



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Carbonilación de proteínas en el epitelio
pigmentario de la retina en un modelo
experimental de diabetes**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

Elena Morales Ramírez



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

Ciudad universitaria, Ciudad de México. 2019



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.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. DATOS DEL ALUMNO

MORALES
RAMÍREZ
ELENA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE CIENCIAS
BIOLOGÍA
414110355

2. DATOS DEL TUTOR

DRA.
ROCÍO
SALCEDA
SACANELLES

3. DATOS DEL SINODAL 1

DR.
ALONSO
MARTÍNEZ
CANABAL

4. DATOS DEL SINODAL 2

DRA.
HELLENA
SOLLEIRO
VILLAVICENCIO

5. DATOS DEL SINODAL 3

DR.
ADOLFO
ANDRADE
CETTO

6. DATOS DEL SINODAL 4

DR.
LUIS
ENRIQUE
ARIAS
ROMERO

7. DATOS DEL TRABAJO ESCRITO

CARBONILACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA EN UN MODELO
EXPERIMENTAL DE DIABETES
40P
2019

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos a mis compañeros del laboratorio AL-102, a la Dra. Rocío Salceda por su apoyo y enseñanzas durante la elaboración de esta tesis.

Agradecimientos especiales al Biólogo Gustavo Sánchez Chávez por su asesoramiento y ayuda técnica durante la elaboración de esta trabajo.

Por sus observaciones y sugerencias agradezco mis sinodales:

Dr. Alonso Martínez Canabal, Dra. Helena Solleiro Villavicencio, Dr. Adolfo Andrade Cetto y Dr. Luis Enrique Arias Romero.

A mi familia

A los jóvenes ilustres

ÍNDICE

<u>LISTA DE ABREVIATURAS</u>	- 6 -
<u>RESUMEN</u>	- 7 -
<u>INTRODUCCIÓN</u>	- 9 -
LA DIABETES MELLITUS	- 9 -
RETINOPATÍA DIABÉTICA	- 10 -
ESTRUCTURA DE RETINA Y EPR	- 12 -
ESTRÉS OXIDATIVO	- 14 -
ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EPR	- 16 -
TÉCNICAS PARA MEDIR Y DETECTAR EL ESTRÉS OXIDATIVO	- 17 -
DAÑO A PROTEÍNAS	- 18 -
<u>HIPÓTESIS</u>	- 21 -
<u>OBJETIVOS</u>	- 21 -
OBJETIVO GENERAL	- 21 -
OBJETIVOS PARTICULARES	- 21 -
<u>MÉTODOS</u>	- 22 -
MODELO ANIMAL	- 22 -
TRATAMIENTOS	- 22 -
EXTRACCIÓN DEL TEJIDO	- 23 -
CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	- 24 -
DETERMINACIÓN DE CARBONILOS	- 24 -
DERIVATIZACIÓN CON DNPH	- 24 -

ANÁLISIS ESTADÍSTICO	- 25 -
<u>RESULTADOS</u>	- 26 -
NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE	- 26 -
NIVELES DE HEMOGLOBINA GLICADA (HBA1C)	- 26 -
OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL EPR DE RATAS CONTROLES Y DIABÉTICAS	- 27 -
EFFECTO DEL L-NAME Y QUERCETINA EN LA OXIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS	- 28 -
EFFECTO DE LA INSULINA EN LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS	- 30 -
<u>DISCUSIÓN</u>	- 33 -
<u>CONCLUSIÓN</u>	- 37 -
<u>REFERENCIAS</u>	- 38 -

LISTA DE ABREVIATURAS

EPR: Epitelio pigmentation de la retina

DM: Diabetes mellitus

ROS: Especies reactivas de oxígeno

RNS: Especies reactivas de nitrógeno

L-NAME: N(ω)-nitro-L-arginina metil ester

PKC: Proteína K cinasa

AGE: Especies de glicación avanzada

NOS: Óxido nítrico sintasa

NO: Óxido nítrico

8-OH-G: 8-Hidroxiguanosina

MDA: Malondialdehido

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular

PEGF: Factor de crecimiento derivado de epitelio pigmentario

SOD Mn: Superóxido dismutasa dependiente de Magnesio

Stz: Estreptozotocina

Ip: intraperitoneal

SDS: Dodecil sulfato de sodio

DNPH: 2,4-Dinitrofenilhidrazina

DNP: 2,4-Dinitrofenilhidrazona

PVDF: Difloruro polivinildieno

MAPK: Proteína cinasa activada por mitógeno

RESUMEN

La retinopatía diabética es una enfermedad crónica derivada de la diabetes mellitus (DM), se ha sugerido que la DM provoca un estado de estrés oxidativo sistémico que lleva a daño celular (Archer, 1999). En un estado de estrés oxidativo existe un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y/o especies reactivas de nitrógeno (RNS), debido que los sistemas antioxidantes son sobrepasados por los agentes oxidantes. En dicho estado ocurren modificaciones estructurales y funcionales en las biomoléculas (Konigsberg Fainstein, 2008); por ejemplo incluyendo a las proteínas, que al ser oxidadas sufren cambios estructurales afectando sus funciones en como señalizadores celulares, intermediarios metabólicos, etc.

