

UNIVERSIDAD AUSTRAL

FACULTAD DE CIENCIAS BIOMEDICAS

**REDUCCION DEL DAÑO RETINAL Y DEL ESTADO  
PRO-INFLAMATORIO MEDIANTE EL INHIBIDOR DE  
SERINO PROTEASAS ALFA-1-ANTI-TRIPSINA  
EN UN MODELO ANIMAL DE DIABETES**

Tesis para optar por el grado de Doctor en  
Ciencias Biomédicas por la Universidad Austral

**Licenciado Gustavo Alfredo Ortiz**

**Director de Tesis: Profesor Dr. Juan E. Gallo**

## Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer al Doctor Gallo por su generosidad. Por haber confiado, por darme la oportunidad, apoyarme y siempre abierto a cualquier tipo de discusión. Gracias por brindarme la libertad absoluta para hacer, deshacer y promover mi pensamiento crítico. Gracias Juanco!

En Segundo lugar a los mejores papas del mundo (lo siento Ale y Juanjo) Ines y Alfredo son los mejores. No puedo estar mas agradecido, siempre me dieron todo. Como dije alguna vez ellos no saben muy bien que hago pero eso no les hace falta para apoyarme y estar ahí en cualquier momento. Mi mama tiene un don (no se el resto de las madres), pero cuando la llamo por teléfono y le digo solamente "hola" ya sabe como me siento, que me pasa y hasta que llevo puesto. Ellos saben mejor que nadie desde donde partí, y a donde llegué. Los amo con todo mi corazón!

Mis hermanos, María mi hermantin. Siempre una oreja preparada esperando que caiga con alguna bomba o simplemente preparada para rescatarme de un ahogo en ese vaso de agua. Ella siempre tiene la palabra justa, la que encaja. Astróloga y psicóloga, casi los mismos genes así que no podría ser de otra manera. Fede! Hermano mayor, compañero de cancha (san Lorenzo querido), de cervezas, de futbol (11 y papi), y de la vida. Fede es esa persona practica que puede solucionarlo todo, muy claro y con las palabras justas también! Gracias hermanos por estar ahí!

Angela, pequeña, piri, petisa, titin, todos esos apodos y mas. Gracias pirin por acompañarme todos estos años. Gracias por aguantarme, por ayudarme, por escucharme, aconsejarme y mas. Gracias! Quien diría q después de aquellas juntadas intecheanas en 2011, el 2018 nos encontraría casados en Boston... Te amo pirin.

Mi familia por elección: Ale y Juanjo, no se como hicieron todos estos años (y los que vendrán) para soportarme! Gracias por ayudarme, siempre fueron suuuper generosos conmigo. Los quiero mucho! Juanchi, Facu, Die, Rochi, lo mismo: gracias x aguantarme! Los quieroo

Mis amigos en viñetas:

1. Mis amigos Bariloche1: Charli, Colo, Pingui, Tonga, Beto, Pela, Jose, gracias por hacerme la vida mas divertida y descontracturada, por enseñarme a disfrutar de lo simple. Gracias por los asados, las juntadas! Son lo mejor, los quiero siempre conmigo.

2. Mis amigos Bariloche2: Seba, Marta, Guido, Rafa, Sala, Porte, Facu! Los quiero mucho, gracias por estar, por las peleas x WhatsApp, por la mirada critica, por las juntadas.
3. Amigos de la radio y la vida: Pablada, Anelisa (chamana), Mono, Pau, Adri, Santi (chaman). Los quiero mucho, ustedes me hacen mejor de lo que soy. Son recontra cracks, espero poder tenerlos siempre a mi lado.

La familia del Austral:

Mari (la colo) muchas gracias! Difícil poner en palabras lo que me ayudaste estos años, gracias codirectora!

Gallo group: Emi! Gracias maestro, toda esta locura arranco con su batiseñal como olvidarla. Abrazo grande amigo! Gracias Salta por esos primeros años! Gracias Profe (JP) siempre al pie del cañón. Gracias Fede y Co! Compartimos poco pero intenso!

TG group: gracias Bayo y Santi sus consejos! Gracias Marce! por aguantarme, por aconsejarme por estar en momentos difíciles te quiero Marce!. Gracias Cata, tucu!

Gracias Guillermo M. por estar siempre dispuesto a ayudar no solo durante mi tesis, también durante las instancias finales que fueron bastante apretadas.

Quiero dedicarle un párrafo aparte al Doctor Rodolfo Martin. Me abrió las puertas de su casa cuando no tenia (literalmente) donde vivir. Gracias Rodolfo nunca voy a olvidar ese gran gesto.

Por último a mi abu, a Zelfa. Gracias Zelfita por haberme ayudado todo este tiempo. Yo no estaría acá si no fuera por vos. Vos hiciste mejor a todo el que te cruzaste, con una generosidad inigualable, y un corazón sin limites. Me cuesta mucho pensar que ya no estas, asique prefiero pensar que estas en algún lugar mirándome/mirándonos y poniéndote contenta por este logro que es tuyo también. Te amo Zelfita donde quiera que estés.

# REDUCCION DEL DAÑO RETINAL Y DEL ESTADO PRO-INFLAMATORIO MEDIANTE EL INHIBIDOR DE SERINO PROTEASAS ALFA 1 ANTITRIPSINA EN UN MODELO ANIMAL DE DIABETES

## RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) es la principal causa de ceguera en la población laboralmente activa. Actualmente no existen tratamientos preventivos para dicha patología, los mismos están enfocados en las etapas tardías. Sin embargo, en la RD los cambios neurodegenerativos ocurren de manera temprana en la retina interna de personas diabéticas. Dichos cambios ocurren incluso antes de que el componente vascular de la retina se vea afectado. Esta enfermedad es caracterizada por una progresión lenta. Los principales cambios en la retina neural son la pérdida de células ganglionares, y un consecuente afinamiento del espesor total de la retina central. El desorden metabólico causado por la hiperglucemia crónica se refleja en un estrés a nivel celular que en instancias finales genera productos tóxicos y la inevitable muerte celular. El componente inflamatorio que comienza en las etapas tempranas de la enfermedad ha adquirido importancia en el desarrollo de la RD. En particular la hiperglucemia sostenida en el tiempo puede alterar el estado basal de células del sistema inmune innato como son los macrófagos. De hecho, la migración, el *homing*, las propiedades fagocíticas y reparativas de este tipo celular se ven afectadas. La migración de macrófagos a la retina diabética, y en patologías como el desprendimiento de retina, degeneración macular relacionada a la edad, y glaucoma ha sido previamente reportado. El aumento de moléculas con un potente poder inflamatorio como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se han descrito en la RD, así

como el incremento de moléculas de adhesión celular como sICAM y selectinas. Estas citoquinas y quemoquinas provocan la activación del endotelio vascular retinal, generan leucostasis en la retina y finalmente áreas de no-perfusión.

La alfa 1 antitripsina es el principal inhibidor de serino proteasas en sangre, producida principalmente por los hepatocitos y es considerada una proteína de fase aguda por su rápido incremento en suero en un estado inflamatorio. Diversos trabajos han descrito a AAT como una proteína capaz de modular contextos inflamatorios en distintas patologías como, diabetes tipo 1, artritis reumatoide, enfermedad de Bowel, esclerosis múltiple y rechazo de injerto vs huésped. Trabajos recientes han demostrado que AAT es capaz de reducir los niveles de TNF- $\alpha$  y la infiltración de neutrófilos. También se ha observado que AAT es capaz de modular el perfil inmunológico de células dendríticas y macrófagos.

El objetivo de la tesis fue explorar el potencial terapéutico de AAT en un modelo de retinopatía diabética en ratón. Evaluar la reducción del daño en la retina de los animales diabéticos que fueron tratados con AAT y establecer posibles mecanismos de acción. Se logró así, demostrar que la pérdida de células ganglionares de la retina disminuye con la utilización de AAT en los ratones diabéticos. El afinamiento de la retina también se vio disminuido en los ratones que recibieron el tratamiento. Se analizaron los niveles de 40 citoquinas tanto en suero como en la retina. El estado inflamatorio de los animales que recibieron AAT fue reducido notablemente tanto a nivel sistémico como en el microambiente de la retina. En particular los niveles de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , sICAM se vieron reducidos. El perfil inmunológico de los macrófagos

encontrados en la retina presentaba características antiinflamatorias, con expresión de CD206. El microambiente retinal exhibió también una menor expresión de la enzima iNOS y un aumento en la expresión de la Arginasa 1. Estos resultados en conjunto señalan a la AAT como una posible y nueva opción terapéutica para la RD e incluso para patologías en donde es necesario disminuir un estado inflamatorio subyacente.

Publicaciones obtenidas de los resultados de la tesis

**Diabetic retinopathy: could the alpha-1 antitrypsin be a therapeutic option?**

Gustavo Ortiz, Juan P Salica, Eduardo H Chuluyan, Juan E Gallo. *Biol Res.* 2014; Nov 18. 47: 58

**Alpha-1-Antitrypsin Ameliorates Inflammation and Neurodegeneration in the Diabetic Mouse Retina.** Ortiz, Gustavo; Lopez Emiliano; Salica Juan Pablo; Potilinski Constanza; Fernández Acquier Mariano; Eduardo Chuluyan; Gallo Juan. *Exp Eye Res.* 2018; May 18;174:29-39.

Aportes realizados en el transcurso del desarrollo de la presente tesis en temas de trabajos relacionados:

**Retinal upregulation of inflammatory and proangiogenic markers in a model of neonatal diabetic rats fed on a high-fat-diet.** Jorge E Mancini, Gustavo Ortiz, Juan Oscar Croxatto, Juan E Gallo. *BMC Ophthalmol.* 2013 Apr 15. 13: 14

**Corneal neovascularization: a combined approach of bevacizumab and suramin showed increased antiangiogenic effect through downregulation of bFGF and P2X2.** Lopez E, Salica JP, Ortiz G, Potilinski C, Croxatto J, Gallo JE. *Curr Eye Res.* 2018; Apr; 43(4):466-473.

**Possible Neuroprotective Role of P2X2 in the Retina of Diabetic Rats**

Jorge Mancini; Gustavo Ortíz; María C. Potilinski; Juan P. Salica; Emiliano S. López; Juan O. Croxatto; Juan E. Gallo. *Diabetology & Metabolic Syndrome*. Apr 2018; Apr 12;10:31.



## Abreviaturas empleadas

AAT	Alfa 1 antitripsina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Acido ribonucleico
BSA	Seroalbúmina bovina
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DBT	Diabético
DCs	Células dendríticas
G-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
I.P.:	Intraperitoneal
IP10	Proteína inducida por Interferón-10
IFN- $\gamma$ :	Interferon $\gamma$
IL-1b:	Interleuquina 1b
IL-2:	Interleuquina 2
IL-3:	Interleuquina 2
IL-4:	Interleuquina 4
IL-6:	Interleuquina 6
IL-7:	Interleuquina 7
IL-10:	Interleuquina 10
IL-23:	Interleuquina 23
IL-27:	Interleuquina 27
M-CFS:	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MCP-1:	Proteína quimioattractante de monocitos
PBS:	Buffer fosfato salino
qPCR:	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RD	Retinopatía Diabética
ROS	Especies reactivas del oxígeno (por <i>reactive oxygen species</i> )
SDF-1:	Factor derivado de las células del estroma 1
SDS:	Dodecilsulfato sódico
sCAM-1:	Molécula de adhesión celular -1
SFB:	Suero fetal bovino
TBS:	Solución buffer Tris-salino
TNF- $\alpha$ :	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
VEGF:	Factor de crecimiento del endotelio vascular

# ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	16
El ojo    17	
La retina, anatomía e histología .....	19
Fisiología de la unidad neurovascular de la retina.....	23
Enfermedad del ojo diabético .....	24
Retinopatía Diabética.....	24
Fisiopatología de la Retinopatía Diabética .....	26
Componente inflamatorio de la RD .....	27
Papel en la retinopatía diabética de los macrófagos de la retina: la microglia	28
Marcadores de superficie de la microglia .....	30
Microglia M2 en la neuroinflamación crónica.....	32
Control de la polarización M1/M2 en la neuroinflamación.....	33
El oxido nítrico en la RD .....	35
Retinopatía diabética experimental .....	37

<b>Modelos animales de RD</b> .....	<b>37</b>
<b>Modelos de roedores de Retinopatía Diabética</b> .....	<b>37</b>
<b>Modelos diabéticos inducidos químicamente</b> .....	<b>38</b>
<b>Pérdida de células ganglionares durante la retinopatía diabética</b> .....	<b>40</b>
<b>Terapias actuales para la retinopatía diabética</b> .....	<b>41</b>
<b>Inhibidores de serino proteasas</b> .....	<b>42</b>
<b>Alfa 1 antitripsina</b> .....	<b>44</b>
<b>AAT y su utilización terapéutica actual</b> .....	<b>45</b>
<b>Células de la glía</b> .....	<b>46</b>
<b>Hipótesis de trabajo</b> .....	<b>49</b>
<b>Objetivo general:</b> .....	<b>49</b>
<b>Objetivos específicos:</b> .....	<b>49</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>50</b>
<b>Experimentos in vivo</b> .....	<b>51</b>
Animales .....	51
Protocolo de tratamiento y grupos experimentales.....	51
Inducción de la diabetes con estreptozotocina.....	52

Tinciones histológicas .....	53
Examen histológico de hígado, riñón y corazón. ....	53
Medición del espesor retinal .....	54
Conteo de células ganglionares a partir de una configuración de retinas en flor .....	54
Extracción de ARN total .....	55
Síntesis de ADNc a partir de ARN total.....	56
Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR) .....	56
Microarreglo de citoquinas de suero y retina.....	57
Determinación de niveles de TNF- $\alpha$ en el suero y en la retina de animales mediante <i>enzyme linked immunosorbent assay</i> (ELISA) .....	60
Control de pesos, consumo de agua, glucemias .....	61
<b>Experimentos in vitro.....</b>	<b>61</b>
Líneas celulares .....	61
Cultivo celular primario de células de Müller .....	62
Caracterización de células de Müller de ratón.....	63
Detección de especies reactivas del oxígeno utilizando el reactivo diclorofluoresceína. ....	63
Preparación de alfa 1 anti-tripsina humana.....	64
Ensayo de formación de puntos de quiebre ( <i>branching points</i> ) .....	64
Ensayo de viabilidad celular sobre Hmec-1 y sobre el cultivo primario de células de Müller.....	65
Ensayos de migración <i>in vitro</i> .....	65
Ensayo de co-inmunoprecipitación seguido de espectrometría de masas.....	66
Protocolo de tinción del gel de poliacrilamida.....	67
Tratamiento de la muestra para el análisis por espectrometría de masas.....	67

Análisis de la expresión por IFI de AAT en Hmec-1.....	68
<b>Análisis estadístico .....</b>	<b>68</b>
 RESULTADOS .....	 69
<b>Generación del modelo animal de diabetes .....</b>	<b>70</b>
 Niveles de glucemia durante 8 semanas de tratamiento .....	 70
Evaluación del consumo de agua.....	71
Control del peso durante el tratamiento .....	72
<b>Efecto de AAT en los cambios neurodegenerativos .....</b>	<b>73</b>
 La administración intraperitoneal de AAT disminuye el afinamiento retinal .....	 73
Efecto de la administración de AAT sobre el número de células ganglionares de la retina .....	75
<b>Evaluación del efecto de AAT en el proceso inflamatorio.....</b>	<b>77</b>
 Medición de citoquinas y quemoquinas en suero y retina a través de un micro-arreglo.....	 77
Evaluación del efecto de AAT sobre los niveles de TNF- $\alpha$ en retina y en suero .....	81
Niveles de TNF- en retina.....	82
<b>Efecto de AAT sobre el número de macrófagos/microglia en la retina .....</b>	<b>83</b>
 Niveles de ARNm de <i>f4/80</i> , <i>iNOS</i> y <i>arginasa1</i> .....	 85
Niveles proteicos de iNOS .....	86
<b>Efecto de AAT en el perfil inmunológico de los macrófagos de la retina .....</b>	<b>86</b>

<b>Evaluación de enzimas hepáticas y número leucocitario en el modelo animal utilizado.....</b>	<b>88</b>
<b>Evaluación de toxicidad hígado, riñón y corazón.....</b>	<b>89</b>
<b>Efecto de AAT en la sobrevida de los animales.....</b>	<b>90</b>
<b>Ensayos in vitro.....</b>	<b>91</b>
Caracterización de las células de Müller.....	91
Efecto de AAT en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en un cultivo primario de células de Müller expuestas a elevadas concentraciones de glucosa.....	93
Efecto de AAT en la producción de ROS en la línea endotelial microvascular humana-1 (Hmec-1) expuesta a elevadas concentraciones de glucosa.....	95
Medición de viabilidad celular: reducción del MTT para evaluar posible efecto citotóxico en cultivo de AAT sobre el cultivo de Hmec-1.....	96
Efecto de AAT en la migración de macrófagos in vitro.....	97
Efecto de AAT en la migración de células endoteliales.....	98
Efecto de AAT en el perfil inmunológico de macrófagos <i>in vitro</i> .....	99
<b>Angiogénesis.....</b>	<b>101</b>
Efecto de AAT en la formación de puntos de quiebre ( <i>branching points</i> ) en cultivos de Hmec-1.....	101
<b>Identificación de nuevos sustratos/interacciones/ de AAT.....</b>	<b>103</b>
Ensayo de inmunoprecipitación seguido de análisis de espectrometría de masas.....	103
Expresión de AAT en las células Hmec-1.....	108

DISCUSIÓN .....	109
CONCLUSIONES.....	123

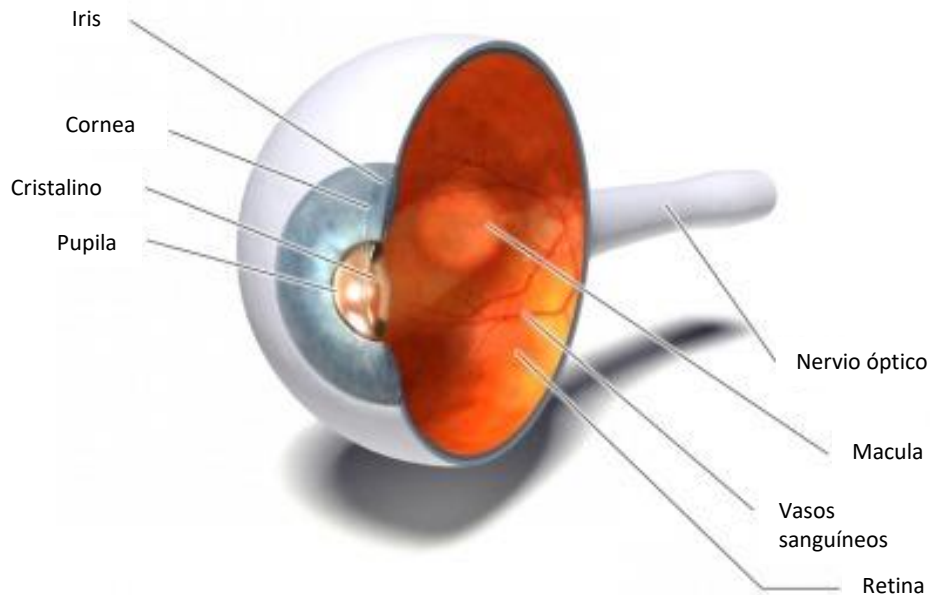
## **INTRODUCCIÓN**



## El ojo

El ojo es una esfera llena de líquido encerrada por tres capas de tejido. La mayor parte de la capa externa está compuesta por un tejido fibroso blanco resistente denominado esclera. En la parte frontal del ojo la esclera se transforma en la córnea, un tejido transparente especializado que permite que los rayos de luz ingresen en el ojo (Figura 1). La capa media del globo ocular incluye tres estructuras distintas pero continuas: el iris, el cuerpo ciliar y la coroides (Steinmetz 1981). El iris es la porción coloreada del ojo que se puede ver a través de la córnea. Contiene dos conjuntos de músculos con acciones opuestas, que permiten ajustar el tamaño de la pupila (la apertura en su centro) bajo control neural (Grant-Kels and Kels 1992). El cuerpo ciliar es un anillo de tejido que rodea la lente (cristalino) e incluye un componente muscular que es importante para ajustar la potencia refractiva de la lente y un componente vascular (los llamados procesos ciliares) que produce el fluido que llena la parte delantera de la lente del ojo. La coroides se compone de un rico lecho capilar que sirve como fuente principal de suministro de sangre para los foto-receptores de la retina. Sólo la capa más interna del ojo, la retina, contiene neuronas que son sensibles a la luz y son capaces de transmitir señales visuales a través del nervio óptico y en última instancia al cerebro (Kolb 1995, Kirkwood 2012). En el camino hacia la retina, la luz pasa a través de la córnea, el cristalino y dos ambientes fluidos distintos. La cámara anterior, el espacio entre el cristalino y la córnea, está llena de humor acuoso, un líquido claro que suministra nutrientes a estas estructuras así como al cristalino. El humor acuoso es producido por los procesos ciliares en la cámara posterior (la región entre el cristalino y el iris) y fluye en la cámara anterior a través de la pupila. Una malla especializada de

células que se encuentra en la unión del iris y la córnea es responsable de su captación (Kels, Grzybowski et al. 2015). Bajo condiciones normales, las velocidades de producción y captación de humor acuoso están en equilibrio, asegurando una presión intraocular constante. Los niveles anormalmente altos de presión intraocular, que ocurren en el glaucoma, pueden reducir el suministro de sangre al ojo y eventualmente dañar las neuronas de la retina. El espacio entre la parte posterior del cristalino y la superficie de la retina se llena con una sustancia gruesa y gelatinosa llamada humor vítreo o simplemente vítreo, que representa aproximadamente el 80% del volumen del ojo (Rocher 2010). Además de mantener la forma del ojo, el vítreo contiene células fagocíticas que eliminan la sangre y desechos que de otro modo podrían interferir con la transmisión de la luz. Las habilidades de limpieza del vítreo son limitadas, en personas de mediana edad y ancianos pueden hallarse los denominados "flotadores". Los flotadores son colecciones de desechos demasiado grandes para el consumo fagocítico que permanecen y generan sombras molestas en la retina y que se ven reflejadas en el campo visual (Purves 2001, Kels, Grzybowski et al. 2015).



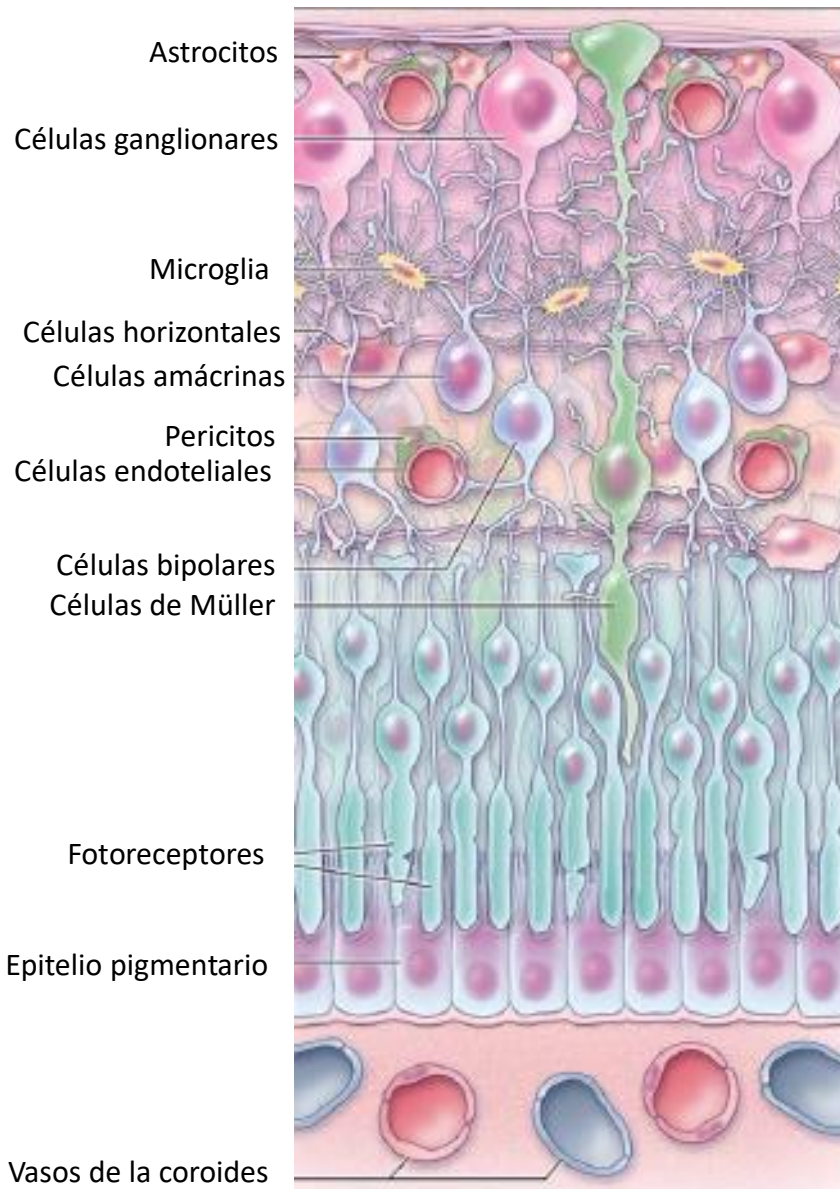
**Figura 1. Esquema del ojo humano.** Se observan en la figura un corte axial con los distintos componentes del ojo humano. En el segmento anterior la cornea el cristalino, la pupila y el iris, mientras que en el segmento posterior los vasos sanguíneos, la retina, la macula y el nervio óptico. La retina es una lámina fina ubicada en el segmento posterior del ojo que se encuentra entre la macula y la coroides (Figura adaptada de Purves 2001).

### **La retina, anatomía e histología**

La retina es una fina lámina ubicada en el segmento posterior del ojo (Babel and Houber 1970). Está compuesta por diferentes capas de células con funciones diversas, que producen señales eléctricas que llegan al cerebro (corteza óptica) en dónde se traducen en colores e imágenes, así como lograr visión con iluminación tenue o visión periférica que constituye nuestro campo visual (Kirkwood 2012). El normal funcionamiento se verá afectado en patologías oculares que impidan la llegada de estímulos a la retina como en alteraciones de los medios transparentes que componen el ojo (cornea, cristalino, humor acuoso y humor vítreo), también en patologías específicas de la retina como es el caso de las retinopatías (Ben M'Barek, Regent et al. 2015). Anatómicamente en el centro de la retina está el nervio óptico. Desde el centro del nervio óptico irradian los principales vasos sanguíneos de la retina. A un costado del nervio óptico se puede ver un punto rojizo ligeramente ovalado, libre de vasos sanguíneos, la fovea, que se encuentra en el centro de la zona conocida como la mácula por los

médicos oftalmólogos. Un campo circular alrededor de la fovea se considera la retina central, mientras que más allá del campo central se denomina la retina periférica. En humanos, la retina total es un disco circular de entre 30 y 40 mm de diámetro y tiene aproximadamente 0,5 mm de espesor. El nervio óptico está compuesto por los axones de las células ganglionares que se dirigen al cerebro y, adicionalmente, los vasos sanguíneos entrantes que se abren en la retina para vascularizar las distintas capas de la retina y las neuronas (Figura 1 y 2) (Kirkwood 2012). Una sección radial de una porción de la retina revela que las células ganglionares (las neuronas de salida de la retina) se encuentran más internas en la retina más cercana vítreo, y los foto-receptores (bastones y conos) contra el epitelio pigmentario y la coroides. Por lo tanto, la luz debe viajar a través del grosor de la retina antes de llegar y activar los bastones y los conos (Figura. 2) (Antonetti, Klein 2012). Posteriormente, la absorción de fotones por el pigmento visual de los foto-receptores se traduce en un primer mensaje bioquímico y luego en un mensaje eléctrico que puede estimular todas las neuronas sucesivas de la retina. El mensaje de la retina sobre la entrada de luz y alguna organización preliminar de la imagen visual se transmiten al cerebro a partir del patrón de descarga de las células ganglionares. Décadas atrás, se realizaban diagramas simples de la retina en donde sólo se consideraban los foto-receptores y las células ganglionares con unas pocas inter-neuronas que conectan los dos tipos de células (Gunn and Schafer 1877, Henkind 1967). Sin embargo, en la actualidad cuando se realiza una sección vertical de la retina y se la observa en el microscópico, se puede ver la complejidad en donde conviven un mayor número y distintos tipos de células nerviosas. Estas se pueden denominar interneuronas que se encuentran empacadas en la parte central de la

de la retina entre los foto-receptores y las células ganglionares (Campbell, Zhang et al. 2017, Hoshino, Ratnapriya et al. 2017) (Figura 2). En este sentido, es importante destacar que en todas las retinas vertebradas las interneuronas están compuestas por tres capas de cuerpos de células nerviosas y dos capas de células encargadas de la sinapsis. Las 3 capas de células nerviosas son las siguientes: la capa nuclear externa (ONL por sus siglas en inglés) contiene cuerpos celulares de los bastones y conos, la capa nuclear interna (INL por sus siglas en inglés) contiene cuerpos celulares de las células bipolares, horizontales y amacrinas y la capa de células ganglionares (GCL) que contiene cuerpos celulares de células ganglionares y células amacrinas desplazadas. Mientras que las 2 capas que corresponden a la sinapsis son: la capa plexiforme externa (OPL) donde ocurren las conexiones entre bastones y conos, y las células bipolares y las células horizontales; y la capa plexiforme interna (IPL) que funciona como una estación re-transmisora para las células bipolares, que son las que finalmente se conectan con las células ganglionares (Campbell, Zhang et al. 2017). Además, existen diferentes variedades de células amacrinas tanto horizontales como verticales, que interactúan para influenciar e integrar las señales de las células ganglionares. La culminación del procesamiento neural ocurre en la capa IPL en donde el mensaje relativo a la imagen visual se transmite por intermedio de las células ganglionares al cerebro a lo largo del nervio óptico. Como se indicó anteriormente las capas de células que componen la retina pueden ser fácilmente observadas por medio de un corte histológico. En la siguiente figura se esquematizan los tipos celulares nombrados de las distintas capas de la retina (Figura 2) (Kolb 1995).



**Figura 2. Esquema de las distintas capas de la retina.** La retina es una lámina ubicada en el segmento posterior del ojo que consta de 7 capas de células distintas. Desde la coroides hacia el humor vítreo podemos encontrar los siguientes tipos celulares: epitelio pigmentario de la retina, los foto-receptores, las células bipolares, células de Müller que conectan virtualmente todas las capas celulares de la retina, células amácrinas, microglia, células horizontales, células amácrinas, células ganglionares y astrocitos. También se muestran los pericitos que son células que rodean los plexos de la retina y cumplen funciones de sostén y nutrición. Por último se pueden observar los vasos de la coroides en la retina que cumplen una función esencial en el suministro de nutrientes a toda la retina, así como también en mantener la temperatura constante en las estructuras del ojo. La coroides es una capa de vasos sanguíneos y tejido conectivo que se encuentra por fuera de la retina y contigua al epitelio pigmentario de la retina (Figura adaptada de Antonetti, Klein et al. 2012).

## **Fisiología de la unidad neurovascular de la retina**

La unidad neurovascular se denomina a las relaciones físicas y bioquímicas entre neuronas y células de la glia con la vasculatura junto con la cercana interdependencia entre estos tejidos y el sistema nervioso central. Las células gliales junto con los pericitos y las neuronas promueven la formación de la barrera hemato-retinal la cual controla el flujo de fluidos y metabolitos desde la sangre al parénquima neural. La arquitectura de la retina confiere características únicas a la unidad neurovascular. La retina tiene plexos capilares en la capa de células ganglionares y en la capa nuclear interna. La unidad neurovascular incluye astrocitos, células de Müller, neuronas amacrinas y ganglionares que residen en estrecha proximidad a segmentos microvasculares que suministran oxígeno y nutrientes. El estrecho acoplamiento de las unidades neurovasculares se muestra por la autorregulación del flujo sanguíneo vascular retiniano por los niveles de metabolitos locales (el nivel de lactato y la presión parcial de oxígeno y dióxido de carbono) junto con el metabolismo de las células gliales. La retina externa consiste en neuronas foto-receptoras y células de Müller. Ambas células están acopladas metabólicamente para soportar la generación de impulsos electroquímicos en respuesta a la estimulación de la luz. El intercambio de nutrientes y oxígeno que se difunden de los vasos coroideos a través de la capa de células epiteliales pigmentadas hacia las células de Müller y los foto-receptores es esencial. La regulación fina de los medios acuosos de la unidad neurovascular es indispensable para lograr una correcta agudeza visual. Cualquier impedimento o desbalance metabólico entre las distintas células que componen la unidad neurovascular es capaz de generar patologías como veremos más adelante (Antonetti, Klein et al. 2012).

## **Enfermedad del ojo diabético**

La enfermedad del ojo diabético es un grupo de condiciones que afectan al ojo en personas que sufren de diabetes. Dentro de estas condiciones tenemos a la retinopatía diabética (RD), el edema macular diabético (EMD), cataratas, glaucoma y la queratopatía diabética. La RD involucra cambios tanto en la retina neural como en la retina vascular. En los estadios avanzados la pared de los vasos se vuelve permeable y por lo tanto ingresa líquido al interior del estroma de la retina. Este ingreso anormal de líquido a la retina interfiere en el viaje de la luz y provoca pérdida de la agudeza visual, especialmente si el líquido se localiza en la mácula (región central de la retina) (ICO Guidelines for Diabetic Eye Care, 2017).

### **Retinopatía Diabética**

La RD es la principal causa de ceguera en la población con edad laboral (Leasher, Bourne et al. 2016). De acuerdo con el *National Eye Institute* perteneciente al *National Institute of Health* humanos la RD posee cuatro estados clínicos definidos:

1. *Retinopatía no proliferativa (RNP) leve*, la cual se define por pequeñas áreas de prominencia circulares que emergen de los diminutos vasos sanguíneos (plexos) de la retina, llamados microaneurismas, que ocurren en la etapa más temprana de la enfermedad. Estos microaneurismas pueden producir fugas de líquido hacia el estroma de la retina. En esta etapa también pueden generarse en menor proporción pequeñas hemorragias y exudados blandos (compuestos de líquido) en las distintas áreas de la retina (Cheung, Mitchell et al. 2010).

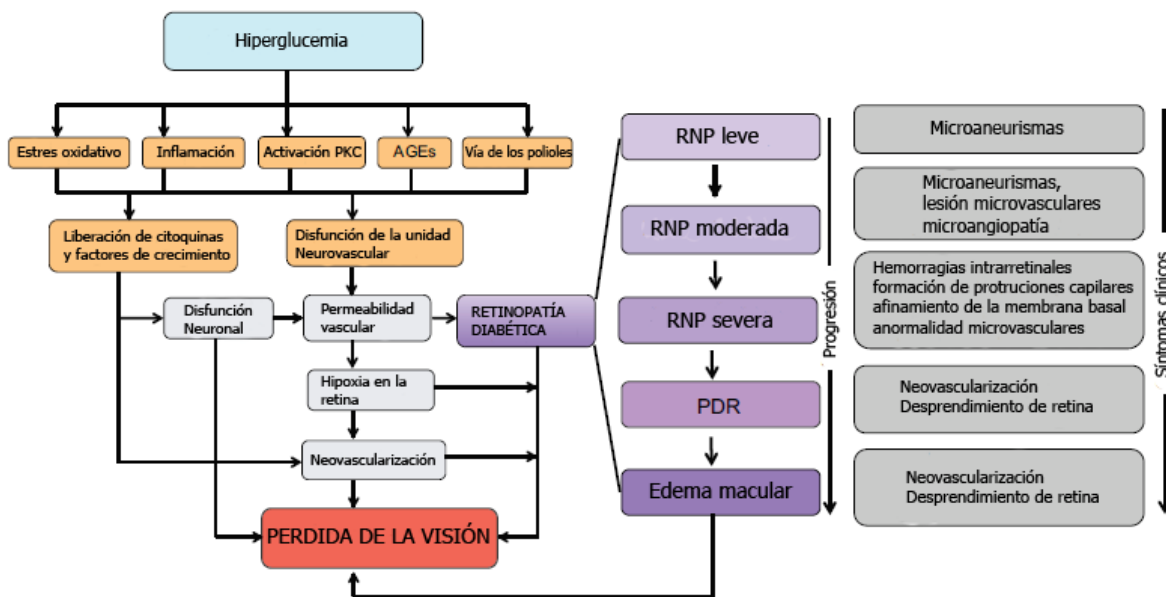


2. *Retinopatía no proliferativa moderada*: a medida que la enfermedad progresa, los vasos sanguíneos que nutren la retina pueden hincharse y deformarse. Pueden perder su capacidad de transportar sangre. Ambas condiciones causan cambios característicos en la apariencia de la retina y pueden contribuir al EMD el cual se caracteriza por una acumulación de líquido entre las capas de la retina que componen la mácula. En este estado también pueden ocurrir hemorragias y exudados duros, que corresponden a la acumulación de líquido y lípidos. El líquido puede reabsorberse pero la reabsorción de lípidos es más lenta y por ello su denominación(Cheung, Mitchell et al. 2010).

