



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DEL FACTOR  
NUCLEAR ERITROIDE 2 RELACIONADO CON EL  
FACTOR 2 (Nrf2), EN UN MODELO DE DIABETES  
EXPERIMENTAL.**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**Biólogo**

**P R E S E N T A:**

**Albert Garay Jesús Silvestre**



**DIRECTOR DE TESIS:  
Dra. Rocío Salceda Sacanelles**

**México, D. F. 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del alumno

Albert

Garay

Jesús Silvestre

57 88 27 01

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de ciencias

Biología

308317013

2. Datos del tutor

Dra.

Rocío

Salceda

Sacanelles

3. Datos del sinodal 1

Dr.

Julio Eduardo Roque

Morán

Andrade

4. Datos del sinodal 2

Dra.

María Eugenia

Gonsebatt

Bonaparte

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Sandra Margarita

Morales

Mulia

6. Datos del sinodal 4

Dra.

María del pilar

Cabrales

Romero

7. Datos del trabajo escrito

Localización subcelular del Factor Nuclear Eritroide 2 Relacionado al Factor 2 (Nrf2), en un modelo de diabetes experimental.

53 pp

2015

# Agradecimientos.

Dra. Rocío Salceda, le agradezco todo el entusiasmo, apoyo, disponibilidad e interés que mostró durante mi estancia en el laboratorio.

Agradezco a mis sinodales:

- Dr. Julio Eduardo Roque Morán Andrade.
- Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte.
- Dra. Sandra Margarita Morales Mulia.
- Dra. María del pilar Cabrales Romero.

Por su tiempo durante la revisión y comentarios sobre este trabajo.

Agradezco al Biól. Gustavo Sánchez-Chávez, por la asistencia técnica como académica durante la realización de este trabajo.

Jesús Silvestre Albert Garay contó con el apoyo parcial de la beca: PAPIIT/UNAM, proyecto IN202813 durante la elaboración de esta tesis.

# Resumen.

La retinopatía diabética es una complicación que se presenta en pacientes con diabetes mellitus, la cual su patogénesis es aún desconocida. Hay evidencia de que la hiperglucemia produce estrés oxidante en una variedad de tejidos. De hecho, se tienen reportes de la existencia de estrés oxidante en la retina a estadios avanzados de diabetes; sin embargo, no está claro si el estrés oxidante observado es la causa o una consecuencia de las alteraciones de la retina en la diabetes. El factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2), se considera uno de los más importantes reguladores de la respuesta antioxidante.

En el presente trabajo, se estudió la expresión del Nrf2 en fracciones subcelulares de la retina de la rata a tiempos cortos de diabetes. Los niveles de expresión del Nrf2 aumentaron en la fracción citoplasmática y disminuyeron en la fracción nuclear de retinas de ratas diabéticas. Además, en células gliales de Müller de la retina de la rata, la expresión del Nrf2 en la fracción citoplasmática disminuyó en células cultivadas de 6-36 h en presencia de altas concentraciones de glucosa. En estas condiciones, se observó un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno. La expresión del Nrf2 aumentó en la fracción nuclear a tiempos largos de incubación. Los resultados sugieren, que las altas concentraciones de glucosa provocan la pérdida de la capacidad regulatoria del estado redox mediada por el Nrf2 o este no desempeña un papel primordial en la regulación del estado redox.

# Índice:

<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>3</b>
1. Anatomía del ojo.....	3
1.1.- Anatomía de la retina.....	4
2. Diabetes.....	6
3. Estrés oxidante.....	8
4. Respuesta celular al estrés oxidante.....	10
4.1 Estructura del Factor Nuclear Eritroide 2 Relacionado al Factor 2 (Nrf2).....	10
5. Mecanismos regulatorios de la vía de activación del Nrf2.....	11
6. Retinopatía diabética.....	15
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>17</b>
1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>MÉTODOS: 18</b>	
1. Inducción de diabetes.....	18
2. Cultivo primario de células gliales de la retina de la rata (células de Müller).....	18
3. Fraccionamiento subcelular: aislamiento de núcleos.....	19
4. Inmunodetección por medio de Western Blot.....	20
5. Inmunohistoquímica.....	21
6. Detección de estrés oxidante.....	22
7. Análisis estadístico.....	22
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
1. Localización celular del Nrf2 en la retina de la rata.....	23
2. Localización subcelular del Nrf2 y la Keap1 en la retina de la rata diabética.....	23
3. Efecto de altas concentraciones de glucosa en la localización subcelular del Nrf2 y Keap1 en células gliales de Müller en cultivo...26	
4. Producción de EROs por altas concentraciones de glucosa en las células gliales de Müller en cultivo.....	31

<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>38</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>39</b>

# Lista de abreviaturas.

·OH: radical hidroxilo.  
 $^1\text{O}_2$ : oxígeno singulete.  
Bach 1-2: proteína con homologías BTB y CNC, 1 y 2.  
BTB: complejo, tramtrack y Bric a' brac.  
bZip: básica cremallera de leucina.  
CBP: proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc.  
CCG: capa de células ganglionares.  
CHD6: proteína de unión al DNA como ATPasa/helicasa.  
CNC: capín collar.  
CNE: capa nuclear externa.  
CNI: capa nuclear interna.  
CPE: capa plexiforme externa.  
CPI: capa plexiforme interna.  
CTEM: cadena de transporte de electrones mitocondrial.  
CTR: región carboxilo terminal.  
Cul3: cullin 3.  
DCFH-Da: diacetato de diclorodihidrofluoresceína.  
DGR: dominio de repetición Kelch ó repetición doble de glicina.  
DM: diabetes mellitus.  
DMEM: medio Dulbecco's.  
DMEM-S10: DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%.  
DNA: ácido desoxirribonucleico.  
DNasa: desoxirribonucleasa I.  
EPR: epitelio pigmentario de la retina.  
ERA: elemento de respuesta antioxidante.  
ERNs: especies reactivas del nitrógeno.  
EROs: especies reactivas del oxígeno.  
G25: glucosa 25 mM.  
G5: glucosa 5 mM.  
Gclc: glutamato cisteína ligasa subunidad catalítica.  
GFAP: proteína ácida fibrilar glial.  
GLUT4: transportador de glucosa 4.  
GS: glucógeno sintasa.  
GSK-3: 3-cinasa de la glucógeno sintasa.  
Gsts: glutation-S-transferasas.  
 $\text{H}_2\text{O}_2$ : peróxido de hidrógeno.  
HBSS-CMF: solución salina de Hank's libre de calcio y magnesio.  
HO1: hemo oxigenasa 1.  
IKK $\beta$ : cinasa  $\beta$  de IKB.  
IVR: región intermedia.  
Keap1: proteína similar Kelch asociada a ECH 1.  
Maf: proteína de fibrosarcoma musculoaponeurótico.  
Neh1-7: homología ECH-Nrf2 1-7.

NO: óxido nítrico  
NO<sub>2</sub>: dióxido de nitrógeno.  
NOS: óxido nítrico sintasa.  
NOX: NAD(P)H oxidasas.  
Nqo1: NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1.  
Nrf2: factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2.  
Nrfs: factores relacionados a NFE2.  
NTR: región amino terminal.  
O<sub>2</sub><sup>-</sup>: superóxido.  
ONOO-: peroxinitrito.  
p45 NFE2: factor nuclear derivado eritroide 2, subunidad p45.  
PBS: buffer fosfato salino.  
PBS-S: saponina al 0.4% en PBS.  
PERK: proteína cinasa del retículo endoplásmico.  
PGA: productos finales de glicación avanzada.  
PGAM5: fosfoglicerato mutasa 5.  
PI3K: 3-cinasa de fosfoinosítidos.  
PKC: proteína cinasa C.  
PVDF: membrana de fluoruro de polivinilideno.  
RD: retinopatía diabética.  
RI: receptor de insulina.  
RL: radical libre.  
RXRα: receptor ácido retinoico α.  
SKN-1: familia Skinhead 1.  
SRI: sustratos del receptor de insulina.  
STZ: estreptozotocina.  
TC-199: medio TC-199.  
TC-199-S10: medio TC-199 suplementado con suero fetal bovino al 10%.  
TNFα: factor de necrosis tumoral alfa.  
Trx: tioredoxina.  
VEGF: factor de crecimiento endotelio vascular.  
XO: xantina oxidasas.  
β-TrCP: proteína que contiene repeticiones β-transducina.

# Introducción.

## ***1.-Anatomía del ojo***

El ojo de los vertebrados anatómicamente consiste en una serie de capas tisulares, entre las cuales la esclerótica y la córnea forman la capa externa del globo ocular. La esclerótica está compuesta principalmente por fibras elásticas de colágena, que proporcionan la protección y el soporte al globo ocular. La córnea es un tejido transparente que permite la entrada de la luz al ojo (Estrada & Uribe, 2002; Ross & Pawlina, 2007; Villa & Santodomingo, 2003).

La úvea (coroides, cuerpo ciliar y el iris) forma la capa media del ojo. En la coroides, se encuentran distribuidos los vasos sanguíneos que irrigan al ojo. El cuerpo ciliar se encarga de modificar la forma del cristalino, secretar el humor acuoso y algunos componentes del vítreo (Ashton, 1980). Del cuerpo ciliar se desprende una porción de músculo, que forma el iris. El iris funciona como un diafragma cuyo orificio central, la pupila, aumenta o disminuye su tamaño en respuesta a la intensidad de la luz. El cristalino funciona como una lente biconvexa, cuya función es enfocar los objetos a diferentes distancias (Costanzo, 2014; Zhu, 2014) (Fig. 1).

El cristalino y el cuerpo ciliar dividen al ojo en dos segmentos. Por delante del cristalino y del cuerpo ciliar se encuentra el segmento anterior, que se divide en dos cámaras: la cámara posterior entre el cristalino y el iris y la cámara anterior entre el iris y la córnea. Detrás del cristalino y del cuerpo ciliar se encuentra el segmento posterior, éste contiene una matriz extracelular transparente y gelatinosa denominada humor vítreo, la cual ocupa dos tercios del volumen total del ojo (Treuting et al., 2012; Welsch & Sobotta, 2008).

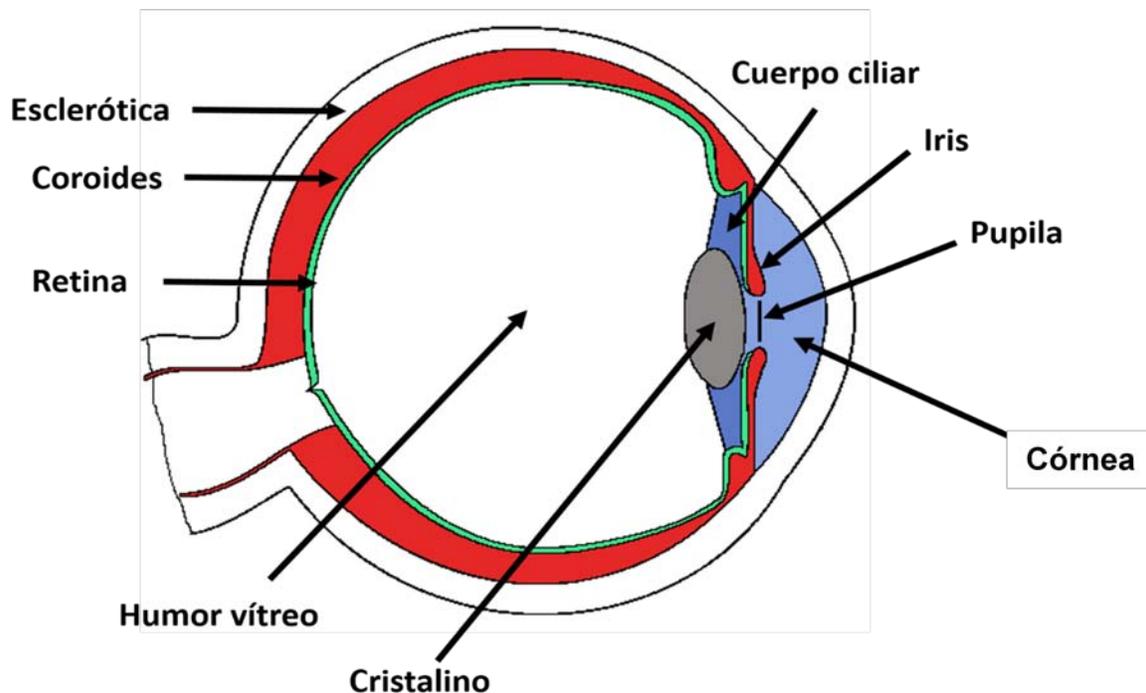


Figura 1. Estructura básica del ojo de los vertebrados.

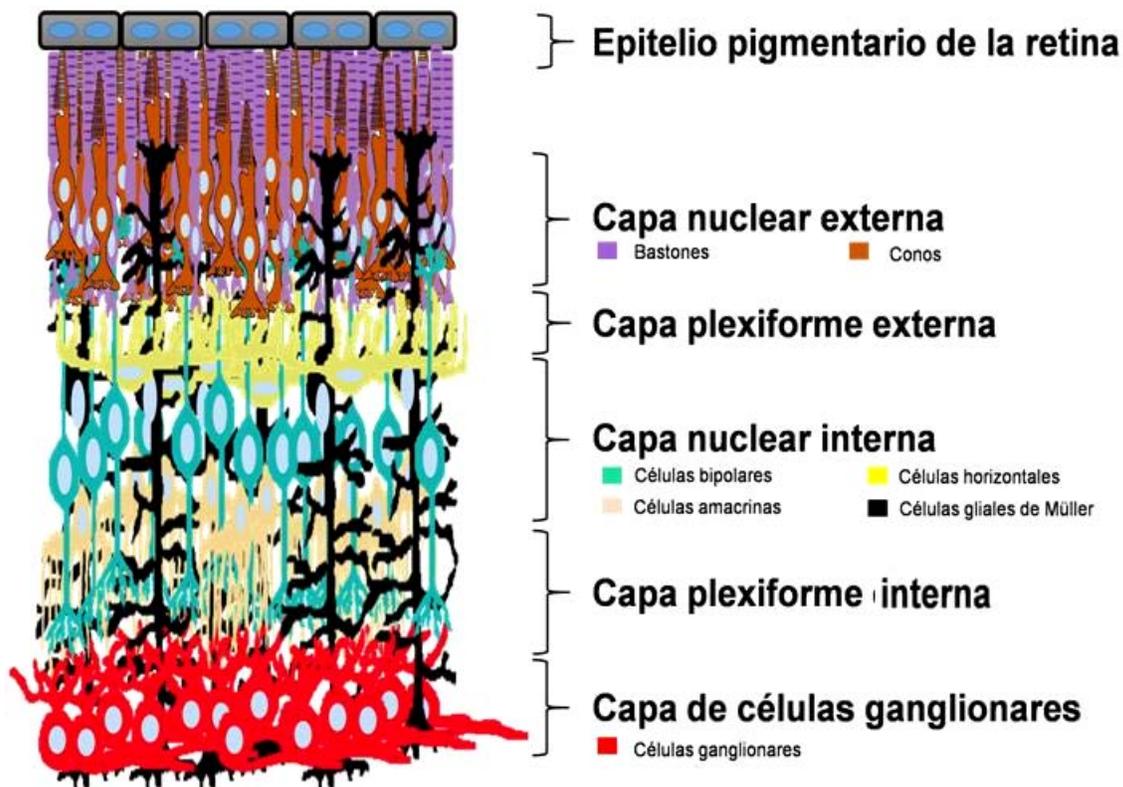
### 1.1.- Anatomía de la retina.

