

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS

María Victoria VAGLIENTI



Departamento de Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

Centro de Investigaciones en Bioquímica Clínica e Inmunología

CIBICI-CONICET

Córdoba, 28 de julio de 2022

“Efecto de NO₂-OA sobre el estrés oxidativo, gliosis, neovascularización y neurodegeneración retinal en modelos experimentales in vitro e in vivo: Participación de la Célula Glial de Müller”

DIRECTORA DE TESIS

Prof. Dra. María Cecilia Sánchez

(Inv. Independiente. Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI-CONICET-FCQ UNC)

COMISIÓN ASESORA

Prof. Dra. María Ana Contín

(Inv. Independiente. Departamento de Química Biológica-CIQUIBIC-CONICET-FCQ UNC)

Prof. Dra. Daniela Quinteros

(Inv. Independiente. Departamento de Ciencias Farmacéuticas- UNITEFA-CONICET-FCQ
UNC)

Prof. Dr. Gustavo Bonacci

(Inv. Adjunto. Departamento de Bioquímica Clínica-CIBICI-CONICET-FCQ UNC)

EVALUADOR EXTERNO

Prof. Dra. Nora Rotstein

(Inv. Principal. INIBIBB-CONICET-Bahía Blanca)

Este trabajo de tesis fue realizado con la ayuda económica obtenida a través de becas y subsidios de CONICET, IBRO, AGENCIA-FONCyT y SECyT-UNC.

A mi familia, mi lugar seguro en el mundo

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN	4
SUMMARY	7
I. Introducción	9
I.I Estructura funcional de la retina neural.....	10
I.II Retinopatías proliferativas: escenario actual.....	12
I.III. Fisiopatología de la ROP y la RD.....	14
I.IV Funciones claves de las CGM en la retina sana.....	20
I.V Gliosis	23
I.VI. Ácidos grasos-nitrados: lípidos bioactivos	24
I.VII. NO ₂ -FA: activación de la vía de antioxidante Keap1-Nrf2 y beneficios en RP	26
II. Objetivos	29
II.I Objetivo General	30
II.II Objetivos Específicos.....	30
III. Resultados Modelo “in vitro”	31
III.I. Efecto de NO ₂ -OA sobre la viabilidad de las CGM.....	32
III.II. NO ₂ -OA induce la expresión proteica de HO-1 en CGM	32
III.III. NO ₂ -OA activa la vía de señalización antioxidante Keap1-Nrf2 en CGM	34
III.IV. NO ₂ -OA previene el incremento de ERO inducido por LPS o PMA en CGM	35
III.V. NO ₂ -OA revierte el estrés glial inducido por α ₂ -Macroglobulina en CGM.....	36
III.VI. NO ₂ -OA previene el incremento de ERO inducido por α ₂ M en CGM	38
III.VII. NO ₂ -OA reduce la expresión de VEGF-A bajo condiciones de hipoxia y proinflamatorias en CGM.....	41
III.VIII. NO ₂ -OA modula la angiogénesis in vitro mediante la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2.....	42
IV. Resultados Modelo “in vivo”	47
IV.I. NO ₂ -OA induce la expresión transcripcional de NQO1 y SOD1 en retina de ratones wild type C57BL/6	48
IV.II. Efecto de NO ₂ -OA sobre la funcionalidad y la estructura retinal en ratones adultos	49
IV.III. Modelo de Retinopatía inducida por oxígeno (OIR)	52
IV.IV. NO ₂ -OA promueve la angiogénesis reparativa en retinas de ratones OIR	54
IV.V. NO ₂ -OA mantiene la expresión de VEGF-A inducido por la hipoxia a P17 OIR.....	56
IV.VI. NO ₂ -OA previene la gliosis inducida en retinas a P17 OIR.....	57
IV.VII. NO ₂ -OA evita la pérdida funcional de la retina a P26 OIR	59

IV.VIII. NO ₂ -OA impide la disminución en la expresión de caspase-3 total en retinas de ratones P26 OIR.....	61
V. DISCUSIÓN.....	64
V.I Conclusiones del modelo “in vitro”	65
V.II. Conclusiones del modelo “in vivo”	69
VI. PERSPECTIVAS FUTURAS	73
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
VIII. REFERENCIAS.....	88
IX. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA.....	108

ABREVIATURAS

AGE: Productos finales de glicosilación avanzada (por *Advanced Glycation End products*)

ARE: Elemento de respuesta antioxidante (por *Antioxidant Responsive Element*)

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

ARVO: por *Association for Research in Vision and Ophthalmology*

ASB: Albúmina Sérica Bovina

ATCC: por *American Type Culture Collection*

BAEC: por *Bovine Aorta Endothelial Cells*

BCA: Ácido Bicinconinico (por *Bicinchoninic Acid*)

CGM: Células Gliales de Müller

CRALBP: Proteína Unidora de Retinaldehído (por *cellular retinaldehyde-binding protein*)

Cys: Cisteína

DCF-DA: por *Dichlorodihydrofluorescein Diacetate*

DM: Diabetes Mellitus

DMEM: por *Dulbecco's modified Eagle's medium*

DTT: por *Dithiothreitol*

EPO: Eritropoyetina

ERG: Electrorretinografía

ERN: Especies Reactivas del Nitrógeno

ERO: Especies Reactivas del Oxígeno

FGF: Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos (por *Fibroblast Growth Factor*)

GCL: Capa de Células Ganglionares (por *Ganglion Cell Layer*)

GFAP: Proteína Ácida Fibrilar Glial (por *Glial Fibrillary Acidic Protein*)

GS: Glutamina Sintetasa

GSA-IB4: Lectina *Griffonia Simplicifolia* IB4

GSL: Cisteína-Glutamato Ligasa (por *Glutamate Cysteine Ligase*)

GST: Glutati6n S-Transferasas (por *Glutathione S-Transferase*)

H&Eo: Tinci3n con Hematoxilina y Eosina

His: Histidina

HO-1: Hemo-Oxigenasa-1

i.o.: Intraocular
i.p.: Intraperitoneal
IGF-1: Factor de Crecimiento Insulínico Tipo 1 (por *Insulin-Like Growth Factor 1*)
IL-1 β : Interleucina-1 Beta
ILM: Membrana Limitante Interna (por *Internal Limiting Membrane*)
INL: Capa Nuclear Interna (por *Inner Nuclear Layer*)
IPL: Capa Plexiforme Interna (por *Inner Plexiform Layer*)
Keap-1: por *Kelch-like ECH-associated protein 1*
LPS: Lipopolisacáridos
LRP1: por *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*
 α_2 M: α_2 Macroglobulina
MIO-M1: por *Moorfields/Institute of Ophthalmology-Müller 1*
MPT: Modificación Postraduccional
NFL: Capa de Fibras Nerviosas (por *Nerve Fiber Layer*)
NF- κ B: por *Nuclear Factor- κ B*
-NO₂: Grupo nitro
NO₂-CLA: Ácido Nitro-Linoleico Conjugado (por *Nitro-Conjugated Linoleic Acids*)
NO₂-FA: Ácidos Grasos-Nitrados (por *Nitro-Fatty Acids*)
NO₂-LA: Ácido Nitro-Linoleico (por *Nitro-Linoleic Acids*)
NO₂-OA: Ácido Nitro-Oleico (por *Nitro-Oleic Acids*),
NQO1: NAD(P)H Quinona Oxidorreductasa 1
Nrf2: por *nuclear factor erythroid 2-related factor 2*
NV: Neovascularización
O₂: Oxígeno
OA: Ácido Oleico (por *Oleic Acids*)
OIR: Retinopatía Inducida por Oxígeno (por *Oxygen-Induced Retinopathy*)
OLM: Membrana Limitante Externa (por *Outer Limiting Membrane*)
ON: Óxido Nítrico
ONL: Capa Nuclear Externa (por *Outer Nuclear Layer*),
OPL: Capa Plexiforme Externa (por *Outer Plexiform Layer*)
P: Día post-natal
PBS: por *Phosphate Buffered Saline*

PEG400: Polietilenglicol 400

PFA: Paraformaldehído

PIGF: Factor de Crecimiento Placentario (por *Placental Growing Factor*)

PMA: Forbol 12-Miristato 13-Acetato (por *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate*)

PMSF: por *Phenylmethyl Sulfonylfluoride*

PRS: Segmentos Fotosensibles de los Fotorreceptores (por *Photoreceptor Segments*)

RA: Aire ambiental (por *Room Air*)

RD: Retinopatía Diabética

RDNP: Retinopatía Diabética No Proliferativa

RDP: Retinopatía Diabética Proliferativa

ROP: Retinopatía del Prematuro (por *Retinopathy of Prematurity*)

RP: Retinopatías Proliferativas

RPE: Epitelio Pigmentario de la Retina (por *Retinal Pigment Epithelial*)

SFB: Suero Fetal Bovino

SOD1: Superóxido Dismutasa 1

TA: Temperatura Ambiente

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (por *Vascular Endothelial Growth Factor*)

VO: Vaso-Obliteración

RESUMEN

Diversas patologías retinianas convergen en la neovascularización (NV) patológica debido al crecimiento anormal de vasos. Entre ellas, las de mayor incidencia mundial que conducen a pérdida de visión y ceguera irreversible son la Retinopatía Diabética (RD) y la Retinopatía del Prematuro (ROP, por *Retinopathy of Prematurity*). Durante años los principales estudios clínicos y básicos, estuvieron dirigidos sólo a identificar los mecanismos de la enfermedad vascular. Sin embargo, hoy se conoce que células no vasculares como glía y neuronas también se ven afectadas. En este sentido, numerosas evidencias han demostrado que una función visual anormal, así como una sensibilidad disminuida al contraste preceden a los signos clínicos microvasculares detectables de la patología. Entre los mecanismos etiopatogénicos de las retinopatías proliferativas (RP) convergen componentes inflamatorios, daño oxidativo, y aumento en la producción de especies reactivas del nitrógeno (ERN), entre otros. En este sentido, niveles elevados de especies reactivas del oxígeno (ERO) causan citotoxicidad o apoptosis, pero también actúan como segundos mensajeros regulando a nivel retinal, el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por *vascular endothelial growth factor*). Debido a ello, varios estudios han sido realizados con el fin de reducir el exceso de ERO en las retinopatías. Sin embargo, una estrategia menos explorada en retina es la modulación de mediadores celulares involucrados en la defensa antioxidante, como el sistema Keap1-Nrf2, que regula la expresión de enzimas antioxidantes de fase II tales como hemo-oxigenasa-1 (HO-1), NAD(P)H quinona oxidoreductasa 1 (NQO1), así como enzimas implicadas en la biosíntesis de glutatión, entre otras. En los últimos años, numerosos trabajos han demostrado el efecto antiinflamatorio y citoprotector de los ácidos grasos-nitrados (NO₂-FA, por *Nitro-Fatty acids*) representados principalmente por el ácido nitro-oleico (NO₂-OA, por *Nitro-oleic acids*), nitro-linoleico (NO₂-LA, *Nitro-linoleic acids*) y el nitro-linoleico conjugado (NO₂-CLA, *Nitro-conjugated linoleic acids*). Por lo que el objetivo de este trabajo de tesis fue investigar el efecto de los NO₂-FA sobre eventos de NV, gliosis, aumento de citoquinas proinflamatorias y estrés oxidativo presentes en las RP. Para este fin, recurrimos a dos modelos experimentales de estudio *in vitro* e *in vivo*. En el primero, utilizamos principalmente células gliales de Müller (CGM) debido a que participan en

procesos de inflamación, gliosis, síntesis y secreción de factores tróficos (como VEGF) y antioxidantes en la retina. Nuestros resultados mostraron que el tratamiento con el NO₂-OA indujo la expresión proteica y transcripcional de la proteína HO-1 mediante la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2. Además, previno el incremento de los niveles de ERO inducidos por el estímulo de lipopolisacáridos (LPS), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA, por *Phorbol 12-myristate 13-acetate*) y la proteína extracelular α -2 Macroglobulina (α ₂M). Interesantemente, esta proteína presente en niveles elevados en las retinopatías también induce gliosis reactiva la cual fue prevenida por el tratamiento con el NO₂-OA. Además, cuando analizamos la respuesta proangiogénica en CGM bajo estímulo hipóxico y proinflamatorio, se observó que el NO₂-OA redujo significativamente los niveles de ARNm de VEGF-A. En línea con estos resultados también demostramos que el NO₂-OA inhibió la formación de túbulos y el pretratamiento con un inhibidor efectivo de Nrf2, anuló este efecto.

En función de los resultados obtenidos *in vitro* decidimos indagar en un modelo de retinopatía experimental inducida por oxígeno (OIR, por *Oxygen-Induced Retinopathy*) en ratones, el efecto del NO₂-OA en los procesos vasoproliferativos y neurodegenerativos retinales, así como su mecanismo de acción. Cabe aclarar que el modelo de OIR constituye una poderosa herramienta para elucidar los mecanismos involucrados en las RP y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Es así que, en nuestro laboratorio, previamente demostramos en el modelo de OIR que además de la vaso-obliteración (VO) y NV retinal se observa daño neuronal, activación glial y pérdida funcional de la retina acompañadas de un incremento en el flujo autofágico. Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis mostraron que la administración por vía intraocular (i.o.) de NO₂-OA, fue capaz de inducir la angiogénesis reparativa, disminuyendo el área avascular central y la NV patológica. Interesantemente, también evitó la gliosis al atenuar los niveles de GFAP, pero no fue capaz de revertir la disminución de la enzima detoxificante de glutamato, GS. Además, evitó el daño en la funcionalidad retinal reflejado en la capacidad de mantener la amplitud, así como también el tiempo de latencia de la onda-b (retina interna) a P26 OIR. En línea con estos resultados, también se observó que el NO₂-OA previno la disminución de la expresión de caspasa-3 total a P26 OIR.

Dado que, en la actualidad, los tratamientos disponibles para las retinopatías (fotocoagulación, vitrectomía, inyección intraocular de anticuerpos monoclonales) intentan enlentecer la progresión, pero solo en casos muy puntuales logran mejorarla, los hallazgos obtenidos en este trabajo de tesis sugieren la utilización del NO₂-OA como una posible estrategia terapéutica en enfermedades invalidantes como las RP, debido a que induce angiogénesis reparativa, evita la gliosis e impide la pérdida de funcionalidad retinal, así como de daño neuronal.

SUMMARY

Pathological retinal neovascularization (NV) is a leading cause of serious vision loss in potentially blinding eye diseases such as proliferative diabetic retinopathy (PDR) and retinopathy of prematurity (ROP). Accumulating evidences, stemming from experimental models and clinical studies of proliferative retinopathies (PR) have provided insights into the mechanisms of vascular injury. However, it is known that non-vascular cells such as glia and neurons are also affected, with the consequent production of gliosis (increased GFAP levels) and neurodegeneration (retinal functional loss, altered neurotrophic balance and neuronal damage). In this sense, numerous evidences have shown that an abnormal visual function, as well as a decreased sensitivity to contrast, precede the detectable microvascular clinical signs in PR. Among the etiopathogenic mechanisms converge inflammatory components, oxidative damage, and increased production of reactive nitrogen species (RNS). In this sense, high levels of reactive oxygen species (ROS) cause cytotoxicity or apoptosis, but they also act as second messengers regulating retinal VEGF levels. In fact, several studies have been carried out in order to reduce the excess of ROS in retinopathies. However, an unexplored therapeutic strategy in retina is the modulation of transcription factors involved in antioxidant defense, such as the Keap1-Nrf2 system, which regulates the expression of phase II antioxidant enzymes such as heme oxygenase-1 (HO-1), NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 (NQO1), as well as enzymes involved in glutathione biosynthesis, among others. Recently, numerous studies have demonstrated the anti-inflammatory and cytoprotective effect of nitro-fatty acids (NO₂-FA) including nitro-oleic acid (NO₂-OA), nitro-linoleic acid (NO₂-LA) and conjugated nitro-linolenic acid (NO₂-CLA). Therefore, the objective of this work was to investigate the effect of NO₂-FA on NV, gliosis, inflammation and oxidative stress in PR. For this purpose, we used two experimental models *in vitro* and *in vivo*. In the first one, Müller glial cells (MGCs) were selected due to the crucial role that play in diabetic retinas. Our results showed that treatment with NO₂-OA induced protein and transcriptional expression of HO-1 by activating the Keap1-Nrf2 antioxidant pathway. In addition, NO₂-OA treatment prevented the increase of ROS levels induced by LPS, PMA and the extracellular protein α_2 M. Interestingly, this protein, present at elevated levels in PR, also induced reactive gliosis, which was prevented by NO₂-OA treatment. Furthermore, when we analyzed the pro-angiogenic response in MGCs under hypoxic and pro-inflammatory stimuli, NO₂-OA significantly reduced VEGF-A mRNA levels. In line with these results, we also show that NO₂-OA inhibited tube formation and pretreatment with an Nrf2 inhibitor, abolished this effect. In order to deepen our *in vitro* results, we have investigated the effect of NO₂-OA on retinal vasoproliferative and neurodegenerative processes in an experimental oxygen-induced retinopathy (OIR) mice model. It should be noted that the OIR model is a powerful tool for elucidating the mechanisms involved in PR and

developing new therapeutic strategies. Previously, we demonstrated in the OIR model retinal vaso-oblivation (VO) and NV, neuronal damage, glial activation and retinal functional loss, accompanied by an increase in autophagic flux. Here, the results showed that an intraocular (i.o.) NO₂-OA injection at P12 OIR, was able to induce reparative angiogenesis, decreasing the VO and pathological NV. Interestingly, it also prevented gliosis attenuating GFAP levels, but was unable to reverse the levels of the glutamate detoxifying enzyme, GS. Additionally, NO₂-OA treatment prevented the reduction in amplitude, as well as the increase in latency of the b-wave (inner retina) at P26 OIR. In line with these results, NO₂-OA was also found to prevent the decrease levels of total caspase-3 at P26 OIR.

Considering the limitations and the side effects of current treatments of PR (photocoagulation, vitrectomy, intraocular injection of monoclonal antibodies) the results of this work underscore the role of NO₂-OA as a novel therapeutic agent that attenuate neovascular and neurodegenerative processes.

I. Introducción

1.1 Estructura funcional de la retina neural

La retina es el tejido nervioso que recubre la parte posterior del ojo y está formada por capas bien definidas de neuronas interconectadas entre sí que, junto con células macrogliales, permiten la adecuada fototransducción y procesamiento de la información visual (**Esquema 1 A**). Estructuralmente, es un tejido muy organizado y conservado en todos los vertebrados. Presenta siete capas bien definidas con una gran diversidad de células que forman circuitos morfológica y funcionalmente distintos que operan en paralelo y en combinación para producir una imagen visual. Tres capas contienen cuerpos celulares con núcleo denominadas: capa nuclear externa (ONL, por *outer nuclear layer*), capa nuclear interna (INL, por *inner nuclear layer*) y capa de células ganglionares (GCL, por *Ganglion cell layer*); dos capas poseen prolongaciones celulares y es donde ocurre la sinapsis neuronal: la capa plexiforme externa (OPL, por *outer plexiform layer*) y la capa plexiforme interna (IPL, por *inner plexiform layer*); una capa que contiene los axones de las células ganglionares que se dirigen hacia el nervio óptico denominada capa de fibras nerviosas (NFL, por *nerve fiber layer*); y la capa más externa formada por los segmentos fotosensibles de los fotorreceptores (PRS, por *photoreceptor segments*) (1–3) (**Esquema 1 B**).

La retina, como muchas otras estructuras del sistema nervioso central, contiene una gran diversidad de tipos neuronales. Aproximadamente 55 tipos de células distintas se encuentran en la retina (4, 5), cada una con una función diferente, mayormente representadas por neuronas, células gliales y las células que componen el sistema vascular. Existen cinco clases principales de células neuronales (células horizontales, bipolares, amacrinas, ganglionares, fotorreceptores conos y bastones) que, junto con las células gliales de Müller (CGM) que brindan soporte metabólico y homeostático, se encargan de la transmisión de la información visual, desde la recepción de la energía lumínica por los fotorreceptores hasta la superficie de la retina neural llegando hasta el nervio óptico (**Esquema 1 B**).

Brevemente, la codificación de la información visual empieza con la conversión de la energía luminosa en cambios de potencial de membrana en los fotorreceptores que modulan la liberación de neurotransmisores. Los fotorreceptores conos y bastones utilizan glutamato como neurotransmisor y hacen sinapsis con células bipolares glutamatérgicas de segundo orden en la OPL. La transmisión sináptica entre fotorreceptores y células bipolares está modulada por células horizontales, las cuales tienen sus núcleos en el borde externo de la INL y sus axones y dendritas expandidos dentro de la OPL. Luego de recibir el estímulo, las células bipolares entran en contacto con las células ganglionares retinales, esta interacción es modulada por las células amacrinas dentro de la IPL. Las células amacrinas tienen sus núcleos en el borde interno de la INL, y sus axones y dendritas en toda la extensión de la IPL. Las células ganglionares son las únicas neuronas con prolongaciones que salen de la retina, proyectando sus axones a los centros visuales superiores.

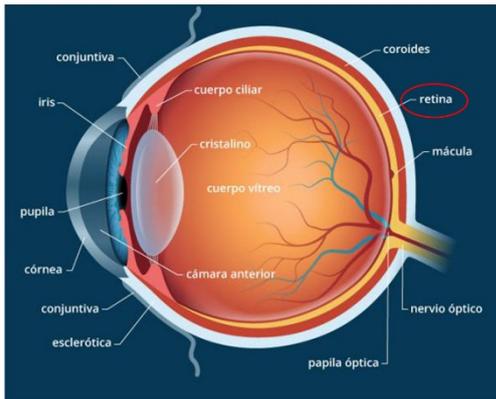
La retina al igual que el cerebro es un tejido inmunoprivilegiado, donde el sistema vascular es un sistema cerrado. El mismo está formado por células endoteliales con fuertes uniones estrechas que constituyen la barrera hematorretiniana interna, y los pericitos que son células murales de soporte que estabilizan los capilares y regulan el flujo vascular retinal. Las uniones estrechas entre las células endoteliales son esenciales para el control del transporte de líquidos y solutos de la barrera interna, así como para prevenir la entrada de sustancias tóxicas y componentes del plasma a la retina (6).

Como parte del sistema nervioso central la retina contiene células gliales, entre ellas la microglía y las células macrogliales. Las células microgliales de la retina proceden de precursores hematopoyéticos externos al sistema nervioso central que lo invaden durante el desarrollo. La microglía ha sido tradicionalmente considerada como los macrófagos o células del sistema inmune residente de la retina. Sus funciones, por lo tanto, se encuentran ligadas a la defensa del huésped contra microorganismos invasores, la reparación tisular cuando ocurre un daño neuronal y la iniciación de procesos inflamatorios. En condiciones normales la microglía aparece como células ramificadas dispuestas fundamentalmente en las capas plexiformes de la retina. Ante cualquier alteración o injuria, adopta una morfología redondeada y se desplaza hacia la región afectada (7).

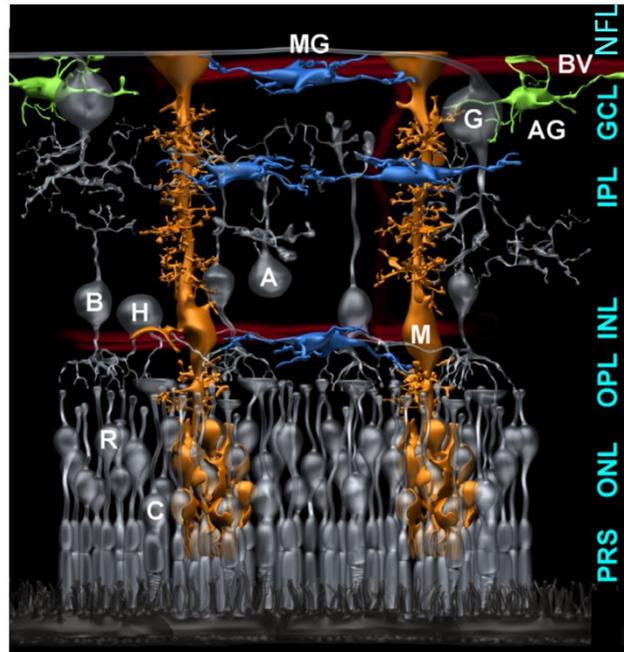
Por otro lado, existen dos tipos de células macrogliales: astrocitos y CGM. Los astrocitos se encuentran principalmente en la NFL y acompañan a los vasos sanguíneos en la INL. Al igual que las CGM, las prolongaciones de los astrocitos cubren los vasos sanguíneos que forman la barrera hematorretiniana interna y cumplen un rol clave en la homeostasis de iones. Además, entre otras funciones los astrocitos tienen un rol importante en la vascularización retinal (8, 9). Con respecto a las CGM, sus características y funciones en la retina serán desarrolladas en la **sección I. IV** de la Introducción.

Por todo lo anteriormente expuesto, cabe destacar que tanto las interacciones celulares como la integridad del tejido retinal son necesarias para una correcta fototransducción y procesamiento de la información visual. Cualquier alteración celular conduce a daños con consecuencias que pueden llevar a la pérdida parcial o total de la visión.

A)



B)



Esquema 1. Esquema representativo del ojo y la estructura de la retina neural en vertebrados.

A) Esquema de las secciones del ojo resaltando la localización de la retina. **B)** Estructura funcional de la retina neural. Organización celular de la retina indicando las diferentes capas que la componen: capa de los segmentos de los fotorreceptores (PRS), capa nuclear externa (ONL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme interna (IPL), capa de células ganglionares (GCL) y capa de fibras nerviosas (NFL). Entre las células que constituyen la retina se encuentran las células gliales de Müller (M) que abarcan todo el espesor de la retina neural; fotorreceptores conos (C) y bastones (R) con sus núcleos en la ONL; células bipolares (B), amacrinas (A) y horizontales (H) con sus núcleos en la INL; la microglía (MG) en la IPL; las células ganglionares (G) con sus núcleos en la GCL y los astrocitos (AG) en la GCL y rodeando a los vasos sanguíneos (BV). Adaptado de *Reichenbach A y Brigmann A., GLIA 2019.*

I.II Retinopatías proliferativas: escenario actual

Las retinopatías proliferativas (RP), como la Retinopatía del Prematuro (ROP, por *Retinopathy of Prematurity*) y la Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP), son la principal causa de ceguera en la población infantil y adulta en edad laboral, respectivamente (10–12); tanto en países desarrollados como en aquellos de medio y medio-alto ingreso, como Argentina. Si bien ambas patologías tienen diferentes estadios antes de llegar a la ceguera, la disminución en la visión afecta directamente la calidad de vida de los pacientes y su desempeño laboral. Un aspecto a destacar de estas patologías es que son prevenibles, razón por la cual, se han establecido programas en Argentina con el objetivo de redactar protocolos que homogenicen los procedimientos de acción en todo el país (13–15). Estudios longitudinales realizados del 2004 al 2016

muestran que el porcentaje de incidencia de la enfermedad y de ceguera no ha mejorado a pesar de la puesta a punto de estos programas, en parte por la baja adherencia al esquema de tratamiento, pero también por la dificultad de acceso a la información ya que los sectores más afectados son aquellos de menores recursos (16). Por lo tanto, la ceguera constituye un grave problema para el sistema de salud en nuestro país.

La ROP es prevenible, en la mayoría de los casos, en Unidades de Cuidados Intensivos Neonatales que cuenten con infraestructura adecuada y personal capacitado para realizar un correcto manejo de conductas perinatales (dentro de las más importantes se encuentra el manejo de la administración de oxígeno) y controlar los factores de riesgo de los bebés prematuros. El diagnóstico oftalmológico en el momento adecuado a través de la pesquisa sistemática y el tratamiento oportuno mejoran el pronóstico visual de los niños con diagnóstico de ROP (17).

Otro problema de las RP es que los enfoques terapéuticos actuales abordan la neovascularización (NV), de aparición tardía. Entre los tratamientos actuales disponibles para la ROP severa o la RDP, se encuentran la fotocoagulación con láser, vitrectomía, crioterapia, y el más utilizado últimamente con inhibidores de VEGF (antiangiogénicos) vía intraocular (i.o.) (18–20). Estos tratamientos son costosos e invasivos, y a pesar de que existan leyes para acceder a los mismos, muchas veces esto no es posible en nuestro país. Además, estos tratamientos no son efectivos en su totalidad, por ejemplo, la fotocoagulación con láser si bien reduce el riesgo de pérdida permanente de la visión, no se puede ignorar las consecuencias a largo plazo en la disminución del campo y la agudeza visual.

En la retinopatía diabética (RD), el tratamiento es más complejo, particularmente en etapas tempranas de la enfermedad, donde no hay una terapia efectiva para detener el progreso de esta retinopatía. En la etapa proliferativa, RDP, se utilizan las inyecciones repetidas de antiangiogénicos, lo que lleva a muchos pacientes a ser refractarios o resistentes al tratamiento (21–24). Estas terapias, intentan frenar la progresión de la patología, pero no logran mejorar la agudeza visual.

En conclusión, es de vital importancia el avance en el entendimiento de los mecanismos involucrados en el origen, desarrollo y progresión de estas retinopatías para la búsqueda de nuevos fármacos terapéuticos que no sólo apunten a la eliminación de la NV, sino también a promover la normalización de la vasculatura retinal a fin de rescatar neuronas y células gliales de la muerte.

I.III. Fisiopatología de la ROP y la RD.

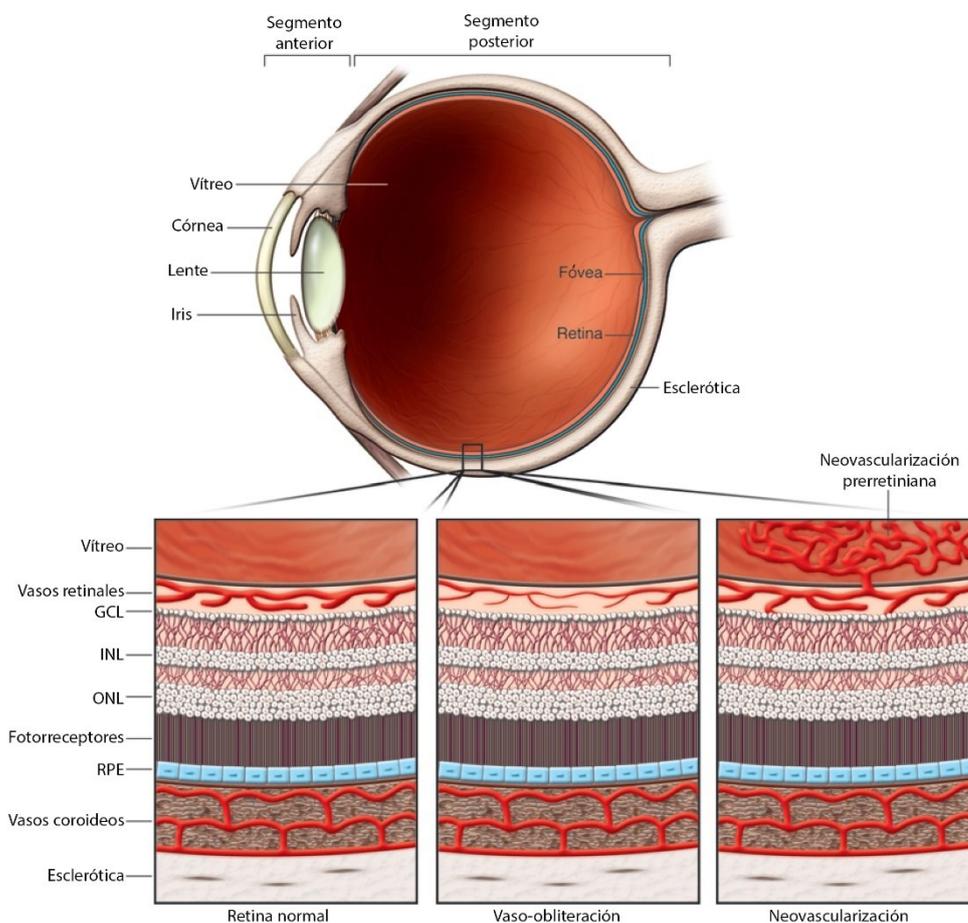
Las retinopatías isquémicas incluyen a un conjunto de patologías vasoproliferativas que cursan con disminución de oxígeno (O₂) en el tejido retinal, que en estadios finales de la enfermedad llevan a NV prerretiniana ocular. Entra ellas se encuentran: la retinopatía de células falciformes, la oclusión de la vena retiniana, el glaucoma neovascular, la RDP y la ROP.

Fisiopatología de la ROP

En los últimos años se han realizado importantes avances en la identificación de los mecanismos implicados en la génesis de la ROP. Además, la comprensión de los mecanismos subyacentes a esta enfermedad ha mejorado el entendimiento de la patogenia de las retinopatías isquémicas proliferativas en adultos como la RD (desarrollada más adelante) y la degeneración macular asociada con la edad en su forma húmeda (principal causa de discapacidad visual en adultos mayores de 50 años). Esta retinopatía afecta únicamente a niños prematuros, y especialmente a aquellos con menos de 1,5 Kg de peso al nacer y/o menos de 32 semanas de edad gestacional, que son llevados a incubadora con administración de O₂ por falta de maduración pulmonar (25, 26). La fisiopatología de la ROP está relacionada, principalmente a los cambios en los niveles de O₂ que la vasculatura inmadura de la retina puede sentir o detectar. Los principales factores de riesgo son, además del bajo peso al nacer y la edad gestacional, la administración de O₂ en niveles o concentraciones inadecuadas, la falta de maduración pulmonar con corticoides prenatales, la restricción del crecimiento intrauterino, la desnutrición posnatal, sepsis y las transfusiones sanguíneas.

Es conocido que el desarrollo de la vasculatura retinal humana comienza aproximadamente en la semana 16 de gestación inducido por un gradiente de hipoxia en el tejido, y concluye en la semana 40 de gestación (27). Por lo tanto, cuando un neonato nace de forma prematura, su desarrollo y suministro de sangre en la retina es incompleto. Su ingreso a la incubadora con niveles elevados de O₂ (hiperoxia, niveles de O₂≈80%) producen el cese del crecimiento fisiológico de la vasculatura retinal, proceso comúnmente denominado vaso-obliteración (VO). Cuanto más prematuro sea el bebé, mayor será el área de la retina sin vascularización (avasascular) al momento de salir de la incubadora. Al finalizar el tratamiento y ser devuelto a un ambiente con menores niveles de O₂ (O₂ ambiental≈21%), las regiones avasculares de la retina periférica perciben la falta de O₂ relativa a las condiciones de la incubadora (hipoxia relativa), lo que produce señales de supervivencia y proangiogénicas en el tejido. Estas áreas avasculares hipóxicas en la retina, gatillan una respuesta proangiogénica desmedida y descontrolada, principalmente por parte de las CGM, las cuales secretan grandes cantidades de factores tróficos, como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por *vascular endothelial growth factor*), en un intento de establecer los plexos vasculares ausentes y la nutrición del tejido. Esta respuesta lleva a la formación

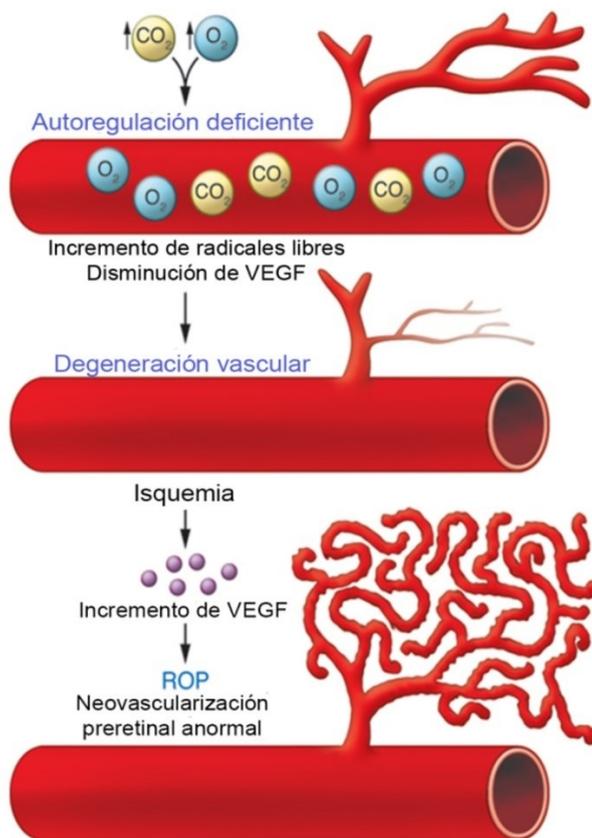
desordenada de nuevos vasos sanguíneos hacia la cavidad vítrea (NV prerretiniana), comúnmente denominados ovillos neovasculares (**Esquema 2**) (28). Los ovillos constituyen vasos sanguíneos inmaduros y no funcionales, dado que están carentes de células murales como los pericitos, con una barrera hematorretiniana interna propensa a romperse y producir hemorragias retinales, que llevan a la extravasación de proteínas del plasma. Además, pueden generar fuerzas mecánicas de tracción en el tejido, que causan finalmente el desprendimiento de la retina, llevando en una última instancia de la enfermedad a la ceguera. La NV *per se* es un impedimento para la visión, aunque es sabido que la neurodegeneración empieza antes de que estas alteraciones vasculares sean detectadas en el ojo.



Esquema 2. Esquema representativo de las etapas de la ROP. La ROP es una patología de dos fases. En la inicial se produce la degeneración vascular (vaso-obliteración), seguida por una fase secundaria de angiogénesis compensatoria patológica en las áreas avasculares hacia la cavidad del vítreo (NV prerretiniana). Adaptado de *Sapieha y col.*, *The Journal of Clinical Investigation* 2010.

La primera etapa de la patología empieza con la hiperoxia, como la que puede ocurrir durante los protocolos de ventilación mecánica (suplementación de O₂) en los bebés prematuros. Se ha descrito una deficiencia en la autorregulación del flujo sanguíneo

en la retina de los recién nacidos prematuros, es decir, que durante un aumento agudo de la tensión de O_2 o de la presión de perfusión, el flujo sanguíneo retinal del recién nacido no puede mantenerse constante, lo que da como resultado un suministro exagerado de O_2 potencialmente tóxico a la retina (**Esquema 3**) (28). Esto provoca la muerte de las células endoteliales y, por lo tanto, la obliteración de los vasos sanguíneos de la retina. La incompleta reducción del O_2 , conduce a la generación de especies reactivas del O_2 (ERO). Además, este incremento en las ERO no puede ser contrarrestado por antioxidantes, que son deficientes en el prematuro con respecto al adulto, ya que el feto está expuesto a bajos niveles de O_2 en el útero. Por otro lado, las ERO pueden reaccionar con el óxido nítrico (ON) para generar especies de nitrógeno altamente reactivas (ERN). Los efectos nocivos de las ERO y ERN en la función celular generalmente se denominan estrés oxidativo y nitrosativo, respectivamente, y dan como resultado la peroxidación de lípidos de membrana, daño en proteínas y ADN, lo que lleva a la degeneración microvascular de la retina (**Esquema 3**). Además, en esta etapa de la patología ya puede observarse estrés oxidativo, gliosis, neurodegeneración retinal y el incremento de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, $IL-1\beta$, $IL-6$, $TNF-\alpha$) (29, 30).