3. *Retinopatía no proliferativa severa*: en esta etapa se suman a las hemorragias, exudados duros, la presencia de exudados blandos (infartos de la capa de fibras) y la deformación de los vasos. Este hecho puede llevar a un incremento de vasos sanguíneos bloqueados o incluso romperse lo que limita el suministro de sangre a algunas áreas de la retina. Estas áreas suelen ser de no-perfusión y por lo tanto capaces de secretar factores de crecimiento que brindan señales a la retina, por ejemplo, para que crezcan nuevos vasos sanguíneos (Cheung, Mitchell et al. 2010).

4. *Retinopatía diabética proliferativa (RDP)*: En esta fase avanzada, los factores de crecimiento secretados por la retina desencadenan la proliferación de nuevos vasos sanguíneos. Los nuevos vasos crecen a lo largo de la superficie interna de la retina y pueden invadir el vítreo. Los mismos son frágiles, carentes de pericitos lo que los vuelve más propensos a la fuga de líquido, rotura y consecuente hemorragia. El tejido cicatrizante que se forma puede contraerse, traccionar y provocar desprendimiento de retina. El desprendimiento de la retina

puede conducir a una pérdida permanente de la visión (Fukuda 1994, Cheung, Mitchell et al. 2010, Heng, Comyn et al. 2013).



**Figura 3. Diagrama de flujo que muestra los principales factores implicados en la patogénesis y los síntomas clínicos evidentes en las diferentes etapas de la RD.** La RD es una enfermedad multifactorial que involucra varios mecanismos patológicos, incluyendo el aumento del estrés oxidativo, la inflamación, la vía del poliol que conduce a la acumulación de sorbitol, la producción de productos finales de glicación avanzada (AGE) y la activación de la ruta de la proteína quinasa C (PKC). Estas vías pueden activar a su vez la producción de citoquinas y moléculas proinflamatorias como ICAM-1, TNF- $\alpha$  y muchos factores vasoactivos, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), que son vitales para mediar los cambios estructurales y funcionales de la RD. El EMD clínicamente significativo puede ocurrir en las últimas etapas de la RD con retinopatía no proliferativa o proliferativa y es la causa más común de pérdida de la visión (Figura adaptada de Robinson, Barathi et al. 2012).

### Fisiopatología de la Retinopatía Diabética

Las razones fisiopatológicas no han sido esclarecidas por completo, sin embargo se ha establecido que los cambios en las etapas tempranas del desarrollo de la RD son consecuencia de la hiperglucemia sostenida en el tiempo (crónica). El consumo de glucosa de las células vasculares y nerviosas de la retina a través de los transportadores vglu1, vglu2 y vglu3 se ve incrementado ocasionando una anomalía. Las concentraciones intracelulares de glucosa se vuelven elevadas y su metabolismo puede llevarse a cabo por vías alternativas. Estas vías son

conocidas como vía de la hexoquinasa y vía del sorbitol, que desencadenan un stress celular. También se produce la glicosilación no enzimática de proteínas que estimula vías de señalización erróneamente como es el caso de la proteína quinasa C. La imposibilidad para el metabolismo intracelular de glucosa lleva a la generación de productos tóxicos para la célula. El desenlace final es la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS), con la consecuente muerte celular (Tarr, Kaul et al. 2013).

### **Componente inflamatorio de la RD**

En los últimos años ha cobrado importancia el rol del sistema inmune innato en el proceso inflamatorio subyacente que ocurre en la RD (Xu and Chen 2017). Como ya mencionamos el desorden metabólico generado por la diabetes da origen a productos tóxicos para las células. Entre ellos tenemos a las proteínas glicosiladas por demás en los espacios extracelulares o proteínas con plegamientos incorrectos en el interior celular. En ambos casos puede haber pérdida o disminución de función. En muchos casos, este tipo de proteínas pueden ser reconocidas por el sistema inmunitario como patrones moleculares asociados al daño (DAMPs por sus siglas en inglés). El componente celular del sistema inmune innato, principalmente macrófagos y neutrófilos, tiene la habilidad de reconocer los DAMPs y aumentar su grado de activación. En última instancia el objetivo del sistema inmune innato es remover los DAMPs generados para mantener la homeostasis adecuada (Xu and Chen 2017). Cuando el desorden metabólico es crónico el estado de activación de las células del sistema inmune también lo es. Esto lleva a un estado inflamatorio sostenido en el tiempo con el consecuente aumento de moléculas pro-inflamatorias como

pueden ser TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  secretadas en parte por los macrófagos o en el microambiente retinal por los macrófagos residentes, las células de la microglia(Tang and Kern 2011). Estas moléculas proinflamatorias tienen la propiedad de activar las células endoteliales e inmunitarias para aumentar el grado de adhesión en los distintos tejidos. En particular en la RD hay un incremento en la expresión en los leucocitos de la molécula de adhesión intracelular (ICAM-1), y aumento de la expresión de distintas selectinas (Joussen, Poulaki et al. 2004). Incluso se ha observado que el polimorfismo del gen *icam-1* está asociado a la severidad de la RD (Sun, Cong et al. 2014). Como hemos comentado previamente, en estadios avanzados donde el grado de inflamación es elevado, el aumento en la adhesión celular puede contribuir al desarrollo de áreas de la retina de no perfusión.

### **Papel en la retinopatía diabética de los macrófagos de la retina: la microglia**

Se ha descrito que las personas diabéticas son más susceptibles a enfermedades infecciosas. En particular, los macrófagos en el curso de la diabetes poseen sus funciones alteradas. La actividad bactericida y la fagocitosis se encuentran disminuidas(Bouma, Lam-Tse et al. 2004, Devaraj, Jialal et al. 2011). Debido a esto, el estado de activación es mayor en pacientes diabéticos, y se ve reflejado por una mayor expresión en moléculas de adhesión y una mayor producción de citoquinas pro-inflamatorias(Hatanaka, Monteagudo et al. 2006, Bradshaw, Raddassi et al. 2009). La retina posee un sistema de defensa que cuenta con los macrófagos residentes que son las células de la microglia y los macrófagos perivasculares (Xu and Chen 2017). Las células de la microglia

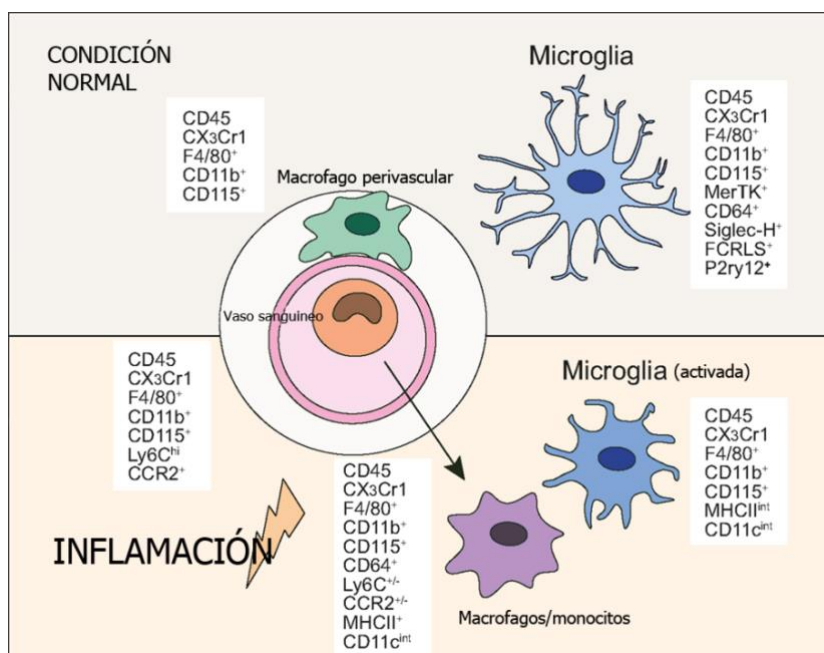
se ubican en la retina interna neural que consta de la capa de células ganglionares, la capa plexiforme interna y plexiforme externa. El sistema de defensa de la retina mediado por macrófagos y microglia puede detectar y responder a PAMPs o DAMPs y juega un papel importante en la homeostasis de la retina, y tal activación está estrechamente controlada(Xu and Chen 2017). Estas células se activan y migran al espacio subretinal en varias retinopatías como la RD(Zeng, Ng et al. 2000, Zeng, Green et al. 2008), la degeneración macular relacionada con la edad(Combadiere, Feumi et al. 2007) y en el envejecimiento(Meleth, Agron et al. 2005, Xu, Chen et al. 2008). La activación de la microglia inducida por la hiperglucemia se ha asociado con el desarrollo temprano de DR. De hecho, estudios han mostrado que durante la diabetes la activación de la microglía de la retina ocurre tan pronto como las modificaciones electroretinográficas (Gaucher, Chiappore et al. 2007, Kern 2007). Distintos trabajos han reportado que las citoquinas, liberadas por microglia activada, entre otras células, contribuyen a la muerte celular neuronal. Estos hallazgos han planteado que las células microgliales activadas tienen un papel patogénico en el curso de la DR (Forrester, Xu et al. 2008, Forrester and Xu 2012).En este sentido, la activación de células microgliales es un marcador temprano de cambios que ocurren en diferentes modelos animales de diabetes y un potencial productor de agentes neurotóxicos en estadios avanzados. Como dijimos, la microglia activada produce sustancias citotóxicas, tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), especies de oxígeno reactivo (ROS), proteasas y aminoácidos denominados excitadores (glutamato y aspartato), que pueden inducir la degeneración neuronal (Kradly, Basu et al. 2005, Xu, Chen et al. 2007, Ma, Zhao et al. 2009). Se ha observado también que la activación de las células

de la microglia puede provocar el movimiento con acumulación de células microgliales en la retina externa y en el espacio subretinal, por ejemplo en el caso de edema macular avanzado(Omri, Behar-Cohen et al. 2011).

### **Marcadores de superficie de la microglia**

Si bien se clasifica a la microglia como macrófagos residentes de la retina (o del SNC) hay que mencionar que son ontogenéticamente distintos de otros miembros del sistema de fagocitos mononuclear que incluye a las células dendríticas, los monocitos y macrófagos. La microglia se origina de los macrófagos primitivos que derivan de los precursores eritro-mieloides en el saco vitelino(O'Koren, Mathew et al. 2016). Estas células en condiciones normales, expresan diversos marcadores de superficie que están presentes en muchos otros macrófagos de tejido y/o monocitos. Estos marcadores son: CD11b, F4/80,CD64, CD45, CD115 (Csf-1R), la molécula ionizada de unión a calcio-1 (Iba - 1) y la tirosina kinasa MER (Mer-TK) (Figura 4)(Greter, Lelios et al. 2015). Las células de la microglia y los macrófagos derivados de médula ósea comparten entonces la expresión del marcador de superficie F4/80. Este marcador es una glicoproteína de superficie de 160 KDa que tiene altos niveles de expresión y se utiliza para identificar estos tipos celulares en los distintos tejidos(Gordon and Pluddemann 2017, Xu and Chen 2017). Es importante remarcar que la expresión de los marcadores de superficie puede variar de acuerdo al estado de activación de la célula (Figura 4)(Wynn, Chawla et al. 2013). El *cluster* de diferenciación CD206, conocido como receptor de manosa, es una proteína transmembrana de 175 kDa, en su mayoría expresada por macrófagos, células dendríticas y células endoteliales. En la retina y también el

cerebro, CD206 se expresa en las células de la microglia y astrocitos (Gordon and Pluddemann 2017). Las células de la microglia expresan CD206 cuando presentan un estado con características anti-inflamatorias (Stein, Keshav et al. 1992). En este estado las células tienen mayor expresión de Arginasa 1 acompañado de una menor producción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , y aumento en la producción de moléculas anti-inflamatorias como IL-10 o TGF- $\beta$  (Figura 4 y 5) (Claria, Gonzalez-Periz et al. 2011, Greter, Lelios et al. 2015). Este receptor se reconoce ampliamente como un marcador microglial M2 típico, y se encarga de captar selectiva y eficientemente ligando compuestos por manosa como es el caso de algunos antígenos microbianos. Además, se sabe que CD206 tiene algunas funciones celulares importantes especialmente en la pinocitosis y fagocitosis de la microglia (Wynn, Chawla et al. 2013, Gordon and Pluddemann 2017). La siguiente figura muestra la variedad de marcadores de superficie que pueden expresar las células de la microglia, los macrófagos perivasculares y macrófagos/monocitos derivados de la médula ósea en una condición normal o en un estado inflamatorio.



**Figura4. Marcadores de superficie de microglía, macrófagos perivascular y derivados de médula ósea en una condición normal o durante un proceso inflamatorio.** Se muestra los diversos marcadores de superficie y como estos pueden variar de acuerdo al estado o el microambiente en el que se encuentren. En condiciones normales las células de la microglía presentan una estructura dendriforme como se muestra en el esquema, mientras que durante el desarrollo de un proceso inflamatorio adquieren una morfología de tipo plasmocitoide (Figura adaptada de Greter, Lelios et al. 2015).

## Microglia M2 en la neuroinflamación crónica

En contraste con la inflamación aguda, la neuroinflamación crónica es una respuesta persistente de larga duración que comienza con un estímulo inflamatorio inicial, que se auto-propaga. Los factores inflamatorios producidos por la microglía pueden dañar el tejido local y, junto con los DAMP liberados, aumentar aún más la inflamación y la activación glial, dando lugar a un ciclo inflamatorio vicioso. Esta inflamación a largo plazo puede tener consecuencias directas sobre las neuronas provocando neurodegeneración como ocurre en la RD(Xu and Chen 2017). Como hemos mencionado la microglía puede presentar un estado antiinflamatorio denominado M2 que se encarga de resolver el estado

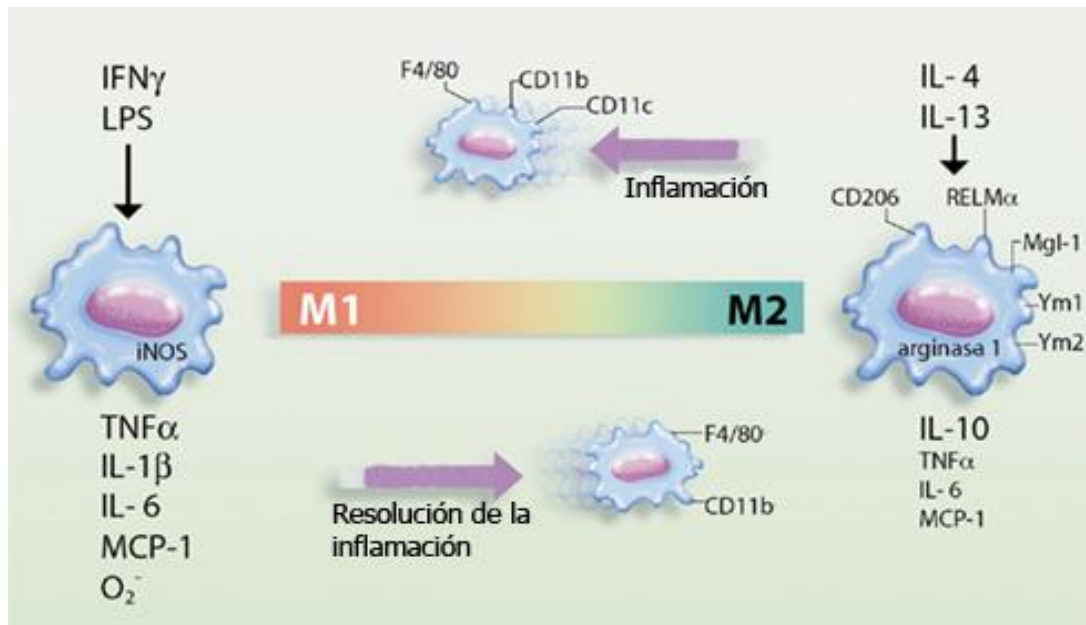


inflamatorio. Sin embargo, las respuestas reparativas muchas veces no logran el objetivo y por lo tanto el estado crónico inflamatorio puede deberse a una respuesta M2 fallida. No sólo la falta de microglia M2 es responsable del control de la inflamación; menos células M2 también significan niveles más bajos de factores neuroprotectores como IGF-1, o en un contexto inflamatorio avanzado menores niveles de citoquinas anti-inflamatorias como IL-10 entre otros factores que la microglia produce (Cherry, Olschowka et al. 2014). Por lo tanto, la falta de una respuesta M2 apropiada podría ser un mecanismo importante subyacente a la neurodegeneración que ocurre durante la RD. Distintos trabajos reconocen la importancia de la dinámica M1 / M2 en enfermedades caracterizadas por neuroinflamación crónica como es el caso de la RD (Abcouwer 2011).

### **Control de la polarización M1/M2 en la neuroinflamación**

Es importante remarcar el papel crítico que el microambiente desempeña en el control del cambio de la activación clásica a la alternativa. La activación clásica se suele denominar a la microglia M1 y se debe principalmente a los altos niveles de citoquinas proinflamatorias presentes en el desarrollo de la diabetes o en distintos daños a nivel del sistema nervioso central central (lesión de la médula o cerebral). Mientras que la activación alternativa es la ya mencionada M2. Es importante destacar que la microglia polarizada no está confinada en un estado particular; tanto microglia como macrófagos son tipos de células que tienen una gran plasticidad y su perfil puede ser modificado/alterado si el ambiente en el que se encuentra cambia, es decir, la producción de citoquinas se modifica (Davis, Tsang et al. 2013). Sin embargo, en procesos inflamatorios crónicos donde la producción de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ es continua, se

mantiene un estado de activación M1 (Abcouwer 2011). Por lo tanto, se podría plantear la hipótesis de que la alteración del microambiente podría utilizarse para tratar los estados inflamatorios. De hecho, para modular los microambientes distintos grupos de investigación han comenzado a utilizar técnicas para inyectar células con un perfil M2 directamente o causar polarización indirectamente con otros agentes terapéuticos (Guerrero, Uchida et al. 2012, Shechter, Miller et al. 2013). Si bien la utilización de terapias celulares, con un perfil M2, son muy interesantes resultan muy poco viables en patologías a nivel de la retina. Por esta razón es que es muy importante la utilización de fármacos que puedan modular el perfil de estas células y modificar el microambiente en la retina disminuyendo el estado inflamatorio crónico que se genera gracias a la hiperglucemia crónica durante la RD. Si bien hay numerosos trabajos sobre el rol que cumplen las células de la microglia en la RD, muchas preguntas quedan por responder sobre el posible efecto en el transcurso de RD. La siguiente figura muestra los tipos de activación clásica (M1) y alternativa (M2) que pueden adquirir las células de la microglia de acuerdo al contexto o microambiente en el que se encuentren. También se muestran las moléculas que expresan y cuáles son las responsables de dirigir el tipo de activación. En el contexto inflamatorio crónico que se produce en la RD, citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , o quemoquinas como MCP-1 son las que van a predominar, con aumento en la expresión intracelular de iNOS. En cambio la conducción hacia un contexto de resolución del proceso inflamatorio puede ser mediada por IL-4 e IL-13, una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, un aumento de la expresión en la superficie celular e intracelular de CD206 y Arginasa 1 respectivamente.

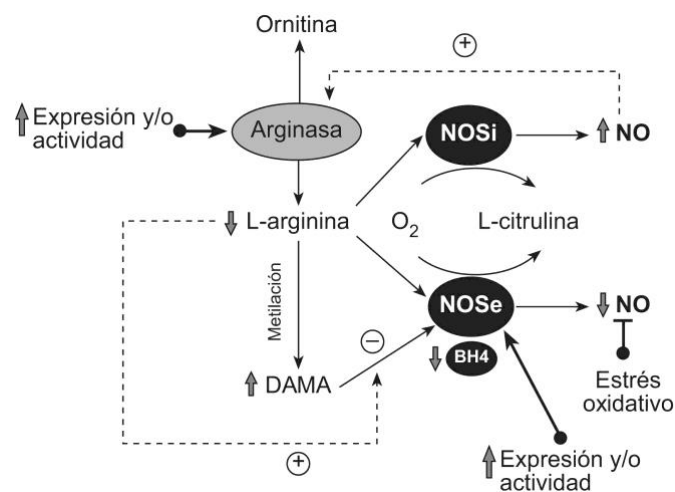


**Figura5. Perfiles de activación de las células de la microglía/macrófagos.** Los procesos inflamatorios son llevados a cabo por células de tipo M1. En un contexto en el cual deben llevar a cabo el defensa frente a un patógeno el beneficio es claro, pero este perfil M1 puede generarse por un desorden metabólico como ocurre en la RD desencadenando un estado patológico. El perfil M2 es un perfil que se encarga de resolver los procesos inflamatorios y devolver la homeostasis al sistema inmunitario necesario cuando se ha resuelto por ejemplo un proceso infeccioso. En este sentido, modular las células de la microglía/macrófagos aun perfil M2 podría disminuir el daño generado en la RD (Figura adaptada de Claria, Gonzalez-Periz et al. 2011).

## El oxido nítrico en la RD

El oxido nítrico (NO) es un metabolito caracterizado como ROS y la producción puede llevarse a cabo por la enzima NO sintasa que presenta diversas isoformas sensibles a calcio y se denominan de acuerdo al tipo celular que lo expresan (nNOS, eNOS) o insensibles a calcio inducible (iNOS)(Forstermann and Sessa 2012). Se ha descrito la expresión de iNOS en la retina de diversos animales. También se ha estudiado la relevancia de la iNOS en ratones c57bl6j diabéticos inducidos químicamente con estreptozotocina demostrando ser un factor importante en la disminución de marcadores de la retinopatía en etapas tempranas el desarrollo (Zheng and Kern 2009). Ratones diabéticos *knock out* para iNOS mostraron una disminución del número de capilares acelulares lo que indica una mayor sobrevida de pericitos, menor afinamiento de la retina y una

menor muerte de células ganglionares entre otros factores(Leal, Manivannan et al. 2007). Diversos trabajos han mostrado la importancia de la reducción de NO y los distintos ROS para disminuir el daño generado en la RD en modelos animales(Toda and Nakanishi-Toda 2007). Incluso algunos estudios han demostrado que el control intraocular de NO en pacientes con retinopatía diabética puede constituir una aproximación terapéutica (Hattenbach, Allers et al. 2000). En la siguiente figura se esquematiza el ciclo de producción del NO por parte de la iNOS y eNOS. La iNOS utiliza el precursor aminoacídico L-arginina cuya disponibilidad es regulada por la Arginasa-1. En presencia de L-arginina iNOS es capaz de aumentar los niveles de NO mientras que en su ausencia no puede hacerlo. Al mismo tiempo un aumento en la concentración de NO conduce a un aumento en la actividad de Arginasa-1 lo que disminuye la producción del sustrato de iNOS (la L-arginina), cerrando el ciclo(Mingorance, Herrera et al. 2009).



**Figura6. Ciclo de producción de NO.** La producción de NO está finamente regulada. Durante la RD se pierde la regulación del ciclo de producción de NO y se desencadena el estrés oxidativo que es en parte responsable de los daños neurodegenerativos. La Arginasa-1 es la responsable de disminuir el sustrato necesario para que la enzima iNOS produzca NO. Al mismo tiempo un aumento en la concentración de NO aumenta la expresión y actividad de Arginasa-1(Figura adaptada de Mingorance, Herrera et al. 2009).

## **Retinopatía diabética experimental**

### **Modelos animales de RD**

Durante las últimas dos décadas, se ha llevado a cabo una extensa investigación con modelos animales de diabetes. Hasta la fecha, varias especies incluyendo ratones, ratas, gatos, perros, cerdos y primates no humanos han sido utilizadas como modelos para proporcionar información valiosa sobre los aspectos celulares y moleculares de la patogénesis de RD. La diabetes en animales suele inducirse con productos químicos como aloxano o estreptozotocina (STZ)(Robinson, Barathi et al. 2012, Jiang, Yang et al. 2015), mediante pancreatectomía quirúrgica, o espontáneamente mediante crianza selectiva(Bogdanov, Corraliza et al. 2014) o manipulación genética(Yoshioka, Kayo et al. 1997). La mayoría de los estudios experimentales sobre RD hasta la fecha han utilizado modelos animales de diabetes tipo 1 (Cheta, 1998; Kern, 2009; Zheng y Kern, 2010). Muchos modelos de ratones transgénicos y *knockout* también se han desarrollado para estudiar las vías moleculares implicadas en la patología RD (Rakoczy, Ali Rahman et al. 2010, Villacampa, Haurigot et al. 2015). Estos modelos han aportado contribuciones a la investigación de la patogénesis de RD, con sus ventajas y desventajas.

### **Modelos de roedores de Retinopatía Diabética**

Varios modelos de roedores se han utilizado para estudiar los mecanismos moleculares subyacentes a la patogénesis de DR. Estos modelos son fáciles de manejar, relativamente baratos, tienen ciclos reproductivos cortos y tienen un fondo genético similar a los humanos, permitiendo que los resultados

experimentales sean extrapolados. Los modelos de RD de roedores varían con respecto a las especies (predominantemente rata o ratón), cepa, método de inducción y duración de la diabetes (Cai and McGinnis 2016). Las técnicas avanzadas de manipulación genética, como la expresión transgénica específica de tejido y el *knockout* dirigido de genes, han aumentado la importancia relativa de los modelos de ratón para experimentos que requieren específicamente modelos modificados genéticamente. Debido a las alteraciones genéticas de determinados procesos metabólicos y mecanismos fisiopatológicos estos animales proporcionan una plataforma notable para investigar la patogénesis de al menos las primeras etapas de la retinopatía (Robinson, Barathi et al. 2012). Sin embargo, una de las principales críticas al uso de roedores para modelar RD es que no reflejan exactamente la condición humana, especialmente con respecto a la extensión de la patología. Los modelos de roedores reproducen la mayoría de los aspectos de las primeras etapas de la RD, pero no se ha encontrado que desarrollen de forma reproducible el último estadio neovascular de la enfermedad, probablemente debido a la corta vida de los animales y por lo tanto a la menor duración de la diabetes.

### **Modelos diabéticos inducidos químicamente**

De acuerdo a lo comentado anteriormente, los modelos animales experimentales de diabetes inducidos por estreptozotocina no desarrollan todas las características de la RD como la observada en humanos. En particular los estadios avanzados correspondientes a la RDP. Sin embargo un modelo reciente generado por retro-cruza en ratones C57bl6j ha mostrado rasgos característicos de la RDP en periodos sorprendentemente cortos de tiempo que

brinda una oportunidad interesante para modificar este paradigma(Weerasekera, Balmer et al. 2015).

La diabetes puede ser inducida en animales usando STZ o aloxano, estas drogas provocan apoptosis selectivamente a las células  $\beta$ -pancreáticas(Rakieten, Rakieten et al. 1963, Jansson and Hellerstrom 1981, Jansson and Sandler 1986). Los animales carentes de estas células son incapaces de producir insulina y por lo tanto inducen una diabetes de tipo insulino-dependientes. Los roedores diabéticos generados de esta manera se han estudiado durante un máximo de 24 meses en una condición de hiperglucemia pero saludable, proporcionándoles pequeñas cantidades de insulina cada pocos días. Este enfoque reproduce los primeros síntomas de la DR, como la pérdida de pericitos y capilares retinianos, el engrosamiento de la membrana basal vascular, la oclusión vascular y el aumento de la permeabilidad vascular (Robinson, Barathi et al. 2012). Los cambios fisiológicos y bioquímicos en la retina comienzan a aparecer entre 1-2 meses después del inicio de la hiperglucemia en las ratas y ratones diabéticos inducidos por STZ. Los cambios no vasculares(neuronal y glial) inducidos por la diabetes se observan antes del desarrollo de cambios en las células vasculares y pueden contribuir a la patología de la enfermedad vascular(Barber, Lieth et al. 1998, Kohzaki, Vingrys et al. 2008). Los modelos de ratones inducidos por STZ no se usaron frecuentemente para estudios sobre RD en el pasado por la dificultad de inducir la diabetes y lo difícil de mantener a los animales vivos una vez que eran diabéticos, sin embargo estos problemas han sido superados recientemente. Los ratones diabéticos inducidos por STZ mostraron a los 6 meses de la inducción de la diabetes capilares acelulares, apoptosis de células vasculares y perdida de

pericitos en la retina, el sello de característico de las etapas tempranas de la RD (Feit-Leichman, Kinouchi et al. 2005). Estudios a largo plazo, 18 meses de diabetes, no mostraron los cambios esperados en la retina que corresponden a una retinopatía proliferativa avanzada. Sin embargo, los ratones desarrollan la pérdida de RGCs. A las 10-14 semanas después del tratamiento con STZ, estos ratones mostraron pérdida de RGCs y un adelgazamiento significativo de las capas interna y externa de la retina (Martin, Roon et al. 2004). Sin embargo, otro estudio en ratas diabéticas con dieta rica en grasa mostró rubeosis iridis y neovascularización corneal a los 2 años de seguimiento (Mancini, Ortiz et al. 2013). En general, estos modelos diabéticos se utilizan principalmente para demostrar los cambios tempranos de RD. Como hemos indicado los estudios de cambios avanzados de la retina no pueden llevarse a cabo en estos modelos ya que los animales presentan diversas complicaciones patológicas dificultando su *housing* y fallecen antes de que la RDP se desarrolle.

### **Pérdida de células ganglionares durante la retinopatía diabética**

La diabetes mellitus (DM) está acompañada de un proceso neurodegenerativo también llamado neuropatía diabética de la retina, es decir, degeneración neuroretinal interna. Este fenómeno se observa estructuralmente, como apoptosis neural, pérdida de células ganglionares, gliosis reactiva (aumento de la expresión de GFAP) y adelgazamiento de la retina interna. Desde un punto de vista funcional, se observa un déficit en el electroretinograma, en la adaptación de la oscuridad, en la sensibilidad al contraste, a la visión del color y a pruebas psicofísicas (Antonetti, Barber et al. 2006, van Dijk, Verbraak et al. 2011, Stem and Gardner 2013). Distintos estudios longitudinales han demostrado que la



pérdida de células ganglionares en la retina es un cambio que ocurre durante las etapas tempranas de la RD. Se ha observado pérdida de células ganglionares en pacientes jóvenes con diabetes tipo 1 pero sin RD. Estudios del espesor de la capa de células ganglionares en pacientes con DM mostro un afinamiento de la misma previo a alteraciones vasculares características de la RD(Bressler, Edwards et al. 2008, Chalam, Bressler et al. 2012, Rodrigues, Urias et al. 2015).Investigaciones en secciones transversales de retinas humanas mediante inmunohistoquímica mostraron un aumento en la expresión de proteínas pro-apoptóticas como caspasa-3 y caspasa-9 en las RGCs de pacientes diabéticos (Oshitari, Yamamoto et al. 2008). En ratones algunos estudios han mostrado pérdida de células ganglionares a partir de las 6 semanas post-inducción de diabetes a través de la cuantificación del factor de transcripción Brn3a y la proteína nuclear específica de neuronas NeuN (Zeng, Ng et al. 2000, Nadal-Nicolas, Jimenez-Lopez et al. 2009). También se ha demostrado un afinamiento en las capas de la retina NFL y GCL luego de 6 semanas de diabetes (Martin, Roon et al. 2004, Yang, Mao et al. 2012). Algunos de estos hallazgos demuestran que el proceso neurodegenerativo es progresivo en el curso de la DM tanto en humanos como en ratones y supera la neurodegeneración asociada con el envejecimiento normal. Por esta razón estrategias terapéuticas enfocadas a disminuir este proceso provocado por la DM que ocurre en etapas muy tempranas y sin síntomas aparentes ha cobrado una importancia relevante.

### **Terapias actuales para la retinopatía diabética**

Debido a que los estadios tempranos de la RD se presentan como asintomáticos el manejo actual de pacientes con retinopatía diabética consiste en iniciar el

tratamiento con fotocoagulación en el estadio pre-proliferativo o proliferativo, y también en la presencia de edema macular clínicamente significativo, así como terapias biológicas con anticuerpos monoclonales anti factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) como el Aflibercept (Eylea, Bayer, Alemania), Ranibizumab (Lucentis, Novartis, Suiza) o Bevacizumab (Avastin® Roche, Zurich, Suiza)(Kollias and Ulbig 2010). Aunque los tratamientos mencionados han contribuido a limitar los casos de ceguera por diabetes todavía no existe un tratamiento preventivo para ser aplicado en etapas tempranas de la enfermedad, para lograr enlentecer el progreso de la misma. Las terapias anti-VEGF han mejorado el resultado del tratamiento de la neovascularización retinal y, especialmente del edema macular diabético, una complicación que afecta aún más la visión del paciente. El uso de glucocorticoides también se ha probado pero aún no se ha podido conseguir una mejoría sustentable en el tiempo(Jonas 2007).

### **Inhibidores de serino proteasas**

Los inhibidores de serino proteasas también llamadas serpinas son una clase de proteínas implicadas en la regulación de las serino y otros tipos de proteasas. Su nombre deriva del residuo de la proteasa target a inhibir, presentan un centro reactivo situado en un anillo peptídico que actúa bloqueando el sitio activo de la proteasa. Se han identificado más de 400 miembros de la superfamilia de serino proteasas. Curiosamente, no todas las serpinas son de naturaleza inhibitoria. Las serpinas no inhibitorias incluyen ovoalbúmina, angiotensinógeno (sustrato del sistema renina-angiotensina-aldosterona) y factor derivado del epitelio de pigmento (PEDF). Se encuentran en mamíferos, insectos, plantas y

virus(Worrall, Blacque et al. 1999, Silverman, Bird et al. 2001). En humanos, la mayoría de las serpinas regulan las funciones de las proteasas implicadas en la respuesta de procesos. Estos pueden incluir la coagulación, fibrinólisis, inflamación, cicatrización de heridas y reparación de tejidos(Carrell, Evans et al. 1991). Las serpinas han sido implicadas en diversas patologías por la pérdida funcional del gen por delección o mutación del mismo, o por dar un producto con menor o nula actividad biológica, lo que resulta en una deficiencia. Los ejemplos de patologías relacionadas con la deficiencia incluyen: enfermedad tromboembólica venosa (anti-trombina), metástasis de cáncer de mama (maspin; *mammary serin protease inhibitor*), enfisema (alfa 1 anti-tripsina) y angioedema hereditario (inhibidor de C1, proteína del complemento)(Gils and Declerck 1998).

Algunas serpinas son reconocidas como antiinflamatorios (AI) endógenos. Entre ellas se destacan la alfa 1 antitripsina (AAT), SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*)y ELAFIN (trappin-2) (Moreau, Baranger et al. 2008, Lewis 2012). Su función la ejercen al inhibir la acción de las enzimas que poseen actividad de serino proteasas. En particular, la elastasa, uno de los principales blancos de las serpinas, es liberada por los leucocitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos) en el foco inflamatorio(Korkmaz, Horwitz et al. 2010). También se ha observado que pueden cumplir otras funciones que no están directamente relacionadas a su actividad inhibitoria, por ejemplo algunos estudios han mostrado que el SLPI tiene propiedades anti-angiogénicas (Sugino, Yamaguchi et al. 2007, Jonigk, Al-Omari et al. 2013). En los últimos años se ha puesto el foco en la utilización de algunas serpinas como AI endógenos debido a sus beneficios en disminuir las respuestas inflamatorias y su escaso o nulo efecto adverso.

## Alfa 1 antitripsina

La AAT, es una proteína de fase aguda que puede alcanzar hasta 5 veces el valor normal y es la principal serpina en sangre (Wewers, Casolaro et al. 1987). Ha mostrado tener efectos antiinflamatorios actuando sobre productos de células del sistema inmune como la elastasa de los neutrófilos (NE), así como también sobre la actividad de citoquinas y quemoquinas. La AAT ha suscitado particular interés en la comunidad científica por su gran potencial para modular distintos ambientes inflamatorios. En este sentido AAT ha demostrado presentar beneficios en patologías con procesos inflamatorios subyacentes. Se ha observado que AAT ha sido capaz de curar y regenerar células  $\beta$ -pancreáticas en diabetes autoinmune en ratones NOD (Koulmanda, Bhasin et al. 2008). También ha mostrado reducir el infiltrado de neutrófilos y aumentar la supervivencia de trasplantes de islotes pancreáticos (Lewis, Mizrahi et al. 2008). En particular, AAT ha demostrado modular a un perfil tolerogénico a células dendríticas con un aumento en la producción de Interleukina-10 (IL-10) (Ozeri, Mizrahi et al. 2012). Incluso macrófagos que fueron pretratados con AAT presentaron un perfil tipo M2. Recientemente se ha observado que AAT fue capaz de disminuir el infiltrado inflamatorio de linfocitos y disminuir los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) en suero en un modelo de diabetes tipo 1 (Wang, Sun et al. 2017). Otros trabajos han señalado que AAT posee la capacidad de inhibir la enzima iNOS tanto *in vivo* como *in vitro* (Chan, Pott et al. 2012). Basados en algunos de estos hallazgos es que la AAT se está utilizando en distintos estudios pre-clínicos y *clinical trials* en patologías como diabetes autoinmune, enfermedad de Bowel, esclerosis múltiple, y la enfermedad de injerto versus huésped

(Subramanian, Shahaf et al. 2011, Tawara, Sun et al. 2012, Collins, Aherne et al. 2013, Fleixo-Lima, Ventura et al. 2014).

