



**FACULTAD DE CIENCIAS
PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
MENCIÓN NEUROCIENCIA**

TÍTULO DEL PROYECTO:

**“EFECTOS DE LA FOTOBIMODULACIÓN CON LUZ CERCANA AL INFRAROJO POR 70
DÍAS EN LA FUNCIÓN Y ESTRUCTURA RETINAL DE UN MODELO DE RATÓN DIABÉTICO
TIPO II”**

GABRIELA SOFIA OPAZO DAMIANI

**Tesis para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas Mención Neurociencia**

**Director(a) de Tesis:
DR. OLIVER SCHMACHTENBERG
CINV, Instituto de Biología**

**Co-Tutor(a) de Tesis:
DR. ALEX VIELMA
CINV**

2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer profundamente a todos los miembros del laboratorio por su buena disposición y ayuda constante durante este proceso. Específicamente, quiero agradecer a Felipe cuya colaboración y orientación fue fundamental para lograr esta tesis, siendo un apoyo esencial durante todo el proceso. No solo ofreció su tiempo y experiencia, sino que también mostró una paciencia y comprensión invaluable. Asimismo, deseo agradecer de manera individual a Alejandra por su aporte en el área de histología, que resultó crucial para el desarrollo de mi trabajo. La generosidad con la que ofreció su ayuda y su constante disposición para colaborar hicieron una diferencia significativa en el éxito de este proyecto.

A mis tutores, por su invaluable orientación y apoyo durante mi tesis, por sus comentarios, críticas y felicitaciones. Su aliento y enseñanzas han enriquecido mi crecimiento académico.

A la Sofi, por su inagotable apoyo, amor, contención y mente logística que me ayudó a organizarme y producir de manera mucho más efectiva. Su presencia constante fue un faro de estabilidad y tranquilidad, dándome el soporte emocional necesario en los momentos más desafiantes.

A mi familia por siempre estar ahí y apoyarme en la decisión de embarcar en esta travesía, sin duda el interés genuino, amor y respaldo han marcado la diferencia en este proyecto y en mi vida.

Gracias.

INDICE

1.	RESUMEN.....	6
2.	ABSTRACT.....	7
3.	INTRODUCCIÓN.....	9
3.1	DIABETES Y RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	9
3.1.1	ROL DE LAS CELULAS GLIALES EN LOS CAMBIOS FISIOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	10
3.1.2	CAMBIOS EN OTROS GRUPOS CELULARES EN LA RD.....	11
3.1.3	MODELOS ANIMALES RELEVANTES PARA EL ESTUDIO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	12
3.2	FOTOBIMODULACIÓN.....	12
3.2.1	MECANISMOS PRIMARIOS DE LA FOTOBIMODULACIÓN.....	14
3.2.2	MECANISMOS SECUNDARIOS DE LA PBM.....	15
3.2.3	FOTOBIMODULACIÓN Y RETINOPATÍA DIABÉTICA.....	16
3.3	ELECTRORRETINOGRAFÍA.....	16
4.	HIPÓTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	19
5.	OBJETIVOS.....	20
5.1	OBJETIVO GENERAL.....	20
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
6.	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
7.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
7.1	ANIMALES.....	23
7.2	GLICEMIA Y PESAJE.....	23
7.3	FOTOBIMODULACIÓN.....	23
7.5	ANÁLISIS DE DATOS ERG.....	25
7.6	HISTOLOGÍA.....	25
7.6.2	PREPARACIÓN OJOS.....	26
7.6.3	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
7.6.4	EXTRACCIÓN DE DATOS IMÁGENES INMUNOHISTOQUÍMICA.....	27
8.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	28
9.	RESULTADOS.....	29
9.1	EFFECTOS DE LA DIABETES EN PESO Y GLICEMIA.....	29
9.2	ELECTRORRETINOGRAFÍA.....	30
9.2.1	EFFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y DIABETES EN PARÁMETROS DEL ERG.....	30
9.2.2	EFFECTOS DE LA PBM EN RATONES DIABÉTICOS MEDIDO POR ERG.....	33
9.3	HISTOLOGÍA.....	37

9.3.1.1	EFFECTOS DE LA DIABETES EN LA EXPRESIÓN DE GFAP	37
9.3.1.2	EFFECTOS DE LA DIABETES EN LA EXPERSIÓN DE POR IBA1	39
9.3.1.3	EFFECTOS DE LA DIABETES EN LOS GROSORES DE LAS CAPAS DE LA RETINA	40
9.3.2.1	EFFECTOS DE LA PBM EN LA EXPRESIÓN DE GFAP	42
9.3.2.2	EFFECTOS DE LA PBM EN LA EXPRESIÓN DE IBA1.....	43
9.3.2.3	EFFECTOS DE LA PBM EN LOS GROSORES DE LAS CAPAS DE LA RETINA	45
10.	DISCUSIÓN.....	47
11.	CONCLUSIONES.....	50
12.	ANEXOS	51
ANEXO A	ERG PRUEBAS T PAREADAS.....	51
ANEXO B	HISTOLOGÍA PRUEBAS T NO PAREADAS	56
12.	BIBLIOGRAFÍA	57

1. RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) es una complicación crónica de la diabetes mellitus (DM) y se estimó que al año 2020 la incidencia de la DM tipo 2 (DMT2), la forma más común de DM, fue de 462 millones. Dependiendo de la duración y control de la enfermedad, es común encontrar cierto grado de retinopatía diabética en estos pacientes, manifestado como microaneurismas, hemorragias, zonas de hipoxia y neovascularización pero también a nivel fisiológico con un aumento de inflamación, estrés oxidativo y neurodegeneración. Estos procesos han sido estudiados mediante modelos animales como el ratón db/db, el cual es un modelo de diabetes tipo 2.

En el presente estudio se utilizó el modelo db/db para estudiar los efectos de la retinopatía diabética y determinar si la terapia de fotobiomodulación reduce los efectos de la RD. Los cambios fueron evidenciados por electroretinografía y técnicas histológicas para comparar los grosores y marcaje de marcadores IBA1 y GFAP. Se constató el desarrollo de la diabetes en los ratones transgénicos db/db comparándolos con ratones heterocigotos db/+ que no desarrollan el fenotipo. El peso y la glicemia fueron mayores en los ratones db/db. Además, se investigó el desarrollo de la retinopatía diabética mediante ERG y los grupos se diferenciaron principalmente en los tiempos implícitos de la onda B, siendo más lentas en los ratones db/db. A nivel histológico se observó que la capa nuclear interna en los ratones db/db era más delgada.

Se trataron a ratones db/db con un sistema de fotobiomodulación por 70 días por 12 horas diarias con una irradiancia de 218 uW/cm² y se compararon con ratones que fueron puestos en observación durante el mismo periodo, del mismo genotipo. Después del tratamiento con PBM, no se encontraron diferencias en la mayoría de los valores de los parámetros del ERG, pero sí un posible efecto protector sobre los OPS del grupo PBM. De manera similar, se observó un menor porcentaje de IBA1 en la CPE en el grupo PBM con respecto al grupo control. A pesar de que se observó un efecto, no fue tan significativo como se esperaba, por lo que se necesitan más estudios para determinar con mayor precisión los efectos de la PBM en la función retinal.

PALABRAS CLAVES

Fotobiomodulación, retinopatía diabética, electroretinografía, db/db, LepR, db/+

2. ABSTRACT

Diabetic retinopathy (DR) is a chronic complication of diabetes mellitus (DM) and it was estimated that in 2020 the incidence of type 2 DM (T2DM), the most common form of DM, was 462 million. Depending on the duration and control of the disease, it is common to find a certain degree of diabetic retinopathy in these patients, manifested as microaneurysms, hemorrhages, areas of hypoxia and neovascularization but also at a physiological level with an increase in inflammation, oxidative stress and neurodegeneration. These processes have been studied using animal models such as the db/db mouse, which is a model of type 2 diabetes.

In the present study, the db/db model was used to study the effects of diabetic retinopathy and determine whether photobiomodulation therapy reduces the effects of DR. The changes were evidenced by electroretinography and histological techniques to compare the thicknesses and labeling of IBA1 and GFAP markers. The development of diabetes in transgenic db/db mice was confirmed by comparing them with heterozygous db/+ mice that do not develop the phenotype. Weight and blood glucose were higher in db/db mice. Furthermore, the development of diabetic retinopathy was investigated using ERG and the groups differed mainly in B wave implicit times, being slower in db/db mice. At the histological level, it was observed that the inner nuclear layer in db/db mice was thinner.

Db/db mice were treated with a photobiomodulation system for 70 days for 12 hours daily with an irradiance of 218 uW/cm² and were compared with mice that were under observation during the same period, of the same genotype. After treatment with PBM, no differences were found in most ERG parameter values, but a possible protective effect on the OPS of the PBM group was found. Similarly, a lower percentage of IBA1 in the CPE was observed in the PBM group compared to the control group. Although an effect was observed, it was not as significant as expected, so further studies are needed to more precisely determine the effects of PBM on retinal function.

KEYWORDS

Photobiomodulation, diabetic retinopathy, electroretinography, db/db, LepR, db/+

3. INTRODUCCIÓN

3.1 DIABETES Y RETINOPATÍA DIABÉTICA

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por hiperglicemia persistente resultante de defectos en la secreción de insulina, la acción de esta o ambas. Para el año 2020 se estimó que la incidencia de la DM tipo 2, la forma más común de DM, fue de 462 millones (3) mientras que se espera que para el año 2030 la prevalencia global de la DM sea de alrededor de 578 millones de personas (10.2% de la población mundial) (2).

Las marcadas fluctuaciones en la glicemia y la hiperglicemia sostenida asociadas a la DM generan daño crónico en la vasculatura, lo que resulta en alteraciones macrovasculares (infarto al miocardio y enfermedad cerebrovascular) y microvasculares (nefropatía y neuropatía) en distintos órganos del cuerpo, incluyendo el ojo (retinopatía) (4). La retinopatía diabética (RD) es la causa principal de ceguera en la población de edad trabajadora en naciones industrializadas (5) y su incidencia en personas con DM actualmente es de alrededor del 35% en países menos desarrollados (6). La RD afecta el bienestar físico, mental y social de quienes la padecen, e implica el uso de numerosos recursos de salud pública (7).

La RD avanza desde una fase no proliferativa, en la que existe isquemia que lleva a disfunción vascular, neuronal y apoptosis, a una fase proliferativa, en la que la isquemia sostenida genera la liberación de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) que gatilla la producción de neovasos (8–10). Estos nuevos vasos son frágiles y están compuestos por miofibroblastos que pueden provocar tracción, desprendimiento de retina y posterior alteración permanente de la agudeza visual y campo visual (11).

Se ha demostrado en modelos animales que las anomalías fisiológicas no vasculares preceden el desarrollo de cambios vasculares y podrían contribuir a la patogénesis de las manifestaciones vasculares observables clínicamente (17).

En la RD se ha visto alterada la función de las neuronas y células gliales de la retina, incluso antes del inicio clínico de la retinopatía (12–16). Esto ocurre debido a la hiperglicemia crónica, la cual daña a las células endoteliales, pericitos y neuronas, afectando la perfusión de la retina y de las células que la conforman (17). Así, se ha observado que son varios tipos de células de la retina los que se alteran en la fisiopatología de la DM (18). Incluso en etapas tempranas de la RD, se han observado cambios a nivel de varias capas de la retina, tales como una disminución del grosor retinal total, disminución de la capa nuclear externa, disminución del grosor de la capa de células ganglionares (CCG), entre otros (19).

3.1.1 ROL DE LAS CELULAS GLIALES EN LOS CAMBIOS FISIOPATOLÓGICOS ASOCIADOS A LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Se han descrito diversos procesos que contribuyen a la fisiopatología de la diabetes, que involucran inflamación, disfunción mitocondrial, alteración de la producción de factores neuroprotectores y aumento del estrés oxidativo, los que pueden generar apoptosis y disfunción neuronal retinal (20–24).

Un grupo celular importante que contribuye al desarrollo de la enfermedad son las células gliales. Existen tres tipos de células gliales en la retina: los astrocitos, las células de Müller y la microglía.

Los astrocitos se ubican en las capas más internas de la retina, a nivel de la capa de fibras nerviosas (CFNR) y CCG, donde tienen un rol crucial en la mantención de la integridad de la barrera hematorretinal, soporte neurotrófico y la transducción de señales neuronales (25). En retinas sanas de mamíferos, la proteína fibrilar acídica glial (GFAP) sirve como marcador de astrocitos ya que solo se expresa en ellos (26). La evidencia indica que en etapas tempranas de la RD hay pérdida de astrocitos, demostrado por una disminución de la expresión de GFAP (27,28). Los astrocitos forman parte de la unidad neurovascular, la que se compone de células endoteliales, pericitos, la membrana basal y neuronas, y su disfunción está asociada a iniciación de daño neuronal degenerativo y deterioro microvascular (25). Debido a que los vasos retinales carecen de inervación autonómica, dependen de la capacidad de respuesta de la unidad neurovascular a las señales circulatorias y neuronales para mantener una regulación adecuada del flujo vascular (29). La regulación del flujo vascular de la retina interna es crítica para su funcionamiento correcto y en la retinopatía diabética se ha comprobado que existe disfunción vascular (30), la que podría ser precursora de manifestaciones clínicas vasculares más severas (31). Por lo tanto, si los astrocitos están alterados por la retinopatía diabética, esto podría afectar directamente a la homeostasis vascular (32).

Por otro lado, las células de Müller abarcan casi todas las capas de la retina. Apoyan funcional y metabólicamente a las neuronas asociadas con ellas, participando en la liberación de factores neurotróficos, reciclaje de neurotransmisores, en la recaptura de glutamato, mantención del balance iónico y estabilización de la microvasculatura (33). Se han observado numerosos cambios en las células de Müller en la RD. Entre ellas destaca la gliosis, especialmente en etapas más tempranas, la cual es evidenciada por un aumento de GFAP (28,34,35) y se caracteriza por cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que varían con el tipo y severidad del insulto (33). Diversos estudios han revelado que la gliosis de las células de Müller se destaca como una de las manifestaciones patológicas iniciales en la retinopatía diabética (36), manifestándose incluso antes de los cambios vasculares y persistiendo

durante todo el curso de la enfermedad. Estas células glióticas secretan una variedad de factores proangiogénicos, proinflamatorios y profibrótico, lo que contribuye a la vascularización y la neurodegeneración, y en consecuencia, impulsa la progresión de la retinopatía (25). Además, se han reportado cambios en el procesamiento de neurotransmisores, funciones de canales iónicos y membrana celular, entre otros (27,37-40).

Finalmente, la microglía es responsable de la vigilancia inmunológica en condiciones de normalidad y patológicas. Se encargan de detectar estímulos anormales al tejido neural, fagocitar desechos celulares y controlar la propagación de agresiones, teniendo un rol importante en las respuestas inflamatorias (41,42). En condiciones normales se ubican en las capas plexiformes y cuando hay injuria suelen migrar a la capa nuclear externa (41). Similar al resto de las células gliales, la microglía puede cambiar su morfología y funciones en respuesta a cambios en su microambiente celular (43). En el transcurso de la RD, la microglía libera citoquinas que contribuyen a la muerte neuronal, aumenta su densidad y puede cambiar su morfología y función a un fenotipo activado (28,44).

3.1.2 CAMBIOS EN OTROS GRUPOS CELULARES EN LA RD

Se ha descrito que las células ganglionares son las neuronas retinales en las que primero se puede observar daño por la RD, lo que conlleva a una reducción en el grosor de la CFNR en etapas tempranas (45). Otra capa afectada en la RD es la capa nuclear interna (CNI) de la cual se ha observado disminución de su grosor en distintos modelos de RD (46,47). Además de las capas anteriores, los fotorreceptores (FR) también sufren de apoptosis en la RD, siendo no solo parte del proceso neurodegenerativo sino también desempeñando un rol en la generación de deterioro microvascular (48). Los FR son una fuente importante de estrés oxidativo en la retina debido al alto consumo energético que tienen para apoyar la actividad del ciclo visual (49). Contienen más del 75% de las mitocondrias de la retina (22), las que son un componente clave del metabolismo oxidativo que provee energía a estas células. Así, en gran parte gracias a los FR, la retina es el órgano con el mayor consumo relativo de oxígeno en el cuerpo (50-52), manteniendo un consumo alto, y constante de glucosa y oxígeno para sostener distintos procesos como la corriente oscura, el reciclaje del fotorpigmento trans-retinal y la renovación de los segmentos externos de los FR (53-55). Por las funciones mencionadas, los FR necesitan abastecerse constantemente de un alto volumen de oxígeno, lo que no es sostenible en la RD debido a que desde etapas tempranas se caracteriza por un estado de hipoxia generado por la hiperglicemia (56). Clínicamente, se ha observado el compromiso temprano de algunas funciones visuales como la sensibilidad al contraste (57-59), incluso detectándose alteraciones años antes en la respuesta visual global medida mediante electroretinografía (ERG) ((60), lo que podría ser indicador de cambios funcionales en los FR u otros componentes neuronales de la retina. Por otro lado en un modelo animal, la eliminación de los bastones

resulta en menos generación de superóxido inducida por DM (61). Por lo tanto, los FR son en cierto nivel contribuidores en la patogénesis de la retinopatía diabética. En conjunto con lo anterior, el cambio en la distribución, el número y/o morfología de las células amacrinas en la retinopatía diabética (62) podrían explicar cambios observados en la respuesta funcional de la retina medida por el ERG en esta enfermedad.

3.1.3 MODELOS ANIMALES RELEVANTES PARA EL ESTUDIO DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Existen diversos modelos animales para el estudio de la DM, siendo el más común el modelo de diabetes inducida por estreptozotocina (STZ) en el que se administra dicha droga para destruir las células β del páncreas, lo que induce hiperglicemia crónica (7). Si bien es ampliamente utilizado, es un modelo compatible con la DM tipo 1, mientras que alrededor del 90% de la población sufre de DM tipo 2 (63). Además, drogas como ésta pueden ser tóxicas para otros órganos, incluyendo la retina (64–66), y la DM generada es menos estable y puede ser reversible por regeneración espontánea de células β del páncreas (67).

El modelo de ratón transgénico db/db utiliza un acercamiento más homologable a la fisiopatología de la DM tipo 2 en humanos ya que al existir una mutación en el receptor de la leptina, hormona encargada de la saciedad, los ratones se hiperalimentan al tener acceso a una dieta *ad libitum*, lo que genera hiperglicemia crónica desde las 8-10 semanas de vida sin destrucción de células pancreáticas (68). En éste modelo se ha observado hiperglicemia, hiperlipidemia, así como otras complicaciones asociadas de la DM como neuropatía, nefropatía y retinopatía diabética (69–71). Manifiestan características de la RD temprana como la pérdida de pericitos y células endoteliales, engrosamiento de la membrana basal, neurodegeneración y aumento del flujo vascular en la retina (72–75), las cuales se observaron a partir de las 26, 22, 20 y 18 semanas respectivamente. A nivel fisiológico se observa apoptosis de células neuronales, activación glial a las 18 semanas (73), e incluso se ha reportado proliferación de capilares retinales en ratones de 15 meses (76).

3.2 FOTOBIMODULACIÓN

La fotobiomodulación (PBM), anteriormente llamada terapia de láser de bajo nivel (LLLT), consiste en la aplicación de niveles bajos de irradiación lumínica con el objetivo de generar una estimulación del metabolismo celular que persiste por más tiempo que la duración de la exposición a la luz, la que es absorbida por cromóforos endógenos para provocar eventos fotofísicos y fotoquímicos en varias escalas biológicas, sin provocar daño termal (78). Existen abundantes investigaciones del tema, en humanos, modelos *in vivo* e *in vitro* de enfermedades de la retina y varios órganos del cuerpo, muchos de los cuales

aportan evidencia prometedora incluyendo ensayos clínicos en humanos (78–83).

Existe una amplia gama de evidencia clínica positiva de su utilidad, incluyendo la aceleración de curación de heridas (85–87), reducción de inflamación (88,89), reducción de síntomas de lesión traumática al cerebro (90–93), crecimiento de pelo (94,95), recuperación muscular (96), regeneración de nervios y mejora de la función cerebral (97,98). A nivel biológico se ha demostrado que aumenta la tasa metabólica, la migración celular, proliferación celular y producción y secreción de proteínas (99,100).

En la retina también existen abundantes estudios favorables de la PBM, cuyos efectos modularían principalmente el nivel de inflamación y estrés oxidativo, protegiendo la función de las células (101,102). Los efectos se han estudiado en modelos *in vivo* e *in vitro* para distintas enfermedades retinales, como degeneración macular asociada a la edad (103–105), degeneración de fotorreceptores (106) y RD (81,107,108).

Si bien los resultados que se obtienen con la fotobiomodulación son muy prometedores, existe variabilidad con respecto a los parámetros de la terapia, como la longitud de onda, dosis y duración de la exposición a la luz, creando problemas relativos a la estandarización y replicabilidad de los resultados, lo que dificulta la comparación de resultados entre las distintas investigaciones. A pesar de existir abundante evidencia a favor, todavía no existe una estandarización clara sobre los protocolos experimentales y clínicos. Para superar estos desafíos, se necesitan más estudios que investiguen sistemáticamente estos parámetros de modo que se puedan establecer protocolos estandarizados que puedan ser adoptados en la práctica.

En la PBM la dosis corresponde a la cantidad total de energía luminosa administrada. La cantidad de energía se debe regular de tal forma que no produzca daño fotoquímico o termal en las células pero sea suficiente para estimular positivamente a los tejidos (83). A lo largo de los años se han explorado distintas longitudes de onda y densidades de poder de radiación (80–82,107,108), desde la luz azul a la infrarroja, con el objetivo de encontrar la dosis más adecuada para generar un efecto terapéutico.

Se ha comprobado que la irradiación con luz roja cercana al infrarrojo de 670 nm acelera la curación de heridas (82–85), disminuye el daño de tejidos en modelos de enfermedad de Parkinson (109) y ha mostrado potencial terapéutico en un modelo de esclerosis múltiple (110). Molecularmente, se ha observado que la PBM con luz roja de 670 nm se asocia a regulación negativa de la producción de citoquinas inflamatorias, de IFN- γ , TNF- α y a regulación positiva de la producción de citoquinas antiinflamatorias IL-4 y IL-10 en un modelo de esclerosis múltiple (110).

3.2.1 MECANISMOS PRIMARIOS DE LA FOTOBIMODULACIÓN

En la PBM, una molécula fotoaceptora absorbe la luz y gatilla una serie de cambios en las vías de señalización intracelulares, lo que eventualmente se puede traducir en un efecto terapéutico. Existen más de 50 moléculas fotoceptoras en las células de los mamíferos, tales como el agua, la hemoglobina, oxihemoglobina, melanina y la citocromo oxidasa C (CCO), siendo esta última posiblemente la más asociada al efecto neuroprotector de la PBM (113–115). La CCO se activa por luz roja y cercana al infrarrojo, y forma parte de la cadena transportadora de electrones localizada en la membrana mitocondrial.

Durante la PBM, la CCO actuaría como un fotoceptor y transductor de fotones del espectro de luz roja y cercana al infrarrojo (116), acelerando la velocidad de transferencia de electrones y mejorando así la eficiencia respiratoria (117). Esto conlleva a un aumento del potencial de membrana mitocondrial (118), de los niveles de ATP (119,120), de especies reactivas de oxígeno (ROS) (114,121,122), AMPc (123) y la estimulación de distintas vías de señalización (101). Debido a que la CCO está ubicada dentro de la mitocondria, es de esperar que aquellos tejidos que tienen grandes cantidades de este organelo, como la retina, tengan respuestas más pronunciadas a la PBM (124).

Se ha demostrado que la CCO tiene espectros de acción a los 820-830 nm, 760 nm, 680 nm y 620 nm (125), lo que se condice con la evidencia que propone a la CCO como el principal cromóforo para la PBM con luz roja a infrarroja. A pesar de que la evidencia indica un rol importante de la CCO, resulta interesante que todavía no se entiende completamente cómo la PBM actúa en ella para producir sus efectos. La teoría de la CCO ha sido ampliamente aceptada como el mecanismo primario de acción de la PBM, aunque existe evidencia de que algunos de los efectos celulares de la PBM pueden ocurrir sin la modulación de ésta (126,127). Otros cromóforos posibles en los cuales podría actuar la PBM son los canales iónicos de potencial de receptor transitorio (TRP) (128,129) y la superóxido dismutasa (SOD1) (130), pero la evidencia es escasa y estudiada en pocas longitudes de onda.

Además, se ha hipotetizado que la absorción de fotones por la CCO produce la expulsión del óxido nítrico (NO) que se encuentra unido al sitio activo de esta enzima (131), posición en la que estaría actuando como inhibidor. Su salida permitiría que el oxígeno se una en su lugar, permitiendo que continúe la producción de la cadena transportadora de electrones (101,132) haciéndola más eficiente y resultando en mayor producción de ATP (133). Sumado a la hipótesis anterior, existe evidencia que sugiere que el NO podría sintetizarse por la exposición a la luz, incluyendo o no su liberación. Esto tiene relación con dos conceptos. El primero, que la CCO tiene una segunda actividad enzimática (además de su rol en la cadena

transportadora de electrones): la reducción de nitrito (NO_2^-) a NO (134). Esto significa que se puede producir NO localmente en la mitocondria. El segundo, que hay evidencia de que ciertas longitudes de ondas pueden inducir la liberación de NO desde fuentes fotolábiles que lo almacenan, como hemoglobina nitrosilada, mioglobina nitrosilada, S-nitrosotioles o complejos de dinitrosil hierro. Este efecto es mayor con luz roja (~670 nm) comparada con otras como 740 nm y 830 nm (135,136). La liberación del NO podría hacer que éste se vuelva disponible para otras aplicaciones biológicas como, por ejemplo, alterar la expresión genética y vasodilatación. A pesar de todo, la evidencia sobre el rol del NO es conflictiva (107,137,138). Por ejemplo, un estudio no logró mostrar los efectos protectores de la luz roja contra la inhibición de la respiración mitocondrial inducida por NO, pero reveló efectos parciales protectores con luz azul. (139).