La capa más interna del ojo es la retina. En la retina se realiza la conversión de energía luminosa en impulsos eléctricos (fototransducción) (Hurley, 2009). Los impulsos eléctricos se transmiten por procesos químicos entre las distintas neuronas de la retina, éstos son procesados en el cerebro, proporcionando información sobre el ambiente a los organismos (Fanjul & eds., 2008).

La retina está formada por el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la retina neural. El EPR es una monocapa de células, de origen neuroepitelial (Klimanskaya, 2006), que contienen una alta concentración de melanina, la cual absorbe el exceso de la luz que incide sobre la retina, evitando que se vuelva a reflejar a través de ésta (Strauss, 2005).

La retina neural está organizada en capas celulares: la capa nuclear externa (CNE) se compone por los núcleos de los fotorreceptores. Los fotorreceptores se dividen en dos tipos celulares, los conos y los bastones. Los segmentos externos

de los fotorreceptores se encuentran embebidos en el EPR y sus proyecciones axónicas distales forman parte de la capa plexiforme externa (CPE), formando sinapsis con las dendritas de las células bipolares y horizontales. La capa nuclear interna (CNI) contiene a los núcleos de las células bipolares, horizontales y amacrinas. En la capa plexiforme interna (CPI) ocurren las sinapsis entre las células de la CNI con las dendritas de las células ganglionares; los somas de éstas constituyen la capa de células ganglionares (CCG) y sus axones la membrana limitante interna y forman el nervio óptico, a través del cual la información de la retina es enviada al cerebro (Costanzo, 2014; Estrada & Uribe, 2002; Fanjul & eds., 2008; Seung & Su, 2014; Treuting et al., 2012; Zhu, 2014) (Fig.2).



*Figura 2. Esquema de la organización de las neuronas y células gliales de Müller en la retina de los vertebrados.*

Además de las neuronas, la retina de los mamíferos cuenta con tres tipos de células gliales: las células de Müller y los astrocitos, que derivan de células progenitoras multipotentes neuroepiteliales (Lenkowski & Raymond, 2014) y las células microgliales, que derivan de macrófagos del saco vitelino extra embrionario (Ginhoux et al., 2013).

Las células de Müller son el principal tipo de célula glial en la retina, poseen la morfología bipolar de las células gliales radiales. El soma de las células de Müller se encuentra localizado en la capa nuclear interna de la retina y sus procesos se extienden en direcciones opuestas, hacia los fotorreceptores en donde forman la membrana limitante externa, y hacia la membrana limitante interna, teniendo prácticamente contacto con todos los tipos celulares de la retina (Bringmann & Reichenbach, 2009; Reichenbach & Bringmann, 2010; Zhu, 2014).

Las células de Müller contribuyen al mantenimiento y modulación de la actividad neuronal, mediante la regulación del microambiente extracelular (captura de neurotransmisores, control del pH y niveles de potasio), regulación del flujo sanguíneo y soporte metabólico a las neuronas (Bringmann & Reichenbach, 2009; Jessen, 2004; Newman, 2010).

El componente vascular de la retina consiste en las ramificaciones de la arteria central retiniana que nutre a la parte interna de este tejido. La parte externa de la retina recibe nutrientes de la coroides, los cuales difunden a través del EPR (Alghadyan, 2011; Chopra et al., 2014).

## **2.-Diabetes.**

La diabetes mellitus (DM) es un desorden crónico, caracterizado por el desbalance metabólico de la glucosa, causando altos niveles de la misma en la sangre (hiperglucemia). La DM se divide en dos tipos: la diabetes tipo 1, en ésta la hiperglucemia es causada por la pérdida de la secreción de insulina por el páncreas, debido a la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ ; la diabetes tipo 2 se caracteriza por que los tejidos no responden adecuadamente a la insulina (Alghadyan, 2011; Belle et al., 2011).

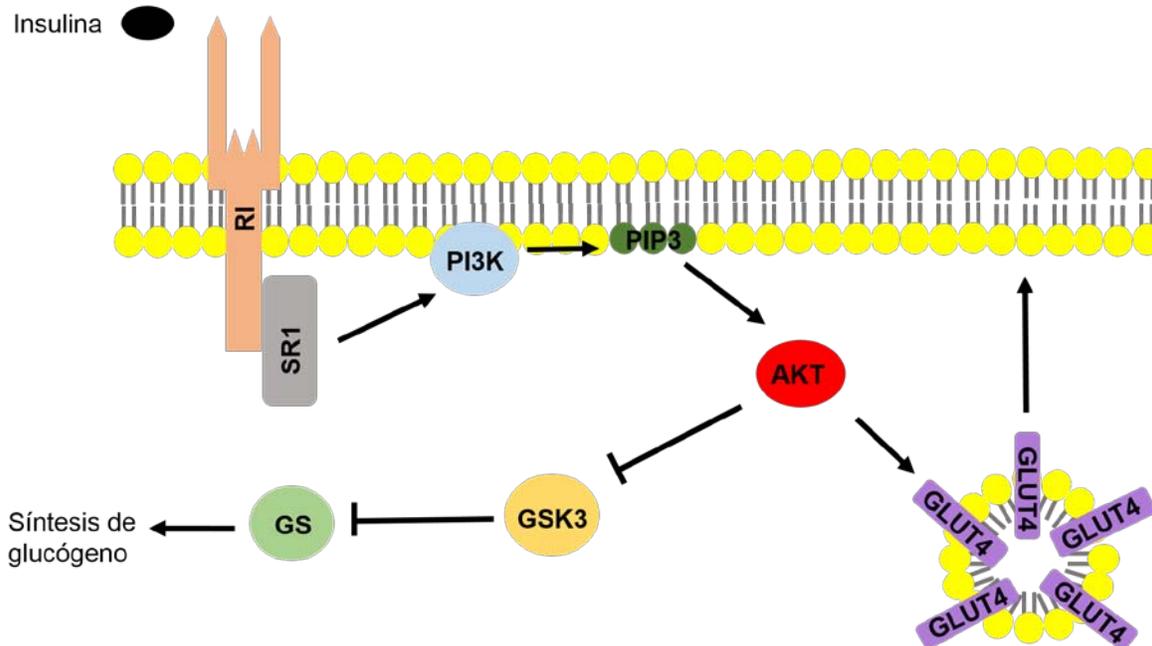
La insulina es una hormona que se sintetiza como proinsulina en el retículo endoplásmico de las células  $\beta$  del páncreas. La molécula de proinsulina se transporta al aparato de Golgi, donde es empaquetada en gránulos de secreción. Dentro de los gránulos, la proinsulina es transformada químicamente por enzimas proteolíticas, formando a la insulina y al péptido C. En respuesta a las concentraciones de glucosa en el torrente sanguíneo, los gránulos se fusionan con la membrana plasmática de las células  $\beta$  liberando a la insulina (Karp, 2009; Lodish, 2005).

Las células que expresan en su superficie receptores de insulina, como las células hepáticas y musculares, responden a esta hormona con un aumento en la captación de glucosa y la síntesis de glucógeno.

La activación del receptor de insulina (RI), promueve el acoplamiento de proteínas denominadas sustratos del receptor de insulina (SRI), estas proteínas suministran sitios de unión a proteínas, desencadenando vías de señalización intracelulares. La activación de la 3-cinasa de fosfoinosítidos (PI3K) por SRI-1, promueve la activación de Akt y ésta interviene en la regulación del transporte de glucosa y en la síntesis del glucógeno (Jímenez, 2002).

Cuando se transduce una señal por la vía del RI-PI3K-Akt, se inicia la translocación de vesículas citoplásmicas que contienen al transportador de glucosa 4 (GLUT4) a la periferia celular, promoviendo una mayor captación de glucosa. La síntesis de glucógeno se lleva a cabo por la acción de la enzima glucógeno sintasa (GS), la cual es regulada negativamente por la 3-cinasa de la glucógeno sintasa (GSK-3). La activación de Akt conduce al descenso de la actividad de GSK-3, incrementado la actividad de la GS y en consecuencia la formación de glucógeno (Karp, 2009; Lodish, 2005) (Fig.3).

La diabetes favorece el desarrollo de complicaciones macrovasculares (enfermedades cardíacas, enfermedad vascular periférica y enfermedad cerebrovascular) y microvasculares (nefropatía, neuropatía y retinopatía) (Chistiakov, 2011).



*Figura 3. Vía de señalización de la insulina. Los transportadores de glucosa se almacenan en vesículas citoplasmáticas. Cuando la insulina transmite una señal por la vía IRS-PI3K-Akt, inicia la translocación de las vesículas a la periferia celular, éstas se fusionan con la membrana plasmática, lo que lleva a los transportadores de glucosa a la superficie, donde regulan la captación de glucosa.*

En diversos tejidos, se ha observado que la hiperglucemia induce un estrés metabólico mediante diversos mecanismos que incluyen: 1) la activación de la proteína cinasa C (PKC); 2) incremento en la vía de los polioles; 3) la unión no enzimática de glucosa a las cadenas laterales de proteínas formando productos finales de glicación avanzada (AGEs); 4) incremento de la expresión de factores de crecimiento; 5) cambios en el flujo sanguíneo; 6) desbalance en el estado redox celular (estrés oxidante) (Ahsan, 2015; Alghadyan, 2011; Chistiakov, 2011; Stewart, 2010).

### **3.- Estrés oxidante.**

Un radical libre (RL) se define como un átomo o molécula que contiene un electrón desapareado en su estructura, que lo hace inestable y altamente reactivo (Betteridge, 2000; Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008). Las especies reactivas del oxígeno (EROs) son un conjunto de moléculas altamente reactivas, que se

generan en los sistemas vivos por medio de los procesos metabólicos en los cuales participa el oxígeno, en tres especies se encuentran los iones de oxígeno, los radicales libres y los peróxidos.

Las principales ERO son el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), el superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ). El oxígeno puede formar compuestos con el nitrógeno, conocidos como especies reactivas del nitrógeno (ERNs), estas son el óxido nítrico ( $NO\cdot$ ), el dióxido de nitrógeno ( $NO_2\cdot$ ) y el peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) (Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008; Fang et al., 2002).

En condiciones fisiológicas normales, la mitocondria es la principal productora de EROs, aproximadamente del 0.1-5% del oxígeno entrante a la CTEM es reducido a superóxido, mientras que el resto es usado en procesos metabólicos (Andreyev & Kushnareva, 2005). Además de la mitocondria las EROs y las ERNs son producidas mediante otros procesos celulares como la actividad de las enzimas NAD(P)H oxidasas (NOX), óxido nítrico sintasa (NOS), xantina oxidasa (XO), mediante el metabolismo del citocromo P450, por la actividad del peroxisoma y por la autooxidación de la glucosa (Andreyev & Kushnareva, 2005; Betteridge, 2000; Buelna-Chontal & Zazueta, 2013; Chopra et al., 2014; Valko et al., 2007)

Las EROs y las ERNs son neutralizadas por moléculas denominadas antioxidantes, las cuales pueden ser enzimáticas y no enzimáticas. Los antioxidantes no enzimáticos incluyen el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), los flavonoides, el ácido úrico, la bilirrubina, la albumina, los antioxidantes tiol (el  $\alpha$ -ácido lipoico y el glutatión), la melatonina y otros componentes. Los antioxidantes enzimáticos incluyen a la catalasa, la superóxido dismutasa, las tioredoxinas y las glutatión peroxidasas (Buelna-Chontal & Zazueta, 2013; Chopra et al., 2014).

En condiciones normales la célula produce concentraciones moderadas de EROs y ERNs. Estas moléculas están involucradas en algunos procesos de señalización celular (Fang et al., 2002; Marinho et al., 2014; Winterbourn, 2015) y son eliminadas rápidamente por los sistemas antioxidantes; sin embargo cuando se altera el estado redox celular debido al incremento de especies reactivas, las

cuales sobrepasan a las defensas antioxidantes celulares, se produce un estrés oxidante (Na & Surh, 2014; Valko et al., 2007).

Las EROs son capaces de oxidar proteínas (carbonilación), lípidos (lipoxidación), carbohidratos (glucoxidación) y romper las cadenas del DNA. El ataque de las EROs a macromoléculas biológicas, lleva a la producción en cadena de nuevos radicales, que a su vez pueden reaccionar con otras macromoléculas, causando un daño oxidante a la célula (Winterbourn, 2015).

#### **4.- Respuesta celular al estrés oxidante.**

Los sistemas vivos han desarrollado múltiples defensas en contra del estrés oxidante. En este proceso de detoxificación se encuentran involucradas dos tipos de moléculas: a) Los antioxidantes directos, que son compuestos de bajo peso molecular como el ascorbato, las ubiquinonas y el glutatión, que pueden sufrir reacciones redox atenuando la formación de productos de oxidación como EROs y ERNs que se consumen o se modifican en su acción antioxidante; b) Los antioxidantes indirectos, se encargan de la regulación positiva antioxidante por medio de la inducción de genes de proteínas que actuarán como antioxidantes o enzimas que facilitan la renovación de los antioxidantes directos (Dinkova-Kostova et al., 2007).

Durante condiciones de alto estrés como es la ingesta de componentes tóxicos o en fallas de la actividad antioxidante directa como es el caso de algunas enfermedades, la célula tiende a recuperar su estado redox por medio de la inducción de ciertos genes, teniendo así un sistema de regulación inducible (Cullinan & Diehl, 2006). El principal regulador del estado redox celular es el factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2) (Athanasίου et al., 2013; Bhakkiyalakshmi et al., 2015).