### **AAT y su utilización terapéutica actual**

La AAT se produce predominantemente en el hígado (Larsson, Palm et al. 2008). La deficiencia de AAT, o por sus siglas en inglés AATD es una enfermedad hereditaria que afecta a los pulmones y el hígado (Campos, Shmuels et al. 2012). En el hígado, la deficiencia de alfa-1 antitripsina se puede manifestar como el síndrome de hepatitis neonatal benigna, mientras que un porcentaje de adultos desarrollan fibrosis hepática con la progresión a cirrosis y carcinoma hepatocelular (Perlmutter 2011, Stoller and Aboussouan 2012). Sus funciones fisiológicas más importantes son la protección del tejido pulmonar de las enzimas proteolíticas y también la regulación de procesos inmunes pulmonares (Wewers, Casolaro et al. 1987). En particular un exceso de actividad proteolítica en los alveolos pulmonares puede generar un remodelamiento desmesurado de la matriz extracelular y la consecuente fibrogenesis. Una fibrogenesis exacerbada a nivel alveolar genera graves fallas funcionales en el intercambio gaseoso entre los vasos sanguíneos y la atmosfera del alveolo (Tuder, Janciauskiene et al. 2010). El diagnóstico de AATD puede establecerse mediante la medición de la AAT en suero o por intermedio de un análisis genético de los alelos del gen de AAT (de Serres, Blanco et al. 2007). El principal uso terapéutico es la sustitución o “terapia de sustitución” con la AAT purificada de suero humano (Tuder, Janciauskiene et al. 2010). Los productos comerciales más conocidos son Trypsan, Prolastin C, Zemaira, Aralast y Glassia (Zhang, Hou et al. 2014, Lior, Geyra et al. 2016). Los objetivos del tratamiento

son la prevención de la disminución acelerada de la función pulmonar, la reducción de las infecciones pulmonares, y las mejoras en la capacidad de ejercicio. En el presente trabajo de tesis se utilizó AAT comercial Trypsan (Grifolds, Barcelona) en el modelo de diabetes en estudio.

### **Células de la glía**

Las células de la neuroglia generalmente denominadas como células gliales o glía son bastante diferentes de las células nerviosas. La principal diferencia es que la glía no participa directamente en las interacciones sinápticas y la señalización eléctrica, aunque sus funciones de apoyo ayudan a definir los contactos sinápticos y mantener las capacidades de señalización de las neuronas. Las células gliales son más numerosas que las células nerviosas en el cerebro, superando en número a ellas en una proporción 3 a 1. Son generalmente más pequeñas que las neuronas, y carecen de los axones y dendritas (Hollander, Makarov et al. 1991). Algunas de las funciones gliales que están bien establecidas incluyen mantener el medio iónico de las células nerviosas, la modulación de la velocidad de propagación de señales nerviosas, la modulación de la acción sináptica mediante el control de la absorción de neurotransmisores, etc. En particular en la retina humana existen 3 tipos de células gliales: Células de Müller, Astroglia y Macroglia (Joussen and Spitznas 1972). Las células de Müller son las principales células de la macroglía en la retina de los mamíferos (Kolb 1995). Anatómicamente, unen la superficie vítrea con el espacio subretiniano y atraviesa todas las capas de la retina (Antonetti, Klein et al. 2012). Esta disposición estructural es ideal para la regulación fisiológica y patológica en la vasculatura retiniana y en las neuronas. En la retina,

las células de Müller desempeñan muchas funciones esenciales en el metabolismo, mantenimiento y en la protección, proporcionando factores tróficos, eliminando metabolitos (residuos), controlando los volúmenes del espacio extracelular, la homeostasis de agua, regulando la función de barrera a la sangre (por sus siglas en inglés *blood retinal barrier* BRB), y modulando la inmunidad innata (Reichenbach and Bringmann 2013). Las células de Müller responden a condiciones de estrés originando por ejemplo gliosis. La gliosis es un aumento en la expresión de la proteína perteneciente a los filamentos intermedios GFAP que implica cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos y se ha observado en la retina de los animales diabéticos como una característica de los cambios tempranos que ocurren (Rungger-Brandle, Dosso et al. 2000, Bringmann, Pannicke et al. 2006). Diversos estudios en ratones han mostrado que el proceso de gliosis comienza a partir de la semana 6 post-inducción de la diabetes (Feit-Leichman, Kinouchi et al. 2005, Kumar and Zhuo 2010, Ly, Yee et al. 2011). Como hemos señalado anteriormente, bajo las condiciones patológicas de la diabetes se puede alterar la producción de factores de crecimiento, como el VEGF. Particularmente en los estadios tardíos de RD, los efectos perjudiciales ya mencionados como el crecimiento de vasos nuevos en el interior de la retina y el vítreo son los responsables de la pérdida de la visión. Estudios recientes han señalado a las células de Müller como la principal fuente de VEGF en la retina (Bai, Ma et al. 2009, Wang, Xu et al. 2010, Wang, Zhu et al. 2015). Algunos trabajos han demostrado que mutantes condicionales para el gen de VEGF en las células de Müller en ratones diabéticos presentan menor expresión de ICAM, TNF- $\alpha$ , acompañados con una disminución en la permeabilidad y en la leucostasis (Wang, Xu et al. 2010). Por esta razón las

células de Müller se han vuelto un interesante blanco para disminuir los efectos de la inflamación, neo-vascularización y la pérdida de líquido al interior de la retina (*vascular leakage*) causando por ejemplo edema macular. En este trabajo de tesis nos hemos enfocado en ver los efectos de la AAT sobre la producción de moléculas con efectos inflamatorios y angiogénicos en cultivos primarios de células de Müller.



## **Hipótesis de trabajo**

El principal daño estructural generado en la RD es el afinamiento de la retina. Viene acompañado por una pérdida de células ganglionares relacionado con las etapas tempranas del desarrollo de la retinopatía. Estos daños son generados por cambios metabólicos desencadenados por la hiperglucemia crónica. Dichos cambios llevan inevitablemente al avance del proceso inflamatorio que se da durante el progreso de las distintas etapas de la RD. La disminución de aquellos factores que contribuyen a la inflamación necesaria para reducir los efectos adversos en la progresión del daño. En este trabajo de tesis doctoral se plantea la hipótesis de que AAT es capaz de disminuir el estado inflamatorio y el daño neurodegenerativo en la retina generado por la hiperglicemia crónica.

### **Objetivo general:**

Objetivo general: estudiar el efecto sobre la retinopatía diabética del inhibidor de Serino proteasas (serpinas) fisiológicos alfa 1 antitripsina.

### **Objetivos específicos:**

1. Determinar el efecto *in vivo* de AAT en la pérdida de células ganglionares
2. Determinar el efecto *in vivo* de AAT sobre el afinamiento retinal
3. Evaluar el efecto *in vivo* de AAT sobre el perfil de citoquinas y quemoquinas sistémico y retinal.
4. Determinar el efecto *in vivo* de AAT sobre las células F480<sup>+</sup> en la retina.

5. Evaluar el efecto *in vitro* de AAT en cultivos primarios de células gliales, de macrófagos (líneas Raw 264.1 y J77.2) y de células endoteliales humanas (Hmec-1), tanto en la migración, como en la producción de NO.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

## Experimentos in vivo

### Animales

En los estudios realizados se utilizaron ratones de la cepa C57BL6j de entre 6 y 8 semanas de edad provenientes del Laboratorio de Animales de Experimentación (LAE) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales fueron mantenidos en el bioterio de nuestra institución (Instituto de Investigaciones en Medicina Translacional, Universidad Austral, Pilar, Buenos Aires) de acuerdo a las normas indicadas por el Comité institucional para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (CICUAL 16-05).

### Protocolo de tratamiento y grupos experimentales.

Ratones c57bl6j de entre 6 y 8 semanas (con un peso de entre 20 – 22 gramos) fueron inyectados con 2 dosis de 100 mg/kg de animal espaciadas por 48 horas. Siete días después de la segunda dosis de STZ se realizó una curva de tolerancia a la glucosa (CTG). En la CTG se realizó una primera medición con los animales en ayuno de 16 horas, luego se inyectaron de manera IP 100µl de una solución de glucosa en concentración 250 mg/ml y se realizaron mediciones de glucemia a los 15, 30 y 60 minutos posteriores. Los animales con glucemias por encima de 200 mg/dl después de transcurridos 60 minutos de la inyección fueron considerados diabéticos. El tiempo cero (comienzo de la diabetes) se considero luego de evaluar las glucemias mediante la CTG. El tratamiento con AAT fue semanalmente a una dosis de 60 mg/kg de animal durante 8 semanas, la primera dosis fue suministrada 1 semana posterior a la confección de la CTG.

El sacrificio se realizó 24hs posteriores a la última dosis (**Figura 8**). Los grupos experimentales utilizados fueron 4. Los mismos se describen a continuación:

1. Ratones C57BL6J diabéticos (DBT)
2. Ratones C57BL6J diabéticos tratados con AAT (DBT+ AAT)
3. Ratones C57BL6J sanos (Controles)
4. Ratones C57BL6J sanos tratados con AAT (Controles + AAT)

**Figura 8. Esquema de inducción de diabetes y tratamiento con AAT.** Los animales de entre 6 y 8 semanas fueron inoculados con STZ en una dosis de 100 mg por kg de animal. La STZ fue re-suspendida en buffer citrato (pH: 4.5) e inoculada inmediatamente en un periodo no mayor a los 15 minutos posteriores. El volumen final de STZ inoculado fue de 100  $\mu$ l. El suministro de AAT fue semanal, en un volumen final de 100  $\mu$ l en una concentración final de 60 mg por kg de animal. Veinticuatro horas posteriores a la última dosis los animales fueron sacrificados.

#### Inducción de la diabetes con estreptozotocina

El efecto de AAT sobre la retina de animales diabéticos se evaluó en el siguiente modelo murino: ratones de la cepa C57BL6j fueron inoculados con 2 dosis de 100mg/kg de animal de estreptozotocina (STZ) de manera intraperitoneal (IP) espaciadas en por 48hs como modelo de diabetes. Este modelo experimental es reconocido ampliamente por la comunidad científica como muy apropiado para la

investigación de terapias en diabetes en los cuales los niveles de glucosa en sangre se mantienen elevados de manera sostenida en el tiempo. Los niveles de glucosa en sangre fueron medidos 7 días luego de la segunda administración de STZ, y fueron considerados diabéticos aquellos animales con glucemias mayores a 200 mg/dl. La glucemia fue monitoreada semanalmente hasta la semana 8 de tratamiento (sacrificio).

#### Tinciones histológicas

Los ojos fueron fijados en para-formaldehído al 4% durante 16 horas, luego fueron embebidos en parafina (Sigma Aldrich cat #:P-3683), se realizaron cortes de 5 micrómetros ( $\mu\text{m}$ ) que posteriormente fueron teñidos con Hematoxilina y Eosina (H&E). El procedimiento de tinción con H&E fue el siguiente: se desparafinizó el tejido mediante dos pasajes de 10 minutos cada uno en xilol (Biopack®) y se hidrató en agua. Se incubó con una solución de hematoxilina por 15 minutos. Se lavó con agua corriente durante 5 minutos. Para rehidratar el tejido se incubó 1 minuto en etanol 100%, 1 minuto en etanol 96%, 1 minuto en etanol 70% y 1 minuto en agua. Se realizó una contra-tinción con solución de eosina alcohólica durante 2 minutos. Se eliminaron los restos de eosina con etanol 70%. Se incubó 2 veces en etanol 100% durante 2 minutos. Se aclaró en xilol y se montó con bálsamo de Canadá (Biopack®).

#### Examen histológico de hígado, riñón y corazón.

Al cumplirse la semana 8, los animales fueron anestesiados y sacrificados; hígado, riñón y corazón fueron extirpados y fijados en para-formaldehído 4%. Los órganos fueron incluidos en parafina. Cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espesor se utilizaron para realizar tinciones de Hematoxilina & Eosina como se describió previamente para las retinas. Las tinciones se observaron al microscopio óptico

Eclipse Nikon E-800 en aumentos de 20x y 40x y se tomaron imágenes utilizando la cámara Nikon DXM1200 digital camera (Tokyo, Japan). Se analizó la anatomía y microarquitectura de cada órgano de todos los grupos experimentales.

#### Medición del espesor retinal

La medición del espesor de la retina fue realizada a partir de las tinciones histológicas de H&E. Las mismas se realizaron desde la retina interna, a la externa. Se midió desde la capa de células ganglionares (GCL) hasta la capa de foto-receptores (PL). También se realizaron mediciones de las distintas capas de la retina: capa plexiforme interna (IPL), capa nuclear interna (INL), capa plexiforme externa (OPL), capa nuclear externa (ONL), y capa de foto-receptores (PL). Se tomaron fotos en aumentos de 20x y 40x de toda la retina desde el disco óptico a la periferia, en dos puntos diferentes de cada campo en cada grupo. Las imágenes se realizaron utilizando la cámara digital Nikon DXM 1200 (Tokio, Japón) montada sobre un microscopio Eclipse Nikon E-800. Las imágenes fueron digitalizadas en un marco rectangular de 1280 × 960 píxeles utilizando los objetivos 40x y 10x para las mediciones de espesor. Se compararon los valores del espesor entre los distintos grupos.

#### Conteo de células ganglionares a partir de una configuración de retinas en flor

Las retinas en forma de flor fueron obtenidas de la siguiente manera. Los ratones fueron anestesiados con una solución anestésica de ketamina/xylazina en 0.1 ml / 20 gramos de animal. Luego se perfundieron los animales con paraformaldehído al 4% con 5 ml. Se extrajeron ojos de animales de 8 semanas de diabetes tratados y sin tratar y sus controles. Se extrajo la cornea y el cristalino. La copa ocular que contiene la retina junto con el epitelio pigmentario se incubó

en para-formaldehído 4% durante 1 hora. Luego se extrajo la retina de la copa ocular y se realizaron 4 cortes peri-céntricos equidistantes, y se incubaron por 2 horas a -80°C para eliminar el humor vítreo. Luego se realizó el bloqueo con BSA al 1% en PBS. Las retinas fueron luego incubadas 16 horas a 4°C con anticuerpo de cabra anti-Brn3a (catalogue #: sc31984, *Santa Cruz Biotechnology, CA*), en una dilución 1:500. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno y luego se incubó con el anticuerpo secundario policlonal anti-cabra durante 2 horas. Se realizaron 3 lavados como se describió previamente y se realizó el montaje con Bálsamo de Canadá (Biopack, catalogo #: 2000130205). Se tomaron imágenes a 4x, 10x para el armado de las retinas en flor y 20x para realizar el conteo. Las imágenes obtenidas fueron tanto de la retina central como de la retina periférica. El valor medio de 20 imágenes fue considerado como representativo y se expresó el número total de células Brn3a positivas por mm<sup>2</sup>.

#### Extracción de ARN total

Las retinas fueron extraídas de los animales y colocadas en 300 µl de Trizol (*Invitrogen, Carlsbad, CA*) por retina, y fueron disgregadas con pipeta. La extracción de ARNm total se realizó según el procedimiento indicado por el fabricante. El tejido disgregado se homogeneizó en trizol y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Se realizó una separación en 60 µl cloroformo. Se centrifugó a 12.000 r.p.m. durante 15 minutos. Se extrajo la fase superior (acuosa) y se realizó una precipitación en 150 µl de isopropanol a 12.000 r.p.m. Finalmente se lavó el ARN en 500 µl de etanol 70% y se centrifugó a 12.000 r.p.m. El pellet se resuspendió en agua miliQ libre de RNAsas. En los ensayos con líneas celulares se utilizó Trizol directamente para levantar las células, a razón de 500 µl cada 10<sup>5</sup> células, sobre la placa de cultivo. En todos

los casos el ARNm fue corrido en un gel de agarosa para evaluar su estado y se cuantifico mediante la utilización de un espectrofotómetro.

#### Síntesis de ADNc a partir de ARN total

Previo a la retro-transcripción el ARN total fue tratado con ADNasa I (*Thermo Scientific*®). La mezcla de reacción fue realizada en un volumen final de 10 µl. Se utilizaron 2 µg de ARN total, solución buffer ADNasa 1X y 2 unidades (2U) de ADNasa I. Se incubó la mezcla durante 30 minutos a 37°C. Para inactivar la ADNasa se utilizaron 0,5 µl de EDTA 25 mM y se incubó durante 10 min a 65°C. La retro-transcripción se realizó utilizando el sistema *First Strand cDNA Synthesis Kit* (*ThermoScientific*®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se incubaron 2 µg de ARN, cebador oligo-dT<sup>15</sup> (15pb), 1mM de dATP, dGTP, dCTP y dTTP durante 5 minutos a 65°C. Posteriormente se colocaron las muestras en hielo y se agregó solución buffer 5X, inhibidor de ARNasa RiboLock y 40U de la retro-transcriptasa M-MuLV. Se incubó 1 hora a 37°C y 5 minutos a 70°C.

#### Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Se estudió la expresión de diversos genes por qPCR utilizando cebadores específicos detallados en la Tabla 1. Para las amplificaciones se utilizó la ADN polimerasa Taq platinum (*Invitrogen*), dNTPS (0,2 mM), cebadores (0,4 µM), y el colorante SYBR Green (1,96 µM) para realizar la qPCR en un termociclador Stratagene Mx3005p. El ciclado para la amplificación fue el siguiente: 1 ciclo de 10 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a la temperatura de *annealing* de los cebadores (T<sub>m</sub>) que depende de la composición de bases de los cebadores y 60 seg a 72°C; Posteriormente se utilizó un ciclo de 10 min a 72°C para completar la extensión de los amplicones. Finalmente, para evaluar la curva de disociación correspondiente a cada amplicon al terminar la reacción de PCR



se aumentó la temperatura de forma gradual de a 2°C, desde 60°C hasta 95°C y se midió fluorescencia cada 15 seg. Los niveles de ARNm no fueron cuantificados de manera absoluta. En todos los casos los niveles de expresión fueron relativizados a los genes de Actina y de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Para el análisis de los datos se aplicó el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Todos los ensayos se repitieron al menos 2 veces y cada muestra fue analizada por triplicado o cuadruplicado. Los nombres y las secuencias de los genes analizados se detallan en la siguiente tabla:

Gen	Secuencia sentido (5'-3')	Secuencia anti-sentido (5'-3')
<i>actina</i>	CCTTCTGACCCATTCCCACC	CACTGTTCGAGTCGCGTCC
<i>arginasa 1</i>	CAGAAGAATGGAAGAGTCAG	CAGATATGCAGGGAGTCACC
<i>f4/80</i>	CTGTAACCGGATGGCAAACCT	CTGTACCCACATGGCTGATG
<i>gapdh</i>	CATCTCTGCCCTCTGCTG	GCCTGCTTCACCACCTTCTTG
<i>iNOS</i>	AAGATGGCCTGGAGGAATGC	TGCTGTGCTACAGTTCCGAG
<i>ip-10</i>	CTGAGTGGGACTCAAGGGAT	AGGCTCGCAGGGATGATTTT
<i>tsp-1</i>	ATACAGATGGCGTCTCAGCC	GAACAGGCCTAGTCTACCGC

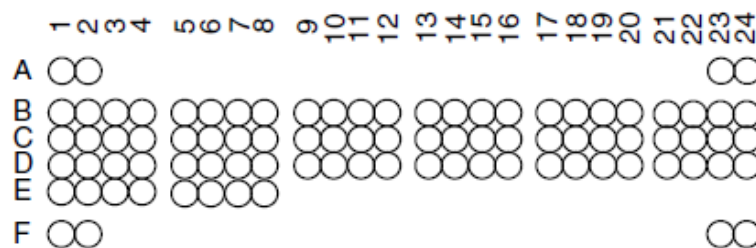
**Tabla1. Listado de cebadores.** La tabla muestra el listado de los cebadores utilizados. Se analizaron los genes de arginasa 1, óxido nítrico sintasa inducible (*iNOS*), y el receptor de manosa de los macrófagos (*f4/80*), proteína inducida por interferón 10 (*IP-10*), trombospondin-1 (*tsp-1*) los mismos fueron relativizados a los genes de actina y de la enzima glucolítica, gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (*gapdh*).

#### Microarreglo de citoquinas de suero y retina

Se tomaron muestras de sangre por punción de la arteria ocular de cada animal a la semana 8 antes del sacrificio. La sangre fue incubada por 10 minutos a 30°C para permitir la coagulación. Se centrifugó durante 15 minutos a 1.200 r.p.m. y se extrajo la fase superior (suero) y se incubó a -20°C hasta su utilización. De cada grupo experimental se generó un *pool* de sueros que constó de 8 animales por grupo. Los *pool*es de suero fueron generados a partir de 70  $\mu$ l de suero por

animal. Para los *pool*es de retina, se procedió de la siguiente manera: se extrajeron siete retinas de cada grupo experimental e incubaron con medio RIPA (cloruro de sodio 150 mM 1,0%, Triton X-100 0,5%, deoxicolato sódico, 0,1% SDS, 50 mM Tris, pH 8,0) y un inhibidor de proteasas (*Sigma Aldrich* #: P2714-1BTL). Los extractos se lisaron en rondas de congelación a -80 ° C y descongelación, y se centrifugaron a 15.000 r.p.m., se recuperó el sobrenadante listo para su uso o se conservó a -20°C hasta su utilización. El microarreglo utilizado consto de un kit (R&D cat #: ARY006) para evaluar los niveles de 40 citoquinas en las muestras de interés. El protocolo utilizado fue seguido según las instrucciones del fabricante. A continuación se describe el procedimiento, se utilizó una única membrana conjugada en un microarreglo a anticuerpos contra 40 citoquinas por grupo de tratamiento. Las membranas se bloquearon con 2 ml del medio de bloqueo durante 1 hr a temperatura ambiente. Se incubaron los microarreglos con los *pool*es de suero o de extracto de retina de cada grupo experimental durante 16hs a 4°C. Se lavaron las membranas 3 veces durante 5 minutos cada vez. Se incubaron las membranas con un coctel de anticuerpos de detección en una dilución 1:100. Luego de los lavados se incubó durante 30 minutos cada membrana con 2 ml del conjugado estreptavidina-HRP en una dilución 1:200. Se lavaron las membranas 3 veces por 5 minutos y se incubó 1 minuto con 1 ml del sustrato *chemireagent mixen* una dilución 1:10.000. Todas las diluciones se realizaron en buffer del microarreglo excepto por el coctel de anticuerpos de detección que fue resuspendido previamente en agua destilada. Finalmente, la intensidad de fluorescencia se visualizó usando el sistema de detección de quimioluminiscencia (ECL, *Amersham Hyperfilm™*, GE, *Healthcare life sciences*, cat #:28906836, *ArlingtonHeights*, IL, EE.UU.) a partir de placas

radiográficas de 18 x 24 cm. La intensidad de cada *spot* en las placas radiográficas se midió utilizando el *software ImageJ*. La intensidad media de los *spots* se promedió y se realizó una tabla indicando la variación del cambio en los grupos control tratado y diabético vs. el grupo control, y diabético vs. diabético tratado con AAT (Tabla 2). A continuación se muestra un esquema (Figura 7) del microarreglo donde se especifica en que posición se encuentran los anticuerpos para las distintas citoquinas y una tabla de referencia que indica las distintas posiciones (tabla 1).



**Figura 7. Microarreglo de citoquinas.** Se observa en el gráfico el ordenamiento de las citoquinas en la membrana de nitrocelulosa. Los sitios donde se encuentran conjugados a la membrana los anticuerpos para cada citoquina se esquematizan con un círculo (*spots*). Para cada citoquina corresponden 2 *spots*.

Citoquina	Posición	Citoquina	Posición
Spot de referencia	A1, A2	IL-16	C17, C18
Spot de referencia	A23, A24	IL-17	C19, C20
BLC/CXCL13/BCA-1	B1, B2	IL-23	C21, C22
c5/c5a	B3, B4	IL-27	C23, C24
G-CSF	B5, B6	IP-10/cxcl10	D1, D2
GM-CSF	B7, B8	I-TAC/CXCL11	D3, D4
I-309/CCL1/TCA3	B9, B10	KC/CXCL1	D5, D6
Eotaxin/CCL11	B11, B12	M-CSF	D7, D8
sICAM-1/cd54	B13, B14	MCP-1 /CCL2/JE	D9, D10
INF- $\gamma$	B15, B16	MCP-5/CCL12	D11, D12
IL-1 $\alpha$	B17, B18	MIG/CXCL9	D13, D14
IL-1 $\beta$	B19, B20	MIP-1 $\alpha$ /CCL3	D15, D16
IL-1ra	B21, B22	MIP-1 $\beta$ /CCL4	D17, D18
IL-2	B23, B24	MIP-2/CXCL2	D19, D20

IL-3	C1, C2	RANTES/CCL5	D21, D22
IL-4	C3, C4	SDF-1 / CXCL12	D23, D24
IL-5	C5, C6	TARC / CCL17	E1, E2
IL-6	C7, C8	TIMP-1	E3, E4
IL-7	C9, C10	TNF- $\alpha$	E5, E6
IL-10	C11, C12	TREM-1	E7, E8
IL-13	C13, C14	Spot de referencia	F1, F2
IL-12 p70	C15, C16	Control negativo	F23, F24

**Tabla 2. Listado de citoquinas del microarreglo.** La siguiente tabla muestra el listado completo de todas las citoquinas evaluadas. Cada citoquina tiene asignado una letra y un número que corresponde a la ubicación en el microarreglo como se detalla en la figura anterior.

#### Determinación de niveles de TNF- $\alpha$ en el suero y en la retina de animales mediante *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA)

Se anestesiaron a los animales con hidrato cloral al 10% en solución fisiológica (NaCl 0.9%, 9 g/L), y se realizó la eutanasia mediante dislocación según el protocolo aprobado por el CICUAL. Inmediatamente después se enucleo el globo ocular y se realizó una extracción quirúrgica de la retina. Se disgregaron mecánicamente las retinas en *radioimmunoprecipitation buffer* RIPA (Cloruro de sodio 150 mM 1.0%, Triton X-100 0.5%, Deoxicolato de sodio, duodecil sulfato de sodio SDS 0.1%, 50 mM Tris, pH 8.0) con inhibidor de proteasas (*Sigma Aldrich* cat #:P2714-1BTL). Se centrifugaron las muestras a 15.000 r.p.m. durante 10 minutos y se midieron los niveles de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes mediante ELISA. Para medir los niveles de TNF- $\alpha$  en suero se extrajo sangre del animal previo al sacrificio. La sangre se incubó 30 minutos a 37°C y se centrifugó 10 minutos a 1.000 r.p.m. para separar el suero del resto de la sangre. Las placas de ELISA fueron incubadas con 100  $\mu$ l por pocillo del anticuerpo de captura en una dilución 1:200 en buffer de captura durante 16hs a temperatura ambiente. Al día siguiente se lavo con buffer de lavado 3 veces durante 5

minutos. Se incubo la placa durante 1 hr a temperatura ambiente con 100  $\mu$ l del anticuerpo de detección en una dilución de 1:100. Se lavo con buffer de lavado por 3 veces durante 5 minutos. Se incubo con 50  $\mu$ l del conjugado estreptoavidina-HRP durante 10 minutos y se detuvo la reacción con 25  $\mu$ l de solución de *stop* (0.16 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). En todos los casos se siguieron los protocolos de acuerdo a las especificaciones de los fabricantes. Las determinaciones se hicieron por triplicado al menos dos veces.

#### Control de pesos, consumo de agua, glucemias

Se realizó un monitoreo semanal de la glucemia, el peso y el consumo de agua de los grupos experimentales. El consumo de agua se cuantifico como el valor del consumo total por caja. Dicho valor se relativizo por animal en cada grupo. Las glucemias basales (14-16 horas de ayuno) fueron tomadas en cada animal semanalmente. Las mismas se realizaron con una gota de sangre colectada por la vena de la cola. Se utilizaron bandas reactivas del kit *ONE TOUCH ULTRA* (Johnson&Johnson®) y se siguió el protocolo del fabricante. Durante el tratamiento los animales tuvieron acceso a comida y agua libremente.

### ***Experimentos in vitro***

#### Líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares de macrófagos Raw 264.1 y J774.2, y una línea de células endoteliales microvasculares humanas (Hmec-1). La línea celular Raw 264.1 fue establecida a partir de ascitis generada por un tumor inducido en un ratón macho por inyección IP de virus de la leucemia de Abselon (A-MuLV). La línea celular J774.2 fue establecida a partir de un tumor de un ratón hembra BALB/C. Las 3 líneas celulares se utilizaron para ensayos de migración *in vitro*.

Raw 264.1 y J774.2 fueron cultivadas en RPMI (sus siglas provienen de *Roswell Park Memorial Institute*, donde fue desarrollado) mientras que la línea Hmec-1 fue cultivada en *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (*Sigma Aldrich* cat #: D8062). Ambos medios de cultivo RPMI y DMEM, fueron suplementados con suero fetal bovino (SFB) al 10% (%v/v) (inactivado a 60°C durante 1 hr), 2 mM glutamina, 100 µg/ml estreptomicina y 100 UI/ml penicilina. Las 3 líneas celulares fueron crecidas en condiciones estándar de cultivo: estufa gaseada con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C.

#### Cultivo celular primario de células de Müller

Para el cultivo celular primario de células gliales se extrajeron retinas de ratones c57bl6j de 4 semanas (n=8) que fueron incubadas en una solución de tripsina (1%) y colagenasa (0.1%) en buffer Hank's (8g/L NaCl, 0,4g/L KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>60mg/L, 1 g/L glucosa, 48 mg/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 98 mg/L MgSO<sub>4</sub>, 140 mg/ml CaCl<sub>2</sub>, 350 mg/L NaHCO<sub>3</sub>) durante 30 minutos en estufa gaseada con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a 37°C. Luego se disgrego el tejido en forma mecánica con pipeta. Las células de Müller son capaces de soportar dichas concentraciones de tripsina y colagenasa mientras que el resto de las células presentes en el disgregado no. Se inactivó la acción de las enzimas con DMEM suplementado con SFB. Se centrifugó el disgregado y se re-suspendió en medio DMEM suplementado con SFB al 20%, fueron mantenidas en el mismo medio durante 4 días en estufa gaseada. Luego se extrajo el medio de cultivo y se lavaron las células con buffer fosfato salino (PBS) pH 7,4. El medio de cultivo posee células muertas en suspensión que son removidas, mientras que las células de Müller al ser adherentes se encuentran en la superficie de la placa de cultivo. Finalmente las células fueron mantenidas en condiciones estándar de

cultivo, utilizando DMEM al 10% con SFB durante 2 semanas. Las células fueron utilizadas en pasajes 2 y 3.

#### Caracterización de células de Müller de ratón

Las características fenotípica de las células de Müller fueron determinadas mediante inmunofluorescencia indirecta. La caracterización se realizó utilizando los anticuerpos anti-ratón específicos de: la proteína de unión a retinaldehído (Cralbp) y la proteína Vimentina. Las células fueron crecidas en vidrios de diámetro 10 mm hasta convergencia. Luego fueron fijadas con paraformaldehído al 4% frío durante 10 minutos. Se bloqueó con una solución de PBS con SFB al 3% durante 1 hr. Se incubó con los anticuerpos específicos para cada proteína durante 1 hr 30 min. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos cada uno. Luego se incubó con el anticuerpo secundario en oscuridad durante 1 hr. Las incubaciones de los anticuerpos primario y secundario fueron todas a temperatura ambiente. Las concentraciones finales utilizadas para cada anticuerpo fueron de 1 µg/µl, y los mismos fueron diluidos en PBS con SFB al 1%. Los volúmenes finales utilizados para cada anticuerpo fueron de 200 µl. Los vidrios con las células fueron observados en un microscopio de Epi fluorescencia Nikon Eclipse E-800 y se obtuvieron fotos a 10x, 20x y 40x.

#### Detección de especies reactivas del oxígeno utilizando el reactivo diclorofluoresceína.

Se sembraron  $1 \times 10^4$  células de Müller por pocillo en una placa de 96 pocillos. Las células se trataron con diferentes concentraciones de glucosa, 30, 50 y 100 mM durante 16 hs. Para la estimación de ROS intracelular, el sobrenadante de cada pocillo se sustituye por DCFH-DA (100 µM) (Sigma Aldrich cat #: 35848) y se incuba durante 1 h. DCFH-DA es una sustancia no fluorescente permeable a

las células que experimenta oxidación intracelular en presencia de ROS a la diclorofluoresceína (DCFC) que es altamente fluorescente. Los pocillos se lavan a continuación con solución salina o PBS. Las células se levantan con rastrillo y el porcentaje de células fluorescentes en suspensión se mide mediante citometría de flujo. La DCFC posee un espectro de excitación a 504 nm y un espectro de emisión a 529 nm.

#### Preparación de alfa 1 anti-tripsina humana

Trypsan® (Laboratorio Grifols, Barcelona, España) es la marca comercial de un liofilizado de AAT. La purificación de AAT (en sus distintas versiones comerciales) y el posterior liofilizado se obtiene a partir de cromatografías de afinidad de sangre periférica de donantes sanos (sin deficiencia de AAT). La administración de Trypsan está indicada en el tratamiento de sustitución crónica en cierto tipo de pacientes con déficit congénito de AAT con enfisema pulmonar clínicamente demostrable. Dicho liofilizado se reconstituyó en agua inyectable estéril libre de pirógenos a una concentración de 20 mg/ml. Dicha proteína se administró inmediatamente después de ser reconstituida, vía IP, en ratones diabéticos y ratones sanos de acuerdo al protocolo de tratamiento.

#### Ensayo de formación de puntos de quiebre (*branching points*)

Para el ensayo de formación de puntos de quiebre, células endoteliales microvasculares humanas (Hmec-1) fueron sembradas en matriz gel (*Thermo Fisher*, cat #: A14609-01). El ensayo se llevó a cabo según las recomendaciones del fabricante, se sembraron  $5 \times 10^3$  células en un pocillo de una placa de 96 en ausencia de VEGF. Las células fueron previamente incubadas durante 16 hs en DMEN sin suplementar y con una concentración de 4.5 mg/ml de AAT. Se tomaron fotos en un microscopio invertido a 20x en 3 campos. Luego se



contaron los puntos de quiebre y el valor promedio en cada condición se comparó utilizando el programa *GraphPad Prism5* para determinar diferencias significativas.

#### Ensayo de viabilidad celular sobre Hmec-1 y sobre el cultivo primario de células de Müller

Se sembraron  $1 \times 10^3$  células Hmec-1 en las mismas condiciones utilizadas en el ensayo de formación de puntos de quiebre. Las células se incubaron 24 horas en DMEM en ausencia de SFB y con una concentración de 1.5 y 3 mg/ml de AAT. Luego se agregó 10  $\mu$ l del reactivo *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (MTT, *Sigma Aldrich* cat#: M-5655) a una concentración de 5 mg/ml en PBS y se incubó por 4 horas en estufa a 37°C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Se detuvo la reacción agregando 150  $\mu$ l de una solución de isopropanol/HCl 0.04 N (200  $\mu$ l de HCl 10N en 50ml de Isopropanol), y se resuspendió hasta homogeneizar. Luego se midió en el espectrofotómetro a 550 nm con corrección a 630 nm. El ensayo se repitió con el cultivo primario de células de Müller pero las condiciones para este tipo celular fueron las siguientes: se incubaron  $1 \times 10^3$  células 24 hs en 30, 50 y 100 mM de glucosa y con 1.5 y 3 mg/ml de AAT y para medir viabilidad se siguió el mismo procedimiento utilizado para las células Hmec-1.

#### Ensayos de migración *in vitro*

Los ensayos de migración se realizaron en una cámara de Boyden de 48 pocillos (Neuroprobe, Inc). Las células Raw 264.1, J774.2 o Hmec-1 ( $1.2 \times 10^3$  células/well) fueron sembradas en la cámara superior. En la cámara inferior se utilizó como quimio-atractivo diluciones 1, 1:10, 1:100 de SFB y DMEM como control. El sistema fue incubado durante 4 horas a 37°C en una atmósfera

húmeda con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células que se encontraban pegadas en la superficie inferior de la membrana fueron fijadas en para-formaldehído al 2% durante 5 minutos. Se tiñeron las células con *4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride* (DAPI, *Sigma-Aldrich* cat#:D9542) y se contaron en un microscopio de Epi-fluorescencia a 40x (Nikon, Eclipse E-800). Se capturaron imágenes de 3 campos y el conteo de núcleos se realizó con el programa *Image J®*. El valor promedio del número de células por campo fue calculado y se utilizó el programa *GraphPad Prism5* para determinar diferencias significativas entre los distintos grupos.

