específicos:

1. Establecer las capacidades citoprotectoras del Pter en células retinianas.
2. Evaluar las alteraciones morfológicas en la retina asociadas al daño generado por la hiperglucemia y su posible prevención mediante la administración de Pter sobre un modelo animal.
3. Determinar la neurotoxicidad inducida por la diabetes y el efecto del polifenol a nivel histológico.
3. Analizar los parámetros de daño oxidativo en la retina consecuencia del desarrollo de diabetes en animales de experimentación y la actividad antioxidante del Pter.
5. Estudiar y proponer las vías moleculares implicadas en la capacidad retinoprotectora del polifenol.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. Modelo animal

En esta tesis doctoral se utilizaron conejos macho New Zealand obtenidos de la Granja San Bernardo, Navarra, España. Todos los procedimientos se aprobaron por el Comité de Ética en Experimentación y Bienestar Animal de la Universidad de Valencia (España) y fueron autorizados por la Conselleria de Agricultura, Medio Ambiente, Cambio Climático y Desarrollo Rural (Generalitat Valenciana). Las condiciones de alojamiento y los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo con la normativa de la Unión Europea (Directiva 2010/63/UE) y española (Real Decreto 53/2013).

Se utilizaron un total de treinta y seis animales, los cuales fueron divididos aleatoriamente en 3 grupos experimentales (n=12 en cada grupo): no diabéticos (control), diabéticos (diabéticos) y diabéticos tratados (tratados). Los animales se mantuvieron con agua y comida regular *ad libitum* durante seis semanas.

1.1 Inducción de diabetes

En los grupos experimentales diabéticos y tratados, la diabetes se indujo con aloxano siguiendo el protocolo descrito por Alabadí *et al.* (Alabadí *et al.* 2004). En resumen, tras un ayuno de 18 h, se sedó al animal mediante inyección intramuscular de ketamina (Merial) (35 mg/Kg) y xilazina (Dechra) (5 mg/Kg). Una vez asegurado el efecto de la anestesia, se inyectó aloxano (Sigma-Aldrich) (80 mg/Kg) disuelto en 10 mL NaCl (0.9%) muy lentamente a través de la vena marginal de la oreja. Para prevenir la hipoglucemia, tras el aloxano, se administraron por vía intravenosa 2 mL de solución glucosada al 5% + 8 ml por vía subcutánea, y se suministró agua glucosada al 10% *ad libitum* durante 24h. Tras 8 horas de la inducción se realizó la administración subcutánea de 10 mL de solución glucosada al 10%.

1.2 Tratamiento de los animales de experimentación

En el caso del grupo de conejos tratados, el tratamiento con Pter se inició 48h después de inducir la diabetes. Debido a la baja solubilidad del Pter y con el objeto de administrarlo diariamente en solución acuosa, se añadió un grupo fosfato al polifenol (sal de fosfato disódico de Pter, al que denominaremos en adelante Pter fosforilado) (Figura 18). La administración de Pter fosforilado se realizó vía subcutánea diariamente durante un periodo de 6 semanas. La dosis de Pter fosforilado administrada fue de 74 mg/kg, lo que equivale a 50 mg/kg de Pter. La concentración isoosmótica administrada fue de 25 mg/mL. De esta forma, el modelo animal queda definido como indica la Figura 17.

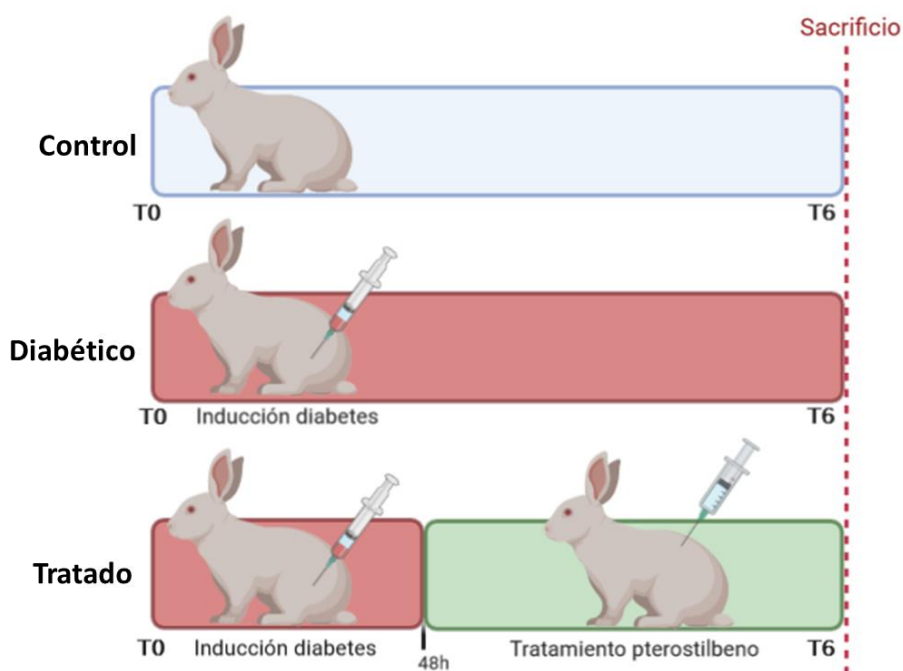


Figura 17. Modelo experimental animal diseñado para el estudio del efecto retinoprotector del Pter en la RDNP. Inicio del estudio en la semana 0 (T0) hasta el sacrificio de los animales en la semana 6 (T6).

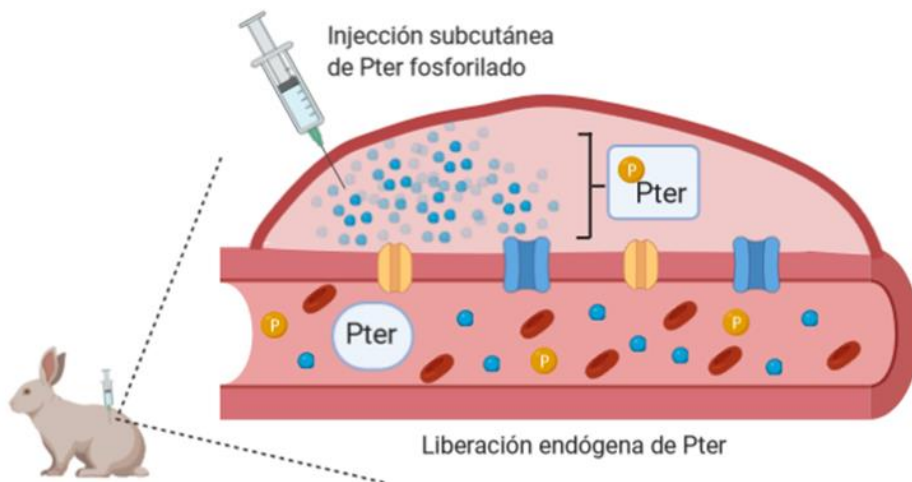


Figura 18. Liberación de Pter tras la administración subcutánea de Pter fosforilado.

1.3 Control de la glucemia y el peso

Con el objetivo de monitorizar la glucemia, se obtuvieron muestras de sangre 1 vez por semana desde la vena marginal de la oreja tras la inmovilización de cada animal. Los niveles de sangre se midieron con un glucómetro (Aviva). Además de su observación diaria, para monitorizar el efecto de la diabetes se pesaron los animales semanalmente en una balanza horizontal (PCE-PB N series).

2. Ensayo farmacocinético de pterostilbena fosforilado

Para comprobar que a partir de Pter fosforilado se libera Pter por la acción de las fosfatasas endógenas (Figura 18), se administró el compuesto vía subcutánea y se realizó el estudio farmacocinético sobre 3 conejos diferentes. Se inyectó una dosis de Pter fosforilado (50 mg/kg de Pter) y se recogieron muestras de sangre (1'5 mL) en eppendorfs con 20 µL de heparina a través de la vena marginal de la oreja a distintos tiempos (5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 min y 24

horas). Las muestras fueron centrifugadas a 1000 G 10 min, se recogieron 150 μ L de plasma, y se realizaron 3 extracciones isovolumétricas con acetato de etilo. Para ello, se añadieron 150 μ L de acetato de etilo, posteriormente se centrifugaron a 12000 G 5 min. Se recogió la fase orgánica y se repitió el proceso 2 veces más. El acetato de etilo se evaporó con una corriente de nitrógeno (N2MCLS Nitrogen Generator). Por último, el residuo se reconstituyó con 150 μ L etanol para disolver el Pter precipitado y ser analizado por espectrofotometría de masas (HPLC-MS/MS) (Waters Acquity UPLC-XevoTQ system) junto con una recta patrón de concentraciones de Pter, de acuerdo con Ferrer *et al.* 2005. Los datos se adquirieron y procesaron utilizando el software MassLynx 4.1 y QuanLynx 4.1 (Waters Corp.).

3. Obtención y preparación de muestras

Tras anestesiar a los animales con una sobredosis de pentobarbital sódico (100 mg/kg), se realizó la perfusión de los mismos con tampón fosfato (PBS) (Fisher Scientific). Posteriormente se procedió a la enucleación ocular. En el ojo derecho se extrajo la retina, separándola en dos partes y guardándola en viales a -80 °C (Figura 19). El ojo izquierdo se incluyó en fijador de Davidson (8% paraformaldehído (Sigma-Aldrich), 30% etanol, 10 % ácido acético glacial (Panreac) durante 24 h a 4 °C. Tras este tiempo se realizó una postfijación en etanol 70% durante 24 h. Con el objeto de incluir las muestras las retinas se deshidrataron en baños de etanol en concentraciones de 80%, 90% y etanol absoluto (x2) (1 h/baño). Tras dos baños en xileno (1 h/baño) las muestras se incluyeron en parafina. Las retinas se cortaron a 10 μ m con microtomo (Leica, RM2125RT) y se montaron sobre portaobjetos supergelatinizados para el posterior análisis histológico (Figura 19).

Además, se recolectaron muestras de sangre a través de la arteria auricular central de las orejas en tubos heparinizados en el momento del

sacrificio y se procesaron dentro de los 30 min posteriores a la extracción. Las muestras se centrifugaron 10 min a 1000 G a temperatura ambiente, y el sobrenadante (plasma) se separó y se dividió en alícuotas. A partir de entonces, las muestras se almacenaron a -80 °C hasta el análisis (Figura 19).

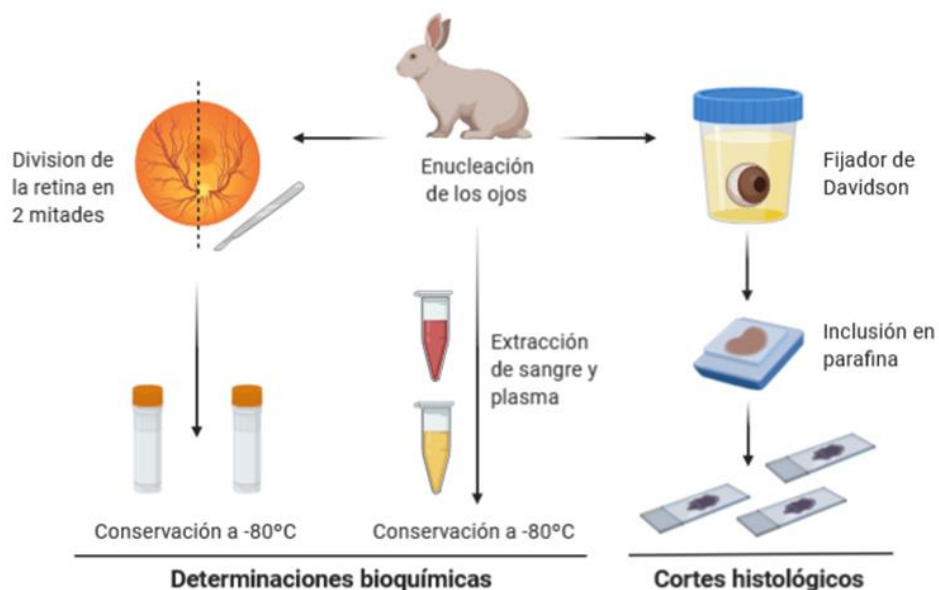


Figura 19. Obtención y conservación de las muestras de estudio.

4. Análisis bioquímico de plasma de conejo

Para la realización de determinaciones bioquímicas plasmáticas, se usaron kits de ensayo comerciales: alanina aminotransferasa (ALT) (Abcam), aspartato aminotransferasa (GOT) (Abcam), fosfatasa alcalina (Abcam). Además de los niveles plasmáticos de bilirrubina total (Abcam), albúmina (Abcam), cloruro (Abcam), nitrógeno ureico en sangre (BUN) (Fisher Scientific), creatinina (Abcam), calcio (Abcam), fosfato (Abcam), sodio (Abcam), potasio (Abcam), la urea y el ácido úrico (Abcam).

5. Ensayos retinográficos

Para evaluar el estado vascular en las retinas usamos la retinografía. Esta es una técnica utilizada en medicina para obtener fotos en color de la retina. Para ello, se usó un retinógrafo GENESIS-D; Kowa (Figura 20). Tras aplicar una gota de tropicamida 1% (Cusí) sobre la pupila del animal para dilatarla (30 minutos), se anestesió a los animales y se fotografió el fondo del ojo izquierdo de cada animal. Las imágenes obtenidas a T0 y T6 se almacenaron en un sistema informático para ser analizadas posteriormente.



Figura 20. Retinógrafo GENESIS-D (Kowa).

6. Análisis de la tortuosidad

Mediante el uso del programa ImageJ (National Institutes of Health, NIH), se dibujó el trazo sobre el vaso de la retina de la imagen tomada mediante retinografía a tiempo 0 (vaso). A su vez, se trazó una línea desde el punto de inicio al punto final del tramo (Benitez-Aguirre *et al.* 2011) (Figura 21). Con estos datos se obtuvo el cociente de las distancias vaso/referencia como valor control. Se aplicó el mismo proceso sobre la retinografía a las 6 semanas, y se relativizó al dato control. Esto se hizo para cada uno de los grupos, control, diabético y diabético tratado con Pter.

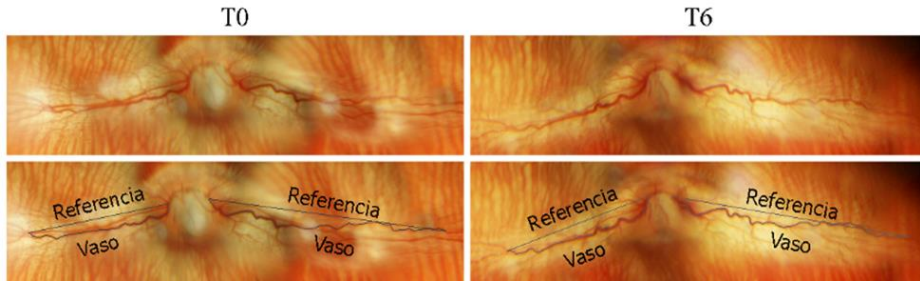


Figura 21. Método de análisis de la tortuosidad vascular retiniana.

7. Detección y cuantificación de apoptosis (TUNEL-HRP)

El nivel de apoptosis se midió mediante la utilización del kit comercial “In Situ Cell Death Detection Kit, POD” (Roche), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. El kit se basa en la detección de rupturas de ADN de cadena sencilla y doble que se producen en las primeras etapas de la apoptosis. En primer lugar, las secciones histológicas de retinas parafinadas (10 μ m) contenidas en portaobjetos supergelatinizados, se desparafinaron con baños de xileno (5 min x2), y se rehidrataron con baños de concentraciones descendientes (100%, 96%, 70%, 50%, 30%) de etanol (PanReac), y agua de 5 min cada uno. A continuación, las retinas se incubaron con la mezcla de reacción del TUNEL, que contiene transferasa de desoxinucleótidos (TdT) y fluoresceína-dUTP. Durante este periodo de incubación, la TdT cataliza la adición de fluoresceína-dUTP a grupos 3'-OH libres en ADN de cadena sencilla y doble. Después del lavado, la marca incorporada en los sitios dañados del ADN fue detectada con un anticuerpo anti-fluoresceína conjugado con la enzima HRP. El revelado para su detección se realizó con diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich). Los núcleos de las células apoptóticas se observan de color marrón al microscopio (Figura 22). Se realizó un control positivo utilizando la enzima ADNasa y un control negativo sin la mezcla de reacción de túnel.

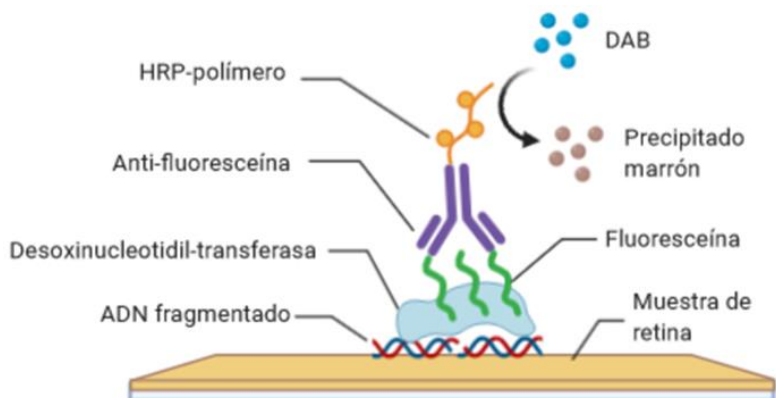


Figura 22. Detección de ADN fragmentado mediante TUNEL-HRP.

Por último, para mejorar la observación de núcleos TUNEL-positivos se contratiñeron las retinas con violeta de cresilo (Sigma-Aldrich). Se deshidrataron los portaobjetos con baños de concentraciones ascendentes de etanol (50%, 70%, 96%, 100% I, 100% II) de 5 min cada uno y xileno (PanReac) 10 min. Las muestras se montaron con cubreobjetos y medio de montaje Eukit (PanReac).

Se tomaron fotografías de los cortes de retina mediante microscopía (Leica DM 4500B). Las imágenes se analizaron con el software ImageJ (National Institutes of Health). Después se cuantificó el número de células tunel-positivas por mm^2 .

8. Determinación de actividades enzimáticas antioxidantes

8.1 Catalasa

La actividad basal de CAT se midió mediante la utilización del kit comercial “Catalase Assay Kit” (Cayman Chemical), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. La CAT participa en la detoxicación del H_2O_2 . Esta enzima cataliza la conversión de dos moléculas de H_2O_2 en oxígeno

molecular y dos moléculas de agua (actividad catalítica). La CAT también demuestra actividad peroxidásica, en la que los alcoholes de bajo peso molecular pueden servir como donantes de electrones (Figura 23). Mientras que los alcoholes alifáticos sirven como sustratos específicos para la CAT, otras enzimas con actividad peroxidásica no utilizan estos sustratos.

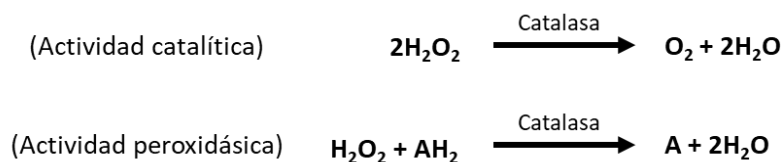


Figura 23. Reacción kit catalasa.

El método está basado en la reacción de la enzima con metanol como donante de hidrógeno en presencia de una concentración óptima de H_2O_2 . El formaldehído producido se une formando un heterociclo bicíclico con el cromógeno 4-amino-3-hidrazino-5-mercapto-1,2,4-triazol (Purpald). El producto de la reacción es oxidado por peryodato de potasio, lo cual da lugar a un cambio en la coloración del cromóforo.

Se preparó una recta patrón con concentraciones conocidas de formaldehído para interpolar nuestras muestras. La placa se incubó 5 min en agitación a temperatura ambiente, y la absorbancia se midió a 540 nm. El tampón de extracción utilizado para el homogenado (Homogenizer SilentCrusher S, Heidolph) de las retinas (50 mg aprox) se compuso de KPi 50 mM (K_2HPO_4 y KH_2PO_4), pH 7 y 1 mM EDTA frío.

8.2 Glutación peroxidasa

La actividad basal de GPx se midió mediante la utilización del kit comercial “Glutathione Peroxidase Assay Kit” (Cayman Chemical), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. El método determina la actividad

de GPx de forma indirecta mediante una reacción acoplada con glutatión reductasa (GR). El glutatión oxidado (GSSG) producido por la reducción de hidroperóxido por la GPx, es restaurado a su estado reducido por la GR y el NADPH (Figura 24). La oxidación de NADPH a NADP⁺ da lugar a un descenso en la absorbancia a 340 nm.

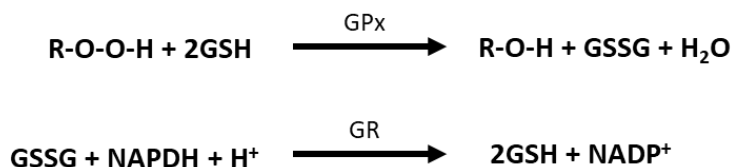


Figura 24. Reacción GPx.

Bajo estas condiciones, el ratio de descenso de la absorbancia es directamente proporcional a la actividad de GPx en la muestra. Las muestras de retina (50 mg de retina aprox) se homogenizaron en un homogenizador “Homogenizer SilentCrusher” (Heidolph) con la adición de un tampón de extracción compuesto de Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 5 mM y DTT 1 mM en frío. La placa con las muestras individuales y la recta estándar GPx fue leída una vez por minuto en lector de placas hasta obtener al menos 5 puntos de tiempo.

8.3 Superóxido dismutasa

La actividad basal de la superóxido dismutasa (SOD) se midió mediante la utilización del kit comercial “Superoxide Dismutase Assay” (Cayman Chemical), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. El kit de utiliza una sal de tetrazolio para la detección de radicales superóxido generados por la xantina oxidasa y la hipoxantina (Figura 25). Una unidad de SOD se define como la cantidad de enzima necesaria para exhibir una dismutación del 50% del radical superóxido.

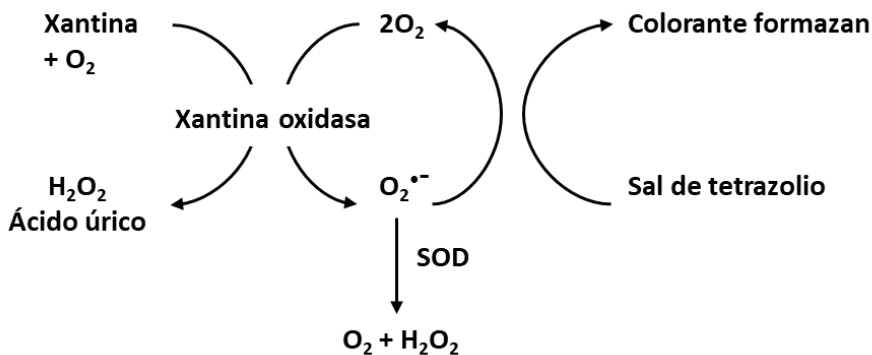


Figura 25. Reacción kit SOD.

Las muestras de retina (50 mg aprox) se homogenizaron en hielo con tampón HEPES 20 mM, pH 7,2, que contiene EGTA 1 mM, manitol 210 mM y sacarosa 70 mM usando el homogenizador “Homogenizer SilentCrusher” (Heidolph). La placa con la recta estándar de SOD y las muestras fue incubada en un agitador durante 30 minutos a temperatura ambiente. Los valores de absorbancia de las muestras fueron medidos en lector de placas en valores de 440-460 nm.

8.4. Cuantificación de proteínas

Las actividades enzimáticas fueron relativizadas a la cantidad de proteínas contenidas en el homogenado de retina. La cuantificación se realizó mediante espectrofotometría (A595). Se utilizó una alícuota de 5 µL de homogenado en 800 µL de reactivo Bradford (azul de Coomassie G-250 disuelto en medio ácido; Thermo), que reacciona con las proteínas produciéndose un cambio de color de marrón a azul. A partir de la determinación de una recta patrón de seroalbúmina (Sigma-Aldrich), se interpolaron las medidas de absorbancia de las muestras y se obtuvieron las concentraciones proteicas.

9. Determinación del estado oxidativo de las retinas

9.1 Biomarcadores de estrés oxidativo determinados por UPLC MS/MS

La cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) es una técnica con una elevada selectividad y sensibilidad, que combina la separación física de la cromatografía líquida con el análisis de la espectrometría de masas. Esta técnica se basa en la generación de iones a partir de moléculas orgánicas en fase gaseosa que son separadas en base a su relación masa-carga (m/z) y posteriormente detectados por medio de un dispositivo adecuado.

Un equipo de MS/MS se encuentra compuesto por un sistema de introducción de muestra, la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La muestra se introduce directamente a través de una varilla metálica, en cuya punta lleva un capilar. Una vez introducida, esta sufre una ionización por electro-spray (ESI) para adquirir carga. La ionización puede tener lugar en modo positivo (generación de cationes) o negativo (generación de aniones). Posteriormente, pasa a un primer cuadrupolo (Q1) que mantiene fija la relación m/z del ión padre. A continuación, pasa a una cámara o celda de colisión (Q2), donde la energía de colisión fragmenta el ión padre en diferentes fragmentos (iones hijos) que entran en el segundo cuadrupolo (Q3) que está fijo a la relación m/z del fragmento mayoritario y, por tanto, solo atraviesa este cuadrupolo el fragmento mayoritario (Figura 26). Por último, el detector registra la cuenta total de iones (TIC).

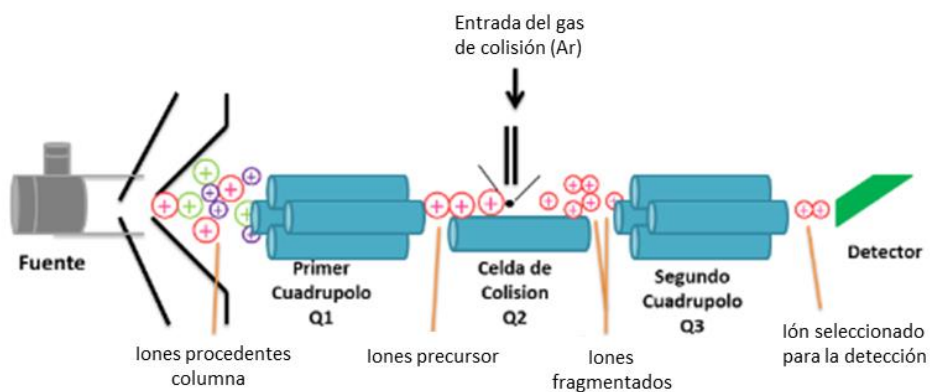


Figura 26. Esquema funcionamiento HPLC/MS/MS (Torres-Cuevas 2017).

En este trabajo se utilizó un HPLC-MS/MS que constaba de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo, Waters Acquity UPLC-XevoTQsystem (Milford) con una fuente de ionización Z-spray operando en modo positivo (ESI+). Para el manejo del equipo y el procesamiento de los datos se utilizó el programa informático MassLynx 4.1 (Waters Corp.). A través de este sistema se analizaron: el GSH/GSSG y su precursor γ -l-glutamyl-l-cisteína (γ -Glu-Cys), isoprostanos y tirosinas de retina.

9.1.1 GSH/GSSG

El GSH/GSSG y su precursor γ -Glu-Cys, fueron analizados por UPLC-MS/MS (Escobar *et al.* 2016).

Los tejidos retinianos se homogenizaron usando el homogenizador “Fisher Scientific, Fisherbrand model 125, FSH-G 5/085” (Waltham) en tampón PBS-NEM 10 mM (N-etilmaleimida, Sigma-Aldrich) en una proporción de 100 mg de tejido por 400 μ L de tampón, donde se dejaron reaccionar durante 1 minuto para evitar la autooxidación de los tioles. A continuación, para precipitar las proteínas se añadió una solución de ácido perclórico (8% v/v). Seguidamente,

las muestras se centrifugaron a 10000 G durante 10 min a 4 °C. Los sobrenadantes se separaron y diluyeron (1:10) en H₂O (HCOOH al 0,1% v/v). Después de eso, 5 µL de solución de mezcla de patrón interno (IS) (cistina-D4 200 µmol/L, cisteína-D2 37.5 µmol/L, fenilalanina-D5 12.5 µmol/L, GSH-C13N15 100 µmol/L, GSSG-C13N15 200 µmol/L) a 95 µL de sobrenadante previamente diluido. Finalmente, se inyectaron en el sistema cromatográfico (UPLC-MS/MS)

Se realizó una curva de calibrado lineal con un intervalo de concentraciones de 185.5 a 190000 nmol/L para el GSH, 9.31 a 9500 nmol/L para el GSSG y para el resto de analitos de 1.9 a 1900 nmol/L corregidos por la señal del patrón. Los resultados fueron expresados tanto por analito en nmol/mg proteína o µmol/mg proteína, o en forma de cocientes (GSH/GSSG γ -glutamylcisteína/cistina).

El método analítico y el tratamiento de la muestra ha sido validado siguiendo las normas de la FDA (Downing *et al.* 2017). Las características analíticas ensayadas durante el procedimiento de validación fueron el rango de linealidad, la exactitud, la precisión, la selectividad, el límite de detección (LOD), el límite de cuantificación (LOQ), así como la estabilidad de las muestras y de los patrones (Escobar *et al.* 2016).

9.1.2 Isoprostanos

El daño lipídico retiniano se determinó mediante el análisis de prostaglandinas (PG), isoprostanos (IsoP), neuroprostanos (NeuroP), dihom-IsoP (Dihomo-IsoP), dihomo-isofuranos (Dihomo-IsoF) y parámetros totales (IsoP, IsoF, NeuroP y NeuroF) usando UPLC-MS/MS. Las prostaglandinas PGE₂, PGF_{2 α} , los estándares IsoP 8-iso-PGE₂, 8-*iso*-15-keto-PGF_{2 α} , 8-*iso*-15(R)-PGF_{2 α} , 1a,1b-dihomo-PGF_{2 α} y el estándar interno deuterado PGF_{2 α} -4d se

obtuvieron de Cayman Chemical Company (Ann Arbor, Michigan, EE. UU.) (Figura 27). Los estándares 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP, 4 (RS)-F_{4t}-NeuroP, 14(RS)14-F_{4t}-NeuroP, 17-F_{2t}-Dihomo-isoP, Ent-7(RS)-F_{2t}-Dihomo-IsoP, 17-*epi*-17F_{2t}-Dihomo-IsoP, 10-*epi*-17(RS)SC- Δ^{15} -11-Dihomo-IsoF, 7(RS)-ST- Δ^8 -11-Dihomo-IsoF fueron sintetizados en el Instituto de Biomoléculas Max Mosseron (IBMM) (Montpellier, Francia) (Figura 27). Los métodos de detección y análisis utilizados fueron establecidos en estudios previos (Cháfer-Pericás *et al.* 2015).