Entre la retina y la coroides se encuentra el epitelio pigmentario de la retina (EPR), que es una monocapa de células pigmentadas, cuya actividad es indispensable para la homeostasis de la retina (Strauss, 2005) por lo tanto, puede ser importante en el desarrollo de las condiciones patológicas como la degeneración macular relacionada con la edad, la retinitis pigmentaria, la retinopatía diabética, etc. Se han observado en modelos animales que a tiempos largos de hiperglucemia aparecen cambios estructurales en el EPR (Aizu, et al., 2002), y que estos pueden contribuir al desarrollo de la retinopatía diabética.

Diversas evidencias han sugerido la existencia de una relación entre el estado de estrés oxidativo crónico en la DM y le retinopatía diabética. En ese sentido, se desarrolló un modelo murino de DM tipo 1 mediante el cual se estudiaron cuantificaron por oxyblot los niveles de proteínas oxidadas (como marcador de estrés oxidativo) en el EPR. Asimismo, se analizó por oxyblot el posible efecto protector de dicho estrés oxidante, de: el antioxidante quercetina, el inhibidor de la NOS (L-NAME) y de la insulina. Los resultados obtenidos en este estudio indican un incremento en la carbonilación de proteínas en el EPR a partir de los 20 días de

hiperglucemia, sin embargo, ésta no se redujo por los tratamientos con insulina, quercetina o L-NAME. Estos resultados sugieren que la hiperglucemia a tiempos cortos (menos de 60 días) ocasiona un estrés oxidativo en las células de EPR; sin embargo, debido a que los tratamientos utilizados para frenar el posible ambiente oxidativo causado por la hiperglucemia no tuvieron efecto, no podemos determinar el mecanismo que lleva al incremento en la oxidación de las proteínas.

INTRODUCCIÓN

LA DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por altas concentraciones de glucosa en la sangre. La DM es un importante problema de salud a nivel mundial (Whiting, et al., 2014) y su prevalencia ha aumentado considerablemente en las últimas décadas. De acuerdo con los datos presentados por la Federación Internacional de DM (FID) en el 2017, se estima que existen 500 millones de personas con DM en el mundo; por otra parte, se ha proyectado que en América del Norte y el Caribe habrá un aumento del 35% de adultos (20-79 años) diagnosticadas con DM para el año.

El diagnóstico de la DM está determinado principalmente por los niveles de glucosa en el plasma: 1) en ayunas (sin ingesta calórica por 8 horas), 2) 2 horas después de la ingesta de 75 g de glucosa, considerando como diagnóstico positivo para DM a valores mayores a 126 mg/dL y 200 mg/dL para el segundo, respectivamente (ADA, 2016). Otra prueba complementaria en el diagnóstico de la DM es la prueba de hemoglobina glicada, considerando positivo para DM cuando los valores son mayores al 6.5% ($HbA_{1c} > 6.5\%$) (ADA, 2016; FID, 2017).

México ocupa desde el 2015 ocupa el sexto lugar a nivel mundial de prevalencia de DM (Federación Mexicana de Diabetes A.C, 2018) y se estima que desde el año 2000 la DM representa la principal causa de muerte en mujeres y hombres entre los 35-65 años (Barquera, et al., 2013). Usualmente la DM se clasifica en tipo 1 (DM1) y 2 (DM2), y es esta última la más prevalente de ambos tipos (mayor a 85%) en la población a nivel mundial (Forouhi & Wareham, 2014). La DM1 es un trastorno autoinmune que se caracteriza por la pérdida de células β -pancreáticas debida a la presencia de auto anticuerpos que los dañan; lo cual causa una deficiencia absoluta de la insulina (ADA, 2016). Por su parte, los principales factores etiológicos de la DM2 son la resistencia periférica a la insulina y la pérdida

progresiva de la secreción de esta hormona (ADA, 2016). Ambos tipos de DM presentan complicaciones vasculares, una de estas es la retinopatía diabética. La retinopatía diabética afecta a 1 de cada 3 personas con DM y es la principal causa de pérdida de visión en adultos en etapa laboral (Lingam & Wong, 2013).

RETINOPATÍA DIABÉTICA

La retinopatía diabética se define como una alteración crónica de la microvasculatura de la zona ocular; el nivel de daño en un paciente está relacionando con el tiempo que ha vivido con DM y el control glucémico. Mantener normales los niveles de glucosa en sangre del paciente diabético reduce el riesgo de desarrollar la retinopatía (Hendrick, et al., 2015), pero no la elimina.

Las anomalías microvasculares que caracterizan a la retinopatía diabética dependen del tiempo y grado de severidad del padecimiento (Figura 1), éstas pueden generar reducción en la visión por presencia de microaneurismas, hemorragias internas, exudados duros y neovascularización, hasta generar ceguera por edema macular y/o desprendimiento de retina (Hendrick, et al., 2015).