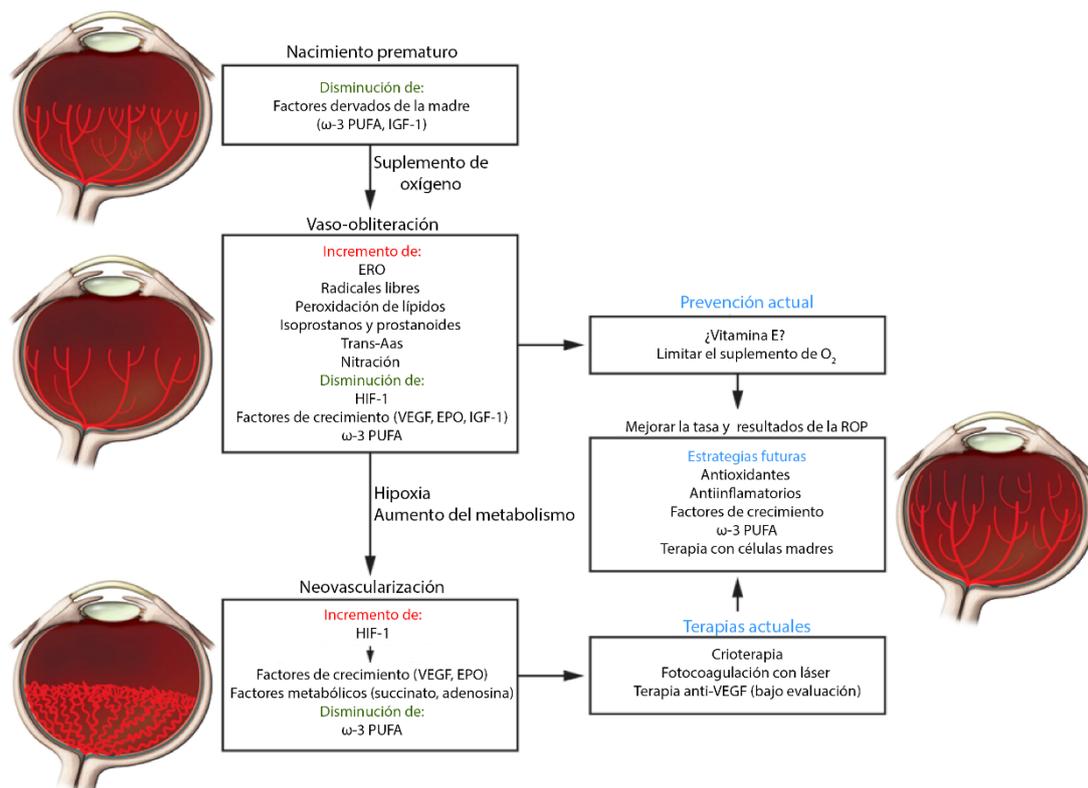


Esquema 3. Autorregulación deficiente en la retina de neonatos prematuros. La autorregulación deficiente del flujo sanguíneo ocular en el recién nacido prematuro no logra controlar la oxigenación de la retina durante el período de hiperoxia. Esto da como resultado un suministro excesivo de O_2 al tejido retinal. El aumento de la oxigenación de la retina incrementa la generación de ERO y suprime la expresión de VEGF en el recién nacido. Esto conduce al cese

del desarrollo vascular y la degeneración microvascular. La isquemia subsiguiente desencadena la NV aberrante, a través, del incremento de VEGF. Adaptado de *Sapieha y col.*, The Journal of Clinical Investigation 2010.

En la segunda etapa de la ROP, la hipoxia relativa induce a una respuesta exacerbada de factores proangiogénicos (31), lo que conduce a la NV prerretiniana observada y contribuye al incremento de la neurodegeneración y persistencia de gliosis en el tejido retinal. En esta etapa, la respuesta proangiogénica es originada en las neuronas (32, 33), astrocitos (34, 35) y principalmente en las CGM (36, 37). Estas poblaciones celulares están carentes del soporte metabólico después de la vaso-obliteración durante la primera fase de la ROP, por lo tanto, en un intento por reestablecer su suministro metabólico, producen cantidades elevadas de factores proangiogénicos como VEGF, eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento placentario (PIGF, por *Placental Growing Factor*), factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-1, por *Insulin-like growth factor 1*), angiopoyetina 2 y factor de crecimiento básico de fibroblastos (FGF, por *fibroblast growth factor*), entre otros (38–40) (**Esquema 3**). Como consecuencia, el crecimiento vascular se desregula y se desvía hacia la cavidad vítrea y el cristalino. Este crecimiento desregulado, puede generar una cicatriz fibrosa que finalmente termine en separar la retina neural del epitelio pigmentario de la retina (RPE, por *Retinal Pigment Epithelial*) (desprendimiento retinal) llevando a la ceguera a los bebés prematuros.

Como mencionamos anteriormente, la principal complicación de la ROP es la NV prerretiniana. Por lo tanto, los enfoques para prevenir la vaso-obliteración o acelerar la angiogénesis microvascular reparativa normal inicial frenaría idealmente el desarrollo de una NV prerretiniana dañina para las células de la retina. Además, sería ideal el desarrollo de estrategias terapéuticas que aborden el estrés oxidativo, gliosis, neurodegeneración y el estado proinflamatorio de esta patología. Es por esto, que *Sapieha y col.* propusieron como estrategias futuras el uso de antioxidantes, antiinflamatorios, moduladores de los factores de crecimiento, terapia con células madres, entre otras (**Esquema 4**) (28).



Esquema 4. Mecanismos involucrados en la fisiopatología de la ROP. Etapas de la ROP: mecanismos y moléculas involucradas en cada una de ellas. Actuales terapias y futuras estrategias para el tratamiento. Adaptado de *Sapieha y col.*, *The Journal of Clinical Investigation* 2010.

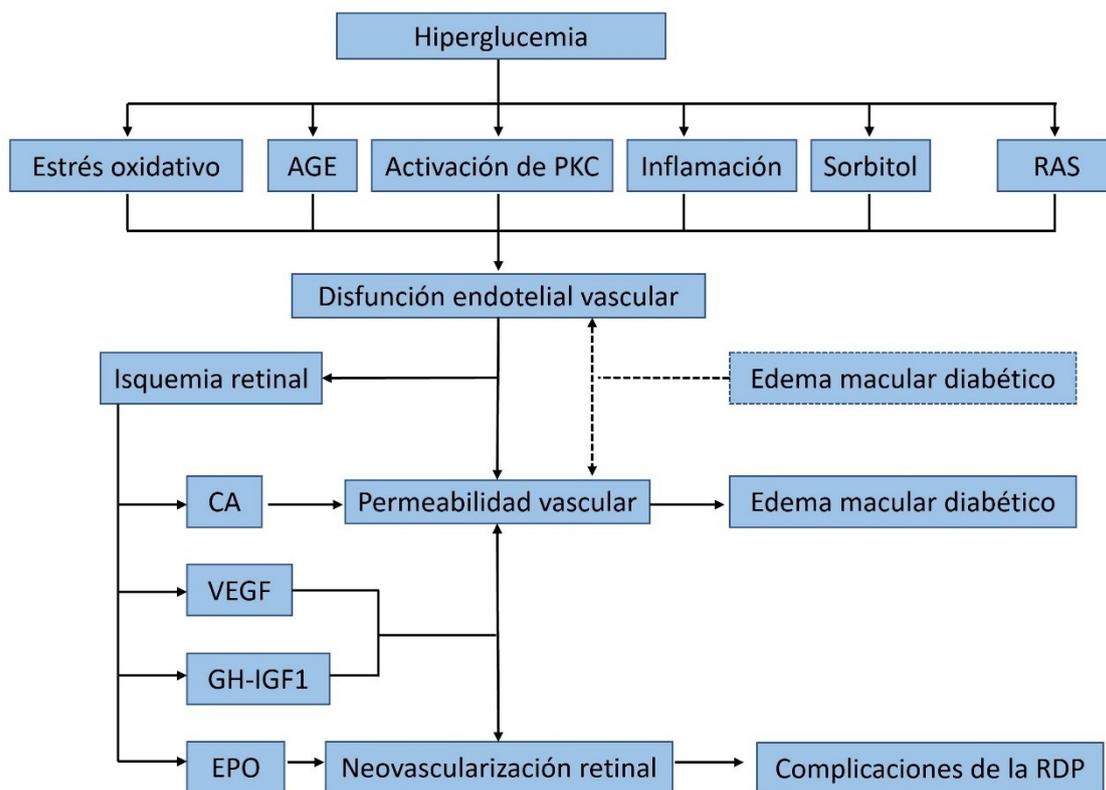
Fisiopatología de la RD

Otra retinopatía isquémica con una alta incidencia en la población adulta es la RD, la cual es la complicación microvascular más frecuente de la Diabetes Mellitus (DM) y es la principal causa de ceguera. La DM es una enfermedad metabólica crónica, causada por una baja producción de insulina por el páncreas (tipo I), o por su inadecuada percepción y uso por parte del organismo (tipo II), ambas caracterizadas por un aumento en los niveles de glucosa en sangre (hiperglucemia). Entre los factores que participan en la RD, la hiperglucemia genera daño en la microvasculatura retiniana, induciendo áreas hipóxicas en la retina, lo que conduce a la activación de factores proangiogénicos que llevan en estadios finales de la patología a la NV.

Desde el punto de vista clínico, existen dos etapas en la RD: la etapa no proliferativa (RDNP) y la etapa proliferativa (RDP) (41, 42). La RDNP, se desarrolla primero y se caracteriza por microaneurismas, aumento en la permeabilidad vascular y hemorragias en la retina. La etapa más severa y avanzada de la retinopatía, o RDP, se caracteriza por NV prerretiniana como consecuencia del daño vascular en la primera etapa. Como ya expusimos para la ROP, en esta última etapa donde la NV prerretiniana contiene

neovasos inmaduros y frágiles, se producen hemorragias en la retina. La presencia de sangre en el humor vítreo, dificulta el paso de luz hacia la retina causando manchas flotantes. Además, puede producirse el desprendimiento de la retina debido a las cicatrices que produce la NV prerretiniana.

El entendimiento de los mecanismos fisiopatológicos del desarrollo de la RD está en constante evolución. Se ha descrito que la exposición crónica a la hiperglucemia y otros factores de riesgo (por ejemplo, hipertensión, mal control de la glucemia, obesidad, entre otros) inician una cascada de cambios bioquímicos y fisiológicos que conducen en última instancia al daño en la microvasculatura y disfunción de la retina (**Esquema 5**) (43). Las vías implicadas incluyen la acumulación del sorbitol (44) y los productos finales de glicosilación avanzada (AGE, *por Advanced glycation end products*) (45, 46), activación del sistema renina-angiotensina, inflamación (47, 48), activación de la proteína quinasa C, incremento de ERO que conducen a estrés oxidativo (49, 50) y el incremento de factores proangiogénicos, principalmente VEGF (51, 52) (**Esquema 5**).



Esquema 5. Fisiopatología de la RD. La hiperglucemia desencadena una cascada de eventos bioquímicos que conducen a la disfunción del endotelio retinal. Esto resulta en isquemia e incremento de la permeabilidad vascular, reforzados por la hipertensión, vías claves en el desarrollo de la RD. AGE = productos finales de glicosilación avanzada. PKC= proteína quinasa C. RAS = sistema renina-angiotensina. CA = anhidrasa carbónica. VEGF = factor de crecimiento endotelial vascular. GH-IGF = factor de crecimiento–factor de crecimiento de la insulina. RDP =

retinopatía diabética proliferativa. HV = hemorragia vítrea. RD=desprendimiento de retina. Adaptado de *Ning Cheung y col. The Lancet, 2010.*

Si bien la fisiopatología y los factores desencadenantes de la ROP y la RDP son diferentes, ambas retinopatías cursan con una fase de hipoxia en la retina, que gatilla un desbalance en los factores proangiogénicos, principalmente VEGF, desencadenando el crecimiento anormal de los vasos sanguíneos (NV prerretiniana). Esta NV conduce, posteriormente, a una ruptura de la barrera hematorretiniana, extravasación de compuestos tóxicos, llevando a estrés oxidativo, glial y muerte neuronal (neurodegeneración) en la retina.

.IV Funciones claves de las CGM en la retina sana

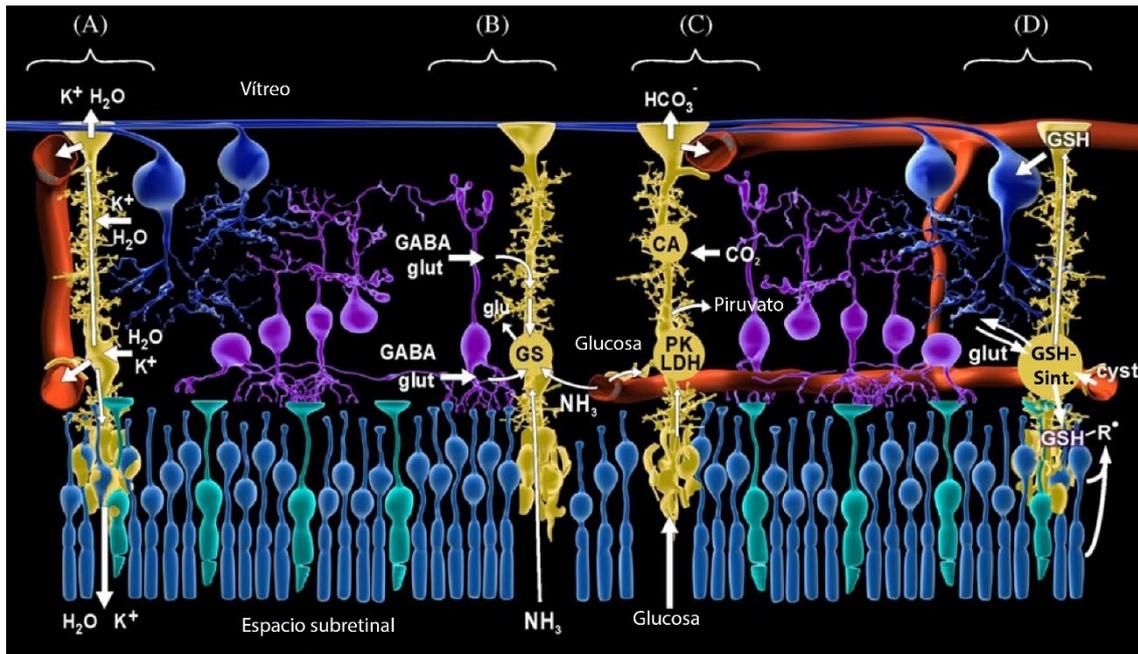
Dentro de los tipos celulares que componen la retina, las CGM cumplen un rol clave en situaciones de salud y enfermedad. Las CGM fueron reconocidas y descritas por primera vez por Heinrich Müller en 1851 como “fibras radiales” que pertenecen a la macroglia de la retina (53). Desde entonces y hasta la actualidad se han realizado numerosos avances en esta área (54). Estas células especializadas localizan el soma celular en la INL desde donde se expanden dos procesos principales en direcciones opuestas, los cuales atraviesan todo el espesor de la retina neural, entre la membrana limitante interna (ILM, por *Internal Limiting Membrane*) y externa (OLM, por *Outer Limiting Membrane*), respectivamente (55). Estas exhiben una estructura polarizada, que se divide en regiones bien características: un proceso celular externo que se desarrolla desde el soma celular hasta la OLM extendiendo numerosas microvellosidades celulares hacia el espacio subretinal; y un proceso celular interno desde el soma celular hasta la ILM, en donde forma un *endfoot* o varias *endfeet* que conectan con la cavidad vítrea. Este sitio hace de nexo para el intercambio de moléculas entre la retina y el humor vítreo, a través de las CGM. Además, estas células emiten procesos secundarios o proyecciones citoplasmáticas longitudinales que le permiten interactuar con todas las células de la retina, entre ellas, neuronas y células endoteliales. *Reichenbach* y col. describieron por primera vez, en 1994, a las CGM como el centro de una “*micro-unidad columnar*” de neuronas retinales, es decir, la unidad anatómica y funcional más pequeña necesaria para el procesamiento de la información visual (56). De esta manera, las CGM no sólo representan el soporte estructural de ésta “*micro-unidad columnar*” sino que también constituyen un vínculo anatómico entre las neuronas de la retina y los compartimentos con los que necesitan intercambiar moléculas, es decir, con los vasos sanguíneos retinales, la cavidad vítrea y el espacio subretinal. Además, las interacciones de las mismas garantizan la mantención de la homeostasis del tejido y permite a las CGM detectar e iniciar una respuesta protectora cuando se produce alguna alteración o daño en la retina (9).

Desde los primeros estadios del desarrollo retinal, las CGM cumplen un rol vital para crear y mantener la arquitectura de la retina (57), y sirven de soporte para la

supervivencia neuronal y el procesamiento de la información visual (58, 59). En este sentido, *Dubois-Dauphin* y col. demostraron que la sobreexpresión célula específica de la proteína Bcl-2 en CGM, en un ratón transgénico, inducía muerte en las mismas a los dos o tres días post-nacimiento. Este fenómeno condujo a displasia tisular, apoptosis de fotorreceptores y finalmente a degeneración retinal y proliferación del RPE (60).

Entre las funciones más importantes descritas de las CGM en la retina sana se encuentran (**Esquema 6**) (55):

- ✓ Preservación de la homeostasis osmótica y el balance hidroelectrolítico en la retina, a través, principalmente de la regulación de la concentración de iones (K⁺), agua y el pH del espacio extracelular (61–65) (**Esquema 6 A**)
- ✓ Modulación de la actividad sináptica mediante la rápida recaptación y reciclaje de neurotransmisores. Para ello, las CGM poseen la enzima glutamina sintetasa (GS), la cual recicla glutamato a glutamina para ser liberado como precursor del neurotransmisor a las neuronas (66). Además, también son capaces de degradar GABA vía el ciclo del ácido cítrico (67). Esta función es clave para evitar la neurotoxicidad por exceso de neurotransmisores (**Esquema 6 B**).
- ✓ Participación en el metabolismo de la glucosa en la retina, proporcionando a las neuronas de la retina nutrientes como el lactato/piruvato para su metabolismo oxidativo. Por otro lado, se encargan del almacenamiento de glucógeno y su degradación por glucogenólisis para nutrir a las neuronas de la retina (68). Además, eliminan los productos de desecho metabólico (**Esquema 6 C**).
- ✓ Regulación del flujo sanguíneo (69) y participación en la formación y mantenimiento de la integridad de la barrera hematorretiniana (70–72).
- ✓ Participación en el reciclaje de fotorpigmentos de los fotorreceptores, a través de la expresión de la proteína unidora de retinaldehído (CRALBP, por *cellular retinaldehyde-binding protein*), lo que es necesario para llevar a cabo el ciclo visual en los fotorreceptores conos (73, 74).
- ✓ Protección de las células del tejido retinal contra el estrés oxidativo, a través de la síntesis y liberación al medio extracelular de glutatión, el cual actúa como cofactor de la enzima glutatión peroxidasa, lo que permite la eliminación de radicales libres (75–77) (**Esquema 6 D**).
- ✓ Preservación de los fotorreceptores y las otras neuronas de la retina de la muerte por secreción de factores neurotróficos, factores de crecimiento y citoquinas (78, 79).
- ✓ Minimizan la dispersión de la luz, actuando como fibras ópticas vivas que guían la luz a través de las capas internas de la retina hacia los fotorreceptores conos y bastones, de forma similar a la fibra óptica de vidrio (80–83).
- ✓ Un subconjunto de CGM en la retina adulta presentan características latentes de células madres/ progenitoras de neuronas (80, 84–87).



Esquema 6. Importante interacción CGM-neuronas en la retina adulta sana. A) mantenimiento del balance hidroelectrolítico del tejido retinal. B) recaptación y reciclado de neurotransmisores. C) soporte metabólico a las neuronas. D) rol protector contra el estrés oxidativo (metabolismo GSH). Adaptado de *Andreas Bringmann y col*, *Prog Retin Eye Res* 2006.

Además de todas estas funciones beneficiosas para las neuronas (**Esquema 6**), las CGM mantienen una comunicación constante con las demás células que componen el tejido retinal. Al respecto, las CGM junto con la microglía residente del tejido son las encargadas de establecer una respuesta inflamatoria en situaciones patológicas agudas o crónicas, incluyendo la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias o factores tróficos necesario para la supervivencia de las células neuronales (88, 89). Además, son las células encargadas de la fagocitosis de cuerpos extraños y *debris* celular de neuronas o células del EPR muertas (90–94).

Por otro lado, como se mencionó anteriormente, las CGM junto con los pericitos, astrocitos y células endoteliales constituyen y son encargadas de la integridad de la barrera hematorretiniana interna, una estructura que le provee protección a la retina ante cualquier daño. La interacción CGM-microglía-endotelio en la retina adulta tiene como principal función regular el tono y el flujo vascular a través de la liberación de sustancias vasoactivas que contraen/dilatan los vasos sanguíneos (95, 96).

La evidencia anteriormente expuesta demuestra claramente que las funciones desempeñadas por las CGM son esenciales para el correcto desarrollo y funcionamiento de la retina.

I.V Gliosis

Como describimos anteriormente, las CGM tienen un rol muy importante en la homeostasis de la retina debido a que presentan una sorprendente resistencia a la injuria debido a su activo metabolismo (54). Sin embargo, en respuesta a estímulos dañinos se tornan reactivas para proteger al tejido retinal de un daño mayor y promover la reparación y remodelación del mismo. Este proceso de activación de las CGM es conocido como “gliosis” y esta caracterizado por cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos. Uno de los primeros indicios es el aumento en la expresión de filamentos intermedios como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP, por *Glial fibrillary acidic protein*) y vimentina mientras que otros cambios son la hipertrofia y proliferación de las células (97). Cabe destacar que el incremento en los filamentos intermedios es una estrategia para prevenir lesiones mecánicas en la retina neural (98), como el desprendimiento de retina que ocurre en estadios avanzados de ROP y RDP (99, 100). La gliosis presenta dos etapas: una protectora, ya que las CGM en presencia de injuria leve pueden activar mecanismos de defensa para las neuronas y reestablecer la homeostasis del tejido y la segunda etapa de daño, cuando la gliosis persiste en el tiempo. En estadios tempranos de las retinopatías, cuando las primeras alteraciones en el tejido son detectadas por las CGM, se considera una respuesta protectora; pero si persiste en el tiempo, sus consecuencias pueden ser perjudiciales para la función retinal.

Nuestro grupo ha demostrado que, en el modelo de retinopatía inducida por oxígeno (OIR, por *Oxygen-induced retinopathy*), la hipoxia severa induce un marcado incremento de GFAP en CGM (gliosis masiva), el cual es acompañado por muerte neuronal, sugiriendo que la gliosis contribuye a la neurodegeneración retinal (29, 30).

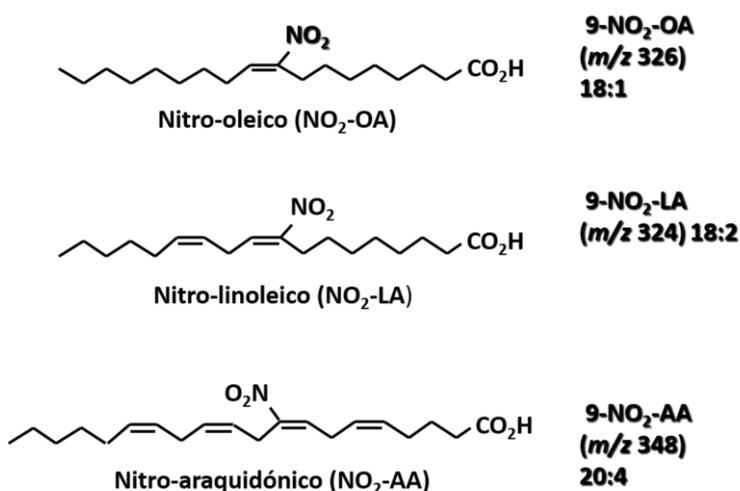
Por otro lado, en nuestro laboratorio tanto en modelos experimentales *in vivo* como *in vitro*, hemos demostrado que α_2 -Macroglobulina activa (α_2M^*), en concentraciones similares a las encontradas en el humor vítreo de pacientes con enfermedades retinales (101), induce gliosis mediada por el aumento de los niveles de GFAP (102). α_2M es una glicoproteína sérica multifuncional que en su forma nativa o activa (α_2M^*) regula la actividad biológica de muchas proteasas, factores de crecimiento y citoquinas, así como otros efectores fisiológicos (103). Debido a esas propiedades, α_2M puede influir en una amplia variedad de procesos biológicos ya sea a través de la interacción con su receptor LRP1 (por *Low density lipoprotein receptor-related protein 1*), o a través de la unión y transporte de citoquinas y factores de crecimiento.

Por lo tanto, la respuesta de las CGM en la retina será preventiva cuando la injuria sea leve y los mecanismos gliales se orienten a la reparación y rescate del tejido, sin embargo, la respuesta será nociva cuando el estímulo sea crónico y severo llevando a la pérdida de la función retinal.

I.VI. Ácidos grasos-nitrados: lípidos bioactivos

En condiciones de estrés oxidativo y nitrosativo, como ocurre en las RP, las ERO y ERN pueden reaccionar con los ácidos grasos libres, así como con los ácidos grasos esterificados los cuales son componentes de las membranas celulares y lipoproteínas. El óxido nítrico (ON) y las importantes especies derivadas del ON reaccionan con los ácidos grasos insaturados de cadena larga produciendo una variedad de productos denominados ácidos grasos-nitrados, nitrolípidos o nitroalquenos ($\text{NO}_2\text{-FA}$, *por Nitro-Fatty acids*) (104–109). La familia de los $\text{NO}_2\text{-FA}$ está formada por la nitración de diferentes ácidos grasos, entre ellos los más estudiados son: el ácido nitro-oleico ($\text{NO}_2\text{-OA}$), el ácido nitro-araquidónico ($\text{NO}_2\text{-AA}$), el ácido nitro-linoleico ($\text{NO}_2\text{-LA}$) y el nitro-linoleico conjugado ($\text{NO}_2\text{-CLA}$) (**Esquema 7**). Los $\text{NO}_2\text{-FA}$ han sido detectados en varios tejidos y fluidos biológicos empleando espectrometría de masa (110–112). Los $\text{NO}_2\text{-FA}$ están presentes en el plasma y orina de individuos sanos en concentraciones submicromolares ($\text{NO}_2\text{-OA}$ total en plasma 921 ± 421 nM y $\text{NO}_2\text{-LA}$ 630 ± 240 nM) (110, 113–115), sus niveles han sido descritos que aumentan durante procesos patológicos como de tipo inflamatorios, en eventos de isquemia-reperusión (116, 117), es decir, en escenarios fisiopatológicos similares a los descritos en las RP. Un trabajo recientemente publicado por *Salvatore* y col. define el nitrolipidoma urinario, destacando la presencia de nitroderivados del ácido linoleico (LA) y el ácido linoleico conjugado (CLA) (110).

Uno de los $\text{NO}_2\text{-FA}$ más estudiados es el $\text{NO}_2\text{-OA}$ (CXA-10, 10- $\text{NO}_2\text{-OA}$, ácido 10-nitro-oleico), siendo utilizado por primera vez en un ensayo clínico en pacientes con enfermedad renal aguda. Actualmente, otros ensayos clínicos se encuentran en fase II para tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar, la glomeruloesclerosis segmentaria focal y el asma (Complexa Inc.). Además, se encuentra en ensayo de fase 1B/2A (Complexa Inc.) para el tratamiento de crisis de células falciformes y enfermedad de células falciformes (118–121).

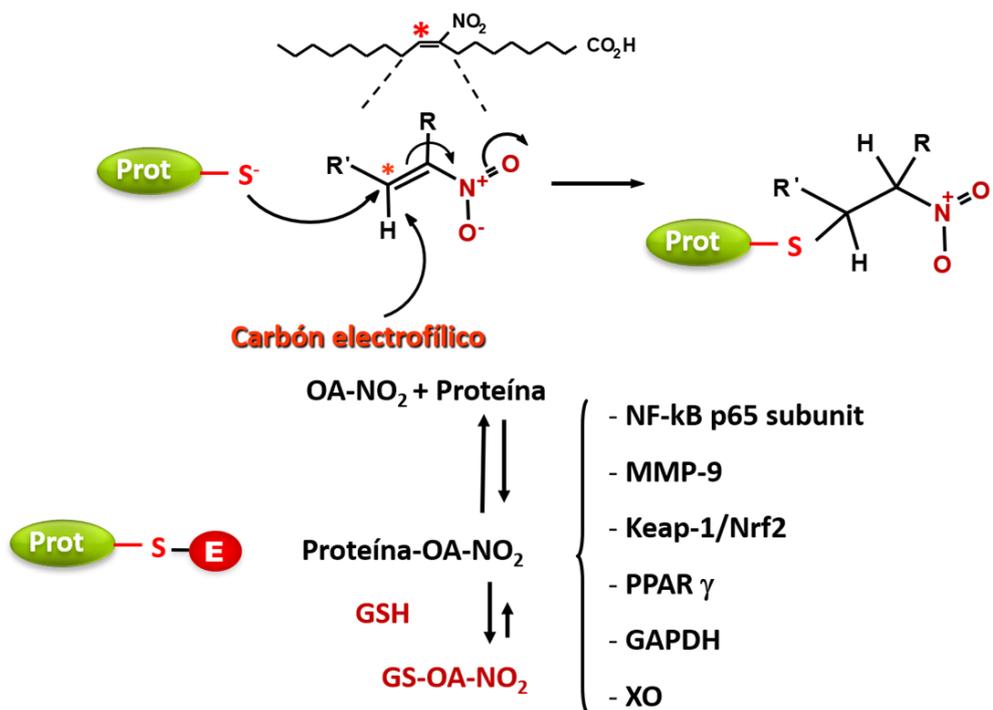


Esquema 7. Familia de los NO₂-FA. Esquema de la estructura molecular de los ácidos grasos-nitrados más estudiados.

La adición del grupo nitro (-NO₂) a un carbono del doble enlace en los ácidos grasos insaturados, genera en el β-carbono adyacente al grupo nitro una densidad de carga positiva, lo que convierte a los nitrolípidos en potentes electrófilos (**Esquema 8**). Estudios bioquímicos revelaron que los NO₂-FA se aductan a proteínas a través de la unión con los aminoácidos cisteína (Cys) e histidina (His). Esta reacción conocida como reacción de adición de Michael es rápida e irreversible en la mayoría de las proteínas estudiadas. Esta modificación postraducciona (MPT) se denominan comúnmente nitroalquilación. La formación de aductos covalentes entre los NO₂-FA y la proteína de interés, puede inducir cambios conformacionales en la proteína y, por lo tanto, también en su función o actividad catalítica (**Esquema 8**) (122–126). Ha sido ampliamente reportado que los NO₂-FA forman aductos covalentes con los residuos Cys de la proteína Keap-1 (por *Kelch-like ECH-associated protein 1*), lo que resulta en la activación del factor de transcripción Nrf2 (por *Nuclear factor erythroid 2-related factor 2*). Esta activación de Nrf2 involucra la expresión de genes responsables de funciones antioxidantes y protectoras para las células (104, 127–131). El rol y la importancia de la vía antioxidante Keap1-Nrf2 en las RP se abordará en el siguiente apartado.

También se ha descrito que los NO₂-FA son moléculas con actividad o propiedades antiinflamatorias, a través de la nitroalquilación de importantes residuos Cys de las subunidades p65 y p50 del factor de transcripción NF-κB (por *nuclear factor- κB*); lo que inhibe la translocación al núcleo del mismo y, por ende, la formación endógena de una variedad de mediadores proinflamatorios, que participan en diferentes enfermedades, incluyendo las RP (132–134). Ha sido demostrado que, tanto el NO₂-LA como el NO₂-OA inhiben la secreción de citoquinas proinflamatorias inducida por LPS en macrófagos (IL-1β, IL-6, TNF-α, MCP-1, entre otros) (133, 135).

En resumen, los NO₂-FA son lípidos bioactivos, con alta reactividad electrofílica que traducen sus acciones biológicas a través de inducción de MPT en importantes proteínas del metabolismo celular. Es por ello, que sus principales propiedades son antiinflamatorias y antioxidantes.

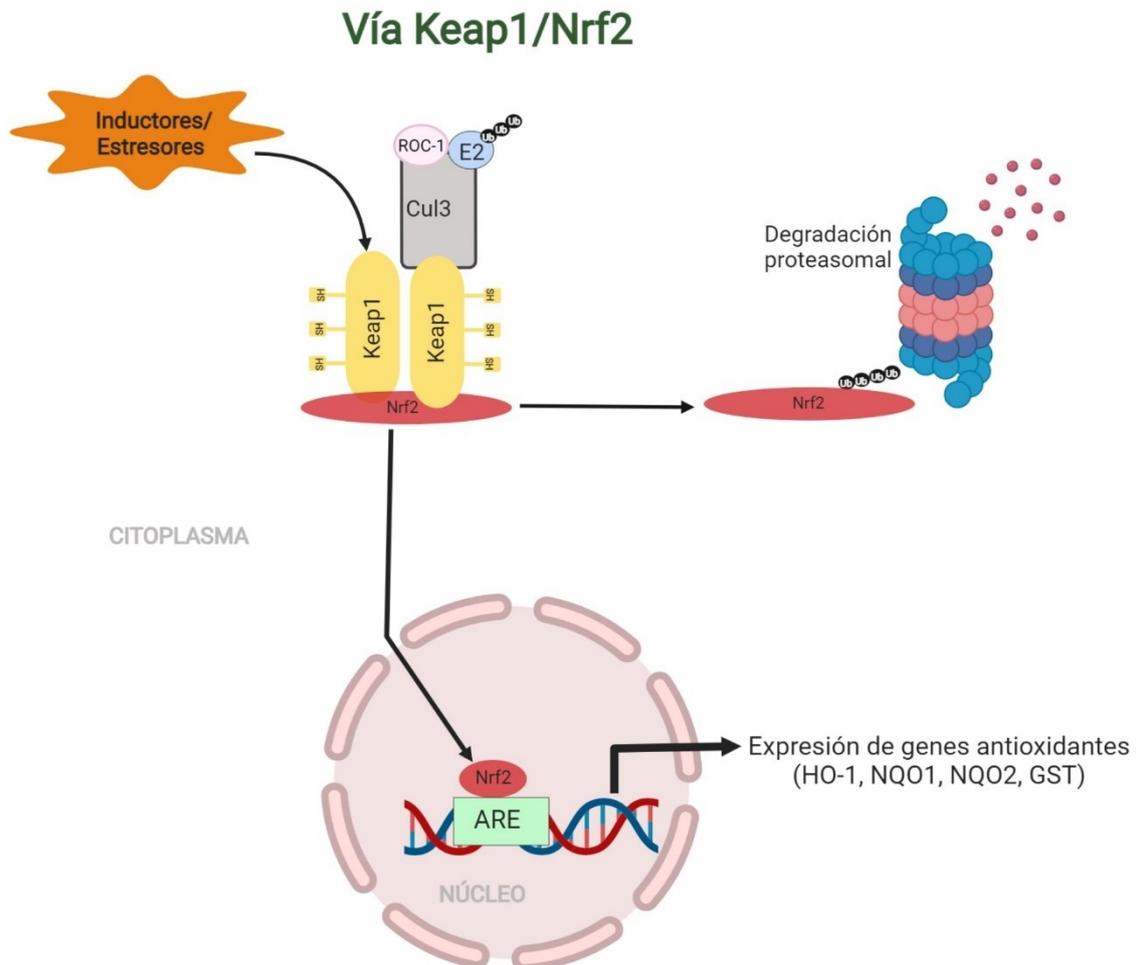


Esquema 8. Nitroalquilación. Ilustración de las modificaciones postraduccionales de proteínas de interés mediante reacción de adición de Michael.

I.VII. NO₂-FA: activación de la vía de antioxidante Keap1-Nrf2 y beneficios en RP

Nrf2 es un factor de transcripción que en situaciones fisiológicas en la célula se encuentra en su forma inactiva en el citosol, debido a la unión con su proteína inhibitoria Keap1. En efecto, la unión de Nrf2 a Keap1, lleva al factor de transcripción constantemente a degradación vía proteasomal (complejo de ubiquitinación con Cul3 E3 ligasa). Sin embargo, en situaciones de estrés oxidativo, Keap1, que funciona como un sensor de ERO y electrófilos, es modificado en algunas de sus más de 23 cisteínas lo que lleva a la liberación de Nrf2 en el citoplasma. De esta forma, Nrf2 es activado y transloca al núcleo, donde se une como un heterodímero a la región del ADN denominada elemento de respuesta antioxidante (ARE, *por antioxidant responsive element*), induciendo la expresión de enzimas detoxificantes de fase II, como hemoxigenasa-1 (HO-1), NAD(P)H quinona oxidorreductasa 1 (NQO-1), NQO-2, glutatión s-transferasa (GST), superóxido dismutasa 1 (SOD1), entre otras (**Esquema 9**). Respecto a los activadores de Nrf2, los lípidos electrofílicos reaccionan con los grupos tioles de Keap1, induciendo la liberación de Nrf2 y facilitando su acumulación en el núcleo y posterior activación de la transcripción génica (136–138). Como mencionamos anteriormente, Keap1 es altamente reactiva a la nitroalquilación por los NO₂-FA ya que constituye una proteína rica en residuos Cys (136, 137, 139–142). Diversos estudios funcionales con mutantes de Keap1 demostraron que la Cys151 es el residuo que se une

a los NO₂-FA, cuya unión provoca la disociación de Keap1 de la Cul3 ligasa, evitando la degradación proteasomal de Nrf2 y permitiendo la activación de sus genes blanco (143, 144). Sin embargo, el NO₂-OA es un activador de Nrf2 independiente de Cys151, ya que las mutantes de Keap1 Cys151 no se ven afectadas por el aumento del nitrolípido (130).



Esquema 9. Ilustración de la vía antioxidante Keap1-Nrf2. En condiciones fisiológicas, el factor de transcripción Nrf2 se encuentra acompañado con su proteína inhibidora Keap1, que lo lleva a degradación continua vía proteasomal. En situaciones de estrés celular, diferentes inductores son capaces de aductarse a Keap1 y liberar a Nrf2, para que transloque al núcleo y se una en los sitios ARE en el ADN y transcriba la expresión de genes antioxidantes.

Cabe destacar que HO-1 cataliza la degradación oxidativa del grupo hemo a biliverdina ejerciendo acciones antioxidantes y antiinflamatorias. La inducción de HO-1 es una vía citoprotectora endógena desencadenada por una variedad de señales relacionadas con el estrés y especies electrofílicas. Interesantemente, ha sido demostrado que los nitroalquenos (NO₂-LA, NO₂-OA y NO₂-CLA) inducen la expresión de HO-1 en células endoteliales (131, 145), RAW264.7 (146) y macrófagos J774.1 (147), entre otras células.

En la retina, se ha descrito el efecto protector de Nrf2 tanto en la ROP como en la RD (148–154). En particular, *Lutty GA.* y col. en el 2010 y luego *Wei* y col. en el 2016 han

resaltado la importancia de Nrf2, demostrando que ratones con ablación genética de Nrf2 (Nrf2^{-/-} KO) sometidos al modelo de OIR presentan una mayor área avascular y de NV (148, 155). Además, la administración de activadores farmacológicos de Nrf2, como dh404 y RS9, disminuyó el área avascular, el área neovascular y la permeabilidad de los vasos sanguíneos retinales (154, 156). Adicionalmente, estudios *in vitro* e *in vivo* demostraron que Nrf2 actúa sobre la célula endotelial regulando la formación de la célula *tip* y la ramificación vascular, induciendo una angiogénesis reparativa en los tejidos (32, 148, 157). Si bien se ha investigado el efecto protector sobre neuronas en otras patologías retinales (149–152), queda mucho por avanzar en el entendimiento de los mecanismos involucrados en el efecto neuroprotector del factor de transcripción Nrf2, así como su impacto sobre otros componentes afectados en las retinopatías como el estrés oxidativo, gliosis y el ambiente proinflamatorio.