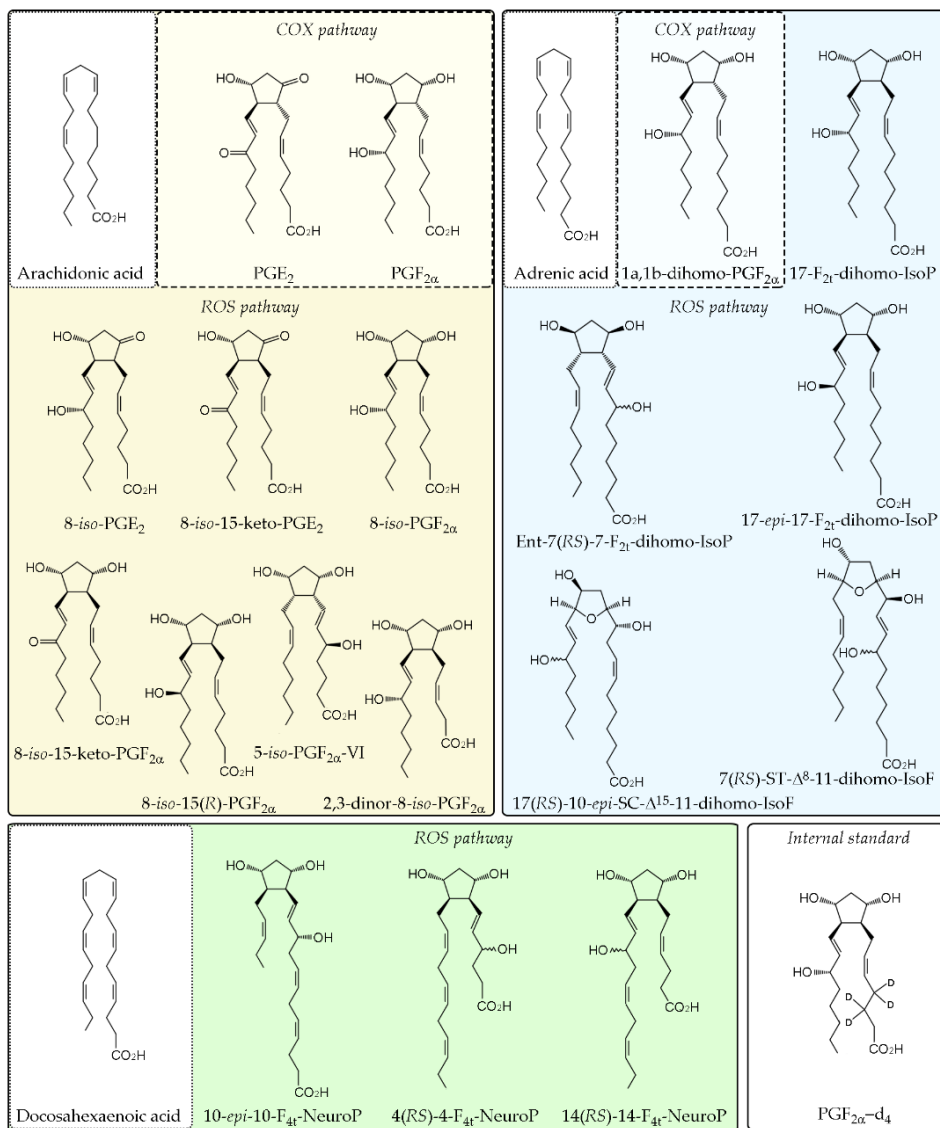


Figura 27. Estructura química de analitos y patrón interno. Los PUFA analizados derivados de ácido araquidónico, ácido adrenico y ácido docosahexaenoico a través de la vía de la ciclooxygenasa (COX) y/o peroxidación no enzimática se separan en recuadros de diferentes colores.

Para llevarlo a cabo se homogenizaron 50 mg aprox de retina (Fisherbrand modelo 125, FSH-G 5/085, Fisher Scientific) en 1 mL de hidróxido

de sodio metanólico (NaOH-Met) (12 g NaOH, 23 mL H₂O y 160 mL metanol) 30 min a 42 °C para producir saponificación. Se transfirió a otro recipiente de vidrio 400 µL de homogenado, 800 µL de H₂O y 400 µL de NaOH-Met, se calentaron a 45 min a 42 °C y se dejaron enfriar en hielo durante 10 min. Posteriormente, se ajustó a pH 3 con HCl 3 M y se centrifugó a 1000 G para la precipitación protéica. Una vez recolectado el sobrenadante, se comenzó con las extracciones de IsoP donde se agregaron 3 mL de hexano y se centrifugó nuevamente 5 min a 1000 G. Se eliminó el sobrenadante y se agregaron 3 mL de acetato de etilo. El sobrenadante se recogió en otro recipiente y se evaporó con gas nitrógeno en una campana extractora. Los extractos secos se reconstituyeron en 200 µl de una mezcla de 15 ml de metanol, 85 ml de H₂O y 10 µl de ácido acético. Finalmente se tomaron 90 µl de la muestra resuspendida y se añadieron 5 µl de estandar interno (PGF2 α -4d 20 µM) para analizarla en UPLC-MS/MS. Durante el tratamiento de la muestra se utilizó exclusivamente material de vidrio.

9.1.3 Medición de tirosinas en retina

Las relaciones 3NO₂-Tyr/p-Tyr, m-Tyr/Phe y 3Cl-Tyr/p-Tyr se cuantificaron mediante UPLC-MS /MS de acuerdo con Torres-Cuevas *et al.* (Torres-Cuevas *et al.* 2016). Brevemente, homogenados de retina (Fisher Scientific, Fisherbrand model 125, FSH-G 5/085) con tampón de lisis (100 mg/mL) (Hepes pH 7,4 con 1 DTT mM, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 50 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, Igepal al 1%, cóctel inhibidor de proteasas al 10% (Sigma-Aldrich) se sonicaron (Branson, modelo: 4C15, All-Spec) durante 30 segundos en 2 pulsos de 15 segundos con una amplitud del 30%. Con la adición de TCA (10%, v/v), se precipitaron las proteínas, se eliminó el sobrenadante, y los sedimentos se tamponaron y resuspendieron en acetato de sodio (50 mmol/L, pH 7,2) (Sigma-Aldrich), se ajustó el pH a 6,5-7 con NaOH 1N. Se añadió pronasa 20 mg/mL con incubación durante 18 h a 50 °C en

agitación, con un volumen 10 veces menor que la muestra. Se añadió nuevamente TCA al 10% (la mitad del volumen total) para finalizar la actividad pronasa y precipitarla, se centrifugó a 2500 G 5 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante. Finalmente, se agregaron 5 µL de solución de patrón interno (10 mmol L⁻¹ Phe-D5) a alícuotas de 95 µL de sobrenadante de cada muestra y se inyectaron en el sistema cromatográfico (UPLC-MS/MS). Los métodos de detección y análisis utilizados fueron establecidos en estudios previos (Torres-Cuevas *et al.* 2016).

9.1.4 Cuantificación proteica de los homogenados

Los datos obtenidos por HPLC-MS/MS se relativizaron a la cantidad de proteínas presente en sus respectivos homogenados a la hora de expresar los resultados. Para esta cuantificación proteica de las muestras se empleó el kit “Pierce BCA Protein Assay Kit[®]” (Thermo Scientific) siguiendo el protocolo del fabricante. Este es un método colorimétrico basado en la reducción de Cu⁺² a Cu⁺¹ en presencia de proteínas y en medio alcalino, y su posterior reacción con dos moléculas de ácido bicinconínico (BCA), dando lugar al complejo coloreado cuya absorbancia se mide en un espectrofotómetro a 562 nm de longitud de onda. Para la correcta determinación de proteínas, se preparó una recta patrón de seroalbúmina bovina (Sigma-Aldrich) en concentraciones comprendidas entre 20 y 0,3 mg/ml, en la cual se interpolaron las muestras de retinas. En una placa de 96 pocillos, se añadieron a 3 µl de muestra 260 µl de la mezcla de reactivos, y tras una incubación a 37 °C en oscuridad durante 30 min, se leyó la absorbancia en lector de placas Multiskan Spectrum (Thermo Scientific).

9.2 Peroxidación lipídica: 4-hidroxinonenal

El 4-HNE se determinó en homogenados de retina mediante el kit “4-Hidroxynonenal (4-HNE) BioAssay ELISA Kit (Rabbit)” (USBiological), siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. Esta determinación se realizó sobre homogenados de retina (50 mg aprox) realizados previamente a través de “Homogenizer SilentCrusher” (Heidolph) en PBS pH 7-7.2 (Fisher Scientific) en hielo. Tras esto se congelaron y descongelaron dos veces para favorecer la rotura de las membranas plasmáticas, y se centrifugaron a 1500G. Este kit de ELISA emplea la técnica de inmunoensayo competitivo utilizando una placa de microvaloración que se ha recubierto previamente con un anticuerpo monoclonal anti-4-HNE. Las muestras de ensayo y los estándares se incubaron junto con el conjugado de 4-HNE-HRP durante una hora. Después del período de incubación se incubó con el sustrato para la enzima HRP. El producto de la reacción forma un complejo de color azul. Finalmente, se añadió una solución de parada para terminar la reacción, que la vuelve de color amarillo (Figura 28).

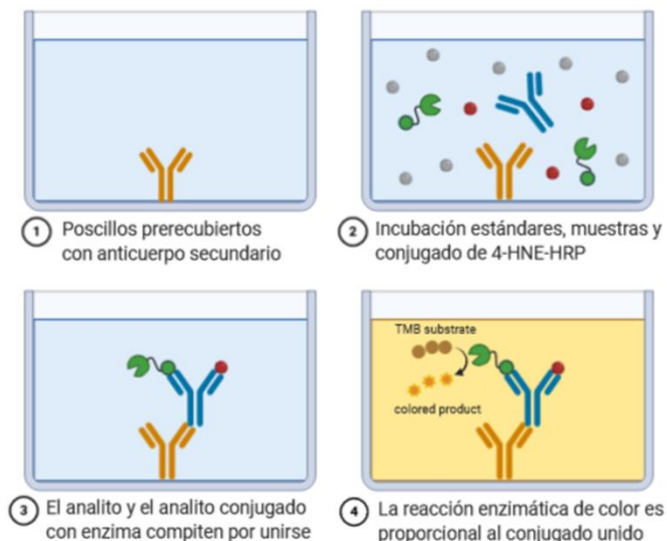


Figura 28. Determinación por Elisa competitiva de 4-HNE.

La intensidad del color se midió espectrofotométricamente a 450 nm en un lector de microplacas. Esta intensidad de color es inversamente proporcional a la concentración de 4-HNE en la muestra o estándar. Se trazó una curva que relacionaba la intensidad del color con las concentraciones de los estándares. La concentración de 4-HNE en cada muestra se interpoló a partir de esta curva.

9.3 Carbonilación de proteínas

Los grupos carbonilo fueron determinados mediante el kit “Rabbit Protein Carbonyl (PC) ELISA Kit” (BlueGene) siguiendo el protocolo establecido por la casa comercial. El kit, al igual que con el 4-HNE, aplica una técnica de inmunoensayo enzimático competitivo utilizando un anticuerpo monoclonal anti-PC y un conjugado PC-HRP. La muestra de ensayo y el tampón se incubaron conjuntamente con el conjugado PC-HRP, y tras el período de incubación, los pocillos se lavaron e incubaron con el sustrato para la enzima HRP. El producto de la reacción enzima-sustrato forma un complejo de color azul, al que se le añade una solución para detener la reacción, que a su vez volverá la solución amarilla. La intensidad del color se midió espectrofotométricamente a 450 nm en un lector de microplacas. Esta intensidad es inversamente proporcional a la concentración de PC, ya que las PC del conjugado de PC-HRP compiten por el sitio de unión del anticuerpo anti-PC. Se trazó una curva estándar que relaciona la intensidad del color con la concentración de los estándares. La concentración de PC en cada muestra se interpola a partir de esta curva pendiente. Los homogenados de tejido (50 mg aprox) se llevaron a cabo mediante el uso de “Homogenizer SilentCrusher” (Heidolph) en PBS (Fisher Scientific) pH 7-7.2 en frío. Posteriormente se sometieron a dos ciclos de congelación-descongelación para aumentar la lisis celular, y se centrifugaron a 1500 G.

9.4 Determinación de peróxido de hidrógeno

Se utilizó el kit Amplex[®] Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase (Fisher Scientific) para medir los niveles de H₂O₂ tanto en los medios de cultivo de células endoteliales de retina humana (HREC, del inglés *Human Retinal Endothelial Cells*) como en el tejido de retina homogenado, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En el caso de las retinas, la medición se hizo sobre un homogenado en tampón de lisis (Hepes pH 7,4 con DTT 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 50 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, Igepal al 1%, cóctel inhibidor de proteasas al 10% (Sigma-Aldrich).

El kit se basa en la capacidad del reactivo Amplex[®] Red (10-acetil-3,7-dihidroxifenoxazina) en combinación con peroxidasa de rábano picante (HRP), para detectar la actividad del H₂O₂ liberado por las muestras biológicas en una estequiometría 1:1 para producir el producto de oxidación rojo fluorescente, resorufina. Se preparó una curva estándar de valores conocidos de H₂O₂ que junto a las muestras se incubaron con los reactivos 30 min en oscuridad. La señal de fluorescencia se midió mediante espectrofluorimetría (Fluoroskan Ascent, Fisher Scientific) a una absorbancia de 560 nm.

10. Cultivos celulares

Para los estudios *in vitro* se utilizaron 3 líneas celulares: HREC, pericitos de retina humana (HRP) y células embrionarias de riñón humano transfectadas con GLP1R (NOMAD HEK 293) (Figura 29). Estos cultivos fueron destinados a la realización de diferentes ensayos.

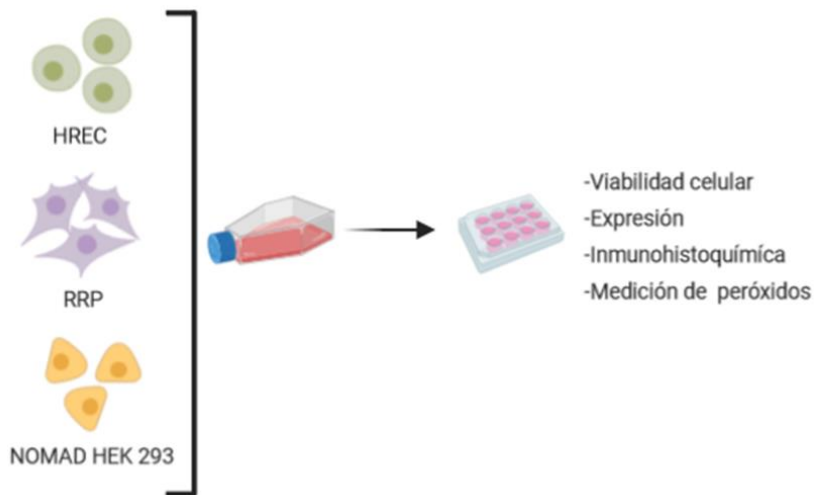


Figura 29. Líneas celulares empleadas en los estudios in vitro.

10.1 Estudios de viabilidad celular

La línea HREC (Innoprot) se mantuvo en medio de células endoteliales (Innoprot) con 1% de suero bovino fetal a 37 °C y 5% de CO₂ en una incubadora humidificada para una óptima nutrición y crecimiento. De la misma manera, las células HRP se mantuvieron en un medio de pericitos (Innoprot) aplicándose las mismas condiciones que en las HREC. Las células utilizadas en todos los ensayos se encontraban entre los pases 3 y 5. Para realizar los experimentos de citotoxicidad de la glucosa, las células se sembraron en placas de cultivo recubiertas con fibronectina (en el caso de las HREC) a una densidad de 10000 células/cm². Las células se suplementaron con glucosa a niveles normales (5 mM) o altos (30 mM) y se trataron a diferentes concentraciones de Pter (se usó DMSO (Sigma-Aldrich) como vehículo a una concentración del 0,1%) 24 h después. El crecimiento celular se analizó usando el contador celular automático Countess® (Invitrogen; Fisher Scientific) después de 24 y 48 horas.

10.2 Cultivo de la línea celular cAMPNomad GLP1R HEK293

Se adquirieron células HEK293 transfectadas de forma estable con un biosensor de cAMP Nomad y receptor del péptido 1 similar al glucagón (GLP1R, del inglés *glucagón-like peptide-1*) (Innoprot). Esta línea celular se diseñó para evaluar la capacidad de los compuestos para activar GLP1R, que induce un aumento de cAMP. Las células GLP1R Nomad se mantuvieron en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Fisher Scientific) que contenía un 10% de albúmina de suero bovino (BSA, Fisher Scientific). También se añadió antibiótico puromicina (5 µg/ml) como antibiótico de selección y se incubó a 37 °C y un 5% de CO₂ en una incubadora humidificada. Las imágenes de la reubicación y acumulación de cAMP en vesículas intracelulares se adquirieron mediante microscopía automatizada IN Cell Analyzer 2000 con un objetivo de 20x. Las imágenes se analizaron con el software "IN Cell Investigator Image Analysis Software 1000 Workstation" (GE Healthcare). Además, se tomaron imágenes confocales mediante un microscopio confocal Leica TCS SP2 con un objetivo HCX PL APO 40x NA 1.32 (Leica).

10.3 Inmunocitoquímica de NRF2

La inmunocitoquímica de NRF2 se realizó después del tratamiento con glucosa y Pter en células HREC. Las células se lavaron con PBS y se fijaron usando paraformaldehído al 4% (Sigma-Aldrich) durante 30 min. Luego, las células se incubaron con Triton X-100 al 1% en PBS durante 10 min para permeabilizar las membranas celulares seguido de incubación con albúmina de suero bovino (BSA) (Sigma-Aldrich) al 3% y suero bovino fetal (FBS) (Sigma Aldrich) 5% en PBS durante 1 h. Las células se incubaron con una dilución 1:250 de anticuerpo primario contra NRF2 (Cell Signaling) durante la noche a 4 °C,

seguido de anticuerpo secundario Alexa Fluor® (Fisher Scientific) durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Los núcleos se tiñeron con 4,6-diamidino-2-feniindol, diclorhidrato (DAPI) (Fisher Scientific) y luego se examinaron por microscopía óptica (Leica DM 4500B). Los datos en núcleos y citosol se obtuvieron mediante el software ImageJ y se expresaron en forma de ratio intensidad/área. Para ello se midió el área y la intensidad de fluorescencia de las células individualmente en el núcleo y el citosol.

10.4 Elevación de los niveles de expresión de NQO1 a través de la vía PI3K/GSK3 β

Para realizar los análisis en la expresión de NQO1 en HREC, se sembraron células en placas de cultivo recubiertas con fibronectina a una densidad de 10000 células/cm² durante 24 h, a las cuales se les añadió unos determinados inhibidores. Como inhibidores de la quinasa PI3K usamos 10 nM de BEZ235 (Sigma-Aldrich), un inhibidor dual de PI3K y mTOR competitivo con ATP para p110 $\alpha/\gamma/\delta/\beta$ y mTOR (p70S6K) y 20 mM de cloruro de litio (Sigma-Aldrich) para inhibir GSK3 β . Estos inhibidores se incubaron 1 hora antes del tratamiento con Pter. El aislamiento de ARN se realizó 24 h después.

11. Estracción de proteínas y análisis *western blot*

Las muestras de tejido se homogenizaron en tampón de lisis (Hepes pH 7,4 con DTT 1 mM, ortovanadato de sodio 1 mM, fluoruro de sodio 50 mM, pirofosfato de sodio 30 mM, igeal al 1%, *cocktel* inhibidor de glicerol y proteasa al 10% (Sigma-Aldrich) enfriado con hielo en una proporción de 100 mg/ml, utilizando el homogenizador “Homogenizer SilentCrusher” (Heidolph). La cantidad de proteínas en el homogeneizado de retina se determinó utilizando el kit de ensayo de proteínas Pierce BCA (Thermo Scientific). Para la

electroforesis, se utilizó tampón de muestra 4x Laemmli (Bio-Rad) junto con ditiotreitól (DTT, Sigma-Aldrich) 50 mM como agente reductor. Después de la incubación a 95 °C durante 10 min, 40 µg/condición de cada muestra se resolvieron mediante geles prefabricados SDS-PAGE al 4-20% (Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ (Bio-rad)) y se transfirieron a una membrana de PVDF (Bio- Rad) con el sistema de transferencia Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad). Las membranas se incubaron durante 1 h en BSA 5% preparado en TBS-T (Tween-20 0.1%, Tris 20 nM, NaCl 137 mM, pH 7.6) para eliminar las uniones inespecíficas. Las transferencias se incubaron durante la noche a 4 °C con anticuerpos primarios preparados en BSA 5% TBST 1% en las diluciones indicadas en la Tabla 5:

Anticuerpo	Dilución	Casa comercial
p-PI3K	1:1000	Cell Signalling
PI3K	1:1000	Cell Signalling
P-AKT	1:2000	Cell Signalling
AKT	1:1000	Cell Signalling
P-GSK3β	1:1000	Abcam
GSK3β	1:1000	Abcam
NQO1	1:1000	Abcam

Tabla 5. Anticuerpos usados para western blot.

Las membranas se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente con un anticuerpo secundario apropiado acoplado a HRP anti-ratón y HRP anti-conejo 1:1000, Cell Signalling) para marcar bandas inmunoreactivas. Las transferencias se visualizaron usando el kit de detección de quimioluminiscencia SuperSignal™ West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Scientific). Las señales se capturaron utilizando el sistema de imágenes ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) + Molecular Imager y LAS-3000 (Fujifilm). El análisis densitométrico de

las bandas se realizó utilizando el software Image Lab Software™, versión 2.0.1 (Bio-Rad). Para hacer posible la combinación de datos de diferentes inmunotransferencias, la densidad relativa de cada banda de proteína fosforilada se normalizó frente a su homóloga no fosforilada en cada muestra.

12. Análisis de expresión génica

12.1 Extracción de ARN

Las muestras de ARN de cultivos celulares y retina se extrajeron en “TRI Reagent® RNA Isolation Reagent” (Sigma-Aldrich) siguiendo el protocolo suministrado por la casa comercial. Brevemente (Figura 30), el protocolo consistió en la homogenización de las muestras en trizol (50 mg/mL y $5 \cdot 10^6$ células/mL) para la ruptura de las membranas plasmáticas y la dilución del ARN, DNA y proteínas. Tras una breve incubación a temperatura ambiente, se añadió cloroformo (Sigma-Aldrich) (0.2 mL/mL trizol), que separa el fenol saturado en fase acuosa (ácidos nucleicos), fase intermedia (ADN) y orgánica (proteínas) tras una centrifugación a 12000 G 15 min a 4 °C. Se recogió la fase acuosa y se añadió 2-propanol (Sigma-Aldrich) (0.5 mL/mL trizol) para deshidratar y precipitar el ARN mediante centrifugación a 12000 G 10 min a 4 °C. Para eliminar los restos de 2-propanol, se añadió etanol 75% (PanReac) frío. Por último, se centrifugó, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el pellet (ARN) en H₂O libre de ARNasas.



Figura 30. Extracción de ARN mediante el método fenol-cloroformo.

La concentración de ARN (Abs 260nm) y su la pureza (relación A260/A280) se determinaron mediante espectrofotometría (Nanodrop, Thermo Scientific).

12.2 Retrotranscripción de ARN a ADNc (RT-PCR)

El ARN se retrotranscribió a ADNc por la acción de la transcriptasa inversa, ya que la ADN polimerasa sólo puede actuar sobre el ADN. Esta reacción se realizó mediante el uso del kit “PrimeScript RT Reagent kit”, (Takara Bio Inc, Shiga, Japón). La *master mix* contenía retrotranscriptasa, nucleótidos y cebadores hexaméricos aleatorios, a la que se añadieron las muestras de RNA. Se utilizaron 500 ng de ARN para la transcripción inversa, realizada en 2 pasos: 15 min a 37 °C y 5 seg a 85 °C en C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad).

12.3 Reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

La PCR en tiempo real (RT-PCR) se realizó con un termociclador iQTM5 Multicolor Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) acoplado a detección de fluorescencia. La *master mix* usada para la PCR fue TB Green[®] Premix Ex TaqTM (Tli RNase H Plus) (Takara), que contiene polimerasa, nucleótidos y reactivo de fluorescencia, necesarios para la reacción. El termociclador se ajustó según el siguiente esquema de amplificación: 10 min a 95 °C (activación de la polimerasa), 40 ciclos de 15 seg a 95 °C (desnaturalización de la doble hélice) seguidos de 30 seg a 60-64 °C para la hibridación (según la temperatura óptima de hibridación para cada primer) y 30 seg a 72 °C para la amplificación. Se usó β -actina como transcripción de referencia. Los cebadores específicos empleados fueron (5' a 3') (Tabla 6):

Gen objetivo	Secuencia de oligonucleótidos Forward/Reverse
NQO1	F: CCATGGTCGGCAGAAGAG R: GATGGGATTGAAGTTCATGG
GCLC	F: GAAAGGACAAACCCAAACCA R: TCTGGGAAACGAGGTTATCG
GCLM	F: TATCAGTGGGCACAGGTGAA R: CTTGGATGTCAGGGATGCTT
β-Actina	F: GACCCAGATCATGTTTGAGA R: AGGGCATACCCCTCGTAGAT

Tabla 6. Primers para RT-PCR de los genes sometidos a estudio.

Se determinó el ciclo umbral (CT, del inglés “threshold cycle”) y la expresión génica se expresó como: fold change = $2^{-\Delta(\Delta C_T)}$, donde $\Delta C_T = C_{T \text{ target}} - C_{T \text{ housekeeping}}$, y $\Delta(\Delta C_T) = \Delta C_{T \text{ treated}} - \Delta C_{T \text{ control}}$.

13. Marcaje inmunocitoquímico. Inmunofluorescencia de GLP1R

El marcaje se realizó sobre portas supergelatinizados con secciones de retina de 5 μm . En primer lugar se desparafinaron las muestras con baños de xileno (15 min), y se rehidrataron con baños de concentraciones descendientes (100%, 96%, 70%, 50%) de etanol (PanReac), y agua de 5 min cada uno. Tras unos lavados con DPBS (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, con calcio y magnesio, Life Technologies), se permeabilizó el tejido con TritonTM X-100 al 1% (v/v) en DPBS durante 1h a temperatura ambiente. Seguidamente se realizó un bloqueo de uniones inespecíficas incubando las retinas con tampón 1 (1% BSA, SBF 5% y 0'3% Triton-x-100) durante 45 min a temperatura ambiente. Tras esto, se incubó con el anticuerpo primario anti-GLP1R (Novus Biologicals) 1:200 en tampón 1 durante toda la noche en agitación a 4 °C en cámara húmeda. Después de varios lavados con tampón 2 (0.25% BSA y 0.1% Triton-100-X en DPBS), se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario acoplado a un fluorocromo (Alexa fluor 488 donkey anti-mouse IgG, Invitrogen) diluido 1:1000 en tampón 2. Se realizó una incubación en DAPI 1:1000 en H₂O para marcar los nucleos celulares. Por último, se lavaron las retinas con DPBS y se montaron en portaobjetos utilizando el reactivo Prolong[®] Gold Antifade Reagent (Molecular Probes, Life Technologies). Las imágenes se tomaron con un microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse 80i) con un objetivo de 40x.

14. Análisis estadístico

Los cálculos, así como las representaciones gráficas, se realizaron con el programa Microsoft Office Excel 2016 y GraphPad Prism 5.0. Para el análisis

estadístico de los resultados que se presentan en este trabajo se utilizó el programa informático GraphPad Prism 5.0 para Windows.

Los datos obtenidos en los experimentos se analizaron mediante un análisis de la varianza (ANOVA) para determinar las diferencias entre grupos, seguido de las pruebas de comparación múltiple para la homogeneidad de las varianzas de Newman-Keuls y Tukey. La hipótesis nula se rechazó para todos aquellos valores de los test en los que el valor F fue significativo con un p-valor menor de 0.05, 0.01 y 0.001.

RESULTADOS

1. Análisis de los efectos del pterostilbeno frente a la exposición a altos niveles de glucosa en pericitos y células endoteliales de retina humana

Para evaluar el papel protector de Pter contra el estrés oxidativo inducido por la alta exposición a glucosa, se incubaron HREC (Innoprot) (Figura 31) y pericitos de retina humana (HRP, del inglés *Human Retinal Pericytes*) (Innoprot) (Figura 32) en medios de cultivo con diferentes concentraciones del polifenol, más glucosa 5 mM (control) o 30 mM (alta glucosa HG, del inglés *high glucose*).

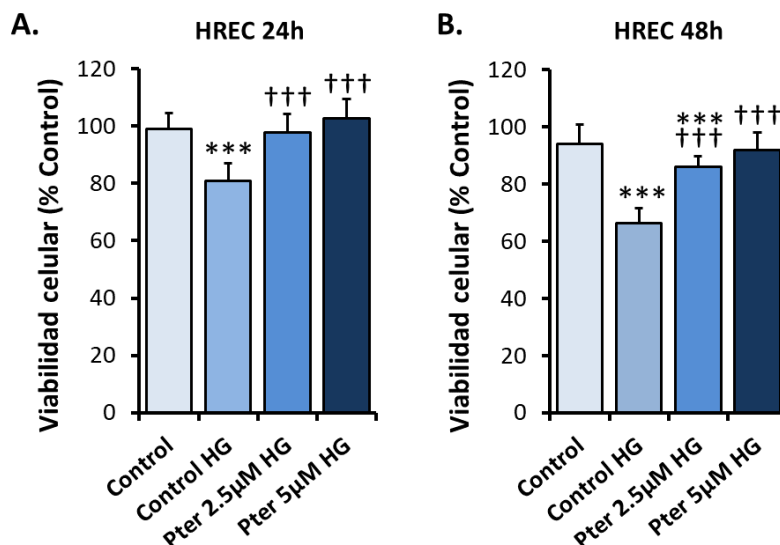


Figura 31. Análisis de la capacidad citoprotectora del Pter en cultivos HREC. Contaje a las 24h (A) y a las 48h (B). Las células utilizadas se encontraban entre los pases 3 y 5. Se utilizaron placas de doce pocillos (0.035×10^6 células/pocillo) (DMSO 0,1% utilizado como vehículo) para la realización de los experimentos. Los resultados se expresaron como índice de proliferación relativa \pm DE ($n=8$), donde el control es 100. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y la prueba de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ frente al grupo control. ††† $p < 0,001$ frente al grupo control HG.

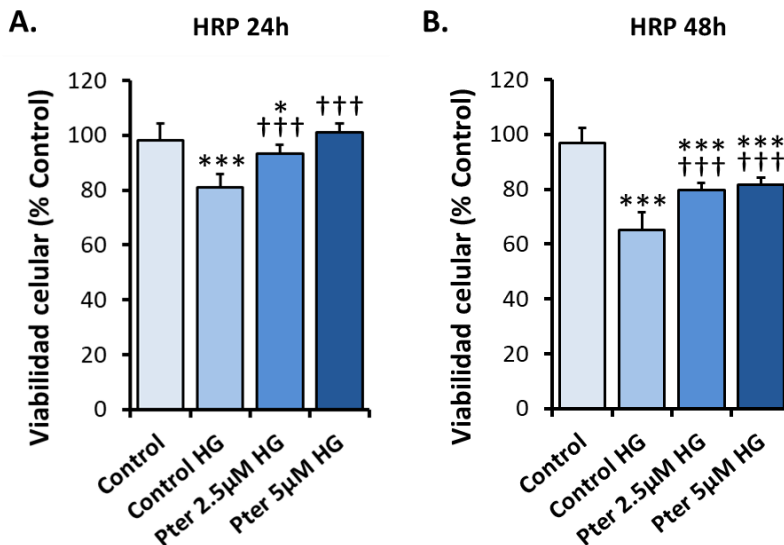


Figura 32. Análisis de la capacidad citoprotectora del Pter en cultivos HRP. Contaje a las 24h (A) y a las 48h (B). Las células se encontraban entre los pases 3 y 5. Los experimentos se realizaron utilizando placas de doce pocillos (0.035×10^6 células/pocillo) (DMSO 0,1% utilizado como vehículo de Pter). Los resultados se expresaron como índice de proliferación relativa \pm DE ($n=8$), donde el control es 100. Los resultados se analizaron estadísticamente mediante ANOVA y la prueba de Tukey. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ frente al grupo control. ††† $p < 0,001$ frente al grupo control HG.

Los cultivos de HREC experimentaron un claro descenso en el contaje del número de células en aquellas placas donde el medio contenía una concentración de glucosa de 30 mM respecto al control de 5 mM. Este efecto se vio revertido con la adición de Pter en el medio de cultivo tras 24 h de incubación (Figura 31 A). Tras 48 h de incubación, el aporte de Pter seguía mostrando un aumento en la supervivencia celular respecto al grupo control HG (Figura 31 B). De forma similar, el efecto observado en las HREC se mostraba en las HRP. El número de pericitos disminuyó significativamente en presencia de glucosa 30 mM respecto al grupo control a las 24h de incubación. Con la adición de Pter 2.5 µM se aumentó la viabilidad celular, sin embargo, aunque significativamente

eran diferentes al grupo control HG, se requirió una concentración de 5 μM para adquirir recuentos celulares iguales al control con glucosa 5 mM (Figura 32 A). A las 48h, la incubación con las diferentes concentraciones de Pter mostraban diferencias respecto al control, pero aun así, los valores en el conteo seguían siendo superiores a las cultivadas sin el polifenol (Figura 32 B). Por lo tanto, de esta manera, se aprecia como el Pter muestra una clara protección en la viabilidad de ambos tipos celulares.

2. Análisis farmacocinético plasmático del pterostilbeno tras la administración subcutánea de su derivado fosforilado

Con el objetivo de estudiar el posible efecto beneficioso del Pter contra el daño oxidativo en la retina, se añadió un grupo fosfato a la molécula del polifenol (Figura 33 A). Esta modificación facilita su disolución en agua y posibilita la administración subcutánea diaria *in vivo* durante 6 semanas evitando el uso de solventes orgánicos. Para saber si con el derivado se alcanzaban concentraciones biológicas activas de Pter en sangre se realizó un ensayo farmacocinético (Figura 33 B, C). Se administró una inyección subcutánea de sal disódica de Pter fosforilado (Pter 50 mg/kg) disuelta en agua (25 mg/ml). La sangre se recogió en diferentes momentos y el Pter se cuantificó en plasma mediante el análisis UPLC-MS/MS.