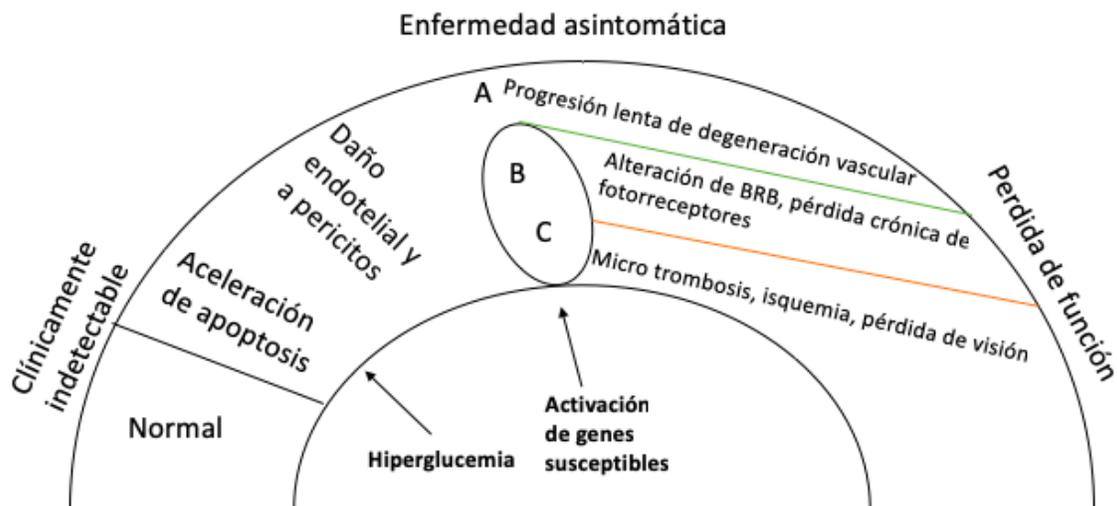


Figura 1. Progresión crónica de la retinopatía diabética. Modificado de (Cunha-Vaz, 2010). Los primeros cambios observados durante la retinopatía diabética son la aceleración de apoptosis de algunas células particularmente de pericitos, mientras la hiper glucemia permanece la enfermedad progresa llevando a la degeneración vascular, pérdida de fotorreceptores, isquemia hasta llevar a la pérdida de visión.

Los primeros cambios patológicos de la retinopatía diabética son las alteraciones de los pericitos y células endoteliales, anomalías de la barrera hemato-retineana (BRB) y formación de microaneurismas (Cunha-Vaz, 2010). La patología de la retinopatía diabética es consecuencia de la exposición constante de los tejidos a las altas concentraciones de glucosa (figura 2), que provocan cambios celulares como el incremento en la vía de los polioles, ocasionando una disminución de NADPH intracelular y disminución de los niveles de glutatión, alterando el estado redox de la célula (Archer, 1999); activación de la proteína cinasa C (PKC), estos cambios se relacionan con estrés oxidativo relacionado con un notable incremento en la permeabilidad vascular, aumento en el flujo sanguíneo y expresión anormal de factores de crecimiento (Archer, 1999); acumulación de productos de glicación avanzada (AGEs) (Lechner, et al., 2017) que altera la homeostasis celular.

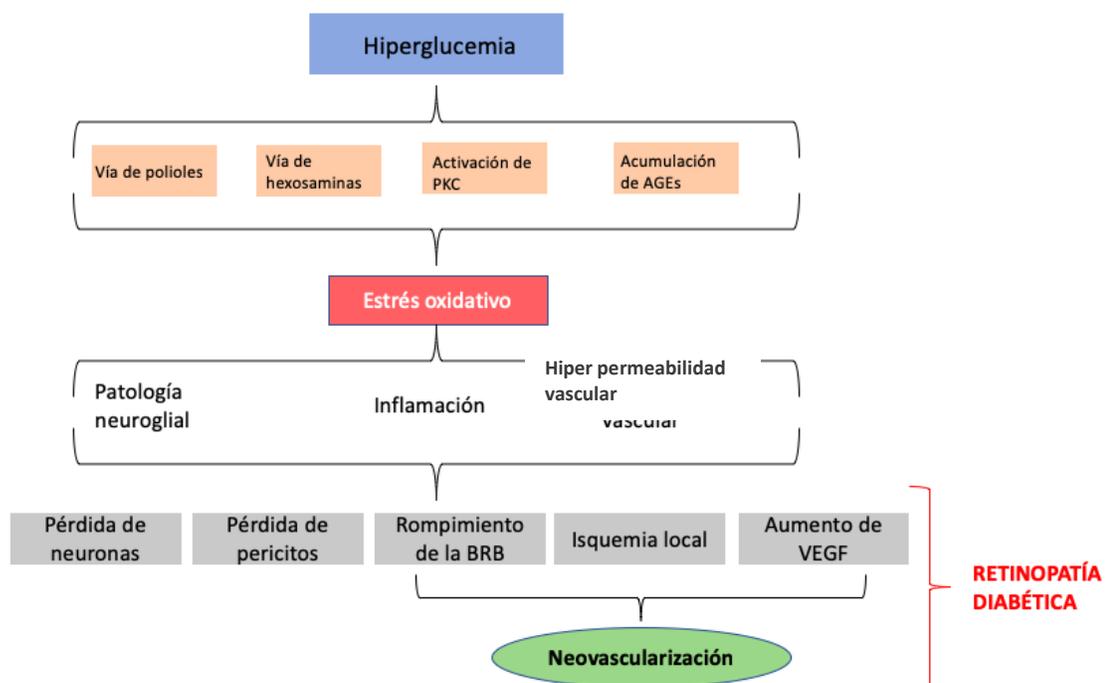


Figura 2. Vías involucradas en el desarrollo de la retinopatía diabética. Modificado de (Lechner, et al., 2017)

A pesar de que la retinopatía diabética es una patología microvascular los cambios vasculares en el ojo usualmente son detectables después de 10 o 15 años de DM, mientras que la pérdida del contraste y sensibilidad al color aparecen

aproximadamente 2 años después de la hiperglicemia en humanos, lo cual indica que la deficiencia visual aparece antes que los cambios vasculares (Aizu, et al., 2002).