#### Ensayo de co-inmunoprecipitación seguido de espectrometría de masas

Las células endoteliales humanas (Hmec-1) fueron cultivadas en monocapa hasta alcanzar un 80-90% de confluencia en una placa de 100 mm y fueron incubadas con AAT durante 16 hs en medio DMEM libre de SFB. Se recuperó el sobrenadante y a las células se les agregó 3 ml de buffer RIPA frío y se realizó una lisis mecánica con la micropipeta. Se centrifugó a 10.000 r.p.m. y se descartó el pellet. El sobrenadante se pretrató con el reactivo proteína A/G plus (sc-2003 Santa Cruz *Biotechnology*, California, US) durante 1 hora en rotación. Luego se centrifugó y se recuperó el sobrenadante. Este paso se realizó para eliminar las interacciones inespecíficas con la proteína A/G plus. Luego el lisado se divide en 2 y se incuba con el anticuerpo específico para AAT (Abcam, Ab133642) y sin el anticuerpo, en rotación durante 16hs a 4°C. Se agregan 20 µl de proteína A/G plus y se incuba durante 1 hora 30 minutos y se centrifuga a 2.500 r.p.m. Se descartan los sobrenadantes y los pellets se lavan con buffer RIPA por 3 veces mediante pasos de centrifugación a 2.500 r.p.m. Luego del último lavado los pellets se re suspenden en buffer de siembra (200 mM Tris-Cl

(pH 6.8) 400 mM DTT, 8% duodecilsulfato de sodio, 0.4% azul de bromofenol, 40% glicerol) y las muestras se calientan a 100°C durante 5 minutos. Los lisados se siembran en distintas calles en un gel de poliacrilamida AL 12.5%. Finalmente los geles se tiñen con una suspensión de *Coomassie blue* coloidal libre de contaminantes. Las calles se cortan y se analizan por espectrometría de masas.

#### Protocolo de tinción del gel de poliacrilamida

Se fijan las proteínas con solución fijadora (30% v/v de etanol y 2% de ácido fosfórico), se lava el gel con agua destilada por 3 veces durante 30 minutos. Los geles se incuban en la solución de tinción (18% metanol, 17% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% de ácido fosfórico) en agitación durante 1 hr. Se agrega 0,5g/L de *Coomassie blue* G-250 en polvo en la solución de tinción. Se deja en agitación durante 1 día.

#### Tratamiento de la muestra para el análisis por espectrometría de masas

Luego de la tinción las calles del gel son cortadas con bisturí por separado. Cada calle del gel fue cortada nuevamente en 5 pedazos. Cada porción fue reducida con DTT 20 mM durante 45 minutos a 56°C y alquilada con iodoacetamida 20 mM durante 45 minutos en oscuridad. Se digirió con tripsina (corta a la derecha de Lys y Arg) durante toda la noche. Se realizó la extracción de los péptidos con acetonitrilo, y se juntaron los péptidos de las 5 fracciones de cada calle, volviéndose a convertir en 4 muestras. Las muestras fueron liofilizadas por *Speed Vac* y vueltas a re-suspender con 10 ul de Ácido Fórmico 0,1%. Se analizó por nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap, lo que nos permite en primer lugar una separación de los péptidos obtenidos por digestión trípica de la muestra y una posterior identificación de los mismos. La ionización de las muestras se realiza por *electrospray*. El análisis de los datos obtenidos se realiza con el programa *ProteomeDiscoverer*.

### Análisis de la expresión por IFI de AAT en Hmec-1

El análisis de la expresión de AAT en las células Hmec-1 se llevo a cabo mediante IFI. Se utilizó el anticuerpo anti-AAT generado en cabra con especificidad para humano, rata y ratón (Abcam, cat #: Ab 7635). El protocolo de IFI fue el mismo que se utilizó para la caracterización de las células de Müller de ratón. Se obtuvieron imágenes a 20x y 40x.

### ***Análisis estadístico***

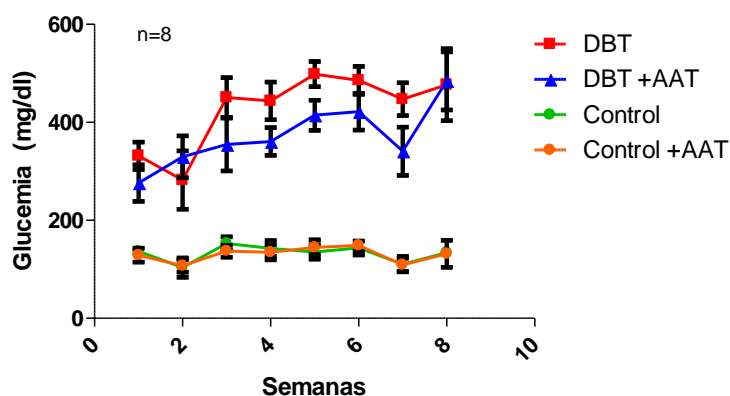
Los resultados de los animales tratados fueron comparados con diabéticos y controles utilizando análisis estadístico, como ANOVA de una o 2 vías seguido de post-test de acuerdo a la variable en cuestión o T-test de Student o Mann-Whitney test. Los valores fueron analizados y aquellos con  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos. Para todos los análisis estadísticos se utilizo el programa *GraphPad Prism 5.0*<sup>®</sup>.

## **RESULTADOS**

## Generación del modelo animal de diabetes

### Niveles de glucemia durante 8 semanas de tratamiento

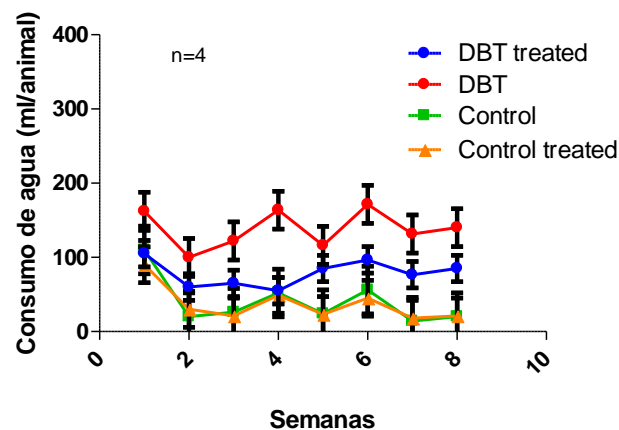
Con el fin de validar el modelo de diabetes tipo 1 se evaluaron semanalmente los niveles de glucosa en sangre de los distintos grupos experimentales durante todo el tratamiento. Los animales control mostraron niveles de  $(134 \pm 19)$  mg/dl, los control tratados con AAT  $(131 \pm 25)$  mg/dl, los diabéticos  $(417 \pm 85)$  mg/dl, y los diabéticos tratados con AAT  $(371 \pm 98)$  mg/dl. Los niveles de glucemia fueron mayores en ambos grupos diabéticos respecto a los controles durante todo el tratamiento ( $p < 0.009$ ). Se observó una tendencia a la disminución de la glucemia en el grupo diabético tratado con AAT respecto al diabético sin tratar pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (línea azul vs. roja). Tampoco se encontraron diferencias en la glucemia entre los grupos control y control tratado con AAT (Figura 9).



**Figura 9. Control de la glucemia.** Se midieron semanalmente los niveles de glucemia con ayunas de 16 horas en cada grupo experimental, ratones controles (Control), Control tratados (Control +AAT) y diabéticos (DBT), diabéticos tratados (DBT +AAT); no se encontraron diferencias significativas entre los grupos diabéticos; DBT vs. DBT +AAT. ANOVA de 1 vía y un análisis post-test Kruskal- Wallis.

## Evaluación del consumo de agua

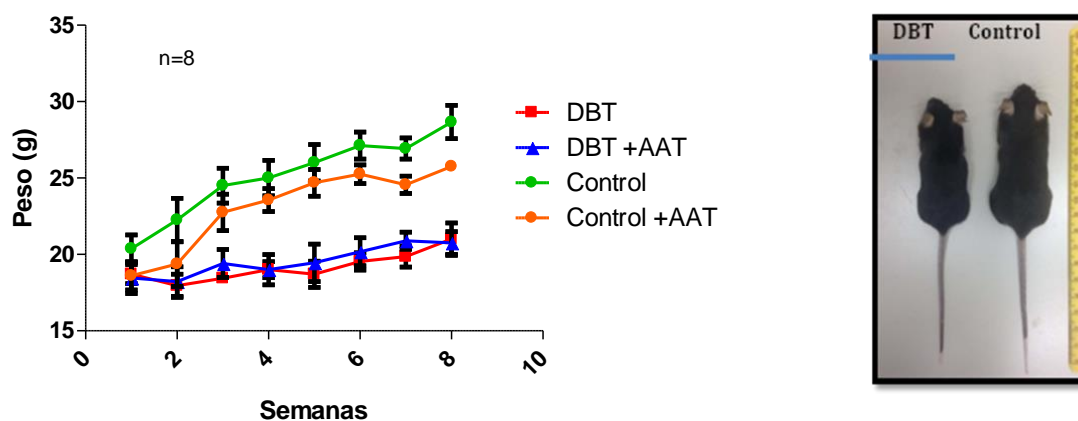
Un parámetro fisiológico que se ve alterado durante la diabetes y en el modelo utilizado es el consumo de agua. Por esta razón es que decidimos realizar el monitoreo durante todo el tratamiento. Según lo esperado el consumo promedio de agua se vio aumentado en los grupos diabéticos respecto de los grupos control. El consumo en los distintos grupos fue: grupo diabético ( $138 \pm 26$ ) ml/semana, el grupo diabético tratado ( $78 \pm 18$ ) ml/semana, el grupo control ( $40 \pm 32$ ) ml/semana y el grupo control tratado ( $32 \pm 27$ ) ml/semana por animal (Figura 10). Si bien hubo una tendencia a un menor consumo de agua en el grupo diabético tratado respecto del diabético, no fueron diferencias significativas.



**Figura 10. Consumo de agua.** Se midieron semanalmente los consumos de agua de cada grupo experimental, ratones controles (Control), control tratados (Control +AAT) y diabéticos (DBT), diabéticos tratados (DBT +AAT);  $p < 0.05$ ; vs. DBT

### Control del peso durante el tratamiento

Se ha establecido que en el modelo de diabetes utilizado en esta tesis los animales no ganan peso o lo hacen muy lentamente comparado con los animales sanos. Por esta razón es que decidimos llevar adelante el control de los pesos durante todo el tratamiento. De acuerdo a lo esperado los animales diabéticos no mostraron el normal incremento de peso en base a su edad durante el tratamiento. El grupo diabético mostro un peso promedio por animal de  $(18 \pm 2)$  g, el diabético tratado con AAT ( $19 \pm 3$ ) g, mientras que los controles ( $24 \pm 3$ ) g y los controles tratados con AAT ( $23 \pm 2$ ) g (Figura 11). A la semana 8 de tratamiento no hubo diferencias en los pesos de los animales diabéticos tratados respecto de los diabéticos sin tratar.



**Figura 11. Control de peso.** Se midieron semanalmente los pesos de cada animal en los distintos grupos (Control), Control tratados (Control +AAT) y diabéticos (DBT), diabéticos tratados (DBT +AAT); \*\* $p < 0.05$ ; \*\*vs. DBT; \* $p < 0.05$  vs DBT tratado

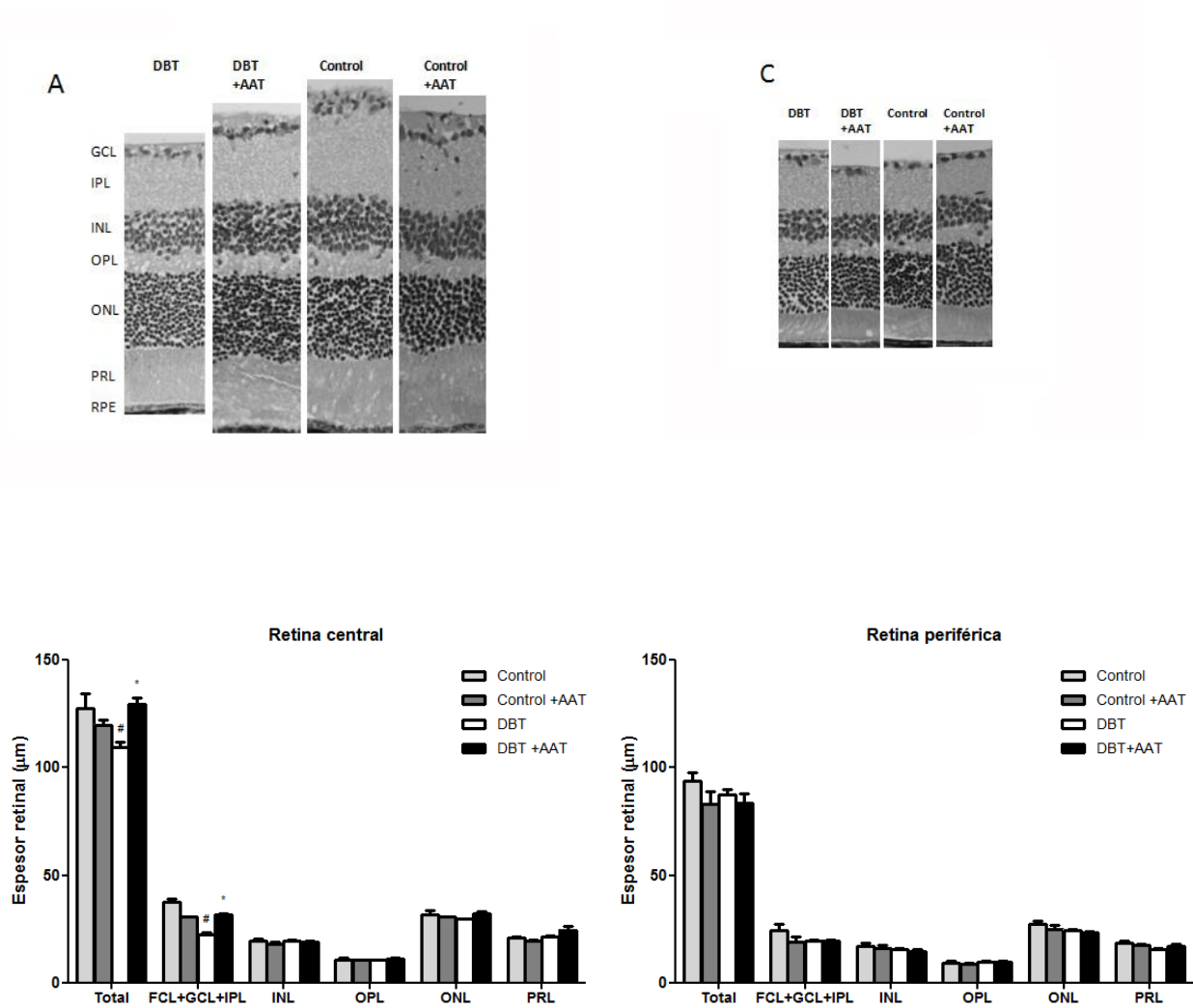


## Efecto de AAT en los cambios neurodegenerativos

La administración intraperitoneal de AAT disminuye el afinamiento retinal

Uno de los objetivos del presente trabajo de tesis fue evaluar si el tratamiento con AAT era capaz de reducir los daños estructurales que se observan en la retina en el modelo de diabetes en estudio. Los daños estructurales son principalmente neurodegenerativos con pérdida de células ganglionares. Por dicha razón, para estimar el daño neurodegenerativo y la posible protección al daño se realizaron mediciones del espesor de la retina central y la retina periférica. De acuerdo a lo esperado en la retina central el espesor retina total se encontró disminuido en los animales diabéticos:  $(115 \pm 8) \mu\text{m}$ . Llamativamente encontramos que en los ratones diabéticos que fueron tratados con AAT el espesor retinal total no se encontró disminuido:  $(138 \pm 7) \mu\text{m}$ . En este sentido, los animales diabéticos tratados tuvieron valores de espesor retinal cercanos a los grupos control cuyo espesor fue:  $(141 \pm 12) \mu\text{m}$  y control tratado con AAT:  $(133 \pm 8) \mu\text{m}$  (Figura 12A y 12B). Llevamos a cabo un análisis detallado de los espesores de las distintas capas de la retina y en particular las diferencias se encontraron en la capa de células ganglionares (GCL) y en la capa plexiforme interna (IPL) de la retina (figura 12A y 12B). En el análisis de la retina periférica no se encontraron cambios en el espesor total así como tampoco en las distintas capas de la retina (figura 12C y 12D). Por los datos encontrados podemos afirmar que los ratones diabéticos que fueron tratados con AAT presentaron una mejora en los cambios neurodegenerativos que ocurren en las etapas tempranas evaluadas en nuestro modelos animal de diabetes tipo 1. En la siguiente figura se observan las histologías de los distintos grupos animales y las

correspondientes cuantificaciones de la retina central y la retina periférica (Figura 12).



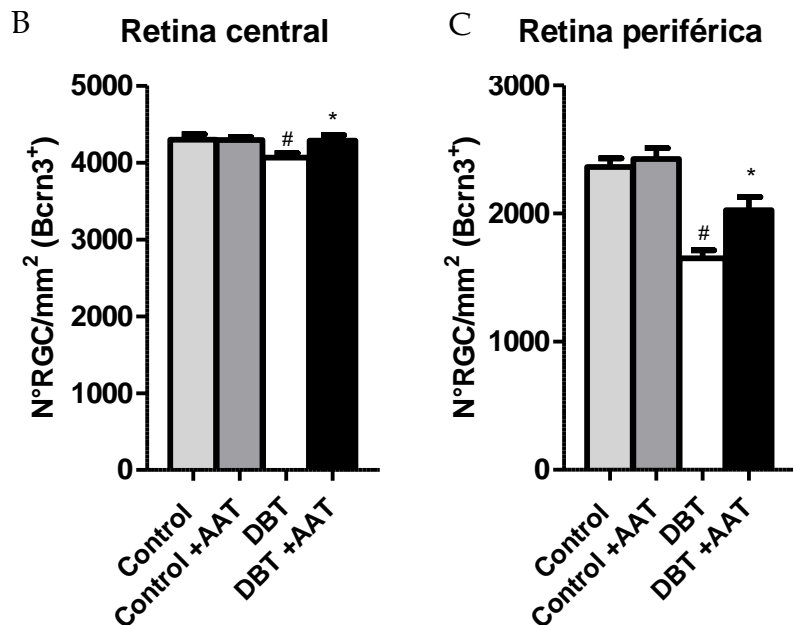
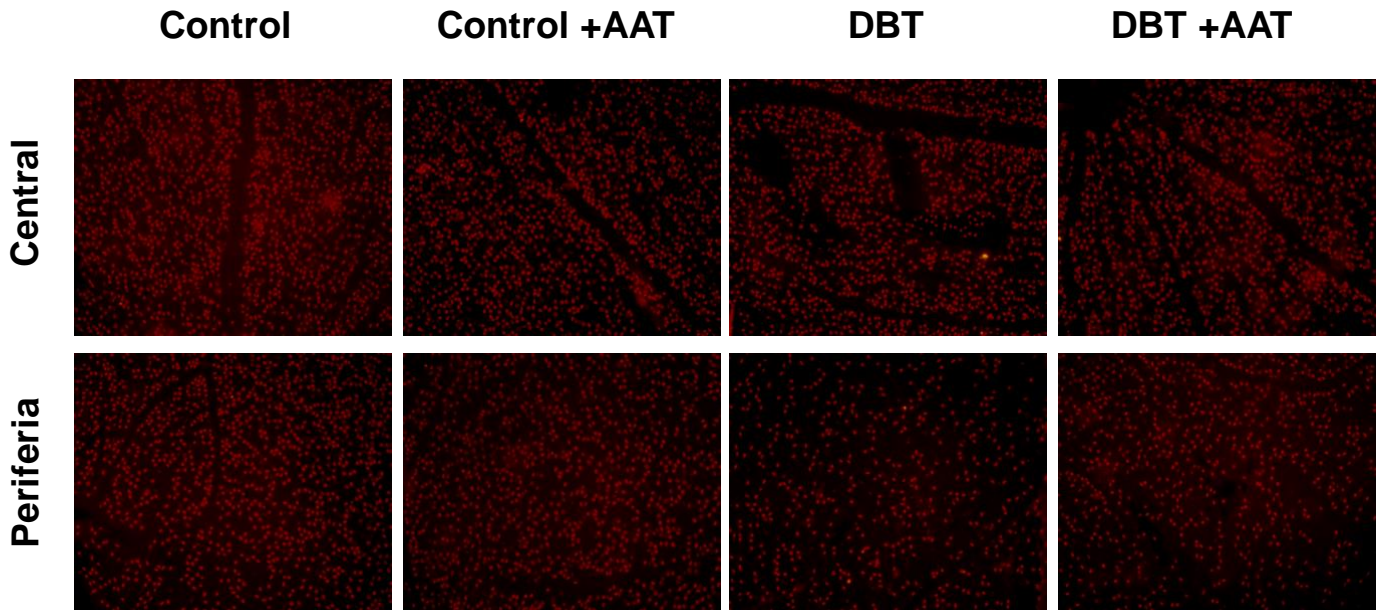
**Figura 12.** (A) Fotos representativas de las histologías de la retina central. (B) Cuantificación del espesor de la retina central. (C) Fotos representativas de la retina periférica. (D) Cuantificación de la retina periférica a retina central. FCL: capa de fibras; GCL: capa de células ganglionares; IPL: capa plexiforme interna; INL: capa nuclear interna; OPL: capa nuclear externa; PRL: capa de fotorreceptores. DBT: grupo diabético; DBT +AAT: grupo diabético tratado con alfa 1 anti-tripsina; control: grupo control sin tratar. # Control vs. DBT; \*DBT vs. DBT+AAT,  $p < 0.05$ ; ANOVA de 2 vías; Kruskal-Wallis test.

## Efecto de la administración de AAT sobre el número de células ganglionares de la retina

Otro parámetro que decidimos evaluar y que ha sido reportado como un cambio temprano en la retina en el modelo de diabetes en estudio es la pérdida de células ganglionares. Existen diversas maneras de realizar un conteo de las células ganglionares en la retina. Se puede realizar a partir de las tinciones de H&E de los cortes sagitales como en la figura 1, pero en muchos casos al realizar los cortes puede haber células amácrinas o de las distintas capas de la retina desplazadas y realizar un conteo erróneo. Otra manera de realizarlo es a partir de inmunofluorescencia el cual aumenta la especificidad. En este trabajo de tesis generamos *flatmounts* de retina, que son retinas en una configuración en flor. Sobre los *flatmounts* realizamos inmunofluorescencias de toda la retina para el factor de transcripción Brn3a. Como se mencionó el Brn3a es un factor de transcripción que se expresa en todas las células ganglionares de la retina y es un buen marcador para poder tener un conteo preciso de estas células. De acuerdo a lo observado en trabajos que se han publicado previamente (Chalam 2008, Bressler 2012) el conteo de células ganglionares tanto en la retina central como en la retina periférica mostró una disminución significativa en el grupo diabético respecto de los grupos control. Mientras que los diabéticos que fueron tratados con AAT mostraron una reducción de la pérdida en los niveles de células ganglionares en la retina central y en la retina periférica (Figura13). Los valores del número de células ganglionares en la retina central fueron los siguientes, grupo diabético:  $(4065 \pm 58)$  N°RGC/mm<sup>2</sup>, en el grupo diabético tratado:  $(4283 \pm 72)$  N°RGC/mm<sup>2</sup>, en el grupo control:  $(4299 \pm 70)$  N°RGC/mm<sup>2</sup>, y en el grupo control tratado con AAT:  $(4294 \pm 36)$  N°RGC/mm<sup>2</sup>. Mientras que el número de células ganglionares en la retina periférica fue, grupo diabético:

(1650 ± 65) N°RGC/mm<sup>2</sup>, grupo diabético tratado: (2025 ± 103) N°RGC/mm<sup>2</sup>, grupo control: (2362 ± 68) N°RGC/mm<sup>2</sup> y grupo control tratado: (2425 ± 85) N°RGC/mm<sup>2</sup>. En la siguiente figura se observan las inmunofluorescencias (Figura 13A) y las cuantificaciones de todos los grupos (Figura 13B y 13C).

A



**Figura 13.**Conteo de GC en retinas en flor (*flat-mounts*) en la retina. Se determino el número de células ganglionares de la retina a través del conteo de núcleos Brn3 positivos mediante inmunohistoquímica. (A) Fotos representativas de los 4 grupos experimentales; central: foto de la retina central; periférica: foto de la retina periférica. Cuantificación del número de células ganglionares (Bcrn3<sup>+</sup>) por mm<sup>2</sup> en la retina central (B) y en la retina periférica (C). Control sin tratar (Control), Control tratados (Control +AAT) y diabéticos (DBT), diabéticos tratados (DBT +AAT); # Control vs. DBT; \*DBT vs. DBT+AAT, p<0.05; ANOVA de 1 vía; Kruskal-Wallis test.

## Evaluación del efecto de AAT en el proceso inflamatorio

Medición de citoquinas y quemoquinas en suero y retina a través de un microarreglo

Para evaluar el estado inflamatorio, y conocer qué citoquinas y quemoquinas predominan en los animales diabéticos tratados con AAT, se utilizaron microarreglos de citoquinas y quemoquinas en membranas de nitrocelulosa. Se analizaron 40 citoquinas y quemoquinas en simultáneo a partir de muestras de suero y retina. En el suero, las siguientes 12 citoquinas se encontraron disminuidas: factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), molécula de adhesión intracelular-1 (sICAM-1), interleuquina-1 $\alpha$  (IL-1 $\alpha$ ), interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-7 (IL-7), interleuquina-17 (IL-17), interleuquina-27 (IL-27), interferon- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ), proteína inflamatoria de macrófagos 1 alfa (MIP-1 $\alpha$ /CCL3), monocito inducido por interferon gama (MIG/CXCL9), quimioattractante de células T inducible por interferon (I-TAC/CXCL11)(Tabla 1).

Solamente 3 citoquinas se encontraron aumentadas en los animales diabéticos que fueron tratados con AAT: quemoquina de motivo C-C ligando-1 (CCL-1), proteína inflamatoria de macrófagos alfa-2 (MIP-2- $\alpha$ /CXCL2), factor estimulante de granulocitos (G-CSF).

Mientras que 15 citoquinas no mostraron cambios en su expresión: proteína quimioattractante de monocitos-1 (MCP-1/CCL2), regula la activación de células T (RANTES/CCL5), quemoquina (motivo C-X-C) ligando-1 (CXCL-1), Proteína inducida por interferon gama-10 (IP-10/CXCL10), factor celular estromal 1 (SDF-1/CXCL12), quimioattractante para linfocitos B (BLC/CXCL13), receptor a de interleuquina-1 (IL-1ra), interleuquina-4 (IL-4), interleuquina-13 (IL-13),

interlequina-16 (IL-16), interlequina-23 (IL-23), precursor del complemento c5 (C5a), factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), Inhibidor de metaloproteinasas de tejido-1 (TIMP-1), Receptor-1 expresado en células mieloides (TREM-1).

Por último 10 citoquinas no fue posible detectarlas en el suero de animales tratados con AAT. En líneas generales las citoquinas proinflamatorias disminuyeron en el suero de los animales tratados con AAT. En particular, se observaron niveles disminuidos de citoquinas con un potente poder inflamatorio y como hemos señalado tienen un papel importante en el desarrollo de la RD, estas citoquinas fueron: IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  y sICAM-1. Por lo tanto, podemos inferir que AAT fue capaz de reducir el estado inflamatorio a nivel sistémico.

Cambio en el suero					
Citoquina	RefSeq	+AAT	DBT	DBT +AAT	Descripción
<b>Disminuidas</b>					
TNF- $\alpha$	NP_038721.1	-3.80	-1.30	-3.19	Potente proinflamatoria, secretada por macrófagos (M $\emptyset$ ). Activación endotelio.
sICAM-1	NP_034623.1	-1.88	1.00	-2.03	Participa en la respuesta inmune innata.
IL-1 $\alpha$	NP_034684.2	-4.18	-1.29	-8.57	Producida por M $\emptyset$ activados.
IL-1 $\beta$	NP_032387.1	-4.76	-5.33	-7.19	Potente citoquina proinflamatoria, induce el flujo de neutrófilos.
IL-3	NP_034686.2	-4.14	-3.73	-2.01	Induce granulocitos, M $\emptyset$ , mastocitos, eosinófilos.
IL-7	NP_001300817.1	-5.22	-4.30	-11.17	Factor de crecimiento hematopoyético.
IL-17	NP_034682.1	-7.79	-1.87	-20.09	Proinflamatoria. Producida por células T-activadas.
IL-27	NP_663611.1	-5.53	-2.75	-12.57	Pro-/antiinflamatoria. Suprime la producción de IL2, IL4, IL5 y IL6
IFN- $\gamma$	NP_032363.1	-5.14	-1.52	-3.79	Secretada por células T, NK, M $\emptyset$ y epiteliales.
CCL3	NP_035467.1	-6.23	-3.63	-6.44	Potente quemoquina para eosinófilos.
CXCL9	NP_032625.2	-5.94	-1.85	-2.54	Crecimiento, movimiento, activación en una rta inflamatoria.
CXCL11	NP_062367.1	-4.63	-1.77	-21.25	Quemotactica para monocitos, células T y neutrófilos.
<b>Aumentadas</b>					
CCL1	NP_035459.1	-2.79	-1.58	8.03	Secretada por células T activadas, tiene actividad quemotactica para monocitos.
CXCL2	NP_033166.1	-2.45	-1.79	3.60	Quemotactica para leucocitos polimorfonucleares humanos.
G-CSF	NP_034101.1	-3.08	-2.61	3.70	Producción y diferenciación de granulocitos y M $\emptyset$ .
<b>Sin cambios</b>					
CCL2	NP_035463.1	-1.58	-1.40	1.54	Actividad quemotactica para monocitos y células T de memoria.
CCL5	NP_038681.2	-2.09	1.26	-1.11	Quimioattractante de eosinófilos, monocitos, células T de memoria, B, NK y DCs.
CXCL1	NP_032202.1	-1.65	-1.07	-1.16	Responsable de reclutar neutrófilos.
CXCL10	NP_067249.1	-2.73	-1.29	1.22	Anti-angiogénica. Quimioattractante de células T activadas
CXCL12	NP_001012495.1	-1.56	1.11	-1.16	Inmunovigilancia, respuesta inflamatoria, homeostasis, y crecimiento tumor.
CXCL13	NP_061354.1	-2.18	-2.12	1.22	Unión a los receptores CXCR5 CXCR3 CCR10.
IL-1ra	NP_001116854.1	-2.28	-1.04	-1.08	Inhibe la actividad de IL-1 por unión al receptor IL1R1.
IL-4	NP_067258.1	-7.00	-4.11	-2.58	Activación de células B.
IL-13	NP_032381.1	-2.46	-1.93	-1.41	Inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, regula síntesis de INF- $\gamma$
IL-16	NP_034681.2	-2.20	-1.60	1.25	Estimula la migración de monocitos, CD4, y eosinófilos.
IL-23	NP_112542.1	-1.48	-3.68	-1.32	Asociada a IL-12b, promueve la producción de citoquinas inflamatorias.
c5/c5a	NP_034536.2	-2.75	-2.64	1.28	Sistema de complemento. Anafilotoxina, actividad quemotactica.
M-CSF	NP_001107001.1	-3.07	1.05	-1.46	Sobrevida, proliferación y diferenciación de M $\emptyset$ .
TIMP-1	NP_001037849.1	-2.00	-1.27	1.30	Inhibidor de MMP, regula la diferenciación, migración y muerte celular.
TREM-1	NP_001334328.1	-3.32	1.04	1.79	Citoquina multifuncional, proinflamatoria, pertenece a la familia de TNF- $\alpha$ .

**Tabla 3. Niveles de citoquinas y quemoquinas en suero.** Determinación mediante microarreglo los niveles de citoquinas y quemoquinas el suero de los distintos grupos. La tabla muestra la variación en el cambio (*fold change*) entre los grupos: control tratado con AAT (+AAT), diabéticos (DBT) y los diabéticos tratados con AAT (DBT +AAT). CCL: citoquinas con motivo Cisteina-Cisteina, CXC: citoquinas con motivo Cisteina-Aminoacido-Cisteina;

En el análisis de las muestras de retina por intermedio del microarreglo los niveles de citoquinas y quemoquinas en todos los casos fueron más bajos que los encontrados en el suero, con la excepción de sICAM que mostró niveles similares a los observados en el suero. Encontramos solamente IL-3 disminuida, mientras que 2 quemoquinas fueron halladas aumentadas: MIP-1a/CCL3 y RANTES/CCL5.

El resto de las citoquinas/quemoquinas detectadas no presentaron cambios en cuanto a su expresión en los animales diabéticos tratados vs los diabéticos sin tratar: CXCL2, MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10, I-TAC/CXCL11, SDF-1/CXCL12, CXCL13, IL-1ra, IL-4, IL-7, IL-13, IL-17, IL-27, C5/C5a, sICAM-1, IFN- $\gamma$ , M-CSF, TIMP-1, TREM-1. Las 21 citoquinas restantes no se detectaron en la retina (Tabla 2).



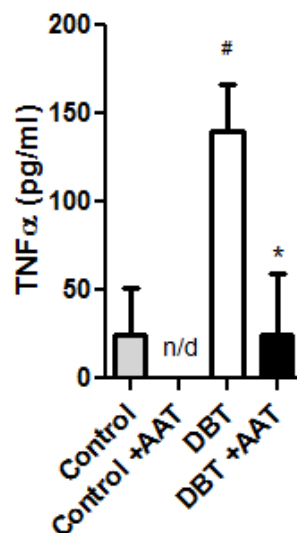
Cambio en la retina					
Chemokines	RefSeq	+AAT	DBT	DBT +AAT	Descripción
<b>Disminuidas</b>					
IL-3	NP_034686.2	1.12	12.30	-13.21	Induce granulocitos, MØ , mastocitos, eosinófilos.
<b>Aumentadas</b>					
CCL3	NP_035467.1	1.00	5.41	3.20	Potente actividad quimiotáctica para eosinófilos.
CCL5	NP_038681.2	1.00	2.38	3.14	Quimioattractante de eosinófilos, monocitos, T de memoria, B, NK y DCs.
<b>Sin cambios</b>					
CXCL2	NP_033166.1	-1.49	1.13	1.67	Quemotáctica para leucocitos polimorfonucleares humanos.
CXCL9	NP_032625.2	1.32	3.94	1.12	Afecta el crecimiento, movimiento y activación en una rta inflamatoria.
CXCL10	NP_067249.1	1.01	15.90	-8.84	Anti- angiogénica. Quimioattractante de células T activadas
CXCL11	NP_062367.1	1.04	5.10	-1.18	Quemotáctica para monocitos, células T y neutrófilos.
CXCL12	NP_001012495.1	1.71	2.41	-2.45	Inmunovigilancia, respuesta inflamatoria, homeostasis, y crecimiento tumor.
CXCL13	NP_061354.1	18.01	11.21	1.36	Unión a los receptores CXCR5 CXCR3 CCR10.
IL-1ra	NP_001116854.1	2.74	1.25	1.55	Inhibe la actividad de IL-1 por unión al receptor IL1R1.
IL-4	NP_067258.1	1.00	18.70	-1.41	Activación de células B.
IL-7	NP_001300817.1	1.74	2.70	-1.27	Factor de crecimiento hematopoyético.
IL-13	NP_032381.1	1.19	4.17	1.61	Inhibe la producción de citoquinas proinflamatorias, regula síntesis de INF-γ
IL-17	NP_034682.1	3.76	5.86	-1.91	Proinflamatoria. Producida por células T-activadas.
IL-27	NP_663611.1	1.41	3.09	-2.25	Pro-/antiinflamatoria. Suprime la producción de IL2, IL4, IL5 and IL6
c5/c5a	NP_034536.2	7.85	10.22	-1.44	Sistema de complemento. Anafilotoxina, actividad quemotáctica.
sICAM-1	NP_034623.1	1.31	1.60	1.26	Participa en la respuesta inmune innata.
IFN-γ	NP_032363.1	2.16	2.00	1.35	Secretada por células T, NK, macrófagos y epiteliales.
M-CSF	NP_001107001.1	2.85	5.74	-1.51	Sobrevida, proliferación y diferenciación de MØ.
TIMP-1	NP_001037849.1	-2.84	2.83	-1.52	Inhibidor de MMP, regula la diferenciación, migración y muerte celular.
TREM-1	NP_001334328.1	1.03	1.12	3.11	Citoquina multifuncional, proinflamatoria, pertenece a la familia de TNF-α.