El grupo fosfato en la posición 4' aumentó la solubilidad en agua y alcanzó concentraciones biológicamente activas en plasma durante las primeras 4 h después de la administración subcutánea, con efectos potencialmente beneficiosos (entre 1.5 y 3 μM) según los resultados obtenidos en los estudios *in vitro*. También se determinó el Pter en el plasma de los conejos tratados durante seis semanas, 24 h después de la última inyección ($0,60 \pm 0,19 \mu\text{M}$) y no se

observaron diferencias significativas respecto los valores obtenidos tras una sola administración ($0,33 \pm 0,21 \mu\text{M}$). Nuestros resultados muestran que el Pter se liberó de la sal disódica de Pter fosforilado y se detectó en plasma a una concentración estable durante al menos 2 h (Figura 33). Además, el estilbeno no se acumuló después de seis semanas de administraciones subcutáneas.

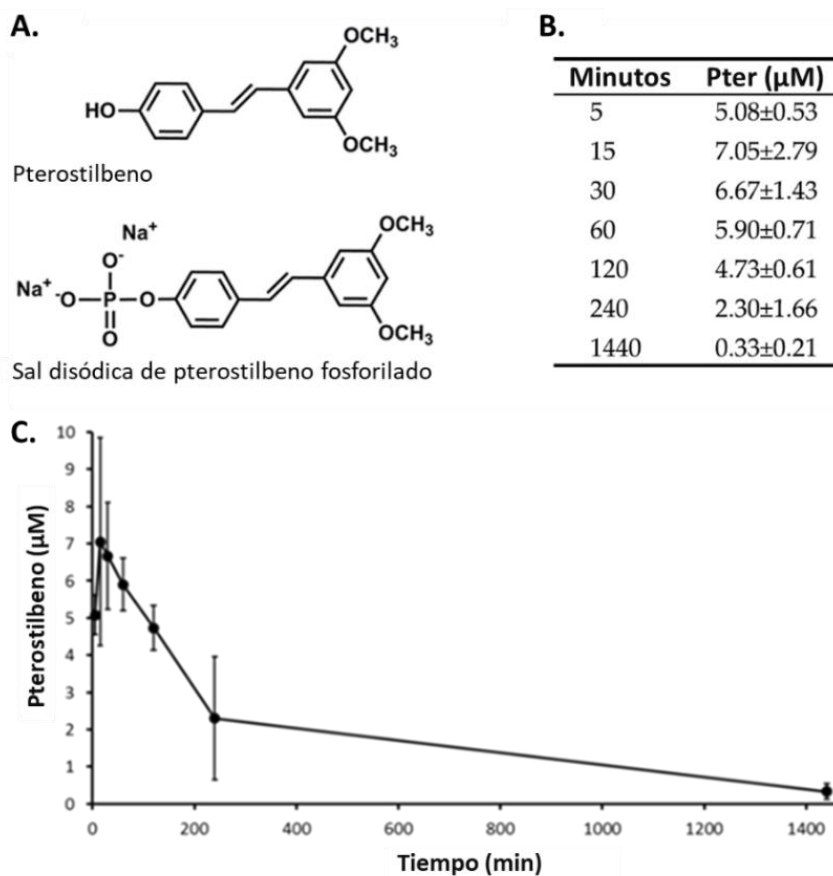


Figura 33. Estructuras químicas y niveles plasmáticos de Pter tras la administración de sal disódica fosforilada del polifenol. Estructuras químicas de Pter y sal disódica de fosfato de Pter (A). La extracción de los plasmas se hizo a: 5, 10, 15, 30, 60, 120, 240 min y 24 horas, y se analizaron por HPLC-MS/MS(B). Los datos mostrados en la tabla B se encuentran representados gráficamente en la figura C. Los resultados son medias \pm DE ($n=4$).

3. Evaluación del peso corporal y niveles de glucosa en sangre

Los pesos corporales y los niveles de glucosa en sangre se midieron 1 día antes de la inducción de la diabetes (semana 0) y semanalmente después de la inducción de diabetes con aloxano (semanas 1-6) (Figura 34), con el fin de confirmar el mantenimiento de la enfermedad a lo largo del tiempo, y detectar cualquier posible cambio que el Pter pudiese ejercer sobre alguno de estos parámetros.

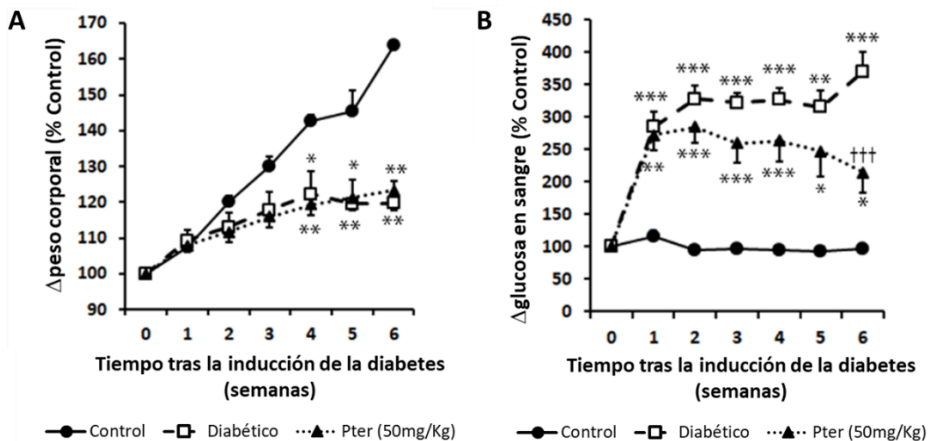


Figura 34. Pesos corporales y niveles de glucosa en sangre desde el día previo a la inducción de diabetes y durante las 6 semanas de tratamiento. Se evaluaron semanalmente los niveles peso (A) y glucosa en sangre (B). Los resultados son medias \pm DE (n=6). Se utilizó una ANOVA, seguido de la prueba post hoc de Tukey, para evaluar las diferencias significativas entre las condiciones experimentales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al grupo de control ††† $p < 0,001$ frente al grupo de diabéticos.

Los conejos diabéticos y diabéticos tratados con Pter experimentaron una pérdida de peso significativa en comparación con la condición de control, cuyo peso se había incrementado en el tiempo (Figura 34 A). Las diferencias en

el peso corporal comenzaron en la segunda semana y aumentaron en ambos grupos durante el período experimental. Además, la diabetes indujo un aumento de la glucemia y el Pter la redujo significativamente, aunque no alcanzó los valores del grupo control (Figura 34 B). Puede observarse como el tratamiento con Pter no modificó los cambios que se inducen en los animales diabéticos con respecto al control en cuanto al peso se refiere.

4. Análisis de la toxicidad inducida por el tratamiento

Con la intención de comprobar que la administración de Pter a los animales de experimentación no producía ningún daño ni riesgo de toxicidad, se realizó un análisis de los plasmas a tiempo final (6 semanas). Las determinaciones bioquímicas se presentan en la Tabla 7. En los conejos diabéticos, la ALT (alanina aminotransferasa) y la fosfatasa alcalina fueron significativamente más altas que en los controles y animales tratados. La albúmina y la fosfatasa alcalina disminuyeron significativamente en los animales tratados. No se observaron diferencias significativas en el resto de parámetros toxicológicos analizados. Por lo tanto, se consideró que las diferencias estadísticas se encontraban dentro del rango de variabilidad normal, independientemente de la administración de Pter y sin importancia toxicológica.

Parámetros de análisis	Control	Diabético	Tratado
ALT (U/L)	49.0 ± 3.6	70.8 ± 6.3 *	50.3 ± 2.6 †
GOT	16.5 ± 0.9	20.7 ± 2.7	22.7 ± 1.2
Fosfatasa alcalina (U/L)	102.0 ± 8.9	137.7 ± 6.1 *	53.0 ± 4.9 ** †††
Bilirrubina total (mg/dL)	0.1 ± 0.01	0.1 ± 0.02	0.2 ± 0.02
Albúmina (g/L)	47.0 ± 0.7	44.2 ± 1.0	35.3 ± 0.9 *** †††
Proteína total (g/L)	60.8 ± 2.2	55.2 ± 1.1	67.3 ± 1.9
Cloruro (mmol/L)	102.3 ± 2.3	96.6 ± 1.2	100.7 ± 2.7
Nitrógeno ureico en sangre (mg/dL)	22.7 ± 2.5	20.9 ± 1.7	20.1 ± 2.8
Creatinina (mg/dL)	0.9 ± 0.1	1.0 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Calcio (mg/dL)	11.9 ± 0.1	11.9 ± 0.3	12.1 ± 0.3
Fósforo (mg/dL)	5.5 ± 0.2	6.1 ± 0.2	5.9 ± 0.4
Sodio (mmol/L)	140.8 ± 0.5	138.4 ± 0.4	138.3 ± 0.3
Potasio (mmol/L)	3.7 ± 0.1	4.1 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Colesterol HDL (mg/dL)	19.2 ± 2.8	19.0 ± 2.3	25.4 ± 3.8
Colesterol total (mg/dL)	41.5 ± 4.4	42.4 ± 3.9	63.7 ± 14.2
Urea (mg/dL)	48.5 ± 5.4	44.8 ± 3.6	43.0 ± 6.1
Ácido úrico (mg/dL)	3.6 ± 0.4	4.2 ± 0.3	4.4 ± 0.3

*Tabla 7. Medidas bioquímicas en muestras de plasma de conejo de seis semanas tras el inicio del estudio. Los datos se presentan como media ± DE (al menos n=4 en cada grupo). Las diferencias entre los grupos se evaluaron mediante una ANOVA, seguida de la prueba de Tukey. * p <0,05; ** p <0,01; *** p <0,001 frente al grupo control. † p <0,05; ††† p <0,001 frente al grupo diabético.*

5. Determinación de la tortuosidad en los vasos sanguíneos de retina de conejo

El primer procedimiento para apreciar si el Pter ejercía algún efecto beneficioso sobre las retinas de los animales de experimentación, fue la realización de retinografías. Los conejos New Zealand se dividieron en tres grupos experimentales: control, diabético y diabético tratado. Las retinografías se realizaron antes de la administración de aloxano (semana 0) (Figura 35 A) y después de la inducción de la diabetes (semana 6) (Figura 35 B).

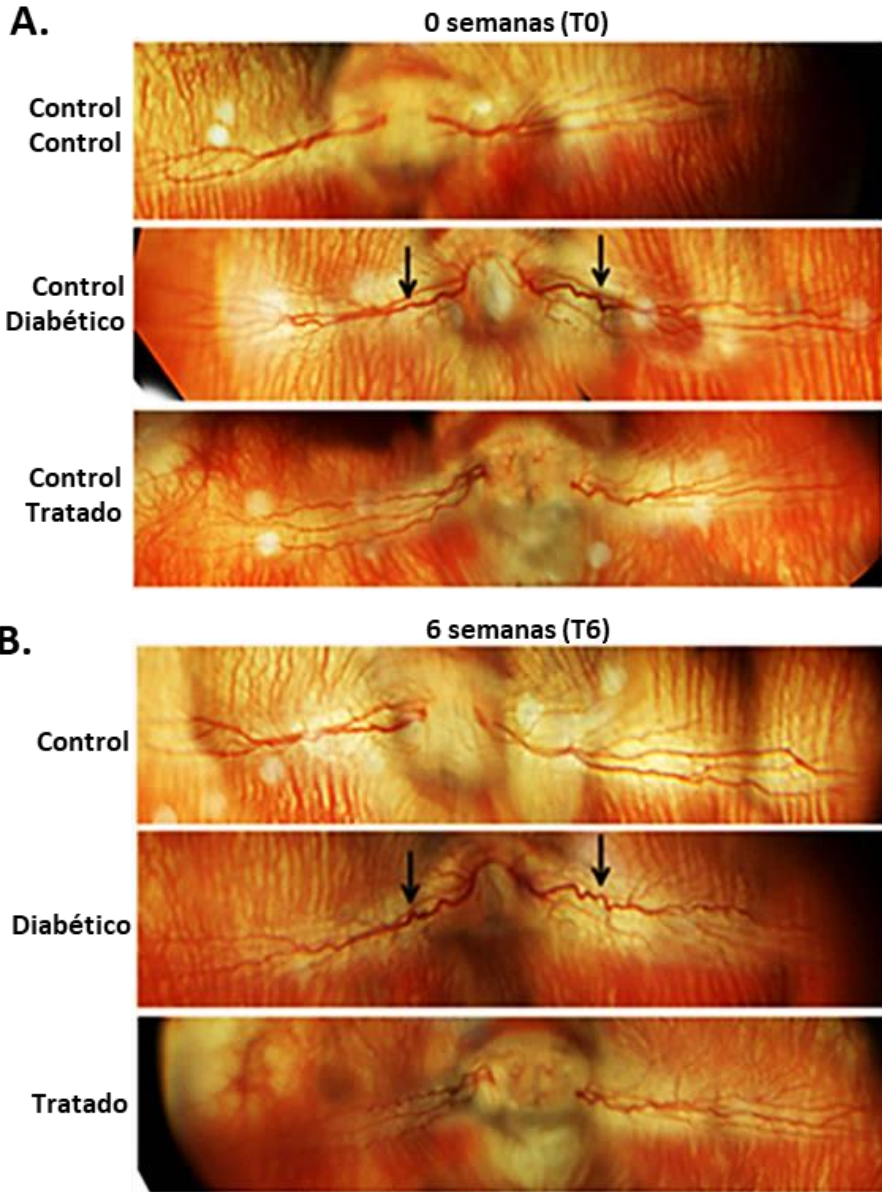


Figura 35. Imágenes retinográficas de los animales de experimentación. Imágenes del fondo de ojo izquierdo que muestran la retina de animales control, diabético y diabético-tratado con Pter al inicio (T0) y tras 6 semanas de la inducción de la diabetes (T6).

Pudo apreciarse de forma cualitativa, como los vasos presentes en la retina de los conejos diabéticos mostraban un incremento en la tortuosidad a las 6 semanas (Figura 35) al compararlos con la misma retina antes de la inducción de la diabetes. Para confirmar de forma cuantitativa los cambios observados, seguidamente se evaluó esta tortuosidad vascular con el software Image J (Figura 36).

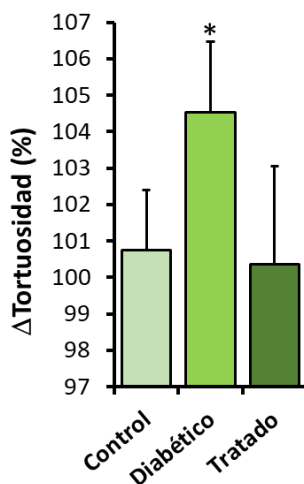


Figura 36. Tortuosidad en los vasos de la retina en conejo control, diabético y diabético-tratado tras 6 semanas de la inducción de diabetes. Los datos se presentan como media \pm DE (n=5 en cada grupo) Los resultados fueron analizados estadísticamente por ANOVA y la prueba de Tukey. * $p < 0.05$ frente al grupo Control.

Puede observarse en la gráfica como la administración de Pter redujo la alteración vascular observada en los animales diabéticos, siendo capaz de disminuir el grado de tortuosidad hasta valores similares al obtenido en conejos control (Figura 36).

6. Análisis de la apoptosis en las retinas de los animales de experimentación

Tras los cambios morfológicos observados en los vasos de la retina, se quiso comprobar si en el tejido se apreciaba alguna otra mejoría. El efecto retinoprotector observado mediante las retinografías se correspondió con los datos obtenidos al evaluar el grado de apoptosis en secciones histológicas de retina. La realización del TUNEL permitió observar cualitativamente el aumento de núcleos de células ganglionares TUNEL-positivos respecto al control en los conejos diabéticos (Figura 37 A). Sin embargo, aunque era algo mayor que los niveles control, el tratamiento con polifenoles dio como resultado una caída significativa en la apoptosis en células ganglionares para la condición diabética (Figura 37 A). El análisis cuantitativo de las secciones histológicas se representa en la Figura 37 B.

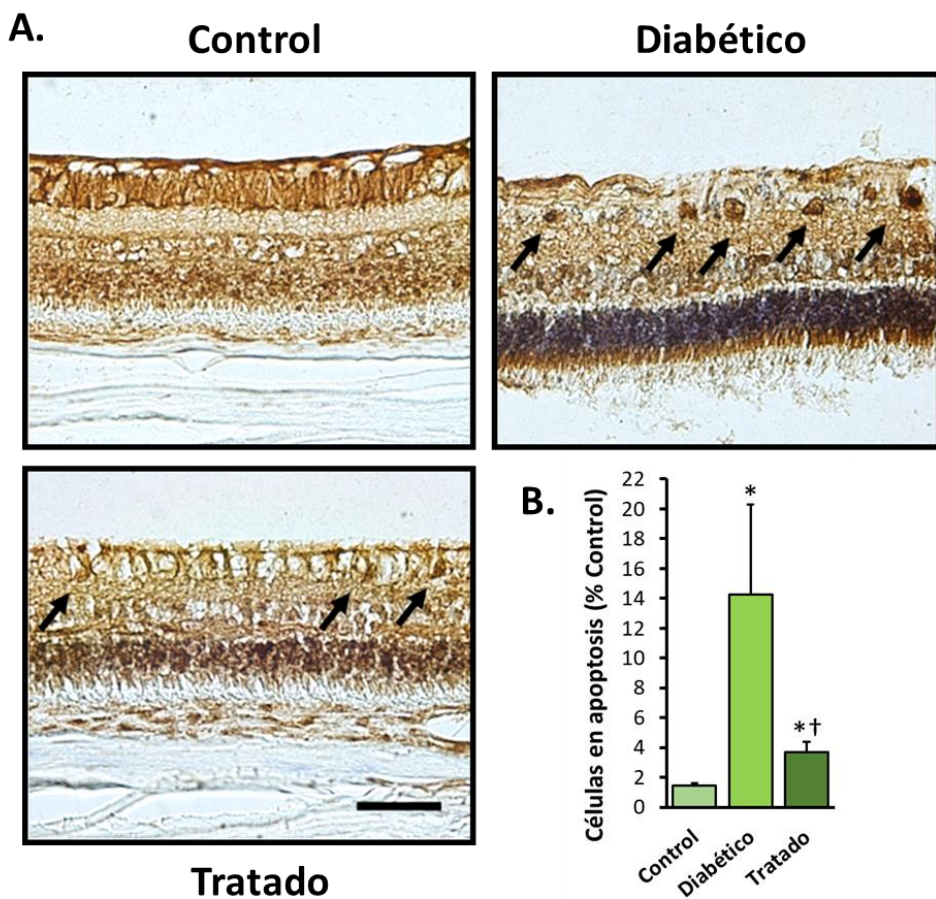


Figura 37. Análisis de la muerte celular programada in vivo. Imágenes de secciones histológicas de retina (10 μm) teñidas con TUNEL-HRP tras 6 semanas de inducción de diabetes (barra negra = 50 μm) (A). Las flechas negras señalan núcleos apoptóticos. Para una mejor apreciación, las muestras fueron sometidas a una contratinción con violeta de cresilo. Los resultados son medias \pm SD (al menos $n=5$ en cada grupo). El análisis estadístico se realizó con ANOVA seguido de la prueba post hoc de Tukey para evaluar las diferencias significativas entre las condiciones experimentales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al grupo de control. † $p < 0,05$; ††† $p < 0,001$ frente al grupo de diabéticos.

7. Análisis de los niveles de ERK en las retinas experimentales

Comprobado el aumento de la muerte celular en las retinas diabéticas, se precedió a evaluar la posibilidad de que el mecanismo inflamatorio también pudiese estar alterado. Se ha determinado que la vía de señalización MAPK/ERK desempeña un papel importante en diversas vías patogénicas y procesos fisiológicos, incluida la regulación de la entrada y la proliferación del ciclo celular, así como en el desarrollo de RD mediante la regulación positiva de la inflamación crónica (L. Zhang, Zhang, y Liang 2016). La vía de señalización MAPK/ERK incluye varias MAPK, incluidas las ERK, que integran múltiples señales bioquímicas y ambientales a través de cascadas de fosforilación (Hu *et al.* 2017). Trabajos como el de Gogg, Smith, y Jansson 2009 muestran que la fosforilación de ERK1/2 se regula significativamente en la DM2. De esta manera se evaluó molecularmente por *western blot* dos proteínas relacionadas con la inflamación como son ERK1 y ERK2 (Figura 38).

La diabetes aumentó la fosforilación de la quinasa 1/2 regulada por señales extracelulares (ERK1/2) en las retinas y Pter recuperó el estado de fosforilación (Figura 38).

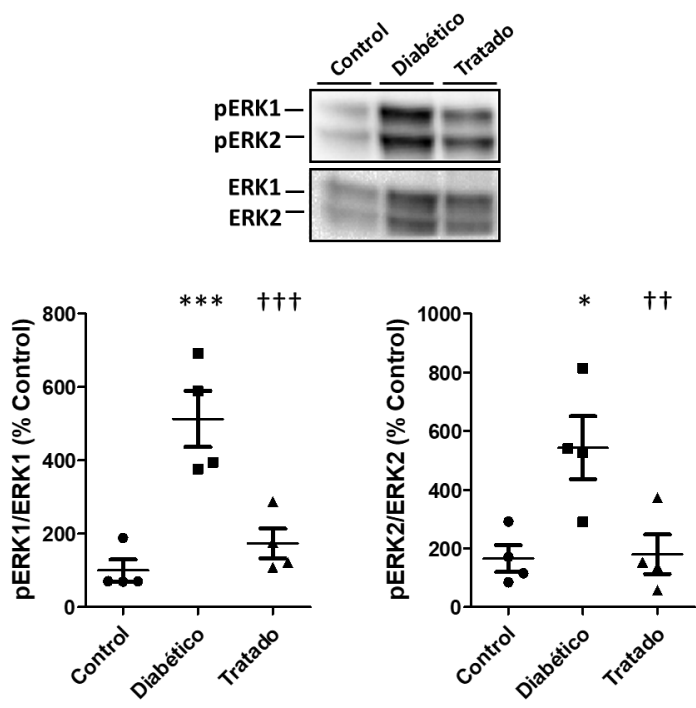


Figura 38. Western blot y densitometría pERK1/2 en retina. Los datos se presentan como media \pm DE (al menos n=4 en cada grupo). Se utilizó un ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ frente al grupo control. †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$ frente al grupo diabético.

8. Estudio del efecto del pterostilbeno frente al estrés oxidativo inducido en las retinas diabéticas

Es bien sabido que la hiperglucemia es un potente inductor de estrés oxidativo y puede desencadenar un aumento del daño celular, la pérdida de función y el desarrollo de RD. Aquí se muestran los efectos de la diabetes como un aumento significativo en la oxidación de proteínas y lípidos de la retina, así como, el aumento de la producción de H_2O_2 tanto *in vitro* como *in vivo*.

8.1 Determinación de los niveles de H₂O₂ en cultivos HREC y en retinas de conejo, en función de los niveles de glucosa

El H₂O₂, un intermedio oxidante estable de origen biológico, puede causar daño a los tejidos oculares al alterar la estructura y función celular. Con el fin de determinar el efecto de los niveles elevados de glucosa sobre el estrés oxidativo y el posible carácter protector del Pter, se realizó un estudio *in vitro* con células HREC. Se midieron los niveles de H₂O₂ que estas células liberaron a los en medios en los que se encontraban. En la Figura 39 puede observarse como las células incubadas con HG incrementaban la producción de niveles de H₂O₂ respecto a la a condición control. Este aumento fue revertido con la adición al medio de cultivo de Pter 2.5 µM. Es más, la utilización de concentraciones superiores (5 µM), disminuyó significativamente los valores de H₂O₂ por debajo del control (Figura 39 A).

De forma similar, se evaluaron los niveles H₂O₂ en homogenados de retinas de conejo. Los análisis de las retinas de animales diabéticos presentaron altos niveles de H₂O₂, mientras que Pter los disminuyó a valores de retinas control (Figura 39 B). Todo ello demuestra la alta capacidad antioxidante del Pter tanto *in vivo* como *in vitro*.

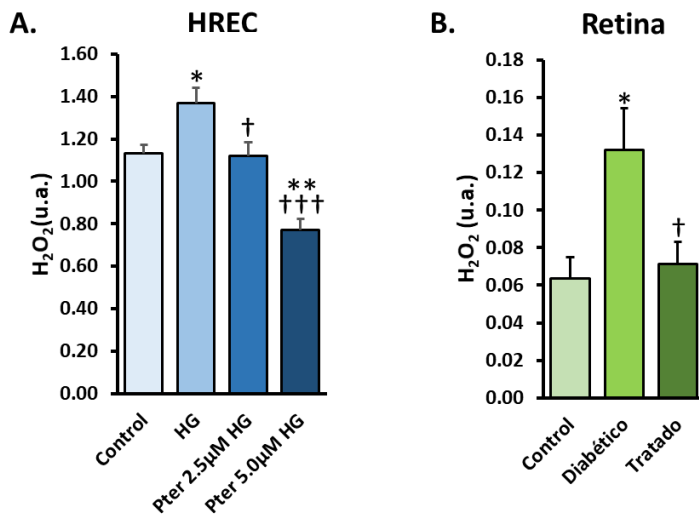


Figura 39. Niveles de H₂O₂ presentes *in vitro* en medios de cultivo de células HREC y en retinas de conejo *in vivo*. Se estableció H₂O₂ en homogenados de retina por espectrofluorometría. Los datos se presentan como media \pm DE (n=4 para HREC; n=6 para retinas). Los resultados fueron analizados estadísticamente por ANOVA y la prueba de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ frente al grupo de control. † $p < 0,05$; ††† $p < 0,001$ frente al grupo de diabéticos.

Tras el claro aumento del estrés oxidativo apreciado en el incremento de los niveles de H₂O₂, a continuación, se quiso comprobar si este estrés oxidativo afectaba a las principales biomoléculas del organismo, como son las proteínas y los lípidos, y como el Pter podría ejercer un efecto protector de estas en nuestro modelo experimental animal.

8.2 Determinación del daño oxidativo a proteínas

Para detectar cambios en las proteínas, se analizaron derivados de la oxidación y la nitración proteica en el aminoácido tirosina, siendo estas unas de las modificaciones más comunes utilizadas como biomarcador de estrés oxidativo. De esta manera, se determinaron las relaciones m-Tyr/Phe, 3NO₂-Tyr/p-Tyr y 3Cl-Tyr/p-Tyr (Figura 40).

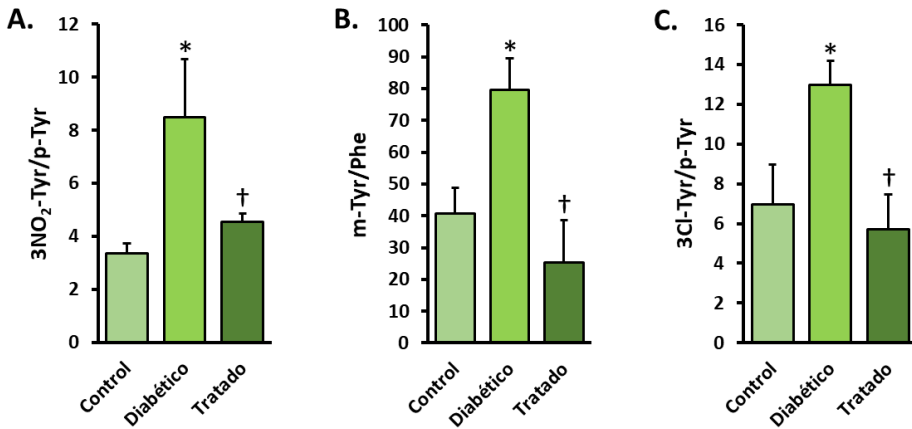


Figura 40. Efecto del tratamiento con Pter sobre la modificación de tirosinas en retinas de conejo. Las relaciones 3NO₂-Tyr/p-Tyr (A), m-Tyr/Phe (B) y 3Cl-Tyr/p-Tyr (C) se cuantificaron mediante UPLC-MS/MS. Los datos se presentan como media ± DE (al menos n=4 en cada grupo), y se analizaron mediante una ANOVA seguida de la prueba de Tukey. * p < 0,05 frente al grupo de control. † p < 0,05 frente al grupo de diabéticos.

Como se observa en la Figura 39, el Pter disminuyó significativamente el daño oxidativo inducido por la exposición a la hiperglucemia en los 3 ratios de tirosinas analizados: 3NO₂-Tyr/p-Tyr (A), m-Tyr/Phe (B) y 3Cl-Tyr/p-Tyr (C).

La evaluación de la oxidación de proteínas en la retina también se evaluó mediante el análisis de la carbonilación proteica. Puede apreciarse en la Figura 41, como la diabetes genera una mayor cantidad de proteínas carboniladas, efecto que en los animales tratados se ve significativamente reducido.

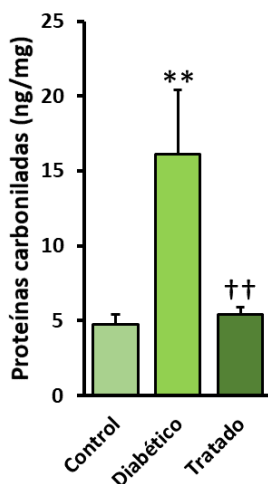
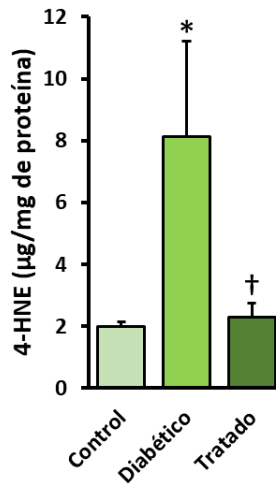


Figura 41. Niveles de proteínas carboniladas presentes en las retinas de los diferentes grupos animales experimentales. La carbonilación se midió en homogenados de retina mediante ELISA. Los datos se presentan como media \pm DE (al menos $n=4$ en cada grupo), y se analizaron mediante una ANOVA seguida de la prueba de Newman-Keuls. ** $p < 0,01$ frente al grupo de control. †† $p < 0,01$ frente al grupo de diabéticos.

De esta forma, el daño oxidativo a las proteínas y su consiguiente prevención por el polifenol Pter, fue confirmado mediante dos determinaciones diferentes.

8.3 Determinación del daño oxidativo a lípidos

Al igual que con las proteínas, se quiso analizar el efecto protector del estilbena contra el daño oxidativo en lípidos. Para ello, se llevó a cabo la cuantificación del 4-HNE en las retinas a las 6 semanas del inicio del estudio (Figura 42).