Dado el efecto benéfico de la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2 en las RP, y considerando que los NO₂-FA son capaces de activar la misma, la hipótesis de este trabajo de tesis es que: **los NO₂-FA modulan la respuesta antioxidante e inflamatoria en las RP, generando una respuesta protectora sobre el estrés oxidativo, gliosis, NV prerretiniana y la neurodegeneración presente en estas patologías.**

Con el propósito de poder demostrar esta hipótesis, en este trabajo de tesis doctoral se utilizaron dos modelos experimentales: uno *in vitro*, donde se empleó principalmente una línea celular humana de CGM, las MIO-M1, y un modelo experimental murino de OIR. En el primer modelo se estudió los mecanismos moleculares responsables de mediar los efectos antioxidantes y citoprotectores de los NO₂-FA en CGM como componentes importantes en la fisio-patología de la retina, mientras que con el segundo evaluamos la respuesta protectora de los NO₂-FA sobre el daño celular y tisular inducidos en las RP.

II. Objetivos

Teniendo en cuenta los antecedentes hasta aquí mencionados, planteamos los siguientes objetivos.

II.I Objetivo General:

Identificar los mecanismos bioquímicos, celulares y moleculares involucrados en las acciones antioxidantes y citoprotectoras de los ácidos grasos-nitrados ($\text{NO}_2\text{-FA}$) en procesos proliferativos y neurodegenerativos retinales. Dado que el beneficio clínico conferido por las terapias actuales en las retinopatías es variable y los resultados no siempre preservan la función retinal, este estudio abre una nueva perspectiva relacionada a posibles estrategias terapéuticas que normalicen la vasculatura y conserven el componente glial y neuronal en la retina.

II.II Objetivos Específicos:

II.II Modelo *in vitro*:

En CGM humanas (MIO-M1) y en células endoteliales (BAEC), se pretende:

- a) Demostrar el efecto antioxidante y citoprotector del ácido nitro-oleico ($\text{NO}_2\text{-OA}$), en eventos característicos de las retinopatías (hipoxia, gliosis, aumento de citoquinas proinflamatorias, estrés oxidativo, angiogénesis).
- b) Determinar los mecanismos moleculares responsables de mediar los efectos antes indicados.

II.III Modelo *in vivo*:

- a) Estudiar el efecto antioxidante del $\text{NO}_2\text{-OA}$ en el modelo de Retinopatía Inducida por Oxígeno (OIR) mediante la activación del sistema de defensa antioxidante endógeno (vía Keap1-Nrf2).
- b) Determinar el efecto citoprotector del $\text{NO}_2\text{-OA}$ en los procesos de neovascularización y neurodegeneración presentes en la retina de animales OIR a través de estudios funcionales (ERG) e histológicos.

III. Resultados

Modelo “in vitro”

III.I. Efecto de NO₂-OA sobre la viabilidad de las CGM

Con el objetivo de encontrar concentraciones del NO₂-OA que no afectaran la viabilidad celular a tiempos prolongados, se realizaron ensayos de viabilidad con sales de tetrazolio (MTT). Para ello, células MIO-M1 fueron estimuladas con vehículo o concentraciones crecientes del NO₂-OA por 24, 48 y 72 hs. Además, se utilizó como control al ácido oleico (OA, por *Oleic Acids*) como contraparte no electrofílica del NO₂-OA. El tratamiento de las células MIO-M1 con vehículo (metanol) o 0,1 – 5 μM de NO₂-OA durante 24, 48 y 72 hs no mostró una reducción significativa de la viabilidad celular ($p > 0,05$) en comparación con los controles sin tratamiento o el vehículo y OA (**Figura 1**).

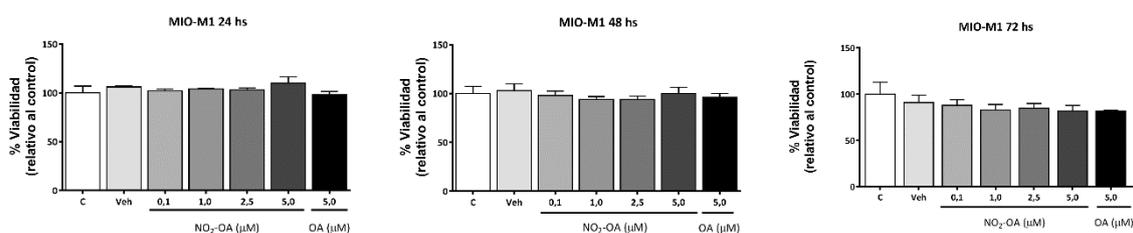


Figura 1. Efecto de concentraciones crecientes de NO₂-OA (0,1 a 5,0 μM) sobre la viabilidad de las células MIO-M1 luego de 24, 48 y 72 hs de tratamiento. Los gráficos de cuantificación indican el porcentaje de células viables respecto al control. Los datos se presentan como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA a una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las condiciones evaluadas. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

III.II. NO₂-OA induce la expresión proteica de HO-1 en CGM

Estudios previos de ácidos grasos-nitrados o nitrolípidos han demostrado la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2 en varios tipos de células y tejidos: células endoteliales (131, 145), macrófagos (146), tejido renal y cardíaco (117, 158–161), entre otros. Dado que la activación de Nrf2 tiene un efecto citoprotector y antiinflamatorio en el tejido retinal (148–156), nos interesó evaluar el efecto del NO₂-OA en las CGM, principales encargadas de preservar la estructura y funcionalidad retinal durante las RP.

Con el propósito de evaluar si el NO₂-OA era capaz de activar la vía antioxidante Keap1-Nrf2 en las células gliales MIO-M1, se midió la expresión de HO-1, un gen blanco de Nrf2, por ensayos de *Western Blot*. Con este fin, células MIO-M1 fueron estimuladas con las mismas concentraciones de NO₂-OA descritas en el ensayo de viabilidad (0,1 – 5 μM) durante 8 y 16 hs. Como se puede observar en la **Figura 2 A**, el NO₂-OA aumentó significativamente la expresión de HO-1, de manera dependiente de la concentración, no observándose cambios con el OA a los tiempos evaluados. El análisis cuantitativo (**Figura 2 B**), mostró que la mayor diferencia se produjo a la concentración de 5 de μM

NO₂-OA, alcanzando un máximo a las 8 hs para luego comenzar a decaer a las 16 hs (Figura 2 C).

En función de estos resultados, seleccionamos la concentración de 5 μM de NO₂-OA para los estudios *in vitro* pues cumple con la condición de no afectar la viabilidad celular e inducir una mayor expresión de HO-1.

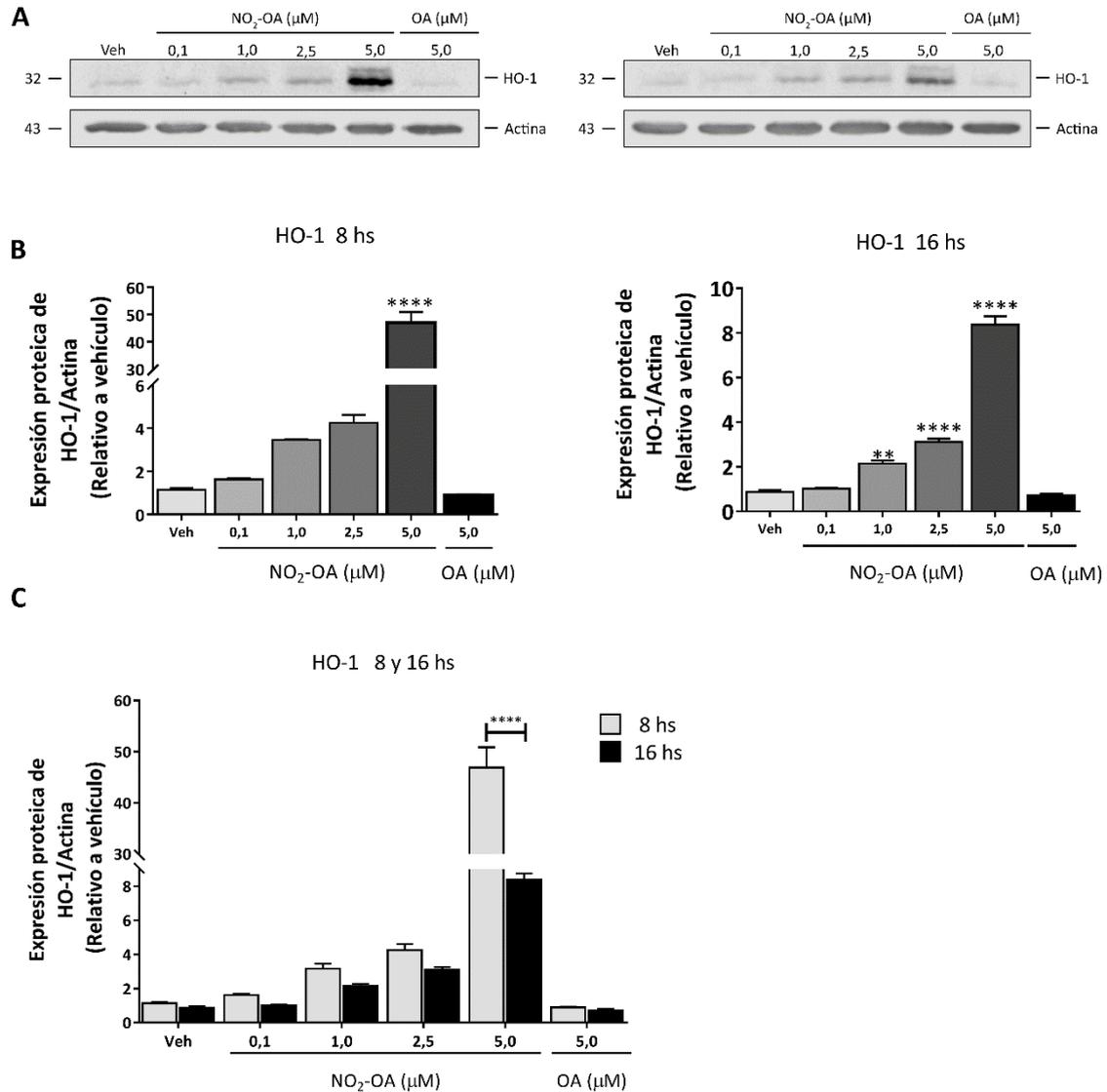


Figura 2. Efecto de NO₂-OA sobre la expresión proteica de HO-1 en células MIO-M1. **A)** Ensayo de *Western blot* de lisados obtenidos de células MIO-M1 estimuladas con diferentes concentraciones del NO₂-OA (0,1 – 5 μM) durante 8 y 16 hs, revelados empleando un anticuerpo anti HO-1. **B)** Cuantificación por densitometría de los niveles de HO-1 normalizados a β-actina. Los datos se presentan como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett. **C)** Correlación de la expresión de HO-1 con la concentración y el tiempo de estímulo de NO₂-OA. Los datos se presentan como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni. **p < 0,01, ****p < 0,0001. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes.

III.III. NO₂-OA activa la vía de señalización antioxidante Keap1-Nrf2 en CGM

Habiendo evidenciado que el NO₂-OA indujo la expresión proteica de HO-1, a continuación, evaluamos la inducción a niveles transcripcionales utilizando el ensayo de qRT-PCR. Para ello, células MIO-M1 fueron incubadas con vehículo, 5 μM de NO₂-OA o 5 μM de OA por 4 hs. En la **Figura 3 A** se puede observar un aumento estadísticamente significativo en la expresión transcripcional de HO-1 luego del estímulo con 5 μM de NO₂-OA mientras que el OA no tuvo efecto a la concentración evaluada.

Con el propósito de evaluar si el incremento en la expresión de HO-1 era mediado por la vía antioxidante Keap1-Nrf2, se utilizó trigonelina, un conocido y potente inhibidor de Nrf2 (162–166). Para ello, las células MIO-M1 se pre-incubaron con 1 y 25 μM de trigonelina durante 1 h, y luego se estimularon con 5 μM de NO₂-OA durante 4 hs. La cuantificación del ensayo muestra que el incremento en la expresión transcripcional de HO-1 inducido por NO₂-OA, se redujo significativamente en las células MIO-M1 pre-tratadas con trigonelina (**Figura 3 B**). Cabe aclarar, que se utilizaron 2 concentraciones de trigonelina de acuerdo a lo descrito en la bibliografía obteniendo una inhibición más marcada con 1 μM. En su conjunto, estos resultados demuestran que el NO₂-OA induce la expresión de HO-1 a través de la activación de la vía Keap1-Nrf2 como lo sugiere la utilización de trigonelina, sin embargo, un porcentaje (50%) de la expresión de HO-1 por NO₂-OA parece ser independiente de Nrf2.

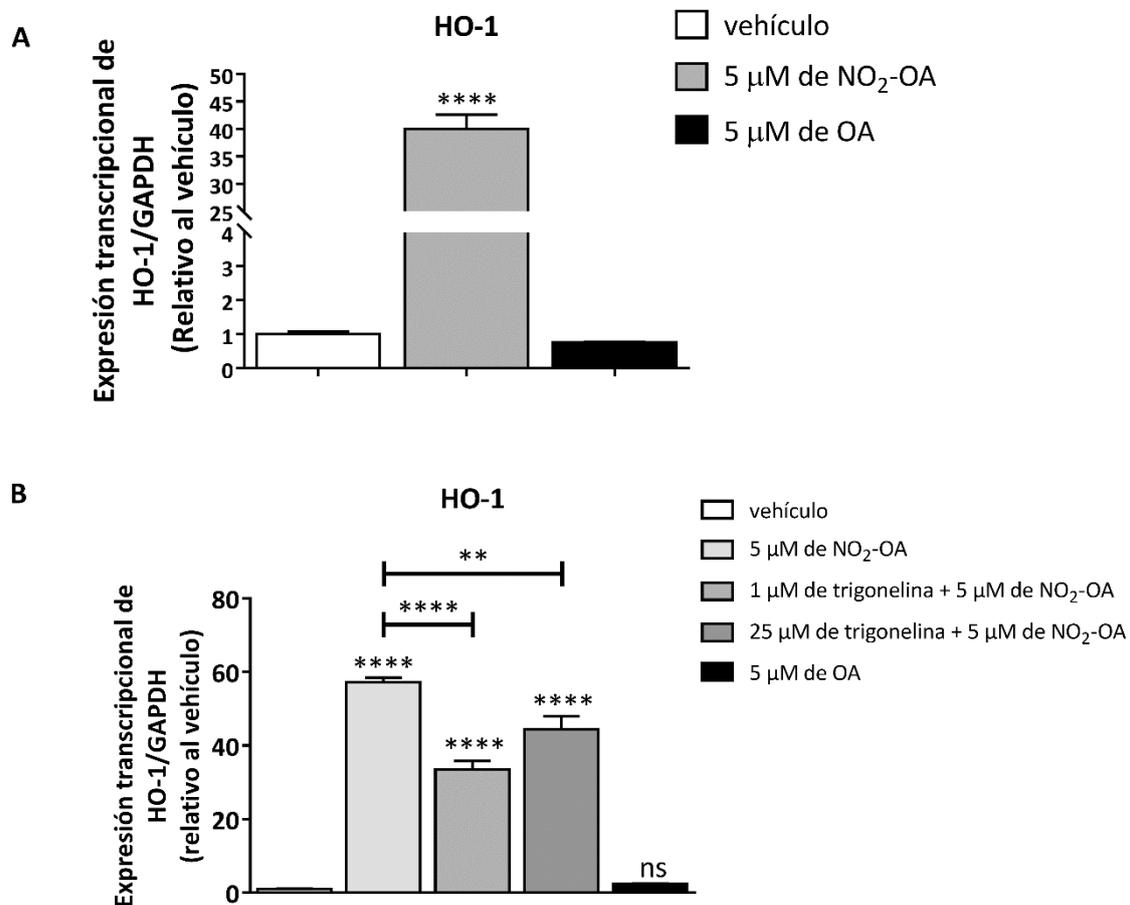


Figura 3. Efecto de NO₂-OA sobre la vía Keap1-Nrf2 en células MIO-M1. A) La expresión del ARNm de HO-1 se realizó por qRT-PCR en células MIO-M1 luego del estímulo con vehículo, 5 μM de NO₂-OA o 5 μM de OA por 4 hs. Los resultados se normalizaron a GAPDH y se expresaron de acuerdo al método 2-ΔΔCt utilizando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de células MIO-M1 tratadas con vehículo. Los datos se presentan como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de comparación múltiple de Dunnett. ns, no significativo, **p < 0,01, **** p < 0,0001. **B)** Efecto de trigonelina sobre la expresión de HO-1 por NO₂-OA. El gráfico muestra la cuantificación del ARNm de HO-1 mediante qRT-PCR. Los resultados se normalizaron a GAPDH y se expresaron de acuerdo al método 2-ΔΔCt utilizando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de células MIO-M1 controles (vehículo). Los datos se presentan como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba posterior de comparación múltiple de Tukey. ns, no significativo, **p < 0,01, **** p < 0,0001. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes.

III.IV. NO₂-OA previene el incremento de ERO inducido por LPS o PMA en CGM

Trabajos previos han demostrado que tanto el estrés oxidativo como la inflamación están involucrados en las alteraciones vasculares y la degeneración neuronal presentes en las RP, aunque no se conozca exactamente si uno es consecuencia del otro o quién es el que inicia con las alteraciones (28, 38, 42). Dado que la acumulación de ERO promueve modificaciones deletéreas en proteínas, lípidos y ADN que inducen daño, estrés o muerte celular, a continuación, examinamos el efecto del NO₂-OA sobre las células retinales expuestas a estrés oxidativo. Para ello, células MIO-M1 fueron preincubadas con 5 μM de NO₂-OA durante 6 hs y luego tratadas con PMA o LPS por 30 min para estimular la activación celular y la generación de ERO, es importante destacar que estos estímulos también inducen vías inflamatorias, pero a los 30 min no afectaría a las mismas. Mediante citometría de flujo se determinaron los niveles de ERO utilizando la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA). Como se puede observar en la **Figura 4 A y B**, la media geométrica de la intensidad de fluorescencia aumentó significativamente para las células tratadas con PMA y LPS en comparación con las células control, es decir, hay un incremento de las ERO (p< 0,001). Sin embargo, el tratamiento con NO₂-OA evitó el aumento inducido por ambos estímulos (LPS o PMA) (p>0,05) (**Figura 4 A y B**). Estos resultados sugieren el papel protector del NO₂-OA frente al estrés oxidativo inducido por diferentes estímulos en las CGM.

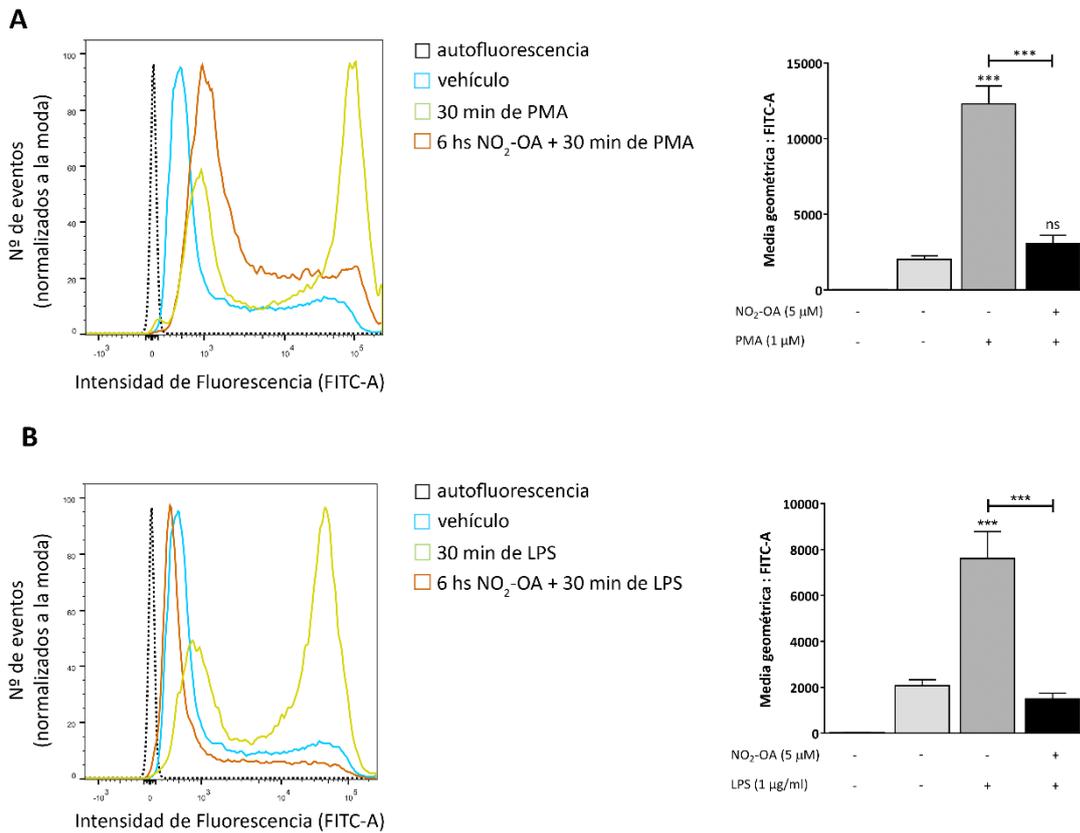


Figura 4. Efecto de NO₂-OA sobre los niveles de ERO inducidos por LPS o PMA en células MIO-M1. A y B) Histograma representativo de la intensidad de fluorescencia de la sonda DCF-DA. Células MIO-M1 fueron tratadas con 5 µM de NO₂-OA durante 6 hs y luego estimuladas con LPS o PMA por 30 min. Los niveles de ERO fueron determinados por citometría de flujo usando la sonda DCF-DA. Gráfico de la media geométrica de intensidad de fluorescencia de CGM con la sonda DCF-DA, en cada condición estudiada. Los datos están presentados como la media ± SEM y analizados estadísticamente mediante ANOVA a una vía seguidos por el post test de Tukey. ns no significativo, *** p < 0.001. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes.

III.V. NO₂-OA revierte el estrés glial inducido por α₂-Macroglobulina en CGM

Ha sido demostrado que durante el desarrollo de la RP se producen alteraciones en la permeabilidad de la barrera hematorretiniana interna que permite la extravasación de proteínas plasmáticas como α₂-Macroglobulina (α₂M) (167). En nuestro laboratorio previamente se demostró que α₂M induce gliosis tanto *in vitro* como *in vivo* en CGM, lo cual se evidencio por el aumento de GFAP (102). Con el propósito de evaluar si el NO₂-OA podría prevenir estrés glial, células MIO-M1 fueron pre-incubadas en presencia o ausencia de 5 µM de NO₂-OA durante 30 min y luego tratadas con 60 nM de α₂M* a diferentes tiempos (2, 4 y 6 hs). La concentración seleccionada de α₂M representa la concentración de proteína encontrada en el humor vitreo de pacientes con RP (101). Mediante ensayos de *Western blot*, se midieron los niveles de expresión de las proteínas

GFAP y vimentina, otra proteína constituyente de filamentos intermedios. Como control positivo del tratamiento con NO₂-OA, se evaluó la expresión de HO-1. Como puede observarse en la **Figura 5 A**, α₂M* aumentó significativamente la expresión de GFAP, vimentina y HO-1. El análisis cuantitativo (**Figura 5 B**) mostró que la expresión de GFAP incrementó a las 2 hs de incubación, manteniéndose este incremento hasta las 6 hs de estimulación con α₂M*. Además, la expresión de vimentina alcanzó un máximo a las 2 hs y persistió en el tiempo hasta las 6 hs de incubación con α₂M* respecto al control. En el ensayo, también se observó un incremento significativo en la expresión de HO-1 después de 4 hs, manteniéndose hasta las 6 hs de estimulación con α₂M*. Por otro lado, cuando se pre-trataron las células MIO-M1 con 5 μM de NO₂-OA previo al estímulo con α₂M*, observamos que los niveles de expresión de GFAP y vimentina decaen rápidamente a niveles del control a las 6 hs (p>0,05). Sin embargo, el pre-tratamiento con el NO₂-OA no impidió el aumento de los marcadores de gliosis a las 2 y 4 hs. Además, en concordancia con resultados previamente mostrados NO₂-OA indujo la expresión de HO-1 de manera dependiente del tiempo (**Figura 2 A**). Éste incremento podría ser el responsable de prevenir la gliosis. En resumen, estos datos indican que α₂M* induce gliosis en CGM y que el pre-tratamiento con NO₂-OA previene el incremento en los niveles de expresión de GFAP y vimentina.

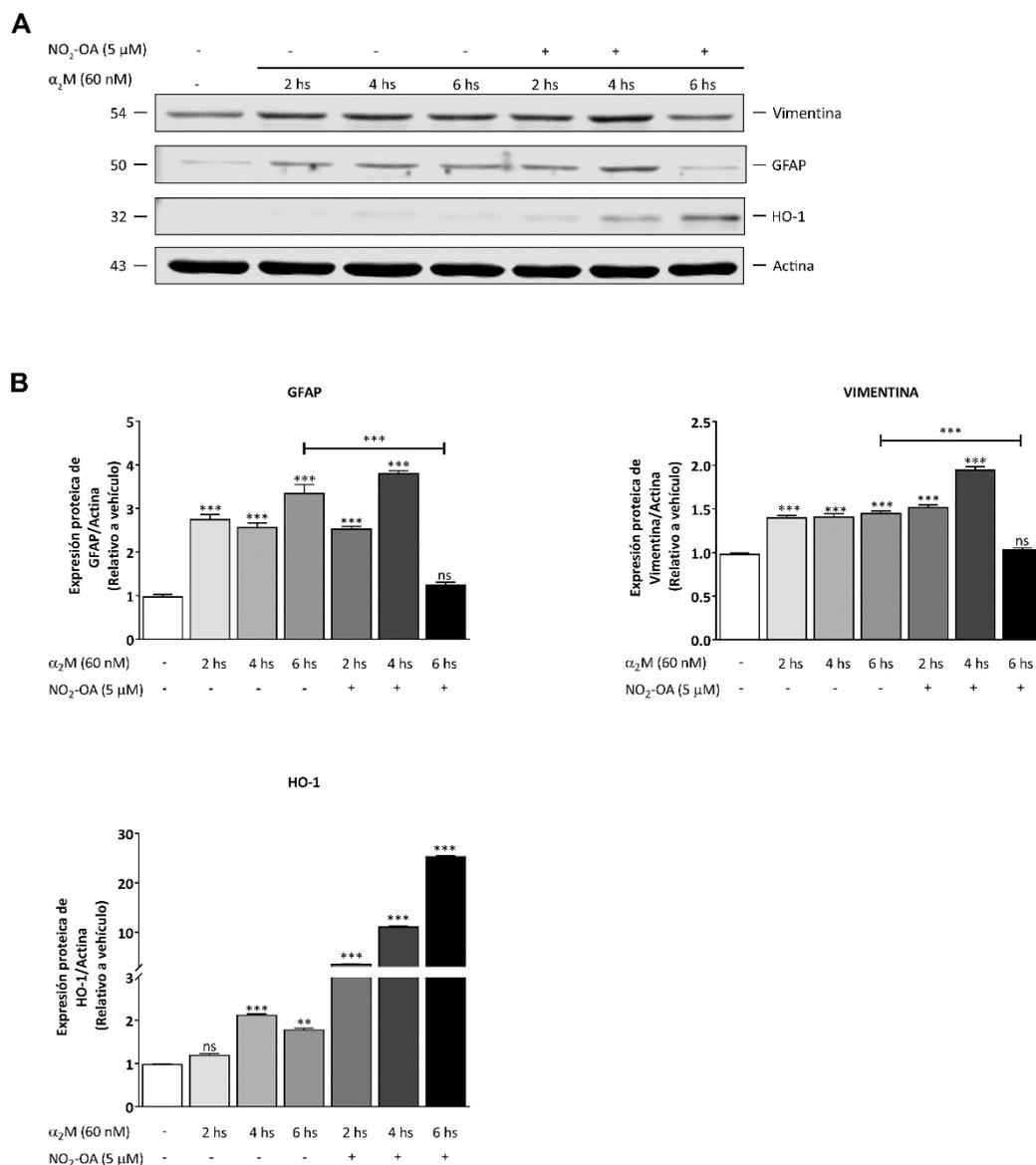


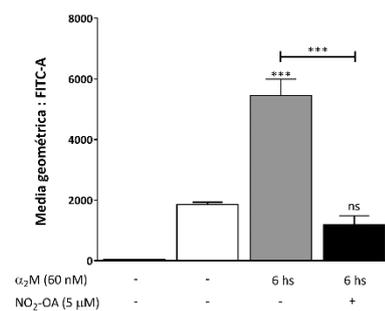
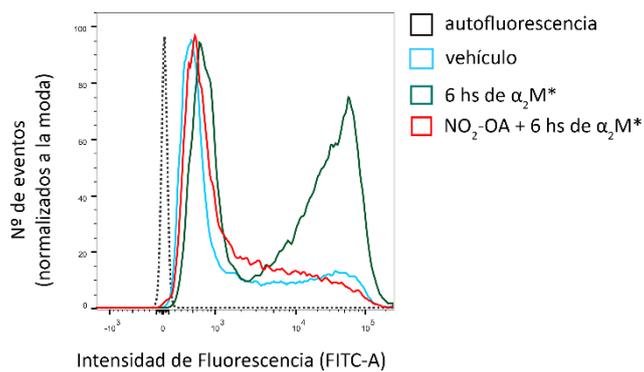
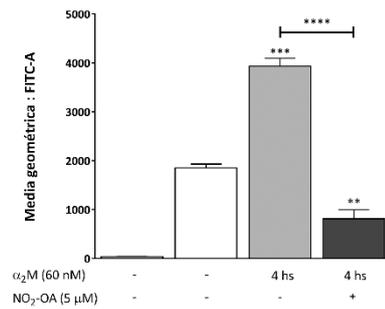
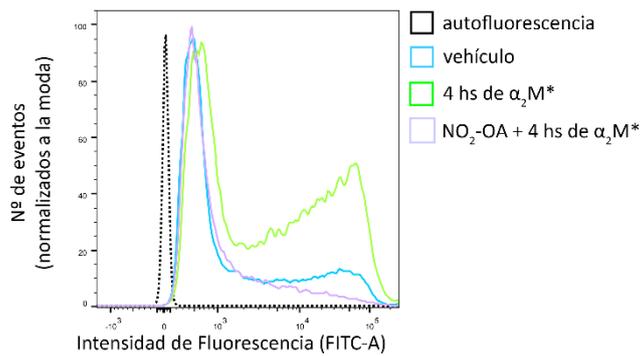
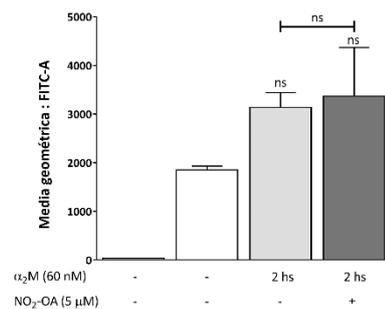
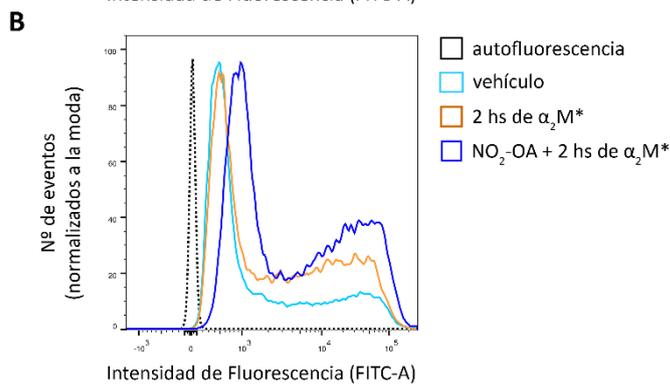
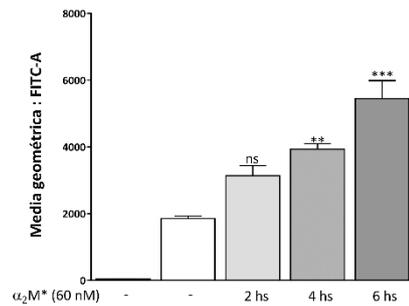
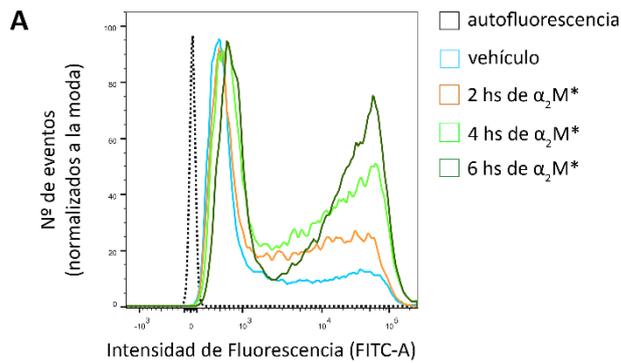
Figura 5. Efecto de NO₂-OA sobre el estrés glial inducido por α₂M* en células MIO-M1. A) Ensayo de *Western blot* de lisados de células MIO-M1 tratadas en presencia o ausencia de 5μM de NO₂-OA por 30 min previo al estímulo con α₂M* por 2, 4 y 6 hs fueron revelados empleando anticuerpos anti Vimentina, GFAP y HO-1. **B)** Cuantificación por densitometría de los niveles de Vimentina, GFAP y HO-1 normalizados a β-actina. Los datos están presentados como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA a una vía seguidos por el post test de Tukey. ns, no significativo **p < 0.01, *** p < 0.001. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes.

III.VI. NO₂-OA previene el incremento de ERO inducido por α₂M en CGM

Dado que α₂M* incrementó la expresión de la proteína antioxidante HO-1, evaluamos si α₂M* aumenta los niveles de ERO y de esta manera induce la gliosis en las CGM. Para

ello, células MIO-M1 fueron incubadas con α_2M^* (60nM) a los mismos tiempos descritos en el experimento anterior (2, 4 y 6 hs) y los niveles de ERO medidos usando la sonda DCF-DA por citometría de flujo (**Figura 6 A**). El análisis cuantitativo de la intensidad de fluorescencia media (media geométrica) mostró que α_2M^* aumentó significativamente los niveles de ERO de manera tiempo dependiente. Posteriormente nos preguntamos si el NO₂-OA podría prevenir el incremento en los niveles de ERO inducidos por α_2M^* . Para ello, células MIO-M1 fueron pre-tratadas en presencia o ausencia de 5 μ M de NO₂-OA durante 30 min y luego incubadas con 60 nM de α_2M^* a 2, 4 y 6 hs. Cuando analizamos las medias geométricas, observamos que el pre-tratamiento con NO₂-OA previno el aumento de los niveles de ERO inducidos por α_2M^* a las 4 y 6 hs con respecto a los niveles basales del control (**Figura 6 B**). Además, se evaluó el efecto, *per se*, del NO₂-OA sobre los niveles de ERO (**Figura 6 C**). Del análisis de la intensidad de fluorescencia media se puede observar que NO₂-OA no afectó significativamente los niveles de ERO basales de las células MIO-M1 y se podría sugerir que hay una tendencia a disminuirlas.

Estos hallazgos indican que α_2M^* tendría un efecto deletéreo sobre las células MIO-M1 aumentando los niveles de ERO y el NO₂-OA previene este incremento.



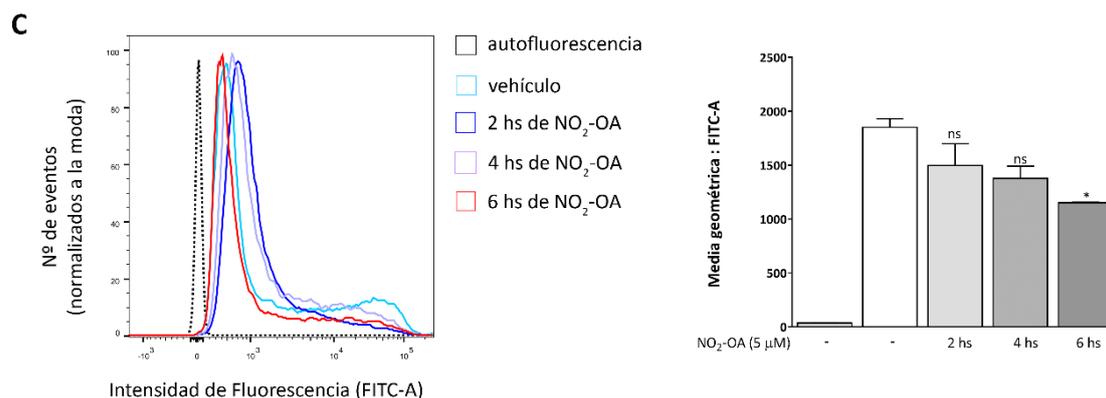


Figura 6. Efecto de NO₂-OA sobre los niveles de ERO inducidas por α_2M^* en células MIO-M1.

A) Células MIO-M1 fueron tratadas con α_2M^* por 2, 4 y 6 hs. Los niveles de ERO fueron medidos por citometría de flujo usando la sonda DCF-DA. Cuantificación de la intensidad de fluorescencia media (media geométrica). **B)** Células MIO-M1 fueron pre-tratadas o no con NO₂-OA por 30 min previo al estímulo con α_2M^* por 2, 4 y 6 hs. Los niveles de ERO fueron medidos con el ensayo DCF-DA. **C)** Células MIO-M1 fueron tratadas con NO₂-OA por 2, 4 y 6 hs. Los niveles de ERO fueron medidos con la sonda DCF-DA. **A, B y C)** Histograma representativo de la intensidad de fluorescencia de la sonda DCF-DA (FITC) y gráficos representando la media geométrica en cada condición estudiada. Los datos están presentados como la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA a una vía seguidos por el post-test de Tukey. ns no significativo, **p < 0.01, *** p < 0.001. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes.

III.VII. NO₂-OA reduce la expresión de VEGF-A bajo condiciones de hipoxia y proinflamatorias en CGM

Dado que las CGM son las principales moduladoras del proceso angiogénico al incrementar la secreción de factores proangiogénicos, como VEGF en las RP (29, 36, 37, 168) a continuación, nos propusimos evaluar la capacidad del NO₂-OA de modular los niveles de VEGF en las CGM. Con el fin de reproducir las condiciones hipóxicas y proinflamatorias de las RP, células MIO-M1 fueron incubadas en normoxia (21 % de O₂) o hipoxia (1 % de O₂) y 20 ng/ml de IL-1 β en presencia o ausencia de 5 μ M de NO₂-OA durante 24 hs. La expresión transcripcional de VEGF-A fue determinada por qRT-PCR (**Figura 7**). El análisis cuantitativo en condiciones de normoxia reveló que mientras el NO₂-OA, *per se*, no afectó la expresión génica de VEGF-A, la estimulación con IL-1 β indujo un ligero aumento. Por otro lado, en condiciones de hipoxia se observó un aumento significativo en los niveles del transcripto de VEGF-A y el tratamiento con NO₂-OA no fue capaz de modular este aumento. Sorprendentemente, bajo condiciones de hipoxia y estímulos proinflamatorios (IL1- β), el aumento en la expresión de VEGF-A fue mayor que el observado solo con hipoxia y el NO₂-OA redujo significativamente este aumento (hipoxia + IL1- β + NO₂-OA). Por lo tanto, en este ensayo demostramos que el tratamiento con NO₂-OA no afectó la expresión del ARNm de VEGF-A en hipoxia, pero

en condiciones de hipoxia y proinflamatorias (presentes en RP), el NO₂-OA redujo significativamente los niveles de ARNm de VEGF-A en CGM.