3.2.2 MECANISMOS SECUNDARIOS DE LA PBM

Se ha comprobado que la PBM activa una cascada de distintas vías de señalización, como por ejemplo, la modulación de ROS inducidas por la mitocondria y membrana celular que activan factores de transcripción nucleares (126,141–143), cambios directos e indirectos al estrés oxidativo (101), señalización mitocondrial retrógrada (144), modulación de enzimas de la cadena transportadora de electrones (133), aumento de síntesis intracelular de ATP (145) y complejos mitocondriales y otros efectos en expresión genética (146).

El estrés oxidativo se define como un desbalance entre la producción de ROS y defensas antioxidantes. Los ROS se producen en gran medida como subproductos del metabolismo oxidativo normal de las mitocondrias (147). El oxígeno que se necesita para que la CCO pueda generar agua es reducido mediante distintas transferencias de electrones en la cadena transportadora de electrones, lo que puede resultar en la generación de superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y el ion hidroxilo (OH^-). A estos radicales se les refiere colectivamente como especies reactivas de oxígeno, moléculas que se caracterizan por tener al menos un electrón desapareado lo que les vuelve inestables y reactivos en búsqueda de un electrón para emparejarse.

Los ROS pueden ser citotóxicos en altas concentraciones y afectar negativamente a varias estructuras celulares como membranas, lípidos, proteínas, lipoproteínas y ADN, alterando sus funciones (148). En contraste, cuando los ROS se mantienen en niveles bajos o moderados son beneficiosos y muy importantes para el funcionamiento celular (149), siendo clave para la fosforilación de proteínas, activación de distintos factores transcripcionales, apoptosis, inmunidad y diferenciación (150,151).

La excitación fótica de la PBM promueve el metabolismo de oxígeno lo que lleva a la producción de ROS (152). Esto cambia el potencial redox de la célula hacia mayor oxidación (114). Los ROS pueden activar el factor nuclear kappa B (NF-kB) (141), el cual puede activar genes relacionados con liberación de citoquinas y quimioquinas, adhesión celular, receptores de superficie celular, anti-apoptosis y proliferación celular, por lo que es considerado pro-inflamatorio. Si bien la activación de estas moléculas no parece compatible con lo que busca lograr la PBM, en cantidades adecuadas, el NF-kB puede generar una reducción de apoptosis, y un aumento de proliferación celular y migración celular, lo que puede ser beneficioso para la curación de tejidos (101). Por otro lado, en cantidades apropiadas, los ROS activan factores de transcripción que regulan positivamente varios genes que juegan roles estimulatorios y protectores en la célula, relacionados, por ejemplo, con funciones de proliferación celular (153) y de producción de citoquinas y factores de crecimiento (154)

Bajo condiciones fisiológicas, la absorción de los fotones por la CCO lleva a un aumento en el potencial de membrana mitocondrial y además de un pulso pequeño de producción de ROS. Pero, cuando el potencial de membrana mitocondrial es bajo por estrés oxidativo preexistente, excitotoxicidad o inhibición de la cadena transportadora de electrones, la absorción de la luz lleva a un aumento del potencial de membrana mitocondrial hasta niveles normales, y la producción de ROS se disminuye (101).

3.2.3 FOTOBIMODULACIÓN Y RETINOPATÍA DIABÉTICA

Un tratamiento potencial para la RD y otras enfermedades retinales es la fotobiomodulación (77). Las fluctuaciones de la glicemia en la DM generan daño que conlleva a una cantidad adicional de estrés oxidativo (140). Considerando la alta cantidad de mitocondrias presentes en los FR, la retina es una diana ideal para el tratamiento con PBM. La luz de 670 nm es efectiva mejorando la función visual de la retina en distintos modelos de patologías (111,112), entre ellos, la DM. Se han observado efectos positivos de la PBM realizada desde el inicio de la DM o cuando se aplica incluso cuando ya ha ocurrido un periodo de DM considerable sin tratar (82,107,108). En un estudio, se observó disminución de la inflamación retinal en un modelo DM tipo 2, reflejado en la disminución de la producción de superóxido, leukostasis y expresión de ICAM-1 inducido por DM en la retina (107).

3.3 ELECTORRETINOGRAFÍA

Los estudios con ERG han impulsado avances considerables en la comprensión de los mecanismos neuronales subyacentes a la retinopatía diabética. La electrorretinografía es un examen electrofisiológico que mide la actividad eléctrica de la retina en respuesta a estímulos luminosos. En adición a ser mínimamente invasivo y permitir evaluar la función retinal de manera objetiva (155), el ERG

es una medida de la integridad funcional de la retina y es sensible a la isquemia retinal (156). Se suele explorar de manera escotópica (con adaptación a la oscuridad) y de manera fotópica (con adaptación a la luz) debido a la organización del sistema de conos y bastones de la retina.

La morfología del ERG varía según la intensidad y duración del estímulo (flash de luz), así como del estado de adaptación a la luz, que está dado por la iluminación de fondo y el tiempo de exposición a ésta. El ERG se compone de varias ondas que se originan en distintas estructuras retinales, destacando en el primer segundo de la respuesta la onda a, onda b y potenciales oscilatorios (OPS).

En el ERG escotópico, la onda a representa la hiperpolarización de los fotorreceptores en la retina externa, en respuesta al estímulo luminoso. Por otro lado, la onda b sería primariamente generada en las células bipolares de bastón (157). Los OPS son respuestas de alta frecuencia y baja amplitud, que se superponen en la pendiente ascendente de la onda B del ERG. Por lo general son un grupo de 4 a 6 ondas que son más fáciles de registrar cuando la retina se estimula con luz de corta duración y alta intensidad y se filtra de manera adecuada. Estas ondas se generan por la interacción de las sinapsis recíprocas entre las células de la retina interna, que se cree son las células bipolares y las células amacrinas (158), aunque su origen no está completamente establecido.

3.3 ELECTORRETINOGRAFÍA Y DM

El ERG se utiliza para detectar cambios en etapas tempranas de la RD incluso antes de que aparezcan síntomas visuales, monitorear de la progresión de la enfermedad y evaluar la eficacia de tratamientos para la RD como fotocoagulación con láser, inyecciones intravítreas de VEGF, entre otros. En los modelos de animales y en humanos con diabetes, se han reportado alteraciones funcionales en el ERG, como por ejemplo, el retraso de los OPs (159–169), disminución de la amplitud de las ondas a y b (166,170,171) y aumento del tiempo implícito de la onda a y onda b (162,165,172,173).

Entendiendo que la progresión de la retinopatía diabética puede detectarse incluso antes del daño microangiopático mediante ERG, es necesario su tratamiento oportuno para evitar la ceguera irreversible. En la actualidad, esto se logra de manera paliativa, mediante distintos tratamientos que permiten frenar la progresión y mejorar sintomatología levemente, pero no revierten el daño generado por la RD. Por lo tanto, para esta enfermedad toma mayor importancia la búsqueda de tratamientos que no sean aplicados para resolver los signos y síntomas, sino, para prevenir la aparición de éstos y por tanto prevenir el daño retinal y el avance de la enfermedad. La fotobiomodulación se ha instaurado como un tratamiento potencial para la retinopatía diabética y otras enfermedades retinales, sobre todo

en etapas iniciales donde su acción puede prevenir daño a la retina. Si bien existe bastante información con respecto a esta terapia, actualmente no se conocen los efectos de la fotobiomodulación con luz cercana al infrarrojo nm en la retina de los ratones db/db motivo por el cual se lleva a cabo esta investigación.

Se estudiará el efecto de la PBM sobre la respuesta visual medida por ERG y técnicas histológicas, tales como el marcaje de células gliales con GFAP, para astrocitos y células de Müller reactivas, e IBA1 para las células microgliales, mediante inmunohistoquímicas, así como la medición de grosores en base a las imágenes anteriores.

4. HIPÓTESIS Y PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál será el efecto de la fotobiomodulación con luz cercana al infrarrojo aplicada diariamente por 70 días, en la función y estructura retinal de ratones modelo de diabetes tipo II medido por cambios en la función y estructura retinal?

HIPÓTESIS

La fotobiomodulación disminuirá el daño retinal debido a la retinopatía diabética, medido por cambios en la función y estructura retinal en ratones de un modelo de diabetes tipo II tratados con luz cercana al infrarrojo, diariamente por 70 días.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Demostrar la disminución del daño retinal estructural y funcional tras la aplicación de fotobiomodulación en ratones modelo de diabetes tipo II tratados con luz cercana al infrarrojo de diariamente por 70 días.

5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- i) Determinar los efectos de la PBM sobre los cambios funcionales que se observan en la retina de un modelo de diabetes tipo II, medidos por parámetros electrofisiológicos del full field ERG.
- ii) Determinar los efectos de la PBM sobre la expresión de GFAP e IBA, así como de los grosores retinales, mediante inmunohistoquímica, en un modelo de diabetes tipo II.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se asignó aleatoriamente los ratones db/db a dos grupos: un grupo experimental sometidos a tratamiento con PBM por 70 días y un grupo control sin tratamiento.

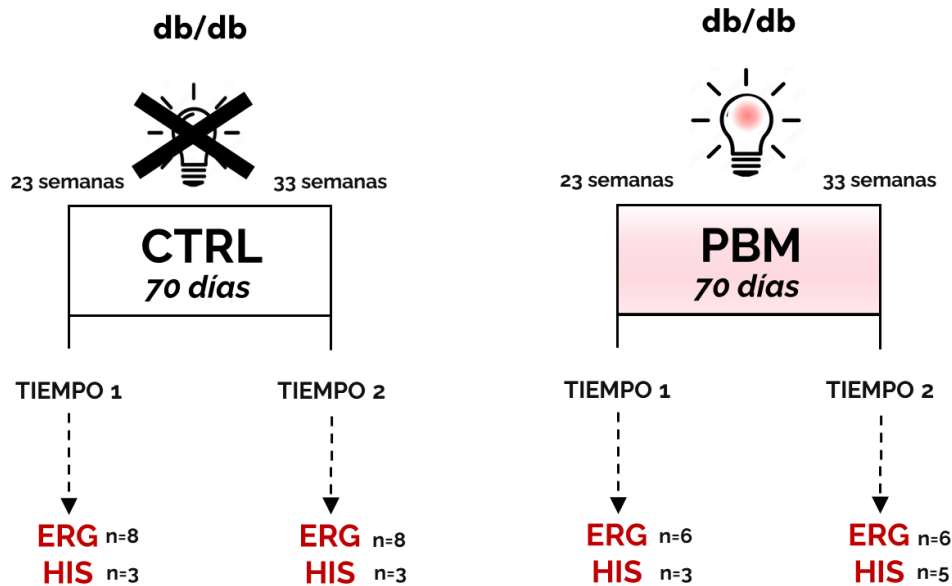


Figura 1. Diseño experimental. Se dividió a los ratones en grupo fotobiomodulación (PBM) y control (CTRL), los cuales fueron observados/tratados por 70 días, respectivamente. Se realizaron electroretinogramas (ERG) y técnicas histológicas (HIS) antes y después del periodo del protocolo (tiempo 1 y tiempo 2, respectivamente), con una edad de inicio de 23 semanas y término de 33 semanas. Se despliega el tamaño muestral para los ERGs e HIS al lado de cada etiqueta.

Para cumplir con el objetivo 1, se realizaron ERGs en los tiempos previos y posteriores al protocolo de intervención/observación, los que desde ahora en adelante serán llamados tiempo 1 y tiempo 2, respectivamente. El n de los ratones del grupo control fue 8 para el tiempo 1 y de 8 para el tiempo 2, para los ratones del grupo PBM fue 6 para el tiempo 1 y de 6 para el tiempo 2.

Para cumplir con el objetivo 2, se sacrificaron animales en los tiempos 1 y 2 a los cuales se les hicieron pruebas histológicas. El n de los ratones del grupo control fue 3 para el tiempo 1 y de 3 para el tiempo 2 mientras que el n de los ratones del grupo PBM fue 3 para el tiempo 1 y de 5 para el tiempo 2.

COMPROBACIÓN DEL DAÑO FUNCIONAL POR RETINOPATÍA DIABÉTICA

Además, para constatar el cuadro diabético del ratón db/db, se realizaron ERG y pruebas histológicas a ratones db/+ (ratones sanos que no desarrollan el genotipo diabético) y se compararon con los primeros. Se siguió el mismo protocolo de examinación que el diseño experimental, realizando ERGs y técnicas histológicas antes y después de los 70 días.

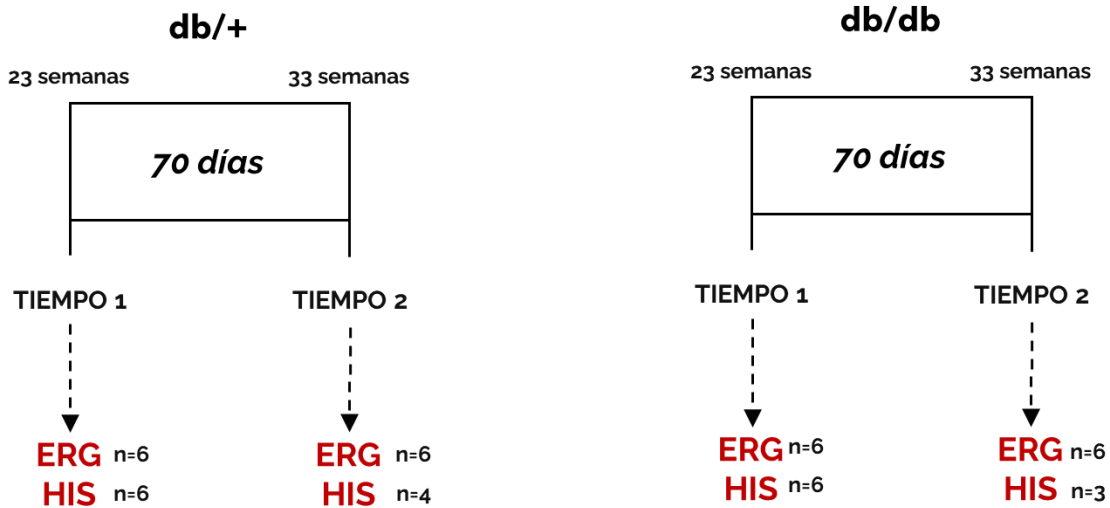


Figura 2. Diseño de protocolo para comprobación del daño funcional por retinopatía diabética. Se exploraron las diferencias entre los ratones db/+ y db/db antes y después de un periodo de 70 días. Se realizaron electroretinogramas (ERG) y técnicas histológicas (HIS) antes y después del periodo del protocolo (tiempo 1 y tiempo 2, respectivamente), con una edad de inicio de 23 semanas y término de 33 semanas. Se despliega el tamaño muestral para los ERGs e HIS al lado de cada etiqueta.

Se realizó ERG a los ratones en el tiempo 1, y se sacrificaron ratones en el tiempo 1 y tiempo 2 para las pruebas histológicas. A los ratones que no fueron sacrificados en el tiempo 1 se les realizó un ERG en el tiempo 2. En el ERG, el n de los ratones db/db fue 8 para el tiempo 1 y 8 para el tiempo 2, para los ratones db/+ fue 6 para el tiempo 1 y 6 para el tiempo 2. En inmunohistoquímicas, el n de los ratones db/db fue 6 para el tiempo 1 y 3 para el tiempo 2 mientras que el n de los ratones db/+ fue 6 para el tiempo 1 y 4 para el tiempo 2.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 ANIMALES

Se utilizaron ratones de la línea transgénica BKS.Cg-Dock7^m+/+ Lepr^{db}/J (strain #000642, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA). Esta línea de roedores expresa 3 fenotipos: Lepr^{db}, Dock7^m Lepr^{db} y Dock7^m. Los ratones homocigotos para el gen LepR mutante y wildtype para Dock7 (+db/+db) desarrollan un fenotipo característico de obesidad, hiperglicemia progresiva y sostenida, lo que los hace un buen modelo de estudio de la DM tipo 2, mientras que los ratones heterocigotos para LepR mutante y Dock7m (m+/⁺db) se desarrollan sanos. Por otro lado, los ratones misty, homocigotos para Dock7m y wildtype para LepR, no presentan los genes transgénicos del receptor de la leptina y crecen con malformaciones, por lo que no fueron utilizados para este estudio. Durante el escrito se referirá como homocigotos o db/db a los ratones obesos y heterocigotos o db/+ a los ratones que no desarrollan diabetes. Los ratones fueron criados con un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas, sin restricciones en el acceso a comida y agua, a temperatura ambiente de 22±1° y humedad de 40-60%. Para los ERG y muestras inmunohistoquímicas del tiempo 1 los ratones tenían en promedio 23 semanas de edad y para el tiempo 2 tenían 33 semanas de edad.

La utilización de animales para esta tesis fue aprobada por el comité de bioética de la Universidad de Valparaíso bajo el acta de convalidación bioética CBC 722022, en alero del acta de evaluación bioética BEA169-21 del CICUAL para el proyecto FONDECYT No. 1210790 del Dr. Oliver Schmachtenberg.

7.2 GLICEMIA Y PESAJE

Para corroborar las diferencias en la expresión fenotípica de los grupos, se evaluó la glicemia mediante un analizador de glucosa comercial (Accu-chek Active Model GU, Roche Diagnostics USA, Indianapolis, IN, USA). La medición fue efectuada al final de la sesión de ERG, cortando ~1 mm de la cola del ratón, mientras se mantenía anestesiado con isoflurano según las características del protocolo de ERG. Una vez realizado lo anterior, se registró además el peso de los animales. Los datos mencionados fueron obtenidos para las edades correspondientes al tiempo 1 y tiempo 2.

7.3 FOTOBIMODULACIÓN

Se construyó un sistema de PBM para cada jaula de ratones utilizando dispositivos LEDs (Luxeon C, L1C1-DRD100000000) con un máximo de longitud de onda 654 nm, ubicados de tal manera que la irradiancia

continua promedio fuese de 218 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$, manteniendo la estimulación por 12 horas, por 70 días seguidos. El aparato de PBM fue construido para ser posicionado por encima del techo de las jaulas de los ratones, lo que evitó la manipulación adicional de los ratones para prevenir efectos no deseados como estrés. La PBM se programó para encenderse diariamente por 12 horas coincidiendo con la fase de luz del ritmo circadiano de los ratones. En este periodo se realizó el cambio de cama, comida y agua de manera habitual, sin alterar sus rutinas.

7.4. ELECTORRETINOGRAFÍA

Previo al registro de ERG, se adaptó a los ratones a la oscuridad desde la noche anterior por al menos 8 horas en un cuarto oscuro. En este estudio se registraron los ERG previo al comienzo del tratamiento/periodo de observación de los ratones y luego el mismo día del término del tratamiento. Se anestesió a los ratones db/+ y db/db con isoflurano a una concentración de al 3,0%/3,5% respectivamente para inducción en una cámara plástica hermética por aproximadamente 3 minutos y de 2,0%/2,5% para mantención respectivamente, debido a las diferencias marcadas de peso entre ambos genotipos. Se corroboró la inducción anestésica evaluando ausencia del reflejo de retiro (tras apretar un pie) y pérdida del reflejo de parpadeo y corneal. Posteriormente, se instiló clorhidrato de proparacaína 0,5% como anestesia tópica y se dilataron las pupilas con atropina 1%. Antes de comenzar el registro, se administró una gota de lágrima artificial (Lacryvisc 3 mg/g, Gel Oftálmico, Alcon) para mantener las córneas hidratadas para el examen.

Se creó un sistema de domo tipo Ganzfeld basado en LEDs de luz blanca ubicados equidistantemente en una cúpula de acrílico. El sistema de iluminación se conectó a una tarjeta digitalizadora que permitía controlar la intensidad y la duración de los flashes a través del software WinWCP (University of Strathclyde Glasgow, Scotland). Se elaboraron y utilizaron tres electrodos: uno de registro hecho a partir de alambre de plata, otro de referencia hecho de acero inoxidable, y uno de tierra hecho de alambre de cobre. Para todos los registros, el electrodo de referencia fue posicionado subdérmicamente en la mejilla del ratón, el electrodo de registro sobre la superficie corneal, ajustado mediante un micromanipulador, y el electrodo de tierra fue conectado a la jaula Faraday. El protocolo de estimulación consistió en una serie de 10 flashes en condiciones de adaptación escotópica, con intensidades entre $-1,1 \log$ a $+2,69 \log \text{ mW}/\text{cm}^2$. Cada toma contaba con una línea base de 200 ms previo al inicio del flash y se repetía al menos 10 veces. Se reporta el promedio de estas tomas para cada intensidad. Si bien se exploró la respuesta a 10 intensidades de flashes, cabe mencionar que para la onda A sólo se reportan 4 intensidades ya que las 6 primeras (más tenues) no evocaban una respuesta distinguible ni medible por encima del ruido de base.

Los registros se obtuvieron utilizando un amplificador diferencial (AC/DC Differential amplifier, Model 3000, AM Systems Inc) en modo AC filtrando entre 1-1000 Hz, con ganancia de 1000x. La plataforma donde se posicionaba el ratón tenía una base termorregulada a 32°C y una boquilla conectada con el sistema de sedación con isoflurano para mantener la anestesia durante el procedimiento.

Cada examen duraba aproximadamente 45 minutos, tiempo que considera la sedación y la ejecución del protocolo de ERG. Una vez finalizado el experimento, se realizó el pesaje y toma de glicemia según el protocolo mencionado previamente. Luego de esto, el ratón era movido a su jaula para mantenerlo en observación 1 hora antes de transportarlo devuelta al bioterio CINV.

7.5 ANÁLISIS DE DATOS ERG

Se analizó los datos obtenidos mediante el software WinWCP (University of Strathclyde Glasgow, Scotland). Para la extracción de las características de las ondas se utilizó un script personalizado escrito en Python 3.9.13 creado específicamente para estos fines (Figura 3). Para aislar los componentes de la onda a y b se utilizó un filtro pasa banda Butterworth de orden 5, de 5-50 Hz, y de 60-235 Hz para los OPS. El código permitió extraer los tiempos implícitos y amplitudes de las ondas a, b y OPS. Se eliminaron las tomas no descartables por promediación que presentaban artefactos por movimientos respiratorios que aparecían en la zona de análisis y que distorsionaban sus dimensiones.

7.6 HISTOLOGÍA

7.6.1 EUTANASIA ANIMALES

El sacrificio de los animales se realizó mediante la inducción anestésica profunda en una cámara plástica hermética con isoflurano al 5%. Una vez monitoreada la pérdida de reflejos (ausencia de parpadeo, ausencia de reflejo corneal y ausencia de reflejo de retiro) se procedía inmediatamente a efectuar la eutanasia usando la decapitación mediante guillotina.

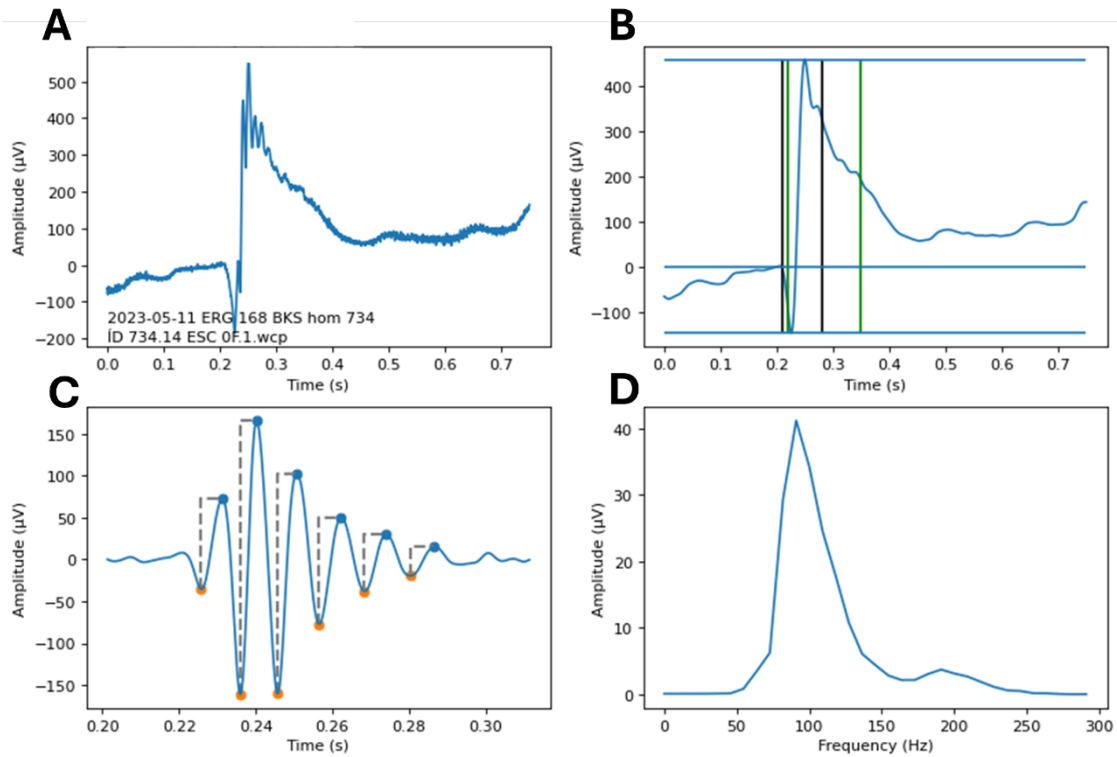


Figura 3. Imágenes representativas de análisis de datos por script personalizado. (A) Representación de datos obtenidos de ERG sin filtrar. Se observa onda A y onda B como peaks de mínima y máxima altura, respectivamente. (B) Registro de ERG con filtro de orden 5, de 5-50 Hz. Las líneas negras representan los límites del rango de búsqueda de la onda A y líneas verdes representan los límites del rango de búsqueda de la onda B. Las líneas azules horizontales marcan los peaks de las ondas A y B. (C) OPS filtrados entre 60-235 Hz. Los puntos naranjos y azules representan valles y peaks respectivamente y las líneas punteadas denotan la amplitud de cada OPS. (D) Análisis espectral de los registros de los potenciales oscilatorios, mostrando la amplitud de los componentes de frecuencia entre 0 y 300 Hz. Se observa el peak producido por los potenciales oscilatorios alrededor de los 100 Hz.