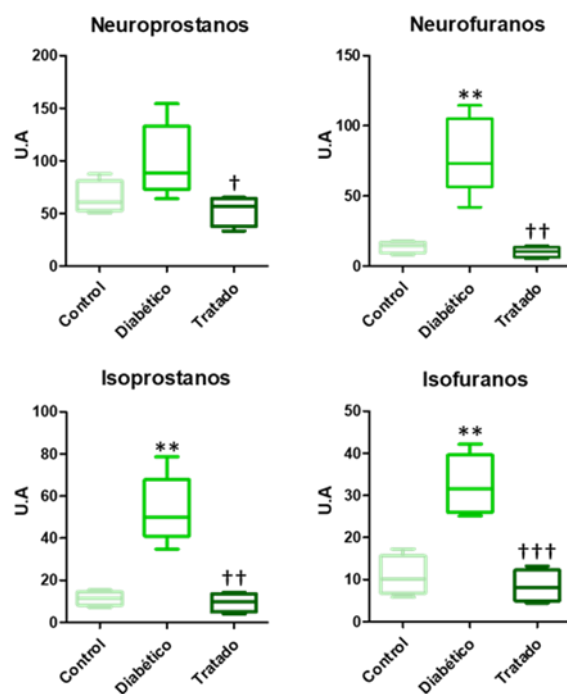


*Figura 42. Determinación de los niveles de 4-HNE en retinas de conejo. La peroxidación lipídica se midió en homogenados de retina (al menos n=4) mediante ELISA. Los datos se presentan como media \pm DE, analizados mediante ANOVA seguida del test de Tukey. * $p < 0,05$ frente al grupo de control. † $p < 0,05$ frente al grupo diabético.*

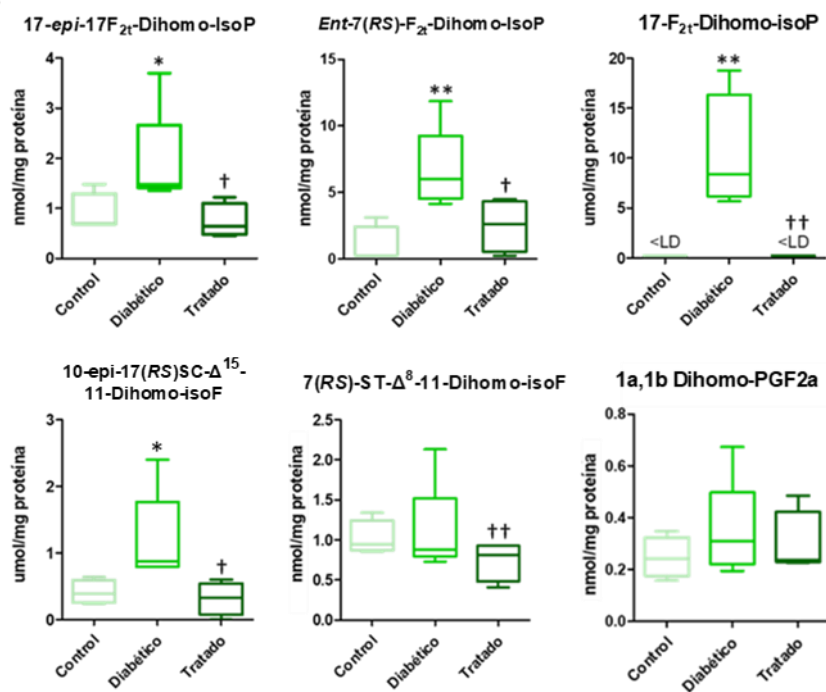
La reducción de peroxidación lipídica reflejada en los niveles de 4-HNE hasta valores control, corroboró el efecto protector del Pter (Figura 42).

Por otro lado, se analizaron otros biomarcadores de estrés oxidativo en lípidos, como son los isoprostanos (Figura 43 A, B, C, D):

A.



B.



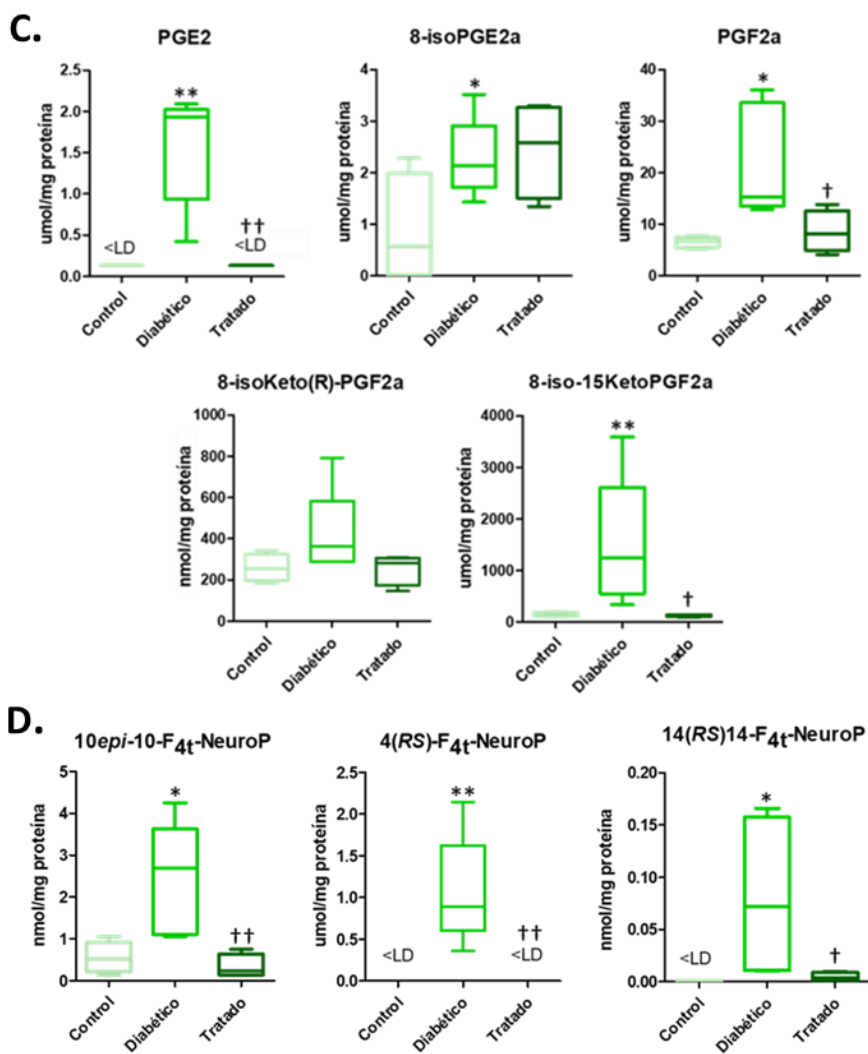


Figura 43. Diagramas de cajas de compuestos de lipoperoxidación. Isoprostanos totales (A), compuestos de peroxidación lipídica derivados del ácido adrenico (B), ácido araquidónico (C) y ácido docoxohexaenóico (D). Los recuadros indican el primer y tercer cuartil, la mediana se muestra como una línea horizontal y los extremos indican los valores máximos y mínimos. Los valores por debajo del límite de detección se indicaron como <LD. Resultados analizados mediante ANOVA seguida de la prueba de Tukey (al menos n=4 en cada grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ frente al grupo control. † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$ frente al grupo de diabético.

Como se observa en la Figura 42, la hiperglucemia crónica aumenta la peroxidación de lípidos totales y los derivados de los ácidos araquidónico, adrenico y docosahexaenoico en muestras de retina. Concretamente, se detectan aumentos significativos en los valores de las prostaglandinas PGE₂ y PGF_{2α}, y los IsoPs 8-*iso*-PGE₂, 8-*iso*-15-keto-PGF_{2α} y 8-*iso*-15-(R)-PGF_{2α}. La oxidación del ácido adrenico se reflejó en un aumento significativo de 17-F_{2t}-Dihomo-IsoP, Ent-7 (RS) -7-F_{2t}-Dihomo-IsoP, 17-*epi*-17F_{2t}-Dihomo-IsoP y 10-*epi*-17(RS)SC-Δ¹⁵-11-Dihomo-IsoF. Se obtuvieron resultados similares para la oxidación del ácido docosahexaenoico que se mostró como un aumento de 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP, 4(RS)-F_{4t}-NeuroP y 14(RS)-14-F_{4t}-NeuroP. Como esperábamos, la administración diaria subcutánea de Pter pudo revertir estas alteraciones oxidativas tempranas.

9. Análisis de la capacidad del pterostilbeno de modular las defensas antioxidantes

Tras determinar la capacidad del polifenol en proteger frente al daño oxidativo inducido por la hiperglucemia, se procedió a estudiar su efecto sobre las principales defensas antioxidantes. Se evaluaron los niveles de GSH y las actividades de las principales enzimas encargadas de amortiguar el estrés oxidativo: la CAT, la GPx y la SOD.

9.1. GSH *in vitro*

En un primer acercamiento, se determinó de forma cualitativa los niveles de GSH presentes en cultivos de células HREC en presencia de glucosa 5 mM y 30 mM con concentraciones de 2.5 y 5 μM de Pter como tratamiento, y en dos tiempos diferentes, a 24 h y 48 h (Figura 44).

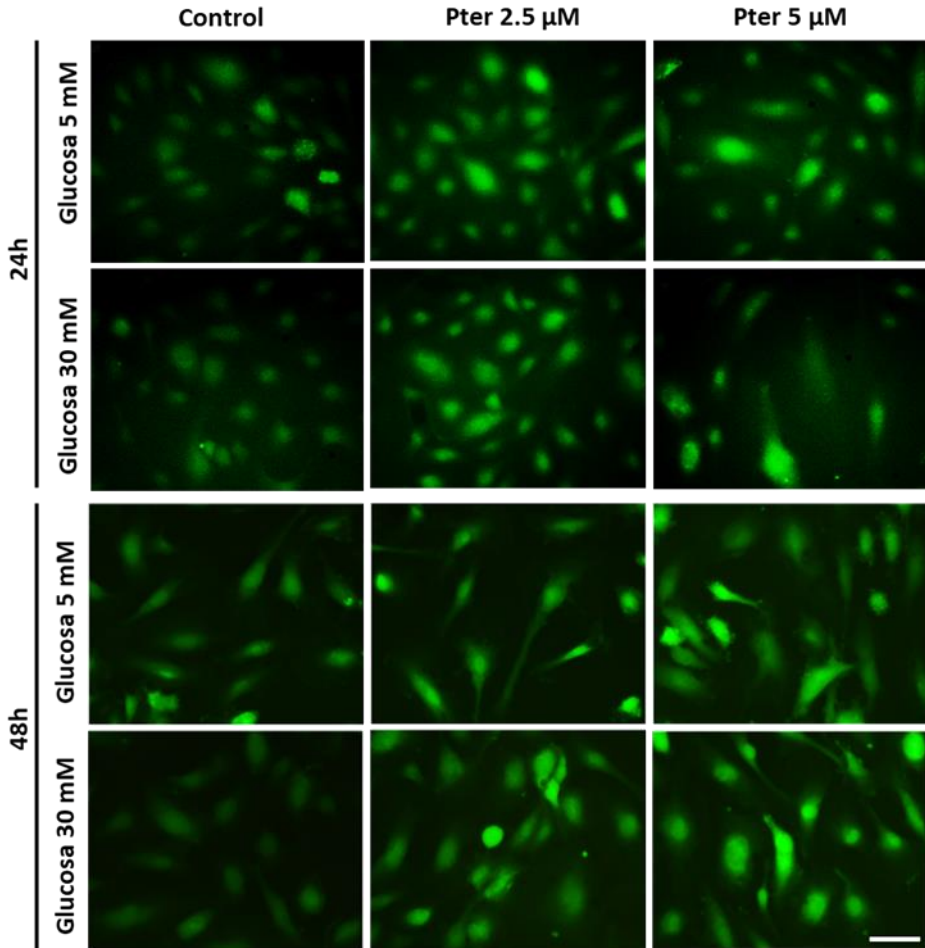


Figura 44. Fluorescencia de GSH presente en células HREC. Para realizar los experimentos las células se sembraron en placas de doce pocillos (0.035×10^6 células/pocillo). 24 horas después se suplementaron con glucosa en niveles normales (5 mM) o altos (30 mM), y tratados con diferentes concentraciones de Pter (2.5 o 5 μ M). El DMSO utilizado como vehículo estaba a una concentración de 0,1%. Para el marcaje en verde se usó CMFDA 75 nM. Barra de calibrado blanca = 40 μ m.

En el análisis microscópico puede observarse como los niveles de GSH se vieron disminuidos en presencia de HG, mientras que la incubación con Pter

aumentaba notablemente la fluorescencia originada por un aumento en los niveles del tripéptido tanto a 24 como a 48 h.

9.2 GSH *in vivo*

Una vez visto el efecto del Pter sobre el GSH en células HREC, se prosiguió con ensayos *in vivo* que corroborasen estos efectos. Para ello, en homogenados de retina se midieron los parámetros de GSH, GSSG y se calculó el ratio GSH/GSSG (Figura 45).

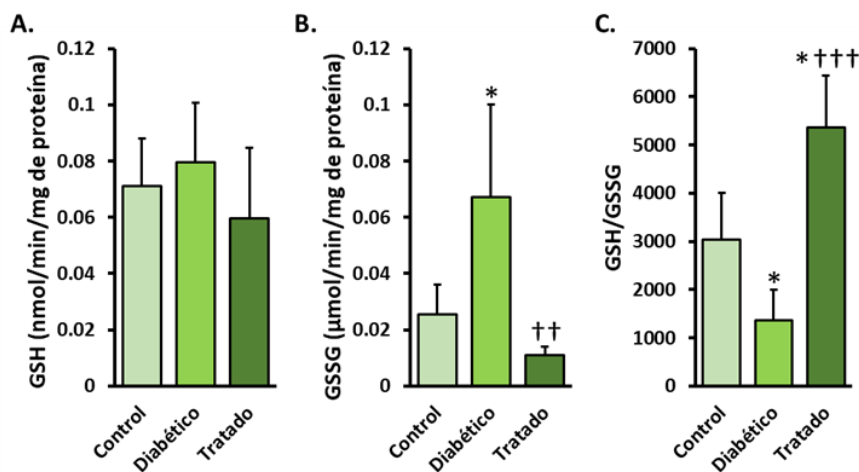


Figura 45. Concentraciones de GSH, GSSG y ratio GSH/GSSG en retinas de conejo. Los datos de GSH y GSSG se obtuvieron mediante UPLC-MS/MS. Los resultados se presentan como media \pm DE (al menos $n=5$ en cada grupo), y fueron mediante una ANOVA seguida de la prueba de Tukey. * $p < 0,05$ frente al grupo de control. † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$; ††† $p < 0,001$ frente al grupo de diabéticos.

No se observaron diferencias significativas en los niveles de GSH en retina entre los 3 grupos experimentales (Figura 45 A). Sin embargo, los niveles de GSSG sí presentaban variaciones significativas intergrupales. En los animales diabéticos, la cantidad de GSSG era muy superior a la del control, y el Pter impedía que el GSH se oxidase a GSSG (Figura 45 B). Por esta razón, el ratio

GSH/GSSG, uno de los principales indicadores del estado redox, se encuentra disminuido en los animales diabéticos respecto al grupo control y, en los animales tratados, significativamente aumentado (Figura 45 C). De esta manera se hace evidente el mejor estado oxidativo en el que se encuentran los animales tratados con el polifenol Pter.

Además, se analizó el γ -L-glutamyl-L-cisteína (γ -Glu-Cys), un precursor de GSH, y las subunidades de la enzima limitante en la síntesis de GSH, la GCL (GCLC y GCLM) (Figura 46).

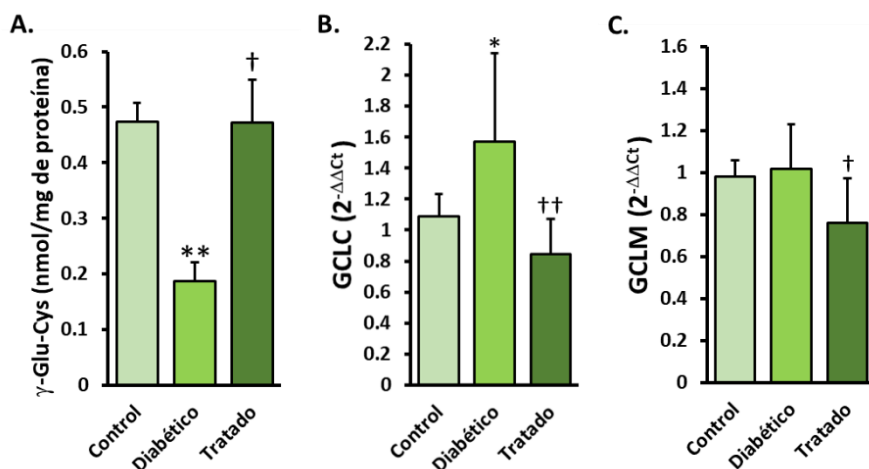


Figura 46. Niveles de γ -Glu-Cys y expresión de las enzimas encargadas de su síntesis. γ -Glu-Cys (A), GCLC (B) y GCLM (C). Los resultados se presentan como media \pm DE ($n=5$ para γ -Glu-Cys; $n=7$ para niveles de expresión), y analizados mediante ANOVA seguida de la prueba de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ frente al grupo control. † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ frente al grupo diabético.

La cantidad de γ -Glu-Cys se encontraba disminuida en las retinas diabéticas a diferencia de los animales diabéticos tratados (Figura 46 A). Los niveles de expresión de la subunidad GCLC estaba incrementada las retinas diabéticas respecto al control (Figura 46 B). En los animales tratados tanto la GCLC (Figura 46 B) como la GCLM (Figura 46 C) se encontraban disminuidas

respecto las retinas diabéticas, sin encontrarse diferencias respecto los animales control.

9.3 Actividades de las principales enzimas antioxidantes

Para identificar la contribución del Pter al mecanismo de defensa antioxidante, se midieron las actividades enzimáticas de CAT, GPx y SOD (Figura 47).

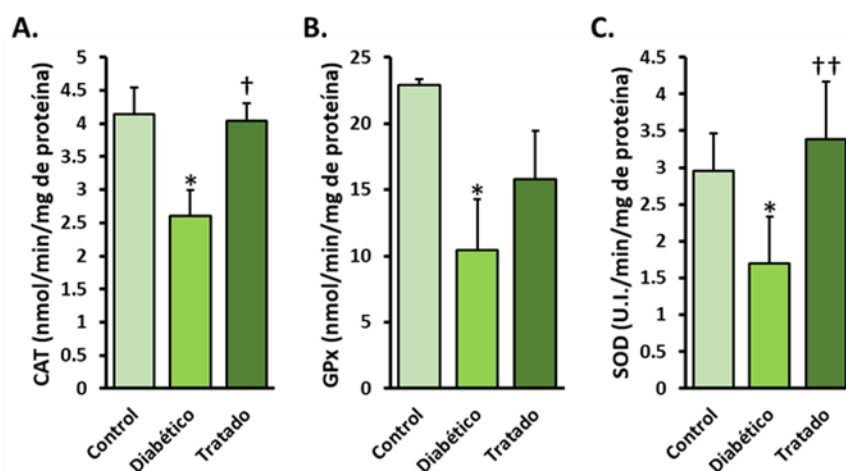


Figura 47. Efecto del Pter sobre la activación de las principales enzimas antioxidantes en conejos diabéticos. Las actividades enzimáticas de CAT (A), GPx (B) y SOD (C) se expresan como mg de proteína. Datos mostrados como media \pm DE (al menos $n=5$ en cada grupo). Se utilizó un ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Newman-Keuls. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ frente al grupo de control. † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ frente al grupo de diabéticos.

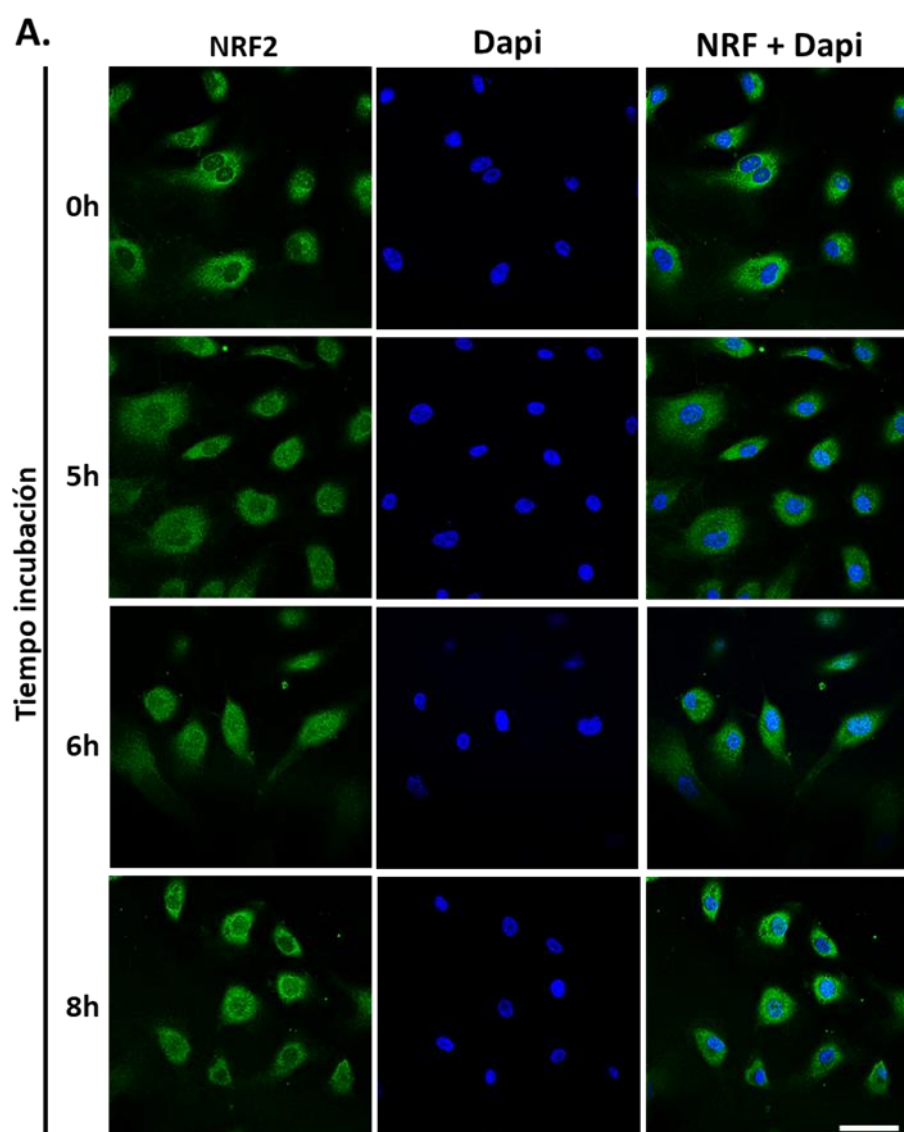
La hiperglucemia redujo las actividades de las 3 principales enzimas antioxidantes en comparación con los controles. Estos efectos sobre las actividades enzimáticas se revirtieron con el tratamiento con Pter (Figura 47).

10. Mecanismos moleculares implicados en el papel antioxidante del pterostilbeno

Para investigar la vía molecular por la cual el Pter estimula los mecanismos de protección antioxidante y reduce el daño retiniano, se analizó el estado de la vía PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2 como desencadenante de los efectos protectores.

10.1 Análisis de la vía; NRF2

En primer lugar, se decidió analizar la posible activación de NRF2. Este factor de transcripción es uno de los actores más importantes en la modulación de la respuesta antioxidante. Para ello, se llevó a cabo un estudio *in vitro* con HREC, mediante inmunocitoquímica contra NRF2 a distintos tiempos. Este ensayo posibilita conocer el tiempo que tarda en activarse la respuesta antioxidante, reflejado como la traslocación al núcleo del factor de transcripción tras la administración de Pter (Figura 48).



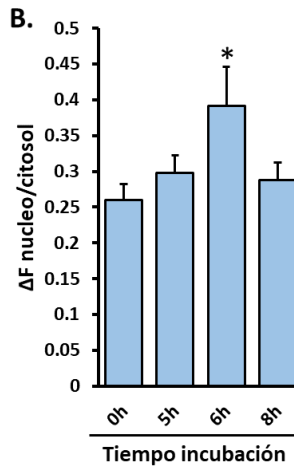


Figura 48. Translocación nucleo-citosol de NRF2 en células HREC. La translocación se detectó mediante microscopía confocal. Las células se incubaron con Pter 5 μM y se fijaron con paraformaldehído al 4% a las 0, 5, 6 y 8 h. NRF2 se detectó mediante inmunocitoquímica (A) y la translocación se evaluó mediante el software ImageJ ($n=3$) (B). Barra blanca escala=40 μm . Los datos se analizaron mediante una ANOVA de una vía, seguido de la prueba de Tukey. * $p < 0,05$ frente al grupo control (0 h).

La activación de NRF2 fue máxima después de 6 h de incubación con Pter en HREC. La proporción de NRF2 nuclear frente a citoplasmático se utilizó como índice de translocación de NRF2 (Figura 48 B).

10.2 Cascada molecular PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2

Una vez demostrada la activación de NRF2, se analizaron posibles activadores aguas arriba. De esta manera, se realizaron *western blots* para detectar las expresiones de pPI3K/PI3K (Figura 49 A), pAKT/AKT (Figura 49 B) y pGSK3 β /GSK3 β (Figura 49 C) en las retinas de los 3 grupos animales.

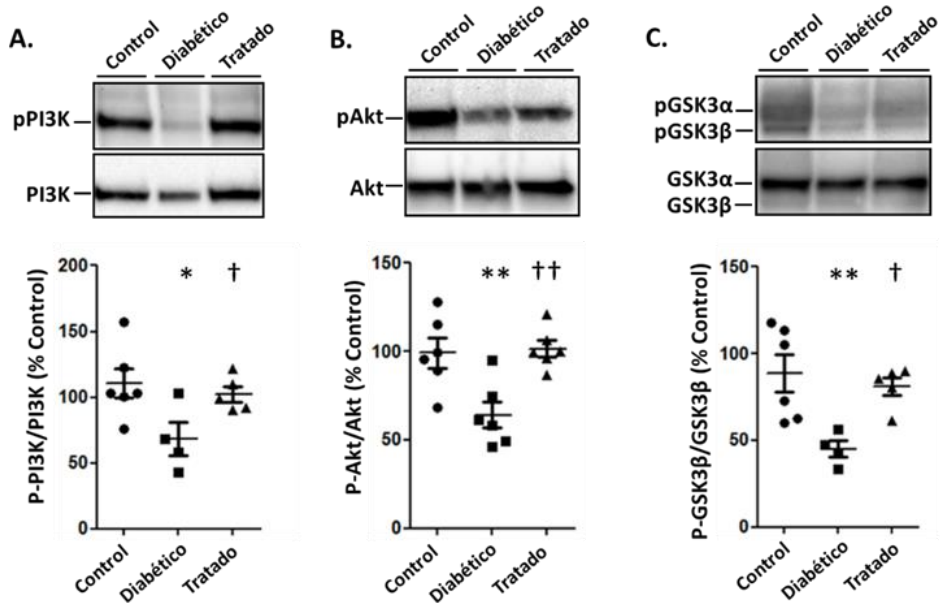


Figura 49. Western blot y densitometrías de la vía PI3K/AKT/GSK3β en retinas de conejo. Los datos se presentan como media \pm DE (al menos $n=4$ en cada grupo). Se utilizó un ANOVA, seguido de una prueba post hoc de Newman-Keuls, para evaluar cualquier diferencia significativa entre las condiciones experimentales. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ frente al grupo control. † $p < 0,05$; †† $p < 0,01$ frente al grupo diabético.

En el grupo diabético se observó una disminución en los niveles de las proteínas pPI3K, pAKT y pGSK3β respecto el grupo control. El Pter aumentó los niveles de fosforilación en las retinas de conejos diabéticos hasta los niveles de los animales control. Con todo ello, el aumento de estos niveles de fosforilación está generando la activación de esta posible vía protectora.

11. Reflejo de la activación de NRF2 en la subida de los niveles de NQO1 *in vitro* e *in vivo*

Para confirmar el efecto del Pter sobre la activación de la vía PI3k/Akt/GSK3 β como importante desencadenante de la función NRF2, responsable de estimular los mecanismos protectores antioxidantes que reducen el daño retiniano, se analizó la expresión de NQO1, una diana directa de NRF2, tras modular la activación de PI3K y GSK3 β en HREC (Figura 50). Para llevarlo a cabo, se usaron inhibidores de la quinasa PI3K (BEZ235), GSK3 β (cloruro de litio, LiCl) y exendina 9 (GLP1R); una proteína de membrana que podría estar activada por Pter; que se expone más adelante.

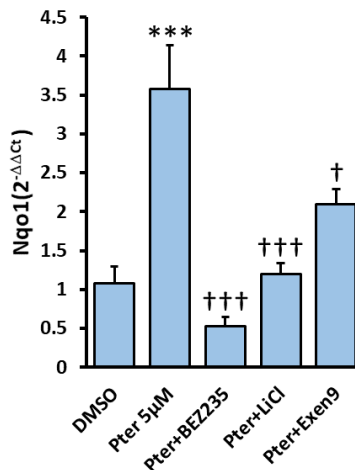


Figura 50. Niveles de ARN de NQO1 en HREC después de 24h. Incubación con: DMSO (control), Pter 5 μ M, Pter (5 μ M) + BEZ235 (10 nM), Pter (5 μ M)+LiCl (20 mM) y Pter (5 μ M) + exendina 9 (Exen9) 1 μ M. Los datos se presentan como media \pm DE (al menos n=4 en cada grupo). Los resultados fueron estadísticamente analizados mediante ANOVA seguida del test de Tukey. *** $p < 0,001$ frente al grupo control. † $p < 0,05$; ††† $p < 0,001$ frente al grupo Pter 5 μ M.

Como puede verse en la Figura 50, la expresión de NQO1 aumentó en presencia del estilbeno. Mientras que estos niveles de expresión disminuyeron con la inhibición de la actividad quinasa PI3K, GSK3 β y de GLP1R.

Por otro lado, se evaluaron los niveles de NQO1 en las retinas de conejo del modelo animal mediante *western blot* (Figura 51).

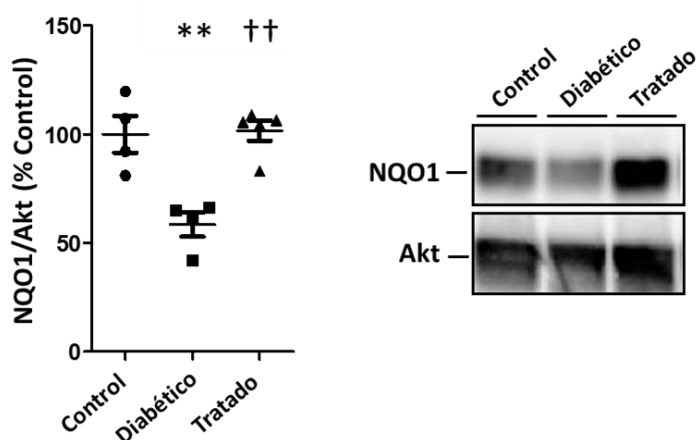


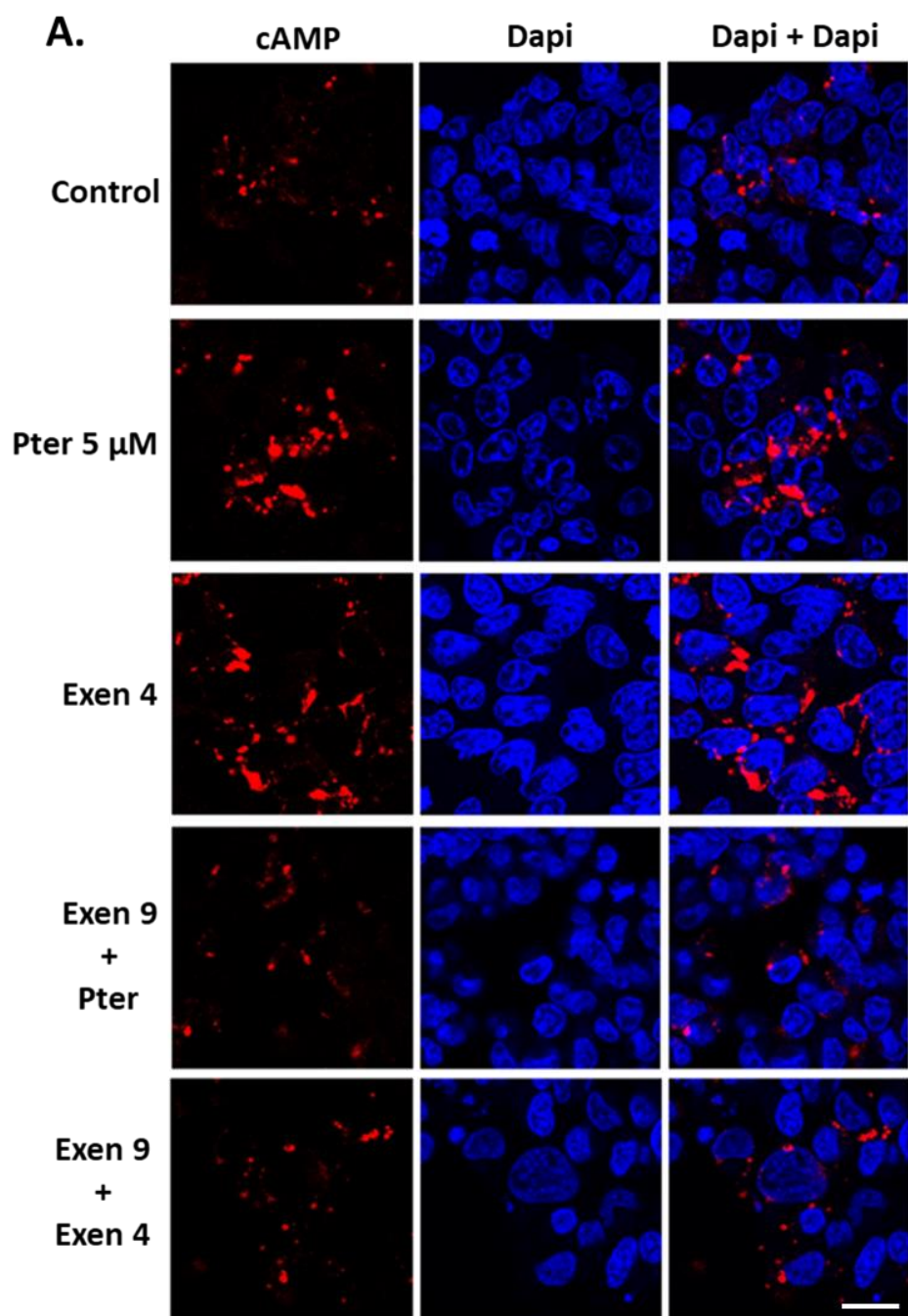
Figura 51. Western blot y densitometrías de NQO1 en retina de conejo. Resultados expresados como media \pm DE (al menos n=4 en cada grupo). El análisis estadístico usado fue una ANOVA, seguida de una prueba post hoc de Newman-Keuls. ** p < 0,01 frente al grupo control. †† p < 0,01 frente al grupo diabético.