ESTRUCTURA DE RETINA Y EPR

La retina es un tejido sensible a la luz, es la zona neural del ojo y forma parte del sistema nervioso central (Purves, et al., 2001). Existen 5 tipos neuronales en la retina: fotorreceptores, células bipolares, células ganglionares, células horizontales y células amacrinas (Figura 3) (Purves, et al., 2001) Los fotorreceptores convierten la energía de la luz en un potencial eléctrico, proceso conocido como fototransducción (Purves, et al., 2001). Las otras células forman distintos circuitos neuronales y se encuentran organizadas en diversas capas como se representa en la figura 3; la retina comprende también una capa de células epiteliales llamada epitelio pigmentario de la retina (EPR).

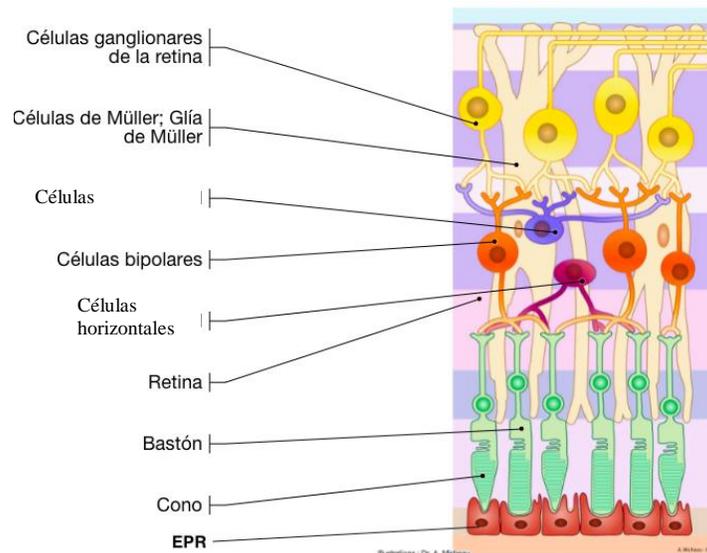


Figura 3. Estructura de la retina. Modificado de (IMAIOS, 2018).

El EPR es una monocapa de células pigmentadas cuya zona apical interactúa con los segmentos externos de los fotorreceptores y la zona basal con la coroides (Strauss, 2005). El EPR es esencial para la función visual y el mantenimiento de la homeostasis en la retina, además constituye la barrera hematorretineana externa que es esencial para el intercambio de nutrientes, iones y agua hacia la retina

(Figura 4) (Thebault, 2011). La pigmentación de este epitelio le permite absorber el exceso de luz que llega a la retina, disminuyendo la exposición de los fotorreceptores a intensidades altas de luz, y previniendo la formación de componentes tóxicos por foto oxidación, como la lipofuscina (Strauss, 2005).

El EPR también es indispensable en el ciclo visual, lleva a cabo la isomerización del pigmento *all-trans*-retinal a *11-cis*-retinal, al cual transporta de vuelta a los fotorreceptores (Figura 4), donde puede volver a unirse a la rodopsina y llevar a cabo la fototransducción (Strauss, 2005). Adicionalmente, el EPR participa en el proceso de renovación de los segmentos externos de los fotorreceptores, por medio de su fagocitosis, provocando la síntesis de nuevos discos.

El EPR secreta una variedad de factores de crecimiento que permiten el mantenimiento estructural del endotelio coriocapilar y de los fotorreceptores, tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento derivado de epitelio pigmentario (PEDF). El VEGF se secreta en bajas concentraciones y hacia la zona basolateral (Figura 4) donde previene la apoptosis de células endoteliales de los coriocapilares; en cambio, el PEDF se secreta hacia la zona apical (Figura 4) donde actúa como neuroprotector y factor anti-angiogénico (Murugeswari, et al., 2017). Los cambios en la secreción de éstos y otros factores de crecimiento se han relacionado a diversas patologías que afectan la visión, incluyendo la retinopatía diabética.

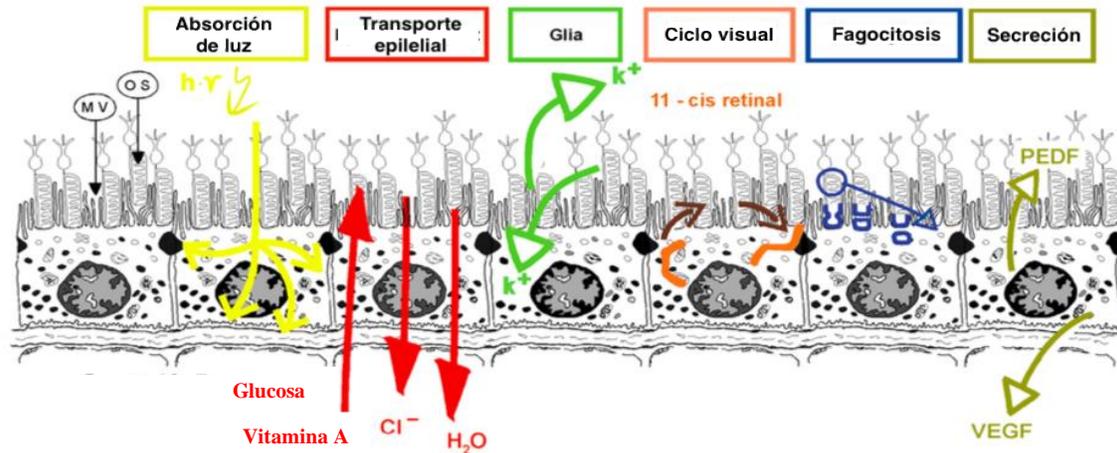


Figura 4. Funciones del epitelio pigmentario de la retina (EPR). Modificado de (Strauss, 2016). En el EPR lleva a cabo la secreción de PEDF hacia los fotorreceptores y VEGF hacia la coroides, la fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores, participa en el ciclo visual al isomerizar el pigmento *all-trans-retinal* a *11-cis-retinal*, intercambio iónico, metabolitos y agua, la absorción del exceso de luz para evitar daño a los fotorreceptores.