7.6.2 PREPARACIÓN OJOS

Se extrajeron los ojos de los ratones y se eliminó la cámara anterior, para luego ser sumergidos en paraformaldehído al 4% durante una hora, y posteriormente lavados en tampón PBS (pH 7,4). Se mantuvieron a 4°C y luego se criopreservaron en un gradiente de 10%, 20% y 30% de sacarosa consecutivamente, por 10 minutos, 20 minutos y durante toda la noche a 4°C, respectivamente.

Las muestras fueron embebidas en medio de congelación de tejidos (Tissue-Tek, Sakura Finetek), y se cortaron secciones transversales de 20 µm con un criostato (Leica CM-1900). Los cortes fueron montados en portaobjetos previamente tratados con poli-L-lisina.

7.6.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes de retina fueron rehidratados con PBS y luego incubados por 1 hora en solución de bloqueo compuesta por 1% de BSA, 1% de suero de caballo y 0,3% de Triton X-100 (CAS# 9002-93-1, Amresco, Solon, OH, USA) en PBS. Posteriormente se diluyeron los anticuerpos primarios en solución de bloqueo y se incubaron por 3 días a 4°C en una cámara húmeda. Se marcaron las células gliales con anticuerpos anti-proteína acídica glial fibrilar 1:500 (Cat# 13-0300, RRID: AB_2532994, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) y microglía con anti- IBA1 (A104332, Antibodies, Cambridge, United Kingdom Antibodies) 1:1000. Una vez terminada la incubación, se lavaron los cortes en PBS y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en los anticuerpos secundarios. Los cortes fueron teñidos con DAPI 0,25 µg/ml por 10 minutos (#D9542, Sigma-Aldrich, Saint Luis, MO, USA) y montados en medio de montaje para fluorescencia (#F4680, Fluoromount, Sigma-Aldrich, Saint Luis, MO, USA) para ser visualizadas en un microscopio confocal (Nikon C1 Plus).

7.6.4 EXTRACCIÓN DE DATOS IMÁGENES INMUNOHISTOQUÍMICA

Para todas las mediciones, se promediaron los datos de al menos 3 imágenes por cada ratón. La reactividad glial representada por la actividad de GFAP e IBA1 se midió como la cantidad de píxeles que se encontraban sobre un umbral definido para cada canal, con respecto a la cantidad total de píxeles del área delimitada. El cálculo de píxeles sobre umbral se exploró para la CCG + CFNR, plexiforme interna (IPL), nuclear interna (CNI) y plexiforme externa (CPE), capas que fueron delimitadas manualmente. De manera similar, para el cálculo de los grosores de las capas, se establecieron los límites de las capas de manera manual y luego se promedió la distancia entre las líneas que delimitaban cada capa, en al menos 20 puntos. Se excluyeron las imágenes en las que las retinas presentaban daños o alteraciones severas a su estructura en las capas de interés.

Para todos los análisis de imágenes histológicas, se recogieron los datos en valores de píxeles, los cuales fueron convertidos a micras según la tasa de micras por píxeles que se obtuvo a partir de los datos del software del microscopio con el que se adquirieron las fotografías (EZ-C1 Freeviewer, Nikon).

8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó con el programa Jamovi 2.4.14. Primero se aplicó el test de Shapiro-Wilk para revisar la normalidad de las distribuciones. Si el test determinaba que los datos provenían de una distribución normal, se aplicó el test T de student para t test pareados y no pareados. De existir una distribución no normal, se utilizó la prueba de rangos de Wilcoxon para los t test pareados y la prueba de U de Mann-Whitney para los t test no pareados.

Todos los gráficos fueron creados con el programa GraphPad Prism 8.0. Para todos los tests, el nivel de significancia fue establecido en $p=0,05$. A no ser que se mencione lo contrario, las barras de error de los gráficos representan el error estándar. Los valores de significancia indicados por asteriscos son * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.001$.

9. RESULTADOS

9.1 EFECTOS DE LA DIABETES EN PESO Y GLICEMIA

Como primera aproximación, se decidió corroborar la inducción de diabetes en el modelo db/db, para lo cual se pesaron los ratones a las 23 y 33 semanas (Figura 4A). El peso de los ratones db/+ fue menor que los db/db en ratones de edad 23 semanas, con valores de 26.7 gramos y 52.3 gramos respectivamente ($p < 0.001$). A las 33 semanas la diferencia de peso persistió entre ambos grupos (27.7 gramos y 53.9 gramos, respectivamente) de manera significativa ($p < 0.001$). Las diferencias en los pesos permitieron corroborar el desarrollo del fenotipo obeso asociado a la presencia de la DM.

De la mano con lo anterior, se midió la concentración de la glucosa en la sangre (Figura 4B) en ambos genotipos. El valor de la glucosa en los ratones a las 23 semanas fue menor en los db/+ que en los db/db ($p = 0.005$, media de 160 mg/dL para db/+ y media de 517 mg/dL para db/db), situación que se mantuvo a las 33 semanas (media de 159 mg/dL para db/+ y media de 480 mg/dL para db/db, $p < 0.001$).

Se observó que el aumento de peso en ratones diabéticos va acompañado de hiperglicemia significativa. Estos datos demuestran diferencias marcadas entre los genotipos db/db y db/+ en el peso y glicemia, siendo mayores en los ratones db/db, confirmando la presencia del cuadro diabético en los ratones.

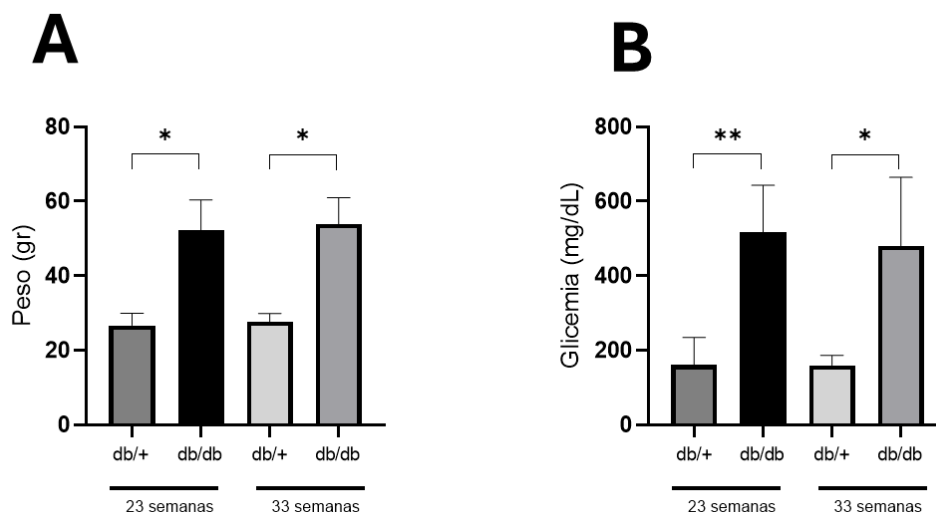


Figura 4. (A) Diferencias en el peso entre los genotipos db/+ y db/db. Se observó un mayor peso de los ratones db/db a las 23 ($n = 27$ para db/+, $n = 29$ para db/db) y 33 semanas ($n = 14$ para db/+, $n = 11$ para db/db). (B) Diferencias en la glicemia de los genotipos db/+ y db/db. Se observó una mayor glicemia en los ratones db/db a las 23 ($n = 3$ para db/+, $n = 5$ para db/db) y 33 semanas ($n = 7$ para db/+, $n = 8$ para db/db).

9.2 ELECTORRETINOGRAFÍA

9.2.1 EFECTOS DEL ENVEJECIMIENTO Y DIABETES EN PARÁMETROS DEL ERG

Una vez que se constató el desarrollo de la diabetes en los ratones db/db, se estudiaron parámetros del ERG (amplitud y tiempo implícito de la onda A, amplitud y tiempo implícito de la onda B, amplitud y tiempo implícito de los OPS) para confirmar que los ratones estaban desarrollando alteraciones funcionales por la retinopatía diabética. De esta manera, el seguimiento longitudinal permitió el estudio del efecto del envejecimiento y de la progresión de la retinopatía diabética durante el tiempo del protocolo.

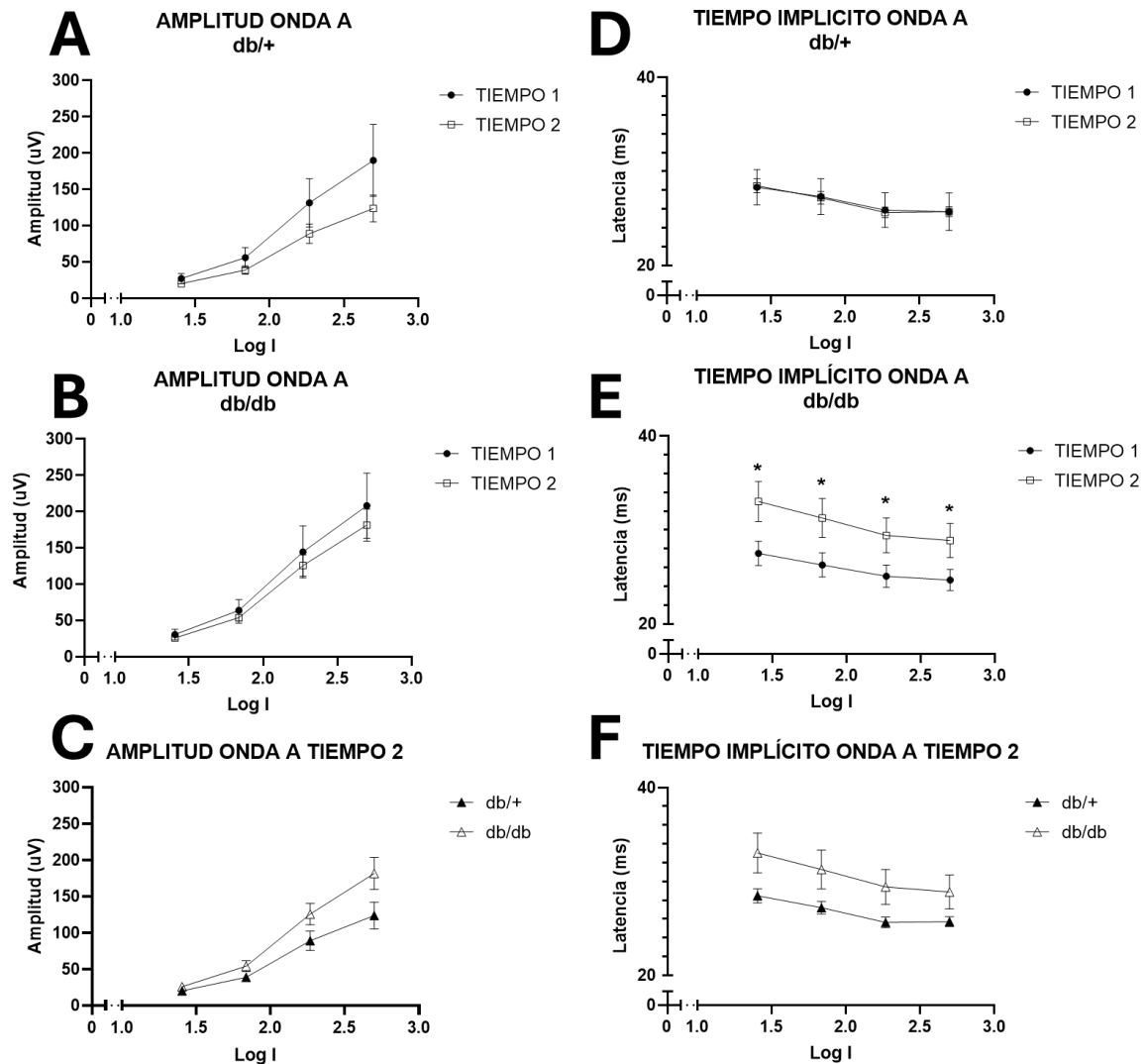


Figura 5. Cambios de los parámetros amplitud y tiempo implícito de la onda A con el paso del tiempo en ratones db/db y db/+. Se observaron amplitudes similares entre el tiempo 1 y 2 en los ratones db/+ (A) y db/db (B), lo que se observa en el tiempo dos como una ausencia de diferencias en las amplitudes de ambos grupos (C). No se observaron diferencias entre los grupos en los tiempos implícitos de los ratones db/+ (D) pero sí se observó un aumento en todos los tiempos implícitos en los ratones db/db (E) sin observarse diferencias entre los genotipos en el tiempo 2 (F).

Con respecto a las amplitudes de la onda A, no se observan diferencias entre el tiempo 1 al 2 de los ratones db/+ (Figura 5A) ni db/db (Figura 5B), así como tampoco existen diferencias los grupos en el tiempo 2 (Figura 5C). Por otro lado, los tiempos implícitos de la onda A tampoco demuestran diferencias entre el tiempo 1 al 2 de los ratones db/+ (Figura 5D) pero sí en los ratones db/db (Figura 5E) donde se observa un mayor tiempo implícito en todas las intensidades exploradas (log +1.40 a +2.70 mW/cm²), lo que no se sostiene en el tiempo 2 al comparar ambos grupos ya que no se observan diferencias (Figura 5F).

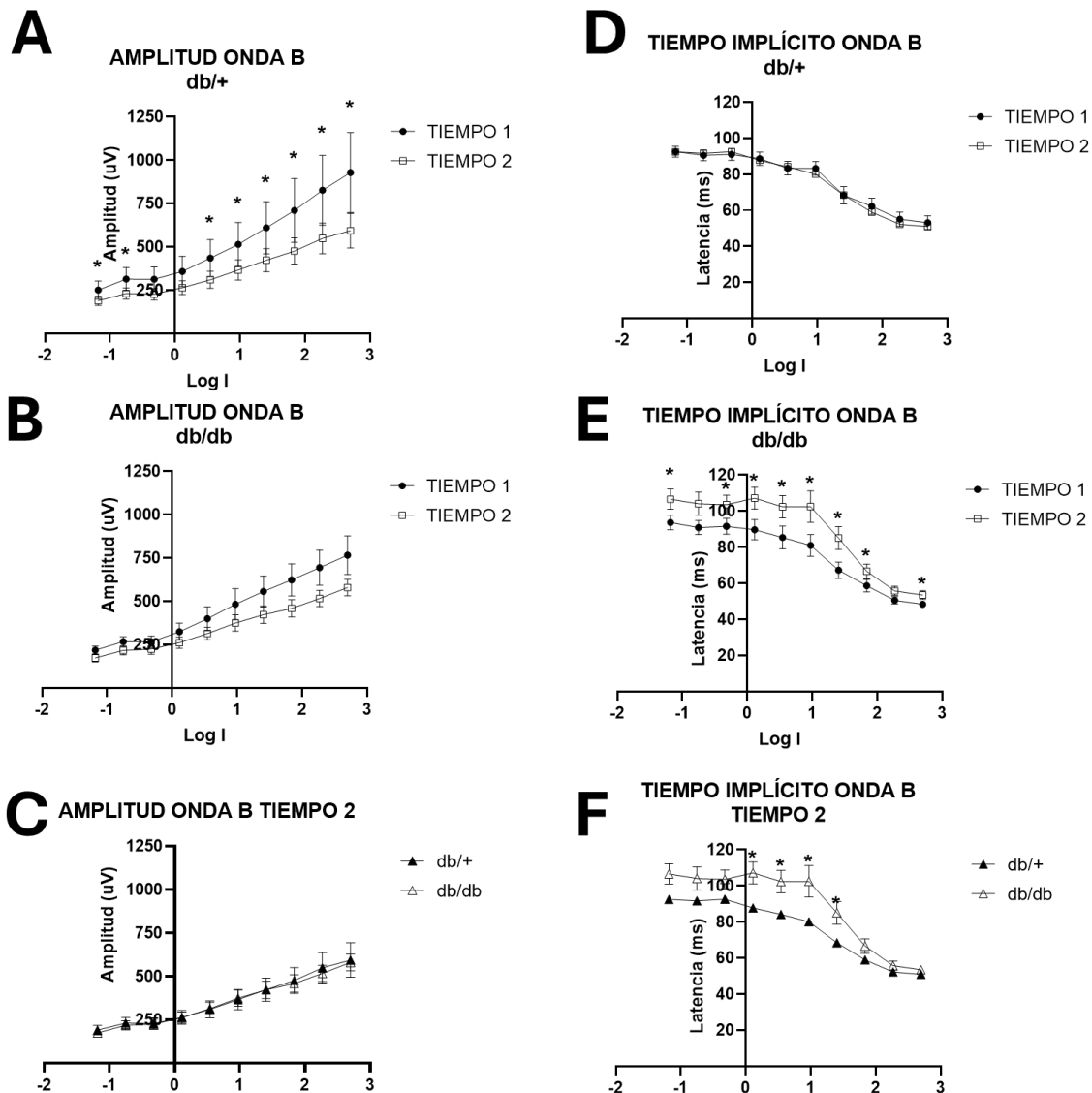


Figura 6. Cambios de los parámetros amplitud y tiempo implícito de la onda B con el paso del tiempo en ratones db/db y db/+. Se observó una mayor amplitud de la onda B en el tiempo 1 en la mayoría de las intensidades en los ratones db/+ (A), mientras que los ratones db/db no tuvieron amplitudes diferentes (B), lo que se observa en el tiempo dos como una ausencia de diferencias en las amplitudes de ambos grupos (C). No se observaron diferencias entre los grupos en los tiempos implícitos de los ratones db/+ (D) pero sí se observó un aumento en la mayoría de los tiempos implícitos en los ratones db/db (E), lo que generó que en el tiempo 2 se observara un mayor tiempo implícito del grupo db/db con respecto al db/+ (F).

Por otra parte, se observa una mayor amplitud de la onda B en el tiempo 1, en la mayoría de las distintas intensidades exploradas (log -1.18, -0.75 y +0.54 a +2.70 mW/cm²) en los ratones db/+ (Figura 6A) al compararlas con el tiempo 2, pero no se observan diferencias al comparar las amplitudes del tiempo 1 con el 2 en los ratones db/db (Figura 6B). La comparación de las amplitudes de ambos grupos en el tiempo 2 tampoco evidencia diferencias importantes (Figura 6C). Asimismo, no se observan diferencias en la comparación de los tiempos implícitos del tiempo 1 al 2 en los ratones db/+ (Figura 6D), mientras que los ratones del grupo db/db mostraron un mayor tiempo implícito de la onda B en el tiempo 2 en la mayoría de las intensidades exploradas (log -1.18, -0.32 a +1.83 y +2.70 mW/cm²) (Figura 6E) en relación a los ratones db/+. Estas diferencias se plasman en la comparación de los tiempos implícitos en el tiempo 2, donde se observa que el grupo db/db tuvo un enlentecimiento de la onda B en este tiempo (Figura 6F).

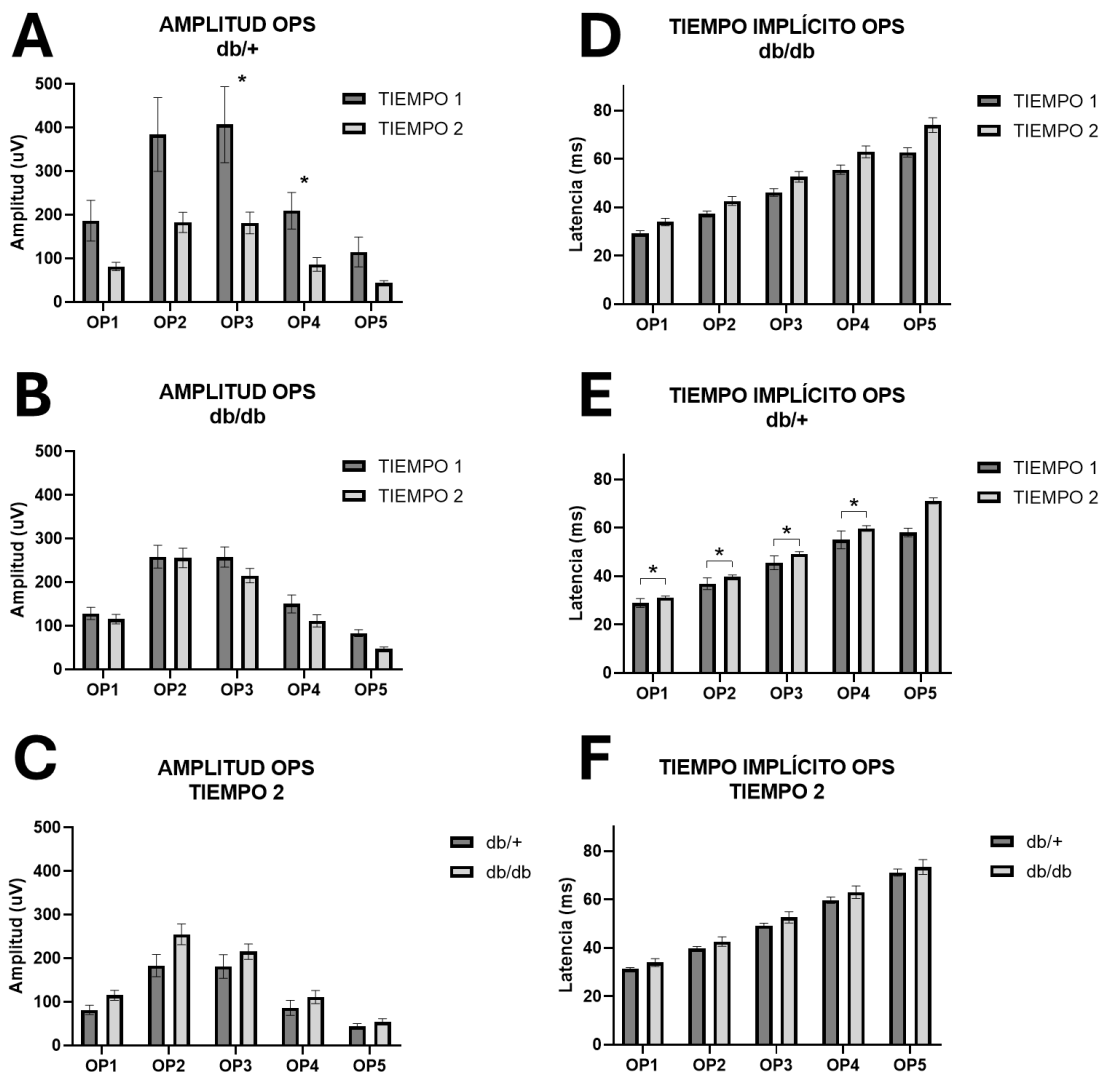


Figura 7. Cambios de la amplitud y tiempo implícito de los OPS con el envejecimiento en ratones db/+ y db/db. Se observaron diferencias en la amplitud en respuesta a dos intensidades en los ratones db/+ (A) pero no en los ratones db/db (B) ni en la comparación de las amplitudes de ambos genotipos en el tiempo 2 (C). No se observaron diferencias en los tiempos implícitos de los ratones db/+ (D) mientras que los ratones db/db mostraron un aumento del tiempo implícito en el tiempo 2 en la mayoría de los OPs exceptuando el OP5 (E). No se observaron diferencias en los tiempos implícitos entre los grupos en el tiempo 2 (F).

En los OPS, se observa una mayor amplitud de los OP3 y OP4 en el tiempo 1 en los ratones db/+, en comparación con el tiempo 2 (Figura 7A)($p=0.048$, $p=0.030$), mientras que en los ratones db/db no se observan diferencias en las amplitudes del tiempo 1 al 2 (Figura 7B), así como tampoco en el tiempo 2 al comparar ambos grupos (Figura 7C). Los tiempos implícitos de los OPS de los ratones db/+ no difieren de manera importante entre sí en el tiempo 1 al 2 (Figura 7D), no obstante, se observó un aumento en el tiempo implícito de los OP1, OP2, OP3 y OP4 en el tiempo 2 en los ratones db/db (Figura 7E) ($p=0.039$, $p=0.039$, $p=0.039$, $p=0.043$), lo que no se sostiene al comparar los tiempos implícitos de ambos grupos en el tiempo 2 (Figura 7F).