Al igual que ocurría con la expresión de NQO1 *in vitro*, los niveles de NQO1 en retina estaban aumentados por la acción del Pter (Figura 51). Con todo ello, se hace patente que el polifenol está actuando mediante esta vía metabólica propuesta, y que, como punto final, NRF2 está desencadenando toda la respuesta adaptativa protectora, reflejada entre otros aspectos, en el aumento de los niveles de NQO1.

12. Papel de GLP1R como receptor de Pter y activador de la cascada metabólica

Con el fin de explorar más a fondo el evento corriente arriba que estimula la vía de señalización de PI3K/AKT/GSK3 β y los efectos retinoprotectores, se centró el trabajo en GLP1R. Para ello, utilizamos la nueva línea celular HEK293 GLP1R Nomad desarrollada por Innoprot (España). Esta línea celular fue diseñada específicamente para analizar la activación de GLP1R a través de los niveles de cAMP por emisión de fluorescencia (Figura 52 A).

El tratamiento con Pter fue capaz de aumentar los niveles de AMPc como se observa en el incremento en la señal de fluorescencia (Figura 52 A). Por otro lado, la estimulación de GLP1R inducida por Pter fue bloqueada por el antagonista de GLP1R, exendina 9 (Figura 52 B).



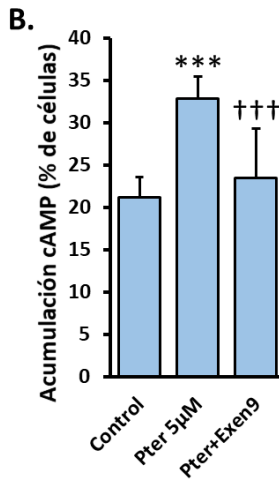


Figura 52. Implicación de GLP1R en el efecto del Pter sobre la activación de la vía PI3K/AKT/GSK3β/NRF2. Se observó cAMP en células *Nomad* mediante microscopía confocal (A). La intensidad de la fluorescencia se evaluó con IN Cell Analyzer en el control (DMSO), Pter 5µM y Pter 5µM + Exen9 1 µM (B). Barra de escala blanca = 20 µM. Los datos se presentan como media ± DE (n=8 en cada grupo). Los resultados fueron estadísticamente analizados mediante ANOVA seguida del test de Tukey. *** $p < 0,001$ frente al control. ††† $p < 0,001$ frente al Pter 5µM.

La implicación de GLP1R en esta vía ya se había postulado en la Figura 50, donde la inhibición de esta proteína con exendina 9 redujo los niveles de NQO1.

Por otro lado, se quiso ver la presencia de este receptor GLP1R en las retinas de los animales experimentales. Tras una inmunofluorescencia pudo verse de forma cualitativa, una aparente disminución en la cantidad de este receptor en las retinas diabéticas, y como el tratamiento con Pter parecía incrementar la presencia del mismo, incluso por encima de las retinas control (Figura 53).

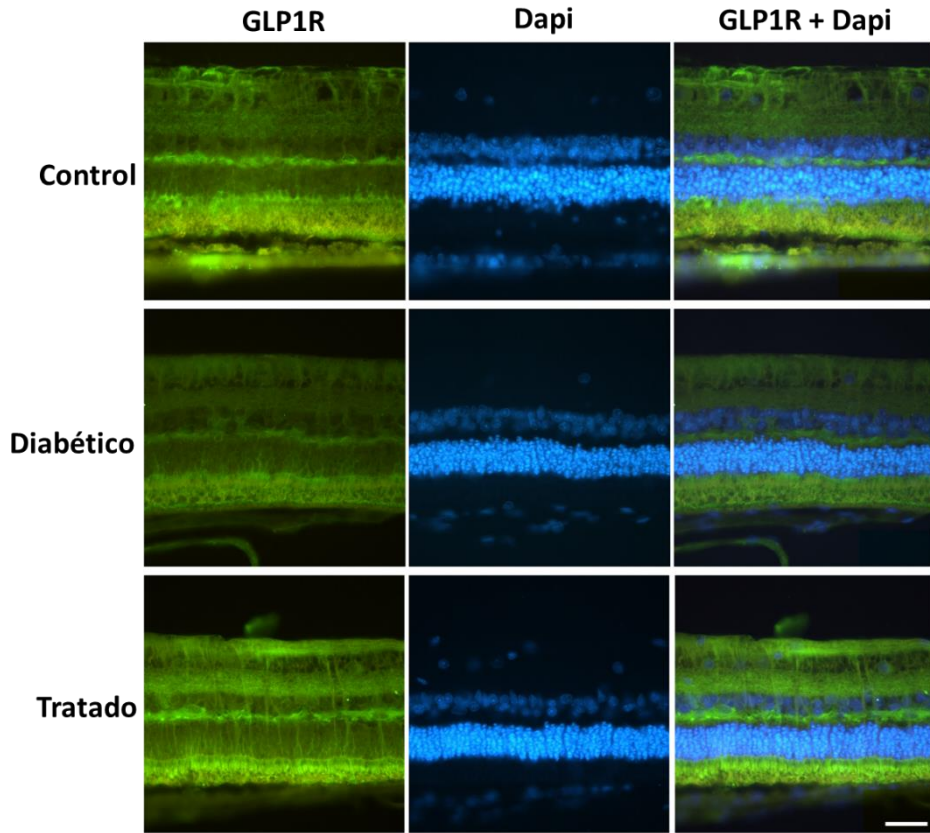


Figura 53. Inmunofluorescencia contra GLP1R en retinas de conejos. Barra de escala=40 μ m. Anticuerpo GLP1R en verde, y núcleos marcados en azul (Dapi).

En vista de los resultados obtenidos, existe una relación directa entre el polifenol Pter y GLP1R, cuya unión desencadena aguas abajo toda la ruta metabólica propuesta, y la activación final del mecanismo protector antioxidante en la retina.

DISCUSIÓN

En la actualidad, el tratamiento para la RD se centra en las etapas más avanzadas de esta enfermedad. Sin embargo, en muchos casos los protocolos de administración no son los óptimos por lo que presentan problemas de eficacia, además de provocar importantes efectos secundarios. La falta de una terapia eficaz, junto con el hecho de que el daño retiniano ocasionado por la progresión de la enfermedad puede ser irreparable, hace necesario encontrar nuevas estrategias para prevenir su aparición.

El estrés oxidativo producto de la hiperglucemia se considera una de las principales etiologías en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes, como la RD (Al-Shabrawey y Smith 2010; Wu, Tang, y Chen 2014). Las ROS tienen la capacidad de dañar las proteínas, los lípidos y el ADN celular, lo que conduce a la alteración de las funciones celulares. Es aquí donde despierta gran interés el uso de polifenoles, concretamente el Pter. Varios estudios han revelado que los nutraceuticos con capacidad antioxidante son eficaces para reducir las complicaciones diabéticas (Rossino y Casini 2019). Así pues, se ha observado un efecto protector para la RD y otras retinopatías con resveratrol (Naginei *et al.* 2014; Soufi, Mohammad-Nejad, y Ahmadiéh 2012), quercetina (B. Chen *et al.* 2017; Ola *et al.* 2017), ácido gálico (Lee *et al.* 2014; Silva *et al.* 2013) y curcumina (Parsamanesh *et al.* 2018; Yang *et al.* 2018), entre otros. Sus efectos se han atribuido a la capacidad de modular diferentes dianas moleculares: como quinasas (MAPK) (Lee *et al.* 2017; L. Zhang, Zhang, y Liang 2016), sirtuinas (SIRT1) (J. Li *et al.* 2017), factor nuclear kappa B (NF-κB) (Lee *et al.* 2017), factores de transcripción como Nrf2/ARE (Bucolo *et al.* 2019; Xue *et al.* 2017), entre otros, proporcionando protección antioxidante y antiinflamatoria (Rossino y Casini 2019). En cuanto al efecto protector de Pter como antioxidante, ha sido comprobado en diferentes modelos experimentales (Sirerol *et al.* 2015). Por ejemplo, Sheng y Rong demostraron que el Pter retrasa la progresión de la RD al aliviar la inflamación y oxidación de biomoléculas utilizando un modelo *in*

vitro de células endoteliales retinianas humanas (Shen y Rong 2015). Sin embargo, el efecto del Pter sobre la retina no se ha estudiado en profundidad.

Debido a la complejidad y heterogeneidad que presenta la RD, ningún modelo animal ha sido capaz hasta la fecha de reproducir completamente los cambios fisiopatológicos neuronales y vasculares que se producen en cada etapa. Sin embargo, cada modelo recapitula algunas de las características de la enfermedad. Los modelos más utilizados para el estudio de la RD se han desarrollado en ratones y ratas, pero también se utilizan perros, gatos, cerdos, conejos, monos y peces cebra (Lai y Lo 2013). Las vías para reproducir la enfermedad se logra a través de dos formas de generar el desarrollo de diabetes: la inducción y la mutación génica (Olivares *et al.* 2017). Los modelos inducidos se generan a través de varios métodos: cirugía (extirpación quirúrgica del páncreas) (S. Kumar *et al.* 2012), fármacos con acción citotóxica a nivel pancreático como la estreptozotocina (STZ) o el aloxano (Lenzen 2008), dietas ricas en galactosa (Engerman y Kern 1984; Robinson *et al.* 2012) y el daño láser (Grossniklaus, Kang, y Berglin 2010) o químico en el ojo (Chan y Werb 2015). Los modelos genéticos se crean utilizando la reproducción selectiva y la edición de genes. Hay varios modos genéticos de RD en ratón, rata y pez cebra. Estos modelos incluyen mutaciones espontáneas, específicas de cepas y editadas genéticamente (Olivares *et al.* 2017). Entre ellos destacan modelos murinos como el *Ins2^{Akita}*, un modelo para la DM1 que alberga una mutación espontánea en el gen de la insulina 2 que conduce al plegamiento incorrecto de la proteína de la insulina, su acúmulo y muerte de las células β pancreáticas (Izumi *et al.* 2003). Los ratones Kimba, un modelo no diabético de retinopatía proliferativa que sobreexpresa VEGF (Lb *et al.* 2008). Y los ratones Akimba, un cruce de las dos cepas anteriores que presentan hiperglucemia y alteraciones típicas de los vasos en etapas avanzadas de RD (Wisniewska-Kruk *et al.* 2014). Además, el modelo de ratón db/db es actualmente el más utilizado de DM2. Este roedor tiene una mutación en el gen que codifica el receptor de leptina, generando deficiencia

de leptina y confiriendo susceptibilidad a la obesidad, resistencia a la insulina y DM2 (Alpers y Hudkins 2011).

Para este estudio se optó por un modelo animal en el que la diabetes se indujo de forma farmacológica con aloxano en conejos New Zealand machos. A diferencia de otros autores que han usado STZ para inducir diabetes en ratas (Sun *et al.* 2019; Tastekin *et al.* 2018), en nuestro modelo no se observan diferencias significativas en referencia al peso entre conejos diabéticos y diabéticos tratados con Pter (Figura 34 A). En cuanto a los niveles de glucosa en sangre, estos autores también hacen referencia a la capacidad hipoglucemiante del estilbena en sus modelos. Sin embargo, nuestros resultados no muestran diferencias estadísticas entre ambos grupos diabéticos hasta la sexta semana desde el inicio del tratamiento, en la que tampoco se alcanzan valores control (Figura 34 B). Aun así, se indica una tendencia a la baja en la hiperglucemia con un estudio más prolongado en el tiempo. Esto puede deberse al hecho de que el efecto citotóxico del aloxano y la STZ se logra por diferentes vías moleculares (Lenzen 2008), o a causa de que la concentración de Pter empleada en este estudio sea insuficiente para alcanzar dichos efectos.

Los polifenoles se caracterizan por una escasa biodisponibilidad que limitan su uso clínico debido, principalmente, a su baja solubilidad y rápido metabolismo. Como consecuencia, se decidió agregar un grupo de fosfato disódico en la posición 4' para así aumentar la solubilidad del compuesto (Figura 33 A). El grupo hidroxilo en la posición 4' es esencial para su actividad (Stivala *et al.* 2001). A raíz de esta modificación, se detectaron los niveles sanguíneos de Pter después de la administración subcutánea de sal disódica de Pter fosforilado para confirmar la liberación de este tras la acción de las fosfatasas, y su consecuente acción biológica (Figura 33 B, C). Además, este cambio estructural de la molécula de Pter posibilitó su administración en el modelo animal. Gracias al aumento de la solubilidad, el Pter pudo inyectarse subcutáneamente para así

evitar la toxicidad de los solventes orgánicos y la probabilidad de inducir daño en el esófago mediante una sonda oral. Las inyecciones se llevaron a cabo en diferentes lugares de la espalda para así evitar también la aparición de posibles daños en la piel de los animales, por ejemplo, granulomas que pudiesen derivarse del estrés ocasionado por la administración diaria en una única zona. Las dosis no tóxicas de 50 mg/kg fueron similares a las empleadas en otros trabajos en los que el Pter demostró ser eficaz (Hannan *et al.* 2016; Wang *et al.* 2018).

La ausencia de toxicidad del Pter que observamos coincide con estudios previos en los que se alimentó con hasta 3 g/kg/día de Pter a ratones durante 28 días, lo que equivaldría a una dosis de 17,67 g/día en seres humanos (Ruiz *et al.* 2009). Otros estudios realizados en seres humanos también hablan sobre la seguridad del Pter. Por ejemplo, un ensayo clínico prospectivo en el que los pacientes con hipercolesterolemia fueron tratados con Pter durante un promedio de 52 días, demostró que las dosis eran seguras hasta 250 mg/día (Riche *et al.* 2013). De igual forma, otros estudios muestran como el tratamiento con 450 mg de extracto de *Pterocarpus marsupium* en voluntarios sanos no produjo ningún signo de toxicidad (Hougee *et al.* 2005). Bioquímicamente, según nuestros resultados, se observaron anomalías en la función hepática en conejos diabéticos, donde se encontraban incrementados los valores de ALT y fosfatasa alcalina, pero no en los conejos diabéticos tratados con Pter (Tabla 7), lo que no solo indica la ausencia de toxicidad, sino una primera diferencia protectora entre los dos grupos. En cuanto a la protección renal, otros autores han mostrado daño renal en modelos animales diabéticos (Wang *et al.* 2010), pero nuestros resultados no mostraron esta alteración. Es probable que dicha complicación aparezca en tiempos más largos. De hecho, trabajos como el realizado por Wang *et al.* indican daños renales en conejos diabéticos a las 12 semanas de la inducción con aloxano, y la recuperación de los efectos adversos tras el tratamiento con Resv (Wang *et al.* 2019).

Una vez comprobada tanto la seguridad del compuesto, como su liberación en el organismo animal, nos centramos en estudiar el efecto protector biológico del Pter en condiciones hiperglucémicas. En esta línea, las primeras aproximaciones se realizaron en ensayos *in vitro* sobre poblaciones celulares de la retina como son las HREC y HRP. Los resultados mostraron que la incubación de ambos tipos celulares en medio HG inducía un claro efecto citotóxico tanto a las 24 h y como a las 48 h. En cambio, en estos mismos medios, la presencia de Pter impidió el brusco descenso celular (Figura 31, 32). En las células HREC puede observarse como, a las 24 h de incubación, el estilbeno normaliza el número de células respecto la condición control. A 48 h se observa el efecto protector, aunque no llega a igualar la viabilidad de la condición control en la concentración más baja ensayada. Para el caso de las células HRP, a pesar de existir una mejora respecto a la condición HG, el Pter solo normalizó el número de células a valores del control en la condición de 5 μ M tras 24 h de incubación. Las diferencias observadas en la respuesta de ambas líneas celulares pueden ser explicadas por una diferente sensibilidad al polifenol y su capacidad celular de metabolizar el Pter. La sensibilidad al Pter no es siempre la misma y es dependiente del tipo celular (Rodríguez 2014). El grado de metabolización del Pter ha sido estudiado en diferentes poblaciones de células como las A375 (células de melanoma), A549 (células del epitelio alveolar), MCF7 (células epiteliales de cáncer mama) o HT29 (células de carcinoma de colon), y se comprobó que su efecto antitumoral dependía de la capacidad de cada tipo celular para metabolizar el polifenol (Rodríguez 2014). Las actividades fisiológicas de sulfatasa y glucuronidasa presentes en diferentes tejidos contribuyen a la farmacocinética y biodisponibilidad de los polifenoles (Kroon *et al.* 2004). La glucuronidación está mediada por UDP-glucuronosiltransferasas (UGT), donde se han identificado múltiples variantes, representando la principal vía de aclaramiento para la mayoría de los polifenoles (Wu *et al.* 2011). Cuanto más lento es el metabolismo, mayor es el tiempo en el que el Pter puede actuar.

De esta manera las HRP metabolizarían más rápidamente el Pter que las HREC, con lo cual, los efectos protectores son más limitados que para las HREC. Al prolongar el tiempo de cultivo, las concentraciones de Pter del medio comienzan a agotarse, empezando por las que se encuentran en menor concentración (2,5 μM), y, por consiguiente, su efecto protector desaparece, lo cual queda reflejado en el menor número de células obtenido en los contajes (Figura 31, 32).

En cuanto al estudio *in vivo*, hemos comprobado varias alteraciones macroscópicas retinianas, entre ellas una afección vascular. La DM deteriora progresivamente las estructuras microvasculares retinianas, signo característico del desarrollo de las etapas más avanzadas de la RD (Cheung, Mitchell, y Wong 2010). Entre las alteraciones vasculares de la RD, la tortuosidad de los vasos retinianos se ha sugerido como un marcador temprano de cambios hemodinámicos y de su progresión (Sasongko *et al.* 2011). Se ha comprobado como la tortuosidad vascular evaluada a través de imágenes tomadas por fotografías de fondo de ojo (Cheung *et al.* 2012; Sasongko *et al.* 2016), muestra una tendencia creciente a medida que la gravedad de la RD aumenta en la RDNP (Lee *et al.* 2018). En los resultados presentados en el presente trabajo puede observarse como la diabetes aumenta la tortuosidad en los vasos sanguíneos pertenecientes a las retinas de conejos diabéticos (Figura 35, 36). La DM induce la disfunción del endotelio y los pericitos, y eventualmente interrumpe la autorregulación del cambio de presión hidrostática (Curtis, Gardiner, y Stitt 2009). Esta pared vascular inestable puede ser vulnerable a la fluctuación del flujo sanguíneo y volverse tortuosa. Además, el aumento VEGF debido al entorno isquémico puede inducir la tortuosidad del vaso (Hartnett *et al.* 2008). El cambio tortuoso puede ser el resultado de una adaptación para compensar la mala perfusión al intentar aumentar el área de superficie y mejorar el suministro de oxígeno (Lee *et al.* 2018). El Pter genera un efecto protector en este ámbito, siendo capaz de impedir estos cambios al mejorar el estado de los vasos y evitar que aparezcan modificaciones tortuosas (Figura 35, 36).

La muerte celular es otra de las alteraciones presentes en las retinas diabéticas. La aparición de apoptosis en las células ganglionares de la retina se ha observado en las neuroretinas de los pacientes diabéticos en las primeras etapas de la enfermedad, independientemente de la duración o de la aparición del daño fenotípico mediante el uso de la tomografía de coherencia óptica de dominio espectral (van Dijk *et al.* 2010; El-Fayoumi *et al.* 2016). En el modelo experimental utilizado, el incremento de muerte celular puede apreciarse en la Figura 37, donde las retinas diabéticas presentan un claro aumento en los niveles de apoptosis. Además, podemos observar como el tratamiento con Pter es capaz de reducir de forma eficaz el daño retiniano inducido por la hiperglucemia disminuyendo el número de núcleos TUNEL-positivos.

Paralelamente a la apoptosis celular en la retina, la diabetes también desencadena procesos inflamatorios (Wang y Lo 2018). ERK1/2 juega un papel clave en el desarrollo de la RD al regular al alza la inflamación crónica de la retina (Zhang *et al.* 2019). Las proteínas ERK1/2 pertenecen a una conocida familia de quinasas activadas por mitógenos implicadas en procesos patológicos y fisiológicos, incluido el metabolismo, la supervivencia celular, la proliferación, la motilidad y la inflamación (Sun y Nan 2017). De acuerdo con otros estudios, nuestros resultados demuestran que ERK1/2 se activa bajo hiperglucemia (Yu *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2019) y que el tratamiento con Pter alivia la respuesta inflamatoria al reducir la fosforilación de ERK1/2; resultados que quedan reflejados mediante *western blot* en la Figura 38 (Yao *et al.* 2018).

En situación hiperglucémica, el estrés oxidativo, como el generado por el H₂O₂, se ha mostrado como causa de neurotoxicidad retiniana (C. Zhang *et al.* 2018). Nuestros resultados muestran un aumento en la producción de H₂O₂ tanto *in vitro* (Figura 39, A), como *in vivo* en las retinas de nuestros animales (Figura 39 B). Además, el polifenol disminuyó la producción de H₂O₂ *in vitro* (Figura 39 A) e *in vivo* (Figura 39 B) inducida por niveles altos de glucosa. Esta reducción

en la citotoxicidad del H₂O₂ y apoptosis ha sido observada anteriormente en otros modelos celulares como las células HepG2, una línea celular de cáncer de hígado (Fan *et al.* 2018). Como ya hemos mencionado con anterioridad, la administración de Pter no cura la diabetes inducida, siendo solo capaz de reducirla en la semana final del estudio sin lograr valores control, por lo que cualquier efecto beneficioso debe atribuirse a un efecto directo del Pter sobre la retina y no a una remisión del daño pancreático.

Conociendo la importancia etiológica del estrés oxidativo en el desarrollo de la RD y, con el fin de profundizar en los mecanismos antioxidantes del Pter, analizamos el daño lipídico y proteico.

El aumento de los productos de la peroxidación lipídica se ha asociado con enfermedades neurodegenerativas (Signorini *et al.* 2018), y existe una evidencia creciente sobre su importancia como mediadores en el desarrollo de neovascularización en la RD (Li *et al.* 2014). En el presente trabajo queda demostrado como el Pter es capaz de reducir significativamente los niveles de 4-HNE en los conejos diabéticos tratados (Figura 42). El 4-HNE es un producto final no enzimático de la peroxidación de AGPI como el ácido linoleico y el AA (Tanito y Anderson 2009). La reducción de los niveles inducida por el tratamiento con Pter tienen claros beneficios, pues la alta reactividad del 4-HNE puede, por ejemplo, inhibir la síntesis de proteínas, ARN y ADN, pudiendo inducir la muerte celular (Csala *et al.* 2015).

El papel de la peroxidación lipídica en la RD ha sido ampliamente estudiado (Njie-Mbye *et al.* 2013; Tangvarasittichai y Tangvarasittichai 2018), pero de manera general, centrándose en un número limitado de productos como el MDA o 4-HNE. Para un análisis más exhaustivo, en este trabajo se han ampliado los componentes estudiados, clasificándolos según el lípido modificado del que proceden. Así pues, estudiamos un grupo de productos derivados de la oxidación del AA, ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido

adrénico (AdA) (Figura 27), que son los ácidos grasos más abundantes de la retina (Liu *et al.* 2010). Los análisis de espectrometría de masas mostraron que la peroxidación de lípidos en las retinas de conejos diabéticos aumentó los niveles de: PGE₂, PGF_{2α}, IsoPs 8-iso-PGE₂, 8-iso-15-keto-PGF_{2α} y 8-iso-15-(R)-PGF_{2α}, 17-F_{2t}-dihomo-IsoP, Ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP, 17-*epi*-17F_{2t}-dihomo-IsoP, 17(RS)10-*epi*-SC-Δ¹⁵-11-dihomo-IsoF, 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP, 4(RS)-F_{4t}-NeuroP, y 14(RS)-14-F_{4t}-NeuroP (Figura 43). La acción del polifenol Pter logró restaurar los niveles de los conejos diabéticos a valores del grupo control (Figura 43). Las prostaglandinas como la PGE₂ y la PGF_{2α}, son mediadores inflamatorios sintetizados a partir del AA por la enzima ciclooxigenasa (COX), asociados a vasoconstricción retiniana, disrupción de la BRB, producción de VEGF, aumento de la vasodilatación, migración de leucocitos y aumento de la producción de citocinas proinflamatorias (Kim *et al.* 2010; Schoenberger *et al.* 2012; Wang, Hsiao, y Al-Shabrawey 2020). 8-iso-15-keto-PGF_{2α} es un metabolito del 8-iso-PGF_{2α}, un producto similar a las prostaglandinas producido por la peroxidación no enzimática del AA en fosfolípidos de membrana (Morrow *et al.* 1990) con efectos vasoconstrictores de manera dependiente a la concentración en la aorta de rata (Cracowski *et al.* 2002). 8-iso-PGE₂, isoprostano derivado del AA durante la peroxidación lipídica (Morrow *et al.* 1994), también tiene efectos vasoconstrictores renales en ratas (Longmire, Roberts, y Morrow 1994). Ent-7(RS)-7-F_{2t}-dihomo-IsoP, 17-*epi*-17F_{2t}-dihomo-IsoP, 17-F_{2t}-dihomo-IsoP formados por un mecanismo no enzimático de radicales libres a partir del AdA (VanRollins *et al.* 2008) y 10-*epi*-10-F_{4t}-NeuroP, 4(RS)-F_{4t}-NeuroP, y 14(RS)-14-F_{4t}-NeuroP producidos a partir del DHA (Roberts *et al.* 1998), se han utilizado como biomarcadores de estrés oxidativo en enfermedades neurodegenerativas (García-Flores *et al.* 2017; Peña-Bautista *et al.* 2019, 2020). Por tanto, si bien es necesario realizar más investigaciones para esclarecer la acción fisiopatológica que desencadenan estos derivados de AGPI en la RD, como bien se muestra en la Figura 43, el Pter

consigue normalizar los niveles de casi todos los analitos estudiados en las retinas de conejos diabéticos contribuyendo a proteger y evitar la aparición de los primeros signos de RD como la muerte de células neuronales derivada del estrés oxidativo.

Además, se analizaron las cantidades totales de isoprostanos, neuroprostanos, neurofuranos e isofuranos. La oxidación del DHA y la producción de neuroprostanos/neurofuranos ocurren principalmente en la materia gris del cerebro y la retina (Milne, Musiek, y Morrow 2005; Van't Erve *et al.* 2016), y los di-homo-isoprostanos/di-homo-isofuranos de la oxidación del AdA se encuentran en la materia blanca del cerebro y retina (Fessel *et al.* 2002; de la Torre *et al.* 2015; VanRollins *et al.* 2008). La presencia de estos compuestos fue claramente menor en las retinas tratadas en comparación con la subida experimentada en las diabéticas (Figura 43 A). Aunque no se ha estudiado en profundidad, el DHA y el AdA se han considerado marcadores tisulares específicos de daño oxidativo en trastornos neurológicos como el síndrome de Rett, el síndrome de Down, la epilepsia, la enfermedad de Alzheimer, y la degeneración macular relacionada con la edad (de La Torre *et al.* 2014; Signorini *et al.* 2018).

La susceptibilidad de la retina al estrés oxidativo debido a la alta concentración de AGPI no solo afecta a los lípidos, las proteínas también muestran una alta reactividad ante estos sucesos, por lo que sus modificaciones pueden convertirlas en citotóxicas por acción de ROS y RNS, contribuyendo así al desarrollo de RD. En este entorno oxidativo, los radicales OH^{*} pueden oxidar el anillo bencílico del aminoácido Phe, y producir isómeros anormales de Tyr como la m-Tyr. La elevación en la concentración de m-Tyr se ha utilizado como un marcador biológico de estrés oxidativo, pero, además, la evidencia emergente demuestra como este isómero es capaz de producir efectos adversos en las células y tejidos de forma directa al interrumpir la homeostasis celular y contribuir a la

patogénesis de la enfermedad (Ipson y Fisher 2016). En la Figura 40 queda patente este aumento de m-Tyr en los animales diabéticos con respecto al control. El incremento de m-Tyr coincide con lo descrito previamente en estudios de diabetes en rata (Pennathur *et al.* 2005). La administración de Pter permitió disminuir de forma eficaz la oxidación de estos residuos de Tyr, ejerciendo así una protección antioxidante sobre las proteínas (Figura 40 B). Efectos similares han sido reflejados en humanos, donde la administración de otro polifenol como el resveratrol también fue capaz de disminuir la m-Tyr en DM2 (Brasnyó *et al.* 2011).

La m-Tyr no fue el único parámetro analizado. También se mostró atención a los posibles cambios en la 3-NO-Tyr y 3Cl-Tyr. La formación de 3-NO-Tyr comienza con la reacción entre el 'NO y O₂⁻ para generar ONOO⁻'. Esta reacción es seguida por la nitración de residuos de p-Tyr por ONOO⁻ para generar 3-NO-Tyr, causando a menudo estrés nitrosativo (Radi 2018). La 3-NO-Tyr se ha identificado como un indicador de daño celular e inflamación (Ceriello 2002; Darwish, Amiridze, y Aarabi 2007). Su producción *in vivo* se ha detectado en un gran número de condiciones patológicas y se considera un marcador de estrés nitrosativo (Nag *et al.* 2019). Los niveles de 3-NO-Tyr se elevan en el tejido de la retina de ratas expuestas a hiperglucemia prolongada (Kowluru 2003). De igual forma, en nuestro modelo de diabetes encontramos incrementados los niveles de 3-NO-Tyr en las retinas de conejos diabéticos, mostrando como el Pter impide que esto ocurra en los conejos tratados (Figura 40 A). Asimismo, la administración del polifenol impide que las retinas tratadas eleven su concentración en 3Cl-Tyr, como ocurre en las diabéticas que no han sido tratadas (Figura 40 C). Este compuesto es un marcador oxidante bien establecido producido durante la reacción entre el HClO con las cadenas de Tyr (Pattison, Davies, y Hawkins 2012), por lo que su reducción mediante el

tratamiento con Pter indica una nueva prevención de daño frente a las modificaciones proteicas.

Para arrojar aún más evidencia sobre la protección antioxidante que ejerce el polifenol Pter sobre el daño a las proteínas, además de las modificaciones en los residuos de tirosinas, se complementó el estudio oxidativo con la determinación de los niveles de proteínas carboniladas. Gran cantidad de trabajos utilizan la carbonilación de proteínas para reflejar la gravedad de la diabetes y sus complicaciones (Cakatay 2005; Pan *et al.* 2008; Ramakrishna y Jailkhani 2007). Existe una correlación positiva entre la carbonilación de proteínas y la gravedad clínica de la RD. Por ejemplo, en comparación con individuos sanos, los pacientes diabéticos han aumentado significativamente los niveles de proteínas carboniladas, y a su vez, los pacientes con RD muestran un mayor nivel que en los pacientes diabéticos sin RD (Margetis *et al.* 2009; Pan *et al.* 2008). En la línea de estos hechos, se indica en la Figura 41 como los conejos diabéticos encontraban los niveles de carbonilación proteica aumentados respecto a los animales no diabéticos, y como el tratamiento con Pter impidió el incremento observado en las retinas diabéticas.