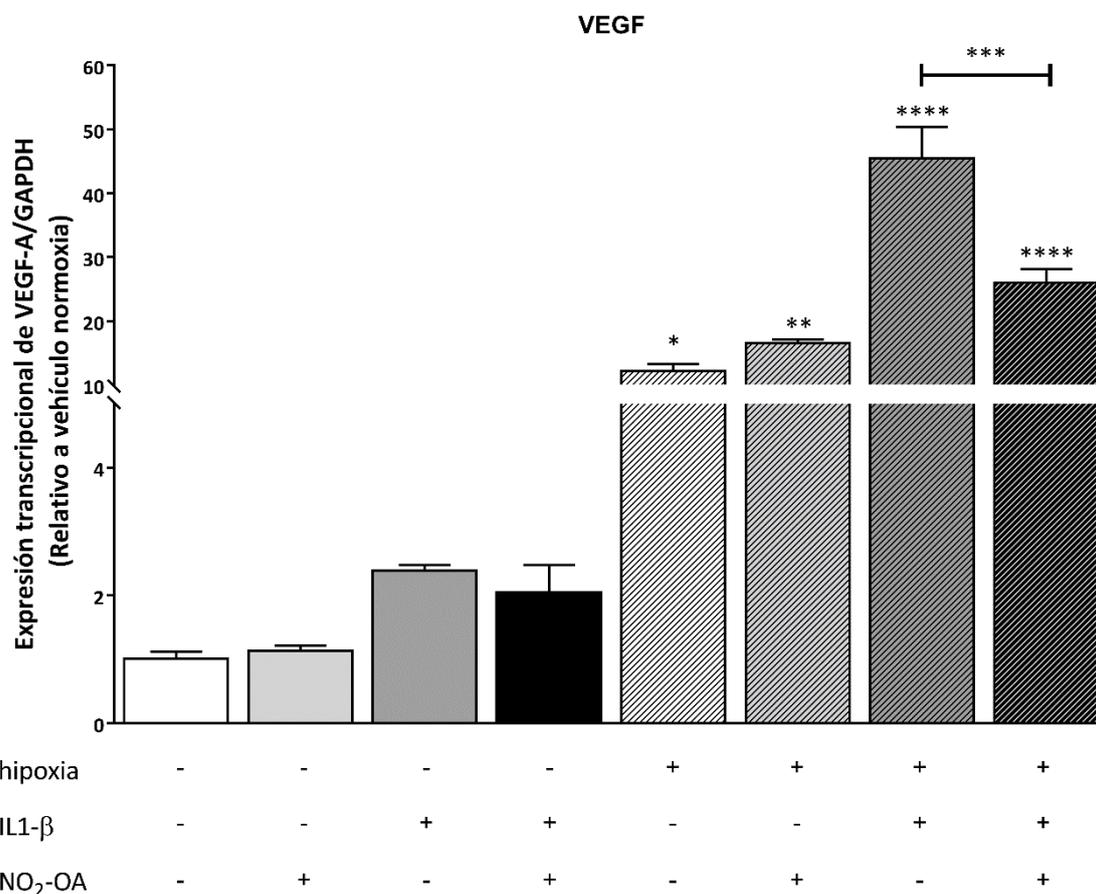


Figura 7. Efecto de NO₂-OA sobre la expresión de ARNm de VEGF-A bajo condiciones hipóxicas y proinflamatorias en células MIO-M1. El ARNm de VEGF-A se cuantificó mediante qRT-PCR en células MIO-M1 tratadas con o sin 5 μM de NO₂-OA y 20 ng/ml de IL-1β, bajo condiciones de normoxia o hipoxia durante 24 hs. Los resultados se normalizaron a GAPDH y se expresaron de acuerdo al método 2-ΔΔCt utilizando como calibrador el nivel de ARNm obtenido del control normoxia. Los datos se presentan como la media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA a una vía seguidos por el post test de comparación múltiple de Tukey. *p < 0,05, **p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0,0001. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes.

III.VIII. NO₂-OA modula la angiogénesis in vitro mediante la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2

Las células endoteliales tienen un papel clave en el proceso de NV en las RP (36), por lo que evaluamos si el tratamiento con el NO₂-OA podría tener un impacto directo en la tubulogénesis. Para ello, células BAEC fueron sembradas en Matrigel y tratadas con vehículo (DMSO) o 5 μM de NO₂-OA con el agregado de VEGF (10ng/ml). Como control de inhibición de la tubulogénesis se utilizó 30 μM de suramina sódica. A través del

análisis morfológico de los túbulos por microscopia de contraste de fases pudimos observar, una reducción significativa de la tubulogénesis en las células incubadas con 5 μM de $\text{NO}_2\text{-OA}$ en comparación con las células control (vehículo) con el agregado de VEGF (**Figura 8 A**). El análisis cuantitativo mostró que el $\text{NO}_2\text{-OA}$ disminuyó significativamente el número de polígonos, el número de nodos y la longitud total de los túbulos en las condiciones evaluadas (**Figura 8 B**). Esos cambios no fueron observados con el vehículo. En concordancia con estos hallazgos, el $\text{NO}_2\text{-OA}$ mostró un aumento significativo en el porcentaje de inhibición de la tubulogénesis respecto al vehículo en las células BAEC (**Figura 8 C**). Para evaluar si el efecto antiangiogénico del $\text{NO}_2\text{-OA}$ era mediado por la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2, utilizamos trigonelina. El análisis cuantitativo mostró que 1 μM de trigonelina restauró el número de polígonos, el número de nodos y la longitud total de los tubos a los niveles del control (**Figura 8 B**). En resumen, estos resultados sugieren un efecto antiangiogénico beneficioso del $\text{NO}_2\text{-OA}$ en patologías como las RP, donde hay un incremento descontrolado de factores proangiogénicos como VEGF que produce una angiogénesis alterada y no funcional (NV prerretiniana).

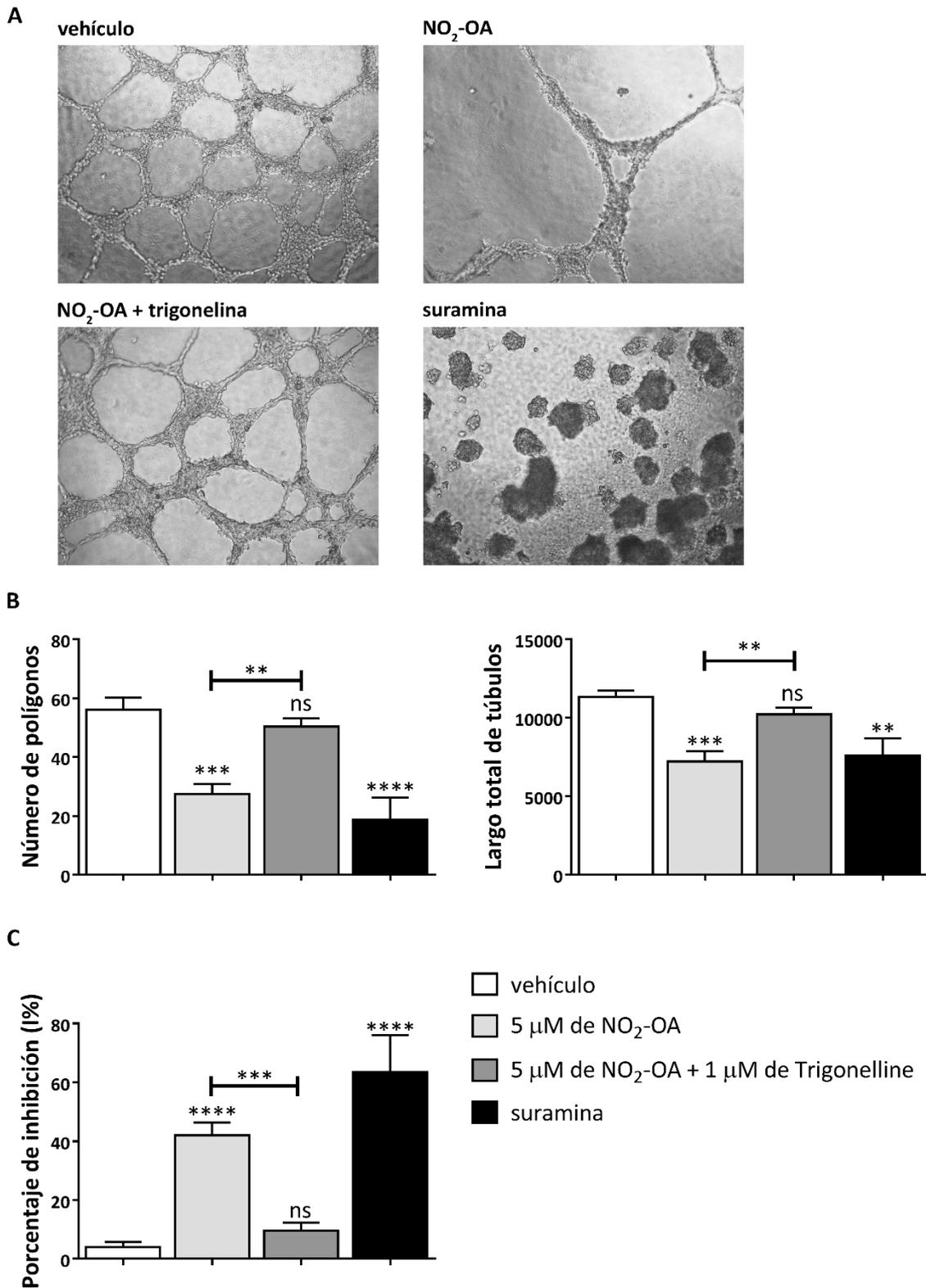


Figura 8. Efecto de NO₂-OA en el ensayo de formación de túbulos en células BAEC. A) Imágenes de contraste de fases representativas del ensayo de tubulogénesis. Se colocaron células BAEC ($\approx 1,5 \times 10^4$ células) en una placa de 96 pocillos previamente recubierta con 30 μ l de matrigel y se incubaron durante 18 hs en presencia o ausencia de 5 μ M de NO₂-OA o 5 μ M de NO₂-OA + trigonelina con la adición de VEGF (10 ng/ml). Se usó 30 μ M de suramina sódica como control de inhibición de tubulogénesis. Se realizaron simultáneamente controles con y sin vehículo. **B)**

Cuantificación del número de polígonos, número de nodos y la longitud total de los segmentos en las condiciones evaluadas utilizando el Software Image J Fiji Angiogenesis Analyser. **C)** Se cuantificaron las estructuras tubulares y se calcularon los porcentajes de inhibición (I%) $I\% = [1 - (\text{Tratamiento de longitud total del tubo} / \text{Control de longitud total del tubo})] \times 100$. Los datos se presentan como media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA a una vía seguidos por el post test de comparación múltiple de Tukey. ns no significativo, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0,0001$. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Para demostrar que este efecto del NO₂-OA sobre la tubulogénesis no fue mediado por muerte celular de las células BAEC, decidimos evaluar la viabilidad celular mediante un ensayo de MTT. Para ello, células BAEC fueron expuestas a concentraciones crecientes de NO₂-OA (0,39 a 50,0 μM) durante 24 hs. Como podemos observar en la **Figura 9**, concentraciones de 12,5 μM de NO₂-OA y superiores afectan significativamente la viabilidad de las células BAEC, mientras que concentraciones menores la preservan respecto al control. Estos resultados, en su conjunto, sugieren que el NO₂-OA modula eventos vasoproliferativos retinales mediante la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2.

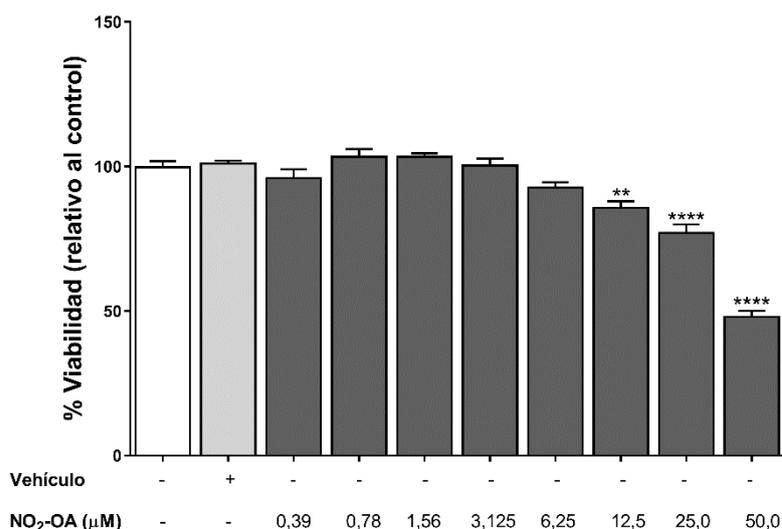


Figura 9. Efecto de 0,39 a 50,0 μM de NO₂-OA sobre la viabilidad de las células BAEC luego de 24 hs de tratamiento. Los gráficos de cuantificación indican el porcentaje de células viables respecto al control. Los datos se presentan como la media \pm SEM y fueron analizados mediante ANOVA a una vía seguido de la prueba posterior de Dunnett. ** $p < 0.01$, **** $p < 0,0001$. Se muestran los resultados de al menos tres experimentos independientes realizados por triplicado.

CONCLUSIONES DEL MODELO “IN VITRO”:

En esta etapa de la tesis demostramos que el NO₂-OA sobre las CGM:

- ✓ No afecta la viabilidad celular en los tiempos y concentraciones evaluadas;
- ✓ Induce la expresión proteica y transcripcional de HO-1;
- ✓ Activa la vía de señalización antioxidante Keap1-Nrf2;
- ✓ Previene el aumento de los niveles de ERO inducidos por los estímulos de LPS o PMA;
- ✓ Reduce la gliosis inducida por α_2M^* ;
- ✓ Previene el aumento de ERO inducido por α_2M^* ;
- ✓ Atenúa el incremento en la expresión transcripcional de VEGF-A inducido por condiciones proinflamatorias (IL1- β) e hipoxia;
- ✓ Inhibe la formación de estructuras tubulares tridimensionales, a través de la vía Keap-Nrf2, en células endoteliales estimuladas con VEGF.

IV. Resultados

Modelo “in vivo”

IV.I. NO₂-OA induce la expresión transcripcional de NQO1 y SOD1 en retina de ratones wild type C57BL/6

Dado que en el modelo *in vitro* demostramos que la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2 inducida por el NO₂-OA fue beneficiosa para las CGM, el objetivo de esta primera etapa experimental en un modelo animal, fue evaluar el efecto del NO₂-OA en la retina luego de la administración intraocular (i.o.). Con este propósito, la activación de genes *downstream* o aguas abajo de Nrf2 fueron medido por qRT-PCR. Para ello, ratones C57BL/6 *wild type* adultos fueron inyectados i.o. con una solución conteniendo 50 o 10 µM de NO₂-OA o vehículo, y fueron sacrificados 6 hs post-inyección. Las concentraciones de NO₂-OA fueron elegidas en función de los resultados *in vitro* antes expuestos, dado que la mejor respuesta de las CGM se observó con 5 µM de NO₂-OA, y teniendo en cuenta que la dilución en la cavidad vítrea es 1:10, elegimos inyectar 1 µl de la solución conteniendo 50 µM o 10 µM de NO₂-OA. Los resultados mostrados en la **Figura 10 A**, indican que la concentración de 50 µM de NO₂-OA incrementó significativamente la expresión transcripcional de la enzima antioxidante NQO1, mientras que no se observaron cambios con 10 µM respecto al control (vehículo). A partir de estos resultados en ratones adultos y con el objetivo de evaluar *a posteriori* el efecto de NO₂-OA en el modelo de OIR, ratones C57BL/6 *wild type* en el día post-natal 12 (P12) fueron inyectados i.o. con 50 µM de NO₂-OA o i.p. 15 mg/Kg de NO₂-OA y los respectivos grupos control inyectados con vehículo. En estos animales también se evaluó la expresión de las enzimas antioxidantes SOD1 y NQO1 mediante qRT-PCR. Interesantemente, la administración del NO₂-OA por ambas vías incrementó significativamente la expresión transcripcional de las enzimas antioxidantes NQO1 y SOD1 respecto al control inyectado con vehículo (**Figura 10 B**). Por lo tanto, estos resultados sugieren que el NO₂-OA induce la expresión transcripcional de enzimas antioxidantes como NQO1 y SOD1 en retinas de ratones *wild type*.

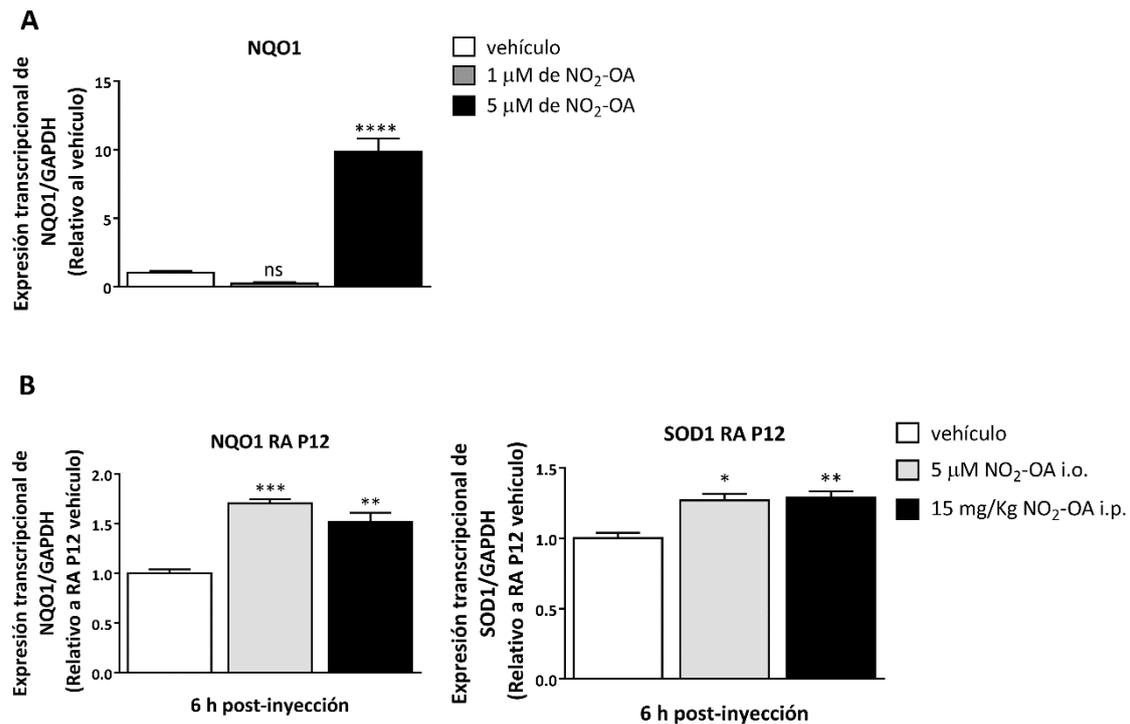


Figura 10. Efecto de la administración i.o. o i.p. de dosis única de NO₂-OA sobre la expresión de NQO1 y SOD1 en retinas de ratones. A) La expresión transcripcional de NQO1 se cuantificó mediante qRT-PCR en retinas neurosensoriales de ratones C57BL/6 *wild type* adultos después de 6 hs de la inyección i.o. de 10 μM o 50 μM de NO₂-OA o vehículo. **B)** El ARNm de NQO1 y SOD1 se cuantificó mediante qRT-PCR en retinas neurosensoriales de ratones P12 después de 6 hs de la inyección i.o. o i.p. con NO₂-OA o vehículo (control). **A y B)** Los resultados se normalizaron a GAPDH y se expresaron de acuerdo al método 2-ΔΔCt usando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de retinas de ratones adultos o P12 inyectados con vehículo. Los datos se presentan como media ± SEM y fueron analizados mediante ANOVA a una vía seguidos por el post test de comparación múltiple de Dunnett. Se utilizaron 3 retinas/ratones por condición. *p < 0,05, **p < 0,01, *** p < 0,001, ****p < 0,0001.

IV.II. Efecto de NO₂-OA sobre la funcionalidad y la estructura retinal en ratones adultos

Luego de evaluar la actividad biológica de NO₂-OA en retinas de ratones C57BL/6 *wild type* por periodos cortos de tiempo (6 hs), decidimos analizar la citotoxicidad de la administración de NO₂-OA o el vehículo a tiempos más prolongados. Con este propósito, animales C57BL/6 *wild type* adultos fueron inyectados vía i.o. con 1 μl de una solución 50 μM de NO₂-OA, vehículo o PBS (control) en el día P0 (día de inicio del experimento de citotoxicidad *in vivo*). Luego, los animales fueron inyectados de forma i.p. con 15 mg/kg de NO₂-OA, vehículo o PBS (control) cada dos días (dosis de refuerzo los días P2, P5, P8, P11 y P14). Con este propósito, el esquema de inyección propuesto inicia a P0 con la i.o. y luego se realizan inyecciones i.p. de refuerzo, cada 2 días, con el objetivo de mantener niveles de NO₂-OA circulante (**Figura 11 A**). Para evaluar la citotoxicidad de

NO₂-OA y el vehículo, se realizaron estudios electrofisiológicos conocidos como electrorretinograma escotópico, ERG, en los días P3, P7 y P15, y análisis histológico ocular (tinción de hematoxilina y eosina en criocortes de retina a P15). Los resultados del ERG no mostraron diferencias significativas en la amplitud de la onda a y la onda b en ratones inyectados con NO₂-OA o vehículo en comparación con el control (PBS) en los días P3, P7 y P15 (**Figura 11 B y C**). Además, los tiempos de latencia de las ondas a y b mostraron un patrón similar al del control (PBS) (**Figura 11 D y E**). Luego de sacrificar a los animales en el día P15, el análisis de las secciones histológicas oculares no reveló diferencias estadísticas en cuanto al espesor de la retina de los ratones tratados con el NO₂-OA o vehículo respecto al grupo control (PBS) (**Figura 12 A y B**). Estos resultados indican que la funcionalidad e histología retinal no se vieron afectadas después de la administración de NO₂-OA o vehículo a la dosis y tiempo evaluados.

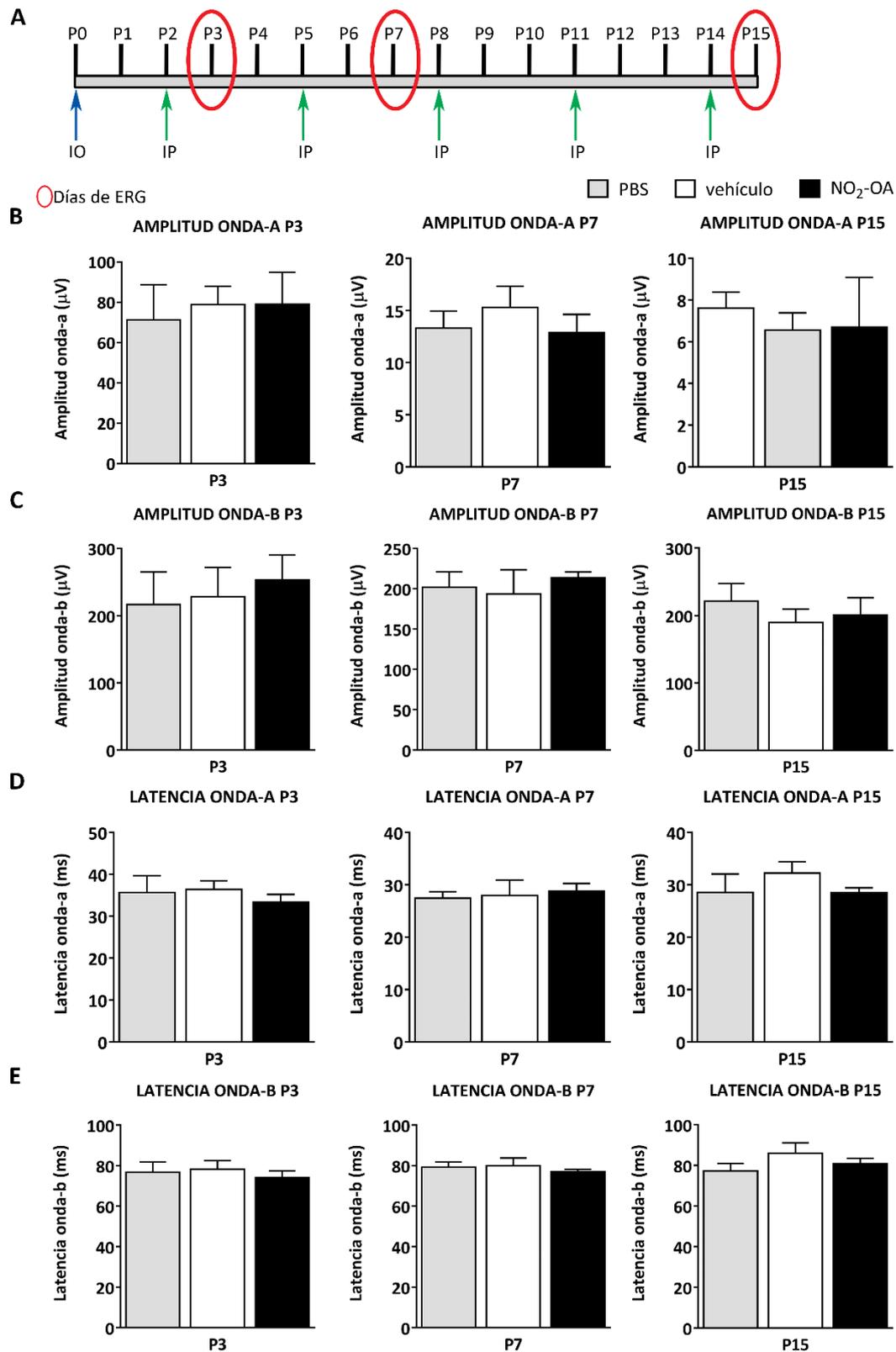


Figura 11. Efecto de la administración de NO₂-OA o vehículo sobre la funcionalidad retinal en ratones C57BL/6 adultos. A) Esquema de administración y ERG para evaluar la citotoxicidad *in vivo* de NO₂-OA o vehículo en retinas de ratones adultos. Las amplitudes (**B y C**) y latencias (**D y E**) de las ondas a y b del ERG escotópico se registraron en P3, P7 y P15 después de una sola inyección i.o. de 1 µl de PBS, vehículo o NO₂-OA (50 µM) e i.p. en P2, P5, P8, P11 y P14 con PBS,

vehículo o NO₂-OA (15mg/Kg) en ratones adultos. Los datos muestran el promedio de respuestas en ambos ojos, en cuatro ratones por condición. Los datos se presentan como la media ± SEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las condiciones evaluadas.

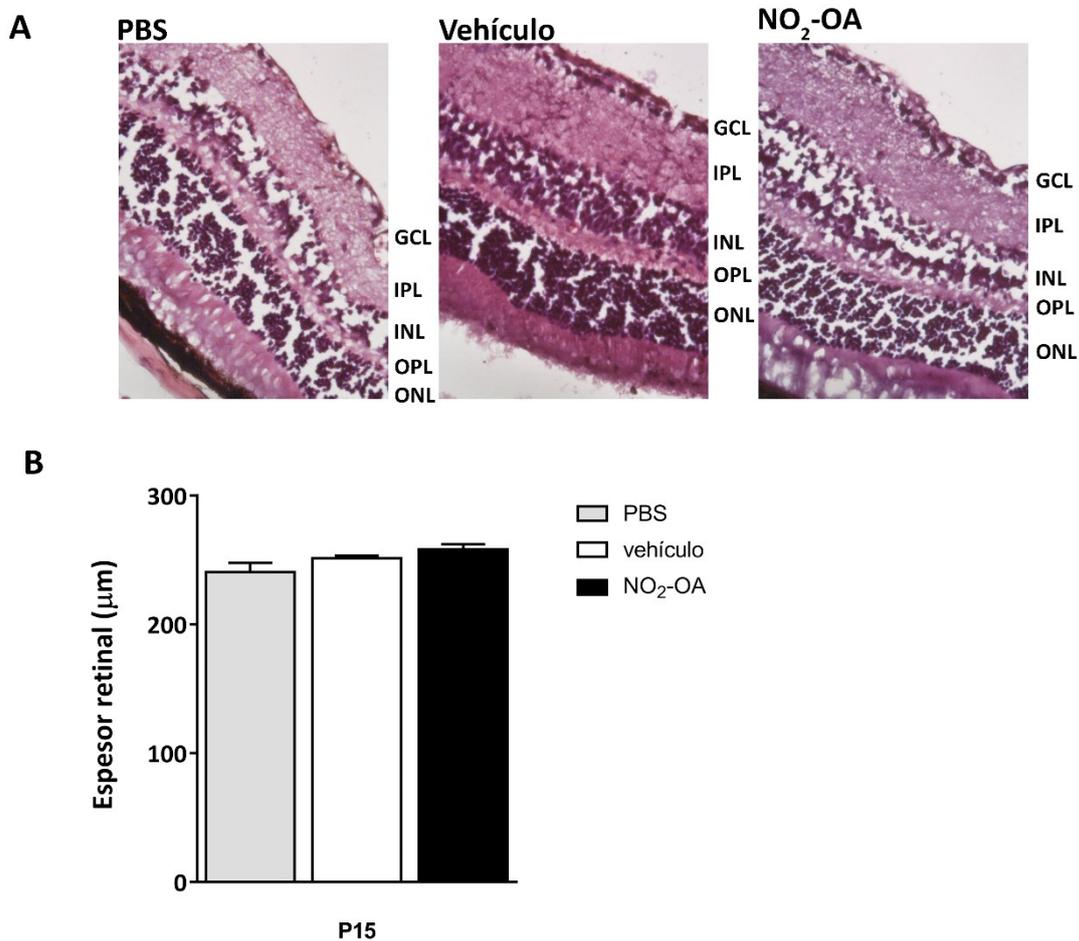


Figura 12. Efecto de la administración de NO₂-OA o vehículo sobre la estructura y el espesor de la retina. A) Secciones histológicas representativas de tinción de H&Eo de la retina en el día P15. **B)** El gráfico representa el espesor retinal (μm) a P15, en cuatro ratones por condición. Los datos se presentan como la media ± SEM. Los datos se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Dunnett. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las condiciones evaluadas.

IV.III. Modelo de Retinopatía inducida por oxígeno (OIR)

La retinopatía experimental inducida por oxígeno (OIR) en ratones, es un modelo ampliamente validado de ROP y de la fase proliferativa de la RD y, por lo tanto, constituye una poderosa herramienta para elucidar los mecanismos involucrados y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas (169). Brevemente, el modelo de OIR consiste en exponer ratones neonatos (P7) junto a su madre a altos niveles de oxígeno

(75% O₂, fase de hiperoxia) durante 5 días (P12), fase en la que se observa la pérdida de vasos retinianos inmaduros y el cese del crecimiento vascular retinal normal, lo que produce VO generando un área avascular central alrededor del nervio óptico. Luego los animales vuelven a ser colocados en aire ambiental (RA, por *room air*), la retina avascular central se vuelve hipóxica, lo que desencadena tanto la regeneración de vasos normales como la NV prerretiniana, la cual alcanza un máximo en el día P17. Poco después, la NV comienza a retroceder y en P26 casi no quedan áreas o zonas visibles de VO ni NV (**Figura 13**) (169, 170).

Previamente en nuestro laboratorio demostramos en el modelo de OIR, que además de la VO y NV retinal, se observa un incremento significativo en el flujo autofágico, daño neuronal por apoptosis de células ganglionares, bipolares, amacrinas y fotorreceptores, activación glial con aumento de GFAP y pérdida de la funcionalidad retinal (disfunción en el ERG), como aspectos claves de las retinopatías (29, 30, 171). Sin embargo, entre los mecanismos etiopatogénicos, también convergen componentes inflamatorios, daño oxidativo, y aumento en la producción de ERN, entre otros. En este sentido, niveles elevados de ERO causan citotoxicidad o inducen apoptosis por lo que varios estudios han sido realizados con el fin de reducir sus niveles en las retinopatías. Sin embargo, una estrategia menos explorada en retina es la modulación de factores de transcripción involucrados en la defensa antioxidante como el sistema Keap1-Nrf2, regulador de enzimas antioxidantes como HO-1, NQO1, así como enzimas implicadas en la biosíntesis de glutatión, tales como cisteína-glutamato ligasa (GCL, por *glutamate cysteine ligase*) y glutatión S-transferasas (GST, por *glutathione S-transferase*).

Por todo lo anteriormente expuesto y con el propósito de evaluar el efecto de NO₂-OA en los procesos vasoproliferativos y neurodegenerativos de las RP, en esta etapa experimental decidimos diseñar el esquema de administración expuesto en la **Figura 13**.

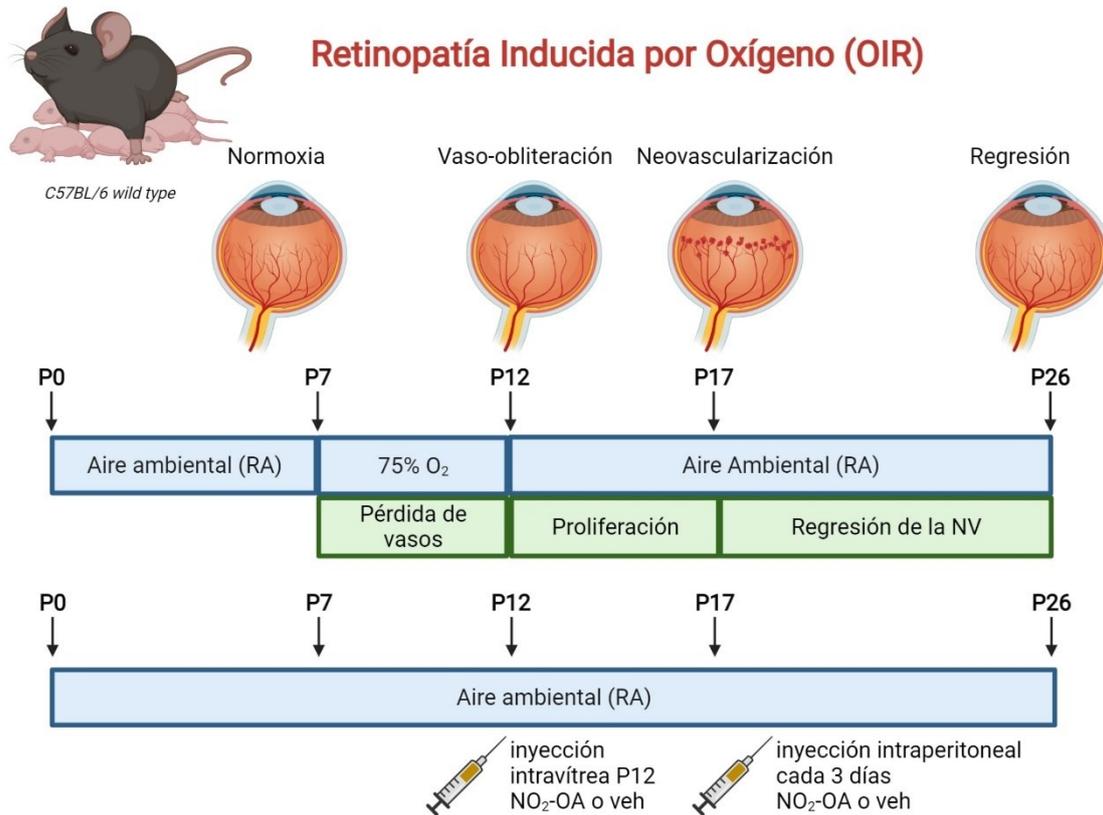


Figura 13. Modelo murino de OIR con esquema de administración de NO₂-OA. Ratones recién nacidos junto a su madre lactante se mantienen en aire ambiental desde el nacimiento hasta el P7 comenzando el desarrollo vascular normal. En el día P7, son introducidos a una cámara de hiperoxia durante 5 días (75% de oxígeno), lo que inhibe el crecimiento vascular y provoca una VO central significativa. Los ratones vuelven a aire ambiental a P12 y la retina central avascular se vuelve hipóxica, provocando un crecimiento de los vasos y una respuesta neovascular patológica. La NV alcanza su máximo en P17. En el día P26 las alteraciones vasculares se resuelven espontáneamente en este modelo. Esquema de administración: NO₂-OA (50 μM) o vehículo fue administrado i.o. en P12 y dosis i.p. de refuerzo (15 mg/Kg) fueron realizadas a P14, P17, P20 y P23 tanto en animales OIR como en controles aire (ratones RA) de la misma edad. Un grupo de animales OIR y RA control fue evaluado a P17 y otro a P26. Modificado de *Stahl A. IOVS 2010.*

IV.IV. NO₂-OA promueve la angiogénesis reparativa en retinas de ratones OIR

Trabajos previos demostraron que animales con ablación genética de Nrf2 (*Nrf2*^{-/-}) en el modelo de OIR, aumentaron significativamente el área avascular en el día P17, acompañado por un incremento considerable en la NV prerretiniana patológica en comparación con ratones *wild type* (32, 148, 155). Además, se conoce que la activación de la vía Keap1-Nrf2 tiene efectos beneficiosos en el modelo de OIR, disminuyendo el área avascular y la NV patológica en el día P17 (154, 156, 172). Estos antecedentes junto con los resultados obtenidos hasta el momento en el modelo *in vitro*, convierten a NO₂-OA en una interesante herramienta terapéutica para ser aplicada en las retinopatías.

En función de ello y con el objetivo de evaluar si NO₂-OA podría tener un efecto beneficioso en la VO y la NV patológica, animales OIR C57BL/6 fueron inyectados con NO₂-OA o vehículo siguiendo el esquema de la **Figura 13**, para ser sacrificados en el día P17 (pico de NV). Para evaluar la vasculatura, retinas completas fueron teñidas con la lectina *Griffonia Simplicifolia Isolectin B4* conjugada con Alexa 488 y montadas en *flat-mount*. El tratamiento con el NO₂-OA produjo a P17 OIR un aumento de la revascularización de la retina central (angiogénesis reparativa) y una disminución del área neovascular en comparación con los animales OIR controles (vehículo) (**Figura 14 A**). El análisis cuantitativo reveló que el área avascular y neovascular se redujo significativamente respecto al vehículo (**Figura 14 B**). Estos resultados muestran que NO₂-OA contribuyó a la angiogénesis reparativa funcional de la retina isquémica.