Se demostraron algunos cambios en ciertos parámetros en ambos genotipos, especialmente, se observó que el paso del tiempo marcadamente afecta los tiempos implícitos de las ondas A y B en el grupo db/db, no obstante, al revisar el análisis en conjunto con la comparación en el tiempo 2, queda evidenciado que el único parámetro que demuestra diferencias importantes entre los genotipos es el tiempo implícito de la onda B (Figura 6F) en algunas intensidades exploradas (log +0.11 a +1.40 mW/cm²), parámetro que aumentaría con el avance de la diabetes en el grupo db/db.

En general estos resultados indican que algunos parámetros del ERG cambian con la progresión de la diabetes en los ratones db/db (tiempo implícito onda B), pero no sufren cambios significativos con el envejecimiento, demostrado por la ausencia de cambios importantes en el grupo db/+. Cabe mencionar que las amplitudes fueron reportadas, pero no consideradas para ahondar en ellas, lo que será discutido más adelante.

9.2.2 EFECTOS DE LA PBM EN RATONES DIABÉTICOS MEDIDO POR ERG

Después de confirmar que la retinopatía diabética de los ratones db/db conllevaba a cambios funcionales en el ERG, se estudiaron los parámetros amplitud y tiempo implícito de la onda A y B, tiempo implícito de OPS y amplitud de OPS para explorar el efecto de la PBM en los ratones db/db.

No se observaron diferencias en las amplitudes de la onda A en el tiempo 1 al 2 en los ratones del grupo control (Figura 8A) ni en los ratones del grupo PBM (Figura 8B). De igual manera, no hubo diferencias entre ambos grupos en el tiempo 2 (Figura 8C). En contraste, los tiempos implícitos de la onda A fueron mayores en el tiempo 2 en el grupo control (log +1.40 a +2.70 mW/cm²) (Figura 8D) y grupo PBM (log +1.40 a +2.70 mW/cm²) (Figura 8E) aunque entre ellos no hubo diferencias en el tiempo 2 (Figura 8F).

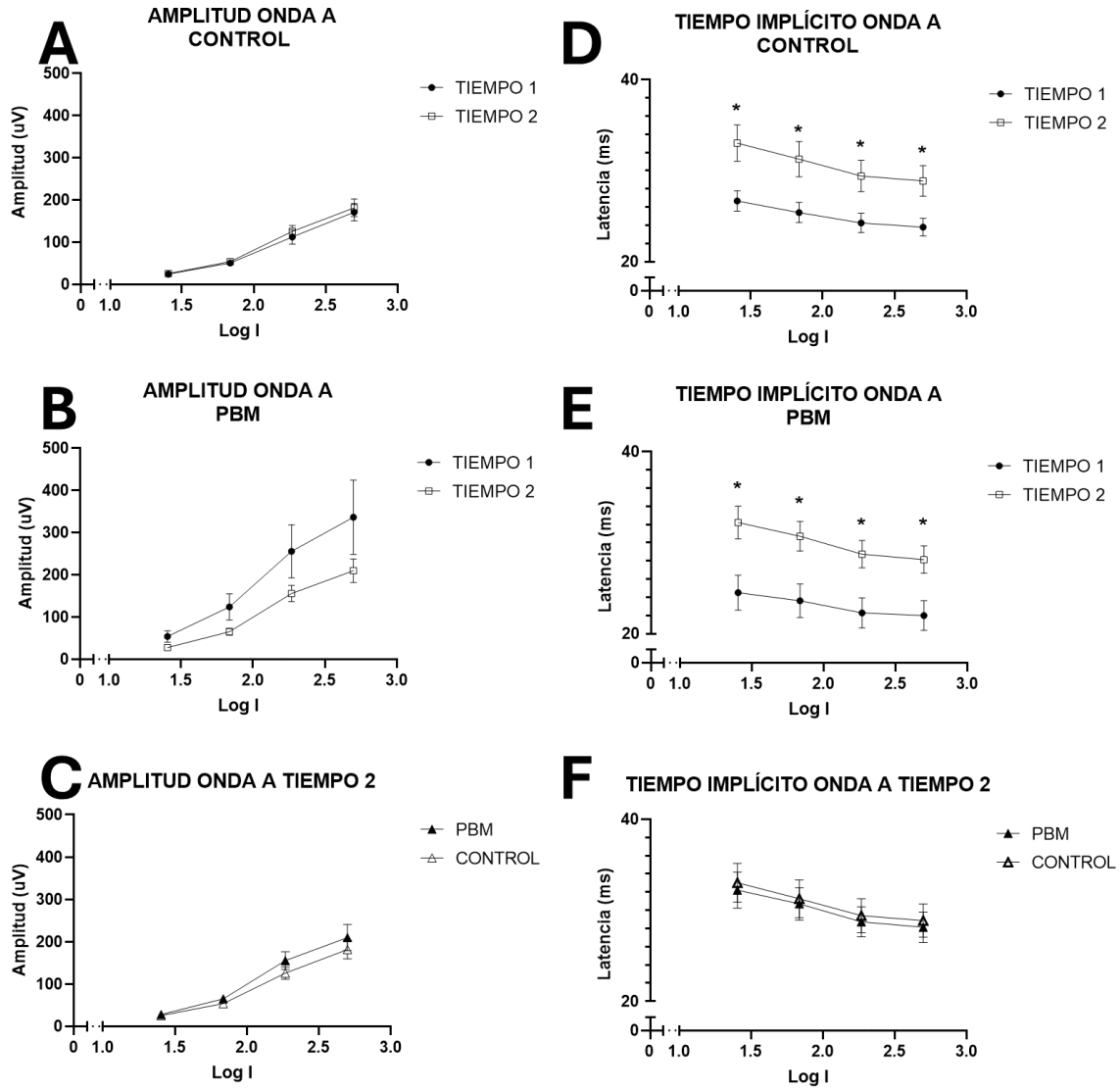


Figura 8. Efectos del envejecimiento y de la progresión de la diabetes en los parámetros de amplitud y tiempo implícito de la onda A de los ratones del grupo control y PBM. No se observaron diferencias en las amplitudes de los ratones del grupo control (A) ni PBM (B), así como tampoco al comparar las amplitudes de los grupos en el tiempo 2 (C). Por otro lado, se observó un mayor tiempo implícito en todas las intensidades en el grupo control (D) y PBM (E) en el tiempo 2 con respecto al tiempo 1. No obstante, no se observaron diferencias entre los grupos en el tiempo 2 (F).

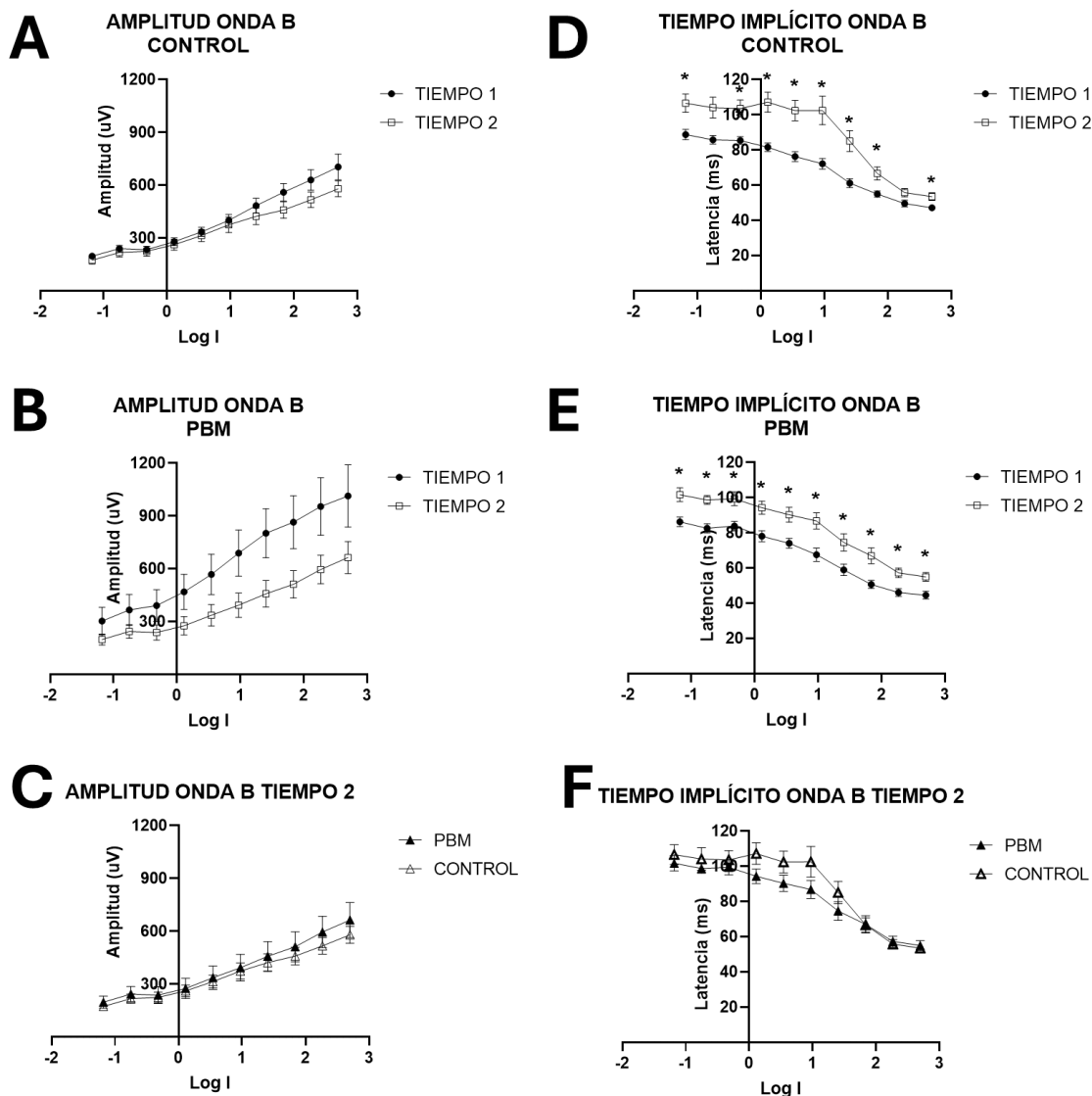


Figura 9. Efectos del envejecimiento y de la progresión de la diabetes en los parámetros de amplitud y tiempo implícito de la onda B de los ratones del grupo control y PBM. No se observaron diferencias en las amplitudes de los ratones del grupo control (A) ni PBM (B), así como tampoco al comparar las amplitudes de los grupos en el tiempo 2 (C). Por otro lado, se observó un mayor tiempo implícito en la mayoría de las intensidades en el grupo control (D) y PBM (E) en el tiempo 2 con respecto al tiempo 1. No obstante, no se observaron diferencias entre los grupos en el tiempo 2 (F).

Por su parte, las amplitudes de la onda B no demostraron diferencias en el tiempo 1 al 2 en los grupos control (Figura 9A) ni PBM (Figura 9B). Del mismo modo, tampoco hubo diferencias en las amplitudes entre los grupos en el tiempo 2 (Figura 9C). Se observó un mayor tiempo implícito de la onda B en el tiempo 2 en la mayoría de las intensidades exploradas ($\log -1.18, -0.32$ a $+1.83$ y $+2.70$ mW/cm^2) (Figura 9D) en el grupo control y en el grupo PBM (-1.18 a $+0.54, +1.40$ a $+2.70$ mW/cm^2) (Figura 9E). No se demostraron diferencias entre ambos grupos en el tiempo 2 (Figura 9F).

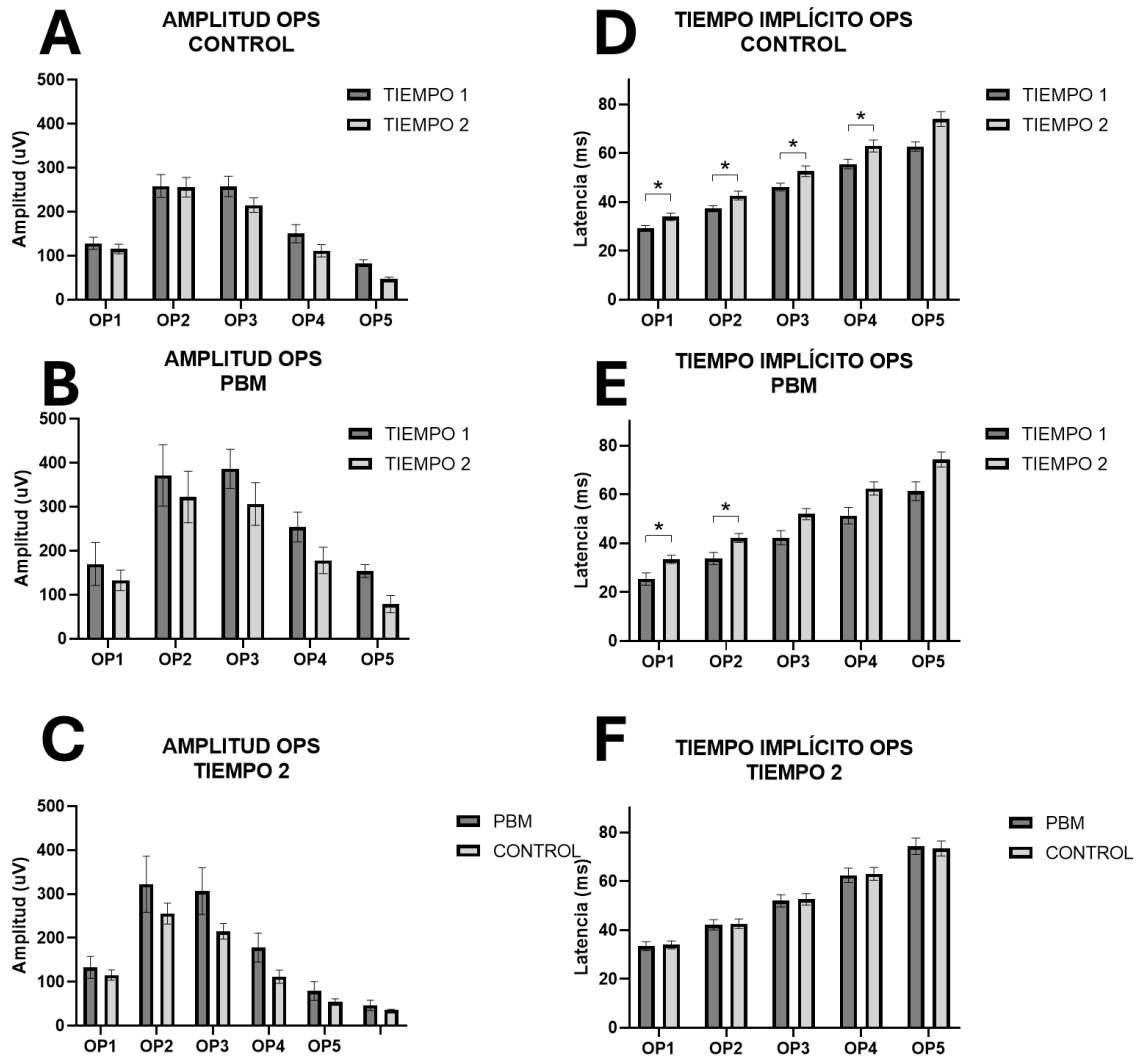


Figura 10. Efectos del envejecimiento y de la progresión de la diabetes en los parámetros de amplitud y tiempo implícito de los OPS de los ratones del grupo control y PBM. No se observaron diferencias en las amplitudes de los ratones del grupo control (A) ni PBM (B), así como tampoco al comparar las amplitudes de los grupos en el tiempo 2 (C). Por otro lado, se observó un mayor tiempo implícito en algunas intensidades en el grupo control (D) y PBM (E) en el tiempo 2 con respecto al tiempo 1. No obstante, no se observaron diferencias entre los grupos en el tiempo 2 (F).

La amplitud de los OPS no demostró cambios de importancia del tiempo 1 al tiempo 2 en los ratones de los grupos control (Figura 10A) ni PBM (Figura 10B), así como tampoco se observaron diferencias en el tiempo 2 al comparar ambos grupos (Figura 10C). En la comparación del tiempo 1 al tiempo 2, se observó un aumento en los tiempos implícitos de los OP1, OP2, OP3 y OP4 en el tiempo 2 (Figura 10D) ($p=0.039$, $p=0.039$, $p=0.039$, $p=0.043$) en los ratones del grupo control, mientras que los ratones del grupo PBM aumentaron los tiempos implícitos de algunos OPS (OP1 $p=0.040$, OP2 $p=0.044$) (Figura 10E). No se observaron diferencias en los tiempos implícitos de los grupos al comparar los valores en el tiempo 2 (Figura 10F).

Se observaron alteraciones de los parámetros similares entre los grupos control y PBM. Las alteraciones de los tiempos implícitos de la onda A y B en ambos grupos en el paso del tiempo reflejan los cambios fisiológicos que ocurren en la retinopatía diabética a medida que la enfermedad avanza.

La similitud de los hallazgos entre grupos del análisis pareado, así como la ausencia de cambios significativos en el análisis del efecto de la PBM en el tiempo 2, sugiere que la terapia de PBM no contrarresta totalmente los efectos de la progresión de la DM medido por ERG.

El detalle de las pruebas T mencionadas en la sección de ERG puede ser revisado en el Anexo A.

9.3 HISTOLOGÍA

9.3.1.1 EFECTOS DE LA DIABETES EN LA EXPRESIÓN DE GFAP

Los astrocitos retinales normalmente son las únicas que expresan GFAP en cantidades considerables, pero en la diabetes las células de Müller expresan una gran cantidad de GFAP (34). Las células de Müller abarcan todo el espesor de la retina e interactúan con las neuronas y los componentes de la barrera hematorretinal interna, la que juega un rol fundamental en la retinopatía diabética. Para determinar la presencia de astrocitos y la reactividad de las células de Müller, se comparó la cantidad de área de ocupada por el marcador GFAP en relación al área total de cada capa lo que permitió explorar diferencias entre los grupos db/+ y db/db.

No se observaron diferencias en el porcentaje de GFAP en los grupos db/+ (Figura 12A) ni db/db (Figura 12B) en la CCG+CFNR, CPE, la CNI ni IPL y en ambos casos se observó ausencia o mínima expresión de GFAP en las capas OPL, INL ni IPL con una mayor presencia en la capa CFNR+CCG. La comparación de ambos grupos en el tiempo 2 no demuestra diferencias en la expresión de GFAP entre ellos (Figura 12C).

Estos resultados indican que no hay cambios en la expresión de GFAP en las distintas capas de la retina (Figura 11) por parte de los astrocitos y/o células de Müller con el envejecimiento ni con la progresión de la retinopatía diabética.

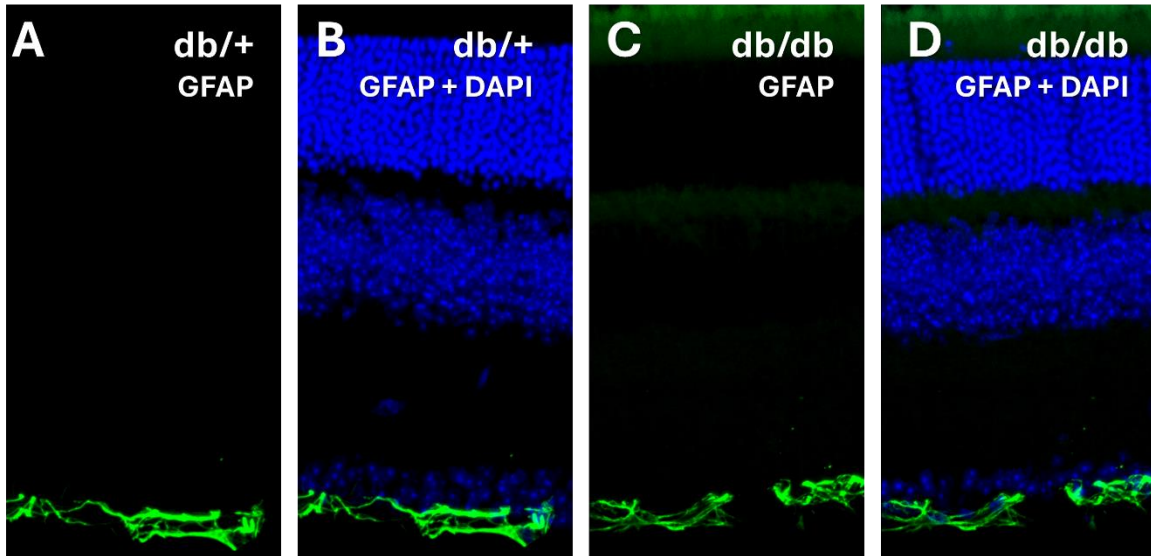


Figura 11. Imágenes de inmunohistoquímica representativas comparativas entre ratones db/+ y db/db, con respecto al marcador GFAP + DAPI. A) Marcaje GFAP en ratones db/+. B) Marcaje GFAP + DAPI en ratones db/+. C) Marcaje GFAP en ratones db/db. D) Marcaje GFAP + DAPI en ratones db/db. Se observa marcaje similar entre ambos genotipos, en la capa CCG+CFNR.

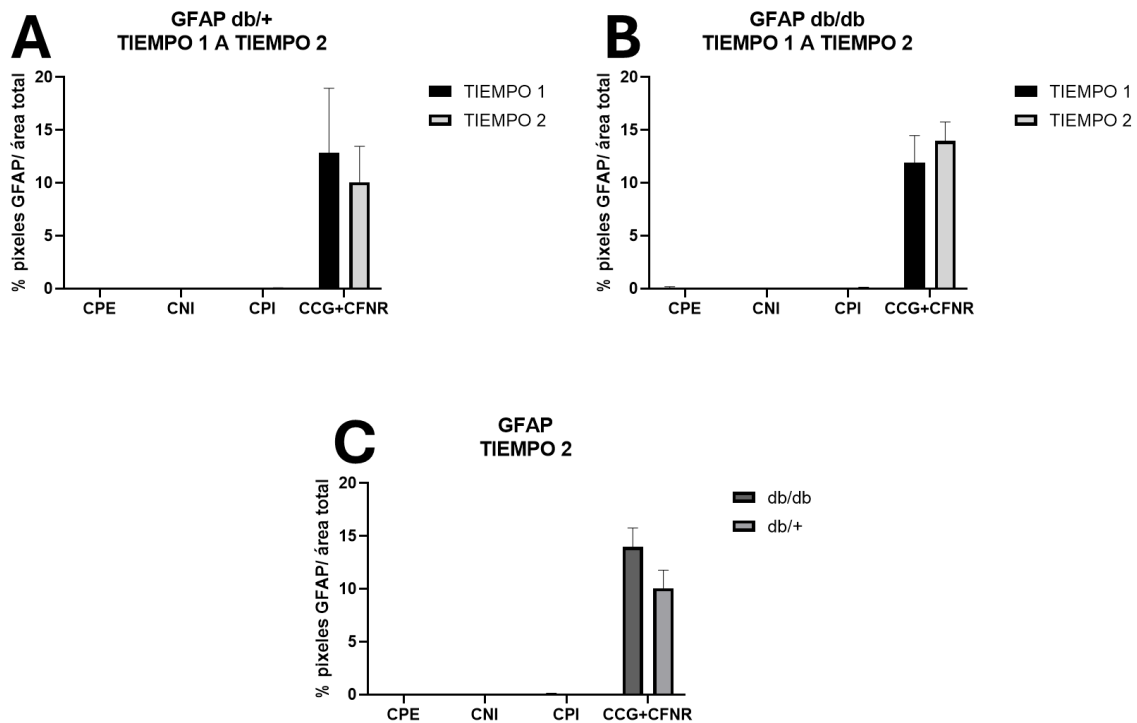


Figura 12. Expresión de GFAP en ratones de db/+ y db/db en las distintas capas de la retina. (A) Se observa ausencia de expresión de GFAP en las capas CPE, CNI ni CPI mientras que en la CCG+CFNR no se observan diferencias, en los ratones db/+ al comparar el tiempo 1 con el tiempo 2 (B) Se observa ausencia o mínima expresión de GFAP en las capas CPE, CNI ni CPI mientras que en la CCG+CFNR no se observan diferencias, en los ratones db/db al comparar el tiempo 1 con el tiempo 2. (C) No se observan diferencias en la expresión de GFAP entre los grupos en ninguna de las capas, en el tiempo 2.

9.3.1.2 EFECTOS DE LA DIABETES EN LA EXPRESIÓN DE POR IBA1

Considerando el rol de la microglía en la inflamación asociada a la retinopatía diabética, se estudió la distribución y densidad de microglía en las distintas capas de la retina. Para esto, se comparó la cantidad de área ocupada por el marcador IBA1 en relación al área total de cada capa para explorar diferencias entre los grupos db/+ y db/db. La expresión de GFAP no cambió del tiempo 1 al tiempo 2 en los ratones db/+(Figura 14A) ni db/db (Figura 14B).

No se observaron diferencias en el porcentaje de IBA1 del tiempo 1 al tiempo 2 en las capas CCG+CFNR, CNV e IPL en los ratones db/+ (Figura 14A) ni db/db, pero sí en la capa CPE en los ratones db/db (Figura 14B). Además, se detectó una mayor presencia del marcador en los ratones db/db al comparar los grupos en el tiempo 2 (Figura 14C) ($p=0.042$).