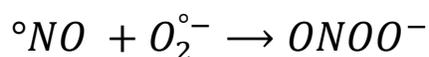
ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo es definido como un desbalance entre la producción de especies oxidantes, ya sean especies reactivas de oxígenos (ROS por sus siglas en ingles), especies reactivas de nitrógeno (RNS por sus siglas en ingles) y antioxidantes, el cual favorece un medio oxidativo que causa (Betteridge, 2000) daño celular.

Las ROS más abundantes son el anión superóxido (O_2^-), el radical hidroxilo ($\cdot OH$) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), los cuales se forman principalmente en la mitocondria como producto de su metabolismo celular (Birben, et al., 2012). En condiciones normales solo el 2-4% del oxígeno es convertido a ROS (Kassab & Piwovar, 2012), sin embargo esa producción de ROS incrementa en enfermedades crónicas como la DM (Busik, et al., 2008). Se ha relacionado la hiperglucemia con la excesiva producción de ROS (Giacco & Brownlee, 2010), que acompañada con una reducción de los sistemas antioxidantes provoca estrés oxidativo (Evans, et al., 2002).

Existen estudios, como el de Nishikawa, *et al.* (2000), donde al disminuir la fosforilación oxidativa o sobre expresar la superóxido dismutasa mitocondrial (SOD2) de células endoteliales aórticas en cultivo, se reducen tanto la producción de ROS como los cambios celulares consecuentes, demostrando que la disfunción mitocondrial como la que ocurre durante la hiperglucemia puede llevar a estrés oxidativo.

Las ROS no son las únicas especies reactivas que existen en la célula, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) también juegan un papel en el ambiente oxidativo de la célula y el daño celular que éste provoca. La principal RNS es el óxido nítrico (NO \cdot); se forma enzimáticamente por la óxido nítrico sintasa (NOS) (Ferrer-Sueta, *et al.*, 2018), la producción de NO se lleva a cabo por la conversión de L-Arginina a L-Citrulina (Boucher, *et al.*, 199). El óxido nítrico es importante para los sistemas biológicos, es un mensajero celular necesario para la vasodilatación, sin embargo al reaccionar con el radical superóxido se produce peroxinitrito (ONOO \cdot) (Formula 1), éste tiene una alta velocidad de reacción ($4-16 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) y, debido a la capacidad de difusión del NO \cdot , se puede predecir que cuando hay exceso de O $_2\cdot^-$ la formación de peroxinitrito es constante (Ferrer-Sueta, *et al.*, 2018).



Formula 1. Formación de peroxinitrito a partir de óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) y superóxido (O $_2\cdot^-$). Modificado de (Ferrer-Sueta, *et al.*, 2018)

El peroxinitrito tiene una alta capacidad oxidante (Beckman & Koppenol, 1996) y puede ser precursor de reacciones que contribuyen al ambiente oxidante (figura 5), por lo que la producción excesiva de RNS, que no puede ser contenida por los sistemas antioxidantes, lleva a un estrés oxidante (Radi, *et al.*, 2000).

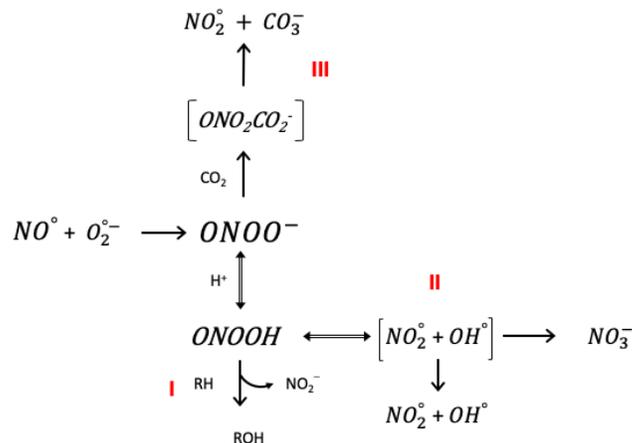


Figura 5. Vías de reacción del peroxinitrito. Las reacciones I a III indican los posibles destinos del peroxinitrito: (I) oxidación de substratos (RH) que deriva en producción de dióxido nítrico (NO_2^-) y en productos nitrados, (II) homólisis del ácido peroxinitruoso lleva a la producción de radicales libres, (III) formación de peroxocarboxilato-nitroso que rápidamente se descompone a radicales secundarios. Modificado de (Radi, et al., 2000).

El limitante principal de la formación de peroxinitrito es la degradación o inhibición de sus precursores (superóxido y óxido nítrico) (Ferrer-Sueta, et al., 2018). Los efectos del superóxido pueden ser disminuidos por compuestos como la quercetina, que es el flavonoide más abundante en la dieta humana (Gao, et al., 2018); asimismo análogos de L-Arginina actúan a modo de inhibidores generales de la óxido nítrico sintasa (NOS), como el N(ω)-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME), reducirían la producción de NO.