**Tabla 4. Niveles de citoquinas y quemoquinas en la retina.** Determinación mediante microarreglo los niveles de citoquinas y quemoquinas la retina de los distintos grupos. La tabla muestra la variación en el cambio (*fold change*) entre los grupos: control tratado con AAT (+AAT), diabéticos (DBT) y los diabéticos tratados con AAT (DBT +AAT). CCL: citoquinas con motivo Cisteina-Cisteina, CXC: citoquinas con motivo Cisteina-Aminoácido-Cisteina;

#### Evaluación del efecto de AAT sobre los niveles de TNF-α en retina y en suero

Con el fin de corroborar los resultados obtenidos con el microarreglo en suero decidimos evaluar los niveles de TNF-α mediante ELISA. La medición se realizó al momento del sacrificio (semana 8 de tratamiento con AAT). En primer lugar, se vio que TNF-α estaba significativamente aumentado en los animales

diabéticos respecto del control ( $p < 0.01$ ). Llamativamente, los animales diabéticos que recibieron AAT presentaron una disminución en la concentración de TNF- $\alpha$  ( $p < 0.01$ ). De manera llamativa los controles tratados con AAT presentaron valores no detectables (n/d) mediante la sensibilidad del kit utilizado lo cual sugiere un efecto de AAT independiente de la condición de diabetes (Figura 14, se realizó un ANOVA de una vía y un test de Tukey's). La concentración de TNF- $\alpha$  en el grupo diabético fue ( $1092 \pm 89$ ) pg/ml, en el grupo diabético tratado ( $333 \pm 122$ ) pg/ml y en el grupo control ( $184 \pm 11$ ) pg/ml. No hubo diferencias significativas entre el grupo control y el diabético tratado. Es importante señalar que AAT fue capaz de restablecer los valores de TNF- $\alpha$  en los animales diabéticos a valores cercanos a los animales sanos.

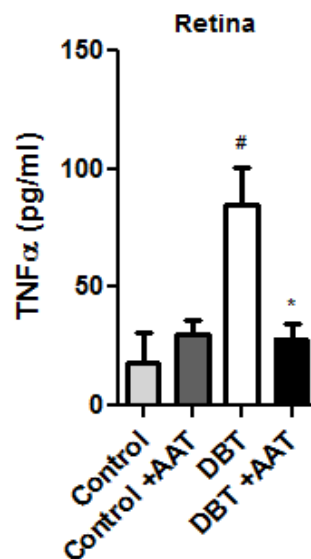


**Figura 14. Niveles de TNF- $\alpha$  en suero.** Determinación por ELISA de TNF- $\alpha$  en el suero de ratones controles (Control), Control tratados (Control +AAT) y diabéticos (DBT), diabéticos tratados (DBT +AAT); (#Control vs. DBT # $p < 0.01$ ; DBT vs. DBT +AAT \*\* $p < 0.01$ , ANOVA de 1 vía, Tukey's *post test*)

#### Niveles de TNF- en retina

Para determinar el efecto de AAT en los niveles de TNF- $\alpha$  en la retina realizamos un ELISA. La concentración de TNF- $\alpha$  encontrada en la retina fue menor que la hallada en suero en todos los grupos. El patrón observado fue

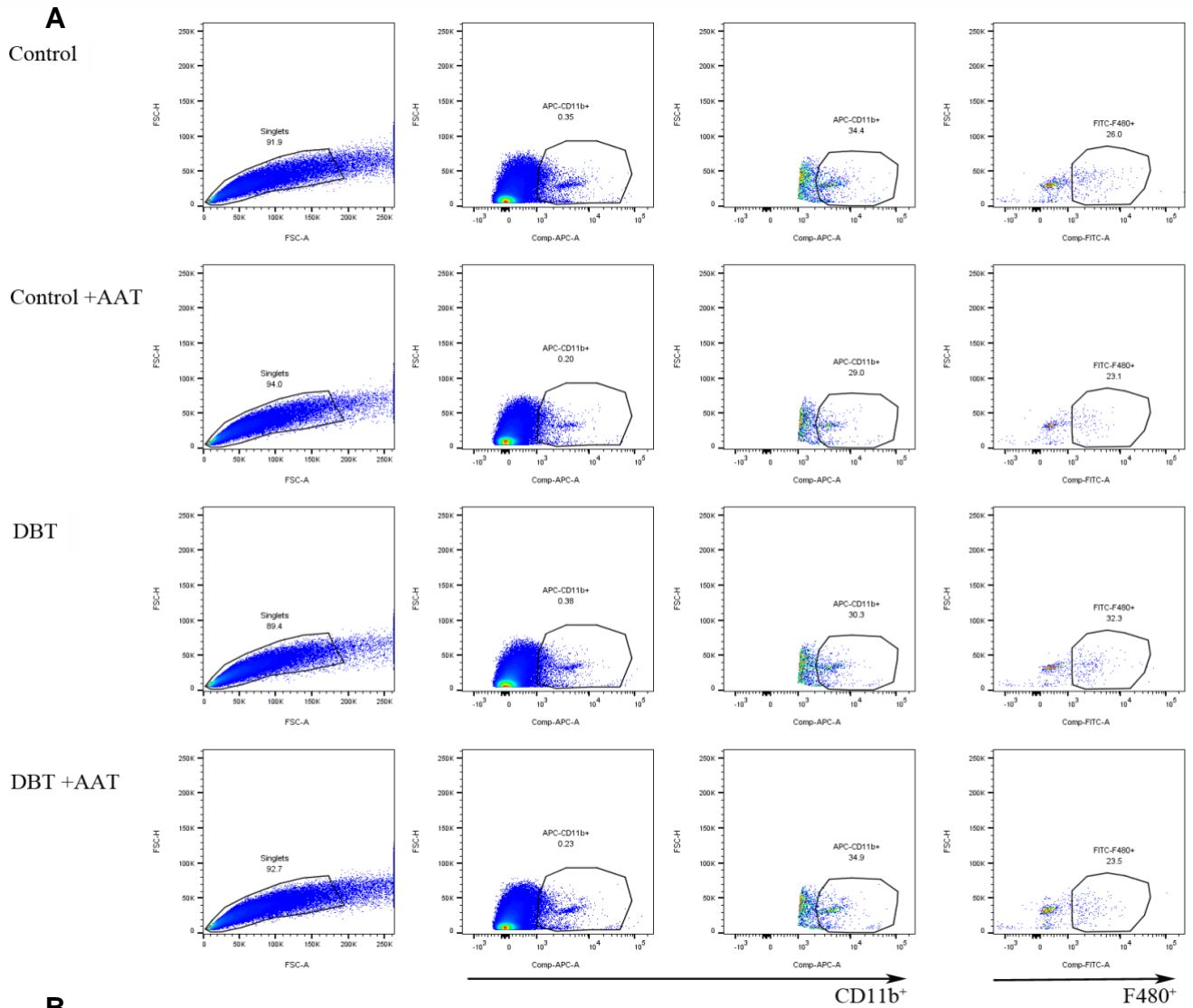
similar al encontrado en suero. Los animales diabéticos presentaron valores significativamente mayores al grupo control. Mientras que los niveles proteicos de TNF- $\alpha$  se encontraron disminuidos en la retina de los animales que fueron tratados con AAT respecto de los animales diabéticos. Grupo diabético tratado con AAT (64  $\pm$  16) pg/ml, el grupo diabético (355  $\pm$  72) pg/ml. Nuevamente los valores en el grupo de animales diabéticos tratados fueron comparables a los animales sanos (grupo control) (90  $\pm$  24) pg/ml (Figura 15). Se realizó un ANOVA de 1 vía y un test de Kruskal-Wallis.



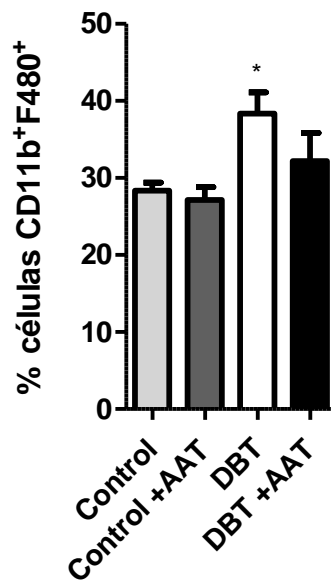
**Figura 15. Niveles de TNF- $\alpha$  en retina.** Determinación por ELISA de TNF- $\alpha$  en la retina de ratones controles (Control), Control tratados (Control +AAT) y diabéticos (DBT), diabéticos tratados (DBT +AAT). (#Control vs. DBT # $p$ <0.01; DBT vs. DBT +AAT \*\* $p$ <0.01, ANOVA de 1 vía, Kruskal-Wallis test)

### ***Efecto de AAT sobre el número de macrófagos/microglia en la retina***

El porcentaje de células doble positivas F4/80<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> mediante citometría de flujo se observó incrementado en el grupo diabético tratado con AAT respecto a los grupos control. No se encontraron diferencias significativas entre los grupos diabético y diabético tratado con AAT. Los restantes grupos no presentaron diferencias significativas entre ellos.



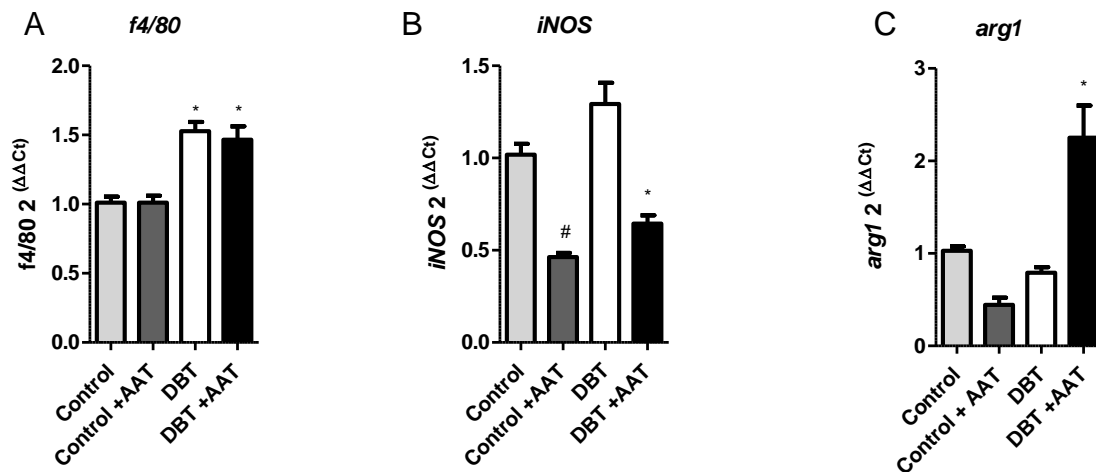
**B**



**Figura 16.** *Dotplots* representivos de las retinas de los 4 grupos experimentales (A); cuantificación del porcentaje de células F4/80<sup>+</sup> positivas incrementado en los animales diabéticos que fueron tratados con AAT (B). Control sin tratamiento (Control), Control tratados (Control +AAT) y diabéticos (DBT), diabéticos tratados (DBT +AAT); n= 4; \*p<0.05 \*vs DBT. *Single cell* corresponde al *gate* realizado sobre *dots* que fueron considerados 1 *dot* = 1 célula (FSH vs FSC). F4/80<sup>+</sup> corresponde al *gate* realizado sobre células que fueron positivas para ese marcador. (\*p<0.01; Control vs. DBT+AAT; ANOVA 1 vía, Tukey post test).

### Niveles de ARNm de *f4/80*, *iNOS* y *arginasa1*

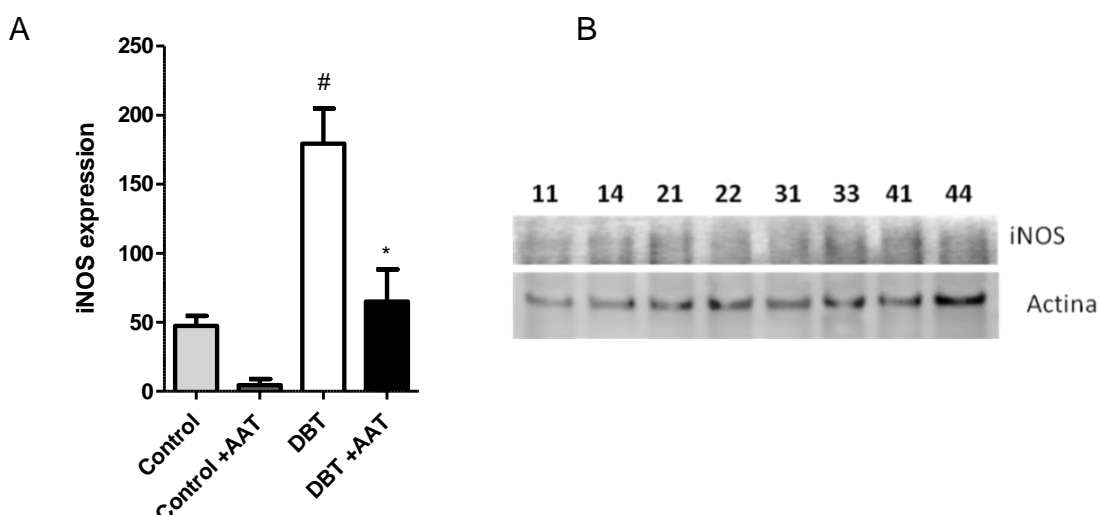
Se midieron los niveles de ARN mensajero (ARNm) del marcador de superficie de macrófagos *f4/80* y de las enzimas *iNOS* y *arg1* en toda la retina. Los niveles de ARNm de *f4/80* se encontraron aumentados en los grupos diabéticos ( $1.53 \pm 0.06$ ) y diabéticos tratados con AAT ( $1.46 \pm 0.09$ ) respecto de los grupos control (Figura 17A). Los niveles de *iNOS* fueron disminuidos en el grupo diabético tratado con AAT ( $0.64 \pm 0.04$ ) respecto del grupo diabético ( $1.29 \pm 0.11$ ), mientras que los niveles de *arg1* se encontraron aumentados en los animales diabéticos tratados con AAT ( $2.25 \pm 0.34$ ) respecto de los diabéticos ( $0.79 \pm 0.06$ ). De manera interesante, en los grupos control los niveles de ARNm de *iNOS* tuvieron la misma tendencia que aquella observada en los grupos diabéticos, encontrándose en el grupo control ( $1.01 \pm 0.05$ ) y control tratado con AAT ( $0.46 \pm 0.02$ ) sugiriendo un efecto independiente de la condición de diabetes (Figura 17).



**Figura 17.** Niveles de ARNm del marcador de superficie F4/80 de macrófagos (A)(\* $p < 0.01$ ; Control vs. DBT+AAT, control vs. DBT; ANOVA 1 vía, Tukey post test) y las enzimas *iNOS* (B)(\* $p < 0.01$ ; DBT vs. DBT+AAT, # $p < 0.01$  control vs. control +AAT; ANOVA 1 vía, Tukey post test) y *arg1* (C)(\* $p < 0.01$ ; DBT vs. DBT +AAT; ANOVA 1 vía, Tukey post test) mediante real time PCR. Control sin tratamiento (Control), Control tratado con AAT (Control +AAT), diabéticos (DBT) y diabéticos tratado con AAT (DBT +AAT);  $n = 4$ . Los genes evaluados fueron relativizados a los genes *gapdh* y *actina* que se utilizaron como controles de carga o *housekeeping*.

## Niveles proteicos de iNOS

Decidimos evaluar la expresión de iNOS por *westernblot* en extractos de retinas completos. Observamos aumentados los niveles proteicos de iNOS en los animales del grupo diabético mientras que los animales diabéticos tratados con AAT presentaban niveles similares al control (animales sanos) (Figura 18).

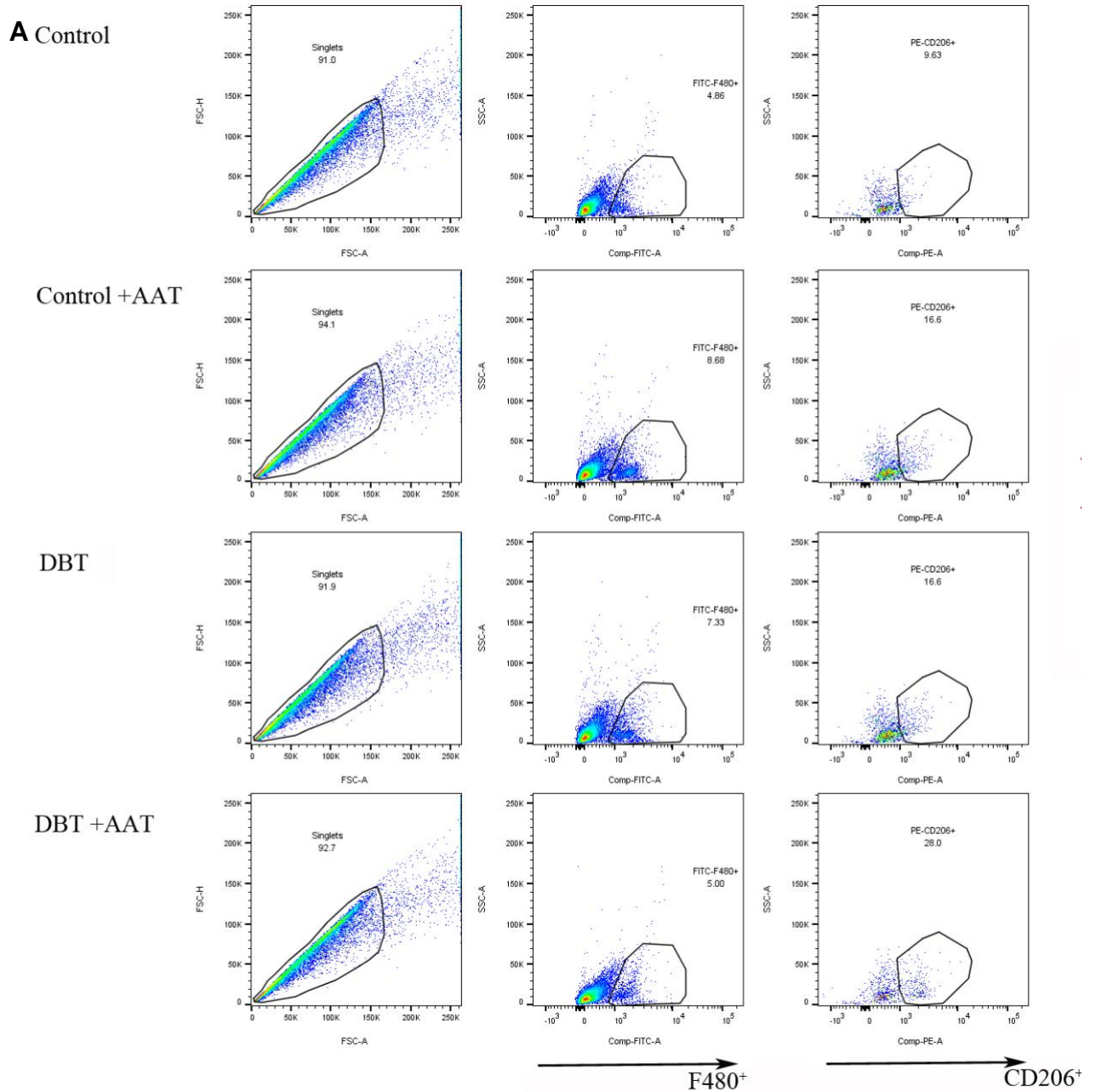


**Figura 18.** Niveles de proteína iNOS en la retina. (A) cuantificación de la intensidad de píxeles mediante gráfico de barras. (B) fotografía representativa del *dot blot* de 8 animales: 11 y 14 diabéticos tratados con AAT, 21 y 22 diabéticos, 31 y 33: controles, 41 y 44: controles tratados con AAT. Control sin tratamiento (Control), Control tratado con AAT (Control +AAT) y diabéticos (DBT), diabéticos tratados con AAT (DBT +AAT); (\* $p < 0.01$ ; DBT vs. DBT+AAT; # $p < 0.01$  control vs. DBT; ANOVA 1 vía, Tukey post test)

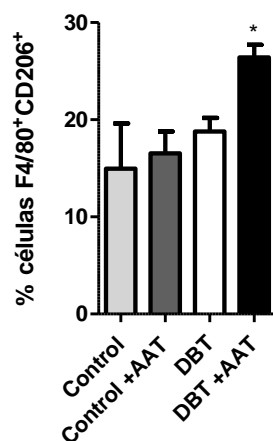
## ***Efecto de AAT en el perfil inmunológico de los macrófagos de la retina***

Los animales diabéticos tratados con AAT presentaron un estado inflamatorio disminuido tanto a nivel sistémico como en el microambiente de la retina, sin embargo ambos grupos diabéticos presentaron niveles comparables de células F4/80<sup>+</sup>. Debido a esto decidimos evaluar el perfil de estas células. Encontramos un mayor número de células doble positivas F480<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> en los animales diabéticos tratados con AAT respecto de los diabéticos. Por lo tanto la microglia/macrófagos encontrados en la retina de los animales diabéticos tratados con AAT presentaron un perfil antiinflamatorio respecto de aquellos

hallados en la retina de los animales diabéticos. El porcentaje de células doble positivas F4/80<sup>+</sup>/CD206<sup>+</sup> en el grupo control fue de 0.20%, en el control tratado fue 0.12%, en el grupo diabético 10.6%, y diabético tratado 19.02%. En la siguiente figura se observan los *dotplots* representativos y la cuantificación de cada grupo (Figura 19).



B

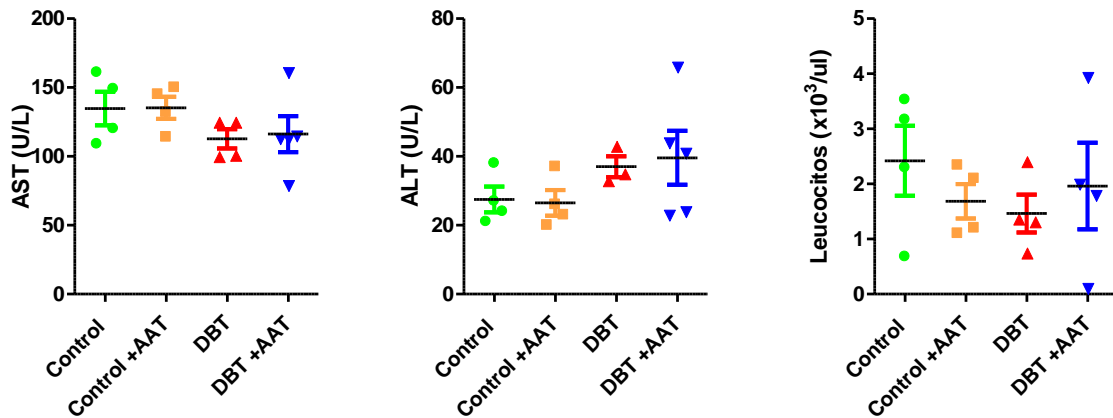


**Figura 19.** *Dotplots* representativos de las retinas de los 4 grupos experimentales(A); cuantificación del porcentaje de células doble positivas para F4/80<sup>+</sup> y CD206<sup>+</sup> incrementado en los animales diabéticos que fueron tratados con AAT (B). Control sin tratamiento (Control), Control tratado con AAT (Control +AAT), diabéticos (DBT) y diabéticos tratados con AAT (DBT +AAT); n= 4; (\*p<0.01 DBT vs DBT +AAT; ANOVA de 1 vía, Tukey post test).

### ***Evaluación de enzimas hepáticas y número leucocitario en el modelo animal utilizado***

Para descartar algún efecto adverso en el tratamiento con AAT se evaluó el perfil de las enzimas hepáticas, aspartato aminotransferasa (AST), alanina aminotransferasa (ALT), así como también el número de glóbulos blancos (leucocitos) en los distintos grupos. Encontramos que el esquema empleado fue bien tolerado, sin signos evidentes de toxicidad clínica, histológica, bioquímica y hematología dentro del período de tiempo estudiado (Figura20). Las transaminasas hepáticas no mostraron diferencias significativas entre los grupos experimentales. Si bien el grupo DBT tratado mostro mayor dispersión en los valores de ALT no se encontraron diferencias significativas. Tampoco se observaron diferencias significativas en el recuento leucocitario entre los grupos. Todos los valores fueron tomados luego del sacrificio, a la semana 8 de tratamiento.



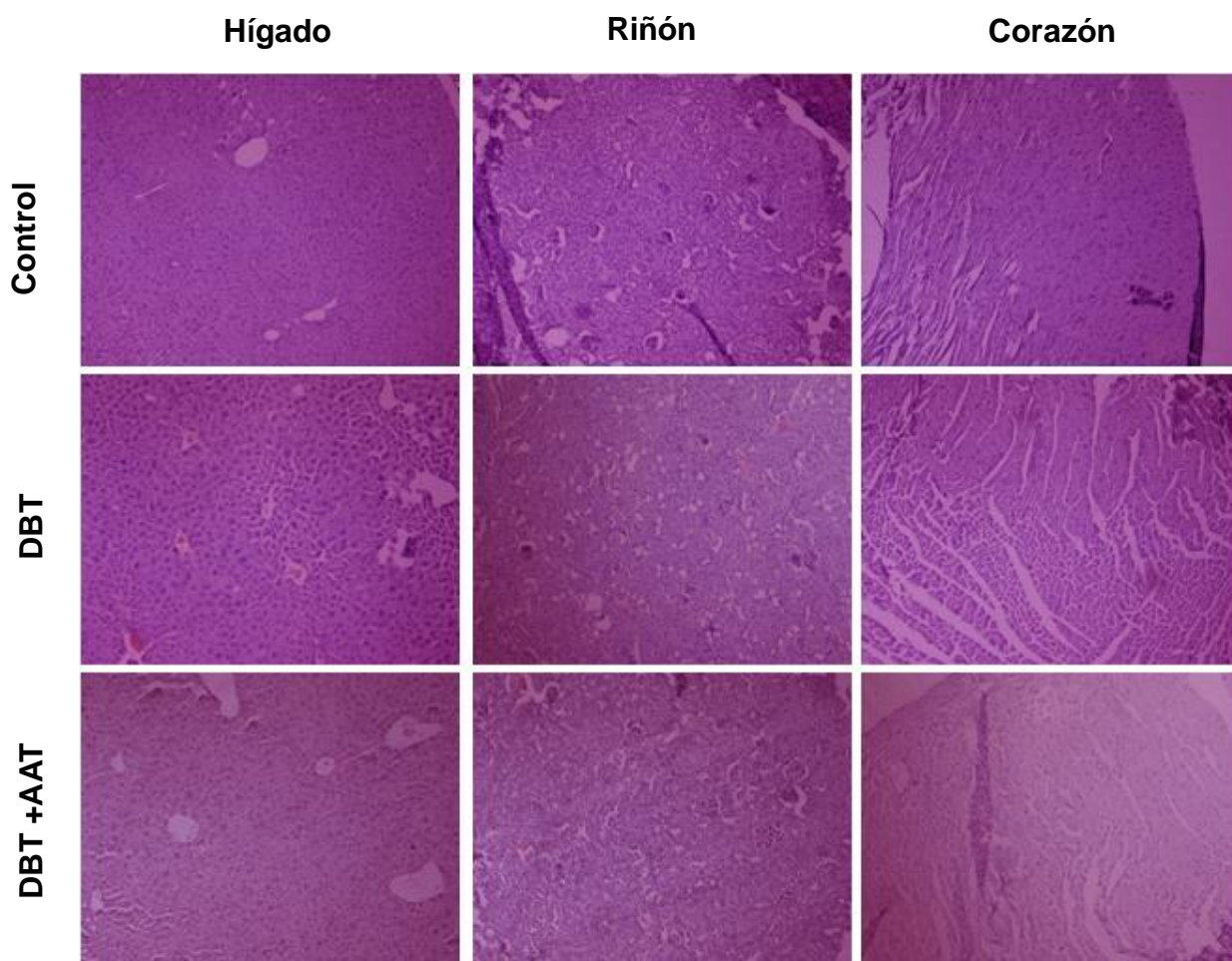


**Figura 20. Niveles de transaminasas hepáticas y recuento leucocitario.** Determinación enzimática de los niveles de transaminasas hepáticas. AST: aspartato transglutaminasas (A), ALT alanina aminotransferasa (B); recuento leucocitario (C) de los grupos experimentales. Controles (Control), control tratado con AAT (Control +AAT), diabéticos (DBT) y diabéticos tratados con AAT (DBT +AAT). No se encontraron diferencias significativas entre los grupos en los parámetros evaluados.

### ***Evaluación de toxicidad hígado, riñón y corazón***

Se analizaron las posibles alteraciones histológicas causadas por AAT en secciones de hígado, riñón y corazón en los grupos diabético, diabético tratado con AAT y control. No encontramos alteraciones histológicas aparentes por la evaluación morfológica en los tejidos evaluados de los ratones utilizando tinción con hematoxilina y eosina (Figura21).

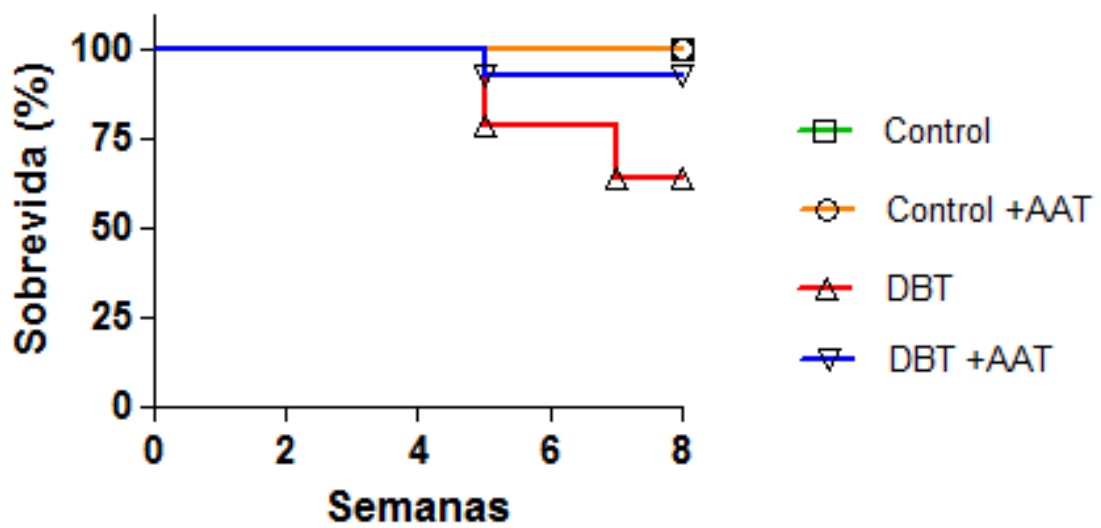
#### **Hígado**



**Figura 21.** Foto representativa de las histologías de los distintos órganos evaluados. Ninguno de los órganos evaluados mostro signos aparentes de toxicidad o cambios morfológicos observables en los grupos que fueron tratados con AAT.

### ***Efecto de AAT en la sobrevida de los animales.***

Sorprendentemente la sobrevida de los animales diabéticos aumento con el suministro de AAT. La sobrevida de los animales diabéticos fue del 64% durante las 8 semanas de tratamiento, mientras que el 92% de los diabéticos tratados con AAT alcanzó la semana 8 de tratamiento. Los animales controles y controles tratados con AAT tuvieron una sobrevida del 100%. (Figura 22) \* $p < 0.05$ ; \*vs Control.

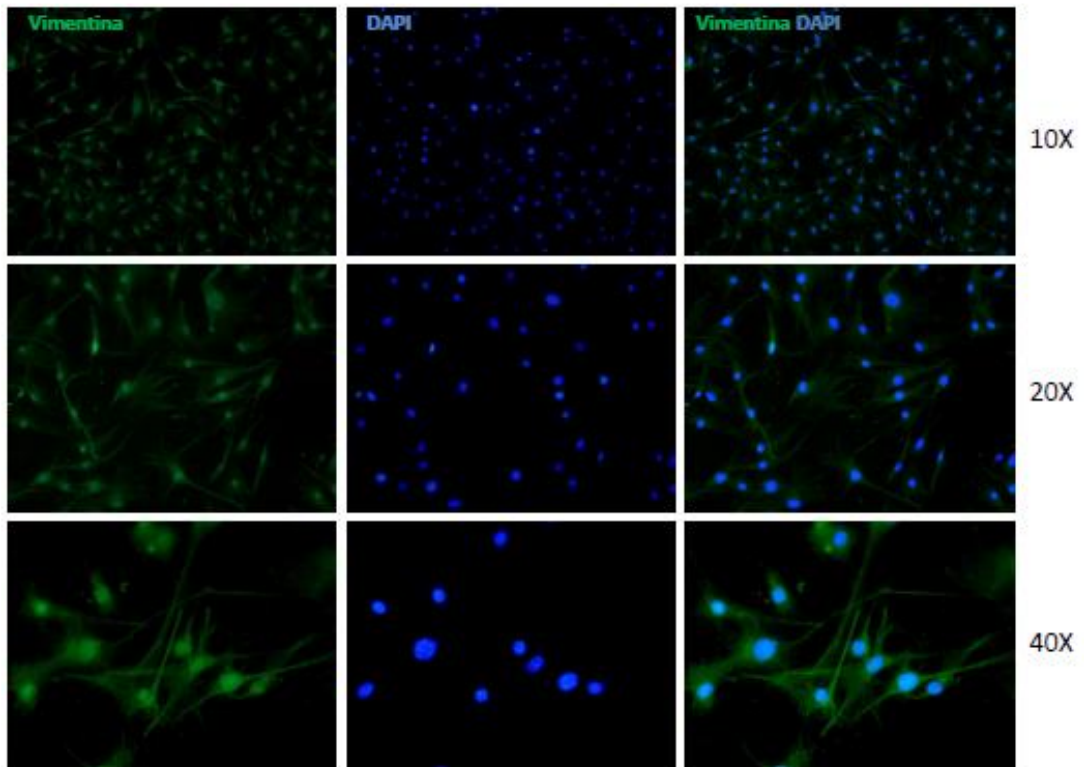


**Figura 22.** Sobrevida de los distintos grupos experimentales durante las 8 semanas de tratamiento. Los grupos control y control tratado tuvieron una sobrevida del 100%. Grupo diabético tratado con AAT (DBT +AAT) tuvo una sobrevida del 92%, mientras que el grupo diabético (DBT) tuvo una sobrevida del 64%.\*vs. Control ( $p < 0.05$ , Log-rank (Mantel-Cox) Test).

## Ensayos *in vitro*

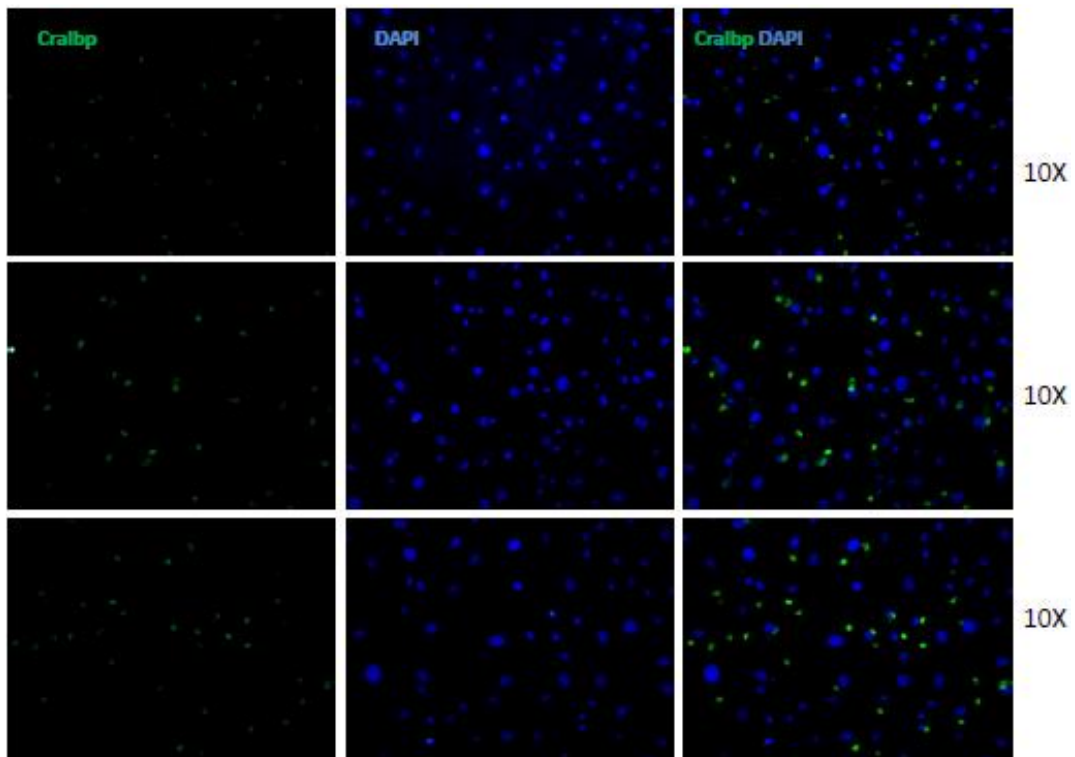
### Caracterización de las células de Müller

Con el fin de caracterizar las células de Müller obtenidas a partir de un cultivo primario de retina realizamos ensayos de IFI para 2 proteínas que se expresan específicamente en este tipo celular: Vimentina y Cralbp. En la figura 23 se observa en verde la marca correspondiente a vimentina que es un filamento intermedio correspondiente al citoesqueleto celular. Se realizó además una tinción nuclear con DAPI. Se obtuvieron fotos a distintos aumentos, 10x, 20x y 40x (Figura 23).