Estos resultados indican que hay más presencia de microglía en la capa CPE en los ratones db/db que en los ratones db/+ en el tiempo 2, lo que se puede observar en la imagen referencial de la Figura 13.

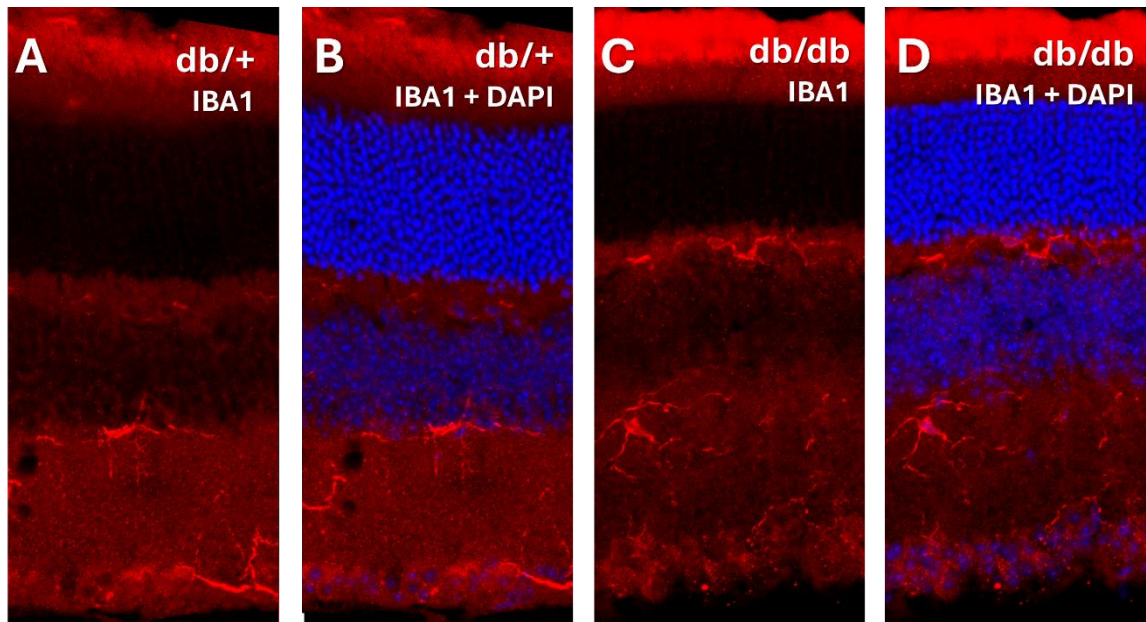


Figura 13. Imágenes de inmunohistoquímica representativas comparativas entre ratones db/+ y db/db, con respecto al marcador IBA1 + DAPI. A) Marcaje IBA1 en ratones db/+. B) Marcaje IBA1 + DAPI en ratones db/+. C) Marcaje IBA1 en ratones db/db. D) Marcaje IBA1 + DAPI en ratones db/db. Se observa mayor marcaje de IBA1 en capa plexiforme externa en ratones db/db con respecto a los db/+.

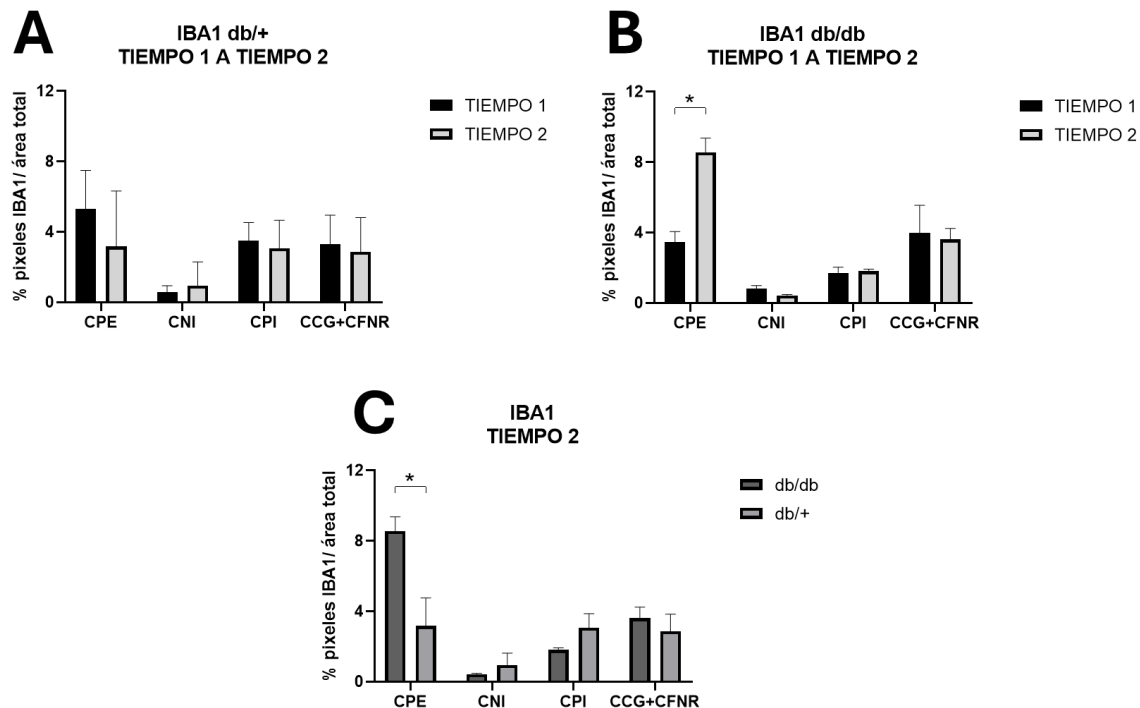


Figura 14. Expresión de IBA1 en ratones de db/+ y db/db en las distintas capas de la retina. (A) No se observan cambios de importancia en los ratones db/+, entre el tiempo 1 al tiempo 2. (B) Se observa una mayor expresión de IBA1 en la CPE en el tiempo 2, en los ratones db/db. (C) Se observa una mayor expresión de IBA1 en la CPE por parte de los ratones db/db en relación con los db/+, en el tiempo 2.

9.3.1.3 EFECTOS DE LA DIABETES EN LOS GROSORES DE LAS CAPAS DE LA RETINA

Para evaluar el efecto de la retinopatía diabética en el grosor de las distintas capas retinales, se midió el grosor de las capas CCG + CFNR, IPL, CNI, CPE, CNE y capa de los segmentos internos de los fotorreceptores (IS) comparándolos entre los grupos db/+ y db/db.

No se observaron diferencias en la comparación de los grosores del tiempo 1 con el 2 en los ratones db/+ (Figura 16A) ni db/db (Figura 16B), pero se observó un menor grosor de la CNI en el grupo db/db (Figura 16C) ($p=0.046$) en comparación con el db/+ en el tiempo 2.

Los resultados son indicativos de que la retinopatía diabética no conlleva a disminución de grosores de las capas CCG + CFNR, IPL, CPE ni CNE de la retina, pero sí en la CNI, lo que se puede observar en la Figura 15.

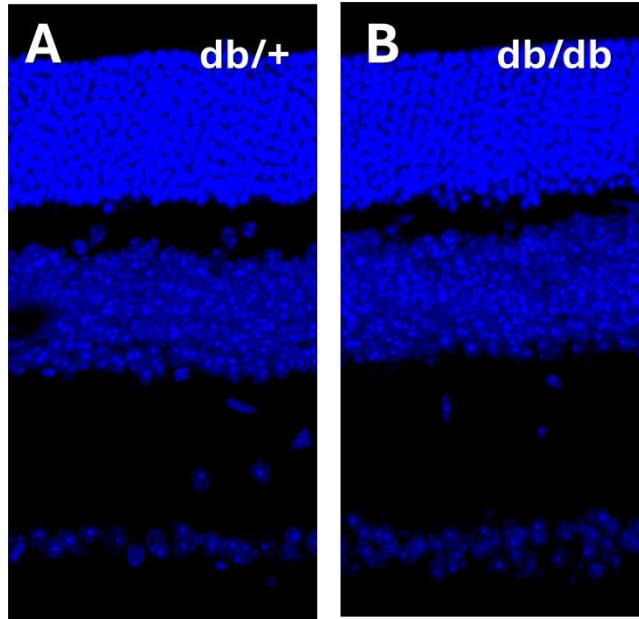


Figura 15. Imágenes marcación con DAPI representativas de los grosores comparativos entre ratones db/+ (A) y db/db (B). No se observan diferencias en los grosores de las capas CCG+CFNR, CPI, CPE, CNE ni SI, pero sí se nota una sutil disminución el grosor de la capa nuclear interna en los ratones db/db.

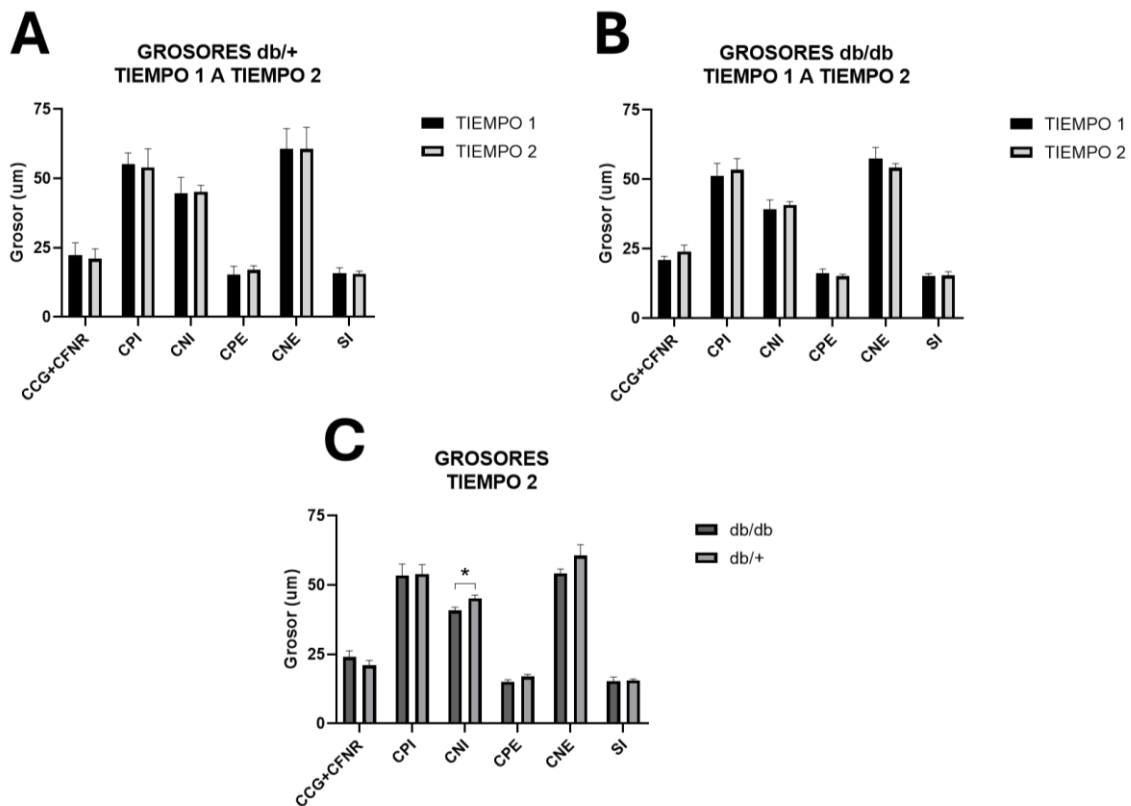


Figura 16. Grosos de las distintas capas de la retina de los ratones de db/+ y db/db. (A) No se observan cambios de importancia en los ratones db/+, del tiempo 1 al tiempo 2. (B) No se observan cambios de importancia en los ratones db/db, del tiempo 1 al tiempo 2. (C) No se observan diferencias entre los grupos en el tiempo 2.

9.3.2.1 EFECTOS DE LA PBM EN LA EXPRESIÓN DE GFAP

Para analizar el efecto de la PBM en la expresión de GFAP, se comparó la cantidad de área de ocupada por el marcador GFAP en relación al área total de cada capa para explorar diferencias entre los grupos control y PBM.

No se observaron diferencias entre el tiempo 1 y el tiempo 2 en los ratones del grupo control (Figura 18A) ni PBM (Figura 18B) en cuanto a la expresión de GFAP en las en las capas CCG+ CFNR, CPE, CNI ni IPL. No se observaron diferencias en el porcentaje de GFAP entre los grupos en el tiempo 2, en las distintas capas (Figura 18C).

Estos resultados indican que no hay mayor actividad de GFAP de astrocitos y/o células de Müller en la retinopatía diabética, en las capas CCG + CFNR, CPE, CNI ni IPL, lo que se puede observar en la Figura 17.

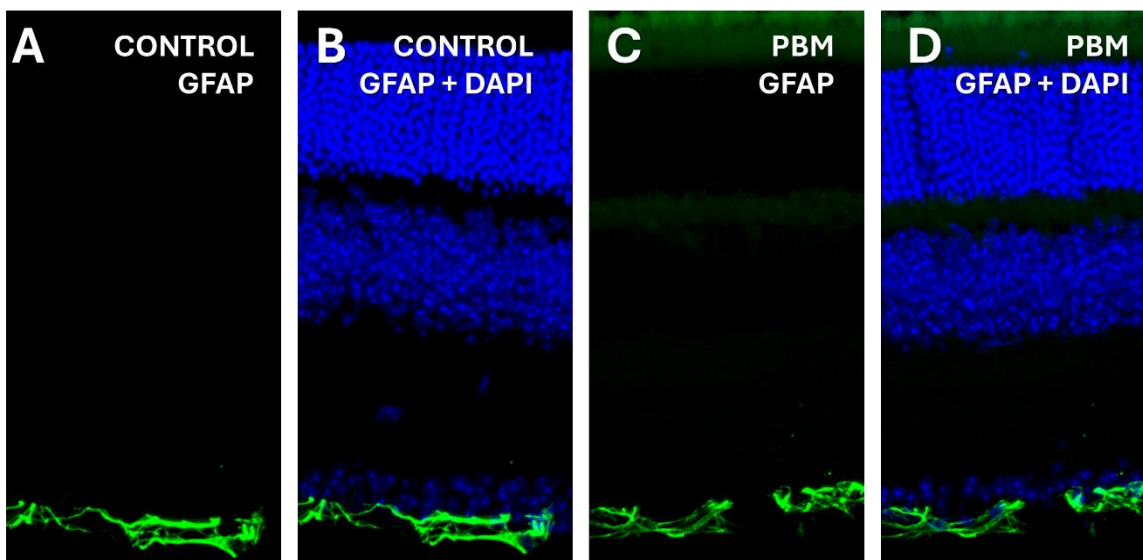


Figura 17. Imágenes de inmunohistoquímica representativas comparativas entre ratones del grupo control y PBM, con respecto al marcador GFAP + DAPI. A) Marcaje GFAP en ratones db/+. B) Marcaje GFAP + DAPI en ratones db/+. C) Marcaje GFAP en ratones db/db. D) Marcaje GFAP + DAPI en ratones db/db. Se observa marcaje similar de GFAP en la capa CCG + CFNR entre los ratones del grupo control y PBM.

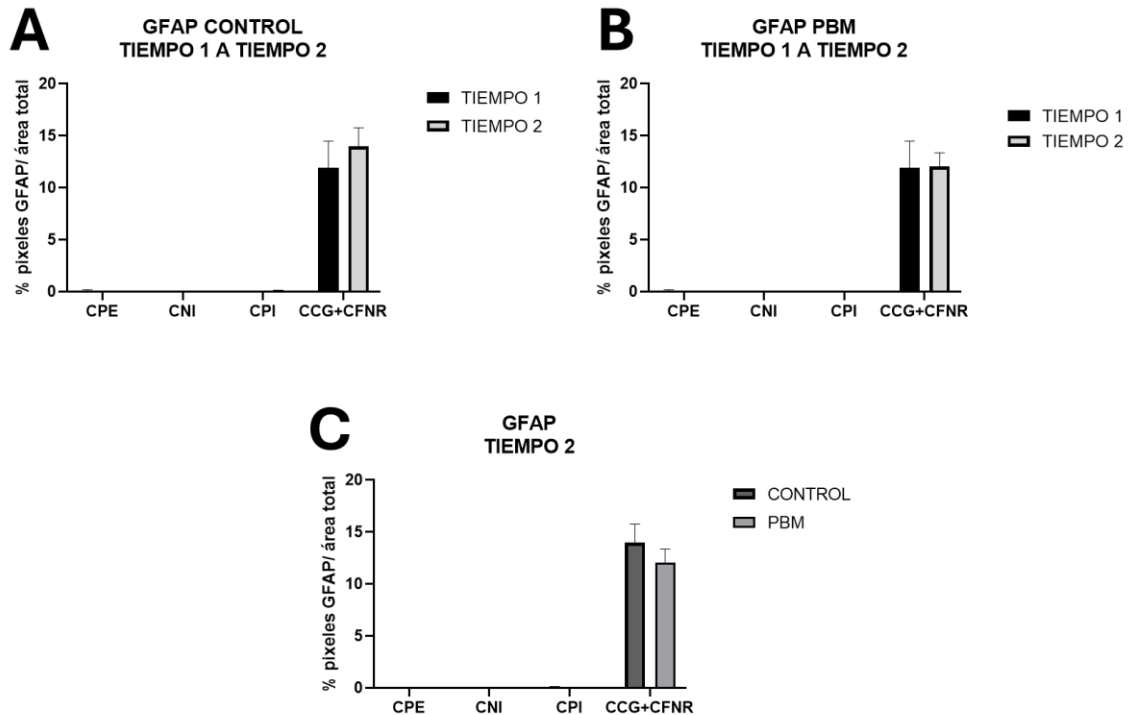


Figura 18. Expresión de GFAP en las distintas capas de la retina en los ratones de los grupos control y PBM. (A) No se observan cambios de importancia en los ratones del grupo control, del tiempo 1 al tiempo 2. (B) No se observan cambios de importancia en los ratones del grupo PBM, del tiempo 1 al tiempo 2. (C) No se observan diferencias entre los grupos en el tiempo 2.

9.3.2.2 EFECTOS DE LA PBM EN LA EXPRESIÓN DE IBA1

Para analizar el efecto de la PBM en la expresión de IBA1, se comparó la cantidad de área ocupada por el marcador IBA1 en relación al área total de cada capa para explorar diferencias entre los grupos control y PBM.

Se observó que existe una mayor cantidad de porcentaje de expresión de IBA1 en la CPE en los ratones del grupo control en la comparación del tiempo 1 con el tiempo 2 (Figura 20A) ($p=0.027$), mientras que el resto de las capas no demostraron diferencias importantes. En los ratones del grupo PBM, no se observaron diferencias en el porcentaje de IBA1 en las distintas capas de la retina al comparar el tiempo 1 con el tiempo 2 (Figura 20B), así como tampoco al comparar la expresión de IBA1 de los grupos control y PBM en el tiempo 2 (Figura 20C).

Estos resultados indican que hay mayor densidad de microglía en la capa CPE en los ratones del grupo control que los del grupo PBM a medida que la diabetes progresa, lo que se puede observar en la Figura 19.

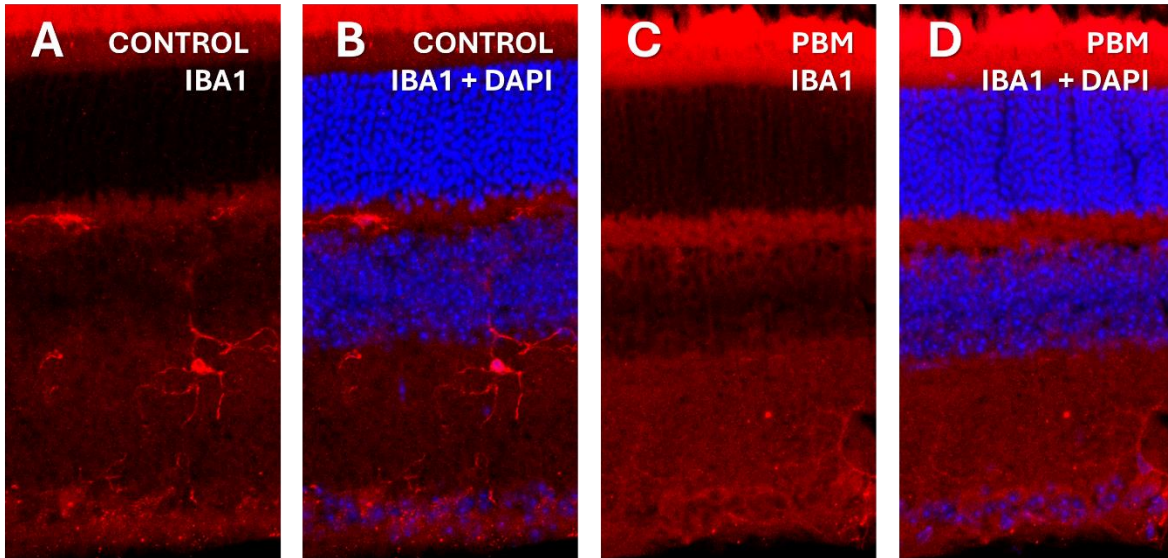


Figura 19. Imágenes de inmunohistoquímica representativas comparativas entre ratones del grupo control y PBM, con respecto al marcador IBA1 + DAPI. A) Marcaje IBA1 en ratones db/+. B) Marcaje IBA1 + DAPI en ratones db/+. C) Marcaje IBA1 en ratones db/db. D) Marcaje IBA1 + DAPI en ratones db/db. Se observa un menor marcaje en los ratones del grupo PBM.

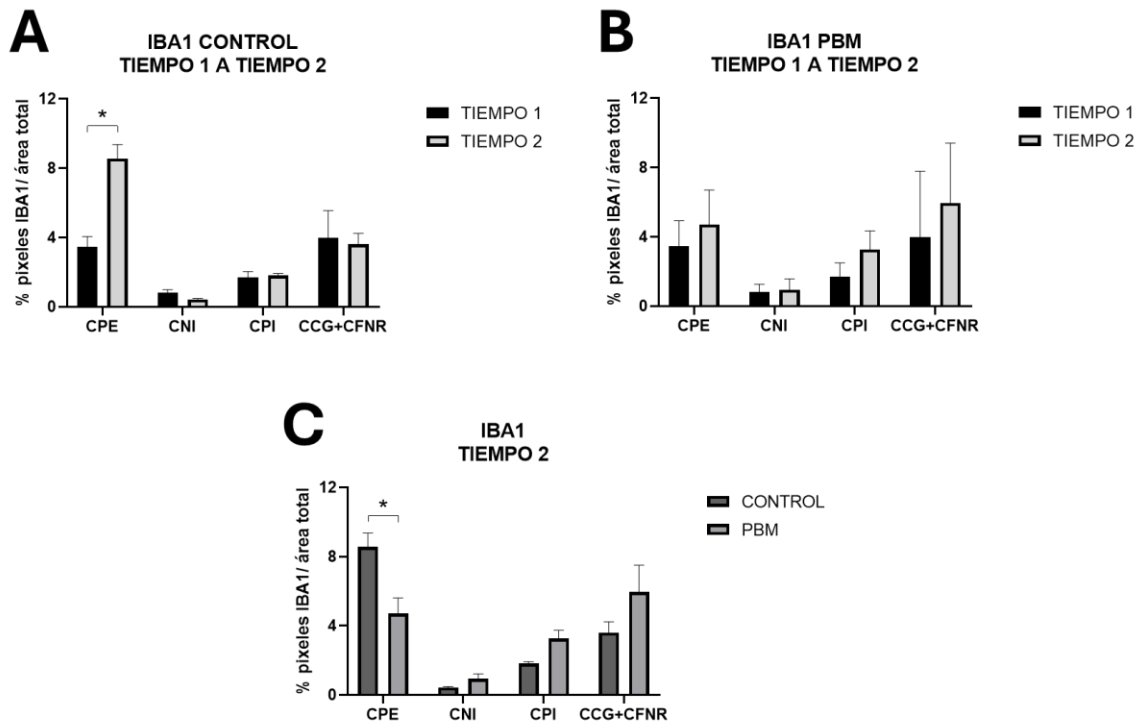


Figura 20. Expresión de IBA1 en las distintas capas de la retina en los ratones de los grupos control y PBM. (A) Se observa mayor expresión de IBA1 en la capa CPE en el tiempo 2 en los ratones del grupo control (B) No se observan diferencias entre los tiempos en las distintas capas de la retina en los ratones del grupo PBM (C) Se observa una mayor expresión de IBA1 en la capa CPE en el grupo control en el tiempo 2.

9.3.2.3 EFECTOS DE LA PBM EN LOS GROSORES DE LAS CAPAS DE LA RETINA

Para analizar el efecto de la PBM en los grosores de las capas de la retina, se midió el grosor de las capas CCG + CFNR, IPL, CNI, CPE, CNE e IS comparándolos entre los grupos control y PBM.

No se observaron diferencias entre el tiempo 1 y el tiempo 2 en los ratones del grupo control (Figura 22A) ni PBM (Figura 22B) en cuanto a los grosores las en las capas CCG+ CFNR, CPE, CNI, IPL, CNE ni SI. No se observaron diferencias en los grosores entre los grupos control y PBM en el tiempo 2, en las distintas capas (Figura 22C).

Estos resultados indican que la PBM no tiene efectos sobre los grosores de las capas CCG + CFNR, IPL, CPE, CNE ni IS, lo que se puede observar en la Figura 21.