#### **4.1 Estructura del Factor Nuclear Eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2).**

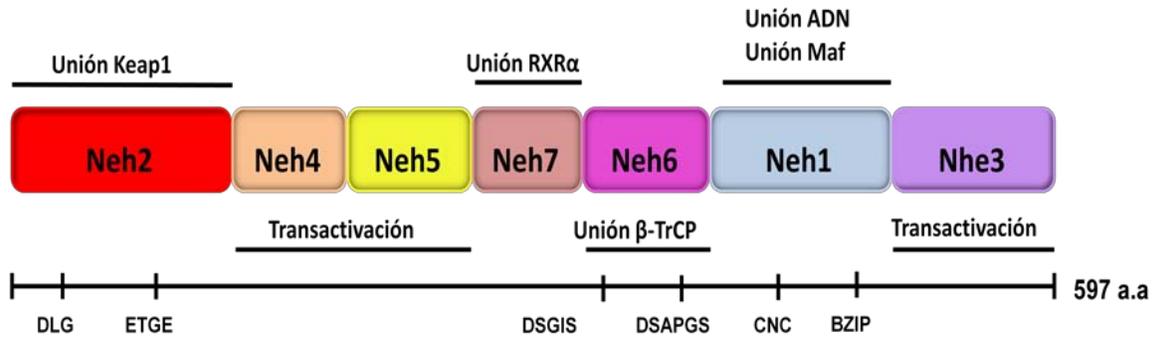
El Nrf2 pertenece a los factores de transcripción de cremallera básica de leucina (bzip), que se encuentran ampliamente conservados en los metazoarios. Nrf2 pertenece a la familia cap'n'collar (CNC), que se define por la presencia de 43 aminoácidos (dominio CNC) localizados hacia el extremo amino terminal del

dominio de unión al DNA. Esta familia comprende a las proteínas de la familia Skinhead 1 (SKN-1) de *Caenorhabditis elegans*; a Cap'n'Collar (Cnc) de *Drosophila*; al factor nuclear derivado eritroide 2, subunidad p45 (p45 NFE2), a los factores relacionados a NFE2 (Nrf1, Nrf2, Nrf3) y las proteínas con homologías BTB-CNC 1 y 2 (Bach1 y Bach2) de vertebrados (Sykiotis & Bohmann, 2010)

Comparaciones estructurales entre el homólogo del Nrf2 en el pollo, humano y ratón, identifican siete regiones altamente conservadas, llamadas dominios Neh1 - 7 (homología ECH-Nrf2). El dominio Neh1 contiene al motivo de unión al DNA bZip, por medio de este motivo se forma el heterodímero con las proteínas pequeñas Maf (MAFs; proteína de fibrosarcoma musculoponeurótico). El dominio N-terminal o Neh2, contiene dos motivos (DLG y ETGE) involucrados en la retención del Nrf2 por la proteína Keap1. Neh3 es un dominio de transactivación que recluta a la proteína de unión al DNA como ATPasa/helicasa (CHD6). Los dominios Neh4 y Neh5 representan los dominios de transactivación que reclutan a la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CBP), estos dominios son importantes para la transcripción de genes dependientes del elemento de respuesta antioxidante (ERA). En el dominio Neh6, se encuentran dos motivos (DSGIS y DSAPGS) que pueden interactuar con la proteína que contiene repeticiones de  $\beta$ -transducina ( $\beta$ -TrCP). El dominio Neh7 interactúa específicamente con el receptor al ácido retinóico (RXR $\alpha$ ) (Fig. 4). (Bhakkialakshmi et al., 2015; Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; Kansanen et al., 2013; Ma, 2013).

#### **4.2.- Mecanismos regulatorios de la vía de activación del Nrf2.**

En condiciones basales el Nrf2 se encuentra regulado negativamente por la proteína Kelch asociada al elemento ECH1 (Keap1). Keap1 presenta cinco dominios estructurales: el extremo amino terminal (NTR), un dominio de dimerización BTB (Broad-Complex, Tramtrack, y Bric a brac), una región intermedia rica en cisteínas (dominio IVR), un dominio de repetición Kelch o repetición doble de glicina (DGR) y una región carboxilo terminal (CTR) (Gan & Johnson, 2014; Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; Kansanen et al., 2013; Namani et al., 2014; Niture, Khatri, & Jaiswal, 2014) (Fig. 5).

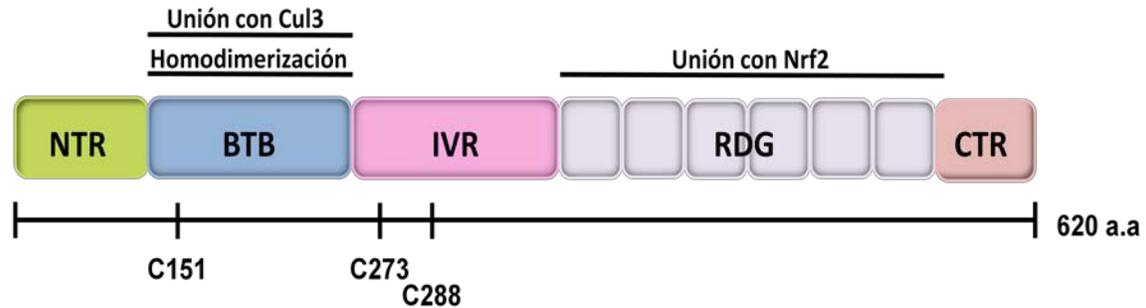


Dominio	Localización (# de aminoácidos)	Funciones
Neh2	1-96	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contiene a los motivos DLG (29-31) y ETGE (79-82), involucrados en la retención citoplasmática de Nrf2 por Keap1.</li> <li>• Región rica en lisinas (aminoácidos blanco para ubiquitinación).</li> <li>• Sitio de fosforilación por PKC en la Ser-40.</li> </ul>
Neh4	111-141	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio de transactivación.</li> <li>• Interacción con la proteína CBP.</li> </ul>
Neh5	172-201	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio de transactivación.</li> <li>• Interacción con la proteína CBP.</li> </ul>
Neh7	209-316	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Represión de Nrf2 por medio del RXRα.</li> </ul>
Neh6	330-380	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contiene a los motivos DSGIS (343-347) y DSAPGS(382-387), involucrados en la degradación de Nrf2 por medio de β-TrCP.</li> </ul>
Neh1	427-560	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Contiene a los motivos CNC y bZIP.</li> <li>• Sitio de unión con ERA.</li> <li>• Formación de heterodímeros con otras proteínas bZip.</li> </ul>
Neh3	561-597	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Dominio de transactivación.</li> <li>• Interacción con CHD6.</li> </ul>

Figura 4. Dominios funcionales del Nrf2.

Los dominios DGR del dímero de Keap1 interactúan con el motivo DLG o ETG del Nrf2. La parte amino-terminal de Keap1 se une al complejo ubiquitina ligasa E3 por medio de la proteína adaptadora CUL3 (cullin3) lo que promueve la ubiquitinación directa de los residuos de lisina del dominio Neh2 de Nrf2 y su posterior degradación por la vía del proteasoma 26S (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014; Ma, 2013). Keap1 funciona como un sensor al estrés oxidante por medio de sus residuos de cisteína (Gañán-Gómez et al., 2013; Kansanen et al., 2013) en su dominio IVR. Los residuos de cisteína (151, 273 y 288) al oxidarse alteran la estructura molecular de Keap1 (Holland & Fishbein, 2010), lo que resulta en la disociación del motivo ETGE del Nrf2. La disociación permite la exposición del

Nrf2, susceptible de ser fosforilado por la PKC (Ser-40 de Nrf2) logrando su liberación completa de Keap1. La liberación de Nrf2 de Keap1 permite su translocación al núcleo.



Dominio	Localización (# de aminoácidos)	Funciones
NTR	1-76	•Amino terminal.
BTB	77-149	•Sitio de homodimerización. •Reclutamiento de Cul-3.
IVR	172-201	•Región rica en cisteínas.
RDG	327-611	•Interacción con Nrf2, PGAM5 y P62. •Interacción con el citoesqueleto de actina.
CTR	611-624	•Carboxilo terminal.

Figura 5. Dominios funcionales de Keap1.

Cuando Nrf2 es translocado al núcleo, éste forma heterodímeros con las MAFs, el heterodímero Maf-Nrf2 se acopla al elemento de respuesta antioxidante (ERA: 5'-NTGAG/CNNNGC-3') en el DNA, promoviendo la transcripción de genes relacionados con proteínas antioxidantes como la NAD(P)H: quinona oxidoreductasa 1 (Nqo1), glutatión-S-transferasas (Gsts), glutamato cisteína ligasa subunidad catalítica (Gclc), proteínas asociadas a la resistencia de multidrogas, hemo oxigenasa 1 (HO1), tioredoxina (Trx), manteniendo así el estado redox celular (Kaspar, Niture, & Jaiswal, 2009)(Fig.6).

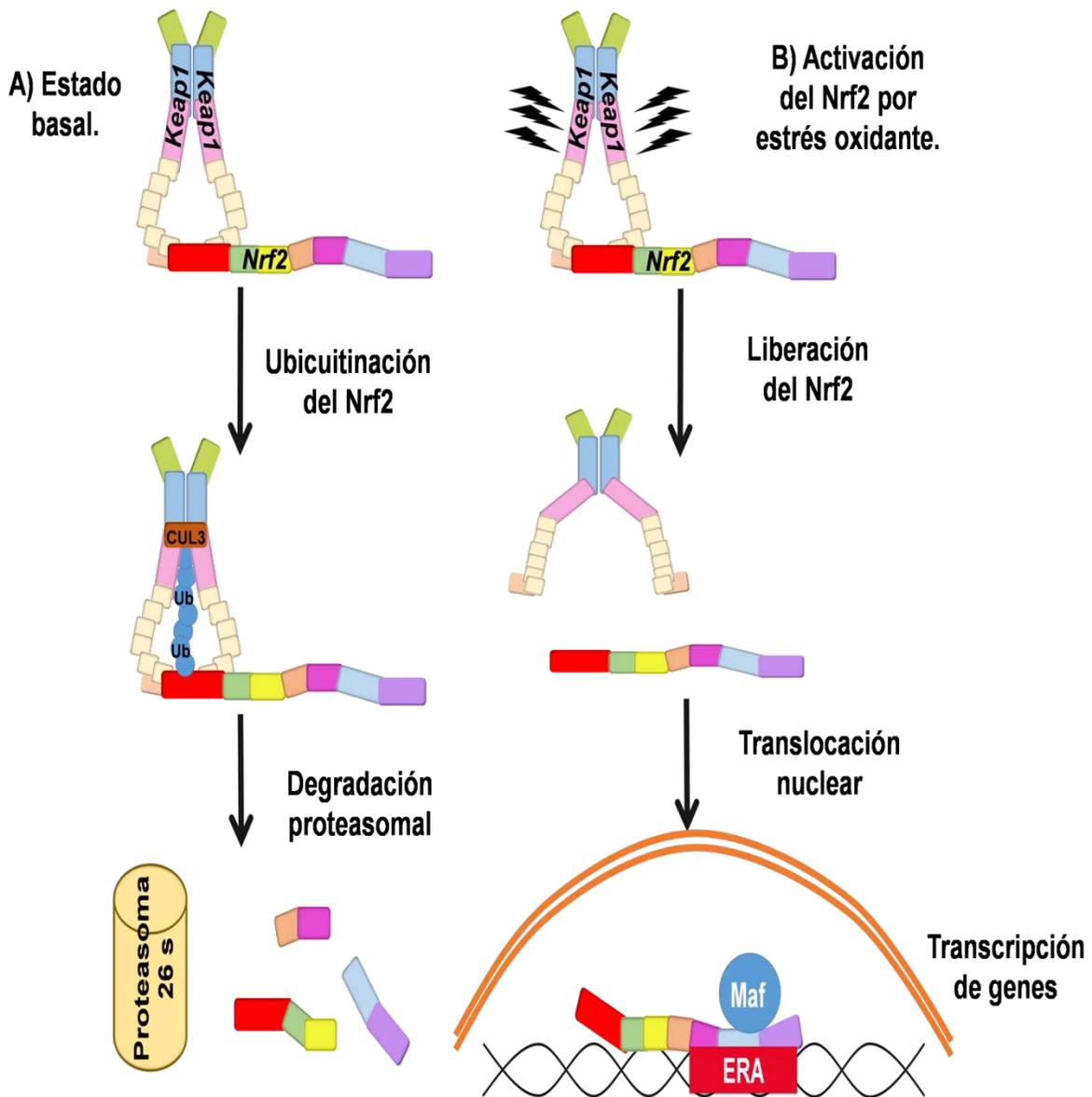


Figura 6. Regulación del Nrf2 por Keap1. A) En condiciones homeostáticas, el Nrf2 está retenido en el citoplasma por el dímero de Keap1 y Cul3. El complejo Nrf2-Keap1-Cul3 promueve la ubiquitinación del Nrf2, llevándolo a su degradación por la vía del proteasoma 26 S. B) Los grupos sulfidrilos de las cisteínas de Keap1 funcionan como sensores al estrés oxidante, la oxidación de las cisteínas promueve un cambio estructural en Keap1 liberando así al Nrf2, éste es translocado al núcleo. Dentro del núcleo el Nrf2 forma heterodímeros con las proteínas Maf, el heterodímero Nrf2-Maf se acopla al elemento de respuesta antioxidante, promoviendo la transcripción de proteínas antioxidantes.

### **5.-Retinopatía diabética.**

La retinopatía diabética (RD) se manifiesta como un deterioro progresivo en la agudeza visual, siendo la primera causa de ceguera en adultos de entre 20 y 64 años que padecen diabetes (Cunha-Vaz et al., 2014; Mastropasqua et al., 2014).

Clínicamente la RD se divide en dos tipos: la RD no proliferativa se caracteriza por la presencia de microaneurismas, hemorragias intrarretinianas, exudados duros y arrosamiento de las vénulas; la RD proliferativa se distingue por la presencia de nuevos vasos sanguíneos y la proliferación del tejido fibroso (Kern, 2014).

Aunque la mayoría de las complicaciones de la RD se han relacionado con lesiones vasculares, los componentes neuronales de la retina se alteran en etapas tempranas de la diabetes (Hernández & Simó, 2014; Stewart, 2010). En animales y pacientes diabéticos, se han observado alteraciones en el electroretinograma antes de la aparición de las lesiones vasculares, características de la RD no proliferativa (Kern, 2014; Tang & Kern, 2011). Además se presentan alteraciones en el control del metabolismo del glutamato (Gowda et al., 2011), pérdida de la actividad sináptica y la apoptosis en las células ganglionares de la retina (Kern, 2014).

La activación de las células gliales juega un papel fisiopatológico en la progresión de la RD. Los astrocitos de la retina normalmente expresan la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), mientras que en las células gliales de Müller esta expresión es nula. En la RD se observa la sobreexpresión de GFAP en las células de Müller (Cunha-Vaz et al., 2014; Hernández & Simó, 2014) y la expresión del factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), relacionado con la inducción de la neovascularización en la RD proliferativa (Bringmann et al., 2002).