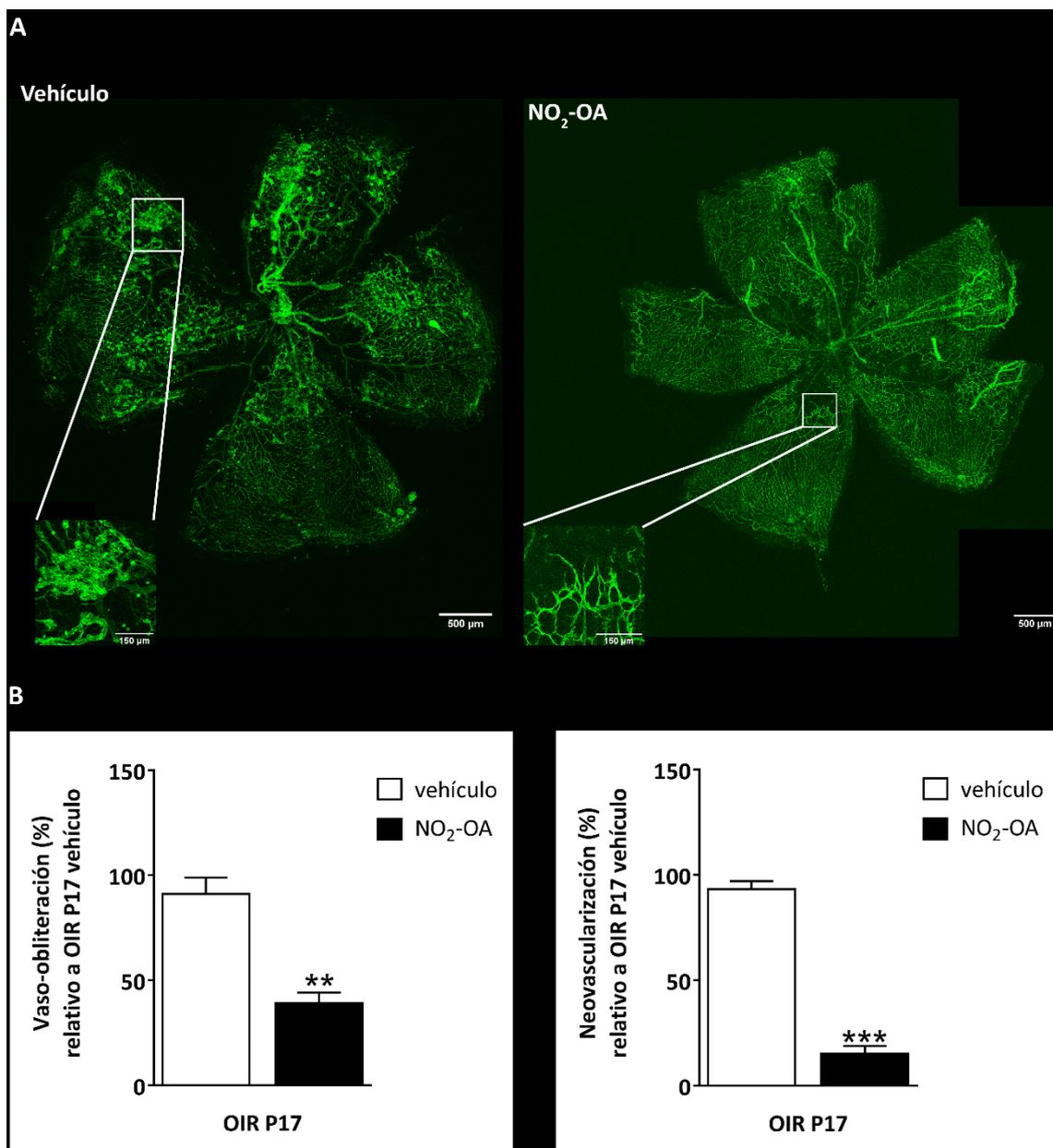


Figura 14. Efecto de NO₂-OA en la VO y la NV patológica en el modelo de OIR. A) Imágenes representativas de retinas completas a P17 montadas en *flat-mount* que evidencian la tinción del endotelio con GSA-IB4 en animales OIR inyectados con vehículo o NO₂-OA. Magnificación del borde del área avascular, donde se forman los neovasos. **B)** El porcentaje de VO (%) se cuantificó como la relación entre el área avascular central y el área total de la retina y el porcentaje de NV (%) se cuantificó como la relación entre el área de NV retinal y el área total de la retina. Los datos se presentan como media ± SEM y se analizaron mediante prueba t de Student no apareada a dos colas. **p < 0,01, *** p < 0,001. Se utilizaron 4 retinas/ratón por condición.

IV.V. NO₂-OA mantiene la expresión de VEGF-A inducido por la hipoxia a P17 OIR

La pérdida de la visión en las RP es causada por un deterioro vasoproliferativo progresivo. La isquemia retinal, una de las consecuencias centrales de esta disfunción, estimula la secreción de varios factores de crecimiento, principalmente VEGF, el cual es un mediador importante de la permeabilidad vascular y de la NV patológica en el ojo (29, 173, 174), que conducen a la pérdida parcial o total de la visión. Por otro lado, la evidencia publicada sugiere que la señalización regulada por estrés oxidativo puede causar características patológicas independientes o en asociación con la señalización de VEGF en las retinopatías (175, 176). Dado que demostramos que el tratamiento con NO₂-OA redujo el área avascular y neovascular en el modelo murino de OIR, a continuación, decidimos evaluar si este efecto es mediado por la regulación en los niveles de VEGF. Para ello, animales OIR y RA (room air), inyectados con NO₂-OA o vehículo, fueron sacrificados en el día P17 y los niveles de VEGF en extracto de retina completa fueron medidos por qRT-PCR. El análisis cuantitativo reveló un incremento en los niveles de expresión transcripcional de VEGF retinal en ratones P17 OIR con respecto a los ratones RA (**Figura 15**). Los animales OIR tratados con NO₂-OA no lograron modular el incremento del transcripto de VEGF-A producido por el modelo. Estos resultados mostraron una alta concordancia con los obtenidos en las células MIO-M1, donde no se observaron diferencias significativas en condiciones de hipoxia con NO₂-OA respecto al vehículo (**Figura 7**), indicando que el NO₂-OA no logró modular el incremento de la expresión génica de VEGF-A inducido por la hipoxia a P17 OIR.

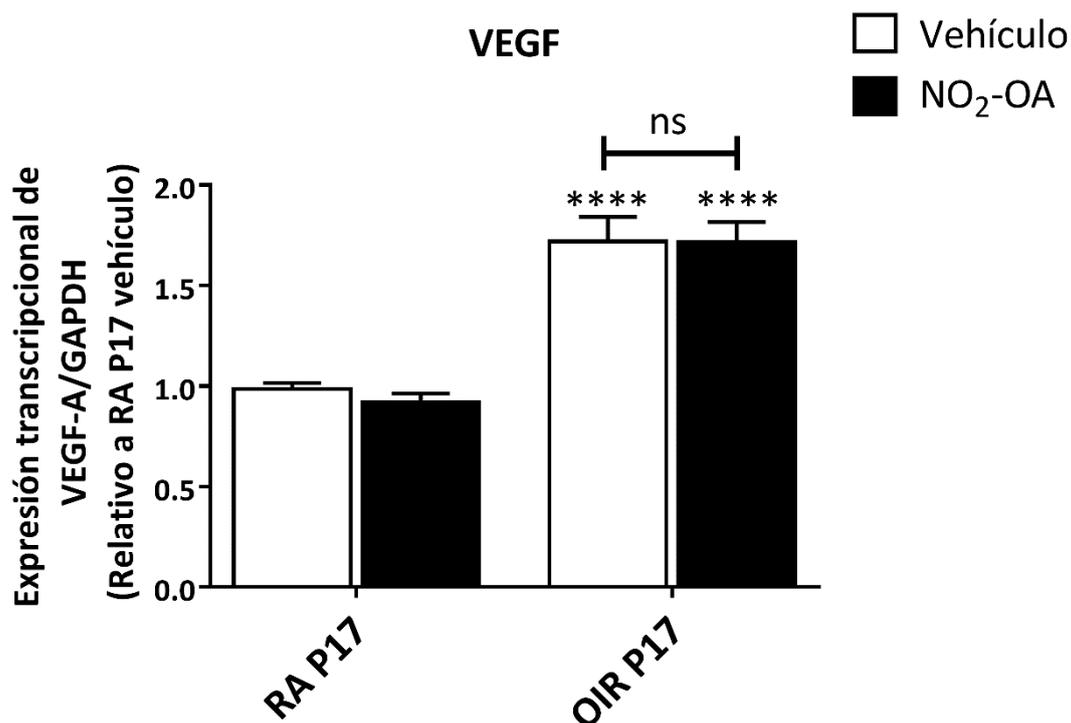


Figura 15. Efecto de NO₂-OA sobre la expresión transcripcional de VEGF-A a P17 OIR. La expresión del ARNm de VEGF-A se evaluó mediante qRT-PCR en retinas neurosensoriales de ratones P17 RA y OIR inyectados i.o. a P12 con 5µM de NO₂-OA o vehículo e i.p. a P14 con 15 mg/Kg del NO₂-OA o vehículo. Los resultados se normalizaron a GAPDH y se expresaron de acuerdo al método 2-ΔΔCt utilizando como calibrador el nivel de ARNm obtenido de retinas de ratones P17 RA inyectados con vehículo. Los datos se presentan como media ± SEM y se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni. ns, no significativo, **** p < 0,0001. Se utilizaron 4 retinas/ratones por condición analizada.

IV.VI. NO₂-OA previene la gliosis inducida en retinas a P17 OIR

Se ha descrito que la activación glial como respuesta inicial a una injuria o noxa es protectora para el tejido retinal, pero si se vuelve persistente (gliosis) se considera un signo de mal pronóstico, ya que las CGM dejan de cumplir sus funciones biológicas necesarias para la sobrevivencia de las neuronas y además secretan citoquinas y quimiocinas, que contribuyen al entorno proinflamatorio del tejido retinal (29, 30, 177–180). En trabajos previos de nuestro grupo se ha demostrado que las retinas de ratones P17 OIR además de mostrar los cambios en el perfil neovascular también exhibieron lesiones neuro-gliales, así como pérdida de la funcionalidad retiniana (29, 30). Dado que en el modelo *in vitro* demostramos que el NO₂-OA es capaz de prevenir la gliosis en CGM, decidimos analizar si el tratamiento con NO₂-OA *in vivo* podría mejorar la gliosis producida a P17 OIR. Con este propósito, los niveles de expresión proteica de GFAP fueron analizados por *Western blot* en extractos de retina completa de animales RA y

OIR inyectados con el NO₂-OA o vehículo. El tratamiento con NO₂-OA no modificó los niveles de GFAP en animales RA respecto al control inyectado con vehículo (**Figura 16 A**). Como se describió anteriormente, el análisis cuantitativo reveló un incremento significativo en los niveles de GFAP a P17 OIR respecto a los controles RA (**Figura 16 B**). Así como en el modelo *in vitro*, el tratamiento con el NO₂-OA disminuyó significativamente los niveles de GFAP respecto al control OIR (vehículo) (**Figura 16 A y B**). Con esto podemos concluir que el NO₂-OA previno la gliosis producida por el modelo a P17 OIR. Al mismo tiempo, evaluamos la capacidad glial para prevenir la excitotoxicidad por exceso de glutamato en la retina, analizando la expresión de la proteína GS (**Figura 16 A**). El análisis cuantitativo indicó una disminución significativa de GS en las retinas OIR que no fue modulada por el tratamiento con NO₂-OA respecto a los controles RA (**Figura 16 B**). En resumen, el tratamiento con NO₂-OA previene la gliosis producida por el modelo de OIR, aunque no modula el descenso en los niveles de GS producido a P17 en el modelo OIR.

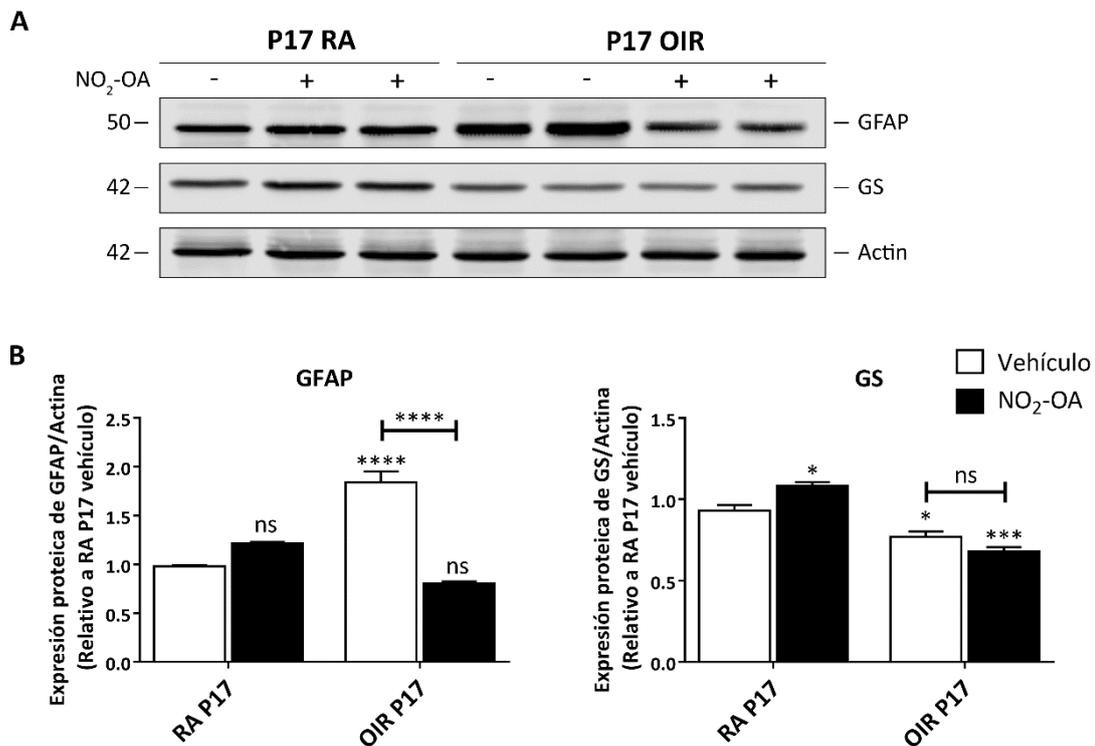


Figura 16. Efecto del tratamiento con NO₂-OA en el modelo murino OIR a P17. A) Ensayo de *Western blot* de extractos de retina neural completa de ratones P17 RA y OIR inyectados con el NO₂-OA o vehículo y revelados empleando anticuerpos anti GFAP y GS. **B)** Cuantificación por densitometría de los niveles de GFAP y GS y normalizados a β-actina. Los datos se presentan como media ± SEM y se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni. ns, no significativo, *p < 0,05, *** p < 0,001, **** p < 0,0001. Se utilizaron 4 retinas/ratones por condición.

IV.VII. NO₂-OA evita la pérdida funcional de la retina a P26 OIR

En las RP, los cambios vasculares no sólo producen áreas avasculares hipóxicas, sino que originan aumento de permeabilidad vascular, lo que conduce a la disfunción y muerte neuronal (29, 30, 171, 181). Con el propósito de evaluar si el NO₂-OA es capaz de prevenir la pérdida en la funcionalidad retinal observada en el modelo de OIR, se realizaron estudios de ERG en ambos grupos (vehículo y NO₂-OA) y en ambas condiciones (RA y OIR) a P17 (**Figura 17 A**) y P26 (**Figura 17 B**). Para ello, la intensidad (amplitud) y la velocidad (latencia) de la respuesta neuronal (onda-a y -b) tras estímulos luminosos fue registrada en las condiciones antes descritas. Cabe mencionar que, en el ERG escotópico, la onda-a inicial es causada por corrientes iónicas extracelulares generadas por fotorreceptores durante la fototransducción mientras que la onda-b corresponde a la actividad de las células de la capa nuclear interna de la retina (principalmente, células bipolares). Como se esperaba, el modelo de OIR no modificó la amplitud de la onda-a a P17 ni a P26. Sin embargo, el tiempo de latencia de la onda-a fue significativamente incrementada en ratones OIR control respecto a los controles RA a P17, condición que fue revertida a P26 donde no se observan diferencias en los tiempos de latencia de la onda-a (**Figura 17 A y B**). La amplitud de la onda-b se redujo significativamente en ratones OIR control en comparación con los ratones RA tanto a P17 como a P26. En los animales tratados con NO₂-OA se puede observar una tendencia a recuperar la amplitud de la onda-b a P17 que se hace significativa a P26. No se observaron diferencias en el tiempo de latencia de la onda-b a P17 en todas las condiciones analizadas. Por otro lado, se observó un incremento significativo en el tiempo de latencia de la onda-b en animales OIR inyectados con vehículo a P26 respecto a los controles RA, el cual fue prevenido por el tratamiento con NO₂-OA en ratones OIR (**Figura 17 A y B**). Estos resultados nos permitirían concluir que NO₂-OA administrado *in vivo* previene la pérdida de la funcionalidad retinal a P26 en el modelo murino OIR.

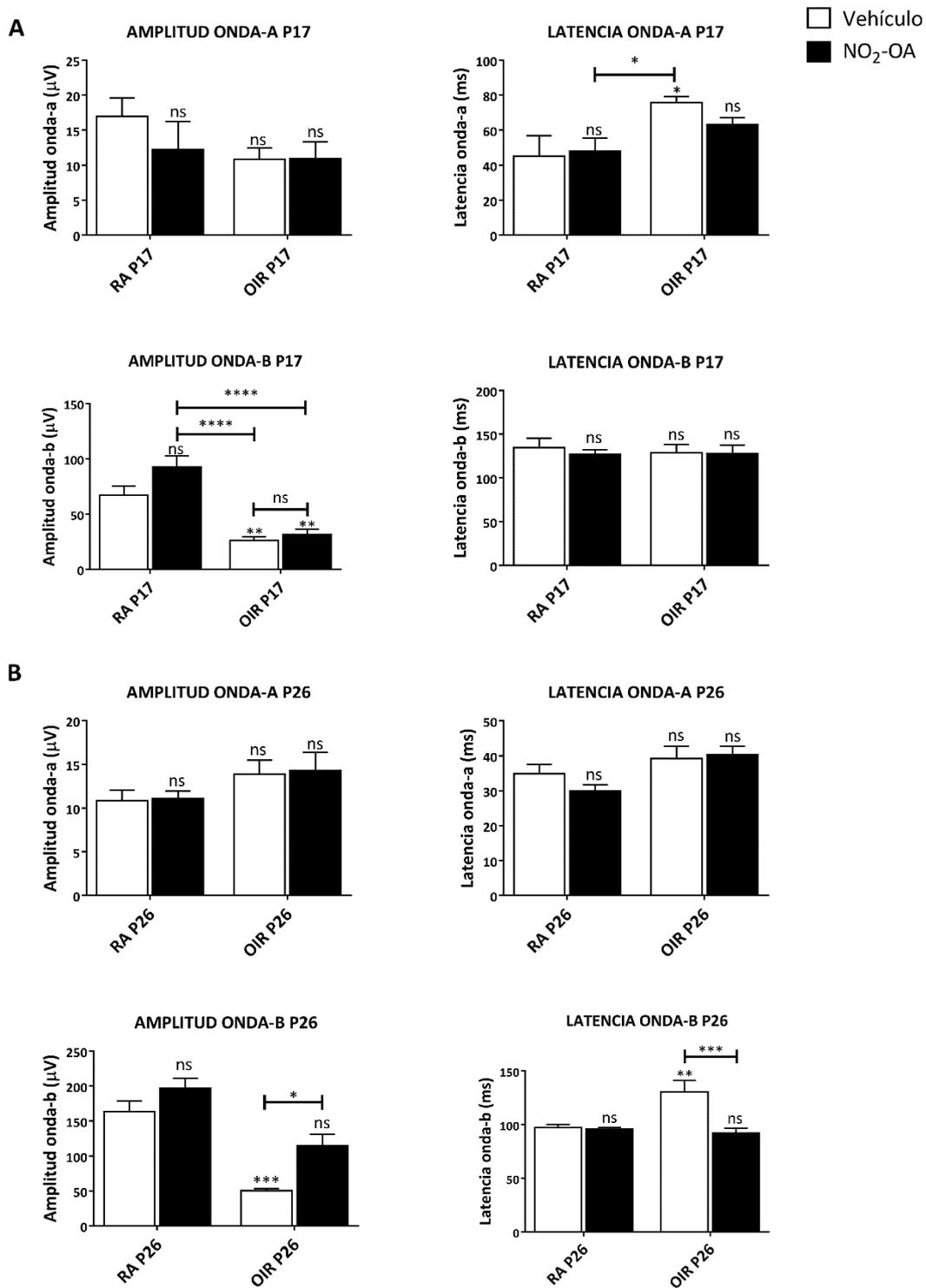


Figura 17. Efecto del NO₂-OA sobre la funcionalidad retinal en el modelo murino de OIR. Las amplitudes y latencias de las ondas-a y -b del ERG escotópico se registraron a P17 (A) y a P26 (B) después de una única inyección i.o. de 1 μl de vehículo o NO₂-OA (50 μM) a P12 e i.p. a P14, P17, P20 y P23 con vehículo o NO₂-OA (15 mg/Kg) en ratones OIR y RA. Los datos muestran el promedio de respuestas en ambos ojos, en siete ratones por condición. Los datos se presentan

como media \pm SEM y se analizaron mediante ANOVA de dos vías seguido de la prueba posterior de Bonferroni. ns, no significativo, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

IV.VIII. NO₂-OA impide la disminución en la expresión de caspasa-3 total en retinas de ratones P26 OIR

Dado que el NO₂-OA tiene un efecto protector sobre la disfunción retinal producida, es decir, los resultados del ERG escotópico pueden indicar la protección de la neurodegeneración producida por el modelo de OIR, decidimos explorar los niveles de caspasa-3 total como marcador de muerte celular. Para ello, animales RA y OIR inyectados con vehículo o NO₂-OA fueron sacrificados a P26, y los niveles proteicos de caspasa-3 total en extractos de retina completa fueron medidos por ensayos de *Western blot* (Figura 18 A). En animales P26 OIR control se observó una disminución significativa de la caspasa-3 total, lo que podría indicar la escisión de caspasa-3 hacia su forma activa. Esta disminución fue prevenida por el tratamiento con NO₂-OA en animales P26 OIR (Figura 18 B).

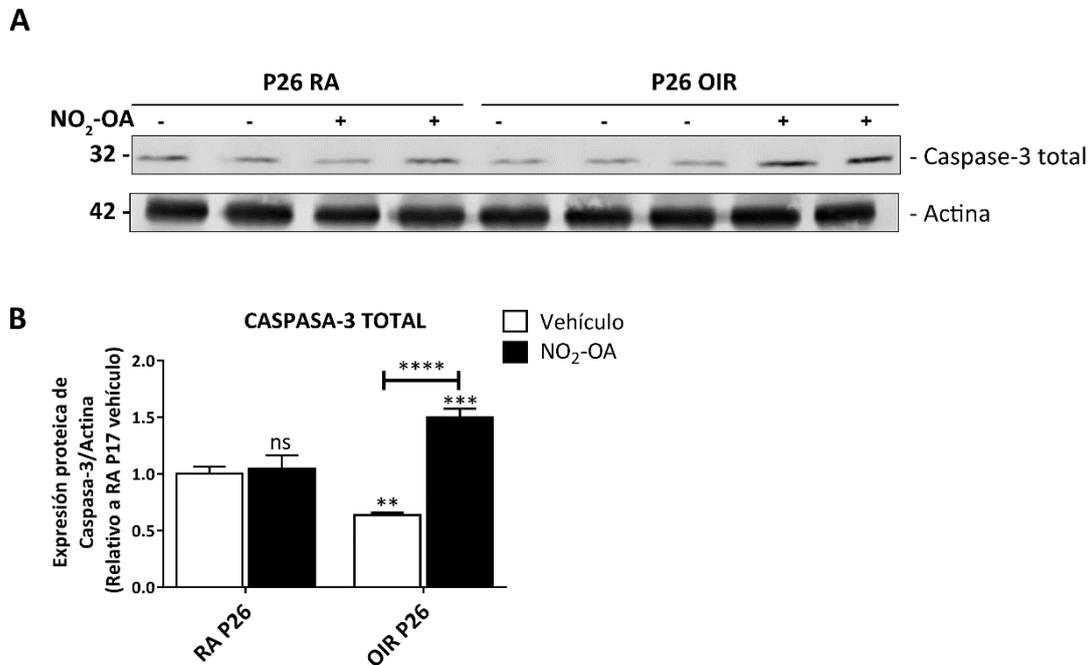


Figura 18. Impacto del tratamiento con el NO₂-OA sobre la neurodegeneración retinal en el modelo murino de OIR P26. A) Ensayo de *Western blot* representativo de extractos de retina neural completa de ratones P26 RA y OIR tratados o no con el NO₂-OA y analizados empleando anticuerpos anti caspasa-3 total. **B)** Cuantificación por densitometría de los niveles de Caspasa-3 y normalizados a tubulina. Los datos se presentan como media \pm SEM y se analizaron mediante ANOVA unidireccional seguido de la prueba posterior de Tukey. ns, no significativo, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$. Se utilizaron 5 retinas/ratones por condición.

Finalmente, estos resultados refuerzan las observaciones del modelo experimental *in vitro* proponiendo al NO₂-OA como posible alternativa terapéutica para el tratamiento

de RP debido al marcado efecto protector exhibido sobre el componente vascular y no vascular retinal en el modelo de OIR.

CONCLUSIONES DEL MODELO “IN VIVO”

En esta etapa de la tesis demostramos que la administración de NO₂-OA:

- ✓ Induce la expresión de genes antioxidantes en la retina del ratón adulto, así como en ratones en el día P12;
- ✓ Preserva la funcionalidad (ERG escotópico) y mantiene la estructura retinal (tinción con H&Eo) en ratones adultos;
- ✓ Promueve la angiogénesis reparativa, disminuyendo el área avascular central (VO) y la NV patológica a P17 OIR;
- ✓ Evita la gliosis, pero no revierte la disminución de GS producida a P17 OIR;
- ✓ Impide la disminución de la amplitud, así como también el incremento de la latencia de la onda-b.
- ✓ Previene la disminución en los niveles de caspasa-3 total en ratones P26 OIR.

V. DISCUSIÓN

V.I Conclusiones del modelo “in vitro”

Las enfermedades neurodegenerativas son en la actualidad, uno de los grandes desafíos de la investigación básica y clínica. A nivel retinal, varias patologías que cursan con neurodegeneración como el glaucoma, las retinopatías proliferativas (ROP y RDP), la degeneración macular asociada a la edad y la Retinitis Pigmentosa no cuentan hasta el momento con cura o tratamiento efectivo (10, 182, 183). En particular, mientras la ROP está asociada a cambios en los niveles de O₂ siendo la principal causa de ceguera en la población infantil (28), la RD obedece a un desequilibrio metabólico que afecta a adultos en edad laboral (28, 183). Según la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS) la ROP es causante del 35% (2.500 niños) de los casos de discapacidad visual en niños menores de 15 años en Argentina. En cuanto a la DM, según la Encuesta Nacional de Factores de Riesgo 2018, esta enfermedad alcanza al 12.7 % de la población. Una de las complicaciones más serias de la Diabetes es la retinopatía originando pérdida de visión y ceguera irreversible en quienes la padecen. Una altísima proporción de los pacientes con DM tipo 1 (90 %) y con DM tipo 2 (60 %) presentarán alguna forma de retinopatía durante la primera década de la enfermedad (184, 185).

Si bien la ceguera en ambas patologías es prevenible, el diagnóstico es generalmente tardío dado que la pérdida de visión no se manifiesta hasta etapas avanzadas. Por lo cual, las opciones de tratamiento son limitadas y poco eficaces. En relación a ello, el tratamiento con láser e inclusive la vitrectomía, han sido utilizados históricamente en las retinopatías neovasculares con el objeto de enlentecer la progresión de la enfermedad hacia la ceguera (10). Evidencias derivadas de modelos experimentales y estudios clínicos, han proporcionado información sobre los mecanismos de lesión vascular que conducen a la NV, lo cual ha llevado al descubrimiento y la implementación de terapias oculares anti-VEGF, establecidas como el pilar del tratamiento actual (186). Sin embargo, el beneficio clínico conferido por estas terapias es variable y los resultados están siendo cuestionados (186). En este sentido, existen muchos pacientes no respondedores, sugiriendo que prevalecen otros mediadores vasculares importantes para el desarrollo de la NV ocular. Además, la potencial resistencia a la terapia antiangiogénica debido a factores genéticos aparece como otro parámetro importante que no puede ser pasado por alto (187). En este contexto, resulta crucial la generación de nuevos conocimientos que permitan ampliar el espectro de potenciales blancos terapéuticos, tanto a nivel celular como molecular. Por lo tanto, el desarrollo de nuevas y eventualmente mejores estrategias debe estar orientado no sólo a eliminar la NV, sino también a promover la normalización de la vasculatura retiniana a fin de rescatar a las neuronas y células gliales de la muerte por falta de O₂ y nutrientes.

Tanto los astrocitos como las CGM son esenciales para proveer de barrera hematorretiniana interna (188). Además, las CGM contribuyen a la homeostasis del tejido retinal a través de muchos mecanismos intracelulares interactuando con neuronas, astrocitos, microglía y células endoteliales con el fin de modular diferentes eventos (54). Resultados de recientes investigaciones han centrado su atención en el papel de las CGM en las RP, demostrando que estas células muestran diferentes respuestas de acuerdo con la severidad del daño y, por lo tanto, desencadenan distintos

eventos a lo largo del curso de la enfermedad (189, 190). En general, las CGM participan en procesos de inflamación, gliosis, síntesis y secreción de factores tróficos y antioxidantes en las RP, presentando un papel protector / perjudicial según se trate de etapas tempranas o tardías de la enfermedad (54).

Es conocido que los NO₂-FA activan la vía de señalización antioxidante Keap1-Nrf2 e inhiben la vía proinflamatoria NF-κB en varios tipos de células y tejidos, como células endoteliales (131, 145), macrófagos (146, 191), tejido renal (158–161), cardíaco (117) y pulmonar (192), entre otros. Además, múltiples estudios han resaltado la importancia de la vía antioxidante Keap1-Nrf2 y los efectos citoprotectores y antiinflamatorios de la activación de la misma en el tejido retinal en diferentes retinopatías, incluyendo las RP (32, 148, 149, 151–154, 156, 157, 193). Entre los NO₂-FA, el NO₂-OA es uno de los más frecuentemente elegidos en los diseños experimentales debido a su alta estabilidad y a que se encuentra actualmente en diferentes etapas de ensayos clínicos (Complexa Inc.) (118–121). Esto otorga una ventaja adicional dado que de aprobarse su uso por la FDA sería más simple la ejecución de ensayos clínicos para segundos usos de este nitrolípido.

Es por ello que en la primera etapa de este trabajo de tesis utilizamos la línea de CGM, MIO-M1 debido a que estas células son capaces de modular los diferentes eventos que ocurren en las RP, como el estrés oxidativo, la hipoxia, gliosis, y el aumento de citoquinas proinflamatorias (por ejemplo, IL-1β), entre otros.

Con el fin de seleccionar la concentración óptima del NO₂-OA que no afectara la viabilidad celular, en primera instancia evaluamos diferentes concentraciones del nitrolípido por ensayos de MTT. Observamos que, en las concentraciones y tiempos ensayados, el NO₂-OA no indujo toxicidad o muerte celular manteniendo la viabilidad de las células MIO-M1. Como mencionamos en la Introducción, en situaciones de estrés celular, Nrf2 es activado y transloca al núcleo, donde se une a la región del ADN denominada ARE, induciendo la expresión de enzimas detoxificantes como HO-1, entre otras. Nuestros resultados mostraron que HO-1, incrementó significativa de manera dependiente de la concentración del NO₂-OA respecto al vehículo (metanol) tanto a nivel transcripcional como proteico a las 8 y 16 hs de tratamiento en las células MIO-M1 (**Figura 2 y 3**). Para corroborar este resultado, a continuación, utilizamos un inhibidor farmacológico ampliamente estudiado, trigonelina (162–166). Como previamente describió *Artt y col.* en un ensayo de luciferasa-ARE, la inhibición de Nrf2 por el tratamiento con trigonelina es dependiente de la concentración, mostrando una mayor inhibición entre concentraciones de 0,1 y 1 μM (166). En línea con ello, en nuestro sistema celular los resultados mostraron que el tratamiento con 1 μM de trigonelina tuvo mayor efecto inhibitorio sobre la activación de Nrf2 producida por el NO₂-OA, en comparación con 25 μM. Interesantemente, debido a que con trigonelina no se alcanzaron los niveles de expresión basales de HO-1 observados en los controles, se podría pensar que el NO₂-OA actúa de manera dependiente e independiente de Nrf2 sobre la modulación de HO-1.

Estos resultados indican que el NO₂-OA activa la vía de señalización antioxidante Keap1-Nrf2 en células humanas retinales MIO-M1.

Dado que las RP cursan con un aumento de ERO que genera estrés oxidativo (175, 177, 194–196) y que las CGM son en gran parte encargadas de liberar moléculas antioxidantes (55) con el fin de mantener el balance redox en el tejido retinal, decidimos evaluar si la activación de la vía Keap1-Nrf2 en las células MIO-M1 le confería protección contra el estrés oxidativo. Para ello, como inductores de ERO utilizamos LPS y PMA. Como era de esperar la exposición de las CGM a estos inductores incrementó significativamente los niveles de ERO, los cuales fueron disminuidos con el pre-tratamiento del NO₂-OA. Esto indica que el incremento en las enzimas antioxidantes producida por el NO₂-OA, fue suficiente para depurar el fuerte incremento de ERO gatillado por LPS y PMA. Este efecto antioxidante también fue observado en macrófagos derivados de médula ósea, aislados de ratones apoE^{-/-}, los cuales fueron estimulados con LPS y tratados con el NO₂-OA mostrando valores atenuados de superóxido (191).

Uno de los aspectos más relevantes de las CGM es que son las responsables de modular la gliosis reactiva en la retina, en patologías como las RP. Es por ello que evaluamos la respuesta de las células MIO-M1 frente a estímulos que generan gliosis y el efecto del tratamiento del NO₂-OA sobre este proceso. Al respecto, α_2M^* es una glicoproteína multifuncional que en su forma nativa o activa (α_2M^*) participa en una amplia variedad de procesos biológicos e interesantemente para este trabajo de tesis ha sido definida como un mediador de citotoxicidad en la retina. Trabajos previos de nuestro grupo, describieron que α_2M^* , en concentraciones similares a las encontradas en el humor vítreo de pacientes con RP (101), induce gliosis tanto *in vitro* como *in vivo* en CGM (102). Mediante ensayos de *Western blot* observamos que el tratamiento con α_2M^* incrementó significativamente la expresión de las proteínas GFAP y vimentina, confirmando los resultados previos de nuestro grupo. Además, observamos un incremento en la expresión de HO-1 inducido por α_2M^* . Este resultado demuestra que α_2M^* es capaz de estimular la expresión de una proteína antioxidante, como HO-1, probablemente debido al proceso asociado a la inducción de gliosis en las células MIO-M1. Asimismo, el pre-tratamiento con el NO₂-OA previene la expresión de GFAP y vimentina inducida por α_2M^* . Estos resultados, en su conjunto, sugieren que el efecto protector del NO₂-OA sobre la gliosis inducida por α_2M^* , es tiempo dependiente para ejercer una fuerte respuesta antioxidante que conduzca a reducir la expresión de las proteínas marcadoras de estrés glial (GFAP y vimentina). Intentando dar respuesta a los mecanismos subyacentes a este fenómeno de disminución de la gliosis por efecto del NO₂-OA, y considerando que α_2M^* induce un aumento en la expresión de la proteína antioxidante, HO-1, posteriormente evaluamos si α_2M^* podría aumentar los niveles de ERO y si este aumento era capaz de inducir gliosis en las células MIO-M1. Este experimento reveló que los niveles de ERO incrementaron significativa y directamente proporcional al tiempo de estímulo con α_2M^* , y que el tratamiento con el NO₂-OA disminuyó las ERO a niveles basales. Estos resultados demostraron que existe una relación entre los niveles de ERO y la gliosis inducida por α_2M^* , los cuales son disminuidos por el NO₂-OA. Es por ello que nos proponemos continuar estos estudios para dar respuesta a estas incógnitas de gran interés en las RP.

El concepto de angiogénesis asociada a la inflamación ha sido propuesto recientemente y se cree que desempeña un papel fundamental en las retinopatías isquémicas (197). Es por ello que decidimos indagar la participación de las CGM bajo condiciones de hipoxia y proinflamatorias en los eventos vasoproliferativos mediados por VEGF. La IL-1 β es una citoquina proinflamatoria ampliamente involucrada en diferentes enfermedades (198) y se ha descrito que desempeña un papel importante en los episodios inflamatorios que conducen al parto prematuro (199–202) y como secuela a la ROP (203). Ensayos *in vitro* han demostrado que IL-1 β induce tanto la transcripción del ARNm de VEGF (204–206) como el aumento en su vida media (regulación postranscripcional) por diferentes mecanismos incluido NF- κ B (207). Además, conociendo que el NO₂-OA tiene efectos inhibitorios sobre esta vía proinflamatoria, decidimos evaluar la expresión del ARNm de VEGF por ensayos de qRT-PCR en células MIO-M1 tratadas con IL-1 β , así como el efecto del NO₂-OA en condiciones de hipoxia y normoxia. En dichos ensayos observamos, como era de esperarse, un incremento significativo en los niveles del transcrito de VEGF inducidos por hipoxia respecto a normoxia. Por otro lado, el NO₂-OA no logró modular los niveles de VEGF inducidos por hipoxia. Asimismo, el estímulo con IL-1 β en condiciones de hipoxia indujo un incremento significativamente mayor al descrito en condiciones de hipoxia. El tratamiento con el NO₂-OA inhibió este incremento producido por IL-1 β . De manera similar, en condiciones de normoxia pudimos observar una tendencia a incrementar los niveles de VEGF por la citoquina IL-1 β , y el NO₂-OA inhibió este incremento. Los resultados de este abordaje experimental nos sugieren que el NO₂-OA ejerce una modulación protectora sobre la inducción de VEGF producida por IL-1 β en las células MIO-M1, probablemente mediante la inhibición de la vía NF- κ B. Es de gran interés continuar estos estudios a fin de poder demostrar con claridad este mecanismo.

Por otro lado, *Wei y col.* demostraron que Nrf2 es un regulador crítico en las células endoteliales durante la angiogénesis que acompaña al desarrollo vascular retinal, a través de la modulación de VEGF en la célula *tip* y *stalk* (157). Además, recientemente *Huang y col.* publicaron que nattoquinasa inhibe la formación de túbulos inducida por VEGF en un ensayo de tubulogénesis, a través de la activación de Nrf2 (172). Es por ello, que en esta última instancia decidimos evaluar el efecto del NO₂-OA en la angiogénesis *in vitro* utilizando el ensayo de tubulogénesis descrito en células BAEC. En los ensayos realizados pudimos observar una disminución significativa en la formación de estructuras tubulares vasculares luego de la estimulación con VEGF en presencia del NO₂-OA, mientras que el tratamiento con el inhibidor de Nrf2, trigonelina, revirtió ese efecto. Por lo cual, de estos ensayos deducimos que el efecto inhibitorio del NO₂-OA sobre la angiogénesis *in vitro* es vía Nrf2-dependiente.

En resumen, nuestros resultados en el modelo *in vitro* constituyen la primera evidencia del efecto beneficioso del NO₂-OA sobre las CGM encargadas de modular los distintos eventos que desencadenan las RP, como el estrés oxidativo, la gliosis, hipoxia, angiogénesis y el incremento de citoquinas proinflamatorias.

V.II. Conclusiones del modelo “in vivo”

Habiendo demostrado los efectos beneficiosos del NO₂-OA en un sistema celular *in vitro*, nos propusimos evaluar estos efectos en un modelo más complejo de NV inducida por oxígeno como es el modelo murino de OIR (169). En este sentido, la retinopatía experimental inducida por oxígeno en ratones, es un modelo ampliamente validado de ROP y de la fase neovascular de la RD y, por lo tanto, constituye una poderosa herramienta para elucidar los mecanismos involucrados y desarrollar nuevas estrategias terapéuticas. Por otro lado, múltiples estudios han evidenciado que la activación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2 es capaz de revertir las alteraciones de estas retinopatías (32, 148, 149, 151–154, 157). Brevemente, el modelo de OIR consiste en exponer ratones neonatos (P7) junto a su madre a altos niveles de oxígeno (75% O₂, fase de hiperoxia) durante 5 días (P12), fase en la que se observa la pérdida de vasos retinianos inmaduros y el cese del crecimiento vascular retinal normal, lo que produce VO generando un área avascular central (alrededor del nervio óptico). Luego los animales vuelven a ser colocados en aire ambiental (P12), la retina avascular central se vuelve hipóxica, lo que desencadena tanto la regeneración de vasos normales como la formación de ovillos neovasculares frágiles e inmaduros hacia la cavidad del vítreo, con un pico de NV en el día P17 (169). Simultáneamente, otros eventos también se manifiestan en la retina hipóxica como la gliosis, el incremento de citoquinas proinflamatorias y la neurodegeneración los cuales pueden ser desarrolladas en respuesta al evento hipóxico u a otros estímulos primarios (29, 30). Posteriormente, la NV comienza a retroceder y hacia el P26 casi no quedan visibles la VO ni la NV, aunque persisten la gliosis y la neurodegeneración.