Además de evitar el daño oxidativo de proteínas y lípidos retinianos inducidos por la hiperglucemia, la administración diaria de Pter mejoró el estado redox general de los animales diabéticos (Figura 45). Antes de profundizar en la parte *in vivo*, previamente se exploraron los efectos del Pter *in vitro* respecto a los niveles de GSH, como indicativo de un buen estado antioxidante frente al ataque oxidativo inducido por elevadas concentraciones de glucosa. Los niveles de GSH en las células HREC estaban disminuidos al incubar las células en un medio con HG. Sin embargo, la adición de Pter en sus distintas concentraciones de 2,5 y 5 μM , aumentaron las cantidades de GSH en estas células (Figura 44). Esta respuesta celular pudo observarse tanto a 24 como a 48 h. Nuestros resultados están en línea con otros estudios en los que utilizando células

ganglionares de rata o células del EPR humano (ARPE-19), el uso de compuestos polifenólicos flavonoides como el eriodictiol o la diosmina, respectivamente, son capaces de aumentar los niveles de GSH en medios HG (Lv *et al.* 2019). Sin embargo, los niveles de GSH de una forma aislada no es un buen indicador del estatus redox. Esto se debe a que el GSH puede tanto biosintetizarse, como obtenerse del reciclado de GSSG, mientras que el GSSG solo se deriva de GSH. Es por ello, que conjuntamente a los valores del tiol, hay que considerar los niveles de GSSG, de esta forma es más apropiado el estudio del estatus redox a través del ratio GSH/GSSG (Go y Jones 2013). Los niveles de GSH de las retinas de los animales diabéticos no presentaron diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos del tiol en los conejos diabéticos tratados con el polifenol (Figura 45 A). Sin embargo, los niveles de GSSG de los animales tratados se vieron significativamente disminuidos con respecto a los animales diabéticos (Figura 45 B). De este modo, el análisis del ratio GSH/GSSG muestra que los animales diabéticos tratados con Pter presentan una mejoría evidente en el estatus redox de las retinas (Figura 45 C) y refuerzan el carácter retinoprotector de este polifenol.

La explicación a esta protección en la que aparentemente los niveles de GSH no experimentan cambios, puede deberse a su tasa de producción/oxidación. El aumento en los niveles de GSSG sin cambios en los de GSH, hace pensar a que la síntesis del tripéptido se encuentra incrementada, pero debido a la exposición a un intenso ambiente oxidativo, la velocidad a la que se oxida es mayor. Para confirmar esto nos fijamos en un precursor de GSH, la γ -Glu-Cys, compuesto formado tras el primer paso limitante en la síntesis de GSH, cuyos niveles en los diabéticos eran significativamente inferiores a los otros dos grupos que se encontraban inalterados (Figura 46 A), lo que parece indicar la rapidez con la que está siendo utilizado en la producción de GSH. Además, la expresión de la subunidad catalítica de la enzima GCL (glutamato-cisteína ligasa) (GCLC) y moduladora (GCLM) que participan en su síntesis, también

parecen ir en la dirección de esta teoría. La expresión de GCLC en el caso de los conejos diabéticos está notablemente aumentada (Figura 46 B). Además, tanto la GCLC como la GCLM se encuentran significativamente disminuidas en las retinas de los animales tratados al compararlas con el grupo diabético (Figura 46 C).

El tratamiento con Pter no solo mejoró la relación GSH/GSSG, sino que también participó en la recuperación de las principales actividades enzimáticas antioxidantes: CAT, SOD y GPx en retinas de conejo diabético (Figura 47). La actividad de estas enzimas se ha visto disminuida en modelos de diabetes *in vitro* (Liu *et al.* 2014), en modelos animales (Jelodar *et al.* 2020; Zhang *et al.* 2020) y estudios en humanos (Haskins *et al.* 2003; Kowluru y Kennedy 2001). La disminución en estas defensas antioxidantes enzimáticas aumenta la vulnerabilidad ante el ataque oxidativo/nitrosativo que acompaña a la hiperglucemia y, predispone a la retina al desarrollo de RD. Es aquí donde cobra relevancia el efecto de incrementar las defensas antioxidantes unido a la administración de Pter, conforme hemos visto en nuestros resultados.

El aumento de las defensas antioxidantes desencadenado por el tratamiento con Pter es el encargado de eliminar los efectos citotóxicos descritos en la hiperglucemia. Pero el verdadero factor impulsor en la defensa y desencadenante de los todos estos efectos protectores se encuentra ligado a la actividad del factor de transcripción NRF2, uno de los principales reguladores de la homeostasis redox y una atractiva diana terapéutica (Nakagami 2016).

La capacidad antioxidante del Pter ha sido demostrada previamente en diferentes modelos experimentales (Bhakkialakshmi *et al.* 2014; Kosuru *et al.* 2018), además de presentar la facultad de activar NRF2 (Yang *et al.* 2017). En condiciones fisiológicas, NRF2 se encuentra principalmente en el citosol, secuestrado por la proteína KEAP1 (proteína 1 asociada a ECH tipo Kealch), la cual facilita su ubiquitinación y degradación al presentarlo al complejo

Cullin3/RING para su degradación por el proteasoma 26S (Lee y Johnson 2004). Ante un estímulo activador, NRF2 se transloca al núcleo, se une a secuencias de elemento de respuesta antioxidante (ARE) y aumenta la expresión de genes desintoxicantes y antioxidantes de fase II como: la hemooxigenasa 1 (HO-1), NQO1, tioredoxina reductasa (TrxR), peroxiredoxinas (Prxs), SOD, CAT, GPx, GSH reductasa (GR), GSH S-transferasa (GST) y GCL (Robledinos-Antón *et al.* 2019; Shaw y Chattopadhyay 2020). Diferentes estudios *in vitro* e *in vivo* confirman estos efectos. Por ejemplo, la inhibición de NRF2 reduce la expresión génica antioxidante y exacerba el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en la línea celular humana gliar de Müller MIO-M1 (Xu *et al.* 2014). Así mismo se ha demostrado que ratones diabéticos y *Knockout* para NRF2, presentan un aumento en los niveles de O₂⁻ y una disfunción de la BRB con agravamiento de la disfunción neuronal (Xu *et al.* 2014).

Con el fin de validar la capacidad del Pter para activar la translocación de NRF2 al núcleo y proporcionar una mejor defensa antioxidante, decidimos realizar ensayos *in vitro* utilizando células HREC. El tratamiento con el estilbeno promovió la máxima translocación de NRF2 al núcleo en HREC después de 6 h de incubación (Figura 48), quedando reflejada su acción al aumentar la expresión del gen NQO1 (Figura 50). Además, *in vivo*, la activación de NRF2 aumentó los niveles de proteína de NQO1 en los animales tratados (Figura 51).

Descritos los efectos del Pter, nos propusimos estudiar el mecanismo molecular subyacente, proporcionando evidencia sobre su vía de acción y de las posibles implicaciones futuras que ello podría tener. Como hemos mencionado más arriba, la actividad de NRF2 se encuentra mediada por KEAP1, pero además, NRF2 también se encuentra regulado por otro mecanismo que implica a GSK3 β , el cual lo fosforila y posibilita su reclutamiento por la caja Cullin/RING para la degradación ubiquitina-proteasoma (Robledinos-Antón *et al.* 2019; Shaw y Chattopadhyay 2020). Los experimentos *in vitro*

(Bhakkialakshmi *et al.* 2016; ZW. Chen *et al.* 2018) e *in vivo* (Ullah *et al.* 2019) han demostrado la capacidad de Pter para activar NRF2 a través de la liberación de KEAP1, sin embargo, todavía no se conoce si puede hacerlo mediante GSK3 β .

GSK3 α y GSK3 β se encuentran en un estado inactivo debido a la fosforilación mediada por AKT. AKT fosforila una gran variedad de sustratos proteicos, incluidas las ligasas de ubiquitina E2, factores de transcripción, quinasas de proteínas y lípidos, enzimas metabólicas, etc., lo que demuestra que la función principal de AKT no es solo regular un proceso fisiológico, sino controlar múltiples funciones. De hecho, la inhibición de GSK3 por fosforilación de AKT es indicativo de la regulación de factores de transcripción como NRF2 (Manning y Toker 2017). Numerosos estudios hacen referencia a que AKT está involucrada en la vía de señalización del antioxidante PI3K y que la vía molecular de activación de PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2 es un poderoso protector contra el daño oxidativo (Padiya *et al.* 2014; Yu *et al.* 2018). De acuerdo con estos trabajos, observamos que el Pter aumentó la expresión de NQO1 en HREC, un evento posterior de la activación de NRF2, y que dicha activación fue revertida por inhibidores de PI3K (BEZ235) y GSK3 β (LiCl) (Figura 50). Además, hemos detectado la activación de la vía PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2 con el tratamiento con Pter en retinas de conejo diabético (Figura 49). Por lo tanto, nuestros hallazgos indican que el Pter es un activador de NRF2 a través de la modulación de la vía PI3K/AKT/GSK3 β , siendo capaz de prevenir los primeros cambios moleculares asociados con el desarrollo de RD.

En un intento por descubrir el origen por el cual el Pter inicia toda esta cascada antioxidante, se propone GLP1R como primer punto de interacción aguas arriba. En los últimos años, los agonistas de GLP1R han surgido como tratamientos eficaces y seguros para la DM2 y se han incorporado a las directrices clínicas de la Asociación Americana de la Diabetes y la Asociación

Europea para el Estudio de la Diabetes (Simó y Hernández 2017). Los estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado la capacidad de GLP1 para proteger las neuronas de la agregación del péptido β -amiloide y contra los productos finales de glicación avanzada (Chen *et al.* 2014). También es capaz de reducir la hiperfosforilación de la proteína Tau regulando GSK3 β (Duka *et al.* 2009). Además, se piensa que el mecanismo de acción de GLP1 implica la activación de la vía de señalización PI3K/AKT, que es capaz de fosforilar e inactivar GSK3 β (Rowlands *et al.* 2018). De este modo, mediante el uso de la línea celular HEK293 GLP1R Nomad, demostramos que el Pter es un agonista eficaz de GLP1R al inducir la formación de AMPc capaz de modular los mecanismos protectores antioxidantes. Para ello se usó como control positivo exendina 4, un agonista de GLP1R que comparte 53% de la secuencia de aminoácidos da GLP1, lo que le permite estimular la liberación de AMPc y mostrar acciones biológicas similares a GLP1 (Teramoto *et al.* 2011). El incremento de AMPc que produjo la exendina 4 era igualmente producido por el Pter, es por ello que proponemos al Pter como un agonista de GLP1R (Figura 52). La acción del Pter sobre GLP1R desencadenó la activación de NRF2 reflejada en la expresión final de la señal en NQO1 (Figura 52 B). La incubación con exendina 9, un antagonista de GLP1R capaz de inhibir la producción de AMPc (Thorens *et al.* 1993), bloqueó la acumulación de AMPc tanto por parte de la exendina 4 como del Pter (Figura 52), e inhibió la expresión de ARNm de NQO1 en HREC inducida por Pter (Figura 50). Esta activación/inhibición confirma la implicación del polifenol en la repuesta desencadenada tras su interacción con GLP1R al desencadenar la activación de NRF2, reflejada en la expresión final de la señal en NQO1 (Figura 50). De esta manera queda definida la posible vía molecular asociada al efecto antioxidante del Pter en la RD (Figura 54).

La inmunofluorescencia sobre las retinas de conejo reveló que la exposición al Pter durante las 6 semanas generaba un aumento en la presencia de GLP1R retiniano (Figura 53). Esto permite hipotetizar sobre la existencia de un

mecanismo de retroalimentación positiva subyacente al Pter, en el que el efecto antioxidante del polifenol tiende a potenciarse con la síntesis de más GLP1R, el cual potenciaría el efecto del Pter. Sin embargo, se necesitan más estudios para comprender la importancia y beneficio de modulación de GLP1R con Pter, así como sus efectos sobre la vía PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2 en el tratamiento de la RD.

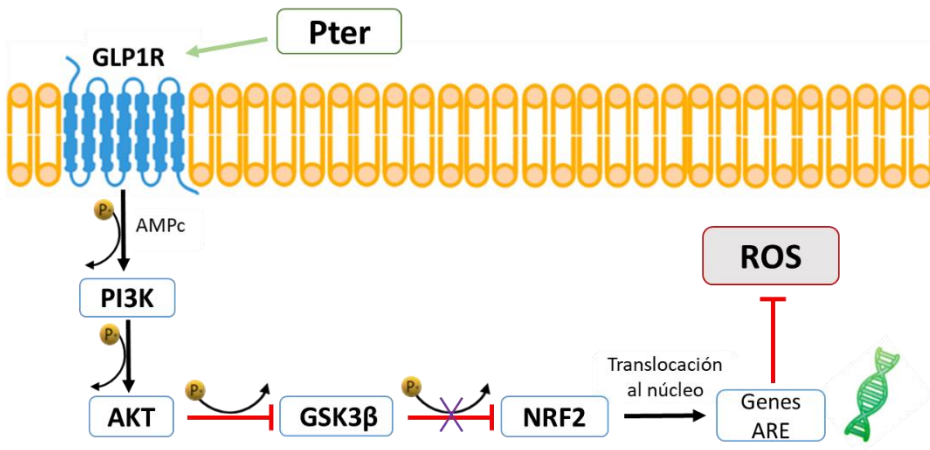


Figura 54. Ruta molecular de acción del Pter.

CONCLUSIONES

1. La fosforilación del polifenol natural Pter aumenta su solubilidad en agua, no altera su actividad biológica y facilita su administración repetida en modelos de experimentación animal.

2. Este trabajo demuestra por primera vez en estudios *in vivo*, que el daño neuro-vascular retiniano temprano causado por la hiperglucemia, reflejado en el número de células ganglionares apoptóticas y en la tortuosidad vascular retiniana respectivamente, puede prevenirse mediante el uso de concentraciones no tóxicas y biodisponibles de Pter, disminuyendo así el riesgo potencial de desarrollar RD.

3. El Pter presenta una potente actividad antioxidante capaz de amortiguar el daño oxidativo inducido por la hiperglucemia crónica en lípidos y proteínas. Esto queda reflejado en la disminución de los niveles de isoprostanos, 4-HNE, tirosinas y proteínas carboniladas de las muestras procedentes de animales diabéticos tratados con el polifenol.

4. El efecto protector del Pter ante el daño oxidativo es ejercido por el incremento en las actividades de las principales enzimas antioxidantes, frente a la disminución en éstas que provoca la diabetes, junto a la mejoría del estado redox, con un ratio GSH/GSSG más favorable y menores niveles de H₂O₂ tanto *in vivo* como *in vitro*.

5. La vía molecular PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2 juega un papel crítico en la protección del Pter contra ROS/RNS en la diabetes después de que el polifenol aumente los niveles de fosforilación y active la ruta de acción. Esta desemboca en la translocación de NRF2 al núcleo y la expresión de los diferentes elementos de respuesta antioxidantes responsables del efecto preventivo en la aparición de RD.

6. Se muestra al Pter como un agonista de la proteína de membrana GLP1R, y se sugiere a esta como posible estimulante de la vía molecular

PI3K/AKT/GSK3 β /NRF2 tras aumentar los niveles de NQO1, diana de NRF2. Además, el Pter incrementa la presencia de GLP1R en retina, con lo que la relación del estilbeno con este receptor puede ser más estrecha de cara a investigaciones futuras en el tratamiento de la RD.

BIBLIOGRAFÍA

- American Academy of Ophthalmology, 2019. <https://www.aaopt.org/salud-ocular/enfermedades/retinopatia-diabetica> (acceso 21 de abril de 2020).
- Adrian M, Jeandet P, Douillet-Breuil AC, Tesson L, Bessis R, 2000. «Stilbene Content of Mature *Vitis Vinifera* Berries in Response to UV-C Elicitation». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(12): 6103-5.
- Aguirre E, López-Bernardo E, y Cadenas S, 2012. «Functional Evidence for Nitric Oxide Production by Skeletal-Muscle Mitochondria from Lipopolysaccharide-Treated Mice». *Mitochondrion*, 12(1): 126-31.
- Ahmad A, y Ahsan H, 2020. «Biomarkers of Inflammation and Oxidative Stress in Ophthalmic Disorders». *Journal of Immunoassay & Immunochemistry*, 41(3): 257-71.
- Ahmad I, y Hoda M, 2020. «Attenuation of Diabetic Retinopathy and Neuropathy by Resveratrol: Review on Its Molecular Mechanisms of Action». *Life Sciences*, 245: 117350.
- Ahsan H, 2015. «Diabetic Retinopathy--Biomolecules and Multiple Pathophysiology». *Diabetes & Metabolic Syndrome*, 9(1): 51-54.
- Aiello LP, Silva PS, y Sun JK, 2012. «Eye Complications of Diabetes». En *Atlas of Diabetes: Fourth Edition*, ed. Jay Skyler. Boston, MA: Springer US, 249-75.
- Alabadí JA, Miranda FJ, Lloréns S, Centeno MJ, Marrachelli VG y Alborch E, 2004. «Mechanisms Underlying Diabetes Enhancement of Endothelin-1-Induced Contraction in Rabbit Basilar Artery». *European Journal of Pharmacology*, 486(3): 289-96.
- Al-Kharashi AS, 2018. «Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy». *Saudi Journal of Ophthalmology*, 32(4): 318-23.
- Alpers CE, y Hudkins KL, 2011. «Mouse Models of Diabetic Nephropathy». *Current opinion in nephrology and hypertension*, 20(3): 278-84.

- Al-Shabrawey M, y Smith S, 2010. «Prediction of diabetic retinopathy: role of oxidative stress and relevance of apoptotic biomarkers». *The EPMA Journal*, 1(1): 56-72.
- Amadio M, Bucolo C, Leggio GM, Drago F, Govoni S and Pascale A, 2010. «The PKCbeta/HuR/VEGF Pathway in Diabetic Retinopathy». *Biochemical Pharmacology*, 80(8): 1230-37.
- Amarowicz R, Carle R, Dongowski G, Durazzo A, Galensa R, Kammerer D, et al., 2009. «Influence of Postharvest Processing and Storage on the Content of Phenolic Acids and Flavonoids in Foods». *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(2): S151-183.
- Arjamaa O, y Nikinmaa M, 2006. «Oxygen-Dependent Diseases in the Retina: Role of Hypoxia-Inducible Factors». *Experimental Eye Research*, 83(3): 473-83.
- Asensi M, Medina I, Ortega A, Carretero J, Baño MC, Obrador E, et al., 2002. «Inhibition of Cancer Growth by Resveratrol Is Related to Its Low Bioavailability». *Free Radical Biology & Medicine*, 33(3): 387-98.
- Association, American Diabetes, 2014. «Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus». *Diabetes Care*, 37(1): S81-90.
- Ayala A, Muñoz MF, y Argüelles S, 2014. «Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014: 360438.
- Bader M, y Ganten D, 2008. «Update on Tissue Renin-Angiotensin Systems». *Journal of Molecular Medicine (Berlin, Germany)*, 86(6): 615-21.
- Barrera-Chimal J, Girerd S, y Jaisser F, 2019. «Mineralocorticoid Receptor Antagonists and Kidney Diseases: Pathophysiological Basis». *Kidney International*, 96(2): 302-19.
- Bartesaghi S, Ferrer-Sueta G, Peluffo G, Valez V, Zhang H, Kalyanaraman B, et al., 2007. «Protein Tyrosine Nitration in Hydrophilic and Hydrophobic Environments». *Amino Acids*, 32(4): 501-15.

- Bavaresco LC, Cantù FE, y Trevisan M, 1999. «Stilbene Compounds: From the Grapevine to Wine». *Drugs Under Experimental and Clinical Research*, 25(2-3): 57-63.
- Behl T, Kaur I, y Kotwani A, 2016. «Implication of Oxidative Stress in Progression of Diabetic Retinopathy». *Survey of Ophthalmology*, 61(2): 187-96.
- Bejarano E, y Taylor A, 2019. «Too Sweet: Problems of Protein Glycation in the Eye». *Experimental Eye Research*, 178: 255-62.
- Benitez-Aguirre P, Craig ME, Sasongko MB, Jenkins AJ, Wong TY, Wang JJ, et al., 2011. «Retinal Vascular Geometry Predicts Incident Retinopathy in Young People with Type 1 Diabetes: A Prospective Cohort Study from Adolescence». *Diabetes Care*, 34(7): 1622-27.
- Bhakkialakshmi E, Shalini D, Sekar TV, Rajaguru P, Paulmurugan R, Ramkumar KM, 2014. «Therapeutic Potential of Pterostilbene against Pancreatic Beta-Cell Apoptosis Mediated through Nrf2». *British Journal of Pharmacology*, 171(7): 1747-57.
- Bhakkialakshmi E, 2016. «Pterostilbene-Mediated Nrf2 Activation: Mechanistic Insights on Keap1:Nrf2 Interface». *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24(16): 3378-86.
- Brasnyó P, Molnár GA, Mohás M, Markó L, Laczy B, Cseh J, et al., 2011. «Resveratrol Improves Insulin Sensitivity, Reduces Oxidative Stress and Activates the Akt Pathway in Type 2 Diabetic Patients». *The British Journal of Nutrition*, 106(3): 383-89.
- Breuss JM, Atanasov AG, y Uhrin P, 2019. «Resveratrol and Its Effects on the Vascular System». *International Journal of Molecular Sciences*, 20(7).
- Brownlee M, 2001. «Biochemistry and Molecular Cell Biology of Diabetic Complications». *Nature*, 414(6865): 813-20.
- Bucolo C, Drago F, Maisto R, Romano GL, D'Agata V, Maugeri G, et al., 2019. «Curcumin Prevents High Glucose Damage in Retinal Pigment Epithelial Cells through ERK1/2-Mediated Activation of the Nrf2/HO-1 Pathway». *Journal of Cellular Physiology*, 234(10): 17295-304.

- Buse MG, 2006. «Hexosamines, Insulin Resistance, and the Complications of Diabetes: Current Status». *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 290(1): E1-8.
- Cadet J, Douki T, y Ravanat JL, 2010. «Oxidatively Generated Base Damage to Cellular DNA». *Free Radical Biology & Medicine*, 49(1): 9-21.
- Cakatay U, 2005. «Protein Oxidation Parameters in Type 2 Diabetic Patients with Good and Poor Glycaemic Control». *Diabetes & Metabolism*, 31(6): 551-57.
- Calderon GD, Juarez OH, Hernandez GE, Punzo SM, De la Cruz ZD, 2017. «Oxidative stress and diabetic retinopathy: development and treatment». *Eye*, 31(8): 1122-30.
- Campbell I, 2017. «Intermediary Metabolism». *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 18(3): 147-49.
- Campochiaro PA, 2015. «Molecular Pathogenesis of Retinal and Choroidal Vascular Diseases». *Progress in retinal and eye research*, 49: 67-81.
- Cardinali DP, Pagano ES, Bernasconi PAS, Reynoso R, Scacchiet P, 2013. «Melatonin and Mitochondrial Dysfunction in the Central Nervous System». *Hormones and Behavior*, 63(2): 322-30.
- Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones JF, Queipo-Ortuño MI, 2013. «Benefits of Polyphenols on Gut Microbiota and Implications in Human Health». *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 24(8): 1415-22.
- Carroll J, Raththagala M, Subasinghe W, Baguzis S, Oblak TD, Root P, et al., 2006. «An Altered Oxidant Defense System in Red Blood Cells Affects Their Ability to Release Nitric Oxide-Stimulating ATP». *Molecular bioSystems*, 2(6-7): 305-11.
- Carroll JS, Ku JC, Karunarathne W, y Spence DM, 2007. «Red Blood Cell Stimulation of Platelet Nitric Oxide Production Indicated by Quantitative Monitoring of the Communication between Cells in the Bloodstream». *Analytical Chemistry*, 79(14): 5133-38.
- Carstensen B, Jørgensen ME, y Friis S, 2014. «The Epidemiology of Diabetes and Cancer». *Current Diabetes Reports*, 14(10): 535.

- Centers for Disease Control and Prevention. National Diabetes Statistics Report, 2020. «National Diabetes Statistics Report 2020. Estimates of Diabetes and Its Burden in the United States.». Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention, U.S. Dept of Health and Human Services. 2020: 32.
- Centro de investigación y cirugía ocular – Inof, 2017. «Diagnóstico y tratamiento de enfermedades de la mácula». <https://inof.es/diagnostico-y-tratamiento-de-enfermedades-de-la-macula/> (acceso 14 de mayo de 2020).
- Ceriello A, 2002. «Nitrotyrosine: New Findings as a Marker of Postprandial Oxidative Stress». *International Journal of Clinical Practice. Supplement*, (129): 51-58.
- Cháfer-Pericás C, Rahkonen L, Sánchez-Illana A, Kuligowski J, Torres-Cuevas I, Cernada M, et al., 2015. «Ultra High Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry Determination of Lipid Peroxidation Biomarkers in Newborn Serum Samples». *Analytica Chimica Acta*, 886: 214-20.
- Chan MF, y Werb Z, 2015. «Animal Models of Corneal Injury». *Bio-Protocol*, 5(13): e1516.
- Chen B, He T, Xing Y, y Cao T, 2017. «Effects of quercetin on the expression of MCP-1, MMP-9 and VEGF in rats with diabetic retinopathy». *Experimental and Therapeutic Medicine*, 14(6): 6022-26.
- Chen C, Cohrs MC, Stertmann J, Bozsak R, Speier S, 2017. «Human beta cell mass and function in diabetes: Recent advances in knowledge and technologies to understand disease pathogenesis». *Molecular Metabolism*, 6(9): 943-57.
- Chen H, Liu C, Cheng C, Zheng L, Huang K, 2018. «Effects of Apelin Peptides on Diabetic Complications». *Current Protein & Peptide Science*, 19(2): 179-89.
- Chen M, Luo C, Zhao J, Devarajan G, Xu H, 2019. «Immune regulation in the aging retina». *Progress in retinal and eye research*, 69: 159-72.

- Chen S, An FM, Yin L, Liu AR, Yin DK, Yao WB, 2014. «Glucagon-like Peptide-1 Protects Hippocampal Neurons against Advanced Glycation End Product-Induced Tau Hyperphosphorylation». *Neuroscience*, 256: 137-46.
- Chen ZW, Miu HF, Wang HP, Wu ZN, Wang WJ, Ling YL, et al., 2018. «Pterostilbene Protects against Uraemia Serum-Induced Endothelial Cell Damage via Activation of Keap1/Nrf2/HO-1 Signaling». *International Urology and Nephrology*, 50(3): 559-70.
- Cheung CYI, Lamoureux E, Ikram MK, Sasongko MB, Ding J, Zheng Y, et al., 2012. «Retinal Vascular Geometry in Asian Persons with Diabetes and Retinopathy». *Journal of Diabetes Science and Technology*, 6(3): 595-605.
- Cheung N, Mitchell P, y Wong TY, 2010. «Diabetic Retinopathy». *Lancet (London, England)*, 376(9735): 124-36.
- Chow BW, y Gu C, 2017. «Gradual Suppression of Transcytosis Governs Functional Blood-Retinal Barrier Formation». *Neuron*, 93(6): 1325-1333.e3.
- Clarke M, y Dodson PM, 2007. «PKC Inhibition and Diabetic Microvascular Complications». *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 21(4): 573-86.
- Cracowski JL, Camus L, Durand T, Devillier P, Guy A, Hardy G, et al., 2002. «Response of Rat Thoracic Aorta to F(2)-Isoprostane Metabolites». *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 39(3): 396-403.
- Crespo C, Brosa M, Soria-Juan A, Lopez-Alba A, López-Martínez N, Soria B, 2013. «Costes directos de la diabetes mellitus y de sus complicaciones en España (Estudio SECCAID: Spain estimated cost Ciberdem-Cabimer in Diabetes)». *Avances en Diabetología*, 29(6): 182-89.
- Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, Margittai E, al., 2015. «On the Role of 4-Hydroxynonenal in Health and Disease». *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1852(5): 826-38.

- Curtis TM, Gardiner TA, y Stitt AW, 2009. «Microvascular Lesions of Diabetic Retinopathy: Clues towards Understanding Pathogenesis?» *Eye (London, England)*, 23(7): 1496-1508.
- Cutler RG, 2005. «Oxidative Stress Profiling: Part I. Its Potential Importance in the Optimization of Human Health». *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1055: 93-135.
- Darwish RS, Amiridze N, y Aarabi B, 2007. «Nitrotyrosine as an Oxidative Stress Marker: Evidence for Involvement in Neurologic Outcome in Human Traumatic Brain Injury». *The Journal of Trauma*, 63(2): 439-42.
- Davies MJ, 2016. «Protein Oxidation and Peroxidation». *The Biochemical Journal*, 473(7): 805-25.
- de la Torre A, Lee YY, Mazzoni A, Guy A, Bultel-Poncé V, Durand T, et al., 2015. «Total Syntheses and in Vivo Quantitation of Novel Neurofuran and Dihomo-Isofuran Derived from Docosahexaenoic Acid and Adrenic Acid». *Chemistry (Germany)*, 21(6): 2442-46.
- Dhama K, Latheef SK, Dadar M, Samad HA, Munjal A, Khandiaet R, et al., 2019. «Biomarkers in Stress Related Diseases/Disorders: Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Values». *Frontiers in Molecular Biosciences*, 6: 91.
- Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, Elman MJ, Qin H, Aiello LP, Beck RW, Bressler NM, et al., 2012. «Intravitreal Ranibizumab for Diabetic Macular Edema with Prompt versus Deferred Laser Treatment: Three-Year Randomized Trial Results». *Ophthalmology*, 119(11): 2312-18.
- Diabetic Retinopathy Clinical Research Network, Wells JA, Glassman AR, Ayala AR, Jampol LM, Aiello LP, et al., 2015. «Aflibercept, Bevacizumab, or Ranibizumab for Diabetic Macular Edema». *The New England Journal of Medicine*, 372(13): 1193-1203.
- Díaz-Naya L, y Delgado-Álvarez E, 2016. «Diabetes mellitus. Criterios diagnósticos y clasificación. Epidemiología. Etiopatogenia. Evaluación inicial del paciente con diabetes». *Medicine - Programa de Formación Médica Continuada Acreditado*, 12(17): 935-46.

- Díaz-Coránguez M, Ramos C, y Antonetti DA, 2017. «The inner Blood-Retinal Barrier: Cellular Basis and Development». *Vision research*, 139: 123-37.
- Dixon SJ, y Stockwell BR, 2014. «The Role of Iron and Reactive Oxygen Species in Cell Death». *Nature Chemical Biology*, 10(1): 9-17.
- Domènech EB, y Marfany G, 2020. «The Relevance of Oxidative Stress in the Pathogenesis and Therapy of Retinal Dystrophies». *Antioxidants*, 9(4): 347.
- Downie LE, Vessey K, Miller A, Ward MM, Pianta MJ, Vingrys AJ, et al., 2009. «Neuronal and Glial Cell Expression of Angiotensin II Type 1 (AT1) and Type 2 (AT2) Receptors in the Rat Retina». *Neuroscience*, 161(1): 195-213.
- Downing NS, Shah ND, Aminawung JA, Pease AM, Zeitoun JD, Krumholz HM, et al., 2017. «Postmarket Safety Events Among Novel Therapeutics Approved by the US Food and Drug Administration Between 2001 and 2010». *JAMA*, 317(18): 1854-63.
- Du X, Matsumura T, Edelstein D, Rossetti L, Zsengellér Z, Szabó C, et al., 2003. «Inhibition of GAPDH Activity by Poly(ADP-Ribose) Polymerase Activates Three Major Pathways of Hyperglycemic Damage in Endothelial Cells». *The Journal of Clinical Investigation*, 112(7): 1049-57.
- Duka T, Duka V, Joyce JN, y Sidhu A, 2009. «Alpha-Synuclein Contributes to GSK-3beta-Catalyzed Tau Phosphorylation in Parkinson's Disease Models». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 23(9): 2820-30.
- Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Cicala C, Caiazza E, Izzo AA, et al., 2019. «Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health». *Phytotherapy Research*, 33(9): 2221-43.
- El-Fayoumi, D, Eldine NMB, Esmael AF, Ghalwash D, Soliman HM, 2016. «Retinal Nerve Fiber Layer and Ganglion Cell Complex Thicknesses Are Reduced in Children With Type 1 Diabetes With No Evidence of Vascular Retinopathy». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 57(13): 5355-60.