ESTRÉS OXIDATIVO EN EL EPR

El EPR y la retina presentan un metabolismo muy activo que puede generar altas cantidades de especies reactivas de oxígeno, sin embargo en condiciones patológicas puede ocurrir un aumento en la producción de especies reactivas y estrés oxidativo (Arnouk, et al., 2011). De hecho, se ha reportado el incremento de marcadores de estrés oxidativo en retinas de pacientes con retinopatía diabética (Goycheva, et al., 2006). Existe evidencia de que los altos niveles de glucosa en sangre alteran el metabolismo de las células del epitelio pigmentario de la retina (EPR) favoreciendo la apoptosis (Strauss, 2016) e incluso estudios de microscopía electrónica demostraron cambios estructurales de las mitocondrias en el EPR de

pacientes diabéticos y en modelos animales con largos periodos de hiperglucemia (Murugeswari, et al., 2017), dichos cambios se han relacionados con aumento en la producción de especies reactivas y el establecimiento de una condición de estrés oxidativo.

TÉCNICAS PARA MEDIR Y DETECTAR EL ESTRÉS OXIDATIVO

El ambiente oxidativo en la célula genera cambios en la estructura de las macromoléculas. La 8-oxo-Guanina (8-OH-G) es un compuesto derivado de la oxidación de los nucleótidos del DNA, que lleva a cambios en su estructura. El 8-OH-G puede ser cuantificado y usado para detectar el daño en el DNA causado por estrés oxidativo (Birben, et al., 2012). De igual manera, la oxidación de lípidos modifica el arreglo de la membrana lipídica, lo cual puede alterar la actividad de receptores y otras proteínas y alterar la permeabilidad membranal; esta oxidación produce malonaldehído (MDA), que es comúnmente usado como marcador de estrés oxidativo (Birben, et al., 2012).

Asimismo, las proteínas son un importante blanco para las ROS y los productos secundarios del estrés oxidativo (Dalle-Donne, et al., 2006) que pueden modificar su estructura y estabilidad y como consecuencia su función (Birben, et al., 2012). La oxidación de las proteínas se puede identificar como la unión de grupos carbonilo en sus residuos de aminoácidos, (Artemenko, et al., 2015) por lo que también se le llama carbonilación de proteínas, la cual ocurre rápidamente y es relativamente estable, por lo que puede usarse como indicador de estrés oxidativo.

Medir el estrés oxidativo por el nivel de carbonilos tiene como ventaja que la degradación de proteínas oxidadas se presenta en cuestión de horas o días, mientras que la degradación de productos de lipoperoxidación ocurre en minutos (Dalle-Donne, et al., 2003). La determinación de carbonilos se puede realizar por espectrofotometría, ELISA u oxyblot, sin embargo, el oxyblot es el método más recomendado para evaluar carbonilación en homogenados de tejidos (Dalle-Donne, et al., 2003).

DAÑO A PROTEÍNAS

Debido a las diversas funciones biológicas de las proteínas (estructurales y catalíticas), su oxidación representa un daño inmediato a las células (Dalle-Donne, et al., 2003), aunque en condiciones normales hay niveles basales de proteínas carboniladas, esos niveles se encuentran elevados en distintas enfermedades (Dalle-Donne, et al., 2003). Todos los residuos de los aminoácidos pueden ser oxidados (Zentella & Piña, 2008), pero aquellos con cadenas aromáticas son los más susceptibles (Tabla 1) (Berlett & Stadtman, 1997). La oxidación de las proteínas puede también ocurrir en el esqueleto de carbonos provocando un fraccionamiento de las proteínas (Berlett & Stadtman, 1997); debido a que los métodos de análisis de oxidación de proteínas evalúan los grupos carbonilos, no proporcionan información respecto al nivel de oxidación en el esqueleto de carbonos.

Aminoácidos más susceptibles a oxidación	
Aminoácidos	Productos de oxidación
Cisteína	Disulfidos
Metionina	Sulfoxido de metionina
Triptofano	2,4,5,6,7-hidroxitriptofano, 3-hidroxicinurina,
Fenilalanina	2,3-hidroxifenilalanina, 2,3-dihidroxifenilalanina
Tirosina	3,4-dihidroxifenilalanina, uniones tirosina-tirosina
Histidina	2-oxohistidina
Arginina	Semialdehido glutámico, asparagina
Lisina	α -aminoadipic semialdehido
Prolina	Semialdehido glutámico, 2-pirrolidona, 4,5-hidroxirolina
Treonina	Ácido 2-amino-3-ketobutírico

Tabla 1. Aminoácidos más susceptibles a oxidación. Obtenido de (Berlett & Stadtman, 1997).

Los carbonilos se pueden formar por la oxidación directa de los residuos de aminoácidos (Figura 6) o por una reacción de los residuos de aminoácidos con productos de peroxidación de ácidos grasos poli insaturados (Figura 7) y por reacciones con productos de la glicación (Figura 8) (Berlett & Stadtman, 1997).

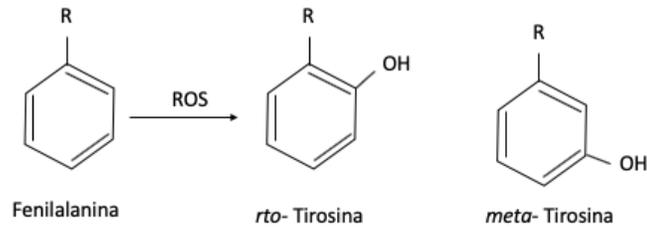


Figura 6. Oxidación de fenilalanina. Obtenido de (Naskalski & Bartosz, 2001).