**Figura 23.** IFI sobre cultivo primario de células de Müller. Se utilizó como anticuerpo primario anti-Vimentina que es una proteína perteneciente los filamentos intermedios que conforman el citoesqueleto. Se realizó una tinción con DAPI. Se obtuvieron fotos a distintos aumentos, 10x, 20x, 40x.

La figura 24 muestra una IFI del cultivo primario de células de Müller. En verde se observa la marca específica para Cralbp y en azul se observan los núcleos de las células correspondientes al marcador DAPI. Las imágenes fueron tomadas en un aumento 10x en todos los casos. Se observa en la tercera columna el *merge* de ambas imágenes (Figura 24).

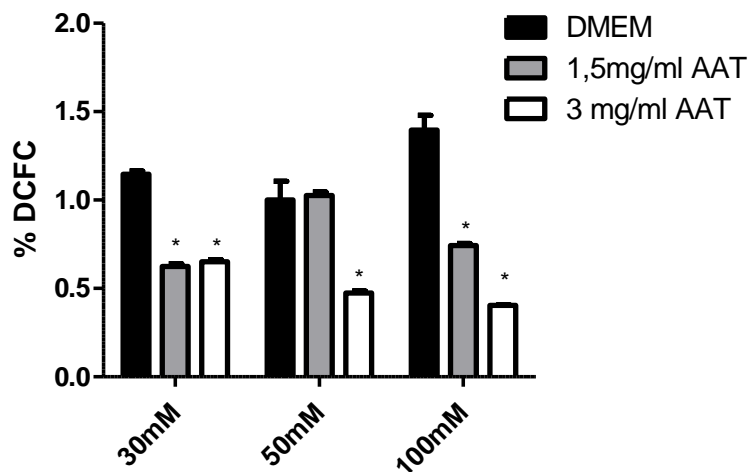


**Figura 24.** IFI sobre cultivo primario de células de Müller. Se utilizó como anticuerpo primario anti-Cralbp (proteína celular de unión a retinaldehído) una proteína que expresan específicamente las células de Müller. Se realizó una tinción con DAPI. Se obtuvieron fotos a 10x.

Efecto de AAT en la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) en un cultivo primario de células de Müller expuestas a elevadas concentraciones de glucosa

En nuestro modelo *in vivo* observamos una disminución en la expresión tanto del ARNm como de la proteína iNOS en extractos de retina completos. De acuerdo a lo mencionado anteriormente las células de Müller son en parte responsables del mantenimiento de la homeostasis de la retina. Por ello es que decidimos evaluar

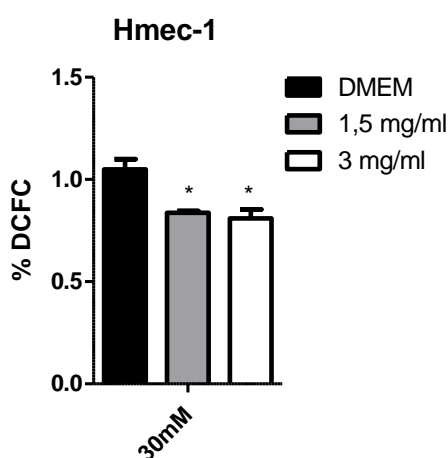
si AAT era capaz de reducir las ROS en cultivos primarios de este tipo celular cultivados en condiciones similares a hiperglucemia. La fluorescencia producida por la generación de ROS en un cultivo primario de células de Müller expuestas a altas concentraciones de glucosa disminuyó cuando fueron co-cultivadas con AAT. Las células fueron expuestas a 30, 50 o 100 mM de glucosa y mostraron un pico de DCFH oxidado por la presencia de ROS. Los niveles de fluorescencia se redujeron significativamente en 3 mg/ml de AAT en comparación con DMEM en condiciones de glucosa 30, 50 y 100 mM, mientras que los niveles de fluorescencia se redujeron solo a 30 y 100 mM en presencia de 1.5mg/ml de AAT. Los valores de fluorescencia fueron normalizados a aquellos obtenidos en la condición de 30mM en donde las células fueron incubadas con DMEM (en ausencia de AAT) (Figura 25).



**Figura 25. Porcentaje de fluorescencia emitida por la Diclorofluoresceína (%DCFC).** Los cultivos primarios de células de Müller expuestos a distintas concentraciones de AAT (1.5mg/ml, 3 mg/ml) presentaron menores % de fluorescencia emitida que aquellos que fueron incubados sin AAT (DMEM). Los cultivos fueron incubados en un insulto de glucosa: 30, 50, 100mM (\* $p < 0.05$ ; 30mM: DMEM vs 1.5 mg/ml, DMEM vs 3 mg/ml; 50 mM: DMEM vs. 3 mg/ml; 100 mM: DMEM vs 1.5 mg/ml, DMEM vs 3 mg/ml; ANOVA de 2 vías, Bonferroni post-test).

## Efecto de AAT en la producción de ROS en la línea endotelial microvascular humana-1 (Hmec-1) expuesta a elevadas concentraciones de glucosa

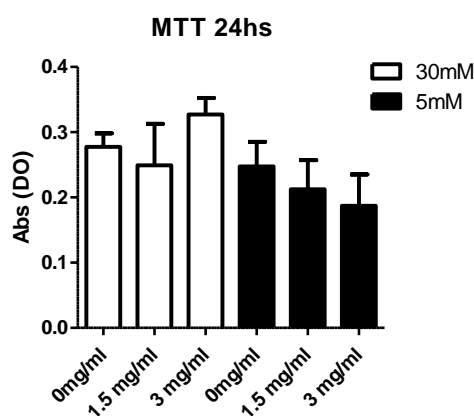
Según lo mencionado, durante el transcurso de la RD otro tipo celular importante que se ve afectado son las células del endotelio de los plexos de la retina. En este sentido, las células endoteliales son responsables de la producción de ROS en condiciones de hiperglucemia. Por ello y para descartar si el efecto encontrado de AAT sobre el cultivo primario de células de Müller era exclusivo de este tipo celular es que decidimos medir la producción de ROS en la línea Hmec-1 expuestas a elevadas concentraciones de glucosa y AAT *in vitro*. Las células fueron cultivadas a 30mM de glucosa durante 16hs y a distintas concentraciones de AAT. En ambas concentraciones de AAT evaluadas se observó una disminución cercana al 20% en la fluorescencia producida a partir de DCFC respecto del control sin AAT. A una concentración de 1.5 mg/ml de AAT la fluorescencia fue  $(0.83 \pm 0.01)$  %, mientras que para 3 mg/ml fue  $(0.80 \pm 0.04)$  %. (Figura 26). Si bien estos resultados no se pueden normalizar a células endoteliales de la retina representan una interesante aproximación para estudios a futuro en líneas endoteliales o cultivos primarios de células endoteliales de la retina.



**Figura 26.** Porcentaje de fluorescencia emitida por la Diclorofluoresceína (%DCFC). En ambas concentraciones de AAT testeadas el porcentaje de DCFC disminuyó en la línea celular incubada a 30 mM de glucosa. (\* $p < 0.05$ ; DMEM vs. 1.5 mg/ml, DMEM vs. 3 mg/ml; ANOVA 1 vía, Tukey post-test)

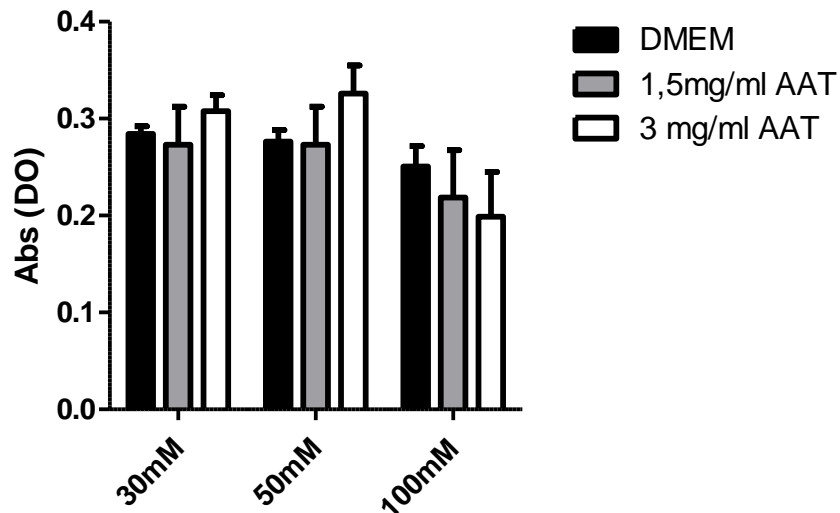
Medición de viabilidad celular: reducción del MTT para evaluar posible efecto citotóxico en cultivo de AAT sobre el cultivo de Hmec-1

Se realizó un ensayo colorimétrico para evaluar si las concentraciones de glucosa y de AAT utilizadas en los cultivos primarios de células de Müller y el cultivo de Hmec-1 afectaban la viabilidad celular. No se encontraron efectos citotóxicos en ninguna de las condiciones evaluadas. En este ensayo se evalúa la actividad de NADPH oxido reductasa, que es un indicador de células viables. Dicha enzima es capaz de reducir el compuesto MTT a su forma insoluble que presenta un color violáceo fácilmente cuantificable mediante espectrofotometría. El ensayo mostró que tanto las concentraciones de AAT como de glucosa utilizadas no presentan efectos negativos sobre la viabilidad de los cultivos de Hmec-1(Figura 27) y de células de Müller (Figura 28).Por consiguiente, la reducción de las ROS encontrada en ambos cultivos tratados con AAT no se debe a una disminución de la viabilidad celular.



**Figura 27. Absorbancia (Abs) medida en los distintos cultivos.** 30mM: corresponde al cultivo celular que fue incubado con 30 mM de glucosa. 5 mM: corresponde a cultivos que fueron crecidos en 5 Mm de glucosa. No se encontraron diferencias en cuanto a los valores de Abs en las distintas concentraciones de glucosa y AAT medidas. (DO: densidad óptica).

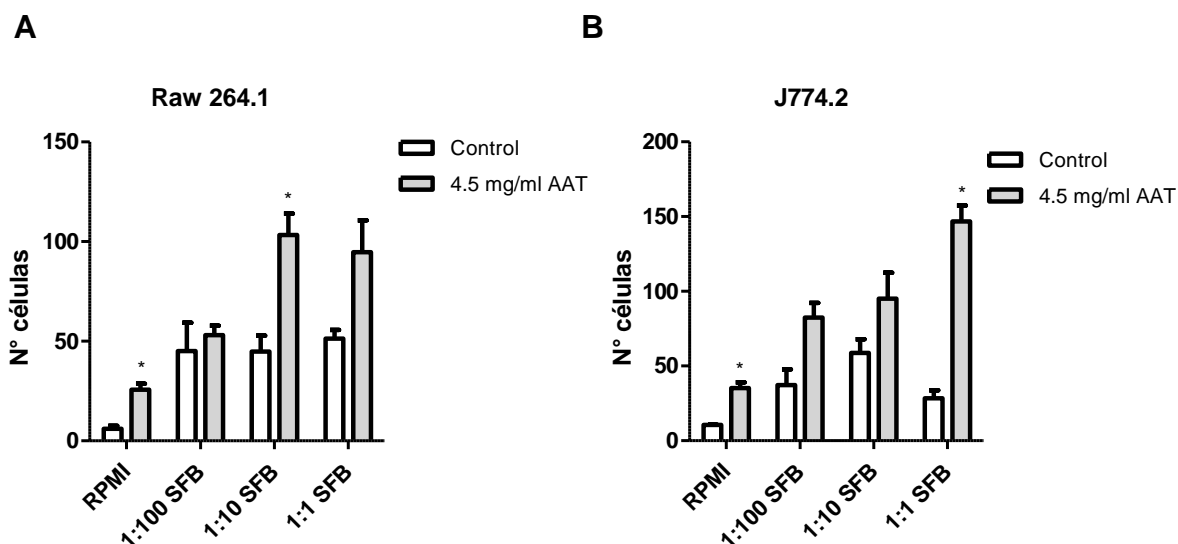




**Figura 28. Absorbancia (Abs) medida en los distintos cultivos.** 30mM: corresponde al cultivo celular que fue incubado con 30 mM de glucosa. 50 mM: corresponde a cultivos que fueron crecidos en 50 mM de glucosa, mientras que 100 mM corresponde a los cultivos que fueron crecidos en 100 mM de glucosa. No se encontraron diferencias en cuanto a los valores de Abs en las distintas concentraciones de glucosa y AAT medidas. (DO: densidad óptica).

#### Efecto de AAT en la migración de macrófagos in vitro

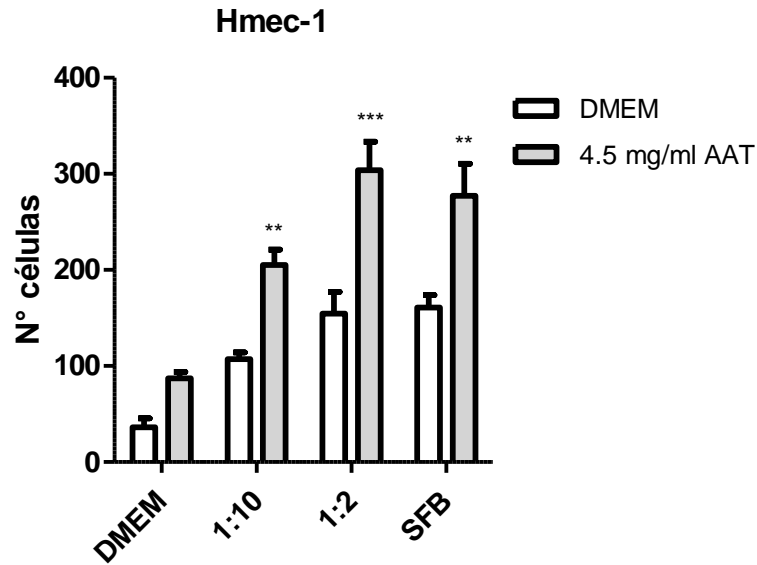
**En** nuestros resultados in vivo mostramos que los ratones diabéticos que fueron tratados con AAT presentaron un mayor número de células F4/80+ en la retina. Para determinar in vitro si AAT tiene algún efecto en la capacidad migratoria de 2 líneas celulares de macrófagos realizamos un ensayo en cámara de Boyden. En las condiciones evaluadas ambas líneas celulares aumentaron el número de células que se movilizaron hacia las distintas concentraciones del quimioattractante (SFB), e incluso sin quimioattractante (RPMI). El número de células Raw264.1 que migraron a SFB fue: tratadas con AAT ( $109 \pm 10$ ) vs. sin AAT ( $51 \pm 4$ ). En la dilución 1:10 de SFB: con AAT ( $103 \pm 11$ ) vs. sin AAT ( $44 \pm 8$ ), en la condición 1:100 de SFB: con AAT ( $57 \pm 4$ ) vs. sin AAT ( $31 \pm 6$ ) y sin quimioattractante RPMI: con AAT ( $23 \pm 3$ ) vs. sin AAT ( $6 \pm 2$ ) células. Mientras que en las células J774.2 los resultados fueron en SFB ( $135 \pm 13$ ) vs ( $33 \pm 6$ ), en la dilución 1:10 de SFB ( $89 \pm 13$ ) vs ( $58 \pm 9$ ) y en la dilución 1:100 ( $82 \pm 10$ ) vs ( $37 \pm 10$ ) y sin quimioattractante (RPMI) ( $74 \pm 10$ ) vs ( $10 \pm 2$ ) (Figura 29).



**Figura 29. Ensayo de migración celular en cámara de Boyden.** Línea de macrófagos Raw264.1 (A), J774.2 (B). En el eje Y se observa el número absoluto de células que migraron al SFB. RPMI corresponde a las células que no fueron pretratadas con AAT, mientras que 4.5mg/ml corresponde a las células que fueron pretratadas por 45 minutos con AAT previo al ensayo de migración. (\* $p < 0.01$ ; células Raw 264.1, RPMI: Control vs 4.5 mg/ml, 1:10 SFB: control vs. 4,5 mg/ml; células J774.2, RPMI: control vs. 4,5 mg/ml, SFB: control vs. 4,5 mg/ml; ANOVA 1 vía, Tukey post test).

#### Efecto de AAT en la migración de células endoteliales

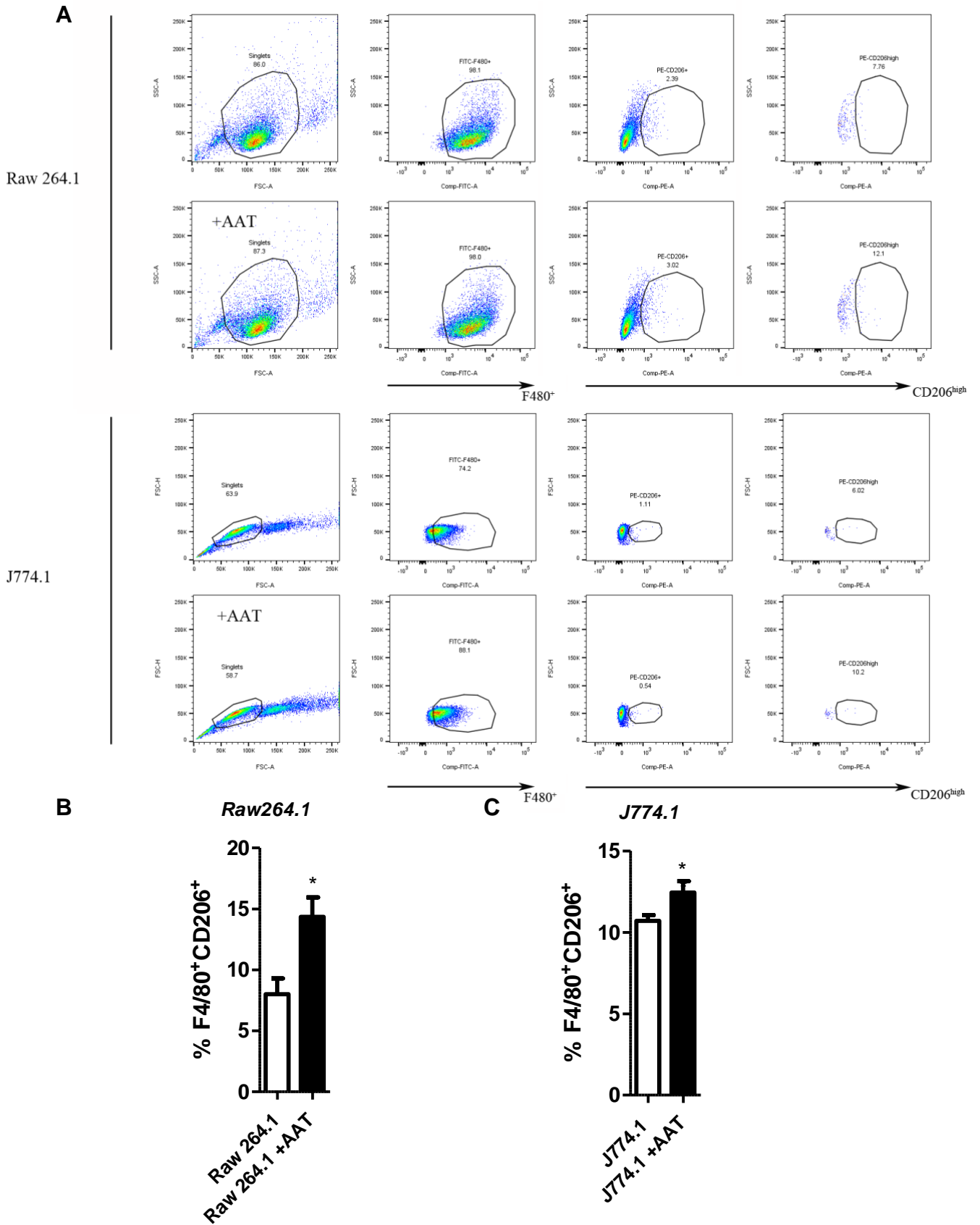
Para determinar si el efecto del aumento en la migración de las líneas celulares de macrófagos era específico de este tipo de células decidimos realizar el mismo ensayo en células endoteliales humanas. Los resultados fueron similares a los hallados en las células Raw264.1 y J774.2 pero el número absoluto de células que migraron al SFB fue mayor. Las células que migraron al SFB fueron: tratadas con AAT ( $277 \pm 33$ ) vs. ( $160 \pm 13$ ), mientras que en la dilución 1:2: tratadas con AAT ( $304 \pm 30$ ) vs. sin tratar ( $154 \pm 23$ ), en la dilución 1:10: tratadas con AAT ( $205 \pm 16$ ) vs. sin tratar ( $107 \pm 7$ ), y sin quimioattractante (DMEM) fueron: tratadas con AAT ( $87 \pm 7$ ) vs. sin tratar ( $36 \pm 9$ ) células (Figura 30).



**Figura 30.** Línea de células endoteliales humanas (Hmec-1). En el eje Y se observa el número absoluto de células que migraron al SFB. Control. \*\* $p < 0.01$ ; \*\* 1:10 y SFB: 4.5 mg/ml vs. DMEM, \*\*\* $p < 0.001$  1:2: 4.5 mg/ml vs. DMEM; ANOVA 2 vías, Bonferroni post-test.

#### Efecto de AAT en el perfil inmunológico de macrófagos *in vitro*

Para evaluar si AAT puede modificar el perfil de macrófagos *in vitro* realizamos una citometría de flujo para los marcadores F4/80 y CD206 de las líneas celulares Raw264.1 y J774.2. Los cultivos que fueron incubados con AAT mostraron un porcentaje mayor de células F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> doble positivas en ambas líneas celulares (Figura 31A y 31B). En la línea Raw 264.1 las células F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>doble positivas fue 2.14% vs. sin tratar 1.76 %. En la línea J774.2 5.82% vs. 4.95% tratadas y sin tratar respectivamente. Este resultado sugiere que AAT es capaz de modular la expresión de CD206 el cual es un marcador característico de un perfil antiinflamatorio de tipo M2.

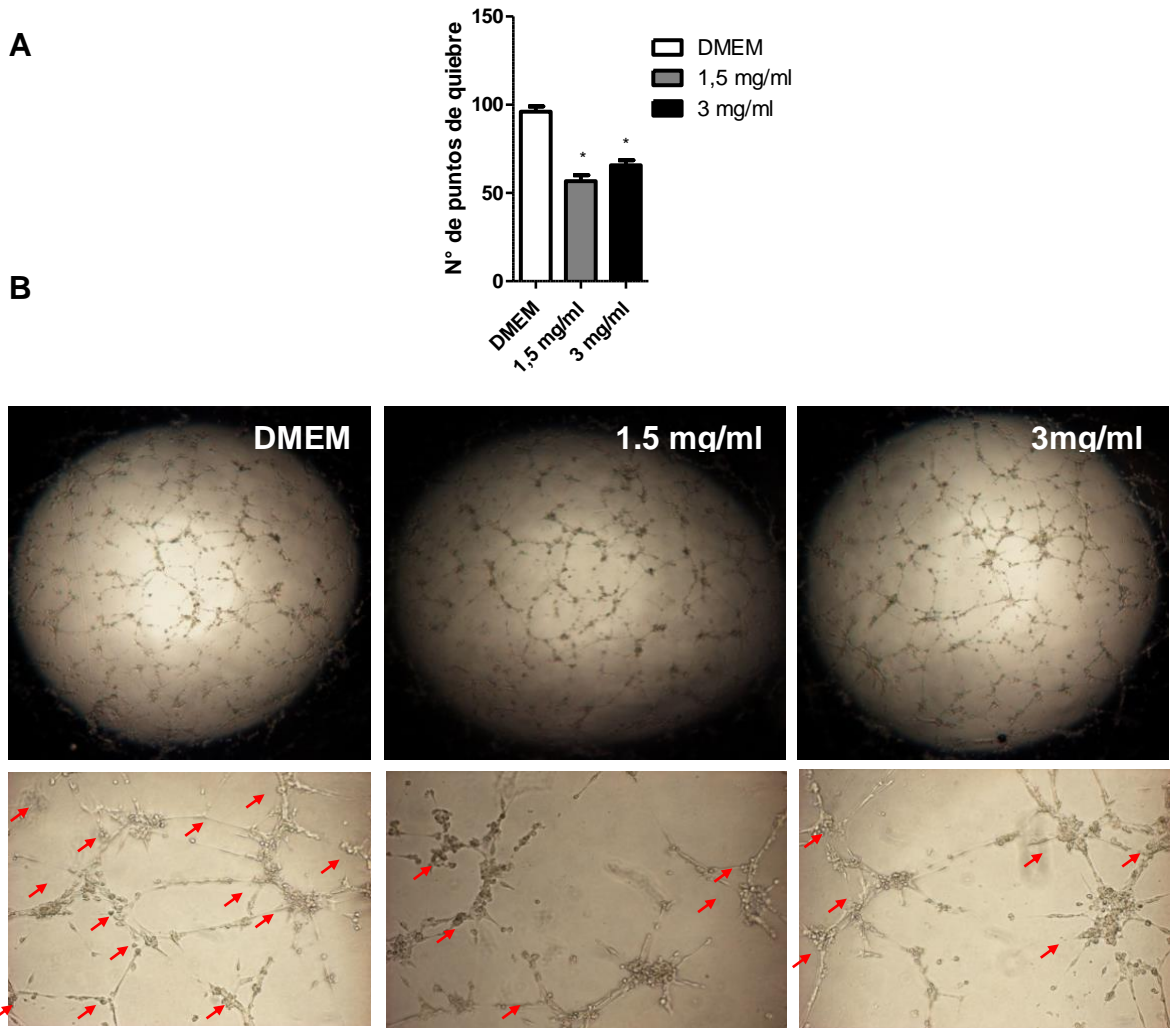


**Figura 31.** *Dotplots* representativos de las 2 líneas Raw 264.1 y J774.2(A); cuantificación del porcentaje de células doble positivas para F4/80<sup>+</sup> y CD206<sup>+</sup> en las células Raw 264.1 (B) y J774.2 (C). El incremento en el porcentaje de células se observó con una concentración de 4.5 mg/ml de AAT. (\*p<0.01, Raw 264.1: control vs. 4.5 mg/ml; J774.2: control vs. 4.5 mg/ml; Test de Student).

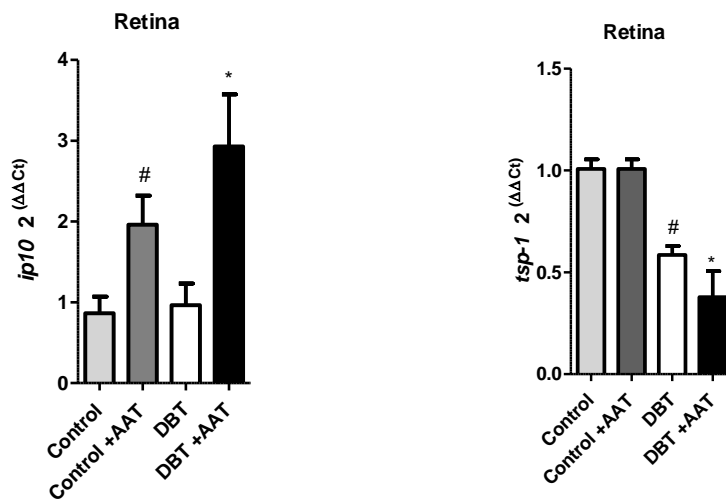
## ***Angiogénesis***

Efecto de AAT en la formación de puntos de quiebre (*branching points*) en cultivos de Hmec-1

Diversos grupos de investigación en distintas partes del mundo están enfocados en encontrar nuevos fármacos para disminuir el proceso angiogénico (neovascularización) que ocurre en la RDP. En nuestro modelo animal utilizado encontramos que los animales que fueron tratados con AAT presentaron mayores niveles de expresión de la molécula IP-10 tanto a nivel proteico (Tabla 2) como del ARNm (Figura 33) y menores niveles de expresión de TSP-1. Algunos trabajos han mostrado que IP-10 previene la formación de vasos y provoca regresión en vasos nacientes. Se ha visto también que sus niveles son inversamente proporcionales a los de VEGF en distintos tipos de cáncer. Algunas de estas razones nos llevaron a evaluar la capacidad de formar puntos de quiebre por parte de las Hmec-1, tanto en presencia como en ausencia de AAT. Observamos que el número de *puntos de quiebre* en presencia de 1.5 y 3 mg/ml de AAT en el medio de cultivo disminuye entre un 40 y un 50% la capacidad de las células de formar uniones entre ellas. El número de puntos de quiebre de las células que no fueron expuestas a AAT fue:  $96 \pm 3$ , mientras que a 1.5 mg/ml:  $56 \pm 3$  y a 3 mg/ml:  $65 \pm 3$ ; (Figura 32).



**Figura 32.** Cuantificación del número de puntos de quiebre (A). Se cuantificaron en las 3 condiciones evaluadas: cultivo no expuesto a AAT (DMEM), cultivo expuesto a una concentración de 1.5 mg/ml de AAT, y un cultivo expuesto a 3 mg/ml de AAT; (B) Foto representativa de las 3 condiciones evaluadas; Las flechas rojas señalan los puntos de quiebre en cada condición. (\* $p < 0.05$ ; DMEM vs. 1.5 mg/ml, DMEM vs. 3 mg/ml; ANOVA 1 vía, Tukey posttest).

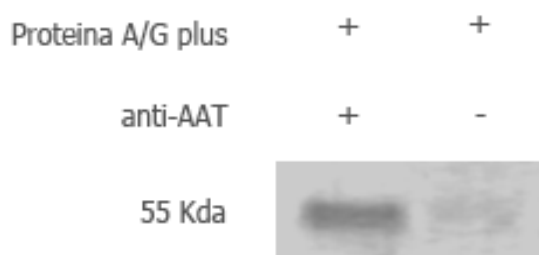


**Figura 33.** Niveles de ARNm de ip-10 y tsp-1 en la retina. (IP-10: # $p < 0.01$ ; control vs. control + AAT; \* $p < 0.01$ , DBT vs. DBT + AAT; TSP-1: # $p < 0.01$  Control vs. DBT, \* $p < 0.01$  DBT vs DBT + AAT; ANOVA 1 vía, Tukey post test);  $n = 4$ . El valor obtenido de ip-10 fue relativizado a los genes *gapdh* y/o *actina* que se utilizaron como controles de carga o *housekeeping*.

### ***Identificación de nuevos sustratos/interacciones/ de AAT***

Ensayo de inmunoprecipitación seguido de análisis de espectrometría de masas

Para poder identificar nuevos sustratos de AAT que nos permitan explicar mediante mecanismos moleculares algunos de los efectos encontrados tanto *in vivo* como *in vitro* decidimos realizar un ensayo de inmunoprecipitación. Luego los inmuno-complejos fueron analizados por espectrometría de masas para detectar nuevos posibles sustratos. El siguiente ensayo de *westernblot* sobre una alícuota del producto de la inmunoprecipitación verifica la precipitación de AAT (Figura 35).



**Figura 35. Ensayo de *westernblot* para verificar la precipitación de AAT.** Proteína A/G plus + y anti-AAT + corresponde a la calle donde los lisados celulares fueron incubados con ambos anticuerpos. Proteína A/G plus + y anti-AAT - corresponde a la calle donde no se utilizó el anticuerpo anti-AAT.

El ensayo de espectrometría de masas nos permitió hacer un análisis amplio de los posibles nuevos sustratos de AAT. Se encontraron 59 proteínas que podrían estar relacionadas a AAT. En particular, en este trabajo nos enfocamos en 3 proteínas, para las cuales se encontraron un número mayor de péptidos, estas fueron: Plectin, Thrombospodin-1 (TSP-1) y el complejo del aparato mitótico nuclear-1 (NUMA-1). Se encontraron 29 péptidos correspondientes a la proteína Plectin, 11 péptidos a la proteína TSP-1 y 4 péptidos del complejo NUMA-1. La siguiente tabla detalla el total de proteínas encontradas en el análisis.

N° acceso	Descripción	Cobertura	# Péptidos	# PSMs	# P. únicos
Q15149	Plectin OS=Homo sapiens	5,02	20	29	19
Q6UWP8	Suprabasin OS=Homo sapiens	9,15	1	4	1
P07996	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens	3,85	4	11	4
Q14980	Nuclear mitotic apparatus protein 1 OS	1,47	3	4	3
O75390	Citrate synthase, mitochondrial OS	5,79	2	4	2
J3KQE5	GTP-binding nuclear protein Ran OS	4,70	1	4	1
P50990	T-complex protein 1 subunit theta OS	4,38	2	4	2
K7ES00	Histone H3.3 (Fragment) OS	11,92	2	3	2
C9JF17	Apolipoprotein D (Fragment) OS	9,30	2	9	2
Q9UGM3	Deleted malignant brain tumors 1 protein OS	6,96	1	4	1
P29508	Serpin B3 OS	8,97	3	3	3
P36957	succinyltransferase component OS	1,77	1	4	1
P35030	Trypsin-3 OS	4,28	1	5	1
P31944	Caspase-14 OS	5,37	1	3	1
Q96DA0	Zymogen granule protein 16 homolog B OS	17,79	2	3	2
Q9BYE4	Small proline-rich protein 2G OS	12,33	1	3	1
P24821	Tenascin OS	1,00	2	2	2
O43854	EGF-like protein 3 OS	2,08	1	4	1
P62753	40S ribosomal protein S6 OS	4,82	1	2	1
Q96JM4	Leucine-rich and IQ domain protein 1 OS	1,10	1	3	1
Q01469	Fatty acid-binding protein, epidermal OS	6,67	1	2	1
Q9HCH0	Nck-associated protein 5-like OS	1,35	1	2	1
H0Y863	Pseudouridylate synthase 7 homolog OS	16,67	1	5	1
Q13510	Acid ceramidase OS	2,78	1	2	1
AOA0C4DH25	Immunoglobulin kappa variable 3-20 OS	27,59	2	4	1
P13489	Ribonuclease inhibitor OS	5,64	2	2	2
P07093	Glia-derived nexin OS	5,53	2	2	2
Q13867	Bleomycin hydrolase OS	2,42	1	2	1
Q9BVJ7	Dual specificity protein phosphatase 23 OS	5,33	1	2	1
O95551	Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 OS	2,49	1	2	1
P47929	Galectin-7 OS	8,09	1	1	1
AOA087WTG3	Cullin-3 OS	5,56	1	1	1
Q8WXW3	Progesterone-induced-blocking factor 1 OS	2,64	1	1	1
P35268	60S ribosomal protein L22 OS	10,16	1	1	1
Q8IVF2	Protein AHNAK2 OS	0,43	1	1	1
P02765	Alpha-2-HS-glycoprotein OS	3,54	1	1	1
P62913	60S ribosomal protein L11 OS	7,87	1	1	1
O96028	Histone-lysine N-methyltransferase NSD2 OS	1,68	1	1	1
Q9HCE9	Anoctamin-8 OS	1,70	1	1	1
O75556	Mammaglobin-B OS	12,63	1	1	1
R4GN35	DENN domain-containing protein 4C OS	0,87	1	1	1

**Tabla 5. Listado de proteínas posibles interactores de AAT.** Se señalan en amarillo las 3 proteínas para las cuales se encontraron mayor número de péptidos provenientes de la inmunoprecipitación. N° acceso: Muestra el identificador único asignado a la proteína mediante la base de datos utilizada. Descripción: Proporciona el nombre de la proteína exclusiva del identificador que aparece en la columna N° accesos. Cobertura: se muestra el porcentaje de la secuencia de la proteína cubierto por los péptidos identificados. #Péptidos: Muestra el número de secuencias de péptido únicas a un grupo de proteínas. #PSMs (*PeptideSpectrumMatches*): Muestra el número total de secuencias de péptidos identificados para la proteína, incluyendo aquellos identificados de forma redundante. #P. únicos: muestra el número de secuencias de péptido únicas a un grupo de proteínas



Las siguientes tablas muestran las secuencias de los péptidos encontrados para las proteínas Plectin, TSP-1 y NUMA-1. Se detalla para cada proteína el nivel de confianza, si el péptido sufrió alguna modificación, si se encontró agrupado, y la cantidad de péptidos hallados para cada secuencia señalada. También se detallan los datos correspondientes a la tabla anterior.

**PLECTIN:** La Plectin es un miembro de una importante familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas, denominadas *plakins* o *cytolinkers*, que son capaces de interconectar diferentes elementos del citoesqueleto. Están relacionadas con el movimiento, el tráfico intracelular de moléculas.