El detalle de las pruebas T mencionadas en la sección de histología puede ser revisado en el Anexo B.

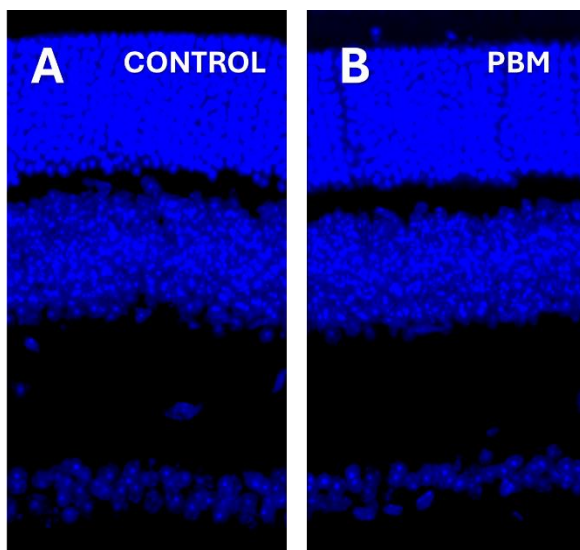


Figura 21. Imágenes de marcación con DAPI representativas de los grosores comparativos entre ratones db/+ (A) y db/db (B). Se observan grosores similares en las distintas capas de la retina entre los ratones del grupo control y PBM.

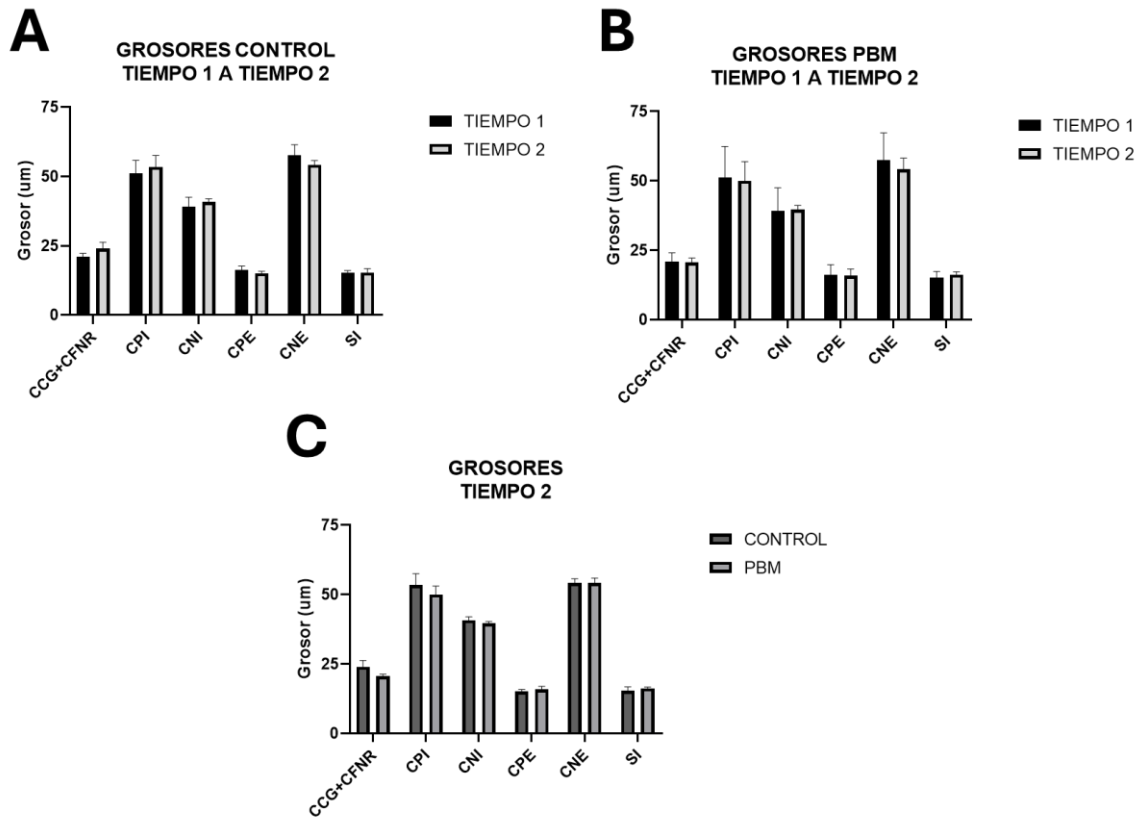


Figura 22. Grosos de las distintas capas de la retina en los ratones de los grupos control y PBM. (A) No se observan diferencias en los grosos de las distintas capas de la retina en los ratones del grupo control (B) No se observan diferencias en los grosos de las distintas capas de la retina en los ratones del grupo PBM (C) No se observan diferencias en los grosos de las distintas capas de la retina en los ratones entre los grupos en el tiempo 2.

10. DISCUSIÓN

La retinopatía diabética, una condición que puede causar pérdida significativa de la visión y ceguera, es un resultado común de la diabetes, una enfermedad crónica. Una alternativa no invasiva para prevenir o reducir el daño retinal es la fotobiomodulación, una terapia en la que se administra luz para estimular procesos biológicos que ayudan a prevenir daño retinal. Como objetivo principal del presente estudio se aplicó terapia de PBM a ratones por 70 días, por 12 horas al día, a ratones db/db, modelo de retinopatía diabética tipo II. Al medir el estado funcional de la retina con ERG, se observó un pequeño posible efecto de la PBM en algunos OPS, así como se observó también que podría existir un efecto sobre el marcaje de IBA1 en el grupo PBM. Además, se corroboró los efectos de la diabetes medido por ERG e IHC y se encontraron diferencias en los genotipos, como por ejemplo un mayor tiempo implícito de la onda B, menor grosor de la CNV y mayor expresión de IBA1 en los ratones db/db.

Para corroborar que los ratones db/db desarrollaban daño funcional por la retinopatía diabética, se realizaron distintas pruebas que corroboraron diferencias entre los genotipos db/db y db/+ en el ERG. Se demostró un aumento en el tiempo implícito de la onda A y B en los ratones db/db a medida que la diabetes progresaba, siendo las medias mayores en los ratones db/db que los ratones db/+. Esto es coincidente con la literatura ya que se han reportado cambios electrofisiológicos en el ERG en este modelo, tales como aumento del tiempo implícito de la onda A y B, disminución de la amplitud de la onda B y alteración del tiempo implícito y amplitud de los OPS (175–178).

En este estudio se observó un mayor tiempo implícito de los OPS en los ratones db/db a medida que progresaba la enfermedad, en concordancia con la literatura (175). Se ha reportado que los OPS son uno de los parámetros que se alteran tempranamente en el desarrollo de la retinopatía diabética (179) y que se vuelven anormales a medida que la RD progresa siendo particularmente vulnerables a cambios en la circulación retinal (60,158). Se cree que se originan producto de la interacción entre las neuronas de la retina interna pero no se sabe con certeza qué células son las responsables, aunque se ha sugerido que las células amacrinas e interplexiformes están involucradas su generación (158). En ese sentido, el tipo de parámetro afectado en el ERG es sugerente de la localización anatómica del daño retinal por lo que su afectación indicaría una alteración de la función retinal de la retina interna, lo que es concordante con el daño isquémico que ocurre en la RD, ya que los plexos vasculares, afectados por la microangiopatía diabética, están ubicados en esa zona. Coincidentemente, la isquemia es un evento común y temprano en la retinopatía diabética (180) y es conocido que los OPS son vulnerables a la isquemia (179).

Hubo una tendencia en ambos grupos, control y PBM, de enlentecimiento del tiempo implícito de las ondas A, B y de algunos OPS a medida que la enfermedad progresaba, reflejando el avance de la retinopatía diabética en los ratones db/db. Además, el grupo PBM no demostró cambios en las medias de los OP3 y OP4 en el transcurso del tiempo 1 al 2, mientras que el grupo control sí demostró un aumento en el tiempo implícito de los OPs en aquel periodo, lo que podría estar reflejando un efecto protector sobre este parámetro. Considerando que previamente se ha reportado que la PBM induce protección en contra de las anomalías causadas por la diabetes (108), esta diferencia podría ser evidencia de un potencial efecto terapéutico generado por la PBM. Además, los OPs no alterados podrían estar reflejando selectividad en la afectación de estos. Existen algunas investigaciones que han explorado los orígenes de cada OPs, pero todavía hay incertidumbre sobre ello (158). Por una parte, el OP4 ha sido asociado a disfunción microvascular temprana (174) en personas diabéticas, lo que tiene estrecha relación con el modelo estudiado. Por otro lado, el origen del OP3 se ha asociado al sistema de bastones, los cuales está comprobado no sólo se afectan en la retinopatía diabética sino que también contribuyen fisiopatológicamente (48). Aun así, la evidencia es incompleta y su significancia desde el punto de vista funcional debe ser explorada con más estudios ya que no se conocen los subcircuitos involucrados en detalle, y no es posible extrapolarlo a partir de los datos de esta investigación. En contraparte, no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos en el tiempo 2 en los parámetros de amplitud y tiempo implícito de las ondas A, B y OPS, a diferencia de lo encontrado en otros estudios que utilizaron longitudes de onda similares (107). Por lo tanto, si bien existen diferencias en la progresión de la RD demostrado por el ERG, la comparación de los dos grupos en el tiempo 2 no demostró diferencias por lo que, si es que existiese un efecto, no sería lo suficientemente potente.

En cuanto a las amplitudes de las ondas A, B y OPS, es importante mencionar que hubo una alta variabilidad en los valores, problema que también han tenido otros estudios (177). El origen de la variabilidad está probablemente en el posicionamiento de los electrodos con respecto al dipolo retinal. Se estandarizó la técnica y se aplicó con rigurosidad para prevenir lo más posible la variabilidad, pero aun así a veces se registraron amplitudes que salían del rango de variabilidad estándar, incluso para un mismo ratón medido en dos ocasiones seguidas. Debido a esto y por el hecho de que los ratones db/+ mostraron aumento de la amplitud en el envejecimiento, fenómeno que no ha sido documentado previamente, las amplitudes fueron reportadas, pero no consideradas para realizar un análisis exhaustivo.

Por otro lado, se analizó la cantidad de área ocupada por el marcador de microglía IBA1 por capa en relación al área total y se observó una diferencia significativa entre los ratones db/+ y db/db, con una mayor cantidad de IBA1 en la CPE en ratones db/db con respecto a los db/+, similar a lo encontrado por

otros autores en ratas diabéticas inducidas por inyección de estreptozotocina (181) y en un estudio con personas diabéticas (44). Estos resultados también coinciden con la distribución conocida de la microglía, cuya localización es en las capas plexiformes de la retina (182). Considerando que en la DM existe un estado inflamatorio crónico (183) es de esperar que haya una mayor actividad de IBA1 en la retina ya que las reacciones inflamatorias que ocurren en la retina son mediadas por microglía activada.

Se observó un menor grosor de la CNV en ratones db/db en comparación con los ratones db/+, lo que concuerda con lo estudiado por otros autores (175,176) en los mismos genotipos. En esta capa se encuentran los núcleos de las células amacrinas, bipolares, horizontales y células de Müller. Si bien se conocen alteraciones funcionales en todos los grupos celulares anteriores en la RD (184), no es posible determinar cuáles son las células que específicamente explicarían la disminución del grosor con la información de este estudio. De todas maneras, el hallazgo sugiere que existe degeneración neuronal o atrofia de alguno de ellos, lo que ha sido reportado previamente (185). Por otro lado, no se observó disminución del grosor de la capa de células ganglionares, a diferencia de lo encontrado por los estudios anteriores y otros autores (186,187). Tampoco se observaron diferencias entre los ratones db/db y db/+ en cuanto al porcentaje de GFAP en la CCG + CFNR, lo que indica ausencia de cambios en los astrocitos a las 33 semanas estudiado por inmunohistoquímica. Estos resultados difieren de hallazgos encontrados previamente por otros investigadores (175) los que encontraron mayor expresión de GFAP tanto en esa capa como en otras, denotando una mayor actividad de los astrocitos y células de Müller. Estas discrepancias podrían deberse al reducido tamaño de la muestra histológica lo que posiblemente afectó precisión del análisis, aumentó la variabilidad y disminuyó el poder estadístico. Es difícil establecer cuál es el origen de estas diferencias en base a los datos de este estudio y requerirá de más estudio.

Por su parte, en las pruebas inmunohistoquímicas para evaluar la efectividad de la fotobiomodulación, el marcador IBA1 en la capa CPE tuvo diferencias significativas en el grupo control en el tiempo 2, pero no en el grupo PBM, lo que podría indicar de manera similar que el grupo tuvo menos daño por la progresión de la diabetes. También es importante para la interpretación considerar que el tamaño muestral de los análisis histológicos era reducido en algunas comparaciones histológicas, lo que podría influir en el poder estadístico de las pruebas.

Se requiere de más estudios para afinar el protocolo de fotobiomodulación de manera de lograr un efecto terapéutico cuya efectividad sea demostrable mediante variados parámetros de las distintas técnicas utilizadas.

11. CONCLUSIONES

La fotobiomodulación es una gran opción potencial para prevenir el daño retinal en las primeras etapas de la retinopatía diabética, ya que funciona como un tratamiento preventivo que actuaría sobre los cambios neurodegenerativos de la retinopatía diabética. El protocolo de fotobiomodulación de este estudio no mostró un efecto notable en la funcionalidad de la retina medida por ERG ni en las técnicas inmunohistoquímicas. Sin embargo, se observó un pequeño posible efecto en algunos OPS y en el marcaje de IBA1. Aunque el protocolo de fotobiomodulación estudiado no demostró un efecto importante en la función y estructura retinal, su potencial como tratamiento preventivo para la retinopatía diabética sigue siendo prometedor en base a la evidencia actual. Es necesario realizar más estudios para establecer un protocolo con efectividad comprobable en una mayor variedad de parámetros de ERG e inmunohistoquímica.

Además, los resultados de esta investigación demuestran que los ratones db/db sufren cambios en la retina que se manifiestan como deterioro funcional de la retina medido por ERG en parámetros como los tiempos implícitos de la onda B y en histología en el grosor de la capa nuclear interna.

Los resultados resaltan que se pueden utilizar modelos animales para obtener una comprensión más profunda de la fisiopatología de la retinopatía diabética y explorar nuevas opciones terapéuticas para prevenir o mitigar el daño retinal causado por la retinopatía diabética.

12. ANEXOS

ANEXO A

ERG PRUEBAS T PAREADAS

db/+

PARÁMETRO	P	MEDIA TIEMPO 1	SD TIEMPO 1	MEDIA TIEMPO 2	SD TIEMPO 2
Amplitud Onda A – Intensidad 1	0.714	35.56776	17.36498	20.12295	5.783154
Amplitud Onda A – Intensidad 2	0.087	71.73068	35.11238	38.81327	12.76037
Amplitud Onda A – Intensidad 3	0.094	173.3052	81.24817	88.96606	29.82991
Amplitud Onda A – Intensidad 4	0.094	252.8022	120.5934	123.5767	41.50746
T. implícito Onda A – Intensidad 1	0.063	26.34211	4.459298	28.47828	1.692781
T. implícito Onda A – Intensidad 2	0.389	25.45713	4.662963	27.19658	1.500291
T. implícito Onda A – Intensidad 3	0.488	23.99233	4.228073	25.64023	1.288945
T. implícito Onda A – Intensidad 4	0.473	23.7482	4.524707	25.70126	1.203765
Amplitud Onda B – Intensidad 1	0.420	302.6579	130.0024	189.3584	62.0525
Amplitud Onda B – Intensidad 10	0.038	1230.853	538.0181	593.004	223.8208
Amplitud Onda B – Intensidad 2	0.034	387.6139	165.8267	230.727	73.09608
Amplitud Onda B – Intensidad 3	0.036	388.5495	179.2282	226.8913	75.68455
Amplitud Onda B – Intensidad 4	0.052	458.7774	215.6299	264.0141	89.00011
Amplitud Onda B – Intensidad 5	0.056	566.8266	256.7893	309.3954	110.0725
Amplitud Onda B – Intensidad 6	0.038	672.5569	303.4391	365.7242	130.3918
Amplitud Onda B – Intensidad 7	0.038	809.3076	352.3866	422.5097	148.9122
Amplitud Onda B – Intensidad 8	0.028	943.9204	442.4123	475.2756	168.1082
Amplitud Onda B – Intensidad 9	0.035	1090.181	469.8368	548.9554	198.6881
T. implícito Onda B – Intensidad 1	0.028	90.7628	7.387807	92.47173	1.372911
T. implícito Onda B – Intensidad 10	0.660	49.35168	7.78797	50.96906	1.792968
T. implícito Onda B – Intensidad 2	0.673	87.68061	6.447111	91.61726	3.291842
T. implícito Onda B – Intensidad 3	0.394	88.47405	7.289396	92.56328	3.767912
T. implícito Onda B – Intensidad 4	0.408	86.5515	9.470596	87.71113	3.110306
T. implícito Onda B – Intensidad 5	0.819	81.4247	9.392393	84.14068	3.953175
T. implícito Onda B – Intensidad 6	0.601	80.41765	9.064066	80.02093	1.948293
T. implícito Onda B – Intensidad 7	0.929	65.03725	11.69871	68.45511	2.870676
T. implícito Onda B – Intensidad 8	0.561	59.60528	11.1633	58.9034	2.12217
T. implícito Onda B – Intensidad 9	0.897	51.42681	8.255365	52.22025	1.623131
Amplitud OPS – Intensidad 1	0.845	186.4384	114.3022	81.4922	23.70428
Amplitud OPS – Intensidad 2	0.082	384.5584	208.0492	182.5462	56.87419
Amplitud OPS – Intensidad 3	0.078	407.0875	214.314	181.1534	60.63301
Amplitud OPS – Intensidad 4	0.048	209.2758	103.1608	86.25612	38.50042
Amplitud OPS – Intensidad 5	0.030	114.8467	83.38531	43.37681	13.316
T. implícito OPS – Intensidad 1	0.291	28.84448	4.511618	31.16375	1.421238
T. implícito OPS – Intensidad 2	0.356	36.83985	5.858008	39.70841	1.936065
T. implícito OPS – Intensidad 3	0.380	45.56761	7.038773	49.1991	2.2918
T. implícito OPS – Intensidad 4	0.356	55.02778	9.003244	59.69683	2.853594
T. implícito OPS – Intensidad 5	0.344	58.04893	4.297544	71.11006	2.99499

db/db

PARÁMETRO	P	MEDIA TIEMPO 1	SD TIEMPO 1	MEDIA TIEMPO 2	SD TIEMPO 2
Amplitud Onda A – Intensidad 1	0.817	24.33636	10.31198	25.76954	10.35082
Amplitud Onda A – Intensidad 2	0.708	50.77054	20.85462	53.98876	20.25326
Amplitud Onda A – Intensidad 3	0.599	112.2956	46.64182	125.7446	39.1982
Amplitud Onda A – Intensidad 4	0.706	171.0213	58.29543	181.4553	58.48279
T. implícito Onda A – Intensidad 1	0.023	26.6778	3.176666	33.04052	5.665569
T. implícito Onda A – Intensidad 2	0.016	25.3961	3.139511	31.27818	5.4704
T. implícito Onda A – Intensidad 3	0.016	24.25172	3.006898	29.4243	4.897711
T. implícito Onda A – Intensidad 4	0.016	23.79397	2.73235	28.875	4.792186
Amplitud Onda B – Intensidad 1	0.277	196.065	45.1306	173.4765	60.98061
Amplitud Onda B – Intensidad 10	0.101	703.2233	207.4053	579.8027	127.3173
Amplitud Onda B – Intensidad 2	0.297	239.7293	50.81474	217.522	69.67225
Amplitud Onda B – Intensidad 3	0.714	233.1081	55.33899	224.312	80.79821
Amplitud Onda B – Intensidad 4	0.536	278.5957	62.96609	261.3315	87.15685
Amplitud Onda B – Intensidad 5	0.742	334.5889	73.88276	313.9373	96.63868
Amplitud Onda B – Intensidad 6	0.844	399.6821	95.75033	374.2675	123.8344
Amplitud Onda B – Intensidad 7	0.195	483.5607	117.5571	422.0505	133.3927
Amplitud Onda B – Intensidad 8	0.082	559.5714	142.3787	458.4168	133.8474
Amplitud Onda B – Intensidad 9	0.066	629.6728	163.5579	516.259	124.9444
T. implícito Onda B – Intensidad 1	0.046	88.7487	8.326018	106.5781	14.81327
T. implícito Onda B – Intensidad 10	0.018	47.185	3.776923	53.43328	6.263945
T. implícito Onda B – Intensidad 2	0.056	85.72755	6.790147	104.0147	16.92535
T. implícito Onda B – Intensidad 3	0.025	85.36135	6.262984	103.5798	13.79401
T. implícito Onda B – Intensidad 4	0.006	81.58491	6.971902	107.1045	16.26443
T. implícito Onda B – Intensidad 5	0.006	76.22923	8.062087	102.3668	16.4385
T. implícito Onda B – Intensidad 6	0.012	72.17815	8.597905	102.4583	22.99335
T. implícito Onda B – Intensidad 7	0.009	61.16926	7.031456	85.0867	16.82255
T. implícito Onda B – Intensidad 8	0.040	54.96675	5.243985	66.68515	10.56203
T. implícito Onda B – Intensidad 9	0.078	49.58818	5.488755	55.7907	6.994444
Amplitud OPS – Intensidad 1	0.422	128.2455	39.18359	115.1867	30.42962
Amplitud OPS – Intensidad 2	0.920	258.6061	73.99543	255.4897	63.57167
Amplitud OPS – Intensidad 3	0.270	257.8132	65.99725	214.9695	46.53789
Amplitud OPS – Intensidad 4	0.246	150.1491	58.38627	111.347	39.67343
Amplitud OPS – Intensidad 5	0.067	83.18876	22.39432	47.09611	12.2181
T. implícito OPS – Intensidad 1	0.039	29.2412	3.04464	33.91025	4.357049
T. implícito OPS – Intensidad 2	0.039	37.20605	3.559871	42.63038	5.329938
T. implícito OPS – Intensidad 3	0.039	46.15506	4.498951	52.63222	6.127527
T. implícito OPS – Intensidad 4	0.043	55.56182	5.375591	62.95448	6.907893
T. implícito OPS – Intensidad 5	0.125	62.71188	5.435819	73.9176	8.596735

db/db + PBM

PARÁMETRO	P	MEDIA TIEMPO 1	SD TIEMPO 1	MEDIA TIEMPO 2	SD TIEMPO 2
Amplitud Onda A – Intensidad 1	0.197	54.15255	33.5443	27.90577	12.82632
Amplitud Onda A – Intensidad 2	0.150	123.9852	75.76195	65.05045	20.30215
Amplitud Onda A – Intensidad 3	0.233	255.5655	154.23	155.5231	47.31147
Amplitud Onda A – Intensidad 4	0.288	336.2549	215.7528	209.9063	69.11129
T. implícito Onda A – Intensidad 1	0.014	24.51111	4.696098	32.23183	4.423127
T. implícito Onda A – Intensidad 2	0.016	23.62613	4.520589	30.706	3.987771
T. implícito Onda A – Intensidad 3	0.014	22.2834	4.025425	28.75293	3.702465
T. implícito Onda A – Intensidad 4	0.015	22.00875	3.990222	28.1426	3.704477
Amplitud Onda B – Intensidad 1	0.438	302.0677	192.6664	197.3738	77.31046
Amplitud Onda B – Intensidad 10	0.261	1013.363	434.6472	663.3526	223.1775
Amplitud Onda B – Intensidad 2	0.313	365.9947	216.0414	243.4437	96.64804
Amplitud Onda B – Intensidad 3	0.313	390.8483	220.7044	237.0252	106.7866
Amplitud Onda B – Intensidad 4	0.313	468.5404	245.8863	275.4301	128.3571
Amplitud Onda B – Intensidad 5	0.313	567.0402	283.8373	335.5112	149.7531
Amplitud Onda B – Intensidad 6	0.199	688.9337	322.647	392.714	168.9248
Amplitud Onda B – Intensidad 7	0.174	801.8193	341.0294	457.7952	185.5798
Amplitud Onda B – Intensidad 8	0.191	864.1757	368.9848	511.1904	191.1047
Amplitud Onda B – Intensidad 9	0.216	953.629	399.0095	595.1695	200.2521
T. implícito Onda B – Intensidad 1	0.023	86.21581	6.757702	101.6878	9.727687
T. implícito Onda B – Intensidad 10	0.010	44.59108	5.446434	54.99726	6.315107
T. implícito Onda B – Intensidad 2	0.031	82.5233	6.434604	98.66661	6.161722
T. implícito Onda B – Intensidad 3	0.010	83.86603	6.57774	99.3685	9.565113
T. implícito Onda B – Intensidad 4	0.005	78.06786	7.589759	94.21118	9.219721
T. implícito Onda B – Intensidad 5	0.018	74.00915	6.966428	90.2135	10.46076
T. implícito Onda B – Intensidad 6	0.063	67.5091	9.311134	86.7346	11.35761
T. implícito Onda B – Intensidad 7	0.014	58.96443	8.017234	74.55845	11.9328
T. implícito Onda B – Intensidad 8	0.010	50.6639	5.778538	66.92928	11.06173
T. implícito Onda B – Intensidad 9	0.009	46.05588	5.382451	57.28601	6.80549
Amplitud OPS – Intensidad 1	0.582	169.9631	118.8065	132.8773	56.34358
Amplitud OPS – Intensidad 2	0.687	371.5784	170.9037	322.62	143.1858
Amplitud OPS – Intensidad 3	0.454	386.643	108.3154	306.6714	119.0311
Amplitud OPS – Intensidad 4	0.234	254.1448	83.21053	178.1805	73.83363
Amplitud OPS – Intensidad 5	0.063	153.8403	35.73318	79.03245	47.36048
T. implícito OPS – Intensidad 1	0.040	25.36558	6.168973	33.36095	4.097992
T. implícito OPS – Intensidad 2	0.044	33.72715	6.173801	42.14975	4.773201
T. implícito OPS – Intensidad 3	0.052	42.27181	7.168559	51.97611	5.60818
T. implícito OPS – Intensidad 4	0.053	51.33526	8.28661	62.44333	6.594707
T. implícito OPS – Intensidad 5	0.053	61.31421	9.426489	74.2838	7.505611