- Ellis MP, Lent-Schochet D, Lo T, y Yiu G, 2019. «Emerging Concepts in the Treatment of Diabetic Retinopathy». *Current Diabetes Reports*, 19(11): 137.
- Engerman RL, y Kern TS, 1984. «Experimental Galactosemia Produces Diabetic-like Retinopathy». *Diabetes*, 33(1): 97-100.
- Escobar J, Sánchez-Illana A, Kuligowski J, Torres-Cuevas I, Solberg R, Garberget HT, et al., 2016. «Development of a Reliable Method Based on Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry to Measure Thiol-Associated Oxidative Stress in Whole Blood Samples». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 123: 104-12.
- Eshaq RS, Aldalati AMZ, Alexander JS, y Harris NR, 2017. «Diabetic Retinopathy: Breaking the Barrier». *Pathophysiology: the official journal of the International Society for Pathophysiology*, 24(4): 229-41.
- Evcimen ND, y King GL, 2007. «The Role of Protein Kinase C Activation and the Vascular Complications of Diabetes». *Pharmacological Research*, 55(6): 498-510.
- Falcão M, Falcão-Reis F, y Rocha-Sousa A, 2010. «Diabetic Retinopathy: Understanding Pathologic Angiogenesis and Exploring its Treatment Options». *The Open Circulation & Vascular Journal*, 3(1).
- Fan X, Wang L, Huang J, Lv H, Deng X, y Ci X, 2018. «Pterostilbene Reduces Acetaminophen-Induced Liver Injury by Activating the Nrf2 Antioxidative Defense System via the AMPK/Akt/GSK3 β Pathway». *Cellular Physiology and Biochemistry*, 49(5): 1943-58.
- Feng B, Chen S, McArthur K, Wu Y, Sen S, Ding Q, et al., 2011. «MiR-146a-Mediated Extracellular Matrix Protein Production in Chronic Diabetes Complications». *Diabetes*, 60(11): 2975-84.
- Ferrer P, Asensi M, Segarra R, Ortega A, Benlloch M, Obrador E, et al., 2005. «Association between Pterostilbene and Quercetin Inhibits Metastatic Activity of B16 Melanoma». *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 7(1): 37-47.
- Fessel JP, Porter NA, Moore KP, Sheller JR, y Roberts 2nd LJ, 2002. «Discovery of Lipid Peroxidation Products Formed in Vivo with a Substituted

Tetrahydrofuran Ring (Isofurans) That Are Favored by Increased Oxygen Tension». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(26): 16713-18.

Fields MA, Del Priore LV, Adelman RA, y Rizzolo LJ, 2019. «Interactions of the Choroid, Bruch's Membrane, Retinal Pigment Epithelium, and Neurosensory Retina Collaborate to Form the Outer Blood-Retinal-Barrier». *Progress in Retinal and Eye Research*, : 100803.

Filla LA, y Edwards JL, 2016. «Metabolomics in diabetic complications». *Molecular bioSystems*, 12(4): 1090-1105.

Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al., 2017. «Global Causes of Blindness and Distance Vision Impairment 1990–2020: A Systematic Review and Meta-Analysis». *The Lancet Global Health*, 5(12): e1221-34.

Fong DS, Girach A, y Boney A, 2007. «Visual Side Effects of Successful Scatter Laser Photocoagulation Surgery for Proliferative Diabetic Retinopathy: A Literature Review». *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 27(7): 816-24.

Forrester JV, Xu H, Kuffová L, Dick AD, y McMenamin PG, 2010. «Dendritic cell physiology and function in the eye». *Immunological Reviews*, 234(1): 282-304.

Fraga CG, Croft KD, Kennedy DO, y Tomás-Barberán FA, 2019. «The Effects of Polyphenols and Other Bioactives on Human Health». *Food & Function*, 10(2): 514-28.

Frank RN, 2004. «Diabetic Retinopathy». *New England Journal of Medicine*, 350(1): 48-58.

Frey T, y Antonetti DA, 2011. «Alterations to the Blood-Retinal Barrier in Diabetes: Cytokines and Reactive Oxygen Species». *Antioxidants & Redox Signaling*, 15(5): 1271-84.

Frijhoff J, Winyard PG, Zarkovic N, Davies SS, Stocker R, Chenget D, et al., 2015. «Clinical Relevance of Biomarkers of Oxidative Stress». *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(14): 1144-70.

- Fuendjiep V, Wandji J, Tillequin F, Mulholland DA, Budzikiewicz H, Fomum ZT, et al., 2002. «Chalconoid and Stilbenoid Glycosides from *Guibourtia Tessmanii*». *Phytochemistry*, 60(8): 803-6.
- Ganea E, y Harding JJ, 2006. «Glutathione-Related Enzymes and the Eye». *Current Eye Research*, 31(1): 1-11.
- García-Flores, LA, Medina S, Martínez-Hernández P, Oger C, Galano JM, Durand T, et al., 2017. «Snapshot Situation of Oxidative Degradation of the Nervous System, Kidney, and Adrenal Glands Biomarkers-Neuroprostane and Dihomo-Isoprostanes-Urinary Biomarkers from Infancy to Elderly Adults». *Redox Biology*, 11: 586-91.
- Giacco F, y Brownlee M, 2010. «Oxidative Stress and Diabetic Complications». *Circulation Research*, 107(9): 1058-70.
- Giri B, Dey S, Das T, Sarkar M, Banerjee J, y Dash SK, 2018. «Chronic Hyperglycemia Mediated Physiological Alteration and Metabolic Distortion Leads to Organ Dysfunction, Infection, Cancer Progression and Other Pathophysiological Consequences: An Update on Glucose Toxicity». *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 107: 306-28.
- Go YM, y Jones DP, 2013. «Thiol/Disulfide Redox States in Signaling and Sensing». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 48(2): 173-81.
- Gogg S, Smith U, y Jansson PA, 2009. «Increased MAPK Activation and Impaired Insulin Signaling in Subcutaneous Microvascular Endothelial Cells in Type 2 Diabetes: The Role of Endothelin-1». *Diabetes*, 58(10): 2238-45.
- Gologorsky D, Thanos A, y Vavvas D, 2012. «Therapeutic Interventions against Inflammatory and Angiogenic Mediators in Proliferative Diabetic Retinopathy». *Mediators of Inflammation*, 2012: e629452.
- Gómez-Ulla F, Fernandez MI, Gonzalez F, Rey P, Rodriguez M, Rodriguez-Cid MJ, et al., 2002. «Digital Retinal Images and Teleophthalmology for Detecting and Grading Diabetic Retinopathy». *Diabetes Care*, 25(8): 1384-89.

- Gong Q, Xie J, Liu Y, Li Y, y Su G, 2017. «Differentially Expressed MicroRNAs in the Development of Early Diabetic Retinopathy». *Journal of Diabetes Research*, 2017: 4727942.
- Gong Q, y Su G, 2017. «Roles of MiRNAs and Long Noncoding RNAs in the Progression of Diabetic Retinopathy». *Bioscience Reports*, 37(6).
- Gonos ES, Kapetanou M, Sereikaite J, Bartosz G, Naparło K, Grzesiket M, et al., 2018. «Origin and pathophysiology of protein carbonylation, nitration and chlorination in age-related brain diseases and aging». *Aging (Albany NY)*, 10(5): 868-901.
- Grossniklaus HE, Kang JS, y Berglin L, 2010. «Animal Models of Choroidal and Retinal Neovascularization». *Progress in Retinal and Eye Research*, 29(6): 500-519.
- Guasch-Ferré M, Merino J, Sun Q, Fitó M, y Salas-Salvadó J, 2017. «Dietary Polyphenols, Mediterranean Diet, Prediabetes, and Type 2 Diabetes: A Narrative Review of the Evidence». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 6723931.
- Hammes HP, 2018. «Diabetic Retinopathy: Hyperglycaemia, Oxidative Stress and Beyond». *Diabetologia*, 61(1): 29-38.
- Han X, Shen T, y Lou H, 2007. «Dietary Polyphenols and Their Biological Significance». *International Journal of Molecular Sciences*, 8(9): 950-88.
- Hannan PA, Khan JA, Ullah I, y Ullah S, 2016. «Synergistic Combinatorial Antihyperlipidemic Study of Selected Natural Antioxidants; Modulatory Effects on Lipid Profile and Endogenous Antioxidants». *Lipids in Health and Disease*, 15: 151.
- Hartnett ME, Martiniuk D, Byfield G, Geisen P, Zeng G, y Bautch VL, 2008. «Neutralizing VEGF Decreases Tortuosity and Alters Endothelial Cell Division Orientation in Arterioles and Veins in a Rat Model of ROP: Relevance to plus Disease». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 49(7): 3107-14.
- Haskins K, Bradley B, Powers K, Fadok V, Flores S, Ling X, et al., 2003. «Oxidative Stress in Type 1 Diabetes». *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1005: 43-54.

- Hecker M, y Wagner, AH 2018. «Role of Protein Carbonylation in Diabetes». *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 41(1): 29-38.
- Heintz, E, Wiréhn AB, Peebo BB, Rosenqvist U, y Levin LA, 2010. «Prevalence and Healthcare Costs of Diabetic Retinopathy: A Population-Based Register Study in Sweden». *Diabetologia*, 53(10): 2147-54.
- Helbig H, 2007. «Surgery for Diabetic Retinopathy». *International Journal of Ophthalmology*, 221(2): 103-11.
- Hendrick AM, Gibson MV, y Kulshreshtha A, 2015. «Diabetic Retinopathy». *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 42(3): 451-64.
- Heng LZ, Comyn O, Peto T, Tadros C, Ng E, Sivaprasad S, Y Hykin PG, 2013. «Diabetic Retinopathy: Pathogenesis, Clinical Grading, Management and Future Developments». *Diabetic Medicine: A Journal of the British Diabetic Association*, 30(6): 640-50.
- Hernández C, Simó-Servat A, Bogdanov P, y Simó R, 2017. «Diabetic Retinopathy: New Therapeutic Perspectives Based on Pathogenic Mechanisms». *Journal of Endocrinological Investigation*, 40(9): 925-35.
- Hougee S, Faber J, Sanders A, de Jong RB, van den Berg WB, Garssen J, et al., 2005. «Selective COX-2 Inhibition by a Pterocarpus Marsupium Extract Characterized by Pterostilbene, and Its Activity in Healthy Human Volunteers». *Planta Medica*, 71(5): 387-92.
- Hu L, Zhang Y, Chen L, Zhou W, Wang Y, y Wen J, 2017. «MAPK and ERK Polymorphisms Are Associated with PCOS Risk in Chinese Women». *Oncotarget*, 8(59): 100261-68.
- IAPB Vision Atlas, 2019. «The Vision Loss Expert Group (VLEG) • IAPB Vision Atlas». <http://atlas.iapb.org/about-vision-atlas/vision-loss-expert-group/> (acceso 28 de junio de 2019).
- Idris I, Gray S, y Donnelly R, 2001. «Protein Kinase C Activation: Isozyme-Specific Effects on Metabolism and Cardiovascular Complications in Diabetes». *Diabetologia*, 44(6): 659-73.
- Ipson BR, y Fisher AL, 2016. «Roles of the Tyrosine Isomers Meta-Tyrosine and Ortho-Tyrosine in Oxidative Stress». *Ageing Research Reviews*, 27: 93-107.

- Ishida S, Usui T, Yamashiro K, Kaji Y, Ahmed E, Carrasquillo KG, et al., 2003. «VEGF164 Is Proinflammatory in the Diabetic Retina». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 44(5): 2155-62.
- Izumi T, Yokota-Hashimoto H, Zhao S, Wang J, Halban PA, y Takeuchi T, 2003. «Dominant Negative Pathogenesis by Mutant Proinsulin in the Akita Diabetic Mouse». *Diabetes*, 52(2): 409-16.
- Janagam DR, Wu L, y Lowe TL, 2017. «Nanoparticles for drug delivery to the anterior segment of the eye». *Advanced drug delivery reviews*, 122: 31-64.
- Jelodar G, Mohammadi M, Akbari A, y Nazifi S, 2020. «Cyclohexane Extract of Walnut Leaves Improves Indices of Oxidative Stress, Total Homocysteine and Lipids Profiles in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats». *Physiological Reports*, 8(1): e14348.
- Jones DR, Keune WJ, Anderson KE, Stephens LR, Hawkins PT, y Divecha N, 2014. «The Hexosamine Biosynthesis Pathway and O-GlcNAcylation Maintain Insulin-Stimulated PI3K-PKB Phosphorylation and Tumour Cell Growth after Short-Term Glucose Deprivation». *The FEBS journal*, 281(16): 3591-3608.
- Jones DP, y Sies H, 2015. «The Redox Code». *Antioxidants & Redox Signaling*, 23(9): 734-46.
- Joseph JA, Fisher DR, Cheng V, Rimando AM, y Shukitt-Hale B, 2008. «Cellular and Behavioral Effects of Stilbene Resveratrol Analogues: Implications for Reducing the Deleterious Effects of Aging». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(22): 10544-51.
- Joussen AM, Smyth N, y Niessen C, 2007. «Pathophysiology of Diabetic Macular Edema». *Developments in Ophthalmology*, 39: 1-12.
- Joy AP, y Cowley EA, 2008. «8-Iso-PGE2 Stimulates Anion Efflux from Airway Epithelial Cells via the EP4 Prostanoid Receptor». *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 38(2): 143-52.
- Kalinina EV, Chernov NN, y Novichkova MD, 2014. «Role of Glutathione, Glutathione Transferase, and Glutaredoxin in Regulation of Redox-Dependent Processes». *Biochemistry. Biokhimiia*, 79(13): 1562-83.

- Kanda A, y Ishida S, 2019. «(Pro)renin receptor: Involvement in diabetic retinopathy and development of molecular targeted therapy». *Journal of Diabetes Investigation*, 10(1): 6-17.
- Kaschina E, Namsolleck P, y Unger T, 2017. «AT2 Receptors in Cardiovascular and Renal Diseases». *Pharmacological Research*, 125(Pt A): 39-47.
- Kaštelan S, Tomić M, Antunica AG, Rabatić JS, y Ljubić S, 2013. «Inflammation and Pharmacological Treatment in Diabetic Retinopathy». *Mediators of Inflammation*, 2013: e213130.
- Kehrer JP, y Klotz LO, 2015. «Free Radicals and Related Reactive Species as Mediators of Tissue Injury and Disease: Implications for Health». *Critical Reviews in Toxicology*, 45(9): 765-98.
- Kharroubi AT, y Darwish HM, 2015. «Diabetes mellitus: The epidemic of the century». *World Journal of Diabetes*, 6(6): 850-67.
- Khasawneh FT, Huang JS, Mir F, Srinivasan S, Tirupathi C, y Le Breton GC, 2008. «Characterization of Isoprostane Signaling: Evidence for a Unique Coordination Profile of 8-Iso-PGF(2alpha) with the Thromboxane A(2) Receptor, and Activation of a Separate CAMP-Dependent Inhibitory Pathway in Human Platelets». *Biochemical Pharmacology*, 75(12): 2301-15.
- Khoddami A, Wilkes MA, y Roberts TH, 2013. «Techniques for Analysis of Plant Phenolic Compounds». *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(2): 2328-75.
- Khuthaila MK, Hsu J, Chiang A, DeCroos FC, Milder EA, Setlur V, et al., 2013. «Postoperative Vitreous Hemorrhage after Diabetic 23-Gauge Pars Plana Vitrectomy». *American Journal of Ophthalmology*, 155(4): 757-63, 763.e1-2.
- Kim JH, Kim JH, Yu YS, Cho CS, y Kim KW, 2009. «Blockade of Angiotensin II Attenuates VEGF-Mediated Blood-Retinal Barrier Breakdown in Diabetic Retinopathy». *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 29(3): 621-28.

- Kim SJ, Toma HS, Barnett JM, y Penn JS, 2010. «Ketorolac Inhibits Choroidal Neovascularization by Suppression of Retinal VEGF». *Experimental Eye Research*, 91(4): 537-43.
- Kim Y, Keogh JB, y Clifton PM, 2016. «Polyphenols and Glycemic Control». *Nutrients*, 8(1).
- Kisic B, Miric D, y Zoric L, 2014. «Free Radical Biology of Eye Diseases». En *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*, ed. Ismail Laher. Berlin, Heidelberg: Springer, 3599-3623.
- Knight AR, Taylor EL, Lukaszewski R, Jensen KT, Jones HE, Carréet JE, et al., 2018. «A High-Sensitivity Electrochemiluminescence-Based ELISA for the Measurement of the Oxidative Stress Biomarker, 3-Nitrotyrosine, in Human Blood Serum and Cells». *Free Radical Biology and Medicine*, 120: 246-54.
- Kolb H, Fernandez E, y Nelson R, eds. 1995. *Webvision: The Organization of the Retina and Visual System*. Salt Lake City (UT): University of Utah Health Sciences Center.
- Kompella UB, Kadam RS, y Lee VHL, 2010. «Recent advances in ophthalmic drug delivery». *Therapeutic Delivery*, 1(3): 435-56.
- Koopman WJH, Nijtmans LGJ, Dieteren CEJ, Roestenberg P, Valsecchi F, Smeitink JAM, et al., 2010. «Mammalian Mitochondrial Complex I: Biogenesis, Regulation, and Reactive Oxygen Species Generation». *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(12): 1431-70.
- Kosuru R, Kandula V, Rai U, Prakash S, Xia Z, y Singh S, 2018. «Pterostilbene Decreases Cardiac Oxidative Stress and Inflammation via Activation of AMPK/Nrf2/HO-1 Pathway in Fructose-Fed Diabetic Rats». *Cardiovascular Drugs and Therapy*, 32(2): 147-63.
- Kowluru RA, y Kennedy A, 2001. «Therapeutic Potential of Anti-Oxidants and Diabetic Retinopathy». *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 10(9): 1665-76.
- Kowluru RA, 2003. «Effect of Reinstitution of Good Glycemic Control on Retinal Oxidative Stress and Nitrate Stress in Diabetic Rats». *Diabetes*, 52(3): 818-23.

- Kowluru RA, y Mishra M, 2015. «Oxidative Stress, Mitochondrial Damage and Diabetic Retinopathy». *Biochimica et Biophysica Acta*, 1852(11): 2474-83.
- Kroon, PA, Clifford MN, Crozier A, Day AJ, Donovan JL, Manach C, et al., 2004. «How Should We Assess the Effects of Exposure to Dietary Polyphenols in Vitro?» *The American Journal of Clinical Nutrition*, 80(1): 15-21.
- Kubo Y, Akanuma S, y Hosoya K, 2018. «Recent advances in drug and nutrient transport across the blood-retinal barrier». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 14(5): 513-31.
- Kumar B, Gupta SK, Saxena R, y Srivastava S, 2012. «Current Trends in the Pharmacotherapy of Diabetic Retinopathy». *Journal of Postgraduate Medicine*, 58(2): 132.
- Kumar S, Singh R, Vasudeva N, y Sharma S, 2012. «Acute and Chronic Animal Models for the Evaluation of Anti-Diabetic Agents». *Cardiovascular Diabetology*, 11: 9.
- Kuno N, y Fujii S, 2010. «Biodegradable Intraocular Therapies for Retinal Disorders». *Drugs & Aging*, 27(2): 117-34.
- Kur J, Newman EA, y Chan-Ling T, 2012. «Cellular and Physiological Mechanisms Underlying Blood Flow Regulation in the Retina and Choroid in Health and Disease». *Progress in Retinal and Eye Research*, 31(5): 377-406.
- de La Torre A, Lee YY, Oger C, Sangild PT, Durand T, Lee JCY, et al., 2014. «Synthesis, Discovery, and Quantitation of Dihomo-Isosofurans: Biomarkers for in Vivo Adrenic Acid Peroxidation». *Angewandte Chemie (International Ed. in English)*, 53(24): 6249-52.
- Lahey JM, Francis RR, y Kearney JJ, 2003. «Combining Phacoemulsification with Pars Plana Vitrectomy in Patients with Proliferative Diabetic Retinopathy: A Series of 223 Cases». *Ophthalmology*, 110(7): 1335-39.
- Lai AKW, y Lo ACY, 2013. «Animal Models of Diabetic Retinopathy: Summary and Comparison». *Journal of Diabetes Research*, 2013: 106594.
- Langcake P, Cornford CA, y Pryce RJ, 1979. «Identification of Pterostilbene as a Phytoalexin from *Vitis Vinifera* Leaves». *Phytochemistry*, 18(6): 1025-27.

- Lb T, Penrose MA, O'Shea JE, Lai CM, Rakoczy EP, y Dunlop SA, 2008. «VEGF-Induced Choroidal Damage in a Murine Model of Retinal Neovascularisation». *The British journal of ophthalmology*, 92(6):832-8.
- Lee HS, Jun JH, Jung EH, Koo BA, y Kim YS, 2014. «Epigallocatechin-3-gallate Inhibits Ocular Neovascularization and Vascular Permeability in Human Retinal Pigment Epithelial and Human Retinal Microvascular Endothelial Cells via Suppression of MMP-9 and VEGF Activation». *Molecules*, 19(8): 12150-72.
- Lee H, Lee M, Chung H, y Kim HC, 2018. «QUANTIFICATION OF RETINAL VESSEL TORTUOSITY IN DIABETIC RETINOPATHY USING OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY ANGIOGRAPHY». *Retina*, 38(5): 976-85.
- Lee JM, y Johnson JA, 2004. «An Important Role of Nrf2-ARE Pathway in the Cellular Defense Mechanism». *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 37(2): 139-43.
- Lee M, Yun S, Lee H, y Yang J, 2017. «Quercetin Mitigates Inflammatory Responses Induced by Vascular Endothelial Growth Factor in Mouse Retinal Photoreceptor Cells through Suppression of Nuclear Factor Kappa B». *International Journal of Molecular Sciences*, 18(11): 2497.
- Lee R, Wong TY, y Sabanayagam C, 2015. «Epidemiology of diabetic retinopathy, diabetic macular edema and related vision loss». *Eye and Vision*, 2(1): 17.
- Lenzen S, 2008. «The Mechanisms of Alloxan- and Streptozotocin-Induced Diabetes». *Diabetologia*, 51(2): 216-26.
- Li C, Miao X, Li F, Wang S, Liu Q, Wang Y, et al., 2017. «Oxidative Stress-Related Mechanisms and Antioxidant Therapy in Diabetic Retinopathy». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 9702820.
- Li J, Yu S, Ying J, Shi T, y Wang P, 2017. «Resveratrol Prevents ROS-Induced Apoptosis in High Glucose-Treated Retinal Capillary Endothelial Cells via the Activation of AMPK/Sirt1/PGC-1 α Pathway». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 7584691.

- Li T, Hu J, Shanshan D, Chen Y, Wang S, y Wu Q, 2014. «ERK1/2/COX-2/PGE2 Signaling Pathway Mediates GPR91-Dependent VEGF Release in Streptozotocin-Induced Diabetes». *Molecular Vision*, 20: 1109-21.
- Lismont C, Nordgren M, Van Veldhoven PP, y Fransen M, 2015. «Redox Interplay between Mitochondria and Peroxisomes». *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 3: 35.
- Liu, A, Chang J, Lin Y, Shen Z, y Bernstein PS, 2010. «Long-Chain and Very Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Ocular Aging and Age-Related Macular Degeneration». *Journal of Lipid Research*, 51(11): 3217-29.
- Liu L, y Liu X, 2019. «Roles of Drug Transporters in Blood-Retinal Barrier». *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1141: 467-504.
- Liu TS, Pei YH, Peng YP, Chen J, Jiang SS, y Gong JB, 2014. «Oscillating High Glucose Enhances Oxidative Stress and Apoptosis in Human Coronary Artery Endothelial Cells». *Journal of Endocrinological Investigation*, 37(7): 645-51.
- Lobo V, Patil A, Phatak A, y Chandra N, 2010. «Free Radicals, Antioxidants and Functional Foods: Impact on Human Health». *Pharmacognosy Reviews*, 4(8): 118-26.
- Longmire AW, Roberts LJ, y Morrow JD, 1994. «Actions of the E2-Isoprostane, 8-ISO-PGE2, on the Platelet Thromboxane/Endoperoxide Receptor in Humans and Rats: Additional Evidence for the Existence of a Unique Isoprostane Receptor». *Prostaglandins*, 48(4): 247-56.
- Lopez-Bastida J, Boronat M, Oliva-Moreno J, y Schurer W, 2013. «Costs, outcomes and challenges for diabetes care in Spain». *Globalization and Health*, 9: 17.
- Lorenzi M, 2007. «The Polyol Pathway as a Mechanism for Diabetic Retinopathy: Attractive, Elusive, and Resilient». *Experimental Diabetes Research* 2007: 61038.
- Lv P, Yu J, Xu X, Lu T, y Xu F, 2019. «Eriodictyol Inhibits High Glucose-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Retinal Ganglial Cells». *Journal of Cellular Biochemistry*, 120(4): 5644-51.

- Mahajan N, Arora P, y Sandhir R, 2019. «Perturbed Biochemical Pathways and Associated Oxidative Stress Lead to Vascular Dysfunctions in Diabetic Retinopathy». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2019: 8458472.
- Maheshwary AS, Oster SF, Yuson RMS, Cheng L, Mojana F, Freeman WR, 2010. «The Association between Percent Disruption of the Photoreceptor Inner Segment-Outer Segment Junction and Visual Acuity in Diabetic Macular Edema». *American Journal of Ophthalmology*, 150(1): 63-67.e1.
- Manigrasso MB, Juranek J, Ramasamy R, y Schmidt AM, 2014. «Unlocking the Biology of RAGE in Diabetic Microvascular Complications». *Trends in endocrinology and metabolism*, 25(1): 15-22.
- Manning BD, y Toker A, 2017. «AKT/PKB Signaling: Navigating the Network». *Cell*, 169(3): 381-405.
- Mansour SE, Browning DJ, Wong K, Flynn Jr HW, y Bhavsar AR, 2020. «The Evolving Treatment of Diabetic Retinopathy». *Clinical Ophthalmology*, 14: 653-78.
- Margetis, PI, Antonelou MH, Petropoulos IK, Margaritis LH, y Papassideri IS, 2009. «Increased Protein Carbonylation of Red Blood Cell Membrane in Diabetic Retinopathy». *Experimental and Molecular Pathology*, 87(1): 76-82.
- Marrocco I, Altieri F, y Peluso I, 2017. «Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: e6501046.
- Martínez-Leo EE, y Segura-Campos MR, 2019. «Systemic Oxidative Stress: A Key Point in Neurodegeneration — A Review». *The journal of nutrition, health & aging*, 23(8): 694-99.
- Matayatsuk C, Poljak A, Bustamante S, Smythe GA, Kalpravidh RW, Sirankapracha P, et al., 2007. «Quantitative Determination of Ortho- and Meta-Tyrosine as Biomarkers of Protein Oxidative Damage in Beta-Thalassemia.» *Redox Report: Communications in Free Radical Research*, 12(5): 219-28.

- Mauer M, Zinman B, Gardiner R, Suissa S, Sinaiko A, Strand T, et al., 2009. «Renal and Retinal Effects of Enalapril and Losartan in Type 1 Diabetes». *The New England Journal of Medicine*, 361(1): 40-51.
- Maurya R, Singh R, Deepak M, Handa SS, Yadav PP, y Mishra PK, 2004. «Constituents of Pterocarpus Marsupium: An Ayurvedic Crude Drug». *Phytochemistry*, 65(7): 915-20.
- Mehrzadi S, Hemati K, Reiter RJ, y Hosseinzadeh A, 2020. «Mitochondrial Dysfunction in Age-Related Macular Degeneration: Melatonin as a Potential Treatment». *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 24(4): 359-78.
- Mena S, Rodríguez ML, Ponsoda X, Estrela JM, Jäätela M, y Ortega AL, 2012. «Pterostilbene-Induced Tumor Cytotoxicity: A Lysosomal Membrane Permeabilization-Dependent Mechanism». *PLoS One*, 7(9): e44524.
- Millán I, Piñero-Ramos JD, Lara I, Parra-Llorca A, Torres-Cuevas I, y Vento M, 2018. «Oxidative Stress in the Newborn Period: Useful Biomarkers in the Clinical Setting». *Antioxidants*, 7(12): 193.
- Milne, GL, Musiek ES, y Morrow JD, 2005. «F2-Isoprostanes as Markers of Oxidative Stress in Vivo: An Overview». *Biomarkers: Biochemical Indicators of Exposure, Response, and Susceptibility to Chemicals*, 10 (1): S10-23.
- Mohamed Q, Gillies MC, y Wong TY, 2007. «Management of Diabetic Retinopathy: A Systematic Review». *JAMA*, 298(8): 902-16.
- Montezano AC, Cat AND, Rios FJ, y Touyz RM, 2014. «Angiotensin II and Vascular Injury». *Current Hypertension Reports*, 16(6): 431.
- Morgan PE, Pattison DI, y Davies MJ, 2012. «Quantification of Hydroxyl Radical-Derived Oxidation Products in Peptides Containing Glycine, Alanine, Valine, and Proline». *Free Radical Biology & Medicine*, 52(2): 328-39.
- Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, and Roberts 2nd LJ, 1990. «A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism.» *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(23): 9383-87.

- Morrow JD, Minton TA, Mukundan CR, Campbell MD, Zackert WE, Daniel VC, 1994. «Free Radical-Induced Generation of Isoprostanes in Vivo. Evidence for the Formation of D-Ring and E-Ring Isoprostanes». *The Journal of Biological Chemistry*, 269(6): 4317-26.
- Morrow JD, Minton TA, y Roberts LJ, 1992. «The F2-Isoprostane, 8-Epi-Prostaglandin F2 Alpha, a Potent Agonist of the Vascular Thromboxane/Endoperoxide Receptor, Is a Platelet Thromboxane/Endoperoxide Receptor Antagonist». *Prostaglandins*, 44(2): 155-63.
- Muñoz de Escalona-Rojas JE, Quereda-Castañeda A, y García-García O, 2016. «Actualización de la retinopatía diabética para médicos de atención primaria: hacia una mejora de la medicina telemática». *Medicina de Familia. SEMERGEN*, 42(3): 172-76.
- Nag TC, Kathpalia P, Gorla S, y Wadhwa S, 2019. «Localization of Nitro-Tyrosine Immunoreactivity in Human Retina». *Annals of Anatomy*, 223: 8-18.
- Nagai N, Izumi-Nagai K, Oike Y, Koto T, Satofuka S, y Ozawa Y, 2007. «Suppression of Diabetes-Induced Retinal Inflammation by Blocking the Angiotensin II Type 1 Receptor or Its Downstream Nuclear Factor-KappaB Pathway». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 48(9): 4342-50.
- Nagineeni CN, Raju R, Nagineeni KK, Kommineni VK, Cherukuri A, Kutty KR, et al., 2014. «Resveratrol Suppresses Expression of VEGF by Human Retinal Pigment Epithelial Cells: Potential Nutraceutical for Age-related Macular Degeneration». *Aging and Disease*, 5(2): 88-100.
- Nakagami Y, 2016. «Nrf2 Is an Attractive Therapeutic Target for Retinal Diseases». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016: 7469326.
- Nakajima T, Roggia MF, Noda Y, y Ueta T, 2015. «EFFECT OF INTERNAL LIMITING MEMBRANE PEELING DURING VITRECTOMY FOR DIABETIC MACULAR EDEMA: Systematic Review and Meta-Analysis». *Retina (Philadelphia, Pa.)*, 35(9): 1719-25.
- Naylor A, Hopkins A, Hudson N, y Campbell M, 2019. «Tight Junctions of the Outer Blood Retina Barrier». *International Journal of Molecular Sciences*, 21(1): 211.

- Nejad C, Stunden HJ, y Gantier MP, 2018. «A Guide to MiRNAs in Inflammation and Innate Immune Responses». *The FEBS journal*, 285(20): 3695-3716.
- Nguyen G, Delarue F, Burcklé C, Bouzahir L, Giller T, y Sraer JD, 2002. «Pivotal Role of the Renin/Prorenin Receptor in Angiotensin II Production and Cellular Responses to Renin». *The Journal of Clinical Investigation*, 109(11): 1417-27.
- Nguyen G, y Muller DN, 2010. «The Biology of the (pro)Renin Receptor». *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 21(1): 18-23.
- Niven JE, y Laughlin SB, 2008. «Energy Limitation as a Selective Pressure on the Evolution of Sensory Systems». *The Journal of Experimental Biology*, 211(11): 1792-1804.
- Njie-Mbye YF, Kulkarni-Chitnis M, Opere CA, Barrett A, y Ohia SE, 2013. «Lipid Peroxidation: Pathophysiological and Pharmacological Implications in the Eye». *Frontiers in Physiology*, 4: 366.
- Noh H, y King GL, 2007. «The Role of Protein Kinase C Activation in Diabetic Nephropathy». *Kidney International. Supplement*, (106): S49-53.
- Nordwall M, Abrahamsson M, Dhir M, Fredrikson M, Ludvigsson J, Arnqvist HJ, 2015. «Impact of HbA1c, Followed from Onset of Type 1 Diabetes, on the Development of Severe Retinopathy and Nephropathy: The VISS Study (Vascular Diabetic Complications in Southeast Sweden)». *Diabetes Care* 38(2): 308-15.
- Ola MS, Ahmed MM, Shams S, y Al-Rejaie SS, 2017. «Neuroprotective effects of quercetin in diabetic rat retina». *Saudi Journal of Biological Sciences*, 24(6): 1186-94.
- Ola MS, Nawaz MI, Siddiquei MM, Al-Amor S, y El-Asrar AMA, 2012. «Recent Advances in Understanding the Biochemical and Molecular Mechanism of Diabetic Retinopathy». *Journal of Diabetes and its Complications*, 26(1): 56-64.
- Olivares AM, Althoff K, Chen GF, Wu S, Morrisson MA, DeAngeliset MM, et al., 2017. «Animal Models of Diabetic Retinopathy». *Current Diabetes Reports*, 17(10): 93.