N° acceso	Descripción	Cobertura	# Péptidos	# PSMs	# Pep. únicos
Q15149	Plectin OS=Homo sapiens	5,02	20	29	19
Confianza	Secuencia	Modific.	# Grupos P.	# Proteína	# PSMs
Alta	SLVPAAELLESR		1	1	4
Alta	DDGTGQLLPLSDAR		1	1	2
Alta	VIDRELYQQLQR		1	1	2
Alta	AGVVGPELHEQLLSAEK		1	1	2
Alta	LTAEDLFEAR		1	1	2
Alta	VPLDEALQR		1	1	2
Alta	AQAEAQQPTFDALRDEL		1	1	1
Alta	VPVDVAYQR		2	3	1
Alta	ELIPTEEAR		1	1	1
Alta	LAAEQELIR		1	1	1
Alta	DLSELGSVR		1	1	1
Alta	LLDAQSTGGIVDPSK		1	1	1
Alta	VLALPEPSPAAPTLR		1	1	2
Alta	SLQEEHVAVAVQLR		1	1	1
Alta	NLVDNITGQR		1	1	1
Alta	AQVEQELTTLR		1	1	1
Alta	GGAEGELQALR		1	1	1
Alta	GLLSAEVAR		1	1	1
Alta	SLAAEEEEAAR		1	1	1
Alta	LLFNDVQTLK		1	2	1

**Tabla 6. Proteína Plectin.** Se encontraron 20 péptidos distintos de los cuales 1 fue hallado 4 veces y 7 péptidos 2 veces. Confianza: Indica un nivel de confianza asociado con la secuencia del péptido. Secuencia: muestra la secuencia de aminoácidos que componen el péptido. Modific.: Muestra las modificaciones estáticas y dinámicas identificadas en el péptido. #Grupos P.: muestra el número de proteínas pertenecientes a grupos. # Proteína: Muestra el número de proteínas identificadas en el grupo de proteínas de una proteína de referencia

**TSP-1:** es una glicoproteína adhesiva que media las interacciones de célula a célula y de célula a matriz extracelular. Puede unirse a fibrinógeno, fibronectina, laminina, colágeno tipo V e integrinas alfa-V / beta-1. Se ha demostrado que esta proteína desempeña funciones en la agregación plaquetaria, angiogénesis y tumorigénesis. Ligando para CD36 que media las propiedades antiangiogénicas. Desempeña un papel en la respuesta al estrés del retículo endoplásmico (RE), a través de su interacción con el factor de transcripción activador 6 alfa (ATF6) que produce factores de respuesta de estrés en el RE.

N° acceso	Descripción	Covertura	# Peptidos	# PSMs	# Pep. únicos
P07996	Thrombospondin-1 OS=Homo sapiens	3,85	4	11	4
Confianza	Secuencia	Modific.	# Grupos P.	# Proteina	# PSMs
Alta	GGVNDNFQGV LQNVR		1	1	3
Alta	FVFGTTPEDILR		1	1	5
Alta	SITLFVQEDR		1	1	2
Alta	GTLLALER		1	1	1

**Tabla 7. Proteína Thrombospodin-1 (TSP-1).** Se encontraron 4 péptidos distintos de los cuales 1 fue hallado 4 veces y 7 péptidos 2 veces. En total se encontraron 11 péptidos para TSP-1. El intervalo de confianza fue alto para todos los péptidos hallados.

**NUMA-1:** Esta proteína es estructuralmente grande que forma un componente de la matriz nuclear. La proteína interactúa con los microtúbulos y juega un papel en la formación y organización del huso mitótico durante la división celular. La translocación cromosómica de este gen con el gen RARA (receptor de ácido retinoico, alfa) en el cromosoma 17 se ha detectado en pacientes con leucemia promielocítica aguda. El empalme alternativo da como resultado múltiples variantes de transcripción.

Es considerada una proteína de unión a microtúbulos (MTs) que desempeña un papel en la formación y el mantenimiento de los polos del huso y la alineación y

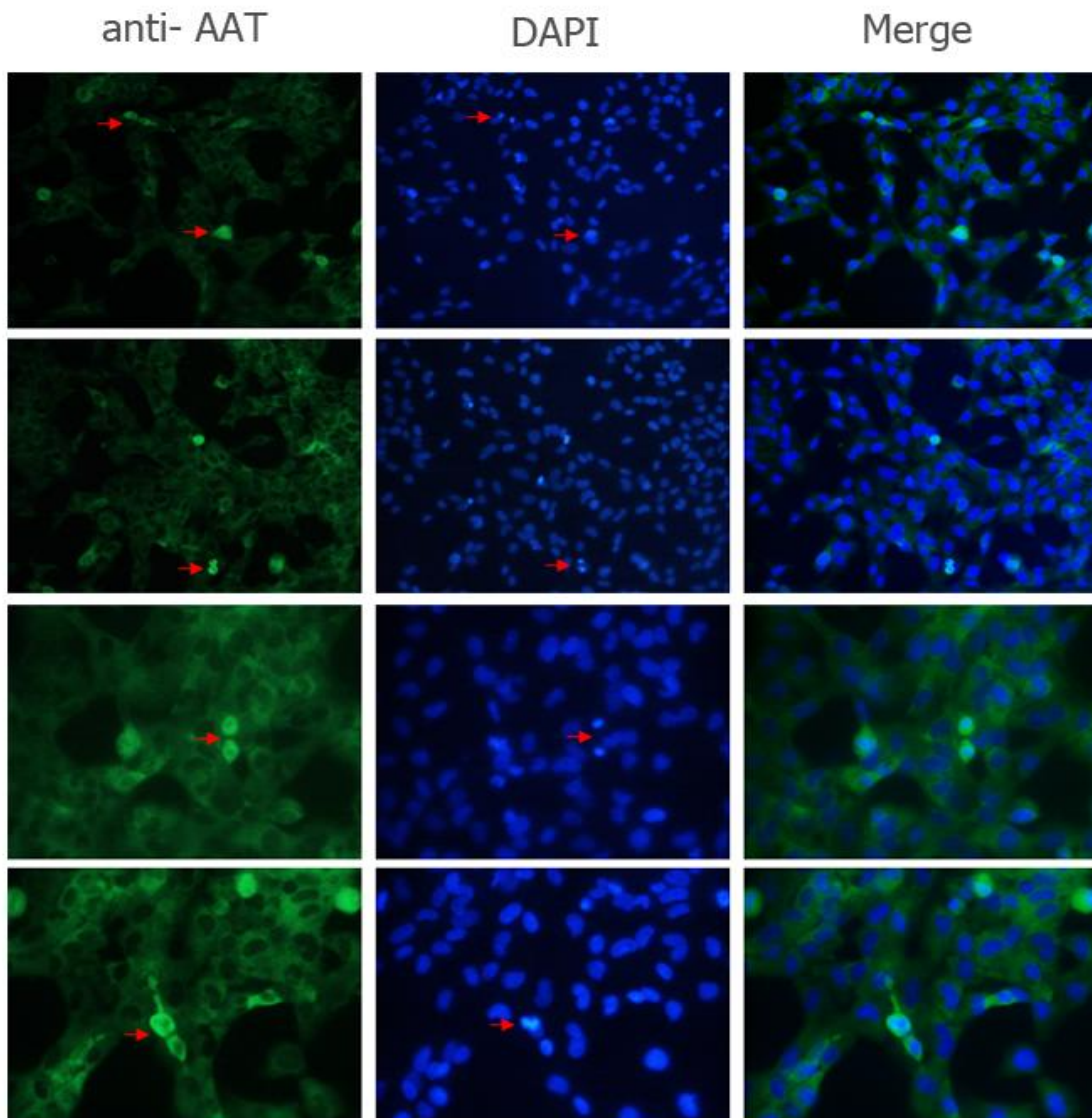
la segregación de los cromosomas durante la división celular mitótica, para unir los extremos negativos de MTs en los polos del huso, lo cual es crítico para el establecimiento y mantenimiento de los polos del huso. Desempeña un papel en el establecimiento de la orientación del huso mitótico durante la metafase y la elongación durante la anafase de una manera dependiente de dineína-dinactina. En metafase, parte de un complejo ternario compuesto por proteínas GPM2 y G alfa, que regula el reclutamiento y el anclaje del complejo dineína-dinactina en las regiones de la corteza de las células mitóticas situadas por encima de los dos polos del huso y por lo tanto regula la orientación correcta del huso mitótico. Durante la anafase, media el reclutamiento y la acumulación del complejo dineína-dinactina en la membrana celular de la región cortical polar a través de la asociación directa con fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato, y por lo tanto participa en la regulación de la elongación del huso y la segregación cromosómica. Se liga también a otros fosfoinositidos, tales como fosfatidilinositol 3-fosfato (PIP), ácido lisofosfatídico (LPA) y fosfatidilinositol trifosfato (PIP<sub>3</sub>), in vitro. También se requiere para la orientación adecuada del huso mitótico durante las divisiones celulares asimétricas. Es un componente altamente abundante de la matriz nuclear donde puede servir a un papel estructural no mitótico, ocupa la mayor parte del volumen nuclear.

N° acceso	Descripción	Covertura	# Peptidos	# PSMs	# P. únicos
Q14980	NUMA- 1 OS=Homo sapiens	1,47	3	4	3
Confianza	Secuencia	Modific.	# Grupos P.	# Proteinas	# PSMs
Alta	ELGELIPLR		1	4	2
Alta	YVQELAAVR		1	4	1
Alta	EQAAEHYKLQMEK	1xOxidation [	1	4	1

**Tabla 8. Proteína NUMA-1 (NUclear Mitotic Apparatus-1).** Se encontraron 3 péptidos distintos de los cuales 1 fue hallado 2 veces. En total se encontraron 4 péptidos. Uno de los péptidos identificados presentaba una oxidación. El intervalo de confianza fue alto para todos los péptidos hallados.

### Expresión de AAT en las células Hmec-1

Encontramos un patrón de expresión citoplasmático, homogénea de AAT en las células Hmec-1. De manera llamativa, observamos también una mayor expresión de AAT vinculada a las células que se encontraban en división celular o próximas a dividirse (Figura 36).



**Figura 36.** IFI sobre cultivo de Hmec-1. Se utilizó como anticuerpo primario anti-AAT. Se realizó una tinción con DAPI. Se obtuvieron imágenes a 20x y 40x. Las flechas rojas indican células en división, se pueden observar en la columna central (DAPI) los núcleos en división.

## DISCUSIÓN

En este trabajo de tesis se demostró por primera vez que la alfa 1 anti-tripsina es capaz de reducir los daños neurodegenerativos tempranos que ocurren en la retina interna de ratones provocados por la diabetes. En la retina diabética, un proceso neurodegenerativo crónico y progresivo comienza en las etapas tempranas, tanto en humanos como en ratones (Yanoff 1969, Barber, Lieth et al. 1998, Martin, Roon et al. 2004, Yang, Mao et al. 2012). Los estudios longitudinales realizados en pacientes con hiperglicemia y diabetes autoinmune confirmaron la presencia de neurodegeneración retiniana antes de que la unidad vascular se vea afectada o el daño es mínimo en estos pacientes (van Dijk, Verbraak et al. 2010, Chalam, Bressler et al. 2012). Particularmente, la retina interna pero no la externa es afectada. Diversos estudios experimentales han demostrado que las células ganglionares de la retina (células Brn3a<sup>+</sup>) se ven reducidas en número a partir de la semana 6 de diabetes en ratones diabéticos que fueron inducidos por STZ (Martin, Roon et al. 2004, Yang, Mao et al. 2012). En este trabajo quedó demostrado que la pérdida de las células ganglionares disminuyó gracias al suministro exógeno de AAT en los animales diabéticos luego de 8 semanas posteriores a la inducción. A su vez, otro trabajo reveló que la capa de fibras nerviosas y la capa de células ganglionares (NFL + GCL) se vuelven más finas 6 semanas después de la inducción de la diabetes (Sohn, van Dijk et al. 2016). Es importante remarcar que este hecho también ocurrió en nuestro modelo experimental, sin embargo, los ratones que fueron tratados con AAT no presentaron dicho afinamiento en las capas NFL y GCL.

La participación del sistema inmune innato en las complicaciones secundarias que genera la diabetes ha tenido importancia en los últimos años (Tang and Kern 2011). En particular, el desequilibrio metabólico debido a la hiperglucemia

genera productos que pueden ser detectados por células del sistema inmune tales como macrófagos. En este sentido, el grado de activación de los macrófagos en la diabetes puede aumentar con el tiempo y segregar moléculas pro-inflamatorias como IL-1b, TNF- $\alpha$  (Mohr, Xi et al. 2002, Abcouwer and Antonetti 2013). Estas moléculas conducen a un proceso inflamatorio crónico que activa el endotelio en la retina y aumenta la expresión de moléculas relacionadas a la adhesión celular tales como ICAM-1 y selectinas, de modo temprano en la diabetes (Smith 1993). Posteriormente, el endotelio activado podría generar áreas de leucostasis y consecuentemente de no perfusión (Joussen, Poulaki et al. 2004). En este trabajo de tesis nos propusimos generar un modelo de diabetes de tipo hiperglicémico (similar al autoinmune) en ratón y evaluar si los cambios inflamatorios tempranos causados por la diabetes en la retina podrían reducirse con el tratamiento de AAT y de alguna manera vincularlo con la demora observada en los cambios neurodegenerativos en los animales que recibieron AAT. En este sentido, la disminución del adelgazamiento de la retina y la pérdida de células ganglionares en ratones diabéticos tratados con AAT nos llevó a pensar en una reducción del estado inflamatorio a nivel sistémico y/o en el microambiente de la retina. Pudimos demostrar mediante la utilización de un microarreglo de citoquinas y quemoquinas que la administración exógena de AAT disminuyó en gran medida la inflamación provocada por la diabetes. Los ratones que recibieron AAT mostraron niveles bajos de citoquinas y factores proinflamatorios como TNF- $\alpha$ , sICAM IL1 $\alpha$ , IL1 $\beta$ , INF- $\gamma$ , IL-3, IL-7, IL17, IL-23, IL-27, y quemoquinas CXCL1, CXCL9, CXCL11, CXCL12, CCL3, CCL5.

Investigadores han puesto el foco en el TNF- $\alpha$  siendo blanco de diversas estrategias terapéuticas en la RD y en distintas enfermedades con procesos inflamatorios subyacentes. En particular en la RD varios trabajos han mostrado que el bloqueo de TNF- $\alpha$  redujo la adhesión leucocitaria, suprimió la rotura de la barrera hemato-ocular anterior en la retina y redujo la expresión de moléculas de adhesión celular como ICAM-1 (Joussen, Poulaki et al. 2002, Huang, Gandhi et al. 2011). Otro trabajo demostró que pegsunercept, un anticuerpo inhibidor de TNF- $\alpha$ , redujo la pérdida de pericitos y células endoteliales por apoptosis (Behl, Krothapalli et al. 2008, Behl, Krothapalli et al. 2009). Por otro lado, un trabajo reciente mostró que ratones con diabetes autoinmune (NOD) tratados con inyecciones de AAT redujeron los valores sistémicos de TNF- $\alpha$  (Wang, Sun et al. 2017). En los animales diabéticos, la leucostasis se promueve mediante la sobreexpresión de moléculas de adhesión en el endotelio de la retina y la expresión de integrinas en los leucocitos circulantes. Ratones *knockout*, carentes de ICAM-1 o de la integrina de leucocitos CD18, exhibieron reducción del daño capilar de la retina y reducción en la permeabilidad vascular durante la diabetes (Joussen, Poulaki et al. 2004). El TNF- $\alpha$  puede desempeñar un papel en este proceso, un trabajo mostró que la delección del gen TNF- $\alpha$  disminuye la leucostasis, la muerte celular en la retina y la permeabilidad vascular en ratones diabéticos (Huang, Gandhi et al. 2011). *Arita et al.* encontraron que los niveles de TNF- $\alpha$  y receptores de TNF solubles, se incrementaron en sueros de pacientes con RD y este hecho se correlacionó con la gravedad de la enfermedad. Además, el TNF- $\alpha$  de sueros de pacientes con RD activó células endoteliales en cultivo, aumentando la actividad Rho kinasa (ROCK) enzima río abajo en la vía de señalización que conduce a la expresión de ICAM-1 (Arita,



Nakao et al. 2013). La activación de TNF- $\alpha$  y ROCK también desencadenó la translocación de integrinas CD18 y CD11b a la superficie de neutrófilos, lo que permite la unión a ICAM-1 (Arita, Hata et al. 2009, Arita, Hata et al. 2010). Al mismo tiempo un trabajo reciente señala a ROCK como posible blanco terapéutico de enfermedades vitreoretinales (Yamaguchi, Nakao et al. 2017). Estos datos sugieren que el TNF- $\alpha$  elevado a nivel sistémico puede aumentar la adhesividad del endotelio de la retina y la capacidad de los leucocitos de adherirse. Estos resultados indican además que los procesos que conducen a la leucostasis pueden no originarse en la retina, sino más bien son el resultado de una inflamación sistémica baja pero persistente causada por la diabetes. De hecho, un estudio clínico de 11 pacientes con RD severa refractaria a la terapia convencional encontró que la administración sistémica de un anticuerpo bloqueador del TNF- $\alpha$  (infliximab) produjo un aumento significativo del 24% en la agudeza visual (Sfikakis, Grigoropoulos et al. 2010). Colectivamente, estos estudios sustentan el rol de la inflamación sistémica y el TNF- $\alpha$  como potenciales dianas terapéuticas para DR. En este trabajo de tesis nos enfocamos en evaluar los niveles de TNF- $\alpha$  en los grupos en estudio. Como era de preverse encontramos que los animales diabéticos presentaron mayores niveles que el grupo control tanto en suero como en retina, sugiriendo un estado proinflamatorio superior. Mientras que el grupo que recibió AAT tuvo una marcada disminución de TNF- $\alpha$  tanto sistémico como en el microambiente de la retina (Figuras 14 y 15). A partir de estos resultados demostramos que el tratamiento con AAT es capaz de disminuir una de las citoquinas proinflamatorias más potentes en el desarrollo de la diabetes y su complicación retinal.

Como hemos mencionado el sistema inmune innato ha adquirido importancia en las patologías asociadas a la diabetes (Xu and Chen 2017). Una de las principales células del sistema inmune innato, los macrófagos, se han descrito ampliamente en diversas patologías que poseen componentes inflamatorios. Sin embargo, su rol en la retinopatía diabética aún no ha sido esclarecido completamente. La comunidad científica ha descrito que los macrófagos tienen al menos 2 perfiles inmunológicos: un perfil de tipo 1 (M1) y uno de tipo 2 (M2) (Martinez, 2014). Los macrófagos M1, están asociados directamente a un estado proinflamatorio con la secreción de citoquinas como TNF- $\beta$  e IL-1 $\beta$ , aumento de la expresión y actividad de la enzima iNOS, aumento en la expresión de moléculas de co-estimulo y presentación antigénica entre otras (Gordon, 2017). Mientras que por otro lado los macrófagos M2 se han descrito como un perfil de tipo anti-inflamatorio, con la expresión de moléculas como TGF- $\beta$ , IL-10, disminución y aumento en la actividad y expresión de iNOS y Arginasa 1 respectivamente (Martinez and Gordon 2014). Se los ha señalado con un potencial rol benéfico en diferentes tejidos y patologías. En este sentido, es interesante subrayar que un trabajo reciente mostró que macrófagos previamente tratados con AAT exhibían cierta semejanza a un perfil M2 (Churg, Wang et al. 2007).

Por las razones mencionadas es que en este trabajo nos enfocamos en el posible rol inmuno-modulador de AAT sobre la microglia/macrófagos en el modelo animal de retinopatía diabética. En primer lugar quisimos señalar la presencia de la microglia/macrófagos en la retina y demostramos por qPCR que los niveles de ARN mensajero de F4/80 en toda la retina se vieron aumentados en los animales diabéticos (Figura 17). Luego, por citometría de flujo, vimos que

el porcentaje de células doble positivas F4/80<sup>+</sup> son más altos en los animales diabéticos tratados con AAT y sin tratar (Figuras 16). De esta manera demostramos que las retinas diabéticas en nuestro modelo presentan un mayor número de células microglia/macrófagos que en las retinas sanas (control). Este hecho ha sido previamente descrito en algunos trabajos (Nakazawa, Hisatomi et al. 2007, Rangasamy, McGuire et al. 2014). Como el estado inflamatorio fue disminuido en los animales diabéticos que recibieron AAT respecto de los diabéticos sin tratar, nos enfocamos en el perfil inflamatorio de estas células. Demostramos por primera vez que en la retina los animales que fueron tratados con AAT presentaron porcentajes aumentados de células doble positivas F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup> (Figura 19). Se ha descrito que los macrófagos con un perfil M2 expresan el marcador de superficie CD206, se caracterizan también por una menor expresión y actividad de iNOS y mayor expresión y actividad Arginasa-1 (Martinez and Gordon 2014, Gordon and Pluddemann 2017). En este trabajo de tesis mostramos que en la retina de los animales diabéticos tratados con AAT los niveles de transcripción de las enzimas iNOS y Arginasa-1 disminuyeron y aumentaron, respectivamente. Este resultado coincide con un perfil M2 (Figura 16). Por otro lado, algunas citoquinas son capaces de modular el perfil de los macrófagos. En particular se ha observado que IL-13 e IL-4 pueden modular macrófagos a un perfil M2 con alta expresión de Arginasa 1 en ratones (Van Dyken and Locksley 2013). Un modelo en ratón de uveítis inducida por LPS, una inyección de IL-13 recombinante fue capaz de reducir la inflamación en el humor vítreo (Lemaitre, Thillaye-Goldenberg et al. 2001). En nuestro estudio encontramos aumento de la producción de IL-13 en la retina de los animales tratados con AAT (Tabla 4). En conjunto, nuestros hallazgos muestran: a. mayor

porcentaje de células F4/80<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>, b. disminución y aumento de los transcritos de iNOS, arg1 respectivamente, c. aumento del *fold change* de IL-13 en la retina, y d. descenso marcado en los valores de TNF- $\alpha$ . Estos resultados apoyan la idea que AAT fue capaz de modular aun perfil M2 la microglia/macrófagos que se encuentran en la retina de los animales diabéticos. En este trabajo no pudimos detectar IL-10, la cual es una citoquina característica de un perfil M2. Es importante señalar que los trastornos metabólicos como la diabetes están asociados con un estado de inflamación crónica de bajo grado y quizá esta sea la respuesta a la imposibilidad de detectar IL-10. Otra explicación podría estar relacionada al tiempo de duración de la diabetes, tiempos más prolongados permitirían lograr un estado inflamatorio aún mayor. Por otro lado, IL-4, una citoquina señalada como moduladora a un perfil M2, no sufrió cambios significativos en suero y retina analizada en el microarreglo en animales diabéticos tratados con AAT respecto de los diabéticos sin tratar.

La administración de AAT sería responsable de la menor producción de citoquinas proinflamatorias como vimos en el modelo *in vivo*. Esta modulación junto con un estado inflamatorio disminuido podría ser la causa de las mejoras observadas en el adelgazamiento de la retina y la pérdida de células ganglionares (Figuras 12 y 13). Sin embargo, en nuestro modelo *in vivo* también hemos visto que los animales tratados con AAT mostraron mayores niveles de CCL3 y CCL5 en la retina, así como mayores niveles sistémicos de CCL1 (Tabla 4). Estas citoquinas son quimio-atrayentes para varios tipos de células, incluyendo macrófagos y pueden ser responsables del aumento en el número de células F4/80<sup>+</sup> en la retina como se muestra en este trabajo (Figuras 16 y 17). Es importante destacar que no se observaron diferencias en el número total de

glóbulos blancos (Figura 20) por lo tanto el mayor número de células F4/80<sup>+</sup> no se puede atribuir a un aumento en la población general de leucocitos.

Por otro lado, se define a la familia de moléculas de bajo peso molecular y estructura homóloga responsables de la quimiotaxis de los leucocitos como quemoquinas. En la actualidad se conocen diversas quemoquinas para distintos tipos particulares de células. En particular los linfocitos T vírgenes viajan a zonas denominadas T específicas de los ganglios linfáticos secundarios donde hay mayor expresión de CCL19 y CCL21. Mientras que los linfocitos B vírgenes reconocen la quemoquina CXCL13 producida por los folículos donde se encuentran las células dendríticas foliculares que durante una respuesta inmunológica van a dar origen a los centros germinales. Al mismo tiempo una se ha demostrado que las quemoquinas presentan características pro-inflamatorias debido a su potencial para reclutar células a nichos inflamatorios (Navarro-Gonzalez and Mora-Fernandez 2008). Sugerimos que un mayor número de macrófagos a la retina no sería perjudicial de la enfermedad, incluso podría desempeñar un papel beneficioso debido a su capacidad para interrumpir el contexto pro-inflamatorio observado en la diabetes temprana como se ha sugerido en algunos trabajos (Kriegel, Rathinam et al. 2012). De hecho, un aumento del número de macrófagos M2 en la retina diabética no tratada (Figura 19) puede indicar un mecanismo de retroalimentación contra el proceso inflamatorio que no podría ser lo suficientemente eficiente. Sin embargo, el tratamiento con AAT aumenta el número de esas células, mantiene un microambiente antiinflamatorio que a su vez se refleja en mejores resultados clínicos. Además, sugerimos que la administración de AAT podría ser beneficiosa no sólo en nuestro modelo animal, sino también en otros modelos

que necesitan aumentar la capacidad regenerativa o de reconstrucción de los macrófagos con un perfil de M2 o incluso para los pacientes con DR. Es necesaria una investigación adicional para evaluar este efecto potencialmente beneficioso.

Además, en este trabajo de tesis, demostramos que las líneas de macrófagos Raw 264.1 y J774.2 incubadas con AAT aumentaron el porcentaje de células CD206<sup>+</sup> con respecto a aquellos cultivos que no recibieron AAT (Figura 31). Por lo tanto, AAT fue capaz de modular la expresión de CD206<sup>+</sup> en ambas líneas de células de macrófagos. Consecuentemente, AAT tuvo la capacidad para modular los macrófagos a un perfil antiinflamatorio tanto *in vivo* como *in vitro*. También demostramos que los macrófagos Raw 264.1 y J774.2 expuestos a AAT presentaron un aumento de la capacidad migratoria (Figura 29). Este efecto no fue específico para este tipo celular ya que también lo vimos en células endoteliales humanas (Hmec-1) (Figura 30). Es importante mencionar que la magnitud del cambio en la capacidad migratoria fue mayor en las Hmec-1 (Figura 29 vs Figura 30). Creemos que esto se debe en parte a que la AAT utilizada en estos ensayos es de origen humana al igual que este tipo celular, mientras que las líneas de macrófagos utilizadas fueron de ratón. En este sentido, y con el fin de buscar una posible explicación que nos permitiera explicar mediante algún mecanismo porque AAT aumentó la capacidad migratoria en dichas células realizamos ensayos de inmunoprecipitación. Los mismos se realizaron a partir de un lisado de las células Hmec-1 seguido de un análisis de espectrometría de masas. En estos ensayos hemos encontrado 3 posibles proteínas que estarían relacionadas con alguno de los efectos mostrados en este trabajo de tesis: Plectin, Thrombospodin-1 y NuMA (Tabla 5).

Al mismo tiempo mostramos que AAT se sobre-expresa en células Hmec-1 especialmente cuando se encuentran en división (Figura 36). Es interesante mencionar particular la proteína NuMA está vinculada directamente con el proceso de división celular. NuMA es una proteína abundante de 240 kDa con capacidad de unión a los microtúbulos (MTs) a través de su región carboxilo terminal. Estructuralmente, se ha demostrado que tiene un alto potencial para formar polímeros filamentosos. Durante la interfase celular, NuMA se localiza dentro del núcleo, pero rápidamente se redistribuye a los centrosomas durante la mitosis. NuMA se asocia con los MTs ya que se une a los extremos libres de estos y convergen en los polos del uso mitótico siendo un componente de los centrosomas (Zeng 2000). Como muchas proteínas involucradas en la división celular la localización y la función de NuMA está regulada por fosforilación y desfosforilación (Radulescu and Cleveland 2010). Si bien la relación entre AAT y NUMA es incierta, este trabajo de tesis sugiere que estas proteínas están interaccionando durante el proceso de división celular, al menos en células endoteliales humanas *in vitro*.

Por otro lado, la proteína Plectin es una proteína grande de 500 kDa, normalmente se expresa en diversos tejidos incluyendo piel, músculo y cerebro. También se ha encontrado su expresión en retina (*The Human Protein Atlas*) (Castañón, 2013). Se asocia a los filamentos intermedios del citoesqueleto y presenta propiedades de andamiaje y señalización, que afecta a las propiedades mecánicas y dinámicas del citoesqueleto. En células normales desempeña un papel crucial en la organización de la red del citoesqueleto (Castanon, Walko et al. 2013). Fibroblastos aislados de ratones deficientes en Plectin presentaban anomalías en su citoesqueleto de actina y alteración del potencial migratorio

(Abrahamsberg, Fuchs et al. 2005). Además, Plectin es un biomarcador robusto para el adenocarcinoma pancreático. La expresión aberrante y pérdida en la localización (*mislocalization*) de Plectin impulsa la proliferación, migración e invasión en células en cáncer de páncreas (Shin, Smith et al. 2013). En este trabajo de tesis observamos un aumento en la capacidad migratoria en distintos tipos celulares que fueron tratados con AAT, al mismo tiempo encontramos que AAT y Plectin interaccionan. Nos parece razonable pensar que una interacción entre estas 2 proteínas es la responsable de aumentar la capacidad migratoria en los distintos tipos celulares evaluados, pero mayores investigaciones deben realizarse para poder corroborar estos resultados.

La proteína TSP-1 es una glicoproteína de la matriz extracelular (ME) que está fuertemente vinculada al proceso de angiogénesis y la progresión tumoral. Influye en el fenotipo celular y en la estructura de la ME, media las interacciones de célula a célula y de célula a ME (Chen, Herndon et al. 2000). Trabajos han demostrado que mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores que se producen dentro de las células tumorales se asocian con frecuencia a la disminución de la expresión de la TSP-1. Sin embargo, el TSP-1 producido por fibroblastos, células endoteliales y las células del sistema inmune es capaz de suprimir la progresión del tumor (Quail and Joyce 2013). TSP-1 inhibe la angiogénesis mediante efectos directos sobre la migración y supervivencia de células endoteliales y mediante efectos indirectos sobre la movilización de factores de crecimiento (Watnick 2012). La TSP-1 que está presente en el microambiente tumoral también actúa para suprimir el crecimiento de células tumorales mediante la activación del TGF- $\beta$  en aquellas células tumorales que responden al TGF- $\beta$ . Incluso se ha señalado a TSP-1 como el activador principal



TGF $\beta$ 1 (Lopez-Dee, Pidcock et al. 2011). En este trabajo encontramos que células endoteliales tratadas con AAT disminuyeron la capacidad para formar puntos de quiebre (*branching points*) (Figura 32), pensamos que puede existir una modulación positiva de TSP-1 por parte de AAT para inhibir la producción de puntos de quiebre en Hmec-1. Es importante remarcar que los macrófagos son una fuente de TPS-1 el cual se produce por intermedio de TLR-4 (Fordham, Hua et al. 2012, Stein, Miller et al. 2016). En nuestro modelo *in vivo* medimos la expresión de TSP-1 en toda la retina y encontramos una disminución en el grupo diabético que recibió AAT. Este resultado sería contradictorio a los hallazgos resultados *in vitro*, sin embargo la modulación *in vivo* en la expresión de TSP-1 es más compleja y un análisis más profundo debe realizarse para poder encontrar un vínculo entre estas 2 proteínas.

Si bien la relación entre las proteínas Plectin, NuMA, TSP1 y AAT no se conocen, en este trabajo de tesis demostramos que existe una interacción entre ellas. Parece al menos evidente que existe relación entre Plectin, NuMA y AAT en el proceso de división celular. Sin embargo, cómo estas proteínas modulan su expresión y qué relación existe entre los efectos mencionados debe ser estudiado con más detalle para poder encontrar algún beneficio funcional.

En resumen, en la actualidad no existen tratamientos para las etapas tempranas de la RD. En este contexto, un mayor conocimiento sobre la fisiopatología de la enfermedad ha despertado el uso de nuevas terapias. Drogas que generen una demora en el proceso neurodegenerativo relacionado al afinamiento retinal, así como también que reduzcan los daños relacionados al proceso inflamatorio crónico que genera la diabetes son necesarias. En este trabajo hemos

demostrado por primera vez que AAT fue capaz de disminuir la inflamación y la neurodegeneración retiniana causada por la diabetes en ratones. Se pudo demostrar que los ratones tratados con AAT presentaron una demora en la pérdida de RGC, también estos ratones presentaron una demora en el afinamiento retinal a 8 semanas de diabetes. Estas mejoras estructurales están relacionadas a una inmuno-modulación por parte de AAT de los macrófagos residentes de la retina y una consecuente disminución de moléculas como TNF- $\alpha$  e ICAM-1. Finalmente, estos resultados indican que una terapia con AAT y la aplicación de dosis múltiples en ratones diabéticos podrían representar una nueva herramienta terapéutica para el tratamiento de la RD.

## **CONCLUSIONES**

**De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo de tesis podemos concluir:**

**En cuanto a los resultados *in vivo*:**

Se logro generar un modelo de diabetes de tipo hipoglucémico durante 8 semanas mediante la utilización de estreptozotocina.

Se instalo un tratamiento con fines preventivos de AAT en ratones diabéticos a 8 semanas sin encontrar signos de toxicidad a nivel clínico, histológico y bioquímico.

Se consiguió retrasar los cambios tempranos en la retina de los animales diabéticos:

- a. Se retrasó la perdida de células ganglionares en los ratones diabéticos que recibieron AAT durante un periodo de 8 semanas.
- b. Se consiguió retrasar el afinamiento retinal observado en los ratones diabéticos a 8 semanas mediante el uso de AAT.

Se demostró que AAT fue capaz de reducir los niveles de  $TNF\alpha$  tanto a nivel sistémico (suero) como a nivel de la retina.

Se demostró mediante un microarreglo de citoquinas que el estado inflamatorio de los animales diabéticos tratados con AAT fue menor.

Se confirmó que los animales diabéticos presentaron mayor número de macrófagos en la retina.

Se demostró que AAT fue capaz de modular a un perfil antiinflamatorio los macrófagos encontrados en la retina de los animales diabéticos. Con mayor expresión de CD206<sup>+</sup> y arginasa 1 y menor expresión de iNOS.

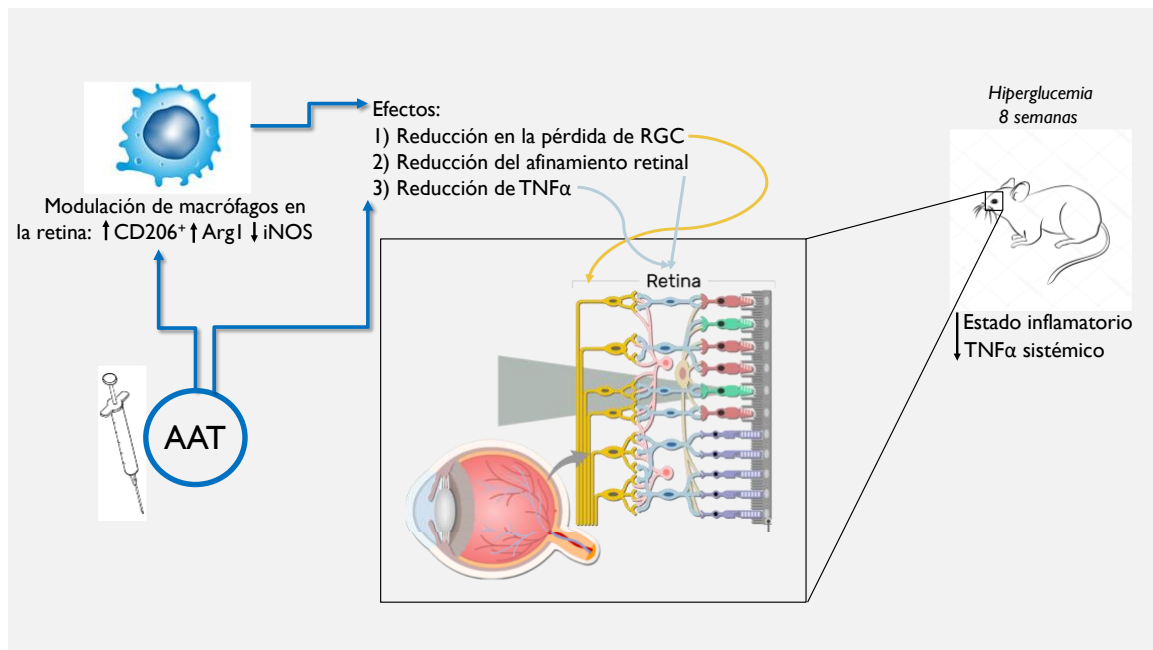
**En cuanto a los resultados *in vitro*:**

Se demostró que AAT fue capaz de modular las líneas celulares de macrófagos con mayor expresión de CD206<sup>+</sup>.

Se demostró que AAT aumenta la capacidad migratoria de la línea celular Hmec-1 así como también de las líneas de macrófagos Raw264.1 y J774.2.

Se encontró aumentada la expresión de AAT durante la división celular en células endoteliales humanas.

Se encontraron interacciones entre AAT y las proteínas Plectin, NuMA y TSP-1 que no han sido descritas en la bibliografía previamente. Sugiriendo un posible rol de AAT en la división celular.