ERG PRUEBAS T NO PAREADAS - TIEMPO 2
db/db vs db/+

PARÁMETRO	p	MEDIA db/db	DESVIACIÓN ESTÁNDAR db/db	MEDIA db/+	DESVIACIÓN ESTÁNDAR HET
Amplitud Onda A – Intensidad 1	0.287	25.8	11.1	20.1	6.34
Amplitud Onda A – Intensidad 2	0.138	54	21.7	38.8	14
Amplitud Onda A – Intensidad 3	0.090	126	41.9	89	32.7
Amplitud Onda A – Intensidad 4	0.068	181	62.5	124	45.5
T. implícito Onda A – Intensidad 1	0.077	33	6.06	28.5	1.85
T. implícito Onda A – Intensidad 2	0.095	31.3	5.85	27.2	1.64
T. implícito Onda A – Intensidad 3	0.085	29.4	5.24	25.6	1.41
T. implícito Onda A – Intensidad 4	0.131	28.9	5.12	25.7	1.32
Amplitud Onda B – Intensidad 1	0.666	173	65.2	189	68
Amplitud Onda B – Intensidad 2	0.756	218	74.5	231	80.1
Amplitud Onda B – Intensidad 3	0.956	224	86.4	227	82.9
Amplitud Onda B – Intensidad 4	0.959	261	93.2	264	97.5
Amplitud Onda B – Intensidad 5	0.941	314	103	309	288
Amplitud Onda B – Intensidad 6	0.911	374	132	366	143
Amplitud Onda B – Intensidad 7	0.996	422	143	423	163
Amplitud Onda B – Intensidad 8	0.85	458	143	475	184
Amplitud Onda B – Intensidad 9	0.733	516	134	549	218
Amplitud Onda B – Intensidad 10	0.909	580	136	593	245
T. implícito Onda B – Intensidad 1	0.052	107	15.8	92.5	1.5
T. implícito Onda B – Intensidad 2	0.127	104	18.1	91.6	3.61
T. implícito Onda B – Intensidad 3	0.103	104	14.7	92.6	4.13
T. implícito Onda B – Intensidad 4	0.02	107	17.4	87.47	3.41
T. implícito Onda B – Intensidad 5	0.03	102	17.6	84.1	4.33
T. implícito Onda B – Intensidad 6	0.048	102	24.6	80	2.13
T. implícito Onda B – Intensidad 7	0.047	85.1	18	68.5	3.14
T. implícito Onda B – Intensidad 8	0.126	66.7	11.3	58.9	2.32
T. implícito Onda B – Intensidad 9	0.279	55.8	7.48	52.2	1.78
T. implícito Onda B – Intensidad 10	0.351	53.4	6.7	51	1.96
Amplitud OPS – Intensidad 1	0.052	115	32.5	81.5	26
Amplitud OPS – Intensidad 2	0.062	255	68	183	62.3
Amplitud OPS – Intensidad 3	0.296	215	49.8	181	66.4
Amplitud OPS – Intensidad 4	0.294	111	42.4	86.3	42.2
Amplitud OPS – Intensidad 5	0.469	54.1	21	43.4	16.3
T. implícito OPS – Intensidad 1	0.154	33.9	4.66	31.2	1.56
T. implícito OPS – Intensidad 2	0.214	42.6	5.7	39.7	2.12
T. implícito OPS – Intensidad 3	0.25	52.6	6.55	49.2	2.51
T. implícito OPS – Intensidad 4	0.334	63	7.38	59.7	3.13
T. implícito OPS – Intensidad 5	0.602	73.4	8.7	71.1	3.67

db/db + PBM vs db/db

PARÁMETRO	p	MEDIA db/db	DESVIACIÓN ESTÁNDAR db/db	MEDIA db/db + PBM	DESVIACIÓN ESTÁNDAR db/db + PBM
Amplitud Onda A – Intensidad 1	0.755	25.8	11.1	27.9	14.1
Amplitud Onda A – Intensidad 2	0.368	54	21.7	65.1	22.2
Amplitud Onda A – Intensidad 3	0.257	126	41.9	156	51.8
Amplitud Onda A – Intensidad 4	0.456	181	62.5	210	75.7
T. implícito Onda A – Intensidad 1	0.786	33	6.06	32.2	48.5
T. implícito Onda A – Intensidad 2	0.838	31.3	5.85	30.7	4.37
T. implícito Onda A – Intensidad 3	0.792	29.4	5.24	28.8	4.06
T. implícito Onda A – Intensidad 4	0.771	28.9	5.12	28.1	4.06
Amplitud Onda B – Intensidad 1	0.561	173	65.2	197	84.7
Amplitud Onda B – Intensidad 2	0.599	218	74.5	243	106
Amplitud Onda B – Intensidad 3	0.818	224	86.4	237	117
Amplitud Onda B – Intensidad 4	0.825	261	93.2	275	141
Amplitud Onda B – Intensidad 5	0.785	314	103	336	164
Amplitud Onda B – Intensidad 6	0.840	374	132	393	185
Amplitud Onda B – Intensidad 7	0.722	422	143	458	203
Amplitud Onda B – Intensidad 8	0.584	458	143	511	209
Amplitud Onda B – Intensidad 9	0.419	516	134	595	219
Amplitud Onda B – Intensidad 10	0.429	580	136	663	244
T. implícito Onda B – Intensidad 1	0.527	107	15.8	102	10.7
T. implícito Onda B – Intensidad 2	0.507	104	18.1	98.7	6.75
T. implícito Onda B – Intensidad 3	0.564	104	14.7	99.4	10.5
T. implícito Onda B – Intensidad 4	0.133	107	17.4	94.2	10.1
T. implícito Onda B – Intensidad 5	0.168	102	17.6	90.2	11.5
T. implícito Onda B – Intensidad 6	0.147	102	24.6	86.7	12.4
T. implícito Onda B – Intensidad 7	0.25	85.1	18	74.6	13.1
T. implícito Onda B – Intensidad 8	0.97	66.7	11.3	66.9	12.1
T. implícito Onda B – Intensidad 9	0.718	55.8	7.48	57.3	7.46
T. implícito Onda B – Intensidad 10	0.680	53.4	6.7	55	6.92
Amplitud OPS – Intensidad 1	0.499	115	32.5	133	61.7
Amplitud OPS – Intensidad 2	0.296	255	68	323	157
Amplitud OPS – Intensidad 3	0.091	215	49.8	307	130
Amplitud OPS – Intensidad 4	0.067	111	42.4	178	80.9
Amplitud OPS – Intensidad 5	0.313	54.1	21	79	51.9
T. implícito OPS – Intensidad 1	0.828	0.234	0.00466	0.233	0.00449
T. implícito OPS – Intensidad 2	0.873	0.243	0.0057	0.242	0.00523
T. implícito OPS – Intensidad 3	0.851	0.253	0.00655	0.252	0.00614
T. implícito OPS – Intensidad 4	0.899	0.263	0.00738	0.262	0.00722
T. implícito OPS – Intensidad 5	0.855	0.273	0.0087	0.274	0.00822

ANEXO B

HISTOLOGÍA PRUEBAS T NO PAREADAS

T TEST TIEMPO 2 – GFAP – db/db vs db/+					
	p	X db/+	DE	X db/db	DE
CCG + CFNR	0.181	10	3.39	14	3.09
CPE	0.986	0.00183	0.00245	0.0019	0.0032
CNI	0.925	0.0052	0.0075	0.0047	0.0065
IPL	0.547	0.0491	0.0312	0.0824	0.0997

T TEST TIEMPO 2 – IBA1 – db/db vs db/+					
	p	X db/+	DE	X db/db	DE
CCG + CFNR	0.581	2.86	1.94	3.61	1.09
CPE	0.042	3.18	3.15	8.56	1.39
CNI	0.539	0.957	1.33	0.437	0.0886
IPL	0.238	3.08	1.58	1.81	0.201

T TEST TIEMPO 2 – GROSORES – db/db vs db/+					
	p	X db/+	DE	X db/db	DE
CCG + CFNR	0.344	21	3.62	24	3.96
IPL	0.923	53.9	6.81	53.4	7.18
CNI	0.046	45.2	2.28	40.8	2.07
CPE	0.163	17	1.54	15.1	1.34
CNE	0.238	60.6	7.8	54.2	2.61
IS	0.879	15.6	1.02	15.4	2.43
GROSOR TOTAL	0.468	213	17.6	203	17

T TEST TIEMPO 2 – GFAP – db/db + PBM vs db/db					
		X db/db	DE	X db/db + PBM	DE
CCG + CFNR	0.412	14	3.09	12	2.93
CPE	0.899	0.00187	0.0032	0.00158	0.00297
CNI	0.569	0.00466	0.0065	0.0028	0.00247
IPL	0.306	0.0824	0.0997	0.0322	0.0264

T TEST TIEMPO 2 – IBA1 – db/db + PBM vs db/db					
	p	X db/db	DE	X db/db + PBM	DE
CCG + CFNR	0.308	3.61	1.09	5.96	3.45
CPE	0.027	8.56	1.39	4.71	1.99
CNI	0.234	0.437	0.0886	0.941	0.637
IPL	0.065	1.81	0.201	3.26	1.07

T TEST TIEMPO 2 – GROSORES – db/db + PBM vs db/db					
	P	X db/db	DE	X db/db + PBM	DE
CCG + CFNR	0.128	24	3.96	20.6	1.63
IPL	0.534	53.4	7.18	50	6.95
CNI	0.385	40.8	2.07	39.6	1.55
CPE	0.64	15.1	1.34	15.9	2.4
CNE	0.991	54.2	2.61	54.2	4.01
IS	0.504	15.4	2.43	16.3	0.957
GROSOR TOTAL	0.582	203	17	197	13.8

12. BIBLIOGRAFÍA

1. Cho NH, Shaw JE, Karuranga S, Huang Y, da Rocha Fernandes JD, Ohlrogge AW, et al. IDF Diabetes Atlas: Global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045. *Diabetes Res Clin Pract.* abril de 2018;138:271-81.
2. Saeedi P, Petersohn I, Salpea P, Malanda B, Karuranga S, Unwin N, et al. Global and regional diabetes prevalence estimates for 2019 and projections for 2030 and 2045: Results from the International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 9th edition. *Diabetes Res Clin Pract.* noviembre de 2019;157:107843.
3. Khan MAB, Hashim MJ, King JK, Govender RD, Mustafa H, Al Kaabi J. Epidemiology of Type 2 Diabetes – Global Burden of Disease and Forecasted Trends. *J Epidemiol Glob Health.* marzo de 2020;10(1):107-11.
4. Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiological Reviews.* enero de 2013;93(1):137-88.
5. Prokofyeva E, Zrenner E. Epidemiology of Major Eye Diseases Leading to Blindness in Europe: A Literature Review. *Ophthalmic Research.* 26 de noviembre de 2011;47(4):171-88.
6. Teo ZL, Tham YC, Yu M, Chee ML, Rim TH, Cheung N, et al. Global Prevalence of Diabetic Retinopathy and Projection of Burden through 2045: Systematic Review and Meta-analysis. *Ophthalmology.* noviembre de 2021;128(11):1580-91.
7. Singh R, Farooq SA, Mannan A, Singh TG, Najda A, Grażyna Z, et al. Animal models of diabetic microvascular complications: Relevance to clinical features. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 1 de enero de 2022;145:112305.
8. Wilkinson CP, Ferris FL, Klein RE, Lee PP, Agardh CD, Davis M, et al. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology.* septiembre de 2003;110(9):1677-82.
9. Moran EP, Wang Z, Chen J, Sapieha P, Smith LEH, Ma J xing. Neurovascular cross talk in diabetic retinopathy: Pathophysiological roles and therapeutic implications. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1 de septiembre de 2016;311(3):H738-49.
10. Stitt AW, Curtis TM, Chen M, Medina RJ, McKay GJ, Jenkins A, et al. The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res.* marzo de 2016;51:156-86.
11. Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. Diabetic Retinopathy. *N Engl J Med.* 29 de marzo de 2012;366(13):1227-39.
12. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest.* 15 de agosto de 1998;102(4):783-91.
13. Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA. Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clinical & Experimental Ophthalmology.* 2000;28(1):3-8.

14. Barber AJ. A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 1 de abril de 2003;27(2):283-90.
15. Antonetti DA, Barber AJ, Bronson SK, Freeman WM, Gardner TW, Jefferson LS, et al. Diabetic Retinopathy: Seeing Beyond Glucose-Induced Microvascular Disease. *Diabetes*. 1 de septiembre de 2006;55(9):2401-11.
16. Simó R, Hernández C. Novel approaches for treating diabetic retinopathy based on recent pathogenic evidence. *Progress in Retinal and Eye Research*. 1 de septiembre de 2015;48:160-80.
17. Feit-Leichman RA, Kinouchi R, Takeda M, Fan Z, Mohr S, Kern TS, et al. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. noviembre de 2005;46(11):4281-7.
18. Tonade D, Kern TS. Photoreceptor cells and RPE contribute to the development of diabetic retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. julio de 2021;83:100919.
19. Tang L, Zhang Y, Jiang Y, Willard L, Ortiz E, Wark L, et al. Dietary Wolfberry Ameliorates Retinal Structure Abnormalities in db/db Mice at the Early Stage of Diabetes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 1 de septiembre de 2011;236(9):1051-63.
20. Kern TS. Contributions of Inflammatory Processes to the Development of the Early Stages of Diabetic Retinopathy. *Exp Diabetes Res*. 2007;2007:95103.
21. Bek T. Mitochondrial dysfunction and diabetic retinopathy. *Mitochondrion*. 1 de septiembre de 2017;36:4-6.
22. Miller DJ, Cascio MA, Rosca MG. Diabetic Retinopathy: The Role of Mitochondria in the Neural Retina and Microvascular Disease. *Antioxidants (Basel)*. 23 de septiembre de 2020;9(10):905.
23. Simó R, Hernández C. Neurodegeneration in the diabetic eye: new insights and therapeutic perspectives. *Trends in Endocrinology & Metabolism*. 1 de enero de 2014;25(1):23-33.
24. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cellular Signalling*. 1 de mayo de 2012;24(5):981-90.
25. Llorián-Salvador M, Cabeza-Fernández S, Gomez-Sanchez JA, Fuente AG de la. Glial cell alterations in diabetes-induced neurodegeneration. *Cellular and Molecular Life Sciences [Internet]*. 2024 [citado 22 de febrero de 2024];81(1). Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10796438/>
26. Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Exp Eye Res*. mayo de 2002;74(5):615-25.
27. Ly A, Yee P, Vessey KA, Phipps JA, Jobling AI, Fletcher EL. Early Inner Retinal Astrocyte Dysfunction during Diabetes and Development of Hypoxia, Retinal Stress, and Neuronal Functional Loss. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2 de diciembre de 2011;52(13):9316-26.
28. Rungger-Brändle E, Dosso AA, Leuenberger PM. Glial Reactivity, an Early Feature of Diabetic Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1 de junio de 2000;41(7):1971-80.
29. Newman EA. Functional hyperemia and mechanisms of neurovascular coupling in the retinal vasculature. *J Cereb Blood Flow Metab*. noviembre de 2013;33(11):1685-95.

30. Retinal Blood Flow in Diabetes - CLERMONT - 2007 - Microcirculation - Wiley Online Library [Internet]. [citado 23 de febrero de 2024]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1080/10739680601072164>
31. Cheung CY, Ikram MK, Klein R, Wong TY. The clinical implications of recent studies on the structure and function of the retinal microvasculature in diabetes. *Diabetologia*. 1 de mayo de 2015;58(5):871-85.
32. Simó R, Stitt AW, Gardner TW. Neurodegeneration in diabetic retinopathy: does it really matter? *Diabetologia*. 2018;61(9):1902-12.
33. Bringmann A, Wiedemann P. Müller Glial Cells in Retinal Disease. *Ophthalmologica*. 15 de septiembre de 2011;227(1):1-19.
34. Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes*. 1 de marzo de 1998;47(3):445-9.
35. Barber AJ, Antonetti DA, Gardner TW. Altered expression of retinal occludin and glial fibrillary acidic protein in experimental diabetes. The Penn State Retina Research Group. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. octubre de 2000;41(11):3561-8.
36. Yang S, Qi S, Wang C. The role of retinal Müller cells in diabetic retinopathy and related therapeutic advances. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2 de diciembre de 2022 [citado 17 de mayo de 2024];10. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcell.2022.1047487>
37. Lieth E, Barber AJ, Xu B, Dice C, Ratz MJ, Tanase D, et al. Glial reactivity and impaired glutamate metabolism in short-term experimental diabetic retinopathy. Penn State Retina Research Group. *Diabetes*. 1 de mayo de 1998;47(5):815-20.
38. Li Q, Puro DG. Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. septiembre de 2002;43(9):3109-16.
39. Bringmann A, Pannicke T, Uhlmann S, Kohen L, Wiedemann P, Reichenbach A. Membrane conductance of Müller glial cells in proliferative diabetic retinopathy. *Can J Ophthalmol*. junio de 2002;37(4):221-7.
40. Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, vom Hagen F, Reichenbach A, et al. Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes*. marzo de 2006;55(3):633-9.
41. Grigsby JG, Cardona SM, Pouw CE, Muniz A, Mendiola AS, Tsin ATC, et al. The Role of Microglia in Diabetic Retinopathy. *J Ophthalmol*. 2014;2014:705783.
42. Abcouwer SF. Angiogenic Factors and Cytokines in Diabetic Retinopathy. *J Clin Cell Immunol*. 2013;Suppl 1(11):1-12.
43. Banati RB, Graeber MB. Surveillance, intervention and cytotoxicity: is there a protective role of microglia? *Dev Neurosci*. 1994;16(3-4):114-27.
44. Zeng H yang, Green WR, Tso MOM. Microglial Activation in Human Diabetic Retinopathy. *Archives of Ophthalmology*. 1 de febrero de 2008;126(2):227-32.

45. van Dijk HW, Verbraak FD, Stehouwer M, Kok PHB, Garvin MK, Sonka M, et al. Association of visual function and ganglion cell layer thickness in patients with diabetes mellitus type 1 and no or minimal diabetic retinopathy. *Vision Res.* 28 de enero de 2011;51(2):224-8.
46. Barber AJ, Antonetti DA, Kern TS, Reiter CEN, Soans RS, Krady JK, et al. The Ins2Akita mouse as a model of early retinal complications in diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* junio de 2005;46(6):2210-8.
47. Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. Death of Retinal Neurons in Streptozotocin-Induced Diabetic Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1 de septiembre de 2004;45(9):3330-6.
48. Kern TS, Berkowitz BA. Photoreceptors in diabetic retinopathy. *J Diabetes Investig.* julio de 2015;6(4):371-80.
49. Joyal JS, Gantner ML, Smith LEH. Retinal energy demands control vascular supply of the retina in development and disease: The role of neuronal lipid and glucose metabolism. *Progress in Retinal and Eye Research.* 1 de mayo de 2018;64:131-56.
50. Hayes MJ, Tracey-White D, Kam JH, Powner MB, Jeffery G. The 3D organisation of mitochondria in primate photoreceptors. *Sci Rep.* 22 de septiembre de 2021;11(1):18863.
51. Okawa H, Sampath AP, Laughlin SB, Fain GL. ATP Consumption by Mammalian Rod Photoreceptors in Darkness and in Light. *Current Biology.* 23 de diciembre de 2008;18(24):1917-21.
52. Wong-Riley M. Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain.* 22 de julio de 2010;2:99-116.
53. Ahmed J, Braun RD, Dunn R Jr, Linsenmeier RA. Oxygen distribution in the macaque retina. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1 de marzo de 1993;34(3):516-21.
54. Arden GB, Wolf JE, Tsang Y. Does dark adaptation exacerbate diabetic retinopathy?: Evidence and a linking hypothesis. *Vision Research.* 1 de junio de 1998;38(11):1723-9.
55. LaVail MM. Rod Outer Segment Disk Shedding in Rat Retina: Relationship to Cyclic Lighting. *Science.* 3 de diciembre de 1976;194(4269):1071-4.
56. Al-Kharashi AS. Role of oxidative stress, inflammation, hypoxia and angiogenesis in the development of diabetic retinopathy. *Saudi J Ophthalmol.* 2018;32(4):318-23.
57. Lopes de Faria JM, Katsumi O, Cagliero E, Nathan D, Hirose T. Neurovisual abnormalities preceding the retinopathy in patients with long-term type 1 diabetes mellitus. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* septiembre de 2001;239(9):643-8.
58. Sokol S, Moskowitz A, Skarf B, Evans R, Molitch M, Senior B. Contrast sensitivity in diabetics with and without background retinopathy. *Arch Ophthalmol.* enero de 1985;103(1):51-4.
59. Harris A, Arend O, Danis RP, Evans D, Wolf S, Martin BJ. Hyperoxia improves contrast sensitivity in early diabetic retinopathy. *Br J Ophthalmol.* marzo de 1996;80(3):209-13.
60. Tzekov R, Arden GB. The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol.* 1999;44(1):53-60.

61. Du Y, Veenstra A, Palczewski K, Kern TS. Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 8 de octubre de 2013;110(41):16586-91.
62. Szabó K, Énzöly A, Dékány B, Szabó A, Hajdú RI, Radovits T, et al. Histological Evaluation of Diabetic Neurodegeneration in the Retina of Zucker Diabetic Fatty (ZDF) Rats. *Sci Rep*. 21 de agosto de 2017;7(1):8891.
63. Furman BL. Streptozotocin-Induced Diabetic Models in Mice and Rats. *Current Protocols*. 2021;1(4):e78.
64. King AJ. The use of animal models in diabetes research. *Br J Pharmacol*. junio de 2012;166(3):877-94.
65. Eleazu CO, Eleazu KC, Chukwuma S, Essien UN. Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans. *J Diabetes Metab Disord*. 23 de diciembre de 2013;12:60.
66. Yang M, Chen Y, Vagionitis S, Körtvely E, Ueffing M, Schmachtenberg O, et al. Expression of glucose transporter-2 in murine retina: Evidence for glucose transport from horizontal cells to photoreceptor synapses. *Journal of Neurochemistry*. 2022;160(2):283-96.
67. Polewik K, Kosek M, Jamrozik D, Matuszek I, Smędowski A, Lewin-Kowalik J, et al. Rodent Models of Diabetic Retinopathy as a Useful Research Tool to Study Neurovascular Cross-Talk. *Biology*. febrero de 2023;12(2):262.
68. Hummel KP, Dickie MM, Coleman DL. Diabetes, a New Mutation in the Mouse. *Science*. 2 de septiembre de 1966;153(3740):1127-8.
69. Barile GR, Pachydaki SI, Tari SR, Lee SE, Donmoyer CM, Ma W, et al. The RAGE axis in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. agosto de 2005;46(8):2916-24.
70. Calcutt NA, Willars GB, Tomlinson DR. Axonal transport of choline acetyltransferase and 6-phosphofruktokinase activities in genetically diabetic mice. *Muscle Nerve*. diciembre de 1988;11(12):1206-10.
71. Sharma K, McCue P, Dunn SR. Diabetic kidney disease in the db/db mouse. *Am J Physiol Renal Physiol*. junio de 2003;284(6):F1138-1144.
72. Midena E, Segato T, Radin S, di Giorgio G, Meneghini F, Piermarocchi S, et al. Studies on the retina of the diabetic db/db mouse. I. Endothelial cell-pericyte ratio. *Ophthalmic Res*. 1989;21(2):106-11.
73. Clements RS, Robison WG, Cohen MP. Anti-glycated albumin therapy ameliorates early retinal microvascular pathology in db/db mice. *J Diabetes Complications*. 1998;12(1):28-33.
74. Yang Q, Xu Y, Xie P, Cheng H, Song Q, Su T, et al. Retinal Neurodegeneration in db/db Mice at the Early Period of Diabetes. *J Ophthalmol*. 2015;2015:757412.
75. Tadayoni R, Paques M, Gaudric A, Vicaut E. Erythrocyte and leukocyte dynamics in the retinal capillaries of diabetic mice. *Exp Eye Res*. octubre de 2003;77(4):497-504.
76. Cheung AKH, Fung MKL, Lo ACY, Lam TTL, So KF, Chung SSM, et al. Aldose Reductase Deficiency Prevents Diabetes-Induced Blood-Retinal Barrier Breakdown, Apoptosis, and Glial Reactivation in the Retina of db/db Mice. *Diabetes*. 1 de noviembre de 2005;54(11):3119-25.