La retina es un tejido altamente propenso al daño por el estrés oxidante, debido a su alto requerimiento de oxígeno y glucosa, ocasionado por su alta tasa metabólica (Fainstein & Aguilar-Maldonado, 2008). Lo que ha permitido proponer que la hiperglucemia induce la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO), como consecuencia del aumento en el flujo de electrones en la cadena respiratoria. Las altas concentraciones de glucosa intracelular, promueven una

mayor formación de piruvato que puede ser oxidado por el ciclo del ácido tricarboxílico, aumentando el flujo de NADH y FADH<sub>2</sub> a la cadena de transporte de electrones de la membrana interna mitocondrial, lo que puede ocasionar un aumento en la formación de anión superóxido (Giacco, 2011; Wu, Tang, & Chen, 2014).

En la retina de ratas diabéticas y en células de la retina incubadas con altas concentraciones de glucosa, se encuentran incrementados los niveles de superóxido y peróxido de hidrógeno (Eshaq et al., 2014), aumento en la lipoperoxidación y daño en el DNA (Kowluru, 2001; Kowluru, 2003). En la diabetes, las enzimas involucradas en la homeostasis redox como la superóxido dismutasa, la glutatión reductasa, la glutatión peroxidasa y la catalasa se encuentran disminuida su expresión en la retina (Brownlee, 2005). El uso de antioxidantes para prevenir la retinopatía experimental, ha proporcionado pruebas tanto a favor como en contra del uso de éstos (Stewart, 2010).

Estos estudios se han realizado en modelos de roedores diabéticos a más de 2 meses de inducida la diabetes y en pacientes afectados por la enfermedad durante varios años, por lo que no se ha establecido si el estrés oxidante observado es una consecuencia de la enfermedad o si es el responsable de las alteraciones observadas en la retina. Determinar si el estrés oxidante es una causa o una consecuencia de tales alteraciones resulta relevante para entender el proceso e identificar posibles estrategias terapéuticas para evitar el progreso de la enfermedad.

## **Hipótesis:**

Si la hiperglucemia genera estrés oxidante, que lleva a las alteraciones de la retina observadas en la RD, en etapas tempranas de hiperglucemia se esperaría un incremento del Nrf2 en el núcleo de las células en respuesta al estrés oxidante.

## **Objetivo general:**

Identificar la existencia de estrés oxidante en la retina de la rata diabética, a través de la localización y expresión subcelular del Nrf2.

## **Objetivos específicos:**

-Determinar la expresión y localización del Nrf2 y Keap1 en la retina de ratas sin tratamiento (controles) y de ratas en las que se indujo diabetes tipo1 a los 7, 20, 30 y 45 días post-inducción.

-Determinar la expresión y localización subcelular del Nrf2 y Keap1 en células gliales de la retina (glía de Müller) en cultivo, expuestas con distintas concentraciones de glucosa.

-Detectar la presencia de estrés oxidante en células gliales de Müller en cultivo, expuestas con distintas concentraciones de glucosa.

# Métodos:

## **1. Inducción de diabetes.**

En este trabajo se utilizaron ratas Long-Evans de 180 a 200 g. La inducción de la diabetes tipo 1, se realizó suministrando una sola dosis de estreptozotocina (STZ; 98mg/kg en amortiguador de citratos (ácido cítrico 90mM, NaCl 10mM, p.H 4.8)). Los animales se mantuvieron en condiciones de alimento y agua *ad libitum*. Estos fueron sacrificados a los 7 (7D), 20 (20D), 30 (30D) y 45 días (45D) posteriores a la inducción de la diabetes, a los mismos tiempos fueron sacrificadas ratas que no recibieron tratamiento (grupo control). La determinación de glucosa en sangre se realizó con las tiras reactivas de Accu-chek. Los animales se consideraron diabéticos si los valores ópticos de glucosa en sangre superaban los 300 mg/dL.

## **2. Cultivo primario de células gliales de la retina de la rata (Células de Müller).**

Ratas Long Evans de siete días postnatales, fueron decapitadas, en condiciones de esterilidad se extrajeron los ojos y fueron incubados en Medio Dulbecco's (DMEM; sigma D6546, 25 mM de glucosa, anfotericina B 2.5 µg/ml, penicilina 100 u/ml y L-glutamina 2 mM), toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad.

Al día siguiente los ojos fueron lavados con etanol al 70% e incubados con una solución salina de Hank libre de calcio y magnesio (HBSS-CMF; sigma H4641, NaHCO<sub>3</sub> 40 mM, anfotericina B 2.5 µg/ml y penicilina 100 u/ml, 0.1% de tripsina), durante 30 min a 37°C. Los ojos se colocaron en DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10% (DMEM-S10) para inactivar la tripsina.

Con una incisión ecuatorial en el ojo se obtuvo la copa óptica, de la cual se le separó la retina agitando suavemente en DMEM-S10. Las retinas fueron recuperadas en 3 ml de DMEM-S10 con 300 µl de desoxirribonucleasa I (DNasa 4000 U/ml). Las retinas fueron dissociadas mediante pasajes a través de una pipeta Pasteur, la suspensión se dejó sedimentar durante 20 s. para recuperar el sobrenadante. El sedimento se resuspendió con 3 ml de DMEM-S10, repitiendo la

disociación y recuperación del sobrenadante, el cual se juntó con el primer sobrenadante.

Para el cultivo en placas de 6 pozos, se emplearon las células aisladas a partir de dos retinas (1 ml por pozo~1, 000,000 células). Para el cultivo en placas de 24 pozos se emplearon las células aisladas a partir de una retina (0.5 ml por pozo~500,000 células). En algunos experimentos se colocaron cubreobjetos de vidrio sobre los que crecieron las células. Tres días después de la siembra a las células, se les cambió el medio D MEM-S10 por D MEM durante 6 horas provocando la muerte neuronal y obteniendo un cultivo de glía más puro. Posteriormente, las células se incubaron en un medio TC-199 suplementado con suero fetal bovino al 10% (TC-199-S10; sigma M0650, NaHCO<sub>3</sub> 40mM, 5 mM de glucosa, anfotericina B 2.5 µg/ml, penicilina 100 u/ml y L-glutamina 2 mM).

Las células crecieron durante 3 semanas en una incubadora a 37°C con atmosfera húmeda 5% CO<sub>2</sub> / 95% aire. Cada tercer día se le retiró el medio de cultivo y se adicionó medio fresco.

A las 3 semanas de crecimiento, las células fueron tratadas con altas concentraciones de glucosa (G25; 25 mM) durante 6, 12, 24, 36 y 48 horas, en paralelo con células incubadas con concentraciones normales de glucosa (G5; 5.5mM). El control osmótico se verificó adicionando manitol (19.5mM) al medio de incubación a los mismos tiempos del tratamiento.

### **3. Fraccionamiento subcelular: aislamiento de núcleos.**

Los animales fueron sacrificados por medio de decapitación, se enuclearon los ojos, con un corte se separó la copa óptica, a partir de la cual se aisló la retina.

Las retinas se aislaron en 1 ml de HBSS-CMF y se agitaron durante cinco minutos, en seguida fueron incubadas en 1 ml de HBSS-CMF con 0.1% de tripsina durante 10 minutos a temperatura ambiente. El medio HBSS-CMF se sustituyó con 1 ml de TC-199-S10, para inactivar la tripsina. Las retinas se colocaron en 0.5 ml de TC-199, se disociaron las células pasándolas varias veces a través de una pipeta Pasteur, se dejó sedimentar por 20 s, se recuperó el sobrenadante (S1); al pellet

se le adicionó 1 ml de medio TC-199 adicionado con 0.1% de tripsina y se repitió dos veces la disociación, recuperándose los sobrenadantes (S2 y S3).

Los sobrenadantes (S1-S3) se centrifugaron a 106 g durante 10 minutos a 4°C, el pellet recuperado corresponde a la fracción nuclear (N), el sobrenadante recuperado de S1 es la fracción citoplasmática (C). A la fracción citoplasmática se le adicionaron anti-proteolíticos (bacitracina 1mg/ml, benzamidina 2 mM, inhibidor de tripsina de soya 0.1mg/ml, pepstatina 10µg/ml, aprotinina 20u/ml y leupeptina 20µg/ml). La fracción nuclear se homogenizó en 75µL de Buffer Nuclear (HEPES 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1 mM, 1% Triton X-100 y anti-proteolíticos) el homogenado de la fracción nuclear y la fracción citoplasmática se incubaron durante una hora a 4°C en agitación a 1200 rpm y se almacenaron a -70°C.

A las células cultivadas a diferentes tiempos de tratamiento, se les retiró el medio de cultivo y se lavaron dos veces con Buffer de homogenización (HEPES 50 mM, sacarosa 0.3 M, EDTA 1 mM y anti-proteolíticos). Posteriormente, las células se obtuvieron mediante el raspado de la placa en 100 µl de buffer de homogenización por p ozo, el homogenado se centrifugó a 6500 g durante 15 min, el pellet recuperado es la fracción nuclear y el sobrenadante la fracción citoplasmática.

La fracción nuclear se homogenizó en 50 µL de Buffer Nuclear, el homogenado de la fracción nuclear y la fracción citoplasmática se incubaron una hora a 4°C en agitación a 1200 rpm y almacenaron a -70°C.

#### **4. Inmunodetección por medio de Western Blot.**

La expresión de la proteína Nrf2 y Keap1 se determinó mediante la técnica de Western Blot. Las proteínas se separaron en un gel SDS/PAGE al 12% y se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). La membrana se bloqueó con leche libre de grasa al 5% (P/V) en TBS-Tween (Trizma 20mM, NaCl 136mM, Tween-20 0.1%, pH 7.6) durante dos horas; posteriormente se incubó toda la noche a 4°C con los anticuerpos primarios: anti-Nrf2 (1:1000, ab137550-Abcam), anti-Keap1 (1:300, sc-33569-Santa Cruz Biotechnology), anti-

Cox IV(1:1000, 485 0-Cell Signaling) anti- $\alpha$  Actina (1:250, Chemicon, Temecula, CA) o anti-Histona 2B (H2B; 1:1000, #12364-Cell Signaling).

La inmunoreactividad fue detectada con un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (anti-conejo 1:5000; 1:10000) durante 1 hora; las bandas de proteína se visualizaron por quimioluminiscencia. La intensidad de las señales fue revelada en Hyperfilm ECL (GE Healthacare Ltd.) y se digitalizó con el programa DigiDoc Rt Alfa (Alpha INNOTECH). La cuantificación basada en las densidades ópticas relativas, se realizó con el programa Alpha Ease FC Stand Alone. La carga de proteína se normalizó usando los valores de la H2B para la fracción nuclear y de actina para la fracción citoplasmática. La proteína total se determinó mediante el método de Lowry, con el kit comercial DC Protein Assay (Bio-Rad), utilizando albumina como estándar.

### **5. Inmunohistoquímica.**

La localización celular del Nrf2 se analizó en cortes histológicos de la retina de ratas normales y diabéticas y en células de Müller cultivadas.

Las copas ópticas del ojo se fijaron durante 60 min en paraformaldehído al 4% en Buffer Fosfatos Salino (PBS; KCl 1.3mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.5mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3.2mM, NaCl 135mM). Posteriormente se lavó con PBS y se crioprotegió con sacarosa al 30%, se obtuvieron cortes de 10 $\mu\text{m}$ . Los cortes se incubaron toda la noche a 4 °C con anti-Nrf2 (1:200, ab137550-Abcam) se lavó con PBS tres veces y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo (cy3 1:500, AP-182C Chemicon) durante 2 h. Al finalizar la incubación se lavó con PBS y los cortes se montaron con glicerol.

Las células en cultivo se lavaron dos veces con PBS, se fijaron en 4% paraformaldehído con 4% de sacarosa en PBS durante 10 min, posteriormente se lavaron dos veces con PBS. Las células se permeabilizaron con saponina al 0.4% en PBS (PBS-S) 7 min y se bloquearon con 1% albumina de suero fetal bovino en PBS-S durante 60 min. Los cubreobjetos se incubaron toda la noche con anti-Nrf2 (1:200, ab137550-Abcam), anti-Keap1 (1:300, sc-33569-Santa Cruz Biotechnology) anti-vimentina (1:250, M072529-2-Dako), se lavó 2 veces con PBS-

Se lavó por 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario anti-conejo o anti-ratón (cy3 1:500, AP-182C Chemicon; cy3 1:250, 62-6515 Zymed). Al finalizar la incubación se lavó con PBS-S tres veces por 10 min y los cubreobjetos se montaron con glicerol.

La inmunoreactividad a Nrf2 y Keap1 en los cortes de retina y las células en cultivo, se analizaron en un microscopio de epifluorescencia (Nikon Alphaphot) con cámara Nikon Digital Dxm1200.

### **6. Detección de estrés oxidante.**

Los niveles intracelulares de EROs se midieron por la fluorescencia del 2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-Da). El DCFH-Da es una molécula hidrofóbica que se disuelve rápidamente en las células, donde es hidrolizado por esterasas intracelulares, dando lugar a la molécula DCFH que es oxidada rápidamente por EROs a 2',7'-diclorohidrofluoresceína (DCF) produciendo un onda de emisión de 530nm.

Las células cultivadas sobre cubreobjetos, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con DCFH-Da (25µM) a 37°C por 20 min en la oscuridad, se lavaron tres veces con PBS y se observaron bajo el microscopio. Las células se incubaron con peróxido de hidrogeno (100 µM) como control positivo.

La fluorescencia de la DCF, se analizó en microscopio de epifluorescencia (Nikon Alphaphot) con cámara Nikon Digital Dxm1200

### **7. Análisis estadístico.**

El análisis de las densitometrias obtenidas, se realizó con el programa GraphPadPrism 6, la significancia fue determinada por medio de una prueba de ANOVA y Tukey (P<0.05).

# Resultados.

## 1. Localización celular del Nrf2 en la retina de la rata.

La inmunohistoquímica del Nrf2 reveló su presencia en las capas nucleares de la retina (CNE, CNI y CCG) (Fig. 7). Interesantemente la inmunofluorescencia del Nrf2 se observó incrementada en los somas de los fotorreceptores en la retinas de ratas diabéticas de 45 días (Fig. 7-B).