**Figura 37:** Modelo propuesto de los mecanismos del efecto de AAT. Luego de la administración IP de AAT, los niveles sistémicos de TNF $\alpha$  disminuyen en conjunto con un estado inflamatorio disminuido. A nivel de la retina se produce un retraso en la pérdida de células ganglionares (RGC) así como también el afinamiento de la retina. El suministro de AAT produce en conjunto una modulación de los macrófagos de la retina a un perfil M2. La modulación hacia un perfil M2 sería necesaria para la disminución en los niveles de TNF $\alpha$  en la retina y las mejoras estructurales mencionadas.

Finalmente, los resultados de la presente tesis presentan el potencial uso de AAT para prevenir los cambios tempranos que se producen en la retina debido a la hiperglucemia crónica. Al mismo tiempo abren una puerta para investigaciones futuras sobre AAT y su posible rol terapéutico en la retinopatía diabética.

## **REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

Abcouwer, S. F. (2011). "Neural inflammation and the microglial response in diabetic retinopathy." J Ocul Biol Dis Infor **4**(1-2): 25-33.

Abcouwer, S. F. and D. A. Antonetti (2013). "A role for systemic inflammation in diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(3): 2384.

Abrahamsberg, C., P. Fuchs, S. Osmanagic-Myers, I. Fischer, F. Propst, A. Elbe-Burger and G. Wiche (2005). "Targeted ablation of plectin isoform 1 uncovers role of cytolinker proteins in leukocyte recruitment." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(51): 18449-18454.

Antonetti, D. A., A. J. Barber, S. K. Bronson, W. M. Freeman, T. W. Gardner, L. S. Jefferson, M. Kester, S. R. Kimball, J. K. Krady, K. F. LaNoue, C. C. Norbury, P. G. Quinn, L. Sandirasegarane, I. A. Simpson and J. D. R. C. Group (2006). "Diabetic retinopathy: seeing beyond glucose-induced microvascular disease." Diabetes **55**(9): 2401-2411.

Antonetti, D. A., R. Klein and T. W. Gardner (2012). "Diabetic retinopathy." N Engl J Med **366**(13): 1227-1239.

Arita, R., Y. Hata and T. Ishibashi (2010). "ROCK as a Therapeutic Target of Diabetic Retinopathy." J Ophthalmol **2010**: 175163.

Arita, R., Y. Hata, S. Nakao, T. Kita, M. Miura, S. Kawahara, S. Zandi, L. Almulki, F. Tayyari, H. Shimokawa, A. Hafezi-Moghadam and T. Ishibashi (2009). "Rho kinase inhibition by fasudil ameliorates diabetes-induced microvascular damage." Diabetes **58**(1): 215-226.

Arita, R., S. Nakao, T. Kita, S. Kawahara, R. Asato, S. Yoshida, H. Enaida, A. Hafezi-Moghadam and T. Ishibashi (2013). "A key role for ROCK in TNF-alpha-mediated diabetic microvascular damage." Invest Ophthalmol Vis Sci **54**(3): 2373-2383.

Babel, J. and J. P. Houbert (1970). "[Anatomy and histology of the retina]." Arch Ophthalmol Rev Gen Ophthalmol **30**(3): 257-275.

Bai, Y., J. X. Ma, J. Guo, J. Wang, M. Zhu, Y. Chen and Y. Z. Le (2009). "Muller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization." J Pathol **219**(4): 446-454.

Barber, A. J., E. Lieth, S. A. Khin, D. A. Antonetti, A. G. Buchanan and T. W. Gardner (1998). "Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin." J Clin Invest **102**(4): 783-791.

Behl, Y., P. Krothapalli, T. Desta, A. DiPiazza, S. Roy and D. T. Graves (2008). "Diabetes-enhanced tumor necrosis factor-alpha production promotes apoptosis and the loss of retinal microvascular cells in type 1 and type 2 models of diabetic retinopathy." Am J Pathol **172**(5): 1411-1418.

Behl, Y., P. Krothapalli, T. Desta, S. Roy and D. T. Graves (2009). "FOXO1 plays an important role in enhanced microvascular cell apoptosis and microvascular cell loss in type 1 and type 2 diabetic rats." Diabetes **58**(4): 917-925.

Ben M'Barek, K., F. Regent and C. Monville (2015). "Use of human pluripotent stem cells to study and treat retinopathies." World J Stem Cells **7**(3): 596-604.

Bogdanov, P., L. Corraliza, J. A. Villena, A. R. Carvalho, J. Garcia-Arumi, D. Ramos, J. Ruberte, R. Simo and C. Hernandez (2014). "The db/db mouse: a useful model for the study of diabetic retinal neurodegeneration." PLoS One **9**(5): e97302.

Bouma, G., W. K. Lam-Tse, A. F. Wierenga-Wolf, H. A. Drexhage and M. A. Versnel (2004). "Increased serum levels of MRP-8/14 in type 1 diabetes induce an increased expression of CD11b and an enhanced adhesion of circulating monocytes to fibronectin." Diabetes **53**(8): 1979-1986.

Bradshaw, E. M., K. Raddassi, W. Elyaman, T. Orban, P. A. Gottlieb, S. C. Kent and D. A. Hafler (2009). "Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells." J Immunol **183**(7): 4432-4439.



Bressler, N. M., A. R. Edwards, A. N. Antoszyk, R. W. Beck, D. J. Browning, A. P. Ciardella, R. P. Danis, M. J. Elman, S. M. Friedman, A. R. Glassman, J. G. Gross, H. K. Li, T. J. Murtha, T. W. Stone, J. K. Sun and N. Diabetic Retinopathy Clinical Research (2008). "Retinal thickness on Stratus optical coherence tomography in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy." Am J Ophthalmol **145**(5): 894-901.

Bringmann, A., T. Pannicke, J. Grosche, M. Francke, P. Wiedemann, S. N. Skatchkov, N. N. Osborne and A. Reichenbach (2006). "Muller cells in the healthy and diseased retina." Prog Retin Eye Res **25**(4): 397-424.

Cai, X. and J. F. McGinnis (2016). "Diabetic Retinopathy: Animal Models, Therapies, and Perspectives." J Diabetes Res **2016**: 3789217.

Campbell, J. P., M. Zhang, T. S. Hwang, S. T. Bailey, D. J. Wilson, Y. Jia and D. Huang (2017). "Detailed Vascular Anatomy of the Human Retina by Projection-Resolved Optical Coherence Tomography Angiography." Sci Rep **7**: 42201.

Campos, M., D. Shmuels and J. Walsh (2012). "Detection of alpha-1 antitrypsin deficiency in the US." Am J Med **125**(7): 623-624.

Carrell, R. W., D. L. Evans and P. E. Stein (1991). "Mobile reactive centre of serpins and the control of thrombosis." Nature **353**(6344): 576-578.

Castanon, M. J., G. Walko, L. Winter and G. Wiche (2013). "Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve." Histochem Cell Biol **140**(1): 33-53.

Claria, J., A. Gonzalez-Periz, C. Lopez-Vicario, B. Rius and E. Titos (2011). "New insights into the role of macrophages in adipose tissue inflammation and Fatty liver disease: modulation by endogenous omega-3 Fatty Acid-derived lipid mediators." Front Immunol **2**: 49.

Collins, C. B., C. M. Aherne, S. F. Ehrentraut, M. E. Gerich, E. N. McNamee, M. C. McManus, M. D. Lebsack, P. Jedlicka, T. Azam, E. F. de Zoeten, C. A. Dinarello and J. Rivera-Nieves (2013). "Alpha-1-antitrypsin therapy ameliorates acute colitis and chronic murine ileitis." Inflamm Bowel Dis **19**(9): 1964-1973.

Combadiere, C., C. Feumi, W. Raoul, N. Keller, M. Rodero, A. Pezard, S. Lavalette, M. Houssier, L. Jonet, E. Picard, P. Debre, M. Sirinyan, P. Deterre, T. Ferroukhi, S. Y. Cohen, D. Chauvaud, J. C. Jeanny, S. Chemtob, F. Behar-Cohen and F. Sennlaub (2007). "CX3CR1-dependent subretinal microglia cell accumulation is associated with cardinal features of age-related macular degeneration." J Clin Invest **117**(10): 2920-2928.

Chalam, K. V., S. B. Bressler, A. R. Edwards, B. B. Berger, N. M. Bressler, A. R. Glassman, S. Grover, S. K. Gupta, J. S. Nielsen and N. Diabetic Retinopathy Clinical Research (2012). "Retinal thickness in people with diabetes and minimal or no diabetic retinopathy: Heidelberg Spectralis optical coherence tomography." Invest Ophthalmol Vis Sci **53**(13): 8154-8161.

Chan, E. D., G. B. Pott, P. E. Silkoff, A. H. Ralston, C. L. Bryan and L. Shapiro (2012). "Alpha-1-antitrypsin inhibits nitric oxide production." J Leukoc Biol **92**(6): 1251-1260.

Chen, H., M. E. Herndon and J. Lawler (2000). "The cell biology of thrombospondin-1." Matrix Biol **19**(7): 597-614.

Cherry, J. D., J. A. Olschowka and M. K. O'Banion (2014). "Neuroinflammation and M2 microglia: the good, the bad, and the inflamed." J Neuroinflammation **11**: 98.

Cheung, N., P. Mitchell and T. Y. Wong (2010). "Diabetic retinopathy." Lancet **376**(9735): 124-136.

Churg, A., X. Wang, R. D. Wang, S. C. Meixner, E. L. Pryzdial and J. L. Wright (2007). "Alpha1-antitrypsin suppresses TNF-alpha and MMP-12 production by cigarette smoke-stimulated macrophages." Am J Respir Cell Mol Biol **37**(2): 144-151.

Davis, M. J., T. M. Tsang, Y. Qiu, J. K. Dayrit, J. B. Freij, G. B. Huffnagle and M. A. Olszewski (2013). "Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection." MBio **4**(3): e00264-00213.

de Serres, F. J., I. Blanco and E. Fernandez-Bustillo (2007). "PI S and PI Z alpha-1 antitrypsin deficiency worldwide. A review of existing genetic epidemiological data." Monaldi Arch Chest Dis **67**(4): 184-208.

Devaraj, S., I. Jialal, J. M. Yun and A. Bremer (2011). "Demonstration of increased toll-like receptor 2 and toll-like receptor 4 expression in monocytes of type 1 diabetes mellitus patients with microvascular complications." Metabolism **60**(2): 256-259.

Feit-Leichman, R. A., R. Kinouchi, M. Takeda, Z. Fan, S. Mohr, T. S. Kern and D. F. Chen (2005). "Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes." Invest Ophthalmol Vis Sci **46**(11): 4281-4287.

Fleixo-Lima, G., H. Ventura, M. Medini, L. Bar, P. Strauss and E. C. Lewis (2014). "Mechanistic evidence in support of alpha1-antitrypsin as a therapeutic approach for type 1 diabetes." J Diabetes Sci Technol **8**(6): 1193-1203.

Fordham, J. B., J. Hua, S. R. Morwood, L. P. Schewitz-Bowers, D. A. Copland, A. D. Dick and L. B. Nicholson (2012). "Environmental conditioning in the control of macrophage thrombospondin-1 production." Sci Rep **2**: 512.

Forrester, J. V. and H. Xu (2012). "Good news-bad news: the Yin and Yang of immune privilege in the eye." Front Immunol **3**: 338.

Forrester, J. V., H. Xu, T. Lambe and R. Cornall (2008). "Immune privilege or privileged immunity?" Mucosal Immunol **1**(5): 372-381.

Forstermann, U. and W. C. Sessa (2012). "Nitric oxide synthases: regulation and function." Eur Heart J **33**(7): 829-837, 837a-837d.

Fukuda, M. (1994). "Classification and treatment of diabetic retinopathy." Diabetes Res Clin Pract **24 Suppl**: S171-176.

Gaucher, D., J. A. Chiappore, M. Paques, M. Simonutti, C. Boitard, J. A. Sahel, P. Massin and S. Picaud (2007). "Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy." Vision Res **47**(5): 612-623.

Gils, A. and P. J. Declerck (1998). "Structure-function relationships in serpins: current concepts and controversies." Thromb Haemost **80**(4): 531-541.

Gordon, S. and A. Pluddemann (2017). "Tissue macrophages: heterogeneity and functions." BMC Biol **15**(1): 53.

Grant-Kels, J. M. and B. D. Kels (1992). "Human ocular anatomy." Dermatol Clin **10**(3): 473-482.

Greter, M., I. Lelios and A. L. Croxford (2015). "Microglia Versus Myeloid Cell Nomenclature during Brain Inflammation." Front Immunol **6**: 249.

Guerrero, A. R., K. Uchida, H. Nakajima, S. Watanabe, M. Nakamura, W. E. Johnson and H. Baba (2012). "Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice." J Neuroinflammation **9**: 40.

Gunn, R. M. and E. A. Schafer (1877). "A Contribution to the Minute Anatomy of the Human Retina." J Anat Physiol **11**(Pt 3): 357-516.

Hatanaka, E., P. T. Monteagudo, M. S. Marrocos and A. Campa (2006). "Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes." Clin Exp Immunol **146**(3): 443-447.

Hattenbach, L. O., A. Allers, C. Klais, F. Koch and M. Hecker (2000). "L-Arginine-nitric oxide pathway-related metabolites in the aqueous humor of diabetic patients." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(1): 213-217.

Heng, L. Z., O. Comyn, T. Peto, C. Tadros, E. Ng, S. Sivaprasad and P. G. Hykin (2013). "Diabetic retinopathy: pathogenesis, clinical grading, management and future developments." Diabet Med **30**(6): 640-650.

Henkind, P. (1967). "Radial peripapillary capillaries of the retina. I. Anatomy: human and comparative." Br J Ophthalmol **51**(2): 115-123.

Hollander, H., F. Makarov, Z. Dreher, D. van Driel, T. L. Chan-Ling and J. Stone (1991). "Structure of the macroglia of the retina: sharing and division of labour between astrocytes and Muller cells." J Comp Neurol **313**(4): 587-603.

Hoshino, A., R. Ratnapriya, M. J. Brooks, V. Chaitankar, M. S. Wilken, C. Zhang, M. R. Starostik, L. Gieser, A. La Torre, M. Nishio, O. Bates, A. Walton, O. Bermingham-McDonogh, I. A. Glass, R. O. L. Wong, A. Swaroop and T. A. Reh (2017). "Molecular Anatomy of the Developing Human Retina." Dev Cell **43**(6): 763-779 e764.

Huang, H., J. K. Gandhi, X. Zhong, Y. Wei, J. Gong, E. J. Duh and S. A. Vinores (2011). "TNFalpha is required for late BRB breakdown in diabetic retinopathy, and its inhibition prevents leukostasis and protects vessels and neurons from apoptosis." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(3): 1336-1344.

Jansson, L. and C. Hellerstrom (1981). "A rapid method of visualizing the pancreatic islets for studies of islet capillary blood flow using non-radioactive microspheres." Acta Physiol Scand **113**(3): 371-374.

Jansson, L. and S. Sandler (1986). "Alloxan-induced diabetes in the mouse: time course of pancreatic B-cell destruction as reflected in an increased islet vascular permeability." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **410**(1): 17-21.

Jiang, X., L. Yang and Y. Luo (2015). "Animal Models of Diabetic Retinopathy." Curr Eye Res **40**(8): 761-771.

Jonas, J. B. (2007). "Intravitreal triamcinolone acetonide for diabetic retinopathy." Dev Ophthalmol **39**: 96-110.

Jonigk, D., M. Al-Omari, L. Maegel, M. Muller, N. Izykowski, J. Hong, K. Hong, S. H. Kim, M. Dorsch, R. Mahadeva, F. Laenger, H. Kreipe, A. Braun, G. Shahaf, E. C. Lewis, T. Welte, C. A. Dinarello and S. Janciauskiene (2013). "Anti-inflammatory and immunomodulatory properties of alpha1-antitrypsin without inhibition of elastase." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(37): 15007-15012.

Joussen, A. M., V. Poulaki, M. L. Le, K. Koizumi, C. Esser, H. Janicki, U. Schraermeyer, N. Kociok, S. Fauser, B. Kirchhof, T. S. Kern and A. P. Adamis (2004). "A central role for inflammation in the pathogenesis of diabetic retinopathy." FASEB J **18**(12): 1450-1452.

Joussen, A. M., V. Poulaki, N. Mitsiades, B. Kirchhof, K. Koizumi, S. Dohmen and A. P. Adamis (2002). "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs prevent early diabetic retinopathy via TNF-alpha suppression." FASEB J **16**(3): 438-440.

Joussen, F. and M. Spitznas (1972). "The fine structure of the human retina at the ora serrata." Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol **185**(3): 177-188.

Kels, B. D., A. Grzybowski and J. M. Grant-Kels (2015). "Human ocular anatomy." Clin Dermatol **33**(2): 140-146.

Kern, T. S. (2007). "Contributions of inflammatory processes to the development of the early stages of diabetic retinopathy." Exp Diabetes Res **2007**: 95103.

Kirkwood, B. J. (2012). "Anatomy of the retina." Insight **37**(4): 5-8.

Kohzaki, K., A. J. Vingrys and B. V. Bui (2008). "Early inner retinal dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **49**(8): 3595-3604.

Kolb, H. (1995). Glial Cells of the Retina. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. H. Kolb, E. Fernandez and R. Nelson. Salt Lake City (UT).

Kolb, H. (1995). Simple Anatomy of the Retina. Webvision: The Organization of the Retina and Visual System. H. Kolb, E. Fernandez and R. Nelson. Salt Lake City (UT).

Kollias, A. N. and M. W. Ulbig (2010). "Diabetic retinopathy: Early diagnosis and effective treatment." Dtsch Arztebl Int **107**(5): 75-83; quiz 84.

Korkmaz, B., M. S. Horwitz, D. E. Jenne and F. Gauthier (2010). "Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases." Pharmacol Rev **62**(4): 726-759.

Koulmanda, M., M. Bhasin, L. Hoffman, Z. Fan, A. Qipo, H. Shi, S. Bonner-Weir, P. Putheti, N. Degauque, T. A. Libermann, H. Auchincloss, Jr., J. S. Flier and T. B. Strom (2008). "Curative and beta cell regenerative effects of alpha1-antitrypsin treatment in autoimmune diabetic NOD mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16242-16247.

Krady, J. K., A. Basu, C. M. Allen, Y. Xu, K. F. LaNoue, T. W. Gardner and S. W. Levison (2005). "Minocycline reduces proinflammatory cytokine expression, microglial activation, and caspase-3 activation in a rodent model of diabetic retinopathy." Diabetes **54**(5): 1559-1565.

Kriegel, M. A., C. Rathinam and R. A. Flavell (2012). "Pancreatic islet expression of chemokine CCL2 suppresses autoimmune diabetes via tolerogenic CD11c+ CD11b+ dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(9): 3457-3462.

Kumar, S. and L. Zhuo (2010). "Longitudinal in vivo imaging of retinal gliosis in a diabetic mouse model." Exp Eye Res **91**(4): 530-536.

Larsson, A., M. Palm, L. O. Hansson, S. Basu and O. Axelsson (2008). "Reference values for alpha1-acid glycoprotein, alpha1-antitrypsin, albumin, haptoglobin, C-reactive protein, IgA, IgG and IgM during pregnancy." Acta Obstet Gynecol Scand **87**(10): 1084-1088.

Leal, E. C., A. Manivannan, K. Hosoya, T. Terasaki, J. Cunha-Vaz, A. F. Ambrosio and J. V. Forrester (2007). "Inducible nitric oxide synthase isoform is a key mediator of leukostasis and blood-retinal barrier breakdown in diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **48**(11): 5257-5265.

Leasher, J. L., R. R. Bourne, S. R. Flaxman, J. B. Jonas, J. Keeffe, K. Naidoo, K. Pesudovs, H. Price, R. A. White, T. Y. Wong, S. Resnikoff, H. R. Taylor and S. Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease (2016). "Global Estimates on the Number of People Blind or Visually Impaired by Diabetic Retinopathy: A Meta-analysis From 1990 to 2010." Diabetes Care **39**(9): 1643-1649.

Lemaitre, C., B. Thillaye-Goldenberg, M. C. Naud and Y. de Kozak (2001). "The effects of intraocular injection of interleukin-13 on endotoxin-induced uveitis in rats." Invest Ophthalmol Vis Sci **42**(9): 2022-2030.

Lewis, E. C. (2012). "Expanding the clinical indications for alpha(1)-antitrypsin therapy." Mol Med **18**: 957-970.

Lewis, E. C., M. Mizrahi, M. Toledano, N. Defelice, J. L. Wright, A. Churg, L. Shapiro and C. A. Dinarello (2008). "alpha1-Antitrypsin monotherapy induces immune tolerance during islet allograft transplantation in mice." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(42): 16236-16241.

Lior, Y., A. Geyra and E. C. Lewis (2016). "Therapeutic compositions and uses of alpha1-antitrypsin: a patent review (2012 - 2015)." Expert Opin Ther Pat **26**(5): 581-589.

Lopez-Dee, Z., K. Pidcock and L. S. Gutierrez (2011). "Thrombospondin-1: multiple paths to inflammation." Mediators Inflamm **2011**: 296069.

Ly, A., P. Yee, K. A. Vessey, J. A. Phipps, A. I. Jobling and E. L. Fletcher (2011). "Early inner retinal astrocyte dysfunction during diabetes and development of hypoxia, retinal stress, and neuronal functional loss." Invest Ophthalmol Vis Sci **52**(13): 9316-9326.

Ma, W., L. Zhao, A. M. Fontainhas, R. N. Fariss and W. T. Wong (2009). "Microglia in the mouse retina alter the structure and function of retinal pigmented epithelial cells: a potential cellular interaction relevant to AMD." *PLoS One* **4**(11): e7945.

Mancini, J. E., G. Ortiz, J. O. Croxatto and J. E. Gallo (2013). "Retinal upregulation of inflammatory and proangiogenic markers in a model of neonatal diabetic rats fed on a high-fat-diet." *BMC Ophthalmol* **13**: 14.

Martin, P. M., P. Roon, T. K. Van Ells, V. Ganapathy and S. B. Smith (2004). "Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **45**(9): 3330-3336.

Martinez, F. O. and S. Gordon (2014). "The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment." *F1000Prime Rep* **6**: 13.

Meleth, A. D., E. Agron, C. C. Chan, G. F. Reed, K. Arora, G. Byrnes, K. G. Csaky, F. L. Ferris, 3rd and E. Y. Chew (2005). "Serum inflammatory markers in diabetic retinopathy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **46**(11): 4295-4301.

Mingorance, C., M. D. Herrera and M. Alvarez De Sotomayor (2009). "[Mechanism involved in aged-related endothelial dysfunction]." *Med Clin (Barc)* **132**(2): 62-69.

Mohr, S., X. Xi, J. Tang and T. S. Kern (2002). "Caspase activation in retinas of diabetic and galactosemic mice and diabetic patients." *Diabetes* **51**(4): 1172-1179.

Moreau, T., K. Baranger, S. Dade, S. Dallet-Choisy, N. Guyot and M. L. Zani (2008). "Multifaceted roles of human elafin and secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI), two serine protease inhibitors of the chelonianin family." *Biochimie* **90**(2): 284-295.

Nadal-Nicolas, F. M., M. Jimenez-Lopez, P. Sobrado-Calvo, L. Nieto-Lopez, I. Canovas-Martinez, M. Salinas-Navarro, M. Vidal-Sanz and M. Agudo (2009). "Brn3a as a marker of retinal ganglion cells: qualitative and quantitative time course studies in naive and optic nerve-injured retinas." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **50**(8): 3860-3868.

Nakazawa, T., T. Hisatomi, C. Nakazawa, K. Noda, K. Maruyama, H. She, A. Matsubara, S. Miyahara, S. Nakao, Y. Yin, L. Benowitz, A. Hafezi-Moghadam and J. W. Miller (2007). "Monocyte chemoattractant protein 1 mediates retinal detachment-induced photoreceptor apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(7): 2425-2430.

Navarro-Gonzalez, J. F. and C. Mora-Fernandez (2008). "The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy." *J Am Soc Nephrol* **19**(3): 433-442.

O'Koren, E. G., R. Mathew and D. R. Saban (2016). "Fate mapping reveals that microglia and recruited monocyte-derived macrophages are definitively distinguishable by phenotype in the retina." *Sci Rep* **6**: 20636.

Omri, S., F. Behar-Cohen, Y. de Kozak, F. Sennlaub, L. M. Verissimo, L. Jonet, M. Savoldelli, B. Omri and P. Crisanti (2011). "Microglia/macrophages migrate through retinal epithelium barrier by a transcellular route in diabetic retinopathy: role of PKCzeta in the Goto Kakizaki rat model." *Am J Pathol* **179**(2): 942-953.

Oshitari, T., S. Yamamoto, N. Hata and S. Roy (2008). "Mitochondria- and caspase-dependent cell death pathway involved in neuronal degeneration in diabetic retinopathy." *Br J Ophthalmol* **92**(4): 552-556.

Ozeri, E., M. Mizrahi, G. Shahaf and E. C. Lewis (2012). "alpha-1 antitrypsin promotes semimature, IL-10-producing and readily migrating tolerogenic dendritic cells." *J Immunol* **189**(1): 146-153.

Perlmutter, D. H. (2011). "Alpha-1-antitrypsin deficiency: importance of proteasomal and autophagic degradative pathways in disposal of liver disease-associated protein aggregates." *Annu Rev Med* **62**: 333-345.

Purves, D. (2001). "Viktor Hamburger 1900-2001." *Nat Neurosci* **4**(8): 777-778.

Quail, D. F. and J. A. Joyce (2013). "Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis." *Nat Med* **19**(11): 1423-1437.

Radulescu, A. E. and D. W. Cleveland (2010). "NuMA after 30 years: the matrix revisited." Trends Cell Biol **20**(4): 214-222.

Rakieten, N., M. L. Rakieten and M. V. Nadkarni (1963). "Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917)." Cancer Chemother Rep **29**: 91-98.

Rakoczy, E. P., I. S. Ali Rahman, N. Binz, C. R. Li, N. N. Vagaja, M. de Pinho and C. M. Lai (2010). "Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization." Am J Pathol **177**(5): 2659-2670.

Rangasamy, S., P. G. McGuire, C. Franco Nitta, F. Monickaraj, S. R. Oruganti and A. Das (2014). "Chemokine mediated monocyte trafficking into the retina: role of inflammation in alteration of the blood-retinal barrier in diabetic retinopathy." PLoS One **9**(10): e108508.

Reichenbach, A. and A. Bringmann (2013). "New functions of Muller cells." Glia **61**(5): 651-678.

Robinson, R., V. A. Barathi, S. S. Chaurasia, T. Y. Wong and T. S. Kern (2012). "Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals." Dis Model Mech **5**(4): 444-456.

Rocher, N. (2010). "[Anatomy and physiology of the human eye]." Soins(744): 30-31.

Rodrigues, E. B., M. G. Urias, F. M. Penha, E. Badaro, E. Novais, R. Meirelles and M. E. Farah (2015). "Diabetes induces changes in neuroretina before retinal vessels: a spectral-domain optical coherence tomography study." Int J Retina Vitreous **1**: 4.

Rungger-Brandle, E., A. A. Dosso and P. M. Leuenberger (2000). "Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy." Invest Ophthalmol Vis Sci **41**(7): 1971-1980.

Sfikakis, P. P., V. Grigoropoulos, I. Emfietzoglou, G. Theodossiadis, N. Tentolouris, E. Delicha, C. Katsiari, K. Alexiadou, E. Hatzigelaki and P. G. Theodossiadis (2010). "Infliximab for diabetic macular edema refractory to laser photocoagulation: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover, 32-week study." Diabetes Care **33**(7): 1523-1528.

Shechter, R., O. Miller, G. Yovel, N. Rosenzweig, A. London, J. Ruckh, K. W. Kim, E. Klein, V. Kalchenko, P. Bendel, S. A. Lira, S. Jung and M. Schwartz (2013). "Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus." Immunity **38**(3): 555-569.

Shin, S. J., J. A. Smith, G. A. Reznicek, S. Pan, R. Chen, T. A. Brentnall, G. Wiche and K. A. Kelly (2013). "Unexpected gain of function for the scaffolding protein plectin due to mislocalization in pancreatic cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(48): 19414-19419.

Silverman, G. A., P. I. Bird, R. W. Carrell, F. C. Church, P. B. Coughlin, P. G. Gettins, J. A. Irving, D. A. Lomas, C. J. Luke, R. W. Moyer, P. A. Pemberton, E. Remold-O'Donnell, G. S. Salvesen, J. Travis and J. C. Whisstock (2001). "The serpins are an expanding superfamily of structurally similar but functionally diverse proteins. Evolution, mechanism of inhibition, novel functions, and a revised nomenclature." J Biol Chem **276**(36): 33293-33296.

Smith, C. W. (1993). "Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation." Can J Physiol Pharmacol **71**(1): 76-87.

Sohn, E. H., H. W. van Dijk, C. Jiao, P. H. Kok, W. Jeong, N. Demirkaya, A. Garmager, F. Wit, M. Kucukevcilioglu, M. E. van Velthoven, J. H. DeVries, R. F. Mullins, M. H. Kuehn, R. O. Schlingemann, M. Sonka, F. D. Verbraak and M. D. Abramoff (2016). "Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus." Proc Natl Acad Sci U S A **113**(19): E2655-2664.

Stein, E. V., T. W. Miller, K. Ivins-O'Keefe, S. Kaur and D. D. Roberts (2016). "Secreted Thrombospondin-1 Regulates Macrophage Interleukin-1beta Production and Activation through CD47." Sci Rep **6**: 19684.

Stein, M., S. Keshav, N. Harris and S. Gordon (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-292.

Steinmetz, C. G. (1981). "Practical anatomy and physiology of the eye and orbit." Occup Health Nurs **29**(6): 7-9.

Stem, M. S. and T. W. Gardner (2013). "Neurodegeneration in the pathogenesis of diabetic retinopathy: molecular mechanisms and therapeutic implications." Curr Med Chem **20**(26): 3241-3250.

Stoller, J. K. and L. S. Aboussouan (2012). "A review of alpha1-antitrypsin deficiency." Am J Respir Crit Care Med **185**(3): 246-259.

Subramanian, S., G. Shahaf, E. Ozeri, L. M. Miller, A. A. Vandembark, E. C. Lewis and H. Offner (2011). "Sustained expression of circulating human alpha-1 antitrypsin reduces inflammation, increases CD4+FoxP3+ Treg cell population and prevents signs of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice." Metab Brain Dis **26**(2): 107-113.

Sugino, T., T. Yamaguchi, G. Ogura, T. Kusakabe, S. Goodison, Y. Homma and T. Suzuki (2007). "The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) suppresses cancer cell invasion but promotes blood-borne metastasis via an invasion-independent pathway." J Pathol **212**(2): 152-160.

Sun, H., X. Cong, R. Sun, C. Wang, X. Wang and Y. Liu (2014). "Association between the ICAM-1 K469E polymorphism and diabetic retinopathy in Type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis." Diabetes Res Clin Pract **104**(2): e46-49.

Tang, J. and T. S. Kern (2011). "Inflammation in diabetic retinopathy." Prog Retin Eye Res **30**(5): 343-358.

Tarr, J. M., K. Kaul, M. Chopra, E. M. Kohner and R. Chibber (2013). "Pathophysiology of diabetic retinopathy." ISRN Ophthalmol **2013**: 343560.

Tawara, I., Y. Sun, E. C. Lewis, T. Toubai, R. Evers, E. Nieves, T. Azam, C. A. Dinarello and P. Reddy (2012). "Alpha-1-antitrypsin monotherapy reduces graft-versus-host disease after experimental allogeneic bone marrow transplantation." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(2): 564-569.

Toda, N. and M. Nakanishi-Toda (2007). "Nitric oxide: ocular blood flow, glaucoma, and diabetic retinopathy." Prog Retin Eye Res **26**(3): 205-238.

Tuder, R. M., S. M. Janciauskiene and I. Petrache (2010). "Lung disease associated with alpha1-antitrypsin deficiency." Proc Am Thorac Soc **7**(6): 381-386.

van Dijk, H. W., F. D. Verbraak, P. H. Kok, M. K. Garvin, M. Sonka, K. Lee, J. H. DeVries, R. P. Michels, M. E. van Velthoven, R. O. Schlingemann and M. D. Abramoff (2010). "Decreased retinal ganglion cell layer thickness in patients with type 1 diabetes." Invest Ophthalmol Vis Sci **51**(7): 3660-3665.

van Dijk, H. W., F. D. Verbraak, M. Stehouwer, P. H. Kok, M. K. Garvin, M. Sonka, J. H. DeVries, R. O. Schlingemann and M. D. Abramoff (2011). "Association of visual function and ganglion cell layer thickness in patients with diabetes mellitus type 1 and no or minimal diabetic retinopathy." Vision Res **51**(2): 224-228.

Van Dyken, S. J. and R. M. Locksley (2013). "Interleukin-4- and interleukin-13-mediated alternatively activated macrophages: roles in homeostasis and disease." Annu Rev Immunol **31**: 317-343.

Villacampa, P., V. Haurigot and F. Bosch (2015). "Proliferative retinopathies: animal models and therapeutic opportunities." Curr Neurovasc Res **12**(2): 189-198.

Wang, J., Z. Sun, W. Gou, D. B. Adams, W. Cui, K. A. Morgan, C. Strange and H. Wang (2017). "alpha-1 Antitrypsin Enhances Islet Engraftment by Suppression of Instant Blood-Mediated Inflammatory Reaction." *Diabetes* **66**(4): 970-980.

Wang, J., X. Xu, M. H. Elliott, M. Zhu and Y. Z. Le (2010). "Muller cell-derived VEGF is essential for diabetes-induced retinal inflammation and vascular leakage." *Diabetes* **59**(9): 2297-2305.

Wang, J. J., M. Zhu and Y. Z. Le (2015). "Functions of Muller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy." *World J Diabetes* **6**(5): 726-733.

Watnick, R. S. (2012). "The role of the tumor microenvironment in regulating angiogenesis." *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**(12): a006676.

Weerasekera, L. Y., L. A. Balmer, R. Ram and G. Morahan (2015). "Characterization of Retinal Vascular and Neural Damage in a Novel Model of Diabetic Retinopathy." *Invest Ophthalmol Vis Sci* **56**(6): 3721-3730.

Wewers, M. D., M. A. Casolaro, S. E. Sellers, S. C. Swayze, K. M. McPhaul, J. T. Wittes and R. G. Crystal (1987). "Replacement therapy for alpha 1-antitrypsin deficiency associated with emphysema." *N Engl J Med* **316**(17): 1055-1062.

Worrall, D. M., O. E. Blacque and R. C. Barnes (1999). "The expanding superfamily of serpins: searching for the real targets." *Biochem Soc Trans* **27**(4): 746-750.

Wynn, T. A., A. Chawla and J. W. Pollard (2013). "Macrophage biology in development, homeostasis and disease." *Nature* **496**(7446): 445-455.

Xu, H. and M. Chen (2017). "Diabetic retinopathy and dysregulated innate immunity." *Vision Res.*

Xu, H., M. Chen, A. Manivannan, N. Lois and J. V. Forrester (2008). "Age-dependent accumulation of lipofuscin in perivascular and subretinal microglia in experimental mice." *Aging Cell* **7**(1): 58-68.

Xu, H., M. Chen, E. J. Mayer, J. V. Forrester and A. D. Dick (2007). "Turnover of resident retinal microglia in the normal adult mouse." *Glia* **55**(11): 1189-1198.

Yamaguchi, M., S. Nakao, M. Arima, I. Wada, Y. Kaizu, F. Hao, S. Yoshida and K. H. Sonoda (2017). "Rho-Kinase/ROCK as a Potential Drug Target for Vitreoretinal Diseases." *J Ophthalmol* **2017**: 8543592.

Yang, Y., D. Mao, X. Chen, L. Zhao, Q. Tian, C. Liu and B. L. Zhou (2012). "Decrease in retinal neuronal cells in streptozotocin-induced diabetic mice." *Mol Vis* **18**: 1411-1420.

Yanoff, M. (1969). "Ocular pathology of diabetes mellitus." *Am J Ophthalmol* **67**(1): 21-38.

Yoshioka, M., T. Kayo, T. Ikeda and A. Koizumi (1997). "A novel locus, Mody4, distal to D7Mit189 on chromosome 7 determines early-onset NIDDM in nonobese C57BL/6 (Akita) mutant mice." *Diabetes* **46**(5): 887-894.

Zeng, C. (2000). "NuMA: a nuclear protein involved in mitotic centrosome function." *Microsc Res Tech* **49**(5): 467-477.

Zeng, H. Y., W. R. Green and M. O. Tso (2008). "Microglial activation in human diabetic retinopathy." *Arch Ophthalmol* **126**(2): 227-232.

Zeng, X. X., Y. K. Ng and E. A. Ling (2000). "Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats." *Vis Neurosci* **17**(3): 463-471.

Zhang, X., Y. Hou, X. Ding, S. Ye, H. Cao, Z. Wang, X. Du, Y. W. Xie and C. Li (2014). "Purification and analysis of human alpha1-antitrypsin concentrate by a new immunoaffinity chromatography." *Prep Biochem Biotechnol* **44**(7): 725-737.

Zheng, L. and T. S. Kern (2009). "Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy." *Front Biosci (Landmark Ed)* **14**: 3974-3987.