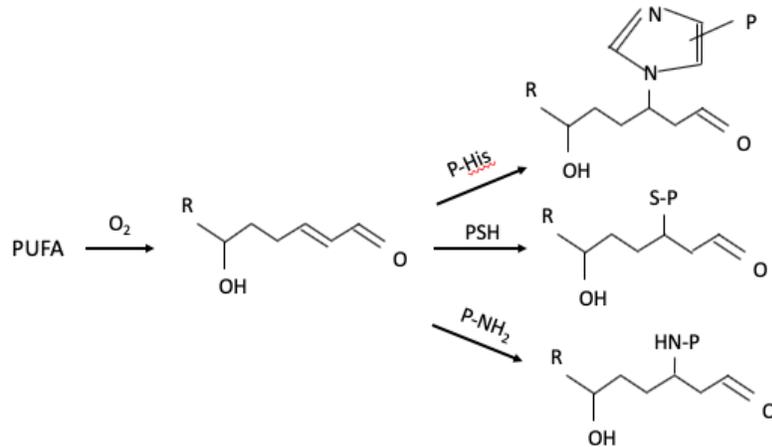


Figura 7. Reacción de productos de peroxidación de ácidos grasos poli insaturados (PUFA) con residuos de aminoácidos de lisina (P-NH₂), cisteína (PSH) e histidina (P-His). Modificado de (Berlett & Stadtman, 1997).

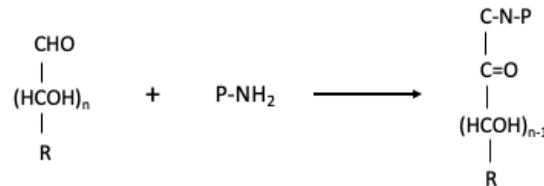


Figura 8. Reacción de un azúcar con residuos de aminoácidos de lisina (P-NH₂). Modificado de (Berlett & Stadtman, 1997)

Las proteínas también pueden oxidarse por RNS, su principal efecto en las proteínas es nitración de cisteínas y tirosinas (Radi, et al., 2000) lo cual además de modificar su estructura contribuye al ambiente oxidativo de la célula. La nitración de residuos de tirosina es uno de los efectos más conocidos del peroxinitrito (Naskalski & Bartosz, 2001), esto trae muchas consecuencias a la célula debido a que pueden inhibir la actividad de distintas enzimas y alterar la comunicación celular

(Radi, et al., 2001). Por ejemplo, la nitración de la tirosina 34 de la superóxido dismutasa de manganeso (SOD Mn) reduce su actividad (Ferrer-Sueta, et al., 2018), asimismo la nitración de tirosinas de los receptores de tirosina cinasa previene su fosforilación y por lo tanto afecta la señalización celular (Naskalski & Bartosz, 2001).

Como se ha mencionado previamente, la DM es una enfermedad metabólica que se ha convertido en un problema de salud pública en México y en el mundo. La exposición crónica de los tejidos a altas concentraciones de glucosa se ha establecido como la causa de las complicaciones de la DM, entre éstas se encuentra la retinopatía diabética. Numerosos trabajos han relacionado el estrés oxidante y nitrosativo con las complicaciones de la retinopatía diabética (Kowluru & Mishra, 2015) (Archer, 1999), sin embargo la mayoría de éstos estudios se realizaron en condiciones crónicas cuando ya se presentan las anormalidades vasculares y relativamente pocos trabajos consideran la participación del EPR en la regulación de la homeostasis retineana. Para contribuir al conocimiento del desarrollo de la retinopatía diabética en éste trabajo se analizó el posible ambiente oxidante a través de oxyblot en el EPR durante etapas tempranas de hiperglucemia y se evaluaron posibles tratamientos para disminuir el ambiente oxidante.

HIPÓTESIS

La hiperglucemia podría inducir estrés oxidativo en el EPR, que se reflejaría en el aumento a la oxidación de proteínas y que disminuiría con tratamientos de antioxidantes, inhibidores específicos y/o factores de supervivencia.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los cambios en la oxidación de proteínas del epitelio pigmentario de la retina durante etapas tempranas de hiperglucemia y el posible efecto protector del tratamiento con quercetina, L-NAME e insulina.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar mediante la técnica de carbonilación de proteínas si la exposición del EPR a tiempos cortos de hiperglucemia causa un estado de estrés oxidativo.
- Determinar el efecto de la quercetina en la carbonilación de proteínas.
- Determinar el efecto de la inhibición de la NOS en la carbonilación de proteínas.
- Identificar el efecto de la insulina en los niveles de carbonilación de proteínas.

MÉTODOS

MODELO ANIMAL

Ratas hembras adultas de la cepa Long-Evans se les indujo DM mediante una inyección intraperitoneal de estreptozotocina (stz) en buffer citrato pH 4.5 (98mg/kg) (Hernández-Ramírez, *et al.*, 2017). Como grupo control se utilizaron ratas de la misma edad a las que se les inyectó solo buffer citrato.

Los niveles de glucosa en sangre se determinaron con un glucómetro (Accu-chek active), considerando como hiperglucemia un valor mayor a 200 mg/dL de glucosa. Asimismo, se midió la hemoglobina glicada (HbA1c) con un analizador DCA Vantage de la marca SIEMENS.