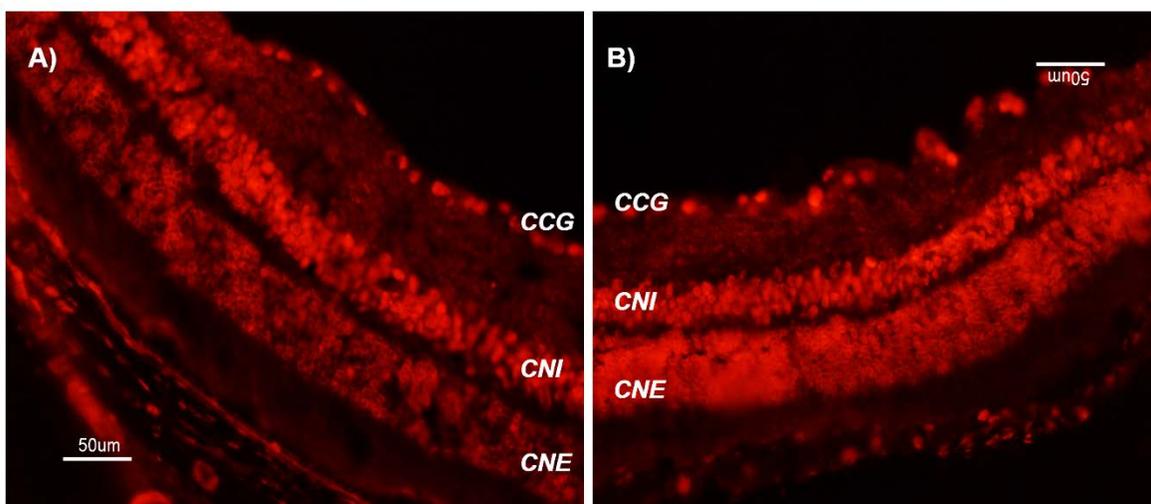


Fig. 7: Inmunofluorescencia del Nrf2 en secciones verticales de retina. A) Retina de rata control y B) diabética (STZ) de 45 días. CNE; capa nuclear externa, CNI; capa nuclear interna, CCG; capa de células ganglionares.

## 2. Localización subcelular del Nrf2 y la Keap1 en la retina de la rata diabética.

Con el fin de identificar la localización del Nrf2, se llevó a cabo un fraccionamiento subcelular y posteriormente la presencia de este factor se determinó por Western Blot. La identificación de la fracción nuclear se realizó por la tinción con DAPI (Fig.8) y la detección de la histona 2B por Western Blot. Estas técnicas demostraron una elevada pureza de la fracción nuclear. El Western Blot para la

histona 2B dio positivo únicamente en la fracción nuclear y ésta no dio reacción positiva para la enzima mitocondrial COX, y actina (Fig.9).

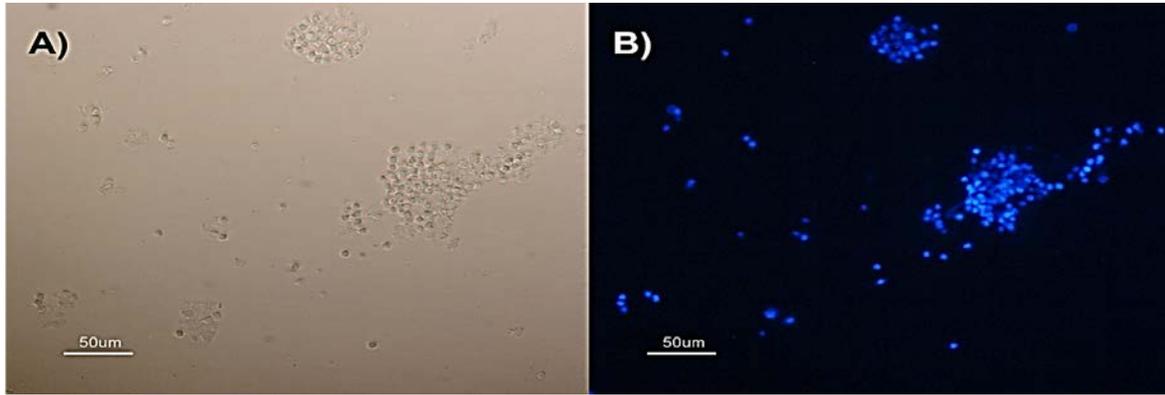


Fig. 8: Fracción enriquecida en núcleos. A) Campo claro, B) marcaje con DAPI.

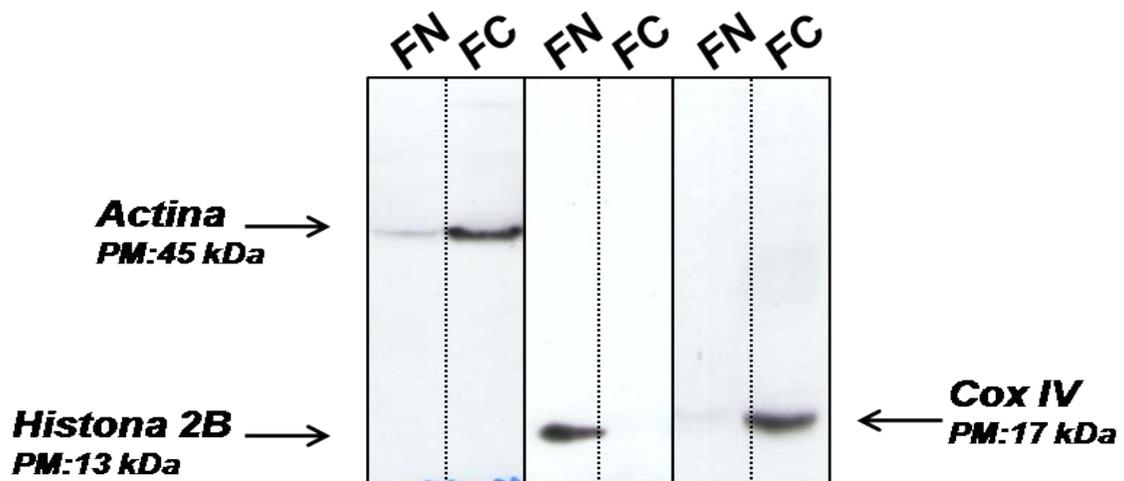
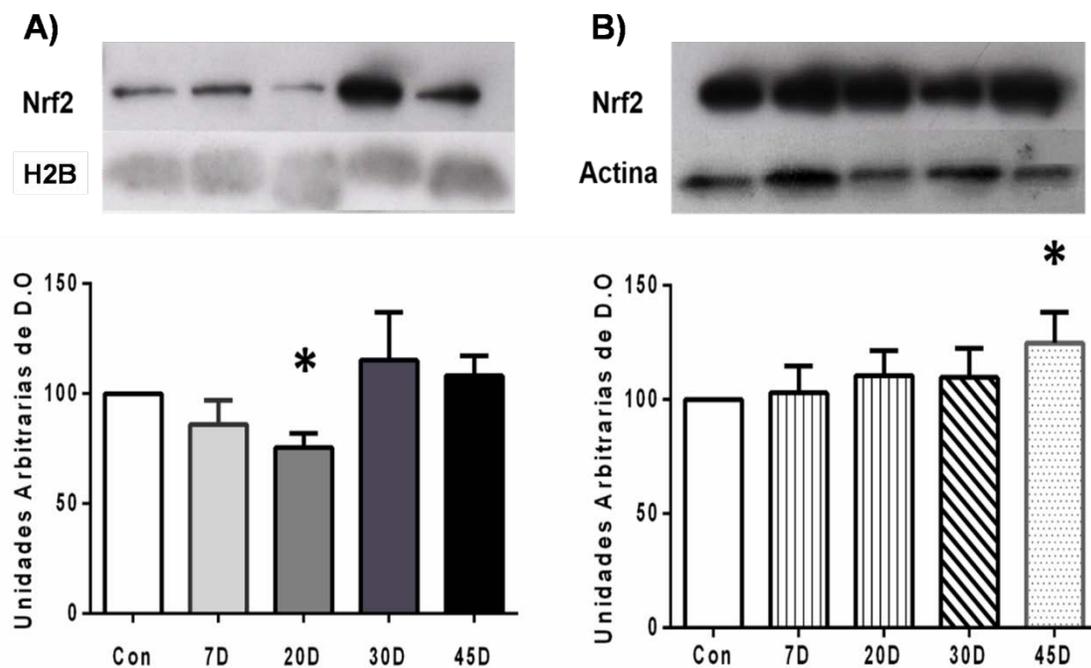


Fig. 9: Identificación de las fracciones subcelulares por medio de Western Blot.

FN: fracción nuclear; FC: fracción citoplasmica.

La expresión del Nrf2 en la fracción nuclear de retinas de ratas sacrificadas a 20 días posteriores a la inducción de diabetes, se observó disminuida en un 24% con respecto a los animales del grupo control (Fig.10-A); mientras que a los 30 y 45 días de hiperglucemia los niveles del Nrf2 fueron los mismos que los encontrados de los animales controles. En la fracción citosólica, la expresión del Nrf2 incrementó únicamente a los 45 días de hiperglucemia, obteniéndose un aumento del 25% con respecto al control (Fig.10-B)

Por otro lado, la expresión de la Keap1 no mostró cambios significativos en ninguna de las fracciones subcelulares (Fig.11).



*Fig. 10: Efecto de la hiperglucemia en la localización subcelular del Nrf2 en la retina de la rata. Expresión del Nrf2 (PM: 68 k Da) en la A) fracción nuclear y B) fracción citoplasmática por medio de la técnica de western Blot, usando como controles de carga Histona 2B (PM: 14 k Da) y actina (PM: 43 k Da) respectivamente. Con; control, 7- 45D; días de hiperglucemia. N=5,\* P <0.05.*

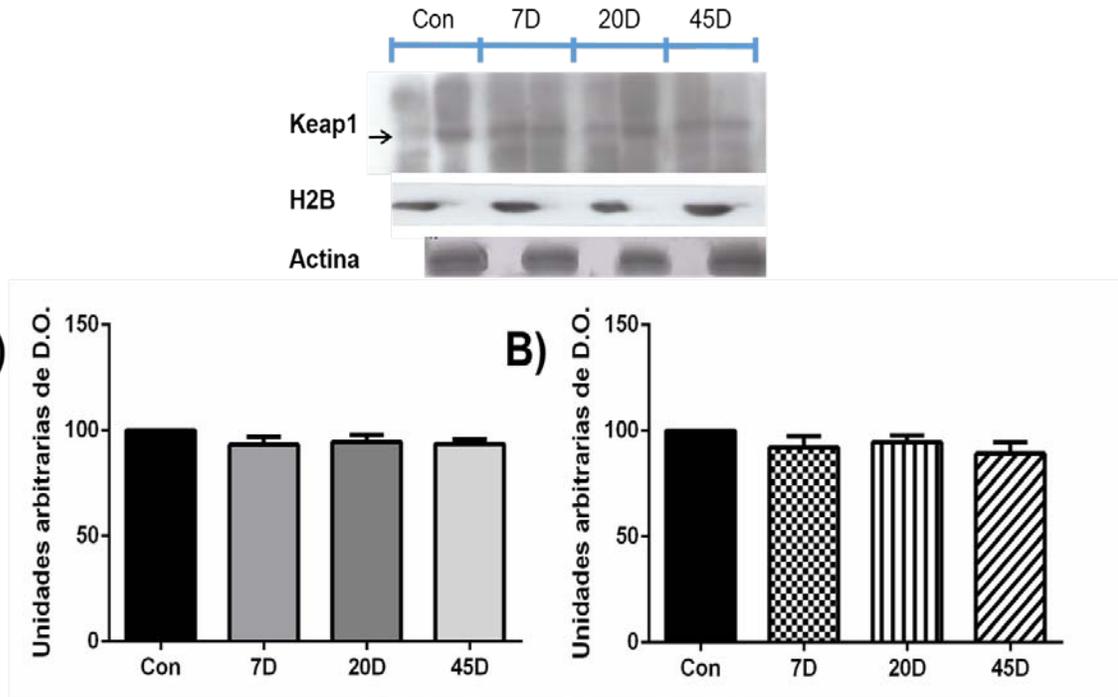


Fig. 11: Efecto de la hiperglucemia en la localización subcelular de la Keap1 (PM: 70 kDa) en la retina de la rata. Expresión de Keap1 en la A) fracción nuclear y B) fracción citoplasmática por medio de la técnica de western Blot, usando como controles de carga H2B y actina respectivamente. Con; control, 7- 45D; días de hiperglucemia. N=5,\* P <0.05.

### 3. Efecto de altas concentraciones de glucosa en la localización subcelular de Nrf2 y Keap1 en células gliales de Müller en cultivo.

El cultivo primario de células gliales de Müller de la retina de la rata, se caracterizó por la expresión de la vimentina, filamento intermedio característico de estas células (Wang et al., 2011) (Fig.12).

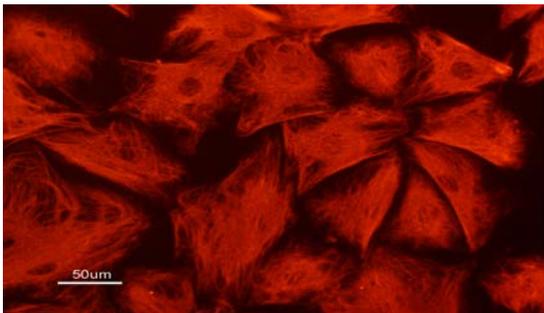


Fig. 12: Células gliales de Müller en cultivo durante 14 días, inmunopositivas para vimentina.

En células incubadas con G5 el Nrf2 se localizó tanto en el citoplasma como en el núcleo, en el que se observó una mayor intensidad de la fluorescencia, en todos los tiempos estudiados (Fig.13-A, B, C y D). La incubación de estas células con G25, causó una disminución en la expresión del Nrf2 en el citoplasma de las células, sin embargo no se pudo identificar ningún cambio de su expresión en el núcleo (Fig. 13-E, F, G, H). Las células incubadas con G5 y manitol (19.5mM) a los diferentes tiempos, presentaron un patrón de expresión similar que el de las células incubadas con G5 (Fig.14-I, J, K y L).