- ONCE, 2019. «Datos visuales y sociodemográficos de los afiliados a la ONCE». <http://www.once.es/new/afiliacion/datos-estadisticos> (acceso 21 de mayo de 2020).
- Padiya R, Chowdhury D, Borkar R, Srinivas R, Bhadra MP, y Banerjee SK, 2014. «Garlic Attenuates Cardiac Oxidative Stress via Activation of PI3K/AKT/Nrf2-Keap1 Pathway in Fructose-Fed Diabetic Rat». *PloS One*, 9(5): e94228.
- Pan HZ, Zhang H, Chang D, Li H, Sui H, 2008. «The Change of Oxidative Stress Products in Diabetes Mellitus and Diabetic Retinopathy». *The British Journal of Ophthalmology*, 92(4): 548-51.
- Parsamanesh N, Moossavi M, Bahrami A, Butler AE, y Sahebkar A, 2018. «Therapeutic Potential of Curcumin in Diabetic Complications». *Pharmacological Research*, 136: 181-93.
- Patel VB, Zhong JC, Grant MB, y Oudit GY, 2016. «Role of the ACE2/Angiotensin 1-7 Axis of the Renin-Angiotensin System in Heart Failure». *Circulation Research*, 118(8): 1313-26.
- Pattison DI, Davies MJ, y Hawkins CL, 2012. «Reactions and Reactivity of Myeloperoxidase-Derived Oxidants: Differential Biological Effects of Hypochlorous and Hypothiocyanous Acids». *Free Radical Research*, 46(8): 975-95.
- Pedro-Botet J, Benaiges D, y Pedragosa A, 2012. «Dislipidemia diabética, macro y microangiopatía». *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 24(6): 299-305.
- Pennathur S, Ido Y, Heller JI, Byun J, Danda R, Pergola P, et al., 2005. «Reactive Carbonyls and Polyunsaturated Fatty Acids Produce a Hydroxyl Radical-like Species: A Potential Pathway for Oxidative Damage of Retinal Proteins in Diabetes». *The Journal of Biological Chemistry*, 280(24): 22706-14.
- Peña-Bautista C, Carrascosa-Marco P, Oger C, Vigor C, Galano JM, Durand T, et al., 2019. «Validated Analytical Method to Determine New Salivary Lipid Peroxidation Compounds as Potential Neurodegenerative Biomarkers». *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 164: 742-49.

- Peña-Bautista C, Álvarez L, Durand T, Vigor C, Cuevas A, Baquero M, et al., 2020. «Clinical Utility of Plasma Lipid Peroxidation Biomarkers in Alzheimer's Disease Differential Diagnosis». *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(8): 649.
- Pezet R, y Pont V, 1988. «Identification of perostilbene in grape berries of *Vitis vinifera*». *Plant Physiology and Biochemistry (France)*, 26(5): 603-7.
- Pisoschi AM, y Pop a, 2015. «The Role of Antioxidants in the Chemistry of Oxidative Stress: A Review». *European Journal of Medicinal Chemistry*, 97: 55-74.
- Purves D, Augustine GJ, Fitzpatrick D, Katz LC, LaMantia AS, J McNamaraet JO, et al., 2001. «The Retina». *Neuroscience. 2nd edition*.
- Quiram PA, Gonzales CR, y Schwartz SD, 2006. «Severe Steroid-Induced Glaucoma Following Intravitreal Injection of Triamcinolone Acetonide». *American Journal of Ophthalmology*, 141(3): 580-82.
- Radi R, 2018. «Oxygen radicals, nitric oxide, and peroxynitrite: Redox pathways in molecular medicine». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(23): 5839-48.
- Ramakrishna V, y Jaikhani R, 2007. «Evaluation of Oxidative Stress in Insulin Dependent Diabetes Mellitus (IDDM) Patients». *Diagnostic Pathology*, 2: 22.
- Ray PD, Huang BW, y Tsuji Y, 2012. «Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling». *Cellular signalling*, 24(5): 981-90.
- Reinisalo M, Kårlund A, Koskela A, Kaarniranta K, y Karjalainen RO, 2015. «Polyphenol Stilbenes: Molecular Mechanisms of Defence against Oxidative Stress and Aging-Related Diseases». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2015: 340520.
- Riche DM, McEwen CL, Riche KD, Sherman JJ, Wofford MR, Deschamp D, et al., 2013. «Analysis of Safety from a Human Clinical Trial with Pterostilbene». *Journal of Toxicology*, 2013: 463595.
- Rienks J, Barbaresko J, Oluwagbemigun K, Schmid M, y Nöthlings U, 2018. «Polyphenol Exposure and Risk of Type 2 Diabetes: Dose-Response

Meta-Analyses and Systematic Review of Prospective Cohort Studies». *The American Journal of Clinical Nutrition*, 108(1): 49-61.

Rimando AM, Cuendet M, Desmarchelier C, Mehta RG, Pezzuto JM, y Duke SO, 2002. «Cancer Chemopreventive and Antioxidant Activities of Pterostilbene, a Naturally Occurring Analogue of Resveratrol». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(12): 3453-57.

Roberts 2nd LJ, Montine TJ, Markesbery WR, Tapper AR, Hardy P, Chemtob S, et al., 1998. «Formation of Isoprostane-like Compounds (Neuroprostanes) in Vivo from Docosahexaenoic Acid». *The Journal of Biological Chemistry*, 273(22): 13605-12.

Robinson R, Barathi VA, Chaurasia SS, Wong TY, y Kern TS, 2012. «Update on Animal Models of Diabetic Retinopathy: From Molecular Approaches to Mice and Higher Mammals». *Disease Models & Mechanisms*, 5(4): 444-56.

Robledinos-Antón N, Fernández-Ginés R, Manda G, y Cuadrado A, 2019. «Activators and Inhibitors of NRF2: A Review of Their Potential for Clinical Development». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 9372182.

Rodríguez ML, Pérez S, Mena-Mollá S, Desco MC, Ortega AL, 2019. «Oxidative Stress and Microvascular Alterations in Diabetic Retinopathy: Future Therapies». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019: 4940825.

Rodríguez M, 2014. Pterostilbeno, un polifenol natural con efectos antitumorales mediados por la permeabilización de la membrana lisosomal (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.

Romero-Aroca P, Sagarra-Alamo R, Pareja-Rios A, y López M, 2015. «Importance of telemedicine in diabetes care: Relationships between family physicians and ophthalmologists». *World Journal of Diabetes*, 6(8): 1005-8.

Rossino MG, y Casini G, 2019. «Nutraceuticals for the Treatment of Diabetic Retinopathy». *Nutrients*, 11(4): 771.

- Rossino MG, Dal Monte M, y Casini G, 2019. «Relationships Between Neurodegeneration and Vascular Damage in Diabetic Retinopathy». *Frontiers in Neuroscience*, 13: 1172.
- Rowlands J, Heng J, Newsholme P, y Carlessi R, 2018. «Pleiotropic Effects of GLP-1 and Analogs on Cell Signaling, Metabolism, and Function». *Frontiers in Endocrinology*, 9: 672.
- Ruiz MJ, Fernández M, Picó Y, Mañes J, Asensi M, Cardaet C, et al., 2009. «Dietary Administration of High Doses of Pterostilbene and Quercetin to Mice Is Not Toxic». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(8): 3180-86.
- Ruiz-García A, Arranz-Martínez E, García-Álvarez J, García-Fernández ME, Palacios-Martínez D, Montero-Costa A, et al., 2019. «Prevalencia de diabetes mellitus en el ámbito de la atención primaria española y su asociación con factores de riesgo cardiovascular y enfermedades cardiovasculares. Estudio SIMETAP-DM». *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 32(1): 15-26.
- Ruiz-Ramos M, Escolar-Pujolar A, Mayoral-Sánchez E, Corral-San Laureano F, y Fernández-Fernández I, 2006. «La diabetes mellitus en España: mortalidad, prevalencia, incidencia, costes económicos y desigualdades». *Gaceta Sanitaria*, 20 (1): 15-24.
- Safi SZ, Qvist R, Kumar S, Batumalaie K, y Bin Ismail IS, 2014. «Molecular Mechanisms of Diabetic Retinopathy, General Preventive Strategies, and Novel Therapeutic Targets». *BioMed Research International*, 2014: 801269.
- Samaha MM, Said E, y Salem HA, 2019. «A Comparative Study of the Role of Crocin and Sitagliptin in Attenuation of STZ-Induced Diabetes Mellitus and the Associated Inflammatory and Apoptotic Changes in Pancreatic β -Islets». *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 72: 103238.
- Santiago AR, Boia R, Aires ID, Ambrósio AF, y Fernandes R, 2018. «Sweet Stress: Coping With Vascular Dysfunction in Diabetic Retinopathy». *Frontiers in Physiology*, 9: 820.

- Sasongko MB, Wong TY, Nguyen TT, Cheung CY, Shaw JE, y Wang JJ, 2011. «Retinal Vascular Tortuosity in Persons with Diabetes and Diabetic Retinopathy». *Diabetologia*, 54(9): 2409-16.
- Sasongko MB, Wong TY, Nguyen TT, Cheung CY, Shaw JE, Kawasaki R, et al., 2016. «Retinal Vessel Tortuosity and Its Relation to Traditional and Novel Vascular Risk Markers in Persons with Diabetes». *Current Eye Research*, 41(4): 551-57.
- Scanlon PH, 2015. «Diabetic retinopathy». *Medicine*, 43(1): 13-19.
- Schoenberger SD, Kim SJ, Sheng J, Rezaei KA, Lalezary M, y Cherney E, 2012. «Increased Prostaglandin E2 (PGE2) Levels in Proliferative Diabetic Retinopathy, and Correlation with VEGF and Inflammatory Cytokines». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 53(9): 5906-11.
- Selvam S, Kumar T, y Fruttiger M, 2018. «Retinal Vasculature Development in Health and Disease». *Progress in Retinal and Eye Research*, 63: 1-19.
- Semeraro F, Morescalchi F, Cancarini A, Russo A, Rezzola S, y Costagliola C, 2019. «Diabetic Retinopathy, a Vascular and Inflammatory Disease: Therapeutic Implications». *Diabetes & Metabolism*, 45(6): 517-27.
- Seshadri TR, 1972. «Polyphenols of Pterocarpus and Dalbergia Woods». *Phytochemistry*, 11(3): 881-98.
- Shafabakhsh R, Aghadavod E, Mobini M, Heidari-Soureshjani R, y Asemi Z, 2019. «Association between MicroRNAs Expression and Signaling Pathways of Inflammatory Markers in Diabetic Retinopathy». *Journal of Cellular Physiology*, 234(6): 7781-87.
- Sharma T, Fong A, Lai TY, Lee V, Das S, y Lam D, 2016. «Surgical Treatment for Diabetic Vitreoretinal Diseases: A Review». *Clinical & Experimental Ophthalmology* 44(4): 340-54.
- Shaw P, y Chattopadhyay A, 2020. «Nrf2-ARE Signaling in Cellular Protection: Mechanism of Action and the Regulatory Mechanisms». *Journal of Cellular Physiology*, 235(4): 3119-30.
- Shen H, y Rong H, 2015. «Pterostilbene Impact on Retinal Endothelial Cells under High Glucose Environment». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 8(10): 12589.

- Shrote AP, y Diagavane S, 2015. «Clinical Evaluation of Correlation Between Diabetic Retinopathy with Modifiable, Non-Modifiable and Other Independent Risk Factors in Tertiary Set-up in Central Rural India». *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 9(10): NC10-14.
- Sies H, Berndt C, y Jones DP, 2017. «Oxidative Stress». *Annual Review of Biochemistry*, 86(1): 715-48.
- Signorini C, De Felice C, Galano JM, Oger C, Leoncini S, Cortelazzoet A, et al., 2018. «Isoprostanoids in Clinical and Experimental Neurological Disease Models». *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 7(7): 88.
- Silva KC, Rosales MAB, Hamassaki DE, Saito KC, Faria AM, Ribeiro PAO, et al., 2013. «Green Tea Is Neuroprotective in Diabetic Retinopathy». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 54(2): 1325-36.
- Silva VAO, Polesskaya A, Sousa TA, Corrêa VMA, Delgado-André N, Reis RI, et al., 2011. «Expression and Cellular Localization of MicroRNA-29b and RAX, an Activator of the RNA-Dependent Protein Kinase (PKR), in the Retina of Streptozotocin-Induced Diabetic Rats». *Molecular Vision*, 17: 2228-40.
- Simó R, y Hernández C, 2017. «GLP-1R as a Target for the Treatment of Diabetic Retinopathy: Friend or Foe?» *Diabetes*, 66(6): 1453-60.
- Simó-Servat O, Simó R, y Hernández C, 2016. «Circulating Biomarkers of Diabetic Retinopathy: An Overview Based on Physiopathology». *Journal of Diabetes Research*, 2016 (3): 1-13.
- Sin autor, 1991. «Grading Diabetic Retinopathy from Stereoscopic Color Fundus Photographs--an Extension of the Modified Airlie House Classification. ETDRS Report Number 10. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group». 1991. *Ophthalmology*, 98(5): 786-806.
- Singla RK, Dubey AK, Garg A, Sharma RK, Fiorino M, Ameen SM, et al., 2019. «Natural Polyphenols: Chemical Classification, Definition of Classes, Subcategories, and Structures». *Journal of AOAC International*, 102(5): 1397-1400.
- Sirerol JA, Feddi F, Mena S, Rodriguez ML, Sirera S, Aupí M, et al., 2015. «Topical Treatment with Pterostilbene, a Natural Phytoalexin, Effectively

- Protects Hairless Mice against UVB Radiation-Induced Skin Damage and Carcinogenesis». *Free Radical Biology & Medicine*, 85: 1-11.
- Sjølie AK, y Chaturvedi N, 2002. «The Retinal Renin-Angiotensin System: Implications for Therapy in Diabetic Retinopathy». *Journal of Human Hypertension*, 16(3): S42-46.
- Soufi FG, Mohammad-Nejad D, y Ahmadi H, 2012. «Resveratrol Improves Diabetic Retinopathy Possibly through Oxidative Stress - Nuclear Factor KB - Apoptosis Pathway». *Pharmacological reports*, 64(6): 1505-14.
- Souza, JM, Peluffo G, y Radi R, 2008. «Protein Tyrosine Nitration--Functional Alteration or Just a Biomarker?» *Free Radical Biology & Medicine*, 45(4): 357-66.
- Stehouwer CDA, 2018. «Microvascular Dysfunction and Hyperglycemia: A Vicious Cycle With Widespread Consequences». *Diabetes*, 67(9): 1729-41.
- Steinberg SF, 2008. «Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function». *Physiological Reviews*, 88(4): 1341-78.
- Stitt AW, Lois N, Medina RJ, Adamson P, y Curtis TM, 2013. «Advances in Our Understanding of Diabetic Retinopathy». *Clinical Science (London, England: 1979)*, 125(1): 1-17.
- Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, 2016 et al., «The Progress in Understanding and Treatment of Diabetic Retinopathy». *Progress in Retinal and Eye Research*, 51: 156-86.
- Stivala LA, Savio M, Carafoli F, Perucca P, Bianchi L, Maga G, et al., 2001. «Specific Structural Determinants Are Responsible for the Antioxidant Activity and the Cell Cycle Effects of Resveratrol». *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25): 22586-94.
- Strain WD, y Paldánus PM, 2018. «Diabetes, Cardiovascular Disease and the Microcirculation». *Cardiovascular Diabetology*, 17(1): 57.
- Sultan MB, Zhou D, Loftus J, Dombi T, Ice KS, y Macugen 1013 Study Group, 2011. «A Phase 2/3, Multicenter, Randomized, Double-Masked, 2-Year Trial of Pegaptanib Sodium for the Treatment of Diabetic Macular Edema». *Ophthalmology*, 118(6): 1107-18.

- Summanen P, 1989. «Significance of Various Systemic and Ocular Parameters in the Long-Term Prognosis after Diabetic Vitrectomy». *International Ophthalmology*, 13(5): 311-19.
- Sun H, Liu X, Long SR, Wang T, Ge H, Wanget Y, et al., 2019. «Antidiabetic Effects of Pterostilbene through PI3K/Akt Signal Pathway in High Fat Diet and STZ-Induced Diabetic Rats». *European Journal of Pharmacology*, 859: 172526.
- Sun J, y Nan G, 2017. «The extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway in neurological diseases: A potential therapeutic target (Review)». *International Journal of Molecular Medicine*, 39(6): 1338-46.
- Sun L, Huang T, Xu W, Sun J, Lv Y y Wang Y, 2017. «Advanced Glycation End Products Promote VEGF Expression and Thus Choroidal Neovascularization via Cyr61-PI3K/AKT Signaling Pathway». *Scientific Reports*, 7(1): 1-12.
- Sun Y, y Smith LEH, 2018. «Retinal Vasculature in Development and Diseases». *Annual review of vision science*, 4: 101-22.
- Tangvarasittichai O, y Tangvarasittichai S, 2018. «Oxidative Stress, Ocular Disease and Diabetes Retinopathy». *Current Pharmaceutical Design*, 24(40): 4726-41.
- Tanito M, y Anderson R, 2009. «Dual roles of polyunsaturated fatty acids in retinal physiology and pathophysiology associated with retinal degeneration». *Clinical Lipidology*, 4(6): 821-27.
- Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, y Chibber R, 2013. «Pathophysiology of Diabetic Retinopathy». *ISRN Ophthalmology*, 2013: 343560.
- Tastekin B, Pelit A, Polat S, Tuli A, Sencar L, Alparslanet MM, et al., 2018. «Therapeutic Potential of Pterostilbene and Resveratrol on Biomechanic, Biochemical, and Histological Parameters in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats». *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2018.
- Teramoto S, Miyamoto N, Yatomi K, Tanaka Y, Oishi H, Arai H, et al., 2011. «Exendin-4, a Glucagon-like Peptide-1 Receptor Agonist, Provides Neuroprotection in Mice Transient Focal Cerebral Ischemia». *Journal of*

Cerebral Blood Flow and Metabolism: Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 31(8): 1696-1705.

- Torres-Cuevas I, 2017. Efecto del acondicionamiento hipóxico en la respuesta a un insulto hiperóxico en el sistema nervioso central de ratones recién nacidos (Tesis doctoral). Universidad de Valencia, Valencia.
- Testa R, Bonfigli AR, Genovese S, De Nigris V, y Ceriello A, 2016. «The Possible Role of Flavonoids in the Prevention of Diabetic Complications». *Nutrients*, 8(5): 310.
- Thorens B, Porret A, Bühler L, Deng SP, Morel P, y Widmann C, 1993. «Cloning and Functional Expression of the Human Islet GLP-1 Receptor. Demonstration That Exendin-4 Is an Agonist and Exendin-(9-39) an Antagonist of the Receptor». *Diabetes*, 42(11): 1678-82.
- Threatt J, Williamson JF, Huynh K, Davis RM, y Hermayer K, 2013. «Ocular Disease, Knowledge and Technology Applications in Patients with Diabetes». *The American Journal of the Medical Sciences*, 345(4): 266-70.
- Tomi M, y Hosoya K, 2010. «The role of blood–ocular barrier transporters in retinal drug disposition: an overview». *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 6(9): 1111-24.
- Torres-Cuevas I, Kuligowski J, Cárcel M, Cháfer-Pericás C, Asensi M, Solberg R, et al., 2016. «Protein-Bound Tyrosine Oxidation, Nitration and Chlorination by-Products Assessed by Ultrapformance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry». *Analytica Chimica Acta*, 913: 104-10.
- Ullah O, Li Z, Ali I, Xu L, Liu H, Shah SZA, et al., 2019. «Pterostilbene Alleviates Hydrogen Peroxide-Induced Oxidative Stress via Nuclear Factor Erythroid 2 like 2 Pathway in Mouse Preimplantation Embryos». *The Journal of Reproduction and Development*, 65(1): 73-81.
- Urbaniak SK, Boguszewska K, Szewczuk M, Kaźmierczak-Barańska J, y Karwowski BT, 2020. «8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosine (8-oxodG) and 8-Hydroxy-2'-Deoxyguanosine (8-OHdG) as a Potential

- Biomarker for Gestational Diabetes Mellitus (GDM) Development». *Molecules*, 25(1): 202.
- Ushio-Fukai M, y Nakamura Y, 2008. «Reactive Oxygen Species and Angiogenesis: NADPH Oxidase as Target for Cancer Therapy». *Cancer letters*, 266(1): 37-52.
- van Dijk, HW, Verbraak FD, Kok PHB, Garvin MK, Sonka M, Leeet K, et al., 2010. «Decreased Retinal Ganglion Cell Layer Thickness in Patients with Type 1 Diabetes». *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 51(7): 3660-65.
- VanRollins M, Woltjer RL, Yin H, Morrow JD, y Montine TJ, 2008. «F2-Dihomo-Isoprostanes Arise from Free Radical Attack on Adrenic Acid». *Journal of Lipid Research*, 49(5): 995-1005.
- Van't Erve TJ, Lih FB, Jelsema C, Deterding LJ, Eling TE, Mason RP, et al., 2016. «Reinterpreting the Best Biomarker of Oxidative Stress: The 8-Iso-Prostaglandin F2 α /Prostaglandin F2 α Ratio Shows Complex Origins of Lipid Peroxidation Biomarkers in Animal Models». *Free Radical Biology & Medicine*, 95: 65-73.
- Vila L, Viguera J, y Alemán R, 2008. «Artículo especial:declaración de Saint Vincent. Retinopatía diabética y ceguera en España. Epidemiología y prevención». *Endocrinología y Nutrición*, 55(10): 459-75.
- Wang B, Wang F, Zhang Y, Zhao SH, Zhao WJ, Yan SL, et al., 2015. «Effects of RAS Inhibitors on Diabetic Retinopathy: A Systematic Review and Meta-Analysis». *The Lancet. Diabetes & Endocrinology*, 3(4): 263-74.
- Wang BJr, Chiu HW, Lee YL, Li CY, Wang YJ, y Lee YH, 2018. «Pterostilbene Attenuates Hexavalent Chromium-Induced Allergic Contact Dermatitis by Preventing Cell Apoptosis and Inhibiting IL-1 β -Related NLRP3 Inflammasome Activation». *Journal of Clinical Medicine*, 7(12): 489.
- Wang J, Wan R, Mo Y, Zhang Q, Sherwood LC, y Chien S, 2010. «Creating a Long-Term Diabetic Rabbit Model». *Experimental Diabetes Research*, 2010: 289614.
- Wang MH, Hsiao G, y Al-Shabrawey M, 2020. «Eicosanoids and Oxidative Stress in Diabetic Retinopathy». *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 9(6): 520.

- Wang W, y Lo ACY, 2018. «Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments». *International Journal of Molecular Sciences*, 19(6): 1816.
- Wang Y, Wang B, Qi X, Zhang X, y Ren k, 2019. «Resveratrol Protects Against Post-Contrast Acute Kidney Injury in Rabbits With Diabetic Nephropathy». *Frontiers in Pharmacology*, 10: 833.
- Wangsa-Wirawan ND, y Linsenmeier RA, 2003. «Retinal Oxygen: Fundamental and Clinical Aspects». *Archives of Ophthalmology (Chicago, Ill.: 1960)*, 121(4): 547-57.
- Wilkinson CP, Ferris 3rd FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al., 2003. «Proposed International Clinical Diabetic Retinopathy and Diabetic Macular Edema Disease Severity Scales». *Ophthalmology*, 110(9): 1677-82.
- Wilkinson-Berka JL, Suphapimol V, Jerome JR, Deliyanti D, y Allingham MJ, 2019. «Angiotensin II and Aldosterone in Retinal Vasculopathy and Inflammation». *Experimental Eye Research*, 187: 107766.
- Willermain F, Scifo L, Weber C, Caspers L, Perret J, y Delporte C, 2018. «Potential Interplay between Hyperosmolarity and Inflammation on Retinal Pigmented Epithelium in Pathogenesis of Diabetic Retinopathy». *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4): 1056.
- Wisniewska-Kruk J, Klaassen I, Vogels IM, Magno AL, Lai CM, Van Noorden CJ, et al., 2014. «Molecular Analysis of Blood–Retinal Barrier Loss in the Akimba Mouse, a Model of Advanced Diabetic Retinopathy». *Experimental Eye Research*, 122: 123-31.
- Wong TY, Cheung CMG, Larsen M, Sharma S, y Simó R, 2016. «Diabetic Retinopathy». *Nature Reviews. Disease Primers*, 2: 16012.
- World Health Organization, 2020. «Diabetes». <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diabetes> (acceso 14 de enero de 2021).
- Wright AF, Jacobson SG, Cideciyan AV, Roman AJ, Shu X, Vlachantoni D, et al., 2004. «Lifespan and Mitochondrial Control of Neurodegeneration». *Nature Genetics*, 36(11): 1153-58.

- Wu B, Kulkarni K, Basu S, Zhang S, y Hu M, 2011. «First-Pass Metabolism via UDP-Glucuronosyltransferase: A Barrier to Oral Bioavailability of Phenolics». *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 100(9): 3655-81.
- Wu MY, Yiang GT, Lai TT, y Li CJ, 2018. «The Oxidative Stress and Mitochondrial Dysfunction during the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018: 3420187.
- Wu T, Qiao S, Shi C, Wang S, y Jicorresponding G, 2018. «Metabolomics window into diabetic complications». *Journal of Diabetes Investigation*, 9(2): 244-55.
- Wu Y, Tang L, y Chen B, 2014. «Oxidative Stress: Implications for the Development of Diabetic Retinopathy and Antioxidant Therapeutic Perspectives». *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014: 752387.
- Xu H, y Chen M, 2016. «Targeting the complement system for the management of retinal inflammatory and degenerative diseases». *European Journal of Pharmacology*, 787: 94-104.
- Xu J, Chen LJ, Yu J, Wang HJ, Zhang F, Liu Q, et al., 2018. «Involvement of Advanced Glycation End Products in the Pathogenesis of Diabetic Retinopathy». *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 48(2): 705-17.
- Xu Z, Wei Y, Gong J, Cho H, Park JK, Sung ER, et al., 2014. «NRF2 Plays a Protective Role in Diabetic Retinopathy in Mice». *Diabetologia*, 57(1): 204-13.
- Xue EX, Lin JP, Zhang Y, Sheng RS, Liu HX, Zhou YL, et al., 2017. «Pterostilbene Inhibits Inflammation and ROS Production in Chondrocytes by Activating Nrf2 Pathway». *Oncotarget*, 8(26): 41988.
- Yang F, Yu J, Ke F, Lan M, Li D, Tanet K, et al., 2018. «Curcumin Alleviates Diabetic Retinopathy in Experimental Diabetic Rats». *Ophthalmic Research*, 60(1): 43-54.
- Yang Y, Fan C, Wang B, Ma Z, Wang D, Gong B, et al., 2017. «Pterostilbene Attenuates High Glucose-Induced Oxidative Injury in Hippocampal

Neuronal Cells by Activating Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2». *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease*, 1863(4): 827-37.

Yao Y, Liu K, Zhao Y, Hu X, y Wang M, 2018. «Pterostilbene and 4'-Methoxyresveratrol Inhibited Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Response in RAW264.7 Macrophages». *Molecules: A Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry*, 23(5): 1148.

Yu G, Guan Y, Liu L, Xing J, Li J, Chenget Q, et al., 2018. «The Protective Effect of Low-Energy Shock Wave on Testicular Ischemia-Reperfusion Injury Is Mediated by the PI3K/AKT/NRF2 Pathway». *Life Sciences*, 213: 142-48.

Yu Z, Zhang T, Gong C, Sheng Y, Lu B, Zhou L, et al., 2016. «Erianin Inhibits High Glucose-Induced Retinal Angiogenesis via Blocking ERK1/2-Regulated HIF-1 α -VEGF/VEGFR2 Signaling Pathway». *Scientific Reports*, 6: 34306.

Zhang C, Xu Y, Tan HY, Li S, Wang N, Zhanget Y, et al., 2018. «Neuroprotective Effect of He-Ying-Qing-Re Formula on Retinal Ganglion Cell in Diabetic Retinopathy». *Journal of Ethnopharmacology*, 214: 179-89.

Zhang L, Zhang ZK, y Liang S, 2016. «Epigallocatechin-3-Gallate Protects Retinal Vascular Endothelial Cells from High Glucose Stress in Vitro via the MAPK/ERK-VEGF Pathway». *Genetics and molecular research*, 15(2).

Zhang T, Mei X, Ouyang H, Lu B, Yu Z, Wang Z, et al, 2019. «Natural Flavonoid Galangin Alleviates Microglia-Trigged Blood-Retinal Barrier Dysfunction during the Development of Diabetic Retinopathy». *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 65: 1-14.

Zhang XG, Zhang YQ, Cheng PQ, Cao Y, Sun JM, Lv XF, 2018. «The Impact of Insulin Pump Therapy to Oxidative Stress in Patients with Diabetic Nephropathy». *European Journal of Medical Research*, 23(1): 7.

Zhang Y, Zhang YQ, Cheng QP, Cao Y, Sun MJ, y Lv, XF, 2020. «Tilianin Protects Diabetic Retina through the Modulation of Nrf2/TXNIP/NLRP3 Inflammasome Pathways». *Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology: Official Organ of the International Society for Environmental Toxicology and Cancer*, 39(1): 89-99.

- Zhao LQ, Zhu H, Zhao PQ, y Hu YQ, 2011. «A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Outcomes of Vitrectomy with or without Intravitreal Bevacizumab Pretreatment for Severe Diabetic Retinopathy». *The British Journal of Ophthalmology*, 95(9): 1216-22.
- Zheng Y, He M, y Congdon, 2012. «The worldwide epidemic of diabetic retinopathy». *Indian Journal of Ophthalmology*, 60(5): 428-31.
- Zhou M, Zhang P, Xu X, y Sun X, 2015. «The Relationship Between Aldose Reductase C106T Polymorphism and Diabetic Retinopathy: An Updated Meta-Analysis». *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 56(4): 2279-89.

ANEXO

AUTORIZACION PROCEDIMIENTO 2016/VSC/PEA/00198

Vista la solicitud realizada en fecha **18/10/16** con nº reg. entrada **23045** por D/D^a. **Pilar Campins Falcó**, Vicerrectora de Investigación y Política Científica, centro usuario **ES460780001001**, para realizar el procedimiento:

“Efectos retinoprotectores del pterostilbeno en diabetes tipo I.”

Teniendo en cuenta la documentación aportada, según se indica en el artículo 33, punto 5 y 6, y puesto que dicho procedimiento se halla sujeto a autorización en virtud de lo dispuesto en el artículo 31 del Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero,

Vista la propuesta del jefe del servicio de Producción y Sanidad Animal.

AUTORIZO:

la realización de dicho procedimiento al que se le asigna el código: **2016/VSC/PEA/00198** tipo **2**, de acuerdo con las características descritas en la propia documentación para el número de animales, especie y periodo de tiempo solicitado. Todo ello sin menoscabo de las autorizaciones pertinentes, por otras Administraciones y entidades, y llevándose a cabo en las siguientes condiciones:

Usuario: **Universitat de Valencia**

Responsable del proyecto: **Ángel Luis Ortega Valero**

Establecimiento: **Sección de Producción Animal SCIE-Campus Burjassot**

Necesidad de evaluación retrospectiva:

Condiciones específicas:

Observaciones:

Valencia a, 9 de noviembre de 2016

El director general de Agricultura, Ganadería y Pesca

Rogelio Llanes Ribas