77. Anders JJ, Arany PR, Baxter GD, Lanzafame RJ. Light-Emitting Diode Therapy and Low-Level Light Therapy Are Photobiomodulation Therapy. *Photobiomodulation, Photomedicine, and Laser Surgery*. febrero de 2019;37(2):63-5.
78. Serrage H, Heiskanen V, Palin W, Cooper PR, Milward MR, Hadis M, et al. Under the spotlight: mechanisms of photobiomodulation concentrating on blue and green light. *Photochem Photobiol Sci*. 11 de junio de 2019;10.1039/c9pp00089e.
79. Shen W, Teo KYC, Wood JPM, Vaze A, Chidlow G, Ao J, et al. Preclinical and clinical studies of photobiomodulation therapy for macular oedema. *Diabetologia*. 1 de septiembre de 2020;63(9):1900-15.
80. Cheng Y, Du Y, Liu H, Tang J, Veenstra A, Kern TS. Photobiomodulation Inhibits Long-term Structural and Functional Lesions of Diabetic Retinopathy. *Diabetes*. 21 de noviembre de 2017;67(2):291-8.
81. Tang J, Herda AA, Kern TS. Photobiomodulation in the treatment of patients with non-center-involving diabetic macular oedema. *Br J Ophthalmol*. agosto de 2014;98(8):1013-5.
82. Whelan HT, Smits RL, Buchman EV, Whelan NT, Turner SG, Margolis DA, et al. Effect of NASA light-emitting diode irradiation on wound healing. *J Clin Laser Med Surg*. diciembre de 2001;19(6):305-14.
83. Eells JT, Wong-Riley MTT, VerHoeve J, Henry M, Buchman EV, Kane MP, et al. Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy. *Mitochondrion*. septiembre de 2004;4(5-6):559-67.
84. Peplow PV, Chung TY, Baxter GD. Laser photobiomodulation of wound healing: a review of experimental studies in mouse and rat animal models. *Photomed Laser Surg*. junio de 2010;28(3):291-325.
85. da Silva JP, da Silva MA, Almeida APF, Junior IL, Matos AP. Laser Therapy in the Tissue Repair Process: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery*. febrero de 2010;28(1):17-21.
86. Loreti EH, Pascoal VLW, Nogueira BV, Silva IV, Pedrosa DF. Use of Laser Therapy in the Healing Process: A Literature Review. *Photomedicine and Laser Surgery*. febrero de 2015;33(2):104-16.
87. Dual Effect of low-level laser therapy (LLLT) on the acute lung inflammation induced by intestinal ischemia and reperfusion: Action on anti- and pro-inflammatory cytokines - de Lima - 2011 - *Lasers in Surgery and Medicine - Wiley Online Library* [Internet]. [citado 28 de octubre de 2023]. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lsm.21053>
88. Enwemeka CS, Parker JC, Dowdy DS, Harkness EE, Sanford LE, Woodruff LD. The efficacy of low-power lasers in tissue repair and pain control: a meta-analysis study. *Photomed Laser Surg*. agosto de 2004;22(4):323-9.
89. Wu X, Dmitriev AE, Cardoso MJ, Viers-Costello AG, Borke RC, Streeter J, et al. 810 nm Wavelength light: An effective therapy for transected or contused rat spinal cord. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009;41(1):36-41.
90. Hashmi JT, Huang YY, Osmani BZ, Sharma SK, Naeser MA, Hamblin MR. Role of Low-Level Laser Therapy in Neurorehabilitation. *PM R*. diciembre de 2010;2(12 Suppl 2):S292-305.

91. Byrnes KR, Waynant RW, Ilev IK, Wu X, Barna L, Smith K, et al. Light promotes regeneration and functional recovery and alters the immune response after spinal cord injury. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2005;36(3):171-85.
92. Anders JJ, Moges H, Wu X, Erbele ID, Alberico SL, Saidu EK, et al. In vitro and in vivo optimization of infrared laser treatment for injured peripheral nerves. *Lasers in Surgery and Medicine*. 2014;46(1):34-45.
93. Mester E, Szende B, Gärtner P. [The effect of laser beams on the growth of hair in mice]. *Radiobiol Radiother (Berl)*. 1968;9(5):621-6.
94. Avci P, Gupta GK, Clark J, Wikonkal N, Hamblin MR. Low-level laser (light) therapy (LLLT) for treatment of hair loss. *Lasers Surg Med*. febrero de 2014;46(2):144-51.
95. Ferraresi C, Kaippert B, Avci P, Huang YY, de Sousa MVP, Bagnato VS, et al. Low-level laser (light) therapy increases mitochondrial membrane potential and ATP synthesis in C2C12 myotubes with a peak response at 3-6 h. *Photochem Photobiol*. 2015;91(2):411-6.
96. Blanco NJ, Saucedo CL, Gonzalez-Lima F. Transcranial infrared laser stimulation improves rule-based, but not information-integration, category learning in humans. *Neurobiology of Learning and Memory*. 1 de marzo de 2017;139:69-75.
97. Vargas E, Barrett DW, Saucedo CL, Huang LD, Abraham JA, Tanaka H, et al. Beneficial neurocognitive effects of transcranial laser in older adults. *Lasers Med Sci*. 1 de julio de 2017;32(5):1153-62.
98. Migliario M, Pittarella P, Fanuli M, Rizzi M, Renò F. Laser-induced osteoblast proliferation is mediated by ROS production. *Lasers Med Sci*. julio de 2014;29(4):1463-7.
99. Tschon M, Incerti-Parenti S, Cepollaro S, Checchi L, Fini M. Photobiomodulation with low-level diode laser promotes osteoblast migration in an in vitro micro wound model. *J Biomed Opt*. julio de 2015;20(7):78002.
100. de Freitas LF, Hamblin MR. Proposed Mechanisms of Photobiomodulation or Low-Level Light Therapy. *IEEE Journal of Selected Topics in Quantum Electronics*. mayo de 2016;22(3):348-64.
101. Tonade D, Liu H, Palczewski K, Kern TS. Photoreceptor cells produce inflammatory products that contribute to retinal vascular permeability in a mouse model of diabetes. *Diabetologia*. octubre de 2017;60(10):2111-20.
102. Kokkinopoulos I, Colman A, Hogg C, Heckenlively J, Jeffery G. Age-related retinal inflammation is reduced by 670 nm light via increased mitochondrial membrane potential. *Neurobiology of Aging*. 1 de febrero de 2013;34(2):602-9.
103. Begum R, Powner MB, Hudson N, Hogg C, Jeffery G. Treatment with 670 nm Light Up Regulates Cytochrome C Oxidase Expression and Reduces Inflammation in an Age-Related Macular Degeneration Model. *PLoS One*. 28 de febrero de 2013;8(2):e57828.
104. Rutar M, Natoli R, Albarracin R, Valter K, Provis J. 670-nm light treatment reduces complement propagation following retinal degeneration. *Journal of Neuroinflammation*. 26 de noviembre de 2012;9(1):257.
105. Albarracin R, Eells J, Valter K. Photobiomodulation protects the retina from light-induced photoreceptor degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1 de junio de 2011;52(6):3582-92.

106. Tang J, Du Y, Lee CA, Talahalli R, Eells JT, Kern TS. Low-Intensity Far-Red Light Inhibits Early Lesions That Contribute to Diabetic Retinopathy: In Vivo and In Vitro. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 29 de mayo de 2013;54(5):3681-90.
107. Saliba A, Du Y, Liu H, Patel S, Roberts R, Berkowitz BA, et al. Photobiomodulation Mitigates Diabetes-Induced Retinopathy by Direct and Indirect Mechanisms: Evidence from Intervention Studies in Pigmented Mice. *PLOS ONE*. 1 de octubre de 2015;10(10):e0139003.
108. Quirk BJ, DeSmet KD, Henry M, Buchmann E, Wong-Riley M, Eells JT, et al. Therapeutic effect of near infrared (NIR) light on Parkinson's disease models. *Frontiers in Bioscience-Elite*. 1 de enero de 2012;4(3):818-23.
109. Muili KA, Gopalakrishnan S, Meyer SL, Eells JT, Lyons JA. Amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice by photobiomodulation induced by 670 nm light. *PLoS One*. 2012;7(1):e30655.
110. Eells JT, Henry MM, Summerfelt P, Wong-Riley MTT, Buchmann EV, Kane M, et al. Therapeutic photobiomodulation for methanol-induced retinal toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18 de marzo de 2003;100(6):3439-44.
111. Giacci MK, Wheeler L, Lovett S, Dishington E, Majda B, Bartlett CA, et al. Differential Effects of 670 and 830 nm Red near Infrared Irradiation Therapy: A Comparative Study of Optic Nerve Injury, Retinal Degeneration, Traumatic Brain and Spinal Cord Injury. *PLoS One*. 8 de agosto de 2014;9(8):e104565.
112. Wong-Riley MTT, Liang HL, Eells JT, Chance B, Henry MM, Buchmann E, et al. Photobiomodulation Directly Benefits Primary Neurons Functionally Inactivated by Toxins: ROLE OF CYTOCHROME c OXIDASE *. *Journal of Biological Chemistry*. 11 de febrero de 2005;280(6):4761-71.
113. Karu T. Primary and secondary mechanisms of action of visible to near-IR radiation on cells. *J Photochem Photobiol B*. marzo de 1999;49(1):1-17.
114. Wong-Riley MT, Bai X, Buchmann E, Whelan HT. Light-emitting diode treatment reverses the effect of TTX on cytochrome oxidase in neurons. *Neuroreport*. 8 de octubre de 2001;12(14):3033-7.
115. Karu TI. Multiple roles of cytochrome c oxidase in mammalian cells under action of red and IR-A radiation. *IUBMB Life*. 2010;62(8):607-10.
116. Yu W, Naim JO, McGowan M, Ippolito K, Lanzafame RJ. Photomodulation of oxidative metabolism and electron chain enzymes in rat liver mitochondria. *Photochem Photobiol*. diciembre de 1997;66(6):866-71.
117. Pan LC, Hang NLT, Colley MMS, Chang J, Hsiao YC, Lu LS, et al. Single Cell Effects of Photobiomodulation on Mitochondrial Membrane Potential and Reactive Oxygen Species Production in Human Adipose Mesenchymal Stem Cells. *Cells*. 11 de marzo de 2022;11(6):972.
118. Karu T, Pyatibrat L, Kalendo G. Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro. *J Photochem Photobiol B*. marzo de 1995;27(3):219-23.
119. Pastore D, Di Martino C, Bosco G, Passarella S. Stimulation of ATP synthesis via oxidative phosphorylation in wheat mitochondria irradiated with helium-neon laser. *Biochem Mol Biol Int*. mayo de 1996;39(1):149-57.

120. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Cell attachment to extracellular matrices is modulated by pulsed radiation at 820 nm and chemicals that modify the activity of enzymes in the plasma membrane. *Lasers Surg Med.* 2001;29(3):274-81.
121. Lavi R, Shainberg A, Friedmann H, Shneyvays V, Rickover O, Eichler M, et al. Low energy visible light induces reactive oxygen species generation and stimulates an increase of intracellular calcium concentration in cardiac cells. *J Biol Chem.* 17 de octubre de 2003;278(42):40917-22.
122. Zhang Z, Shen Q, Wu X, Zhang D, Xing D. Activation of PKA/SIRT1 signaling pathway by photobiomodulation therapy reduces A β levels in Alzheimer's disease models. *Aging Cell.* 2020;19(1):e13054.
123. Hamblin MR. Mechanisms and Mitochondrial Redox Signaling in Photobiomodulation. *Photochemistry and Photobiology.* 2018;94(2):199-212.
124. Karu TI, Pyatibrat LV, Kalendo GS. Photobiological modulation of cell attachment via cytochrome c oxidase. *Photochem Photobiol Sci.* febrero de 2004;3(2):211-6.
125. Lima PLV, Pereira CV, Nissanka N, Arguello T, Gavini G, Maranduba CM da C, et al. Photobiomodulation enhancement of cell proliferation at 660 nm does not require cytochrome c oxidase. *J Photochem Photobiol B.* mayo de 2019;194:71-5.
126. Quirk BJ, Whelan HT. Effect of Red-to-Near Infrared Light on the Reaction of Isolated Cytochrome c Oxidase with Cytochrome c. *Photomed Laser Surg.* diciembre de 2016;34(12):631-7.
127. Albert ES, Bec JM, Desmadryl G, Chekroud K, Travo C, Gaboyard S, et al. TRPV4 channels mediate the infrared laser-evoked response in sensory neurons. *J Neurophysiol.* junio de 2012;107(12):3227-34.
128. Yang WZ, Chen JY, Yu JT, Zhou LW. Effects of low power laser irradiation on intracellular calcium and histamine release in RBL-2H3 mast cells. *Photochem Photobiol.* 2007;83(4):979-84.
129. Vladimirov YA, Gorbatenkova EA, Paramonov NV, Azizova OA. Photoreactivation of superoxide dismutase by intensive red (laser) light. *Free Radic Biol Med.* 1988;5(5-6):281-6.
130. Karu TI, Pyatibrat LV, Kolyakov SF, Afanasyeva NI. Absorption measurements of a cell monolayer relevant to phototherapy: reduction of cytochrome c oxidase under near IR radiation. *J Photochem Photobiol B.* 1 de noviembre de 2005;81(2):98-106.
131. Brown GC. Nitric oxide and mitochondria. *Front Biosci.* 1 de enero de 2007;12:1024-33.
132. Pope NJ, Denton ML. Differential effects of 808-nm light on electron transport chain enzymes in isolated mitochondria: Implications for photobiomodulation initiation. *Mitochondrion.* 1 de enero de 2023;68:15-24.
133. Poyton RO, Ball KA, Castello PR. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology & Metabolism.* 1 de septiembre de 2009;20(7):332-40.
134. Lohr NL, Keszler A, Pratt P, Bienengraber M, Warltier DC, Hogg N. Enhancement of Nitric Oxide Release from Nitrosyl Hemoglobin and Nitrosyl Myoglobin by Red/Near Infrared Radiation: Potential Role in Cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* agosto de 2009;47(2):256-63.

135. Keszler A, Lindemer B, Hogg N, Weihrauch D, Lohr NL. Wavelength-dependence of vasodilation and NO release from S-nitrosothiols and dinitrosyl iron complexes by far red/near infrared light. *Arch Biochem Biophys.* 1 de julio de 2018;649:47-52.
136. Zhang R, Mio Y, Pratt PF, Lohr N, Warltier DC, Whelan HT, et al. Near infrared light protects cardiomyocytes from hypoxia and reoxygenation injury by a nitric oxide dependent mechanism. *J Mol Cell Cardiol.* enero de 2009;46(1):4-14.
137. Karu TI, Pyatibrat LV, Afanasyeva NI. Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide. *Lasers Surg Med.* abril de 2005;36(4):307-14.
138. Buravlev EA, Zhidkova TV, Osipov AN, Vladimirov YA. Are the mitochondrial respiratory complexes blocked by NO the targets for the laser and LED therapy? *Lasers Med Sci.* enero de 2015;30(1):173-80.
139. Muste JC, Russell MW, Singh RP. Photobiomodulation Therapy for Age-Related Macular Degeneration and Diabetic Retinopathy: A Review. *Clin Ophthalmol.* 2 de septiembre de 2021;15:3709-20.
140. Monnier L, Colette C. Glycemic Variability: Should we and can we prevent it? *Diabetes Care.* 1 de febrero de 2008;31(Supplement_2):S150-4.
141. Chen ACH, Arany PR, Huang YY, Tomkinson EM, Sharma SK, Kharkwal GB, et al. Low-level laser therapy activates NF- κ B via generation of reactive oxygen species in mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One.* 2011;6(7):e22453.
142. Lavi R, Ankri R, Sinyakov M, Eichler M, Friedmann H, Shainberg A, et al. The plasma membrane is involved in the visible light-tissue interaction. *Photomed Laser Surg.* enero de 2012;30(1):14-9.
143. Tafur J, Mills PJ. Low-Intensity Light Therapy: Exploring the Role of Redox Mechanisms. *Photomed Laser Surg.* agosto de 2008;26(4):323-8.
144. Karu TI. Mitochondrial signaling in mammalian cells activated by red and near-IR radiation. *Photochem Photobiol.* 2008;84(5):1091-9.
145. Benedicenti S, Pepe IM, Angiero F, Benedicenti A. Intracellular ATP level increases in lymphocytes irradiated with infrared laser light of wavelength 904 nm. *Photomed Laser Surg.* octubre de 2008;26(5):451-3.
146. Zhang Y, Song S, Fong CC, Tsang CH, Yang Z, Yang M. cDNA microarray analysis of gene expression profiles in human fibroblast cells irradiated with red light. *J Invest Dermatol.* mayo de 2003;120(5):849-57.
147. Ristow M, Schmeisser S. Extending life span by increasing oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 15 de julio de 2011;51(2):327-36.
148. Poljsak B, Šuput D, Milisav I. Achieving the Balance between ROS and Antioxidants: When to Use the Synthetic Antioxidants. *Oxid Med Cell Longev.* 2013;2013:956792.
149. Yun J, Finkel T. Mitohormesis. *Cell Metab.* 6 de mayo de 2014;19(5):757-66.
150. Peng HY, Lucavs J, Ballard D, Das JK, Kumar A, Wang L, et al. Metabolic Reprogramming and Reactive Oxygen Species in T Cell Immunity. *Frontiers in Immunology [Internet].* 2021 [citado 30 de abril de 2022];12. Disponible en: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2021.652687>

151. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species - ScienceDirect [Internet]. [citado 30 de abril de 2022]. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167488916302324>
152. Lubart R, Eichler M, Lavi R, Friedman H, Shainberg A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity. *Photomed Laser Surg.* febrero de 2005;23(1):3-9.
153. Moore P, Ridgway TD, Higbee RG, Howard EW, Lucroy MD. Effect of wavelength on low-intensity laser irradiation-stimulated cell proliferation in vitro. *Lasers Surg Med.* enero de 2005;36(1):8-12.
154. Yu HS, Wu CS, Yu CL, Kao YH, Chiou MH. Helium-neon laser irradiation stimulates migration and proliferation in melanocytes and induces repigmentation in segmental-type vitiligo. *J Invest Dermatol.* enero de 2003;120(1):56-64.
155. Benchorin G, Calton MA, Beaulieu MO, Vollrath D. Assessment of Murine Retinal Function by Electroretinography. *Bio Protoc.* 5 de abril de 2017;7(7):e2218.
156. Kang Derwent J, Linsenmeier RA. Effects of hypoxemia on the a- and b-waves of the electroretinogram in the cat retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* octubre de 2000;41(11):3634-42.
157. Bhatt Y, Hunt DM, Carvalho LS. The origins of the full-field flash electroretinogram b-wave. *Front Mol Neurosci.* 3 de julio de 2023;16:1153934.
158. Wachtmeister L. Oscillatory potentials in the retina: what do they reveal. *Progress in Retinal and Eye Research.* 1 de octubre de 1998;17(4):485-521.
159. Leclaire-Collet A, Audo I, Aout M, Girmens JF, Sofroni R, Erginay A, et al. Evaluation of Retinal Function and Flicker Light-Induced Retinal Vascular Response in Normotensive Patients with Diabetes without Retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2 de mayo de 2011;52(6):2861-7.
160. Simonsen SE. The value of the oscillatory potential in selecting juvenile diabetics at risk of developing proliferative retinopathy. *Acta Ophthalmol (Copenh).* diciembre de 1980;58(6):865-78.
161. Kizawa J, Machida S, Kobayashi T, Gotoh Y, Kurosaka D. Changes of Oscillatory Potentials and Photopic Negative Response in Patients with Early Diabetic Retinopathy. *Jpn J Ophthalmol.* 1 de julio de 2006;50(4):367-73.
162. Holopigian K, Seiple W, Lorenzo M, Carr R. A comparison of photopic and scotopic electroretinographic changes in early diabetic retinopathy. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1 de septiembre de 1992;33(10):2773-80.
163. Severns ML, Johnson MA, Bresnick GH. Methodologic dependence of electroretinogram oscillatory potential amplitudes. *Doc Ophthalmol.* 1994;86(1):23-31.
164. Early Inner Retinal Dysfunction in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats | IOVS | ARVO Journals [Internet]. 2022 [citado 30 de abril de 2022]. Disponible en: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2125722>
165. Hancock HA, Kraft TW. Oscillatory Potential Analysis and ERGs of Normal and Diabetic Rats. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1 de marzo de 2004;45(3):1002-8.

166. Bui BV, Loeliger M, Thomas M, Vingrys AJ, Rees SM, Nguyen CTO, et al. Investigating structural and biochemical correlates of ganglion cell dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats. *Exp Eye Res.* 1 de junio de 2009;88(6):1076-83.
167. Kim MK, Aung MH, Mees L, Olson DE, Pozdeyev N, Iuvone PM, et al. Dopamine Deficiency Mediates Early Rod-Driven Inner Retinal Dysfunction in Diabetic Mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 25 de enero de 2018;59(1):572-81.
168. Ramsey DJ, Ripps H, Qian H. An Electrophysiological Study of Retinal Function in the Diabetic Female Rat. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1 de noviembre de 2006;47(11):5116-24.
169. Muir ER, Narayanan D, Chandra SB, Akimov NP, Sohn JH, Meyer E, et al. Diabetic mice have retinal and choroidal blood flow deficits and electroretinogram deficits with impaired responses to hypercapnia. *PLoS One.* 9 de diciembre de 2021;16(12):e0259505.
170. Liu W, Deng Y. The analysis of electroretinography of diabetes mellitus. *Yan Ke Xue Bao.* septiembre de 2001;17(3):173-5, 179.
171. Yoshida Y, Yamagishi SI, Matsui T, Jinnouchi Y, Fukami K, Imaizumi T, et al. Protective role of pigment epithelium-derived factor (PEDF) in early phase of experimental diabetic retinopathy. *Diabetes/Metabolism Research and Reviews.* 2009;25(7):678-86.
172. Zakareia FA, Alderees AA, Al Regaiy KA, Alrouq FA. Correlation of electroretinography b-wave absolute latency, plasma levels of human basic fibroblast growth factor, vascular endothelial growth factor, soluble fatty acid synthase, and adrenomedullin in diabetic retinopathy. *J Diabetes Complications.* junio de 2010;24(3):179-85.
173. Bresnick GH, Palta M. Temporal aspects of the electroretinogram in diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol.* mayo de 1987;105(5):660-4.
174. Luu CD, Szental JA, Lee SY, Lavanya R, Wong TY. Correlation between Retinal Oscillatory Potentials and Retinal Vascular Caliber in Type 2 Diabetes. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 1 de enero de 2010;51(1):482-6.
175. Bogdanov P, Corraliza L, Villena JA, Carvalho AR, Garcia-Arumí J, Ramos D, et al. The db/db Mouse: A Useful Model for the Study of Diabetic Retinal Neurodegeneration. *PLOS ONE.* 16 de mayo de 2014;9(5):e97302.
176. Lam CHI, Zou B, Chan HHL, Tse DYY. Functional and structural changes in the neuroretina are accompanied by mitochondrial dysfunction in a type 2 diabetic mouse model. *Eye Vis (Lond).* 1 de septiembre de 2023;10:37.
177. Hanaguri J, Yokota H, Watanabe M, Yamagami S, Kushiyama A, Kuo L, et al. Retinal blood flow dysregulation precedes neural retinal dysfunction in type 2 diabetic mice. *Sci Rep.* 15 de septiembre de 2021;11:18401.
178. Becker S, Carroll LS, Vinberg F. Rod phototransduction and light signal transmission during type 2 diabetes. *BMJ Open Diabetes Res Care.* 11 de agosto de 2020;8(1):e001571.
179. Shirao Y, Kawasaki K. Electrical responses from diabetic retina. *Prog Retin Eye Res.* enero de 1998;17(1):59-76.

180. Mohite AA, Perais JA, McCullough P, Lois N. Retinal Ischaemia in Diabetic Retinopathy: Understanding and Overcoming a Therapeutic Challenge. *J Clin Med*. 21 de marzo de 2023;12(6):2406.
181. Zeng XX, Ng YK, Ling EA. Neuronal and microglial response in the retina of streptozotocin-induced diabetic rats. *Visual Neuroscience*. mayo de 2000;17(3):463-71.
182. Kinuthia UM, Wolf A, Langmann T. Microglia and Inflammatory Responses in Diabetic Retinopathy. *Front Immunol*. 6 de noviembre de 2020;11:564077.
183. Tang J, Kern TS. Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Prog Retin Eye Res*. septiembre de 2011;30(5):343-58.
184. Ren J, Zhang S, Pan Y, Jin M, Li J, Luo Y, et al. Diabetic retinopathy: Involved cells, biomarkers, and treatments. *Front Pharmacol*. 9 de agosto de 2022;13:953691.
185. Barber AJ. Diabetic retinopathy: recent advances towards understanding neurodegeneration and vision loss. *Sci China Life Sci*. junio de 2015;58(6):541-9.
186. Sohn EH, van Dijk HW, Jiao C, Kok PHB, Jeong W, Demirkaya N, et al. Retinal neurodegeneration may precede microvascular changes characteristic of diabetic retinopathy in diabetes mellitus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 de mayo de 2016;113(19):E2655-64.
187. Gao Y, Ji Y, Luo Y, Sun J, Sun G, Sun X. Ginsenoside Rg1 prevents early diabetic retinopathy via reducing retinal ganglion cell layer and inner nuclear layer cell apoptosis in db/db mice. *Annals of Translational Medicine*. marzo de 2020;8(5):232-232.