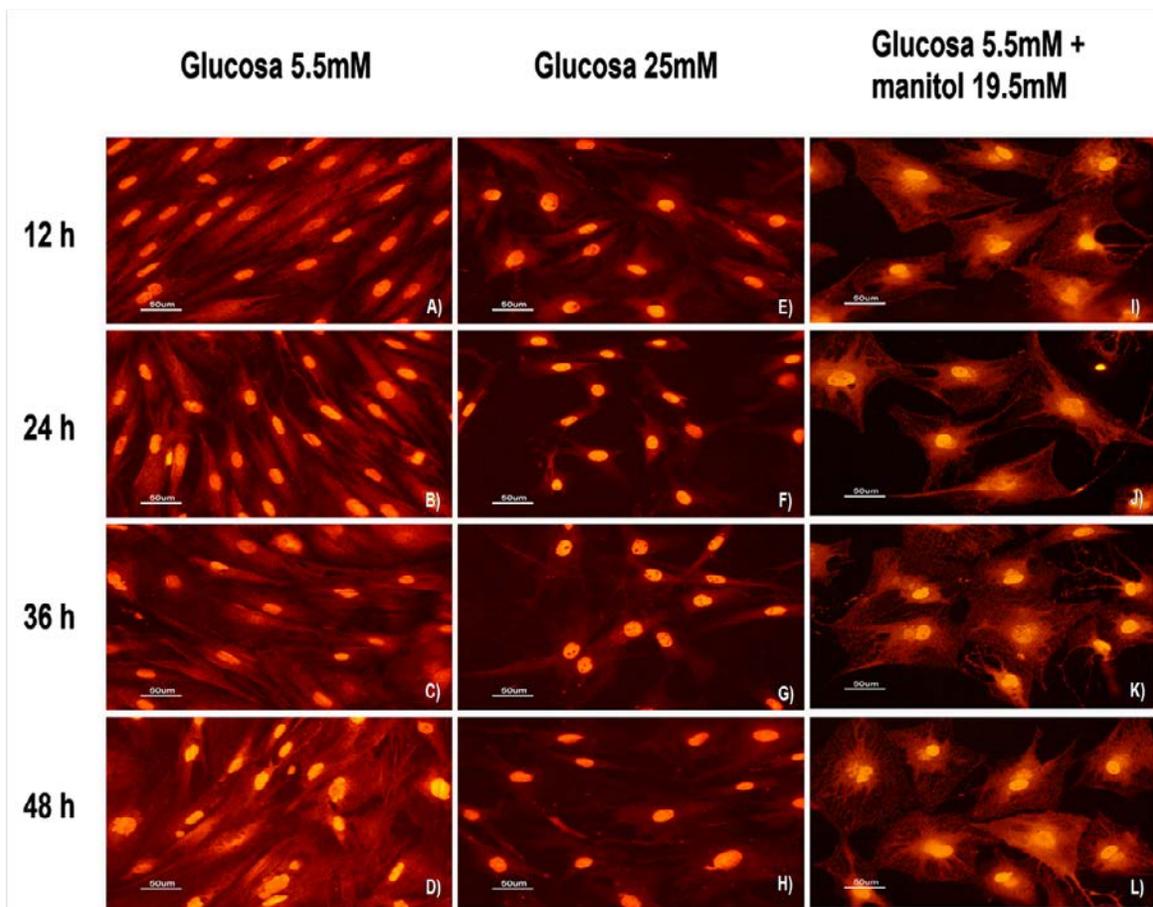


Fig. 13: Inmunolocalización del Nrf2 en células de Müller en cultivo. Células incubadas con 5mM de glucosa (A, B, C y D), 25 mM de glucosa (E, F, G y H) y 5mM de glucosa + 19.5mM de manitol (I, J, K y L). 12-48 h; horas de incubación.

La Keap1 se localizó en el citoplasma de la célula observándose una mayor concentración en la región perinuclear, en las células incubadas con G5 (Fig.14-A, B, C y D). La exposición de las células a G25 causó una disminución en la inmunoreactividad de Keap1 a partir de las 24 h de incubación, manteniéndose estos niveles hasta las 48h (Fig. 14 -E, F, G y H). De particular relevancia, se observó que las células incubadas en presencia de manitol, presentaron un patrón de localización de la Keap1, semejante al observado en las células incubadas con G25 (Fig.14-I, J, K y L).

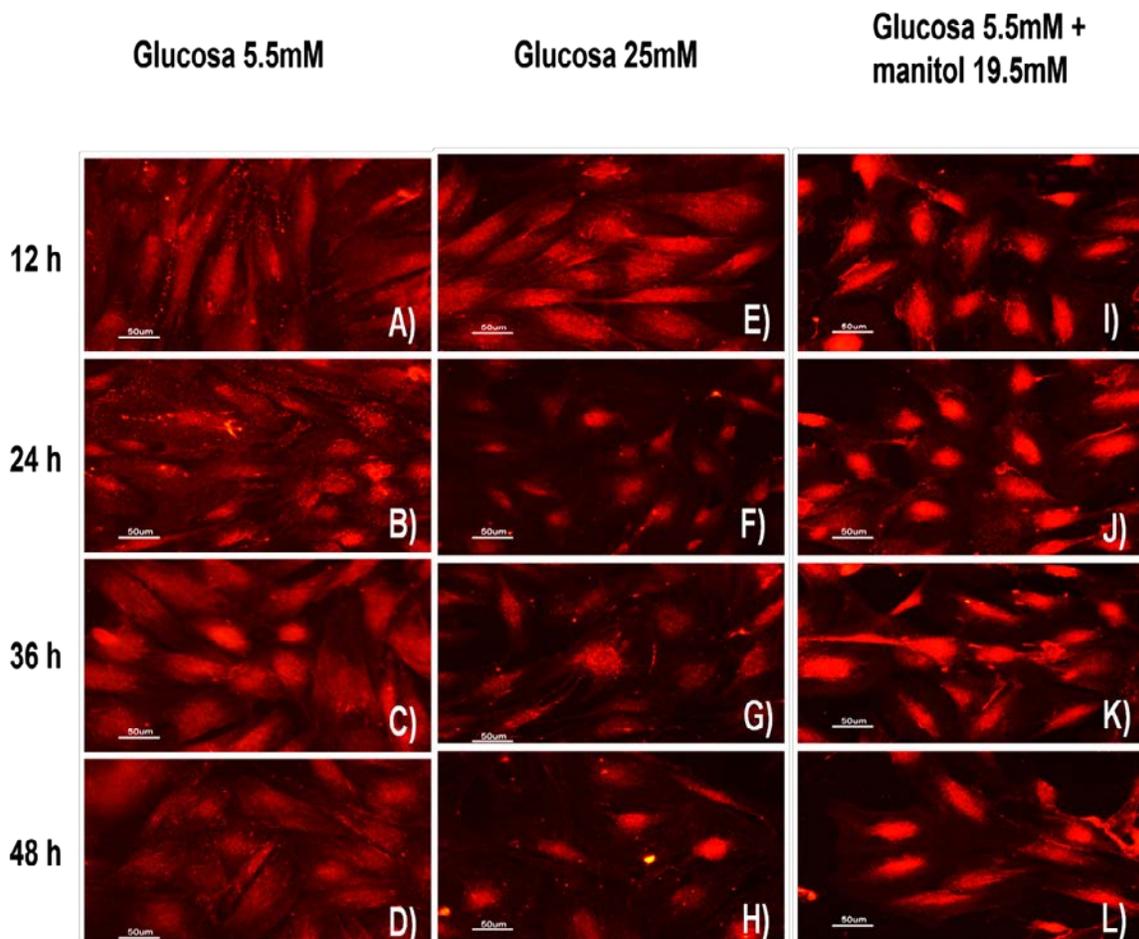


Fig. 14: Inmunolocalización de Keap1 en células de Müller en cultivo. Células incubadas con 5mM de glucosa (A, B, C y D), 25 mM de glucosa (E, F, G y H) y 5mM de glucosa + 19.5mM de manitol (I, J, K y L). 12-48 h; horas de incubación.

En la fracción nuclear de células incubadas con G5, los niveles de expresión del Nrf2, determinados por western blot, fueron constantes en todos los tiempos de incubación (Fig.15). Por el contrario, en las células incubadas con G25, se observaron fluctuaciones en la expresión del Nrf2 en el núcleo, a los diferentes tiempos de incubación; observándose una disminución del 51% a las 24h y un aumento del 69% a las 48h de incubación (Fig.16-A). En la fracción citosólica de las células incubadas con G25, la expresión del Nrf2 se redujo progresivamente con el tiempo de incubación (Fig.16-B), mostrando una mayor disminución a las 48h del 60%

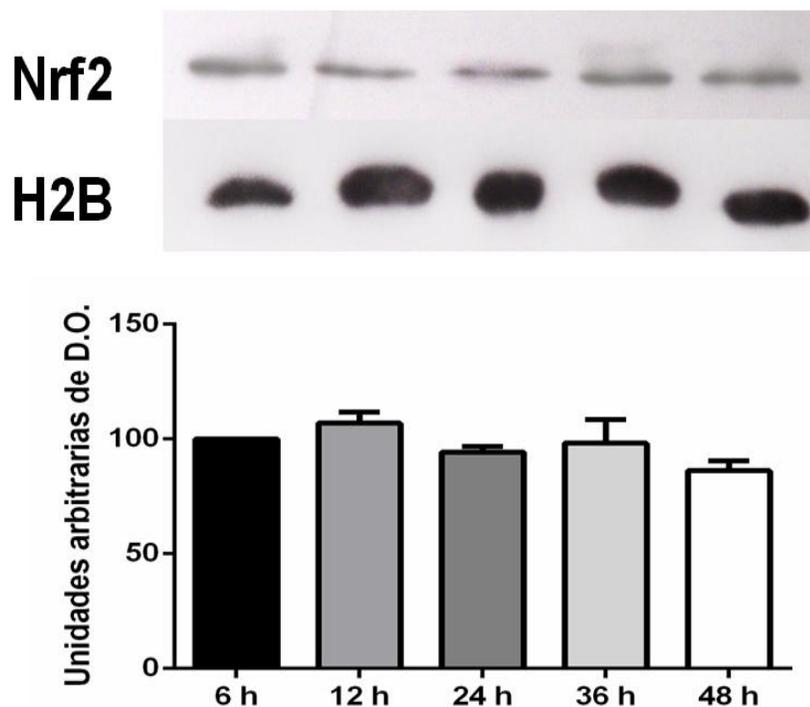


Figura 15. Expresión del Nrf2 en la fracción nuclear de células incubadas con G5, por medio de la técnica de western Blot, usando como control de carga histona 2B (H2B). 6- 48 h: horas de incubación. N=3,\* P <0.05.

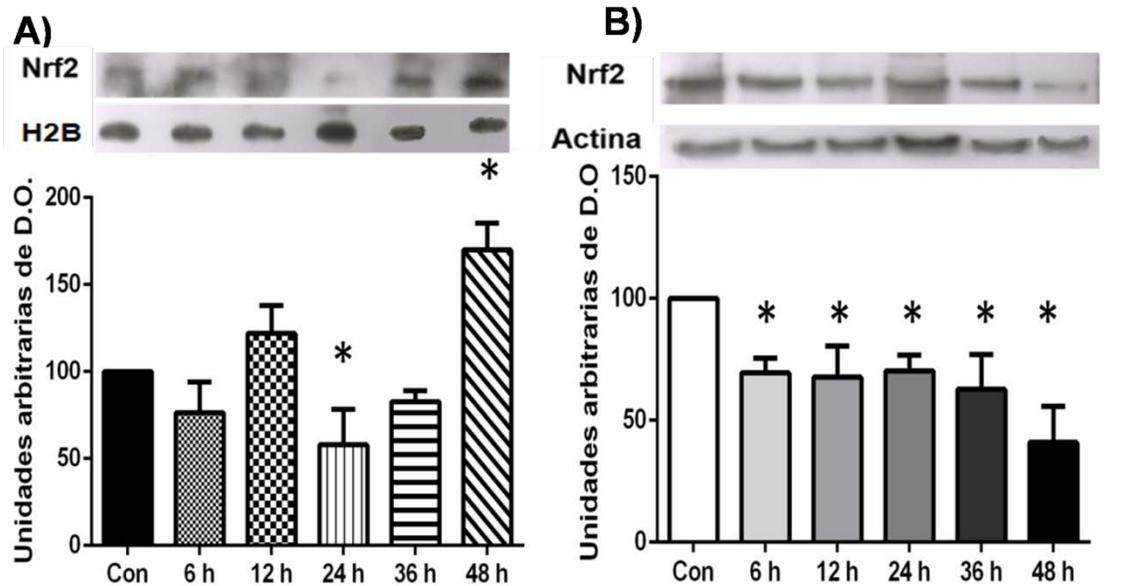
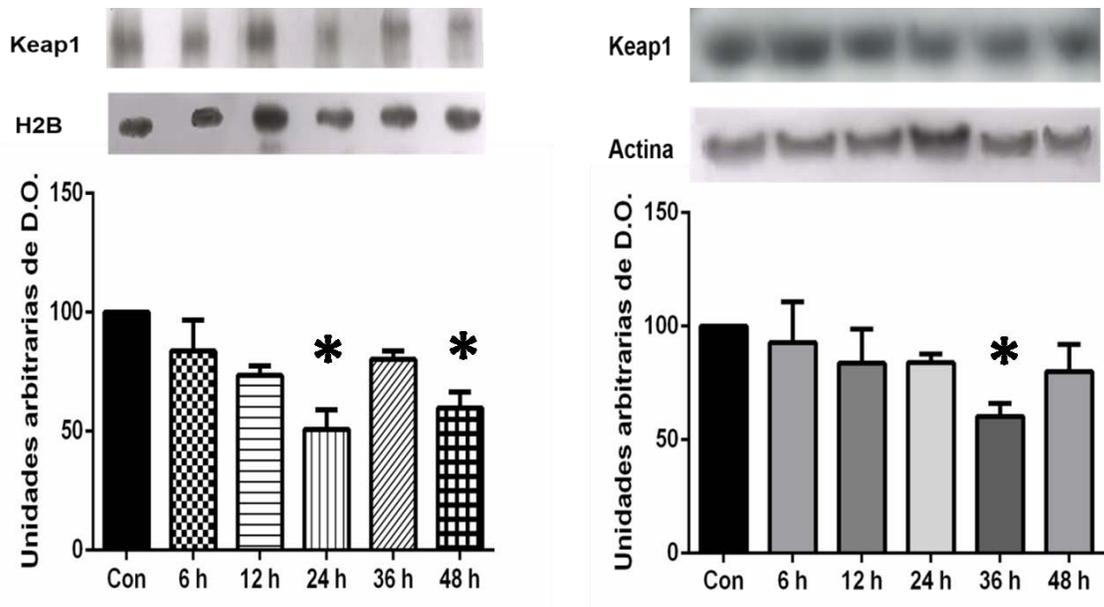


Figura 16. Efecto de la incubación con G25, en la localización subcelular del Nrf2 en las células de Müller. Expresión del Nrf2 en la A) fracción nuclear y B) fracción citoplasmática por medio de la técnica de western Blot, usando como controles de carga histona 2B y actina respectivamente. N=3, \* P < 0.05.