Previo a analizar el efecto del NO₂-OA en el modelo de OIR, evaluamos la activación de la vía de señalización antioxidante Keap1-Nrf2 mediada por el NO₂-OA en la retina sana. De manera similar a lo observado en el modelo *in vitro*, la inyección i.o. de dos dosis diferentes del NO₂-OA en animales adultos, incrementó significativa y directamente proporcional a la concentración los niveles de expresión del ARNm de la enzima antioxidante NQO1, la cual se encuentra aguas abajo del factor de transcripción nuclear Nrf2. Además, la inyección i.o. o i.p. del NO₂-OA en ratones P12 aumentó significativamente la expresión del transcripto de enzimas antioxidantes en la retina, como NQO1 y SOD1, evaluadas por ensayos de qRT-PCR. Estos resultados nos permiten concluir que al igual que en el modelo *in vitro*, el NO₂-OA activa la vía de señalización Keap1-Nrf2 en retinas de ratones adultos y P12. Posteriormente, decidimos evaluar la citotoxicidad *in vivo* del esquema de inyecciones con el NO₂-OA o vehículo a utilizar en el modelo de OIR. Tanto la funcionalidad como la histología del tejido retinal evaluadas por ERG y tinción de H&Eo, respectivamente, no fueron afectadas por el tratamiento con el NO₂-OA ni por el vehículo. Es necesario señalar que al trabajar con nitrolípidos, moléculas poco solubles en agua y que fácilmente liberan su grupo nitro (-NO₂) al medio perdiendo su actividad biológica, tuvimos que usar solubilizadores de estas moléculas

como DMSO y PEG400. Las concentraciones elegidas fueron seleccionadas por bibliografía, las cuales demostraban no ser tóxicas para los tejidos (208). Para las inyecciones i.o. el vehículo contenía 10 % DMSO (donde se encuentra NO₂-OA) – 10 % PEG400 - 80 % PBS, mientras que para las inyecciones i.p. se formuló 50 % PEG400 – 50 % PBS.

Una vez corroborada la activación de la vía Keap1-Nrf2 por efecto del NO₂-OA, a continuación, nos preguntamos que rol cumpliría la misma en los eventos vasoproliferativos, la gliosis y la neurodegeneración observado en el modelo de OIR. Para ello inyectamos i.o. el NO₂-OA a P12 y realizamos inyecciones i.p. de refuerzo a los días P14, P17, P20 y P23 tanto en el modelo de OIR como en ratones controles mantenidos en RA.

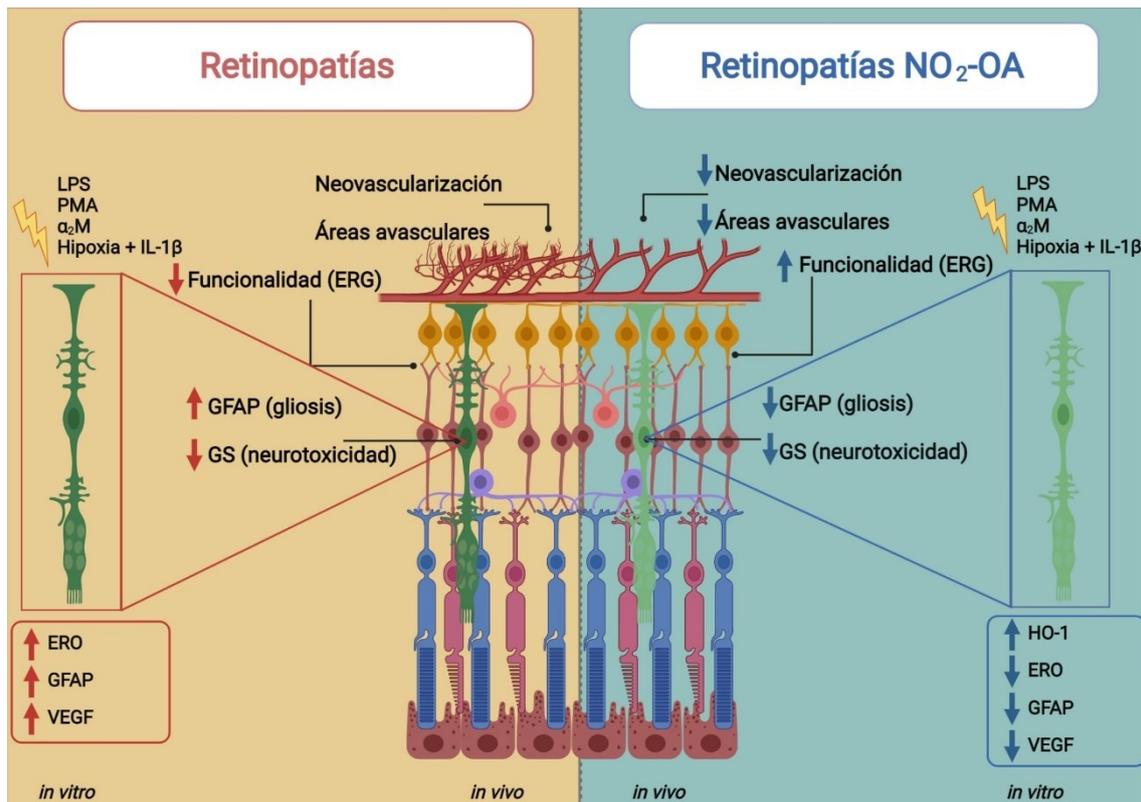
Ensayos de retina completa montados en *flat-mount* y teñidos con la isolectina IB4 mostraron que la administración del NO₂-OA, indujo angiogénesis reparativa normal y funcional lo que disminuyó tanto el área avascular como el área de NV en animales P17 OIR (pico de NV). Como ya mencionamos, la normalización del plexo vascular es esencial para la irrigación correcta del tejido retinal y prevenir las alteraciones derivadas de la turbulencia en el flujo o estasis de las células sanguíneas (209). Estos resultados concuerdan con trabajos previamente publicados, en los cuales se demostró que animales con ablación genética de Nrf2 (Nrf2^{-/-}) en P17 OIR, aumentaron significativamente el área avascular, acompañado por un incremento considerable en la NV prerretiniana patológica (148, 155). Además, el uso de activadores farmacológicos de Nrf2, como dh404 y RS9, en el modelo de OIR disminuyó el área avascular, el área neovascular y la permeabilidad de los vasos sanguíneos de la retina de estos animales (154, 156). Varios mecanismos han sido descritos en estos trabajos, aunque todavía no está claro el rol de la vía de señalización antioxidante Keap1-Nrf2 en la angiogénesis reparativa de áreas avasculares en estas retinopatías. Dado que la NV prerretiniana patológica esta principalmente regulada por el incremento desmedido de VEGF por células hipóxicas en el tejido retinal, en un intento por esclarecer el rol del NO₂-OA en la angiogénesis reparativa, medimos los niveles de expresión del ARNm de VEGF en retinas de animales OIR y RA a P17. Como era de esperar, nuestros resultados mostraron un incremento en los niveles de VEGF en retina de ratones OIR con respecto al control (RA), sin embargo, la administración de NO₂-OA no modificó este incremento. Cabe resaltar que, en la retina VEGF es principalmente producido por las CGM, astrocitos, GCs, ERP y en menor proporción por células endoteliales (210). Además, demostramos en el ensayo de tubulogénesis *in vitro* un efecto antiangiogénico del NO₂-OA en células BAEC. Por lo tanto, de estos ensayos deducimos que es probable que la modulación de la NV sea debida principalmente a los efectos directos del NO₂-OA sobre el endotelio.

En una siguiente etapa, nos preguntamos si la administración *in vivo* del NO₂-OA, era capaz de mejorar la gliosis producida en el modelo de OIR. Por ensayos de *Western blot*

observamos que los niveles de GFAP incrementaron a P17 en el modelo de OIR y, en concordancia con el modelo *in vitro*, el tratamiento con el NO₂-OA redujo este aumento a los niveles del control (RA). Interesantemente, este efecto contribuiría a la reducción de la respuesta deletérea persistente de las CGM que induce progresivamente daño en el tejido retinal. Por otro lado, se observó la alteración de las CGM en estas retinopatías, a través de la disminución de la proteína detoxificante GS a P17 OIR. A diferencia de GFAP, la administración del NO₂-OA no modificó esta caída en la expresión de GS, lo que indica que el nitrolípido no es capaz de revertir la pérdida de capacidad de las CGM para prevenir la neurotoxicidad mediada por glutamato a P17 OIR. Considerando estos resultados sería interesante evaluar estos marcadores de estrés glial a P26 donde los efectos de la neurodegeneración se tornan persistentes.

Finalmente, evaluamos si los cambios vasculares y gliales observados luego de la administración con el NO₂-OA mejoraban la funcionalidad neuronal de la retina a P17 y P26 OIR, utilizando el ERG. Como describimos en la Introducción, la onda-a inicial es producida por corrientes iónicas extracelulares generadas por fotorreceptores durante la fototransducción mientras que la onda-b corresponde a la actividad de las células de la capa nuclear interna de la retina. Como se esperaba, el modelo de OIR no modificó la amplitud ni la latencia de la onda-a a P17 ni P26. Sin embargo, disminuyó la amplitud e incremento el tiempo de latencia de la onda-b tanto a P17 como a P26. En este modelo la administración del NO₂-OA mostró una tendencia a recuperar la amplitud y el tiempo de latencia de la onda-b a P17, lo cual fue significativo a P26. Estos resultados sugieren un efecto protector del NO₂-OA sobre la pérdida de funcionalidad y neurodegeneración producida en el modelo de OIR. A modo de corroborar estos resultados y, como parámetro de muerte celular, analizamos los niveles de caspasa-3 total en animales OIR por ensayos de *Western blot*. Animales P26 OIR inyectados con vehículo mostraron una disminución significativa de la caspasa-3 total, lo que indicaría la escisión de caspasa-3 hacia su forma activa, sugiriendo activación de muerte por apoptosis. Este efecto fue prevenido por la administración del NO₂-OA. Estos hallazgos, sin lugar a dudas, invitan a profundizar sobre el mecanismo por el cual el NO₂-OA ejerce un efecto neuroprotector en el modelo de OIR.

Mediante el uso de dos abordajes experimentales *in vitro* e *in vivo*, en esta tesis se demostró las diferentes funciones de la vía antioxidante Keap1-Nrf2 inducida por el tratamiento con el NO₂-OA. Interesantemente, el NO₂-OA fue capaz de eliminar la NV, disminuir el área avascular, promover la angiogénesis reparativa retinal y rescatar a las neuronas y células gliales de la muerte. En este sentido, el hallazgo de que el NO₂-OA tiene un efecto beneficioso para el tejido retinal constituye la primera evidencia de que este nitrolípido puede establecerse como un potencial agente terapéutico en la prevención de patologías vasoproliferativas y neurodegenerativas tan complejas como la ROP y la RDP (**Esquema 10**).



Esquema 10. Efecto de NO₂-OA en modelos *in vivo* e *in vitro* de retinopatías. Representación gráfica de las alteraciones vasculares, neuronales y gliales presentes en las retinopatías. Se observó una disminución del área avascular y del número de neovasos, una mejora en la funcionalidad retinal (ERG) y una disminución de la gliosis luego del tratamiento con NO₂-OA en el modelo de OIR.

VI. PERSPECTIVAS FUTURAS

Los resultados obtenidos en esta tesis contribuirán, sin lugar a dudas, en el progreso para el tratamiento de las RP y en la generación de nuevos objetivos los cuales compartimos a continuación:

I. Modelo *in vitro*:

I.a.) Analizar el efecto del NO₂-OA sobre el sistema antioxidante y marcadores de daño celular directamente en cultivos NEURONALES expuestos a hipoxia (1% O₂).

I.b.) Evaluar el efecto citoprotector de las CGM pre-incubadas con el NO₂-OA sobre marcadores de daño celular y factores neurotróficos en NEURONAS expuestas a hipoxia (1% O₂).

II. Modelo *in vivo* (OIR):

Estudiar el efecto del NO₂-OA sobre:

II.a.) la muerte celular, marcadores de daño y factores neurotróficos;

II.b.) los niveles de citoquinas proinflamatorias (TNF α , IL-1 e IL-6);

II.c) la actividad del sistema de defensa antioxidante endógeno.

Finalmente, en ambos modelos se pretende analizar si los mecanismos de acción del NO₂-OA son mediados por el sistema de defensa antioxidante Keap1/Nrf2 utilizando inhibidores específicos.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

VII.1 Modelo “in vitro”

Materiales:

La línea de células gliales de Müller humanas y espontáneamente inmortalizadas MIO-M1 (*por las siglas en inglés Moorfields/ Institute of Ophthalmology-Müller 1*) fue proporcionada por G. Astrid Limb (UCL Institute of Ophthalmology and Moorfields Eye Hospital, London, UK). La línea de células endoteliales de aorta bovina (BAEC) fue adquirida de la American Type Culture Collection (ATCC®). El ácido nitro-oleico (NO₂-OA) y el ácido oleico (OA) fueron proporcionados por el Dr. Bruce A. Freeman y el Dr. Francisco Schopfer (Department of Pharmacology and Chemical Biology, University of Pittsburgh, United States). Lipopolisacárido (LPS), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), sonda 2', 7'-dicloro dihidro fluoresceína diacetato (2', 7'-DCFH-DA), trigonelina y el suplemento de crecimiento de células endoteliales fueron comprados en Sigma Aldrich, St. Louis, MO. La proteína α_2 Macroglobulina (α_2 M) se purificó a partir de plasma humano siguiendo un procedimiento descrito previamente (211). α_2 M se activó (α_2 M*) incubando α_2 M con metilamina-HCl 200 mM durante 6 hs a pH 8,2, como se describió anteriormente (212). La proteína IL-1 β /IL-1F2 de ratón recombinante fue obtenida de R&D Systems Biotechne, MN, USA.

a) Cultivos de células gliales de Müller humanas: MIO-M1 (*por las siglas en inglés Moorfields/ Institute of Ophthalmology-Müller 1*).

La línea celular MIO-M1 posee las mismas características fenotípicas y funcionales que un cultivo primario de células gliales de Müller, es decir, muestra los mismos marcadores antigénicos y la misma respuesta electrofisiológica a glutamato (213). Esta línea celular fue cultivada en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) High Glucose, suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina (GlutaMAX; Invitrogen) y 50 U/ml penicilina/estreptomicina (Invitrogen) a 37°C y 5% de CO₂.

b) Cultivos de células endoteliales de aorta bovinas: BAEC

Las células BAEC fueron cultivadas en DMEM High Glucose, suplementado con 20% de SFB, 2 mM L-glutamina (GlutaMAX; Invitrogen), 50 U/ml penicilina/estreptomicina (Invitrogen) y 0,03 mg/ml de suplemento de crecimiento de células endoteliales obtenido a partir de glándula pituitaria bovina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Los cultivos celulares se mantuvieron a 37°C en un ambiente humidificado al 5% de CO₂.

c) Ensayo de viabilidad celular en MIO-M1

La viabilidad celular fue evaluada utilizando el colorante metabólico Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Las células MIO-M1 se cultivaron en placas de 96 pocillos, sembrando 2×10^3 células/pocillo en un volumen final de 100 μ l de DMEM completo e incubando por 24 hs para permitir que las células se adhieran a la placa. Al día siguiente, se incubaron en diferentes condiciones experimentales: medio de cultivo DMEM (control), 0,1% v/v de metanol (vehículo), diferentes concentraciones del NO₂-OA (0,1 a 5 μ M) y 5 μ M de OA durante 24, 48 y 72 hs. Para esto, se trató las células con 100 μ l de las soluciones antes mencionadas 2X, volumen final en el pocillo 200 μ l (dilución 1:2). Luego de los distintos períodos de incubación, se añadió al medio de cultivo 10 μ l de la sal de tetrazolio MTT / pocillo (5 mg/ml en PBS estéril) y se incubó durante 3 hs a 37 °C. Posteriormente, se retiró cuidadosamente el medio celular y se añadieron 200 μ l de DMSO por pocillo para solubilizar los cristales de formazán. El DMSO fue usado para lectura de blancos y se realizaron 3 replicados por condición en 3 experimentos independientes. Finalmente, los valores de densidad óptica se midieron a una longitud de onda de 570nm utilizando un lector de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, EE. UU.). Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en relación al control. El porcentaje de viabilidad se calculó de la siguiente manera: Viabilidad (%) = (Densidad óptica de las células tratadas – Densidad óptica del DMSO) / (Densidad óptica del control – Densidad óptica del DMSO) x 100.

d) Ensayo de viabilidad celular en BAEC

El ensayo colorimétrico MTT se realizó como se describió anteriormente (Joray et al., 2017; 2015). Brevemente, se sembraron 5×10^4 células BAEC suspendidas en 100 μ l de DMEM completo en placas de 96 pocillos y se incubaron durante 24 horas. Posteriormente, se incorporaron 100 μ L de medio que contenía vehículo (concentración final en el pocillo de 0,1 % DMSO) o diferentes concentraciones finales en el pocillo del NO₂-OA (50- 25- 12,50- 6,25- 3,125- 1,56- 0,78- 0,39 μ M). Después de 24 hs se añadieron 10 μ L de una solución 5 mg/mL de MTT en PBS estéril y las placas se incubaron durante otras 4 hs a 37 °C. A continuación, las placas se centrifugaron durante 10 min. a 2000 rpm y se eliminaron los sobrenadantes. Finalmente, los cristales de formazán se solubilizaron con 100 μ L de DMSO y se midió la absorbancia a 595nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad celular en relación con el control, el cual se calculó igual que lo descrito en el ítem anterior.

e) Preparación de lisados celulares para ensayos de Western Blot

Las células MIO-M1 se cultivaron en placas de 6 pocillos, sembrando 2×10^5 células/pocillo en un volumen final de 2 ml de DMEM suplementado por 24 hs. Al día siguiente, las células fueron privadas al 0,5% de SFB durante 2 hs. Todas las incubaciones se realizaron al 0,5 % SFB. Una vez finalizado el experimento, la placa de 6 pocillos se colocó sobre hielo y las células fueron lavadas 3 veces con 2 ml de PBS frío. Luego, fueron lisadas agregando 100 μ l/pocillo de una solución de PBS 1 % Triton X-100, conteniendo 1 mM de phenylmethyl sulfonylfluoride (PMSF), 10 mM de ortovanadato de sodio y cóctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (SIGMA, St. Louis, MO). Los lisados fueron recolectados en tubos de 1,5 ml debidamente rotulados. Las muestras fueron sonicadas en hielo utilizando el siguiente ajuste: amplitud de 40 % durante dos pulsos de 10 seg separados por 5 seg de pausa. Luego los lisados se centrifugaron a 10.000 rpm por 20 min. a 4 °C y los sobrenadantes fueron recolectados. La concentración de proteínas fue determinada utilizando ácido Bicinoninico (BCA) (Pierce, Illinois, USA), empleando Albúmina Sérica Bovina (ASB) como proteína estándar y un espectrofotómetro UV-BioTek (BioTek Instruments Inc., Vermont, USA). Las muestras fueron conservadas a -20°C hasta su posterior procesamiento.

f) Ensayos de Western blot

Los ensayos de *Western blot* se llevaron a cabo con el objetivo de evaluar los cambios en los niveles de expresión de diferentes proteínas. Para ello, se agregó buffer de muestra 5X (60 mM TRIS-HCl pH 6,8, 25 %v/v glicerol, 2% p/v SDS y 0,1 % p/v azul de bromofenol) y Dithiothreitol (DTT) 50X (1M DTT) en las cantidades adecuadas para una concentración final 1X en los lisados celulares, y luego se calentaron las muestras por 5 min a 100 °C en baño seco. La electroforesis fue llevada a cabo con 20 μ g de proteína/calle sembradas en SDS-PAGE al 10%p/v acrilamida/bisacrilamida en buffer de corrida (25 mM TRIS; 192 mM Glicina; 0,1% SDS), pH 8,3 a 100 V, en condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras (DTT). Al finalizar la misma, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) en buffer Tris (25 mM TRIS; 192 mM Glicina; 20% v/v Etanol), pH 8,3 a 100 V durante 1:30 hs. Luego las membranas fueron bloqueadas con leche descremada o albúmina al 5% p/v en TBS que contenía Tween-20 al 0,1 % v/v (TBST) durante 1 h a temperatura ambiente (TA) e incubadas con el respectivo anticuerpo primario, durante toda la noche a 4 °C. Se utilizaron los siguientes

anticuerpos primarios: anti-HO-1 policlonal de conejo (1/1000; Enzo Life Science), anti-GFAP policlonal de conejo (1/1000; Dako, Carpinteria, CA), anti-Vimentina monoclonal de ratón (1/1000; M7020, Dako, Carpinteria, CA) y anti- β -actina monoclonal de ratón (1/2000; ab8226, Abcam). Los anticuerpos secundarios fueron: IRDye 800 CW burro anti-IgG de conejo o IRDye 800 CW burro anti-IgG de ratón (1/15000). Todas las diluciones, tanto de anticuerpos primarios como secundarios, se realizaron en 1% ASB TBST. Las membranas se visualizaron y cuantificaron utilizando el sistema de imágenes por infrarrojos Odyssey (LI-COR, Inc., Lincoln, NE, USA).

g) Ensayo de Diclorofluoresceína diacetato

La producción de Especies Reactivas de Oxígeno (ERO) en células MIO-M1 se evaluó mediante la utilización del ensayo de Diclorofluoresceína diacetato (DCF-DA) (214). Brevemente, después del tratamiento con 5 μ M NO₂-OA o vehículo, las células MIO-M1 se estimularon con 1 μ M de PMA o 1 μ g/ml de LPS durante 30 min. Luego, las células fueron lavadas y se incubaron durante 30 min con la solución conteniendo la sonda 2',7'-diclorofluoresceína diacetato (5 μ M) y las células se incubaron durante 30 min. Las células fueron cosechadas con detaching buffer, luego la intensidad de fluorescencia (media geométrica) de DCF se midió con un citómetro de flujo FACSCanto II (BD Biosciences) y se analizó con el software FlowJo (ThreeStar). Alternativamente, las células MIO-M1 se trataron con 5 μ M NO₂-OA o vehículo durante 30 min antes del estímulo con 60 nM de α_2 M durante 2, 4 y 6 hs, y los niveles de ERO se determinaron como se indicó anteriormente.

h) Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR)

A fin de evaluar cambios transcripcionales, células MIO-M1 fueron colectadas en 500 μ L de Trizol (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina). Las muestras se almacenaron a -80°C hasta la purificación de ARNm. Brevemente, 1 μ g de ARNm total se transcribió de manera inversa en un volumen total de 20 μ L empleando cebadores aleatorios (random primers) (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y 50 U de M-MLV transcriptasa reversa (Promega Corp.). Luego el cDNA fue mezclado con 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y los siguientes *cebadores directos e inversos*: VEGF-A directo:

CCGCAGACGTGTAATGTTCT/ VEGF-A inverso: CGGCTTGTCACATCTGCAAGTA; HO-1 directo: AAGACTGCGTTCCTGCTCAAC/ HO-1 inverso: AAAGCCCTACAGCAACTGTCCG.

Las reacciones de PCR cuantitativa fueron llevadas a cabo en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System con el Software Sequence Detection v1.4. Las condiciones de ciclado incluyeron: una etapa de calentamiento a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15 seg y 60 °C por 1 min. La especificidad fue verificada mediante el análisis de las curvas de melting. Los resultados fueron normalizados a GAPDH: directo GATGCCCCCATGTTTGTGAT/ inverso GGTCATGAGTCCTTCCACGAT. La expresión de genes relativa fue calculada de acuerdo al método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Cada muestra fue analizada por triplicado. No se observaron amplificaciones en los controles negativos de PCR que emplearon agua como muestra (resultados no mostrados).

i) Ensayos de hipoxia gaseosa

Para los ensayos de hipoxia gaseosa, las células MIO-M1 fueron cultivadas hasta una confluencia entre 60-70% en condiciones normales y tratadas con diferentes estímulos: vehículo, 5 μ M de NO₂-OA, 20 ng/ml de IL-1 β y 5 μ M de NO₂-OA + 20ng/ml de IL-1 β . Inmediatamente las placas se transfirieron a una cámara de cultivo sellada (StemCell Technologies, Vancouver, Canadá) con suministro de una mezcla de gases compuesta por 1 % de O₂, 94 % de N₂ y 5 % de CO₂ a 37 °C durante 24 hs. Células MIO-M1 mantenidas en condiciones de normoxia (21% O₂) tratadas con los mismos estímulos fueron utilizadas como control. Las muestras obtenidas fueron procesador para ensayos de qRT-PCR.

j) Ensayo de formación de túbulos en células endoteliales de aorta bovina (BAEC)

Este ensayo se fundamenta en la capacidad de las células endoteliales de formar estructuras tubulares tridimensionales cuando son colocadas sobre una base de matrigel en presencia de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Este ensayo es considerado una de las pruebas más específicas para medir angiogénesis *in vitro* (Arnaoutova and Kleinman, 2010; Grant et al., 1992; Madri et al., 1988) motivo por el cual ha sido seleccionado para evaluar el efecto del NO₂-OA en la formación de túbulos. Brevemente, células BAEC fueron cultivadas ($\approx 1,5 \times 10^4$ células/pocillo) en una placa de 96 pocillos previamente cubierta con 30 μ l de Matrigel. Las placas se incubaron durante

18 hs (37 °C, 5% CO₂) en presencia de los siguientes estímulos: 5 μM de NO₂-OA y 1 μM de trigonelina + 5 μM de NO₂-OA, con la adición de VEGF (10 ng/ml). Se usó suramina sódica 30 μM como control positivo de inhibición de la angiogénesis. Se analizaron simultáneamente muestras de control con y sin sus respectivos vehículos. Las imágenes se obtuvieron con un microscopio invertido Olympus CKX41 y se analizaron con el software ImageJ. Se cuantificaron las estructuras tubulares y se calcularon los porcentajes de inhibición (I%) con la siguiente ecuación $I\% = [1 - (\text{Longitud total del tubo tratamiento} / \text{Longitud total del tubo control})] \times 100$.

k) Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 7.0. Un p-valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Estudios paramétricos fueron seleccionados dada la homogeneidad de varianzas evaluada por test F o de Barlett. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba post test de comparación múltiple de Dunnett (comparación con el control) o Tukey (comparación entre todos los grupos) fueron empleados para determinar las diferencias estadísticas entre más de 2 diferentes grupos. Media ± el error estándar (SEM) (representado como T) fueron graficadas en los análisis paramétricos.

VII.II Modelo "In vivo"

a) Animales

Se utilizaron ratones *wild type* C57BL/6, los cuales fueron adquiridos en el bioterio de la Universidad de La Plata y criados en el bioterio del CIBICI. Todos los procedimientos experimentales fueron realizados siguiendo las normas de ARVO (por *Association for Research in Vision and Ophthalmology*) y aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (Resol. HCD 1216/18). Se realizó el máximo esfuerzo por emplear el menor número posible de animales de experimentación.

b) Ensayo de compatibilidad/tolerancia ocular en ratones *wild type* C57BL/6 adultos

A ratones adultos *wild type* C57BL/6J expuestos a ciclos estándar de luz (12h luz/12h oscuridad) se les inyectó por vía intraocular (i.o.) 1 µl de una solución 50 µM de NO₂-OA en DMSO (10%- PEG400 10%- PBS 80%) o vehículo, durante el ciclo de luz (día 0). Nuevamente, los animales se mantuvieron en cajas de plástico transparente con ciclos estándar de luz. Los animales fueron inyectados vía intraperitoneal (i.p.) cada 2 días (días 2, 5, 8, 11 y 14). Se realizaron estudios electrofisiológicos retinales a los 3, 7 y 15 días después de la inyección i.o., seguido de la eutanasia de los animales para evaluación histopatológica. Los animales inyectados con buffer fosfato salino (PBS) por vía i.o. se usaron como grupo de control.

c) Electrorretinografía (ERG)

La actividad electroretinográfica fue determinada en ratones control y tratados luego de adaptarlos en oscuridad completa por 18 hs (overnight, ON). Posteriormente, bajo iluminación con luces led rojas, los ratones fueron anestesiados vía i.p. con una solución de ketamina (90 mg/kg) /xilacina (8 mg/kg). Las pupilas fueron dilatadas con 1 % de tropicamida y la córnea fue lubricada con gotas de gel conteniendo 0,4 % de polietilenglicol 400 y 0,3 % de polietilenglicol (Systane, Alcon, Buenos Aires, Argentina) para prevenir el daño de la superficie ocular. Los ratones fueron expuestos al estímulo

lumínico a una distancia de 20 cm. Un electrodo de referencia fue situado subcutáneamente en el lomo del ratón, próximo al cuello. Un electrodo de tierra se insertó en la cola y el electrodo de oro de registro se colocó en contacto con la superficie corneal. Las señales electrorretinográficas fueron medidas simultáneamente en ambos ojos (Akonic BIO-PC, Argentina). Se amplificaron, filtraron (1.5-Hz low-pass filter, 1000 high-pass filter, notch activated) y promediaron 10 respuestas consecutivas al flash de luz blanca no atenuada (5 cd.s/m², 0.2 Hz) emitida por un estimulador fotópico (lightemitting diodes) configurado a brillo máximo. La amplitud de la onda a fue medida como la diferencia en amplitudes entre la línea de base y el valle de la deflexión negativa, mientras que la amplitud de la onda b fue medida desde el valle de la onda a, hasta el pico de la onda b. Las latencias de las ondas a y b corresponden a los tiempos en los cuales llega al pico cada onda. Se promediaron las respuestas de ambos ojos de cada ratón.

d) Preparación de criocortes retinales

Con el objeto de realizar análisis histológicos, se prepararon criosecciones retinales obtenidas a partir de ojos previamente fijados con 4 % de PFA a TA durante 2 hs y luego incubados en gradiente de sucrosa (10%, 20% y 30%), durante al menos 1 día en cada una de las concentraciones. Se embebieron los ojos en medio OCT (de optimum cutting temperature, Tissue-TEK, Sakura) y cortes sagitales paralelos al nervio óptico fueron obtenidos en un crióstato (Thermo Scientific) a -20°C. Las secciones de 10 µm de espesor fueron conservadas a -20 °C hasta su posterior utilización.

e) Evaluación de la estructura retinal en criocortes

Los criocortes retinales fueron teñidos con hematoxilina y eosina (H&Eo), con el objetivo de evaluar la integridad de las capas retinales. Mediante microscopía de campo claro se tomaron fotografías de los criocortes de retinas de animales en el día P15. Además, se cuantificó el espesor de las capas retinales en estos cortes retinales.

f) Modelo de Retinopatía Inducida por Oxígeno (OIR) en ratones wild type C57BL/6J

Para el desarrollo del modelo de OIR (Smith et al., 1994), crías de ratones *wild type* C57BL/6J en el día posnatal 7 (P7) fueron colocadas junto a sus madres en una cámara de hiperoxia con una concentración de oxígeno constante ($75\% \pm 2\% \text{ O}_2$) durante un período de 5 días (P12). Los niveles de oxígeno fueron controlados permanentemente con un sensor (Teledyne Analytical Instruments, CA, USA). Luego los animales fueron devueltos a condiciones ambientales, (RA, $21\% \text{ O}_2$) durante otros 5 o 14 días (día P17 o P26, respectivamente). Otro grupo de ratones de la misma edad fueron mantenidos en condiciones ambiental ($21\% \text{ O}_2$) para ser empleados como animales control (RA). Los animales se mantuvieron en cajas plásticas transparentes con ciclos estándar de luz y oscuridad (12 h luz/12 hs oscuridad). A P12, los ratones fueron sacados de la cámara de hiperoxia e inyectados i.o. con $1 \mu\text{l}$ de una solución $50 \mu\text{M NO}_2\text{-OA}$ en DMSO (10%: PEG 400 10%: PBS 80%). Ratones inyectados con $1 \mu\text{l}$ de vehículo (DMSO 10%: PEG 400 10%: PBS 80%) fueron utilizados como control. La concentración de $\text{NO}_2\text{-OA}$ fue seleccionada de acuerdo a ensayos *in vitro* y se empleó una concentración 10 veces mayor a los cultivos ya que se tomó en cuenta la dilución del $\text{NO}_2\text{-OA}$ en la cavidad vítrea ($10 \mu\text{l}$). Brevemente, los ratones fueron anestesiados localmente con una gota de Proparacaína Clorhidrato 0,5% (Anestalcon, Alcon), se indujo exoftalmia con una gota de tropicamida 1% (Midril, Alcon, Buenos Aires, Argentina) y los ojos fueron inyectados en el limbo nasal superior, de acuerdo a descripciones previas (102). Luego se realizaron inyecciones i.p. de refuerzo a los días P14, P17, P20 y P23 con una solución de 15 mg/Kg de $\text{NO}_2\text{-OA}$ en PEG 400: PBS. Los ratones control se inyectaron los mismos días con vehículo (PEG400: PBS). Los animales fueron sacrificados a los tiempos característicos del modelo murino de OIR: P17 (pico de NV) y P26 (resolución de alteraciones vasculares) (29). Para evaluar el efecto de $\text{NO}_2\text{-OA}$, algunos ratones fueron sacrificados 6 hs posterior a la inyección i.o. (P12). Los ojos o retinas de los ratones sacrificados fueron recolectados y procesados para *Western blot*, ensayos de PCR en tiempo real, inmunohistoquímica o tinción con lectinas. Al menos seis ratones por grupo fueron usados para cada condición a cada tiempo examinado. Los resultados obtenidos son representativos de tanto hembras como machos ya que no hubo diferencias aparentes.

g) Marcación de Células Endoteliales con *Griffonia Simplicifolia* I Isolectina B4 (GSI-B4) y montaje en flat-mounts

A fin de evaluar en el modelo de OIR los eventos de VO y NV retinal, se prepararon retinas completas sobre las cuales se realizó la marcación de células endoteliales utilizando la lectina *Griffonia simplicifolia Isolectin B4* (153) conjugada con Alexa 488. Para ello, se enuclearon los ojos de ratones sacrificados a P17 y se fijaron en 4% de PFA durante 2 hs a TA. Luego los ojos se conservaron en PBS a 4 °C hasta su posterior procesamiento. Bajo lupa estereoscópica cada retina neural fue separada del Epitelio Pigmentario de la Retina (RPE) para su posterior tinción y análisis. A continuación, las retinas fueron bloqueadas y permeabilizadas con 5 % de ASB en TBS 0,1 % Tritón X-100 durante 6 hs a 4 °C en agitador orbital. Finalmente, las retinas fueron incubadas con la solución de lectina (1/200 en TBS 0,1 % Tritón X-100) ON a 4 °C con agitación. Al día siguiente, luego de 3 lavados de 30 min c/u con TBS 0,1 % Tritón X-100 a TA, las retinas fueron abiertas con 4 incisiones perpendiculares al nervio óptico y montadas en *flat-mount* con la capa de vasos retinales orientados hacia arriba. Posteriormente, fueron visualizadas por microscopia confocal (Olympus Fluoview FV1200; Olympus Corp., New York, NY, USA) utilizando un objetivo 10X y platina motorizada. Las imágenes finales de los *flat-mounts* fueron procesadas con el programa Image J Fiji.

h) Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (qRT-PCR)

A fin de evaluar cambios en los transcritos de genes corriente abajo de la vía antioxidante Keap1/Nrf2 luego de 6 hs de la inyección i.o., las retinas de ojos inyectados con NO₂-OA u ojos controles, fueron colocadas en 500 µL de Trizol (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y homogeneizadas mecánicamente con pipeta hasta disgregar completamente. Se almacenaron a -80°C hasta la purificación de ARNm. 1 µg de ARN total fue transcrito inversamente en un volumen total de 20 µl empleando cebadores aleatorios (Invitrogen, Buenos Aires, Argentina) y 50 U de M-MLV transcriptasa reversa (Promega Corp.). Luego el cDNA fue mezclado con 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) y los siguientes *cebadores directos e inversos* fueron utilizados:

NQO-1 directo: AGGATGGGAGGTACTCGAATC/ NQO-1 inverso:
AGGCGTCCTCCTTATATGCTA; SOD1 directo: AACCA GTTGTGTTGTCAGGAC/ SOD1
inverso: CCACCATGTTTCTTAGAGTGAGG; VEGF-A directo:
GGAGACTCTTCGAGGAGCACTT/ VEGF-A inverso: GGCGATTTAGCAGCAGATATAAGAA. La

reacción de PCR cuantitativa fue llevada a cabo en el equipo Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System con el Software Sequence Detection v1.4. Las condiciones de ciclado incluyeron: una etapa de calentamiento a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15seg y 60 °C por 1 min. La especificidad fue verificada mediante el análisis de las curvas de melting. Los resultados fueron normalizados a GAPDH (directo: CAGAACATCATCCCTGCAT/ inverso: GTTCAGCTCTGGGATGACCTT). La expresión relativa de genes fue calculada de acuerdo al método 2- $\Delta\Delta$ Ct. Cada muestra fue analizada por triplicado. No se observaron amplificaciones en los controles negativos de PCR que emplearon agua como muestra (resultados no mostrados).

i) Extractos proteicos de retina neural

Retina neural de animales sacrificados a diferentes tiempos fueron separadas de las capas RPE-Coroides y almacenadas a -80°C para ensayos de *Western blot*. Una vez descongeladas fueron sonicadas durante 20 seg (dos pulsos de 10 seg separados de 5 seg de pausa) a una amplitud de 40 % en buffer de TBS (Tris-Base 0,05M pH 7,4; 137mM NaCl, 2mM EDTA pH 8, 1% Nonidet P40, 1mM PMSF, 2mM ortovanadato de sodio, coctel de inhibidores de proteasas y fosfatasas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO)). Luego los lisados fueron incubados a 4 °C por 30 min. y centrifugados a 10.000 rpm por 20 min en centrifuga refrigerada (4 °C). Después de la centrifugación, los sobrenadantes fueron recolectados y la concentración de proteínas fue determinada por el método BCA (Pierce, Buenos Aires, Argentina) para ser posteriormente utilizados en ensayos de *Western blot*.

j) Ensayos de Western blot

Con el propósito de evaluar los cambios en los niveles de expresión de diferentes proteínas, extractos proteicos de retina neural conteniendo 20-25 μ g de proteínas fueron solubilizados en buffer de muestra y calentados por 5 min a 100 °C en baño seco. Las muestras fueron sembradas en geles SDS-PAGE preparadas con 10 % p/v de acrilamida/bisacrilamida. La electroforesis fue llevada a cabo en buffer de corrida en condiciones desnaturalizantes (SDS) y reductoras (DTT), a 100 V durante 2,5 hs. Al finalizar la misma, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Hybond ECL; GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) en buffer

Tris (25 mM; Glicina 192 mM; Etanol 20 % v/v), pH 8,3 a 100 V durante 1 h. Luego las membranas fueron bloqueadas con ASB al 5 % en TBST durante 1 h e incubadas con el anticuerpo primario respectivo diluido en 1 % ASB en TBST, ON a 4 °C. Los anticuerpos primarios utilizados según cada caso fueron: anti-GFAP policlonal de conejo (1/1000; Dako, Carpinteria, CA), anti-GS monoclonal de ratón (1/500; MAB 302, Millipore Corporation MA, USA), anti-caspasa 3 policlonal de conejo (1/300; HPA 002643, Sigma Aldrich) y anti- β -actina monoclonal de ratón (1/2000; ab8226, Abcam). La reacción secundaria se llevó a cabo utilizando un anticuerpo secundario IgG de burro anti-conejo IRDye 800 CW o IgG de burro anti-ratón IRDye 700 CW (1/15000 en TBS en 1 % ASB) durante 1 h a TA, protegido de la luz. Luego de 3 lavados con TBST, las membranas fueron visualizadas y cuantificadas empleando Odyssey Infrared Imaging System (LICOR, Inc., Lincoln, NE, USA).

k) Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism 7.0. Un p-valor < 0,05 fue considerado estadísticamente significativo. Estudios paramétricos fueron seleccionados dada la homogeneidad de varianzas evaluada por test F o de Barlett. Se emplearon el test t de 2 colas no apareado o Mann Whitney cuando se analizaron 2 condiciones. Análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de la prueba post test de comparación múltiple de Dunnett (comparación con el control) o Tukey (comparación entre todos los grupos) fueron empleados para determinar las diferencias estadísticas entre más de 2 diferentes grupos. ANOVA de dos vías seguido del post test de Bonferroni fue empleado para comparaciones entre grupos cuando 2 variables afectaban la variable dependiente. Media \pm el error estándar (SEM) (representado como T) fueron graficadas en los análisis paramétricos.