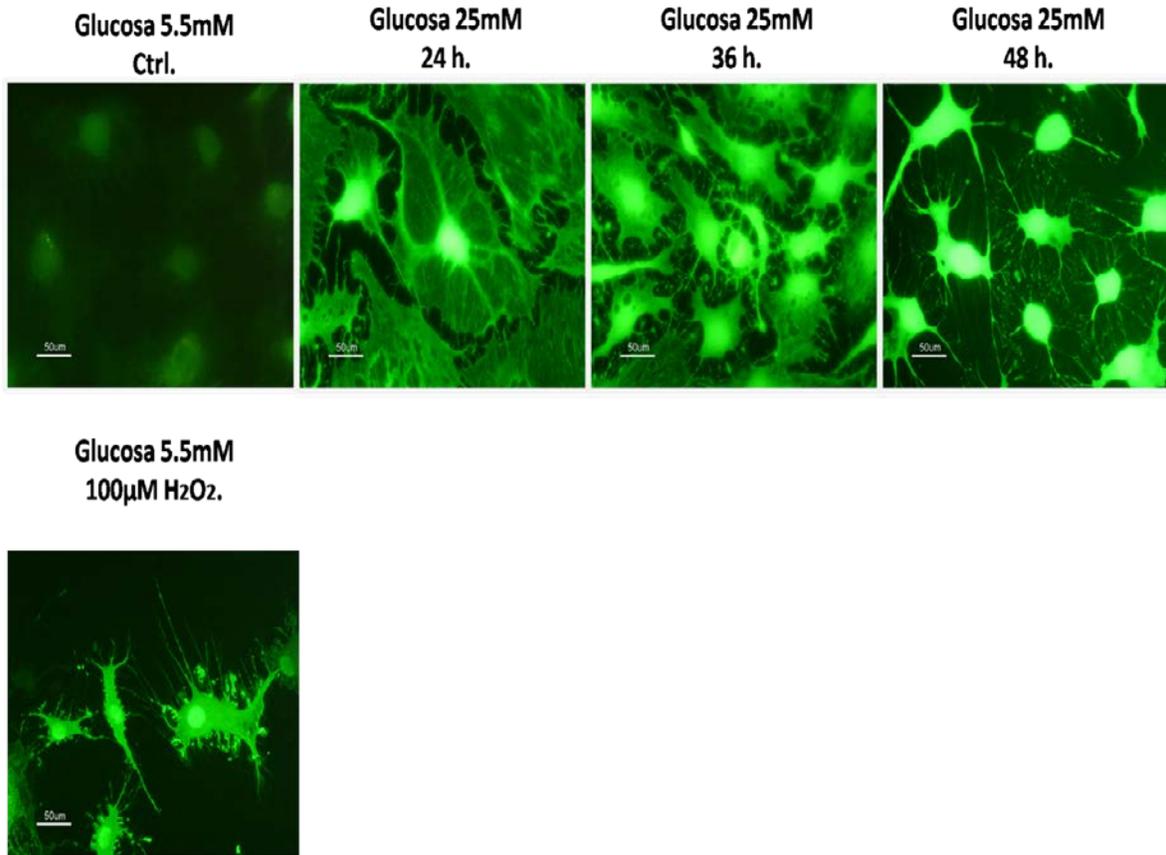
La expresión de la Keap1 en la fracción nuclear de células incubadas con G25, presentó fluctuaciones a los diferentes tiempos de incubación. Se observó una disminución a las 24 h del 50% y a las 48 h del 40% (Fig.17-A), mientras que a las 36 h se observaron los mismos niveles que a las 6 y 12h de incubación. De igual manera, la expresión de la Keap1 en la fracción citosólica, disminuyó significativamente a las 36 h en un 40% (Fig.17-B), observándose a las 48h se los mismos niveles de expresión que en tiempos anteriores.



*Fig. 17: Efecto de la alta concentración de glucosa en la localización subcelular de la Keap1 en las células de Müller. Expresión de la Keap1 en la A) fracción nuclear y B) fracción citoplasmática por medio de la técnica de western Blot, usando como controles de carga histona 2B y actina respectivamente. N=3, \* P <0.05.*

#### **4. Producción de EROs por altas concentraciones de glucosa en las células gliales de Müller en cultivo.**

La producción de EROs se determinó por la fluorescencia del indicador DCF (ver métodos). En las células de Müller incubadas con G5, se observó la producción de ERO, la cual parece localizarse en la zona perinuclear (Fig.18-A). En las células incubadas con G25, se observó una mayor intensidad en la fluorescencia de DHF a partir de las 24h, y ésta se presentó en toda la célula (Fig.18-B, C y D). Paralelamente al incremento en la producción de EROs se observó un cambio drástico en la morfología celular. La morfología de las células incubadas con G25, fue similar a la de las células incubadas con G5 en presencia de 100  $\mu$ M de peróxido de hidrógeno (Fig. 18-E).



*Fig. 18: Producción de EROs en las células de Müller en cultivo. Células incubadas con 5.5mM de glucosa (A), con 25 mM de glucosa (B, C y D). Células incubadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) durante 30 min (E). 24-48h; horas de incubación.*

## Discusión.

El Nrf2 es un componente esencial en la defensa celular, y a que favorece la transcripción de genes que codifican enzimas detoxificantes y antioxidantes (Brigelius-Flohé & Flohé, 2011). En condiciones basales el Nrf2 se encuentra retenido en el citoplasma por su unión a Keap1; esta proteína se une a la ubiquitina ligasa E3, mediante la proteína Cul3. El complejo Keap1-Cul3-E3 facilita la ubiquitinación del Nrf2, promoviendo su degradación en el proteasoma 26S. Keap1 presenta residuos de cisteínas que le permiten funcionar como sensor de oxidantes y/o reductores; el aumento de oxidantes promueve la liberación del Nrf2, activándolo. Éste puede translocarse al núcleo y posteriormente unirse al DNA en el elemento de respuesta antioxidante, lo que resulta en la síntesis de proteínas antioxidantes, que mantienen el estado redox celular (Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

La translocación del Nrf2 al núcleo también se encuentra modulada por otros mecanismos independientes de Keap1: a) la PKC puede fosforilar directamente al Nrf2 en la Ser40, facilitando su liberación de Keap1 (Bloom & Jaiswal, 2003); b) la activación de la proteína cinasa del retículo endoplásmico (PERK), que se activa en respuesta al estrés por proteínas mal plegadas, fosforila al Nrf2 favoreciendo su acumulación nuclear (Cullinan & Diehl, 2006; Cullinan et al., 2003); c) la activación de las cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), como p38 MAPK, la cinasa terminal-NH<sub>2</sub> c-Jun (JNK), y la cinasa reguladora de señales extracelulares (ERK) y d) PI3K (Kang, Ryu, & Kim, 2000).

Adicionalmente, el Nrf2 tiene un mecanismo de degradación independiente de Keap1. El dominio Neh6 del Nrf2 contiene varios residuos de serina que pueden ser fosforilados por la GSK-3 $\beta$ . La fosforilación de estos residuos promueve la unión con la  $\beta$ -TrCP, esta se une a la ubiquitina ligasa E3 mediante la proteína Cul1, promoviendo la ubiquitinación y posterior degradación del Nrf2 (Dinkova-Kostova, Holtzclaw, & Kensler, 2005; Hayes & Dinkova-Kostova, 2014).

La diabetes mellitus, es una enfermedad que se caracteriza por presentar altas concentraciones de glucosa en sangre. Se observó que esta condición puede provocar un estrés oxidante en diferentes tejidos, el cual se ha visto implicado en la progresión de las complicaciones de la diabetes como la nefropatía, la neuropatía y la retinopatía. Debido a que el Nrf2 regula la respuesta antioxidante, se sugiere que su función se encuentra alterada en la diabetes. Ciertamente, la presencia de estrés oxidante, elevados niveles de ERO y ERN, se han observado en el riñón de ratones hiperglucémicos y deficientes del Nrf2 (Yoh et al., 2008).

Las funciones del Nrf2 en la retina se han reportado por medio de su activación por compuestos como el sulfurofano (Pan et al., 2014; Tanito et al., 2005), la curcumina (Mandal et al., 2009), el 17 $\beta$ -estradiol (S. Wang et al., 2015) y la tert-butil-hidroquinona, estos compuestos reducen a las cisteínas de Keap1 permitiendo la liberación del Nrf2. Se demostró que esta activación del Nrf2 protege a la retina en modelos de degeneración inducida por la luz (Tanito et al., 2005) o por compuestos citotóxicos como el 4-hidroxinonanal (Tanito, Agbaga, & Anderson, 2007); esta protección se encuentra mediada por la activación de enzimas antioxidantes, principalmente la Trx1 (Kong et al., 2007; Mandal et al., 2009; Pan et al., 2014; Tanito et al., 2005, 2007; S. Wang et al., 2015). Estos estudios evidencian las funciones del Nrf2 en la homeostasis redox en la retina. El estrés oxidante demostrado en la retina de pacientes diabéticos y de ratas con hiperglucemia inducida en periodos prolongados, sugiere una función alterada del Nrf2 (Eshaq et al., 2014; Brownlee, 2005; Kowluru, 2003; Kowluru, 2001).

En este trabajo, observamos que la expresión del Nrf2 en la retina de ratas normales se localiza en las capas nucleares de la retina (CNI, CNE y CCG), resultado que es semejante al observado por Pan et al., (2014). Sin embargo, el grupo de Xu et al., (2014) reportó la expresión del Nrf2 en las células gliales de Müller y en la capa de células ganglionares de la retina del humano y del ratón.

En la retina de ratas con dos meses de hiperglucemia, inducida por estreptozotocina, se observó un aumento en la expresión del Nrf2, tanto a nivel del RNA como de la proteína (Xu et al., 2014; Zhong & Kowluru, 2012). Estos autores también demostraron un aumento en la translocación del Nrf2 al núcleo y la transcripción de los genes de la Trx1, la HO1 y la NQO1, en la retina de estos animales. De acuerdo con estos resultados, en este trabajo observamos un aumento en la expresión del Nrf2 a los 45 días de inducida la diabetes, pero no a tiempos cortos (7-30 días) (Fig. 7; 10-B). A pesar de este aumento en la expresión de Nrf2, la expresión de éste en el núcleo disminuyó a los 20 días de hiperglucemia, observándose niveles semejantes al basal a los 30 y 45 días de hiperglucemia (Fig. 10-A). Por otro lado, los niveles de expresión de Keap1 no se modificaron en condiciones de hiperglucemia. Nuestros resultados indican que a tiempos cortos de hiperglucemia la capacidad reguladora del Nrf2 es normal, sugiriendo que no existe un estrés oxidante en la retina. La disminución de los niveles del Nrf2 en el núcleo a los 20 días de hiperglucemia parece estar asociada a un aumento o mantenimiento de especies reductoras a nivel citosólico. Se ha reportado que en animales de 20 días de diabetes, las concentraciones de glutatión no sufren cambios con respecto al grupo control, sin embargo también se observa un aumento en la actividad de la superóxido dismutasa.

Los resultados anteriores representan la respuesta de todos los tipos celulares de la retina, y cada uno de éstos podría presentar una respuesta diferente ante las condiciones hiperglucémicas, por lo que el estudio de la expresión del Nrf2 en tipos celulares aislados proporcionaría información más específica.

En este sentido, las células gliales de Müller, son esenciales para el mantenimiento del metabolismo de la retina neural (Bringmann & Reichenbach, 2009). En modelos animales y pacientes diabéticos se han identificado anomalías tanto morfológicas como bioquímicas en la glía de Müller (Cunha-Vaz, Ribeiro, & Lobo, 2014; Simó & Hernández, 2014). Además las células de Müller liberan moléculas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$  y el VEGF que participan en la progresión de la retinopatía diabética (Xu et al., 2014). Adicionalmente, se reportó

que el Nrf2 regula enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión peroxidasa1 en cultivos de células de Müller (J. Wang et al., 2015).

Los estudios de inmunolocalización revelaron que el Nrf2 y Keap1 se encuentran expresados en el citoplasma principalmente en la región perinuclear y en el núcleo de las células de Müller; estos resultados concuerdan con lo reportado por Wang et al., (2015). Cuando las células se incubaron en condiciones de altas concentraciones de glucosa, se observó una disminución en los niveles de expresión del Nrf2 en el citoplasma (Fig. 13; 16-B). Los niveles de expresión del Nrf2 en el citoplasma disminuyeron a partir de las 6h de cultivo en presencia de altas concentraciones de glucosa. Mientras que los niveles en el núcleo presentaron oscilaciones a los distintos tiempos de incubación (Fig. 16-A). Estos resultados sugieren que el Nrf2 se transloca al núcleo como respuesta a un estrés oxidante. Por otra parte, el Nrf2 además de inducir la transcripción de proteínas antioxidantes, puede inducir su propia síntesis, lo que podría provocar una oscilación en los niveles normales de éste en el núcleo a pesar de disminuir en el citoplasma. Es interesante señalar que el efecto observado con altas concentraciones de glucosa no parece deberse a un efecto de osmolaridad, como lo indican los estudios con manitol.

Con el fin de determinar si la translocación del Nrf2 al núcleo se debe efectivamente a un aumento en la producción de EROs, éstas se determinaron por la fluorescencia de la DCF. Las altas concentraciones de glucosa en el medio, causaron un aumento en la producción de EROs a partir de las 24h de incubación (Fig. 18), que correspondió a una disminución del Nrf2 en el núcleo. Es interesante que la producción de EROs siguiera aumentando a las 48h de incubación, a pesar de que los niveles del Nrf2 en el núcleo aumentaron en un 69% con respecto al control. Por otro lado la expresión de Keap1 parece disminuir paulatinamente en condiciones de altas concentraciones de glucosa. Estos resultados indican que las altas concentraciones de glucosa causan un aumento en las EROs, éstas pueden ser controlados por el sistema antioxidante por un periodo de hasta 24h, posterior

al cual la elevada producción de EROs sobrepasa la capacidad reguladora promoviendo la activación del Nrf2.

Nuestros resultados indican que las células de Müller son altamente susceptibles a las elevadas concentraciones de glucosa, y su afectación representa un alto riesgo para el funcionamiento de la retina; lo que sugiere que *in vivo*, la afectación de este tipo celular podría repercutir en tiempos más prolongados en el resto de la retina.

## Conclusiones.

En la retina, a tiempos cortos de hiperglucemia la activación del Nrf2 no se modifica, lo que sugiere que en etapas tempranas de la retinopatía diabética no se estén produciendo en exceso especies reactivas de oxígeno para activar la regulación inducible mediada por Nrf2.

La exposición de las células de Müller a altas concentraciones de glucosa, provoca un aumento en las especies reactivas de oxígeno, disminución en la expresión del Nrf2 en el citoplasma y un aumento en su expresión en el núcleo a tiempos largos de exposición. Estos resultados indican que las células de Müller expuestas a altas concentraciones de glucosa pierden la capacidad reguladora del estado redox mediada por el Nrf2; o bien, el Nrf2 no juega en estas células un papel preponderante en la regulación del estado redox.

# Bibliografía.

Ahsan, H . ( 2015). D iabetic r etinopathy – Biomolecules and m ultiple pathophysiology. *Diabetes & Metabolic Syndrome: Clinical Research & Reviews*, 51–54.

Alghadyan, A . a . ( 2011). D iabetic r etinopathy - An updat e. *S audi J ournal of Ophthalmology*, 99–111.

Andreyev, a Y., & Kushnareva, Y. E. (2005). Mitochondrial Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Biochemistry*, 200–214.

Ashton, N. (1980). Ocular Pathology. *Journal of Clinical Pathology*, 202.

Athanasίου, D ., A guilà, M ., B evilacqua, D ., N ovoselov, S . S ., Parfitt, D. a ., & Cheetham, M. E. (2013). The cell stress machinery and retinal degeneration. *FEBS Letters*, 2008–2017.

Belle, T. O. M. L. V. a N., Coppieters, K. E. N. T., & Herrath, M. G. V. O. N. (2011). Type 1 Diabetes: Etiology, Immunology , and Therapeutic Strategies. *P hysiol Reviews*, 79–118.

Betteridge, D . J . ( 2000). What i s ox idative s tress? *M etabolism: C linical and Experimental*, 3–8.

Bhakkiyalakshmi, E., Sireesh, D., Rajaguru, P., Paulmurugan, R., & Ramkumar, K. M. (2015). The emerging role of redox-sensitive Nrf2–Keap1 pathway in diabetes. *Pharmacological Research*, 104–114.

Bloom, D. A., & Jaiswal, A. K. (2003). Phosphorylation of Nrf2 at Ser40 by protein kinase C in response to antioxidants leads to the release of Nrf2 from INrf2, but is not required for Nrf2 stabilization/accumulation in the nucleus and transcriptional activation of antioxidant response element. *The Journal of Biological Chemistry*, 44675–82.

Brigelius-Flohé, R., & Flohé, L. (2011). Basic principles and emerging concepts in the redox control of transcription factors. *Antioxidants & Redox Signaling*, 23 35–2381.

Bringmann, a , & Reichenbach, A. (2009). Müller Cells. *Journal of Neuroscience*, 1083–1093.

Bringmann, A., Iandiev, I., Pannicke, T., Wurm, A., Hollborn, M., Wiedemann, P., Reichenbach, A. (2009). Cellular signaling and factors involved in Müller cell gliosis: Neuroprotective and detrimental effects. *Progress in Retinal and Eye Research*, 423–451.

Bringmann, A., Pannicke, T., Uhlmann, S., Köhen, L., Wiedemann, P., & Reichenbach, A. (2002). Membrane conductance of Müller cells in proliferative diabetic retinopathy. *Canadian Journal of Ophthalmology*, 221–227.

Brownlee, M. (2005). The pathobiology of diabetic complications. *Diabetes*, 1615.

Buelna-Chontal, M., & Zazueta, C. (2013). Redox activation of Nrf2 & NF-κB: A double end sword? *Cellular Signalling*, 2548–2557.

Chistiakov, D. a. (2011). Diabetic retinopathy: Pathogenic mechanisms and current treatments. *Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews*, 165–172.

Chopra, K., Arora, V., & Kuhad, A. (2014). Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants. *Diabetes: Oxidative Stress and Dietary Antioxidants*, 135–143.

Costanzo, L. (2014). *Fisiologia*. Elsevier Health Sciences Brazil.

Cullinan, S. B., & Diehl, J. A. (2006). Coordination of ER and oxidative stress signaling: The PERK/Nrf2 signaling pathway. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 317–332.

Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J., & Diehl, J. A. (2003). Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. *Molecular and Cellular Biology*, 7198–209.

Cunha-Vaz, J ., Ribeiro, L ., & Lobo, C . ( 2014). Phenotypes and biomarkers of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 90–111.

Dinkova-Kostova, A. T., Holtzclaw, W. D., & Kensler, T. W. ( 2005). The role of Keap1 in cellular protective responses. *Chemical Research in Toxicology*, 1779–1791.

Eshaq, R. S., Wright, W. S., & Harris, N. R. (2014). Oxygen delivery, consumption, and conversion to reactive oxygen species in experimental models of diabetic retinopathy. *Redox Biology*, 661–666.

Estrada, E ., & Uribe, M . del C . A . ( 2002). Atlas de histología de vertebrados (UNAM.). México: UNAM.

Fainstein, M. K ., & Aguilar-Maldonado, B . ( 2008). Radicales Libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas. Manual Moderno.

Fang, Y. Z., Yang, S., & Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 872–879.

Fanjul, & eds., M. L. y M. H. (n.d.). *Biología funcional de los animales*. Vol. 2. Una neurofisiología comparada. Siglo XXI.

Gan, L., & Johnson, J. a. (2014). Oxidative damage and the Nrf2-ARE pathway in neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, 1208–1218.

Gañán-Gómez, I., Wei, Y., Yang, H., Boyano-Adánez, M. C., & García-Manero, G. (2013). Oncogenic functions of the transcription factor Nrf2. *Free Radical Biology and Medicine*, 750–764.

Giacco, F . ( 2011). Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, 1058–1070.

Ginhoux, F ., Lim, S., Hoefel, G., Low, D ., & Huber, T. ( 2013). Origin and differentiation of microglia. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 7, 45.

- Gowda, K., Zinnanti, W. J., & LaNoue, K. F. (2011). The influence of diabetes on glutamate metabolism in retinas. *Journal of Neurochemistry*, 309–20.
- Hayes, J. D., & Din kova-Kostova, A. T. (2014). The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends in Biochemical Sciences*, 199–218.
- Hernández, C., & Simó, R. (2014). Neurodegeneration in diabetic retinopathy: Current concepts and therapeutic implications. *Avances En Diabetologia*, 72–79.
- Holland, R., & Fishbein, J. C. (2010). Chemistry of the cysteine sensors in Kelch-like ECH-associated protein 1. *Antioxidants & Redox Signaling*, 1749–1761.
- Hurley, J. B. (2009). Phototransduction. *Encyclopedia of Neuroscience*, 687–692.
- Jessen, K. R. (2004). Glial cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 1861–1867.
- Jimenez. (2002). *Biologia Celular Y Molecular*. Pearson Educación.
- Kang, K. W., Ryu, J. H., & Kim, S. G. (2000). The essential role of phosphatidylinositol 3-kinase and of p38 mitogen-activated protein kinase activation in the antioxidant response element-mediated rGSTA2 induction by decreased glutathione in H4IIE hepatoma cells. *Molecular Pharmacology*, 1017–25.
- Kansanen, E., Kuosmanen, S. M., Leinonen, H., & Levonenn, A. L. (2013). The Keap1-Nrf2 pathway: Mechanisms of activation and dysregulation in cancer. *Redox Biology*, 45–49.
- Karp, G. (2009). *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. John Wiley & Sons.
- Kaspar, J. W., Niture, S. K., & Jaiswal, A. K. (2009). Nrf2:INrf(Keap1) Signaling in Oxidative Stress. *Stress: The International Journal on the Biology of Stress*, 1304–1309.

Kern, T. S. (2014). Interrelationships between the retinal neuroglia and vasculature in diabetes. *Diabetes and Metabolism Journal*, 163–170.

Klimanskaya, I. (2006). Retinal Pigment Epithelium. *Methods in Enzymology*, 169–194.

Kong, L., Tanito, M., Huang, Z., Li, F., Zhou, X., Zaharia, A., Cao, W. (2007). Delay of photoreceptor degeneration in diabetic mouse by sulforaphane. *Journal of Neurochemistry*, 1041–1052.

Kowluru, R. a. (2001). Diabetes-induced elevations in retinal oxidative stress, protein kinase C and nitric oxide are interrelated. *Acta Diabetologica*, 179–185.

Kowluru, R. a. (2003). Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes*, 818–823.

Leinonen, H. M., Kansanen, E., Pölönen, P., Heinäniemi, M., & Levonen, A. L. (2014). Role of the Keap1-Nrf2 pathway in cancer. *Advances in Cancer Research*.

Lenkowski, J. R., & Raymond, P. a. (2014). Müller glia: Stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Progress in Retinal and Eye Research*, 94–123.

Lo, S.-C., & Hannink, M. (2008). PGCAM5 tethers a ternary complex containing Keap1 and Nrf2 to mitochondria. *Experimental Cell Research*, 1789–803.

Lodish, H. (2005). *Biología celular y molecular*. Ed. Médica Panamericana.

Ma, Q. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 401–26.

Mandal, M. N. a, Patlolla, J. M. R., Zheng, L., Agbaga, M. P., Tran, J. T. a, Wicker, L., Anderson, R. E. (2009). Curcumin protects retinal cells from light-and oxidant stress-induced cell death. *Free Radical Biology and Medicine*, 672–679.

Marinho, H. S., Real, C., Cyrne, L., Soares, H., & Antunes, F. (2014). Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors. *Redox Biology*, 535–562.

Mastropasqua, R., Toto, L., Cipollone, F., Santovito, D., Carpineto, P., & Mastropasqua, L. (2014). Role of microRNAs in the modulation of diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*.

Na, H. K., & Surh, Y. J. (2014). Oncogenic potential of Nrf2 and its principal target protein heme oxygenase-1. *Free Radical Biology and Medicine*, 353–365.

Namani, A., Li, Y., Wang, X. J., & Tang, X. (2014). Modulation of NRF2 signaling pathway by nuclear receptors: Implications for cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1875–1885.

Newman, E. a. (2010). Retinal glia. *Encyclopedia of Neuroscience*, 225–232.

Niture, S. K., Khatri, R., & Jaiswal, A. K. (2014). Regulation of Nrf2 - An update. *Free Radical Biology and Medicine*, 36–44.

Pan, H., He, M., Liu, R., Brecha, N. C., Yu, A. C. H., & Pu, M. (2014). Sulforaphane Protects Rodent Retinas against Ischemia-Reperfusion Injury through the Activation of the Nrf2/HO-1 Antioxidant Pathway. *PLoS ONE*, e114186.

Reichenbach, A., & Briggmann, A. (2010). Müller Cells in the Healthy and Diseased Retina.

Ross, M. H., & Pawlina, W. (2007). *Histología (Médica Pan.)*. México: Médica Panamericana.

Seung, H. S., & Su, U. (2014). Perspective Neuronal Cell Types and Connectivity: Lessons from the Retina.

Simó, R., & Hernández, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23–33.

Simó, R., & Hernández, C. (2014). Neurodegeneration in the diabetic eye: New insights and therapeutic perspectives. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 23–33.

Stewart, M. W. (2010). Pathophysiology of diabetic retinopathy. *Diabetic Retinopathy: Evidence-Based Management*, 1–30.

Strauss, O. (2005). The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Reviews*, 845–881.

Sun, Z., Wu, T., Zhao, F., Lau, A., Birch, C. M., & Zhang, D. D. (2011). KPNA6 (Importin  $\alpha$ 7)-mediated nuclear import of Keap1 represses the Nrf2-dependent antioxidant response. *Molecular and Cellular Biology*, 1800–1811.

Sykoti, G. P., & Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Science Signaling*, re3.

Tang, J., & Kern, T. S. (2011). Inflammation in diabetic retinopathy. *Progress in Retinal and Eye Research*, 343–358.

Tanito, M., Agbaga, M. P., & Anderson, R. E. (2007). Upregulation of thioredoxin system via Nrf2-antioxidant responsive element pathway in adaptive-retinal neuroprotection in vivo and in vitro. *Free Radical Biology and Medicine*, 1838–1850.

Tanito, M., Masutani, H., Kim, Y. C., Nishikawa, M., Ohira, A., & Yodoi, J. (2005). Sulforaphane induces thioredoxin through the antioxidant-responsive element and attenuates retinal light damage in mice. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 979–987.

Tian, H., Zhang, B., Di, J., Jiang, G., Chen, F., Li, H., ... Zheng, J. (2012). Keap1: One stone kills three birds Nrf2, IKK $\beta$  and Bcl-2/Bcl-xL. *Cancer Letters*, 26–34.

Treuting, P. M., Wong, R., Tu, D. C., & Phan, I. (2012). *Special Senses: Eye. Comparative Anatomy and Histology (First Edit.)*. Elsevier Inc.

Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44–84.

Villa, C. , & Santodomingo, J. ( 2003). La córnea. Parte I Estructura, función y anatomía microscópica. *Gaceta Optica*, 454.

Wang, J., Shanmugam, A., Markand, S., Zorrilla, E., Ganapathy, V., & Smith, S. B. (2015). Sigma 1 receptor regulates the oxidative stress response in primary retinal Müller glial cells via NRF2 signaling and system xc<sup>-</sup>, the Na<sup>+</sup>-independent glutamate–cystine exchanger. *Free Radical Biology and Medicine*, 25–36.

Wang, M., Ma, W., Zhao, L., Fariss, R. N., & Wong, W. T. (2011). Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *Journal of Neuroinflammation*, 173.

Wang, S., Wang, B., Feng, Y., Mo, M., Du, F., Li, H., & Yu, X. (2015). 17β-Estradiol Ameliorates Light-Induced Retinal Damage in Sprague–Dawley Rats by Reducing Oxidative Stress. *Journal of Molecular Neuroscience*, 141–151.

Welsch, U. , & Sobotta, J. . ( 2008). *Histología ( Médica Pan.)*. E d. Médica Panamericana.

Winterbourn, C. C. . (2015). Are free radicals involved in thiol-based redox signaling? *Free Radical Biology and Medicine*, 164–170.

Wu, Y., Tang, L., & Chen, B. (2014). *Oxidative Stress: Implications for the Development of Diabetic Retinopathy and Antioxidant Therapeutic Perspectives*, 2014.

Xu, Z., Wei, Y., Gong, J., Cho, H., Park, J. K., Sung, E. R., Duh, E. J. (2014). NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia*, 204 – 213.

Yoh, K., Hirayama, A., Ishizaki, K., Yamada, A., Takeuchi, M., Yamagishi, S. I., ... Yamamoto, M. (2008). Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Genes to Cells*, 1159–1170.

Zheng, L., & Kern, T. S. (2009). Role of nitric oxide, superoxide, peroxynitrite and PARP in diabetic retinopathy. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 3974–87.

Zhong, Q., & Kowluru, R. (2012). Transcription Factor NF-E2-Related Factor 2 (Nrf2) Mediated Antioxidant Defense System in the Development of Diabetic Retinopathy. *Free Radical Biology and Medicine*, S99–S100.

Zhu, J. (2014). *Eye Anatomy*. Lasik MD, 1.