VIII. REFERENCIAS

1. Hoon, M., Okawa, H., della Santina, L., and Wong, R. O. L. (2014) Functional architecture of the retina: Development and disease. *Progress in Retinal and Eye Research*. **42**, 44–84
2. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System [Internet] - PubMed [online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21413389/> (Accessed June 15, 2022)
3. Grossniklaus, H. E., Geisert, E. E., and Nickerson, J. M. (2015) Introduction to the Retina. *Prog Mol Biol Transl Sci*. **134**, 383–396
4. Masland, R. H. (2001) The fundamental plan of the retina. *Nat Neurosci*. **4**, 877–886
5. Cowan, C. S., Renner, M., de Gennaro, M., Gross-Scherf, B., Goldblum, D., Hou, Y., Munz, M., Rodrigues, T. M., Krol, J., Szikra, T., Cuttat, R., Waldt, A., Papasaikas, P., Diggelmann, R., Patino-Alvarez, C. P., Galliker, P., Spirig, S. E., Pavlinic, D., Gerber-Hollbach, N., Schuierer, S., Srdanovic, A., Balogh, M., Panero, R., Kusnyerik, A., Szabo, A., Stadler, M. B., Orgül, S., Picelli, S., Hasler, P. W., Hierlemann, A., Scholl, H. P. N., Roma, G., Nigsch, F., and Roska, B. (2020) Cell Types of the Human Retina and Its Organoids at Single-Cell Resolution. *Cell*. **182**, 1623-1640.e34
6. Cunha-Vaz, J., Bernardes, R., and Lobo, C. (2011) Blood-retinal barrier. *Eur J Ophthalmol*. **21 Suppl 6**, 3–9
7. Silverman, S. M., and Wong, W. T. (2018) Microglia in the Retina: Roles in Development, Maturity, and Disease. *Annu Rev Vis Sci*. **4**, 45–77
8. Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2020) Glia of the human retina. *Glia*. **68**, 768–796
9. Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X., and Sharma, S. C. (2016) Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog Retin Eye Res*. **51**, 1–40
10. Friedlander, M., Dorrell, M. I., Ritter, M. R., Marchetti, V., Moreno, S. K., El-Kalay, M., Bird, A. C., Banin, E., and Aguilar, E. (2007) Progenitor cells and retinal angiogenesis. *Angiogenesis*. **10**, 89–101
11. Campochiaro, P. A. (2015) Molecular pathogenesis of retinal and choroidal vascular diseases. *Prog Retin Eye Res*. **49**, 67–81
12. Rubio, R. G., and Adamis, A. P. (2016) Ocular Angiogenesis: Vascular Endothelial Growth Factor and Other Factors. *Dev Ophthalmol*. **55**, 28–37
13. Ortiz-Basso, T., Gomez, P. V., Boffelli, A., and Paladini, A. (2022) Programa de teleoftalmología para prevención de la ceguera por diabetes en una zona rural de la Argentina. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*. **79**, 10–14
14. Fistolera, D. S., and Rodríguez, S. (2005) Administración y monitorización de oxígeno en recién nacidos con riesgo de retinopatía Artículo original. *Arch.argent.pediatr*. **103**, 503–513

15. Esandi, M. E., and Chapman, E. PROGRAMA DE PREVENCIÓN DE LA CEGUERA EN LA INFANCIA POR RETINOPATIA DEL PREMATURO Informe de Evaluación Externa Marzo, 2008 Evaluadores
16. Alda, E., Lomuto, C. C., Benítez, A. M., Bouzas, L., Brussa, M., Cattaino, A., Dinerstein, N. A., Erpen, N., Galina, L., Mansilla, C., Marinero, S., Quiroga, A., Saidman, G., Sánchez, C., Sepúlveda, T., and Visintin, P. (2018) Results of the National Program for the Prevention of Blindness in Childhood by Retinopathy of Prematurity in Argentina (2004-2016). *Archivos argentinos de pediatría*. **116**, 386–393
17. Guía de Práctica Clínica para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la Retinopatía del Prematuro (ROP)
18. Li, Z., Zhang, Y., Liao, Y., Zeng, R., Zeng, P., and Lan, Y. (2018) Comparison of efficacy between anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) and laser treatment in Type-1 and threshold retinopathy of prematurity (ROP). *BMC Ophthalmol.* 10.1186/S12886-018-0685-6
19. Chan-Ling, T., Gole, G. A., Quinn, G. E., Adamson, S. J., and Darlow, B. A. (2018) Pathophysiology, screening and treatment of ROP: A multi-disciplinary perspective. *Prog Retin Eye Res.* **62**, 77–119
20. Dogra, M. R., Katoch, D., and Dogra, M. (2017) An Update on Retinopathy of Prematurity (ROP). *Indian J Pediatr.* **84**, 930–936
21. Bahrami, B., Hong, T., Zhu, M., Schlub, T. E., and Chang, A. (2017) Switching therapy from bevacizumab to aflibercept for the management of persistent diabetic macular edema. *Graefe's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur klinische und experimentelle Ophthalmologie.* **255**, 1133–1140
22. Ebrahimiadib, N., Lashay, A., Riazi-Esfahani, H., Jamali, S., Khodabandeh, A., Zarei, M., Roohipoor, R., Khojasteh, H., Bazvand, F., Ojani, M., Shahabinejad, M., Yaseri, M., Modjtahedi, B. S., Davoudi, S., and Riazi-Esfahani, M. (2020) Intravitreal Ziv-Aflibercept in Patients With Diabetic Macular Edema Refractory to Intravitreal Bevacizumab. *Ophthalmic Surg Lasers Imaging Retina.* **51**, 145–151
23. Ashraf, M., Souka, A. A., Daich Varela, M., el Kayal, H., and Schlottmann, P. G. (2018) Switching to ranibizumab in diabetic macular oedema refractory to bevacizumab treatment. *Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia.* **93**, 523–529
24. Busch, C., Zur, D., Fraser-Bell, S., Laíns, I., Santos, A. R., Lupidi, M., Cagini, C., Gabrielle, P. H., Couturier, A., Mané-Tauty, V., Giacipoli, E., Ricci, G. D. A., Cebeci, Z., Rodríguez-Valdés, P. J., Chaikitmongkol, V., Amphornphruet, A., Hindi, I., Agrawal, K., Chhablani, J., Loewenstein, A., Iglicki, M., and Rehak, M. (2018) Shall we stay, or shall we switch? Continued anti-VEGF therapy versus early switch to dexamethasone implant in refractory diabetic macular edema. *Acta Diabetol.* **55**, 789–796

25. Chiang, M. F., Quinn, G. E., Fielder, A. R., Ostmo, S. R., Paul Chan, R. v., Berrocal, A., Binenbaum, G., Blair, M., Peter Campbell, J., Capone, A., Chen, Y., Dai, S., Ells, A., Fleck, B. W., Good, W. v., Elizabeth Hartnett, M., Holmstrom, G., Kusaka, S., Kychenthal, A., Lepore, D., Lorenz, B., Martinez-Castellanos, M. A., Özdek, Ş., Ademola-Popoola, D., Reynolds, J. D., Shah, P. K., Shapiro, M., Stahl, A., Toth, C., Vinekar, A., Visser, L., Wallace, D. K., Wu, W. C., Zhao, P., and Zin, A. (2021) International Classification of Retinopathy of Prematurity, Third Edition. *Ophthalmology*. **128**, e51–e68
26. Hartnett, M. E. (2017) Advances in understanding and management of retinopathy of prematurity. *Surv Ophthalmol*. **62**, 257–276
27. Roth, A. M. (1977) Retinal vascular development in premature infants. *Am J Ophthalmol*. **84**, 636–640
28. Sapiaha, P., Joyal, J. S., Rivera, J. C., Kermorvant-Duchemin, E., Sennlaub, F., Hardy, P., Lachapelle, P., and Chemtob, S. (2010) Retinopathy of prematurity: understanding ischemic retinal vasculopathies at an extreme of life. *J Clin Invest*. **120**, 3022–3032
29. Ridano, M. E., Subirada, P. v., Paz, M. C., Lorenc, V. E., Stupirski, J. C., Gramajo, A. L., Luna, J. D., Croci, D. O., Rabinovich, G. A., and Sánchez, M. C. (2017) Galectin-1 expression imprints a neurovascular phenotype in proliferative retinopathies and delineates responses to anti-VEGF. *Oncotarget*. **8**, 32505–32522
30. Subirada, P. v., Paz, M. C., Ridano, M. E., Lorenc, V. E., Fader, C. M., Chiabrando, G. A., and Sánchez, M. C. (2019) Effect of Autophagy Modulators on Vascular, Glial, and Neuronal Alterations in the Oxygen-Induced Retinopathy Mouse Model. *Front Cell Neurosci*. 10.3389/FNCEL.2019.00279
31. Chung, A. S., and Ferrara, N. (2011) Developmental and Pathological Angiogenesis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. **27**, 563–584
32. Wei, Y., Gong, J., Xu, Z., Thimmulappa, R. K., Mitchell, K. L., Welsbie, D. S., Biswal, S., and Duh, E. J. (2015) Nrf2 in ischemic neurons promotes retinal vascular regeneration through regulation of semaphorin 6A. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **112**, E6927–E6936
33. Sapiaha, P., Sirinyan, M., Hamel, D., Zaniolo, K., Joyal, J. S., Cho, J. H., Honoré, J. C., Kermorvant-Duchemin, E., Varma, D. R., Tremblay, S., Leduc, M., Rihakova, L., Hardy, P., Klein, W. H., Mu, X., Mamer, O., Lachapelle, P., di Polo, A., Beauséjour, C., Andelfinger, G., Mitchell, G., Sennlaub, F., and Chemtob, S. (2008) The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med*. **14**, 1067–1076
34. O’Sullivan, M. L., Puñal, V. M., Kerstein, P. C., Brzezinski, J. A., Glaser, T., Wright, K. M., and Kay, J. N. (2017) Astrocytes follow ganglion cell axons to establish an angiogenic template during retinal development. *Glia*. **65**, 1697–1716
35. Dorrell, M. I., Aguilar, E., and Friedlander, M. (2002) Retinal vascular development is mediated by endothelial filopodia, a preexisting astrocytic template and specific R-cadherin adhesion. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. **43**, 3500–10

36. Rodrigues, M., Xin, X., Jee, K., Babapoor-Farrokhran, S., Kashiwabuchi, F., Ma, T., Bhutto, I., Hassan, S. J., Daoud, Y., Baranano, D., Solomon, S., Luty, G., Semenza, G. L., Montaner, S., and Sodhi, A. (2013) VEGF secreted by hypoxic Müller cells induces MMP-2 expression and activity in endothelial cells to promote retinal neovascularization in proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes*. **62**, 3863–3873
37. Le, Y. Z. (2017) VEGF production and signaling in Müller glia are critical to modulating vascular function and neuronal integrity in diabetic retinopathy and hypoxic retinal vascular diseases. *Vision Res*. **139**, 108–114
38. Rivera, J. C., Holm, M., Austeng, D., Morken, T. S., Zhou, T. E., Beaudry-Richard, A., Sierra, E. M., Dammann, O., and Chemtob, S. (2017) Retinopathy of prematurity: inflammation, choroidal degeneration, and novel promising therapeutic strategies. *J Neuroinflammation*. 10.1186/S12974-017-0943-1
39. Hellgren, G., Lundgren, P., Pivodic, A., Löfqvist, C., Nilsson, A. K., Ley, D., Sävman, K., Smith, L. E., and Hellström, A. (2021) Decreased Platelet Counts and Serum Levels of VEGF-A, PDGF-BB, and BDNF in Extremely Preterm Infants Developing Severe ROP. *Neonatology*. **118**, 18–27
40. Nowak, J. Z., and Wiktorowska-Owczarek, A. (2004) [Neovascularization in ocular tissues: mechanisms and role of proangiogenic and antiangiogenic factors]. *Klin Oczna*. **106**, 90–7
41. Wang, W., and Lo, A. C. Y. (2018) Diabetic Retinopathy: Pathophysiology and Treatments. *Int J Mol Sci*. 10.3390/IJMS19061816
42. Lechner, J., O’Leary, O. E., and Stitt, A. W. (2017) The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Res*. **139**, 7–14
43. Cheung, N., Mitchell, P., and Wong, T. Y. (2010) Diabetic retinopathy. *Lancet*. **376**, 124–136
44. Abhary, S., Hewitt, A. W., Burdon, K. P., and Craig, J. E. (2009) A systematic meta-analysis of genetic association studies for diabetic retinopathy. *Diabetes*. **58**, 2137–2147
45. Bolton, W. K., Cattran, D. C., Williams, M. E., Adler, S. G., Appel, G. B., Cartwright, K., Foiles, P. G., Freedman, B. I., Raskin, P., Ratner, R. E., Spinowitz, B. S., Whittier, F. C., and Wuerth, J. P. (2004) Randomized trial of an inhibitor of formation of advanced glycation end products in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol*. **24**, 32–40
46. Genuth, S., Sun, W., Cleary, P., Sell, D. R., Dahms, W., Malone, J., Sivitz, W., and Monnier, V. M. (2005) Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10-year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes*. **54**, 3103–3111

47. Rittiphairoj, T., Mir, T. A., Li, T., and Virgili, G. (2020) Intravitreal steroids for macular edema in diabetes. *Cochrane Database Syst Rev.* 10.1002/14651858.CD005656.PUB3
48. Yilmaz, T., Weaver, C. D., Gallagher, M. J., Cordero-Coma, M., Cervantes-Castaneda, R. A., Klisovic, D., Lavaque, A. J., and Larson, R. J. (2009) Intravitreal triamcinolone acetonide injection for treatment of refractory diabetic macular edema: a systematic review. *Ophthalmology.* **116**, 902–913
49. Lonn, E., Yusuf, S., Hoogwerf, B., Pogue, J., Yi, Q., Zinman, B., Bosch, J., Dagenais, G., Mann, J. F. E., and Gerstein, H. C. (2002) Effects of vitamin E on cardiovascular and microvascular outcomes in high-risk patients with diabetes: results of the HOPE study and MICRO-HOPE substudy. *Diabetes Care.* **25**, 1919–1927
50. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S. I., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Ghardino, I., and Brownlee, M. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature.* **404**, 787–790
51. Aiello, L. P., Avery, R. L., Arrigg, P. G., Keyt, B. A., Jampel, H. D., Shah, S. T., Pasquale, L. R., Thieme, H., Iwamoto, M. A., Park, J. E., Nguyen, H. v., Aiello, L. M., Ferrara, N., and King, G. L. (1994) Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med.* **331**, 1480–1487
52. Aiello, L. P. (2005) Angiogenic pathways in diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* **353**, 839–841
53. EICHNER, D. (1958) [Histology & topochemistry of human retina]. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie (Vienna, Austria : 1948).* **48**, 137–86
54. Subirada, P. v., Paz, M. C., Ridano, M. E., Lorenc, V. E., Vaglianti, M. v., Barcelona, P. F., Luna, J. D., and Sánchez, M. C. (2018) A journey into the retina: Müller glia commanding survival and death. *Eur J Neurosci.* **47**, 1429–1443
55. Bringmann, A., Pannicke, T., Grosche, J., Francke, M., Wiedemann, P., Skatchkov, S. N., Osborne, N. N., and Reichenbach, A. (2006) Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog Retin Eye Res.* **25**, 397–424
56. Reichenbach, A., Ziegert, M., Schnitzer, J., Pritz-Hohmeier, S., Schaaf, P., Schober, W., and Schneider, H. (1994) Development of the rabbit retina. V. The question of “columnar units.” *Brain Res Dev Brain Res.* **79**, 72–84
57. Willbold, E., Berger, J., Reinicke, M., and Wolburg, H. (1997) On the role of Müller glia cells in histogenesis: only retinal spheroids, but not tectal, telencephalic and cerebellar spheroids develop histotypical patterns. *Journal fur Hirnforschung.* **38**, 383–96
58. Newman, E., and Reichenbach, A. (1996) The Müller cell: a functional element of the retina. *Trends Neurosci.* **19**, 307–312

59. Reichenbach, A., Stolzenburg, J. U., Eberhardt, W., Chao, T. I., Dettmer, D., and Hertz, L. (1993) What do retinal müller (glial) cells do for their neuronal “small siblings”? *J Chem Neuroanat.* **6**, 201–213
60. Dubois-Dauphin, M., Poitry-Yamate, C., de Bilbao, F., Julliard, A. K., Jourdan, F., and Donati, G. (2000) Early postnatal Müller cell death leads to retinal but not optic nerve degeneration in NSE-Hu-Bcl-2 transgenic mice. *Neuroscience.* **95**, 9–21
61. Nagelhus, E. A., Veruki, M. L., Torp, R., Haug, F. M., Laake, J. H., Nielsen, S., Agre, P., and Ottersen, O. P. (1998) Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J Neurosci.* **18**, 2506–2519
62. Newman, E. A. (1994) A physiological measure of carbonic anhydrase in Müller cells. *Glia.* **11**, 291–299
63. Vogler, S., Pannicke, T., Hollborn, M., Kolibabka, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A., Hammes, H. P., and Bringmann, A. (2016) Impaired Purinergic Regulation of the Glial (Müller) Cell Volume in the Retina of Transgenic Rats Expressing Defective Polycystin-2. *Neurochem Res.* **41**, 1784–1796
64. Newman, E. A. (1996) Acid efflux from retinal glial cells generated by sodium bicarbonate cotransport. *J Neurosci.* **16**, 159–168
65. Kofuji, P., and Newman, E. A. (2004) Potassium buffering in the central nervous system. *Neuroscience.* **129**, 1043–1054
66. Bringmann, A., Pannicke, T., Biedermann, B., Francke, M., Iandiev, I., Grosche, J., Wiedemann, P., Albrecht, J., and Reichenbach, A. (2009) Role of retinal glial cells in neurotransmitter uptake and metabolism. *Neurochem Int.* **54**, 143–160
67. Biedermann, B., Bringmann, A., Franze, K., Faude, F., Wiedemann, P., and Reichenbach, A. (2004) GABA(A) receptors in Müller glial cells of the human retina. *Glia.* **46**, 302–310
68. Pfeiffer-Guglielmi, B., Francke, M., Reichenbach, A., Fleckenstein, B., Jung, G., and Hamprecht, B. (2005) Glycogen phosphorylase isozyme pattern in mammalian retinal Müller (glial) cells and in astrocytes of retina and optic nerve. *Glia.* **49**, 84–95
69. Kur, J., Newman, E. A., and Chan-Ling, T. (2012) Cellular and physiological mechanisms underlying blood flow regulation in the retina and choroid in health and disease. *Prog Retin Eye Res.* **31**, 377–406
70. Siqueiros-Marquez, L., Bénard, R., Vacca, O., Charles-Messance, H., Bolaños-Jimenez, R., Guilloneau, X., Sennlaub, F., Montañez, C., Sahel, J. A., Rendon, A., Tadayoni, R., and Giocanti-Aurégan, A. (2017) Protection of Glial Müller Cells by Dexamethasone in a Mouse Model of Surgically Induced Blood-Retinal Barrier Breakdown. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **58**, 876–886

71. Behzadian, M. A., Wang, X. L., Windsor, L. J., Ghaly, N., and Caldwell, R. B. (2001) TGF-beta increases retinal endothelial cell permeability by increasing MMP-9: possible role of glial cells in endothelial barrier function. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **42**, 853–9
72. Tout, S., Chan-Ling, T., Holländer, H., and Stone, J. (1993) The role of Müller cells in the formation of the blood-retinal barrier. *Neuroscience.* **55**, 291–301
73. Wang, J. S., and Kefalov, V. J. (2011) The cone-specific visual cycle. *Prog Retin Eye Res.* **30**, 115–128
74. Xue, Y., Shen, S. Q., Jui, J., Rupp, A. C., Byrne, L. C., Hattar, S., Flannery, J. G., Corbo, J. C., and Kefalov, V. J. (2015) CRALBP supports the mammalian retinal visual cycle and cone vision. *J Clin Invest.* **125**, 727–738
75. Reichelt, W., Stabel-Burow, J., Pannicke, T., Weichert, H., and Heinemann, U. (1997) The glutathione level of retinal Müller glial cells is dependent on the high-affinity sodium-dependent uptake of glutamate. *Neuroscience.* **77**, 1213–1224
76. Pow, D. v., and Crook, D. K. (1995) Immunocytochemical evidence for the presence of high levels of reduced glutathione in radial glial cells and horizontal cells in the rabbit retina. *Neurosci Lett.* **193**, 25–28
77. Schütte, M., and Werner, P. (1998) Redistribution of glutathione in the ischemic rat retina. *Neurosci Lett.* **246**, 53–56
78. Unterlauff, J. D., Claudepierre, T., Schmidt, M., Müller, K., Yafai, Y., Wiedemann, P., Reichenbach, A., and Eichler, W. (2014) Enhanced survival of retinal ganglion cells is mediated by Müller glial cell-derived PEDF. *Exp Eye Res.* **127**, 206–214
79. Tawarayama, H., Inoue-Yanagimachi, M., Himori, N., and Nakazawa, T. (2021) Glial cells modulate retinal cell survival in rotenone-induced neural degeneration. *Sci Rep.* 10.1038/S41598-021-90604-W
80. Reichenbach, A., and Bringmann, A. (2013) New functions of müller cells. *GLIA.* **61**, 651–678
81. Agte, S., Savvinov, A., Karl, A., Zayas-Santiago, A., Ulbricht, E., Makarov, V. I., Reichenbach, A., Bringmann, A., and Skatchkov, S. N. (2018) Müller glial cells contribute to dim light vision in the spectacled caiman (*Caiman crocodilus fuscus*): Analysis of retinal light transmission. *Experimental Eye Research.* **173**, 91–108
82. Agte, S., Junek, S., Matthias, S., Ulbricht, E., Erdmann, I., Wurm, A., Schild, D., Käs, J. A., and Reichenbach, A. (2011) Müller glial cell-provided cellular light guidance through the vital guinea-pig retina. *Biophysical Journal.* **101**, 2611–2619
83. Franze, K., Grosche, J., Skatchkov, S. N., Schinkinger, S., Foja, C., Schild, D., Uckermann, O., Travis, K., Reichenbach, A., and Guck, J. (2007) Muller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**, 8287–8292

84. Roesch, K., Jadhav, A. P., Trimarchi, J. M., Stadler, M. B., Roska, B., Sun, B. B., and Cepko, C. L. (2008) The transcriptome of retinal Müller glial cells. *J Comp Neurol.* **509**, 225–238
85. Fischer, A. J., and Reh, T. A. (2003) Potential of Müller glia to become neurogenic retinal progenitor cells. *GLIA.* **43**, 70–76
86. Lenkowski, J. R., and Raymond, P. A. (2014) Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Progress in Retinal and Eye Research.* **40**, 94–123
87. Bernardos, R. L., Barthel, L. K., Meyers, J. R., and Raymond, P. A. (2007) Late-stage neuronal progenitors in the retina are radial Müller glia that function as retinal stem cells. *J Neurosci.* **27**, 7028–7040
88. Harada, T., Harada, C., Kohsaka, S., Wada, E., Yoshida, K., Ohno, S., Mamada, H., Tanaka, K., Parada, L. F., and Wada, K. (2002) Microglia-Müller glia cell interactions control neurotrophic factor production during light-induced retinal degeneration. *J Neurosci.* **22**, 9228–9236
89. Wang, M., and Wong, W. T. (2014) Microglia-Müller cell interactions in the retina. *Adv Exp Med Biol.* **801**, 333–338
90. Francke, M., Makarov, F., Kacza, J., Seeger, J., Wendt, S., Gärtner, U., Faude, F., Wiedemann, P., and Reichenbach, A. (2001) Retinal pigment epithelium melanin granules are phagocytosed by Müller glial cells in experimental retinal detachment. *J Neurocytol.* **30**, 131–136
91. Phagocytosis by human retinal glial cells in culture - PubMed [online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2162333/> (Accessed June 15, 2022)
92. Stolzenburg, J. U., Haas, J., Hartig, W., Paulke, B. R., Wolburg, H., Reichelt, W., Chao, T. I., Wolff, J. R., and Reichenbach, A. (1992) Phagocytosis of latex beads by rabbit retinal Muller (glial) cells in vitro. *Journal fur Hirnforschung.* **33**, 557–564
93. Singh, P. K., Shiha, M. J., and Kumar, A. (2014) Antibacterial responses of retinal Müller glia: Production of antimicrobial peptides, oxidative burst and phagocytosis. *Journal of Neuroinflammation.* 10.1186/1742-2094-11-33
94. Bejarano-Escobar, R., Sánchez-Calderón, H., Otero-Arenas, J., Martín-Partido, G., and Francisco-Morcillo, J. (2017) Müller glia and phagocytosis of cell debris in retinal tissue. *Journal of Anatomy.* **231**, 471–483
95. Kur, J., and Newman, E. A. (2014) Purinergic control of vascular tone in the retina. *J Physiol.* **592**, 491–504
96. Biesecker, K. R., Srienc, A. I., Shimoda, A. M., Agarwal, A., Bergles, D. E., Kofuji, P., and Newman, E. A. (2016) Glial Cell Calcium Signaling Mediates Capillary Regulation of Blood Flow in the Retina. *J Neurosci.* **36**, 9435–9445

97. Lewis, G. P., and Fisher, S. K. (2003) Up-regulation of glial fibrillary acidic protein in response to retinal injury: its potential role in glial remodeling and a comparison to vimentin expression. *Int Rev Cytol.* **230**, 263–290
98. Lundkvist, A., Reichenbach, A., Betsholtz, C., Carmeliet, P., Wolburg, H., and Pekny, M. (2004) Under stress, the absence of intermediate filaments from Müller cells in the retina has structural and functional consequences. *J Cell Sci.* **117**, 3481–3488
99. Erickson, P. A., Fisher, S. K., Guérin, C. J., Anderson, D. H., and Kaska, D. D. (1987) Glial fibrillary acidic protein increases in Müller cells after retinal detachment. *Experimental Eye Research.* **44**, 37–48
100. Okada, M., Matsumura, M., Ogino, N., and Honda, Y. (1990) Müller cells in detached human retina express glial fibrillary acidic protein and vimentin. *Graefes' Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* **228**, 467–474
101. Sánchez, M. C., Luna, J. D., Barcelona, P. F., Gramajo, A. L., Juárez, P. C., Riera, C. M., and Chiabrando, G. A. (2007) Effect of retinal laser photocoagulation on the activity of metalloproteinases and the alpha(2)-macroglobulin proteolytic state in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Exp Eye Res.* **85**, 644–650
102. Barcelona, P. F., Ortiz, S. G., Chiabrando, G. A., and Sánchez, M. C. (2011) alpha2-Macroglobulin induces glial fibrillary acidic protein expression mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein 1 in Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **52**, 778–786
103. Garcia-Ferrer, I., Marrero, A., Gomis-Rüth, F. X., and Goulas, T. (2017) α 2-Macroglobulins: Structure and Function. *Subcell Biochem.* **83**, 149–183
104. Trostchansky, A., Bonilla, L., González-Perilli, L., and Rubbo, H. (2013) Nitro-fatty acids: formation, redox signaling, and therapeutic potential. *Antioxid Redox Signal.* **19**, 1257–1265
105. O'Donnell, V. B., Eiserich, J. P., Bloodsworth, A., Chumley, P. H., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V. M., and Freeman, B. A. (1999) Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive species. *Methods in Enzymology.* **301**, 454–470
106. O'Donnell, V. B., Eiserich, J. P., Chumley, P. H., Jablonsky, M. J., Krishna, N. R., Kirk, M., Barnes, S., Darley-Usmar, V. M., and Freeman, B. A. (1999) Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol.* **12**, 83–92
107. Schopfer, F. J., Cipollina, C., and Freeman, B. A. (2011) Formation and signaling actions of electrophilic lipids. *Chem Rev.* **111**, 5997–6021
108. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives - PubMed [online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7929318/> (Accessed June 15, 2022)

109. Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., and Freeman, B. A. (1990) Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **87**, 1620–1624
110. Salvatore, S. R., Rowart, P., and Schopfer, F. J. (2021) Mass spectrometry-based study defines the human urine nitrolipidome. *Free Radical Biology and Medicine*. **162**, 327–337
111. Melo, T., Montero-Bullón, J. F., Domingues, P., and Domingues, M. R. (2019) Discovery of bioactive nitrated lipids and nitro-lipid-protein adducts using mass spectrometry-based approaches. *Redox Biol*. 10.1016/J.REDOX.2019.101106
112. Bonacci, G., Baker, P. R. S., Salvatore, S. R., Shores, D., Khoo, N. K. H., Koenitzer, J. R., Vitturi, D. A., Woodcock, S. R., Golin-Bisello, F., Cole, M. P., Watkins, S., st. Croix, C., Batthyany, C. I., Freeman, B. A., and Schopfer, F. J. (2012) Conjugated linoleic acid is a preferential substrate for fatty acid nitration. *J Biol Chem*. **287**, 44071–44082
113. Tsikas, D., Zoerner, A. A., Mitschke, A., and Gutzki, F. M. (2009) Nitro-fatty acids occur in human plasma in the picomolar range: a targeted nitro-lipidomics GC-MS/MS study. *Lipids*. **44**, 855–865
114. Lima, É. S., di Mascio, P., Rubbo, H., and Abdalla, D. S. P. (2002) Characterization of linoleic acid nitration in human blood plasma by mass spectrometry. *Biochemistry*. **41**, 10717–10722
115. Baker, P. R. S., Lin, Y., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Groeger, A. L., Batthyany, C., Sweeney, S., Long, M. H., Iles, K. E., Baker, L. M. S., Branchaud, B. P., Chen, Y. E., and Freeman, B. A. (2005) Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands. *J Biol Chem*. **280**, 42464–42475
116. Koenitzer, J. R., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Chen, C. S., Cantu-Medellin, N., Kelley, E. E., and Schopfer, F. J. (2016) Fatty acid nitroalkenes induce resistance to ischemic cardiac injury by modulating mitochondrial respiration at complex II. *Redox Biol*. **8**, 1–10
117. Rudolph, V., Rudolph, T. K., Schopfer, F. J., Bonacci, G., Woodcock, S. R., Cole, M. P., Baker, P. R. S., Ramani, R., and Freeman, B. A. (2010) Endogenous generation and protective effects of nitro-fatty acids in a murine model of focal cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res*. **85**, 155–166
118. Clinical Trial on Asthma: CXA-10, Matching Placebo - Clinical Trials Registry - ICH GCP [online] <https://ichgcp.net/clinical-trials-registry/NCT03762395> (Accessed June 16, 2022)
119. Chieffo: Use of an obese population in phase 1 to... - Google Académico [online] https://scholar.google.com/scholar_lookup?journal=Proceedings+of+the+Annual+Meeting+of+the+American+College+of+Clinical+Pharmacology&title=Use+of+an+obese+pop

- ulation+in+phase+1+to+evaluate+the+pharmacology+of+oral+CXA-10,+an+endogenous,+nitrofatty+acid+signaling+agent&author=C.+Chieffo&author=J.+Botbyl&author=K.+Perry&author=T.M.+Blok&author=D.K.+Jorkasky& (Accessed June 16, 2022)
120. Complexa Announces Successful Completion of Four Phase 1 Studies of CXA-10 and Planned Phase 2 Initiation in Multiple Orphan Indications during 2016 [online] <https://www.prnewswire.com/news-releases/complexa-announces-successful-completion-of-four-phase-1-studies-of-cxa-10-and-planned-phase-2-initiation-in-multiple-orphan-indications-during-2016-300177381.html> (Accessed June 16, 2022)
 121. Garner, R. M., Mould, D. R., Chieffo, C., and Jorkasky, D. K. (2019) Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of Oral CXA-10, a Nitro Fatty Acid, After Single and Multiple Ascending Doses in Healthy and Obese Subjects. *Clin Transl Sci.* **12**, 667–676
 122. Turell, L., Vitturi, D. A., Coitiño, E. L., Lebrato, L., Möller, M. N., Sagasti, C., Salvatore, S. R., Woodcock, S. R., Alvarez, B., and Schopfer, F. J. (2017) The Chemical Basis of Thiol Addition to Nitro-conjugated Linoleic Acid, a Protective Cell-signaling Lipid. *J Biol Chem.* **292**, 1145–1159
 123. Aranda-Caño, L., Sánchez-Calvo, B., Begara-Morales, J. C., Chaki, M., Mata-Pérez, C., Padilla, M. N., Valderrama, R., and Barroso, J. B. (2019) Post-Translational Modification of Proteins Mediated by Nitro-Fatty Acids in Plants: Nitroalkylation. *Plants (Basel)*. [10.3390/plants8040082](https://doi.org/10.3390/plants8040082)
 124. Batthyany, C., Schopfer, F. J., Baker, P. R. S., Durán, R., Baker, L. M. S., Huang, Y., Cerveñansky, C., Branchaud, B. P., and Freeman, B. A. (2006) Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo. *J Biol Chem.* **281**, 20450–20463
 125. Baker, L. M. S., Baker, P. R. S., Golin-Bisello, F., Schopfer, F. J., Fink, M., Woodcock, S. R., Branchaud, B. P., Radi, R., and Freeman, B. A. (2007) Nitro-fatty acid reaction with glutathione and cysteine. Kinetic analysis of thiol alkylation by a Michael addition reaction. *J Biol Chem.* **282**, 31085–31093
 126. Alexander, R. L., Bates, D. J. P., Wright, M. W., King, S. B., and Morrow, C. S. (2006) Modulation of nitrated lipid signaling by multidrug resistance protein 1 (MRP1): glutathione conjugation and MRP1-mediated efflux inhibit nitrolinoleic acid-induced, PPARgamma-dependent transcription activation. *Biochemistry.* **45**, 7889–7896
 127. Netto, L. E. S., de Oliveira, M. A., Monteiro, G., Demasi, A. P. D., Cussiol, J. R. R., Discola, K. F., Demasi, M., Silva, G. M., Alves, S. V., Faria, V. G., and Horta, B. B. (2007) Reactive cysteine in proteins: protein folding, antioxidant defense, redox signaling and more. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* **146**, 180–193
 128. Khoo, N. K. H., Li, L., Salvatore, S. R., Schopfer, F. J., and Freeman, B. A. (2018) Electrophilic fatty acid nitroalkenes regulate Nrf2 and NF-κB signaling: A medicinal

chemistry investigation of structure-function relationships. *Sci Rep.* 10.1038/S41598-018-20460-8

129. Diaz-Amarilla, P., Miquel, E., Trostchansky, A., Trias, E., Ferreira, A. M., Freeman, B. A., Cassina, P., Barbeito, L., Vargas, M. R., and Rubbo, H. (2016) Electrophilic nitro-fatty acids prevent astrocyte-mediated toxicity to motor neurons in a cell model of familial amyotrophic lateral sclerosis via nuclear factor erythroid 2-related factor activation. *Free Radic Biol Med.* **95**, 112–120
130. Kansanen, E., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Kuosmanen, S. M., Tong, K. I., Leinonen, H., Woodcock, S. R., Yamamoto, M., Carlberg, C., Ylä-Herttuala, S., Freeman, B. A., and Levonen, A. L. (2011) Electrophilic nitro-fatty acids activate NRF2 by a KEAP1 cysteine 151-independent mechanism. *J Biol Chem.* **286**, 14019–14027
131. Kansanen, E., Jyrkkänen, H. K., Volger, O. L., Leinonen, H., Kivelä, A. M., Häkkinen, S. K., Woodcock, S. R., Schopfer, F. J., Horrevoets, A. J., Ylä-Herttuala, S., Freeman, B. A., and Levonen, A. L. (2009) Nrf2-dependent and -independent responses to nitro-fatty acids in human endothelial cells: identification of heat shock response as the major pathway activated by nitro-oleic acid. *J Biol Chem.* **284**, 33233–33241
132. Ambrozova, G., Martiskova, H., Koudelka, A., Ravekes, T., Rudolph, T. K., Klinke, A., Rudolph, V., Freeman, B. A., Woodcock, S. R., Kubala, L., and Pekarova, M. (2016) Nitro-oleic acid modulates classical and regulatory activation of macrophages and their involvement in pro-fibrotic responses. *Free Radic Biol Med.* **90**, 252–260
133. Villacorta, L., Chang, L., Salvatore, S. R., Ichikawa, T., Zhang, J., Petrovic-Djergovic, D., Jia, L., Carlsen, H., Schopfer, F. J., Freeman, B., and Chen, Y. E. (2013) Electrophilic nitro-fatty acids inhibit vascular inflammation by disrupting LPS-dependent TLR4 signalling in lipid rafts. *Cardiovasc Res.* **98**, 116–124
134. Cui, T., Schopfer, F. J., Zhang, J., Chen, K., Ichikawa, T., Baker, P. R. S., Batthyany, C., Chacko, B. K., Feng, X., Patel, R. P., Agarwal, A., Freeman, B. A., and Chen, Y. E. (2006) Nitrated fatty acids: Endogenous anti-inflammatory signaling mediators. *J Biol Chem.* **281**, 35686–35698
135. Ichikawa, T., Zhang, J., Chen, K., Liu, Y., Schopfer, F. J., Baker, P. R. S., Freeman, B. A., Chen, Y. E., and Cui, T. (2008) Nitroalkenes suppress lipopolysaccharide-induced signal transducer and activator of transcription signaling in macrophages: a critical role of mitogen-activated protein kinase phosphatase 1. *Endocrinology.* **149**, 4086–4094
136. Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., and Wakabayashi, N. (2005) Keap1, the sensor for electrophiles and oxidants that regulates the phase 2 response, is a zinc metalloprotein. *Biochemistry.* **44**, 6889–6899
137. Wakabayashi, N., Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Kang, M. il, Kobayashi, A., Yamamoto, M., Kensler, T. W., and Talalay, P. (2004) Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **101**, 2040–2045

138. Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., Cole, R. N., Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Yamamoto, M., and Talalay, P. (2002) Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **99**, 11908–11913
139. Hong, F., Sekhar, K. E., Freeman, M. L., and Liebler, D. C. (2005) Specific patterns of electrophile adduction trigger Keap1 ubiquitination and Nrf2 activation. *J Biol Chem.* **280**, 31768–31775
140. Furukawa, M., and Xiong, Y. (2005) BTB Protein Keap1 Targets Antioxidant Transcription Factor Nrf2 for Ubiquitination by the Cullin 3-Roc1 Ligase. *Molecular and Cellular Biology.* **25**, 162–171
141. Sekhar, K. R., Rachakonda, G., and Freeman, M. L. (2010) Cysteine-based regulation of the CUL3 adaptor protein Keap1. *Toxicology and Applied Pharmacology.* **244**, 21–26
142. Gao, L., Wang, J., Sekhar, K. R., Yin, H., Yared, N. F., Schneider, S. N., Sasi, S., Dalton, T. P., Anderson, M. E., Chan, J. Y., Morrow, J. D., and Freeman, M. L. (2007) Novel n-3 fatty acid oxidation products activate Nrf2 by destabilizing the association between Keap1 and Cullin3. *J Biol Chem.* **282**, 2529–2537
143. Yamamoto, T., Suzuki, T., Kobayashi, A., Wakabayashi, J., Maher, J., Motohashi, H., and Yamamoto, M. (2008) Physiological significance of reactive cysteine residues of Keap1 in determining Nrf2 activity. *Mol Cell Biol.* **28**, 2758–2770
144. Eggler, A. L., Small, E., Hannink, M., and Mesecar, A. D. (2009) Cul3-mediated Nrf2 ubiquitination and antioxidant response element (ARE) activation are dependent on the partial molar volume at position 151 of Keap1. *Biochem J.* **422**, 171–180
145. Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Ruotsalainen, A. K., Hynynen, H., and Levonen, A. L. (2017) Nitro-Oleic Acid Regulates Endothelin Signaling in Human Endothelial Cells. *Mol Pharmacol.* **92**, 481–490
146. Vazquez, M. M., Gutierrez, M. v., Salvatore, S. R., Puiatti, M., Dato, V. A., Chiabrando, G. A., Freeman, B. A., Schopfer, F. J., and Bonacci, G. (2020) Nitro-oleic acid, a ligand of CD36, reduces cholesterol accumulation by modulating oxidized-LDL uptake and cholesterol efflux in RAW264.7 macrophages. *Redox Biol.* 10.1016/J.REDOX.2020.101591
147. Ferreira, A. M., Ferrari, M. J., Trostchansky, A., Batthyany, C., Souza, J. M., Alvarez, M. N., López, G. v., Baker, P. R. S., Schopfer, F. J., O'Donnell, V., Freeman, B. A., and Rubbo, H. (2009) Macrophage activation induces formation of the anti-inflammatory lipid cholesteryl-nitrolinoleate. *Biochem J.* **417**, 223–234
148. Wei, Y., Gong, J., Xu, Z., and Duh, E. J. (2016) Nrf2 promotes reparative angiogenesis through regulation of NADPH oxidase-2 in oxygen-induced retinopathy. *Free Radic Biol Med.* **99**, 234–243

149. Wei, Y., Gong, J., Yoshida, T., Eberhart, C. G., Xu, Z., Kombairaju, P., Sporn, M. B., Handa, J. T., and Duh, E. J. (2011) Nrf2 has a protective role against neuronal and capillary degeneration in retinal ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* **51**, 216–224
150. Inoue, Y., Shimazawa, M., Noda, Y., Nagano, R., Otsuka, T., Kuse, Y., Nakano, Y., Tsuruma, K., Nakagami, Y., and Hara, H. (2017) RS9, a novel Nrf2 activator, attenuates light-induced death of cells of photoreceptor cells and Müller glia cells. *Journal of Neurochemistry.* **141**, 750–765
151. Chen, W. J., Wu, C., Xu, Z., Kuse, Y., Hara, H., and Duh, E. J. (2017) Nrf2 protects photoreceptor cells from photo-oxidative stress induced by blue light. *Exp Eye Res.* **154**, 151–158
152. Xu, Z., Cho, H., Hartsock, M. J., Mitchell, K. L., Gong, J., Wu, L., Wei, Y., Wang, S., Thimmulappa, R. K., Sporn, M. B., Biswal, S., Welsbie, D. S., and Duh, E. J. (2015) Neuroprotective role of Nrf2 for retinal ganglion cells in ischemia-reperfusion. *Journal of Neurochemistry.* **133**, 233–241
153. Xu, Z., Wei, Y., Gong, J., Cho, H., Park, J. K., Sung, E. R., Huang, H., Wu, L., Eberhart, C., Handa, J. T., Du, Y., Kern, T. S., Thimmulappa, R., Barber, A. J., Biswal, S., and Duh, E. J. (2014) NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia.* **57**, 204–213
154. Nakamura, S., Noguchi, T., Inoue, Y., Sakurai, S., Nishinaka, A., Hida, Y., Masuda, T., Nakagami, Y., Horai, N., Tsusaki, H., Hara, H., and Shimazawa, M. (2019) Nrf2 Activator RS9 Suppresses Pathological Ocular Angiogenesis and Hyperpermeability. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **60**, 1943–1952
155. Uno, K., Prow, T. W., Bhutto, I. A., Yerrapureddy, A., McLeod, D. S., Yamamoto, M., Reddy, S. P., and Lutty, G. A. (2010) Role of Nrf2 in retinal vascular development and the vaso-obliterative phase of oxygen-induced retinopathy. *Exp Eye Res.* **90**, 493–500
156. Deliyanti, D., Lee, J. Y., Petratos, S., Meyer, C. J., Ward, K. W., Wilkinson-Berka, J. L., and de Haan, J. B. (2016) A potent Nrf2 activator, dh404, bolsters antioxidant capacity in glial cells and attenuates ischaemic retinopathy. *Clin Sci (Lond).* **130**, 1375–1387
157. Wei, Y., Gong, J., Thimmulappa, R. K., Kosmider, B., Biswal, S., and Duh, E. J. (2013) Nrf2 acts cell-autonomously in endothelium to regulate tip cell formation and vascular branching. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 10.1073/PNAS.1309276110
158. Liu, Y., Jia, Z., Liu, S., Downton, M., Liu, G., Du, Y., and Yang, T. (2013) Combined losartan and nitro-oleic acid remarkably improves diabetic nephropathy in mice. *American Journal of Physiology - Renal Physiology.* 10.1152/ajprenal.00157.2013
159. Menon, M. C., Chuang, P. Y., and He, J. C. (2013) Nitro-oleic acid is a novel anti-oxidative therapy for diabetic kidney disease. *Am J Physiol Renal Physiol.* 10.1152/AJPRENAL.00489.2013

160. Wang, W., Li, C., and Yang, T. (2016) Protection of nitro-fatty acid against kidney diseases. *Am J Physiol Renal Physiol.* **310**, F697–F704
161. Arbeeny, C. M., Ling, H., Smith, M. M., O'Brien, S., Wawersik, S., Ledbetter, S. R., McAlexander, A., Schopfer, F. J., Willette, R. N., and Jorkasky, D. K. (2019) CXA-10, a Nitrated Fatty Acid, Is Renoprotective in Deoxycorticosterone Acetate-Salt Nephropathy. *J Pharmacol Exp Ther.* **369**, 503–510
162. Qin, W., Guan, D., Ma, R., Yang, R., Xing, G., Shi, H., Tang, G., Li, J., Lv, H., and Jiang, Y. (2017) Effects of trigonelline inhibition of the Nrf2 transcription factor in vitro on *Echinococcus granulosus*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* **49**, 696–705
163. Roh, J. L., Kim, E. H., Jang, H., and Shin, D. (2017) Nrf2 inhibition reverses the resistance of cisplatin-resistant head and neck cancer cells to artesunate-induced ferroptosis. *Redox Biology.* **11**, 254–262
164. Pirpour Tazehkand, A., Salehi, R., Velaei, K., and Samadi, N. (2020) The potential impact of trigonelline loaded micelles on Nrf2 suppression to overcome oxaliplatin resistance in colon cancer cells. *Molecular Biology Reports.* **47**, 5817–5829
165. Fouzder, C., Mukhuty, A., Mukherjee, S., Malick, C., and Kundu, R. (2021) Trigonelline inhibits Nrf2 via EGFR signalling pathway and augments efficacy of Cisplatin and Etoposide in NSCLC cells. *Toxicol In Vitro.* 10.1016/J.TIV.2020.105038
166. Arlt, A., Sebens, S., Krebs, S., Geismann, C., Grossmann, M., Kruse, M. L., Schreiber, S., and Schäfer, H. (2013) Inhibition of the Nrf2 transcription factor by the alkaloid trigonelline renders pancreatic cancer cells more susceptible to apoptosis through decreased proteasomal gene expression and proteasome activity. *Oncogene.* **32**, 4825–4835
167. Yamane, K., Minamoto, A., Yamashita, H., Takamura, H., Miyamoto-Myoken, Y., Yoshizato, K., Nabetani, T., Tsugita, A., and Mishima, H. K. (2003) Proteome analysis of human vitreous proteins. *Mol Cell Proteomics.* **2**, 1177–1187
168. Subirada, P. v., Vaglianti, M. v., Joray, M. B., Paz, M. C., Barcelona, P. F., and Sánchez, M. C. (2022) Rapamycin and Resveratrol Modulate the Gliotic and Pro-Angiogenic Response in Müller Glial Cells Under Hypoxia. *Front Cell Dev Biol.* 10.3389/FCELL.2022.855178
169. Connor, K. M., Krah, N. M., Dennison, R. J., Aderman, C. M., Chen, J., Guerin, K. I., Sapieha, P., Stahl, A., Willett, K. L., and Smith, L. E. H. (2009) Quantification of oxygen-induced retinopathy in the mouse: a model of vessel loss, vessel regrowth and pathological angiogenesis. *Nat Protoc.* **4**, 1565–1573
170. Stahl, A., Connor, K. M., Sapieha, P., Chen, J., Dennison, R. J., Krah, N. M., Seaward, M. R., Willett, K. L., Aderman, C. M., Guerin, K. I., Hua, J., Löfqvist, C., Hellström, A., and Smith, L. E. H. (2010) The mouse retina as an angiogenesis model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **51**, 2813–2826

171. Lorenc, V. E., Subirada Caldarone, P. v., Paz, M. C., Ferrer, D. G., Luna, J. D., Chiabrando, G. A., and Sánchez, M. C. (2018) IGF-1R Regulates the Extracellular Level of Active MMP-2, Pathological Neovascularization, and Functionality in Retinas of OIR Mouse Model. *Mol Neurobiol.* **55**, 1123–1135
172. Huang, Z., Kin Ng, T., Chen, W., Sun, X., Huang, D., Zheng, D., Yi, J., Xu, Y., Zhuang, X., and Chen, S. (2021) Nattokinase Attenuates Retinal Neovascularization Via Modulation of Nrf2/HO-1 and Glial Activation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 10.1167/IOVS.62.6.25
173. Sankar, M. J., Sankar, J., and Chandra, P. (2018) Anti-vascular endothelial growth factor (VEGF) drugs for treatment of retinopathy of prematurity. *Cochrane Database Syst Rev.* 10.1002/14651858.CD009734.PUB3
174. An-Lun, W., and Wei-Chi, W. (2018) Anti-VEGF for ROP and Pediatric Retinal Diseases. *Asia Pac J Ophthalmol (Phila).* **7**, 145–151
175. Wang, H., Zhang, S. X., and Hartnett, M. E. (2013) Signaling pathways triggered by oxidative stress that mediate features of severe retinopathy of prematurity. *JAMA Ophthalmol.* **131**, 80–85
176. Joyal, J. S., Omri, S., Sitaras, N., Rivera, J. C., Sapiéha, P., and Chemtob, S. (2012) Neovascularization in retinopathy of prematurity: opposing actions of neuronal factors GPR91 and semaphorins 3A. *Acta Paediatr.* **101**, 819–826
177. Tan, S. M., Deliyanti, D., Figgett, W. A., Talia, D. M., de Haan, J. B., and Wilkinson-Berka, J. L. (2015) Ebselen by modulating oxidative stress improves hypoxia-induced macroglial Müller cell and vascular injury in the retina. *Exp Eye Res.* **136**, 1–8
178. Xu, W., Hu, Z., Lv, Y., Dou, G., Zhang, Z., Wang, H., and Wang, Y. (2018) Microglial density determines the appearance of pathological neovascular tufts in oxygen-induced retinopathy. *Cell Tissue Res.* **374**, 25–38
179. Long-term evaluation of retinal morphology and function in a mouse model of oxygen-induced retinopathy - PubMed [online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32256029/> (Accessed June 16, 2022)
180. Prentice, H. M., Biswal, M. R., Dorey, C. K., and Blanks, J. C. (2011) Hypoxia-regulated retinal glial cell-specific promoter for potential gene therapy in disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **52**, 8562–8570
181. Kern, T. S. (2014) Interrelationships between the Retinal Neuroglia and Vasculature in Diabetes. *Diabetes Metab J.* **38**, 163–170
182. Mitter, S. K., Rao, H. V., Qi, X., Cai, J., Sugrue, A., Dunn, W. A., Grant, M. B., and Boulton, M. E. (2012) Autophagy in the retina: a potential role in age-related macular degeneration. *Adv Exp Med Biol.* **723**, 83–90
183. Simo, R., Carrasco, E., Garcia-Ramirez, M., and Hernandez, C. (2006) Angiogenic and antiangiogenic factors in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Diabetes Rev.* **2**, 71–98

184. Tarr, J. M., Kaul, K., Chopra, M., Kohner, E. M., and Chibber, R. (2013) Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* **2013**, 1–13
185. Cui, L., Lv, N., Li, B., Tao, J., Zheng, X., Yan, Y., and Liu, C. (2021) Serum CA 19-9 Level is Correlated to the Clinical Characteristics and Chronic Complications of Patients Newly Diagnosed with Type 2 Diabetes Mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* **129**, 581–586
186. Tah, V., Orlans, H. O., Hyer, J., Casswell, E., Din, N., Sri Shanmuganathan, V., Ramskold, L., and Pasu, S. (2015) Anti-VEGF Therapy and the Retina: An Update. *J Ophthalmol.* 10.1155/2015/627674
187. Tranos, P., Vacalis, A., Asteriadis, S., Koukoula, S., Vachtsevanos, A., Perganta, G., and Georgalas, I. (2013) Resistance to antivascular endothelial growth factor treatment in age-related macular degeneration. *Drug Des Devel Ther.* **7**, 485–490
188. Campochiaro, P. A. (2013) Ocular neovascularization. *J Mol Med (Berl).* **91**, 311–321
189. Das, A., and McGuire, P. G. (2003) Retinal and choroidal angiogenesis: pathophysiology and strategies for inhibition. *Prog Retin Eye Res.* **22**, 721–748
190. Zorrilla-Zubilete, M. A., Yeste, A., Quintana, F. J., Toiber, D., Mostoslavsky, R., and Silberman, D. M. (2018) Epigenetic control of early neurodegenerative events in diabetic retinopathy by the histone deacetylase SIRT6. *J Neurochem.* **144**, 128–138
191. Rudolph, T. K., Rudolph, V., Edreira, M. M., Cole, M. P., Bonacci, G., Schopfer, F. J., Woodcock, S. R., Franek, A., Pekarova, M., Khoo, N. K. H., Hasty, A. H., Baldus, S., and Freeman, B. A. (2010) Nitro-fatty acids reduce atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **30**, 938–945
192. Koudelka, A., Cechova, V., Rojas, M., Mitash, N., Bondonese, A., st. Croix, C., Ross, M. A., and Freeman, B. A. (2022) Fatty acid nitroalkene reversal of established lung fibrosis. *Redox Biol.* 10.1016/J.REDOX.2021.102226
193. Nakagami, Y. (2016) Nrf2 Is an Attractive Therapeutic Target for Retinal Diseases. *Oxid Med Cell Longev.* 10.1155/2016/7469326
194. Lajko, M., Cardona, H. J., Taylor, J. M., Farrow, K. N., and Fawzi, A. A. (2017) Photoreceptor oxidative stress in hyperoxia-induced proliferative retinopathy accelerates rd8 degeneration. *PLoS One.* 10.1371/JOURNAL.PONE.0180384
195. Kowluru, R. A., and Mishra, M. (2017) Epigenetic regulation of redox signaling in diabetic retinopathy: Role of Nrf2. *Free Radic Biol Med.* **103**, 155–164
196. Li, S. Y., Fu, Z. J., and Lo, A. C. Y. (2012) Hypoxia-induced oxidative stress in ischemic retinopathy. *Oxid Med Cell Longev.* 10.1155/2012/426769
197. Wang, T., Tsiurukis, D. I., and Sun, Y. (2020) Targeting Neuroinflammation in Neovascular Retinal Diseases. *Front Pharmacol.* 10.3389/FPHAR.2020.00234

198. Dinarello, C. A., Simon, A., and van der Meer, J. W. M. (2012) Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. *Nat Rev Drug Discov.* **11**, 633–652
199. Romero, R., Brody, D. T., Oyarzun, E., Mazor, M., Wu, Y. K., Hobbins, J. C., and Durum, S. K. (1989) Infection and labor. III. Interleukin-1: a signal for the onset of parturition. *Am J Obstet Gynecol.* **160**, 1117–1123
200. Yoshimura, K., and Hirsch, E. (2005) Effect of stimulation and antagonism of interleukin-1 signaling on preterm delivery in mice. *J Soc Gynecol Investig.* **12**, 533–538
201. Mid-trimester amniotic fluid interleukins (IL-1 β , IL-10 and IL-18) as possible predictors of preterm delivery - PubMed [online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21282748/> (Accessed June 20, 2022)
202. Nadeau-Vallée, M., Quiniou, C., Palacios, J., Hou, X., Erfani, A., Madaan, A., Sanchez, M., Leimert, K., Boudreault, A., Duhamel, F., Rivera, J. C., Zhu, T., Noueihed, B., Robertson, S. A., Ni, X., Olson, D. M., Lubell, W., Girard, S., and Chemtob, S. (2015) Novel Noncompetitive IL-1 Receptor-Biased Ligand Prevents Infection- and Inflammation-Induced Preterm Birth. *J Immunol.* **195**, 3402–3415
203. Rivera, J. C., Sitaras, N., Noueihed, B., Hamel, D., Madaan, A., Zhou, T., Honoré, J. C., Quiniou, C., Joyal, J. S., Hardy, P., Sennlaub, F., Lubell, W., and Chemtob, S. (2013) Microglia and interleukin-1 β in ischemic retinopathy elicit microvascular degeneration through neuronal semaphorin-3A. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **33**, 1881–1891
204. Jung, Y. D., Liu, W., Reinmuth, N., Ahmad, S. A., Fan, F., Gallick, G. E., and Ellis, L. M. (2001) Vascular endothelial growth factor is upregulated by interleukin-1 beta in human vascular smooth muscle cells via the P38 mitogen-activated protein kinase pathway. *Angiogenesis.* **4**, 155–162
205. Tanaka, T., Kanai, H., Sekiguchi, K., Aihara, Y., Yokoyama, T., Arai, M., Kanda, T., Nagai, R., and Kurabayashi, M. (2000) Induction of VEGF gene transcription by IL-1 beta is mediated through stress-activated MAP kinases and Sp1 sites in cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol.* **32**, 1955–1967
206. Mantsounga, C. S., Lee, C., Neverson, J., Sharma, S., Healy, A., Berus, J. M., Parry, C., Ceneri, N. M., López-Giráldez, F., Chun, H. J., Lu, Q., Sellke, F., Choudhary, G., and Morrison, A. R. (2022) Macrophage IL-1 β promotes arteriogenesis by autocrine STAT3- and NF- κ B-mediated transcription of pro-angiogenic VEGF-A. *Cell Rep.* 10.1016/J.CELREP.2022.110309
207. Fahey, E., and Doyle, S. L. (2019) IL-1 Family Cytokine Regulation of Vascular Permeability and Angiogenesis. *Front Immunol.* 10.3389/FIMMU.2019.01426
208. Macdonald, C., Lyzenga, W., Shao, D., and Agu, R. U. (2010) Drug Delivery Water-soluble organic solubilizers for in vitro drug delivery studies with respiratory epithelial cells: Selection based on various toxicity indicators. 10.3109/10717541003777548

209. Liang, X., Zhou, H., Ding, Y., Li, J., Yang, C., Luo, Y., Li, S., Sun, G., Liao, X., and Min, W. (2012) TMP prevents retinal neovascularization and imparts neuroprotection in an oxygen-induced retinopathy model. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* **53**, 2157–2169
210. Wang, J., Xu, E., Elliott, M. H., Zhu, M., and Le, Y. Z. (2010) Müller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage. *Diabetes.* **59**, 2297–2305
211. Chiabrando, G., Bonacci, G., Sanchez, C., Ramos, A., Zalazar, F., and Vides, M. A. (1997) A procedure for human pregnancy zone protein (and human alpha 2-macroglobulin) purification using hydrophobic interaction chromatography on phenyl-sepharose CL-4B column. *Protein Expr Purif.* **9**, 399–406
212. Chiabrando, G. A., Sánchez, M. C., Skornicka, E. L., and Koo, P. H. (2002) Low-density lipoprotein receptor-related protein mediates in PC12 cell cultures the inhibition of nerve growth factor-promoted neurite outgrowth by pregnancy zone protein and alpha2-macroglobulin. *J Neurosci Res.* **70**, 57–64
213. In vitro characterization of a spontaneously immortalized human Müller cell line (MIO-M1) - PubMed [online] <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11867609/> (Accessed June 20, 2022)
214. Vaglianti, M. v., Subirada, P. v., Barcelona, P. F., Bonacci, G., and Sanchez, M. C. (2022) Quantification of Reactive Oxygen Species Using 2',7'-Dichlorofluorescein Diacetate Probe and Flow-Cytometry in Müller Glial Cells. *J Vis Exp.* 10.3791/63337

IX. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA

PUBLICACIONES

2022. Quantification of reactive oxygen species using 2',7'-dichlorofluorescein diacetate probe and flow-cytometry in Müller glial cells.

Vaglianti MV., Subirada PV., Barcelona PF., Bonacci G., Sánchez MC. J Vis Exp. 2022 May 13;(183). doi: 10.3791/63337. PMID: 35635447.

2022. Protective effect of NO₂-OA on the oxidative stress, gliosis and pro-angiogenic response in Müller Glial Cells.

Vaglianti MV., Subirada PV., Barcelona PF., Bonacci G., Sánchez MC. Frontiers in cell and developmental biology. (2022). En redacción.

2022. Rapamycin and Resveratrol modulate of the gliotic and pro-angiogenic response of Müller Glial cells under hypoxia.

Subirada PV., Vaglianti MV., Joray MB., Paz MC., Barcelona PF., Sánchez, MC. Frontiers in cell and developmental biology. (2022). doi.org/10.3389/fcell.2022.855178.

2022. Quantification of vascular parameters in whole mount retinas of mice with non-proliferative and proliferative retinopathies.

Subirada PV., Paz MC., Vaglianti MV., Luna JD., Barcelona PF., Sánchez MC. J Vis Exp. 2022 Mar 12;(181). doi: 10.3791/63126. PMID: 35343957.

2019. PKC α Modulates Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Invasiveness of Breast Cancer Cells Through ZEB1

Llorens MC, Rossi FA, García IA, Cooke M, Abba MC, Lopez-Haber C, Barrio-Real L, Vaglianti MV, Rossi M, Bocco JL, Kazanietz MG, Soria G. Frontiers in Oncology. (2019). 9:1323. DOI: 10.3389/fonc.2019.01323.

2018. A journey into the retina: Müller Glia commanding survival and death

Subirada, PV.; Paz, MC.; Ridano, ME.; Lorenc, VE.; Vaglianti, MV.; Barcelona, PF.; Luna, JD.; Sánchez, MC. European Journal of Neuroscience (2018). Review. Article ID: EJN13965. Article DOI: 10.1111/ejn.13965.

2018. Neovascular retinopathies: etiology and models of study for searching new therapeutic targets

M.E. Ridano, V.E. Lorenc, P.V. Subirada, M.C. Paz, V. Vaglianti, P.F. Barcelona, M.C. Sánchez*. Anales de la Asociación Física Argentina Nro. Especial inVisionT (2018) 56-61 DOI: <https://doi.org/10.31527/analesafa.2018.inVisionT>.

2016. Phosphorylation Regulates Functions of ZEB1 Transcription Factor

Llorens, MC; Lorenzatti, G; Cavallo, NL; Vaglianti, MV; Perrone, AP; Carenbauer AL; Darling DS; Cabanillas AM. Journal of Cellular Physiology (2016) 231: 2205-2217. DOI: 10.1002/jcp.25338.

PRESENTACIONES EN REUNIONES CIENTÍFICAS Y RESÚMENES PUBLICADOS

2022. Annual Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO. Virtual meeting. May 11-12, 2022. International.

- “Protective effect of Nitro-Oleic Acids in neovascularization, vascular regrowth and neurodegeneration in Oxygen-Induced Retinopathy model”. Vaglianti, María V.*; Subirada Caldarone, Paula V.; Joray, Belen; Paz, María C.; Barcelona, Pablo F.; Bonacci, Gustavo; Sanchez, Maria C. (*poster).
- “Studies about the cooperative signaling between p75NTR and Trk receptors in the modulation of choroidal neovascularization”. Subirada, PV*; Tovo, A; Vaglianti, MV; Vicentin D; Ribotta NA; Luna Pinto, JD; Saragovi, HU4; Sánchez, MC; Anastasia, A; Barcelona, PF. (*poster).

2021. XIII Congreso Nacional de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). Virtual. 28 al 30 de octubre. 2021.

- “Effect of Nitro-Oleic Acids in neovascularization and neurodegeneration in Oxygen-Induced Retinopathy model”. Vaglianti, MV. *; Subirada, PV.; Joray, B.; Paz, MC.; Barcelona, PF.; Bonacci, G.; Sánchez, MC. (*Disertante).
- “Doxycycline-mediated inhibition of retinal neovascularization: studies in vitro and in vivo”. Formica M*, Paz M, Subirada P, Joray M, Vaglianti, V, Barcelona P, Luna J, Palma S, Sánchez M. (*Disertante).
- “Study of the LRP1/ α 2M system during choroidal neovascularization”. Tovo, A*; Subirada, PV; Vaglianti, MV; Luna Pinto, JD; Sánchez, MC; Chiabrando GA; Barcelona, PF. (*Disertante).
- “ α 2-Macroglobulin increase in a retinopathy induced by metabolic syndrome in mouse”. Paz, María Constanza*; Vaglianti, María Victoria; Subirada, Paula; Barcelona, Pablo; Sánchez, María Cecilia. (*Disertante).
- “Studies about the cooperative signaling between p75NTR and Trk receptors in the modulation of choroidal angiogenesis”. Subirada, PV*; Tovo, A; Vaglianti, MV; Luna Pinto, JD; Sánchez, MC; Anastasia, A; Barcelona, PF. (*Disertante).

2021. XXXVI Congreso Anual de Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Virtual. 18 al 22 de octubre. 2021.

- “Protective Effect of Nitro-Oleic Acids in Oxygen-Induced Retinopathy”. Vaglianti, MV.*; Subirada, PV.; Paz, MC.; Barcelona, PF.; Bonacci, G.; Sánchez, MC. (*poster).
- “Studies about the cooperative signaling between p75NTR and Trk receptors in the modulation of choroidal angiogenesis”. Paula Virginia Subirada Caldarone*, Albana Tovo, María Victoria Vaglianti, José Luna Pinto, María Cecilia Sánchez, Agustín Anastasia, Pablo Federico Barcelona. (*Poster).
- “Study of the LRP1/ α 2M system during choroidal neovascularization”. Albana Tovo*, Paula V Subirada, María Victoria Vaglianti, José D Luna Pinto, María Cecilia Sánchez, Gustavo A Chiabrando, Pablo F Barcelona. (*Poster).

2021. PAN-AMERICAN RESEARCH DAY (PARD) 2021. Virtual meeting. July 10 and 17. International.

“The neurotrophin receptor p75NTR as a new player in the development of choroidal neovascularization”. Subirada, PV*; Vaqlienti, MV; Jurado, AE; O’Brien, MP; Luna Pinto, JD; Saragovi, HU, Sánchez, MC; Anastasia, A; Barcelona, PF. (*Presentación oral).

2021. Annual Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO. Virtual meeting. May 1-7, 2021. International.

“The neurotrophin receptor p75NTR as a new player in the development of choroidal neovascularization”. Subirada, PV*; Vaqlienti, MV; Jurado, AE; O’Brien, MP; Luna Pinto, JD; Saragovi, HU, Sánchez, MC; Anastasia, A; Barcelona, PF. (*Poster). *Investigative Ophthalmology & Visual Science* June 2021, Vol.62, 643.

2020. 3° edición de Oftalmocórdoba, en la ciudad de Córdoba, Argentina, el 23 y 24 de octubre de 2020.

- *“Potencial Uso de Ácidos Grasos Nitrados en la Modulación de Retinopatías Proliferativas = Modelo de OIR”.* Vaqlienti, MV.*; Subirada, PV.; Joray, B.; Paz, MC.; Barcelona, PF.; Bonacci, G.; Sánchez, MC. (*Presentación oral).
- *“Estudio de la participación del receptor P75NTR durante el proceso de neovascularización coroidea”.* Subirada, PV*; Vaqlienti, MV; Fierro JA; Jurado AE; O’Brien MP; Luna Pinto, JD; Sánchez, MC; Anastasia, A; Barcelona, PF. (*Presentación oral).

2020. XXXV Congreso Anual de Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Virtual. 7 al 9 de octubre. 2020.

- *“NO₂-OA prevents neovascularization and induces vascular regrowth in Oxygen-Induced Retinopathy”.* Vaqlienti, MV.*; Subirada, PV.; Joray, B.; Paz, MC.; Barcelona, PF.; Bonacci, G.; Sánchez, MC. (*Póster).
- *“The neurotrophin receptor p75NTR is involved in choroidal neovascularization”.* Subirada, Paula V.*, Vaqlienti, Maria V., Fierro JA., Jurado AE., OBrien MP., Luna Pinto, JD., Sánchez, MC., Anastasia, A., Barcelona, Pablo F. (*Poster).

2019. Annual Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO. Vancouver Convention Center, British Columbia, Canadá. Apr 28- May 2, 2019. International.

- *“Effect of NO₂-OA on the oxidative stress and glial reactivity in Müller Glial Cells”.* María V. Vaqlienti*, Magali E. Ridano, Paula V. Subirada, Maria C. Paz, Pablo F. Barcelona, Gustavo Bonacci, María C. Sánchez. *IOVS* Vol: 60, Issue 2019, No 9 (*Póster).
- *“Validation of laser-induced choroidal neovascularization (CNV) mouse model: participation of α 2M/LRP1 system”.* Barcelona, Pablo F.*, Subirada, Paula V., Saddi, Nabil, Marquez, Marilynan, Vaqlienti, Maria V., Ridano, Magali E., Marquez, Gabriel, Paz, María C., Luna, JD, Sánchez, MC. (*Poster).

2019. II Congreso Científico Profesional de Bioquímica. Pabellón Argentina Ciudad Universitaria, Córdoba, Argentina. 5 al 7 de Junio, 2019. Nacional.

- *“Efecto del ácido Nitro-Oleico frente a estrés oxidativo y glial en Células de*

Müller". María V. Vaaglianti*, Magali E. Ridano, Paula V. Subirada, María C. Paz, Pablo F. Barcelona, Gustavo Bonacci, María C. Sánchez. (*Póster).

- "Efectos del tratamiento de rapamicina en retinopatías proliferativas". Subirada, Paula V.*, Paz, María C., Ridano, Magali E., Vaaglianti, M. Victoria, Barcelona, Pablo F., Sánchez, María C. (*poster)

2019. XXXIV Congreso Anual de Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Hotel Portal del Lago, Carlos Paz, Córdoba, Argentina. 3 al 5 de Octubre, 2019. Nacional.

- "Effect of Nitro-Oleic Acids in a mouse model of Oxygen-Induced Retinopathy". María V. Vaaglianti*, Paula V. Subirada, María C. Paz, Magali E. Ridano, Pablo F. Barcelona, Gustavo R. Bonacci, María C. Sánchez. (*Póster).
- "Participation of p75NTR in a Mouse Model of Choroidal Neovascularization". Paula Virginia Subirada*, María Victoria Vaaglianti, Agustín Fierro, Alejandra Jurado, Paula O'Brien, Jose Luna Pinto, María Cecilia Sánchez, Agustín Anastasia, Pablo Federico Barcelona. (*Póster).
- Pls and PhD Students Visit 1 K 4th-Grade Students Across Cordoba With the 5-Years-Old Activity "Neuroscience of the Senses". María Constanza Paz*, Nahir Guadalupe Gazal, Paula Virginia Subirada, Constanza Milena Jandar Paz, Alberto Leandro Oliveros, Andrea Guzman, María Victoria Vaaglianti, Sebastian Miranda, Asier Angulo, Genesis D'aloisio, Laura Gastaldi, Victoria Pisano, Cecilia Sánchez, Nicolas Unsain. (*Presentación oral).

2018. XIII Congreso Nacional de Investigación en Visión y Oftalmología (AIVO). 26 y 27 de Octubre de 2018. Córdoba, Argentina.

- "Efecto de NO₂-OA sobre el estrés oxidativo y la reactividad glial en Células Gliales de Müller". María V. Vaaglianti*, Magali E. Ridano, Paula V. Subirada, María C. Paz, Gustavo R. Bonacci, María C. Sánchez. (*Presentación oral).
- "Validation of laser-induced choroidal neovascularization (CNV) mouse model". Barcelona, PF*; Subirada, PV; Sabbi, TN; Márquez, MA; Vaaglianti, MV; Ridano, ME; Márquez, GE; Paz, MP; Luna, JD; Sánchez, MC. (*Presentación oral).
- "Rapamicina: otra potencial estrategia terapéutica para modular la neovascularización retinal pero no la neurodegeneración". Subirada, PV*; Paz, MC; Ridano, ME; Vaaglianti, MV; Barcelona, PF; Chiabrando, GA; Sánchez, MC. (*Presentación oral).

2018. XXXIII Congreso Anual de Sociedad Argentina de Investigación en Neurociencias. Del 23 al 26 de Octubre 2018, Córdoba, Argentina.

- "Vascular and non-vascular alterations in retinopathies: towards a change in the therapeutic strategy". Sánchez MC*, Rídan ME, Subirada PV, Paz MC, Lorenc VE, Vaaglianti MV, Luna JD, Barcelona PF (*Presentación oral).
- "Getting in contact with schools: the synopsis between students and neuroscientists". Subirada, PV*; Palandri, A.; Herrera, G.; Rozes, V.; Paz, M.C.; Gazal, G.N.; D'aloisio, G.; Ávalos, M.P.; Jandar, M.; Díaz, N. ; Martínez, G. ; Martín, J. ; Sánchez, M.A. ; Vaaglianti, V. ; Soterias, E. ; Pisano, V. ; Oliveros, A.L.; Remedi, M.; Calfa, G.; Conde, C.; Sosa, L.; Galiano, M.; Gorostiza, A.; Barcelona, P.; Sánchez, M.C.; Unsain, N (*Poster).

2018. LXIII Reunión Anual de la Sociedad Argentina en Investigación Clínica (SAIC). LXVI Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI). Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). 14 al 17 de Noviembre de 2018. Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.

- "Characterization of Müller glia response after nitro-oleic acid treatment". María V. Vaglianti*, Magali E. Ridano, Paula V. Subirada, María C. Paz, Gustavo R. Bonacci, María C. Sánchez. Medicina ISSN 0025-7680 (print) ISSN 1669-9106 (web), volumen 78- (Supl-III), 2018. (*Poster)
- "Long non-coding RNAs from telomeres respond to oxidative stress and epithelial-mesenchymal transition (EMT)". Galigniana Natalia*, Llorens MC., Charó Nancy L., Vaglianti MV, Cabanillas AM, Piwien Pilipuk Graciela. Medicina ISSN 0025-7680 (print) ISSN 1669-9106 (web), volumen 78- (Supl-III), 2018. (*Presentación oral)
- "Validation of laser-induced choroidal neovascularization (CNV) mouse model". Barcelona, PF*; Subirada, PV; Sabbi, TN; Márquez, MA; Vaglianti, MV; Ridano, ME; Márquez, GE; Paz, MP; Luna, JD; Sánchez, MC. Medicina ISSN 0025-7680 (print) ISSN 1669-9106 (web), volumen 78- (Supl-III), 2018. (*Poster).

2018. Annual Meeting of The Association for Research in Vision and Ophthalmology – ARVO. Hawaii Convention Center, Honolulu, USA. Apr 29- May 3, 2018. International.

- "Comparative study of VEGF inhibitors in Oxygen Induced Retinopathy (OIR) mouse model: Vascular, nonvascular and functional implications". Ridano, ME.*; Paz, MC.; Subidara, PV.; Luna Pinto, JD.; Croci Russo, DO.; Barcelona, PF.; Vaglianti, MV.; Rabinovich, GA.; Sánchez, MC. IOVS Vol: 59, Issue 9 (*Póster).

2017. Encuentro anual de la Asociación de Investigación en visión y oftalmología. 1 de diciembre. Córdoba, Argentina.

- "Participación de la vía antioxidante Keap1-Nrf2 en retinopatías neovasculares: modulación por electrófilos". Vaglianti, MV.*; Ridano, ME.; Subirada PV.; Paz, MC.; Bonacci, GR.; Sánchez, MC. (*Presentación Oral).

2017. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias. 13-17 noviembre 2017. Buenos Aires, Argentina.

- "Study of telomeric transcript expression during epithelial-mesenchymal transition". Galigniana, NM.*; Llorens, MC.; Vaglianti, MV.; Cabanillas, AM.; Piwien-Pilipuk G. Medicina ISSN 1669-9106 (print) ISSN 1669-9106 (web), Volumen 77- (Supl. I), 2017. (*Mini oral).

2017. 110 Annual Meeting of the American Association of Cancer Research (AACR). Washington, DC, USA. April 1-5, 2017. International.

- "ZEB1 is regulated by PKCa in breast cancer cell lines". *Llorens MC, Lopez-Haber C, Barrio-Real L, Vaglianti MV, Kazanietz MG and Cabanillas AM (2017) Proceedings of the American Association for Cancer Research ISSN 0197-016X, Volume 58: 1004. (*Poster).

2016. LXI Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC), LXIV Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Inmunología (SAI), XLVIII Reunión Anual SAFE y VII Reunión Anual NANOMEDAR. 15-19 de noviembre de 2016. Mar del Plata, Argentina.

- “ZEB1 is modified post-translationally by SUMOylation” *Vaglianti MV; Llorens MC; Cabanillas AM. Medicina ISSN 1669-9106 (print) ISSN 1669-9106 (web), Volumen 76- (Supl. I), 2016. (*Poster).
- “ZEB1 is regulated by PKC-alpha in breast cancer cell lines” *Llorens MC; Lopez Haber C; Barrio-Real L; Vaglianti MV; Kazanietz M; Cabanillas AM. Medicina ISSN 1669-9106 (print) ISSN 1669-9106 (web), Volumen 76- (Supl. I), 2016. (*Poster)

2016. LII Reunión Anual Sociedad Argentina de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular (SAIB). 7-10 de noviembre 2016. Córdoba, República Argentina.

- “IGF 1 modulates ZEB1 stability during epithelial mesenchymal transition (EMT)” Llorens MC, Vaglianti MV, Cabanillas AM. BIOCELL 40 (Supl. I) 2016. (*Poster).

2015. LX Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC) y Reunión Científica Anual de la Sociedad Argentina de Fisiología (SAFIS). 18-21 de noviembre de 2015. Mar del Plata, Argentina.

- *Comunicación Oral*: “Regulation of ZEB1 by IGF1R in Epithelial-Mesenchymal Transition of murine mammary epithelial NMUMG cells”. *Llorens MC; Vaglianti MV; Cabanillas, AM. Medicina ISSN 0025-7680 (print) ISSN 1669-9106 (web), Volumen 75 - (Supl. II), 2015.