TRATAMIENTOS

Se establecieron los siguientes grupos de animales:

- 1) controles (sin stz)
- 2) controles (sin stz) tratadas con L-NAME
- 3) controles (sin stz) tratadas con quercetina,(solubilizada en DMSO)
- 4) controles (sin stz) con 0.05%DMSO-salina
- 5) diabéticas (tratadas con Stz)
- 6) diabéticas tratadas con L-NAME
- 7) diabéticas tratadas con quercetina
- 8) diabéticas tratadas con insulina desde la inyección de stz
- 9) diabéticas tratadas con insulina a partir de 7 días posteriores a la inyección de stz

Los distintos tratamientos se muestran en la tabla 2. El L-NAME (sigma), en solución salina, se administró intraperitonealmente (ip) diariamente a una concentración de 50 mg/Kg, durante 7, 20 y 45 días. El tratamiento con quercetina se administró ip en una concentración de 10 mg/Kg durante 7, 20 y 45 días. La quercetina (sigma) se disolvió en 0.05% DMSO (sigma) - solución salina; las ratas

controles (normoglucemia) se les administró la misma concentración de DMSO - salina (Tabla 2). La insulina 0.2 U (Lilly, difusión prolongada) se administró (subcutáneamente) por 20 y 45 días; en otro grupo de animales la insulina se administró después de 7 días de inducida la DM y el tratamiento se continuó hasta 20 y 45 días de inducida la DM (tabla 2).

Grupos de ratas Long-Evans Tratamientos	Ratas 7 días hiperglucémica	Ratas 20 días hiperglucémica	Ratas 45 días hiperglucémica	Control
Sin tratamiento	+	+	+	+
L-Name	+	+	+	+
Quercetina	+	+	+	+
DMSO	-	-	-	+
Insulina desde la inducción de hiperglucemia	-	+	+	-
Insulina 7 días desde la inducción de hiperglucemia	-	+	+	-

Tabla 2. Tratamientos aplicados a las ratas Long- Evans hiperglucémicas y controles. (+) El tratamiento fue aplicado, (-) el tratamiento no fue aplicado.

EXTRACCIÓN DEL TEJIDO

Los animales se sacrificaron a 7, 20, 45 días después de la administración de STZ, se aislaron los ojos, a estos se les hizo un corte ecuatorial y de la parte posterior de la copa óptica se separó el complejo EPR- coroides, éste se homogenizó en buffer de (100ul/ tejido de una rata) (RIPA oxyblot 2x pH7.4, tritón X-100 2%, SDS al 10% 0.2%,PMSF 1nM, β -mercapto etanol 2%, anti proteolíticos 1 μ g/ml), se dejaron en agitación constante por 1 hora a 4°C, seguido de una centrifugación a 17000 g por

30 minutos. Se recuperó el sobrenadante, se tomaron 20 µl para cuantificación de proteínas, las muestras se etiquetaron y se guardaron en un REVCO a -70°C.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

La cuantificación de proteínas se realizó por el método de Bradford siguiendo las recomendaciones del fabricante.

DETERMINACIÓN DE CARBONILOS

La determinación de carbonilos (oxyblot) se llevó a cabo con un kit de detección de proteínas oxidadas (OxyBlot™ Protein Oxidation Detection Kit de Millipore). Durante la oxidación de proteínas los residuos de aminoácidos se unen a grupos carbonilo (Naskalski & Bartosz, 2001), los cuales reaccionan fácilmente con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (derivatización) formándose el 2,4-dinitrofenilhidrazona (DNP) (Figura 9). La DNP puede ser detectada por anticuerpos y por lo tanto ser usado como método de detección de la oxidación de proteínas.

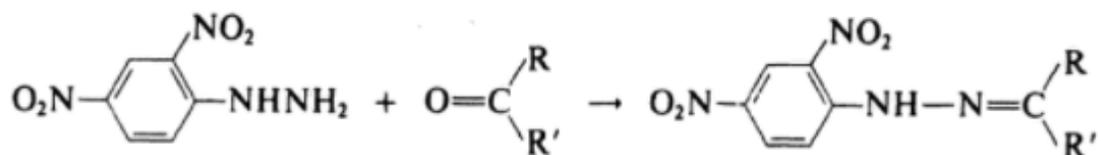


Figura 9. Reacción de 2,4-Dinitrofenilhidrazina con un grupo carbonilo. Obtenido de Pasto & Johnson, 2003

DERIVATIZACIÓN CON DNPH

Las muestras se descongelaron y se adicionó dodecil sulfato de sodio (SDS) al 12%, posteriormente se agregó DNPH en una solución neutralizada, se incubó 15 min a temperatura ambiente (de acuerdo con las instrucciones del comerciante), y posteriormente se agregaron 5 µl de azul de bromofenol (3%) que se utilizó como frente de corrimiento para la electroforesis.

Las muestras derivatizadas (tratadas con la DNPH) fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%; en cada gel se cargó

una muestra sin derivatizar como control negativo. Se realizó la transferencia a membranas de difloruro polivinildieno (PVDF), a 215 mA por 2 horas, las membranas fueron bloqueadas con albúmina 1% por 1 hora para evitar uniones inespecíficas, se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario anti DNP (dilución 1:250). Posteriormente se realizaron tres lavados con TBS-Tween (Tris 20 mM, NaCl 136mM, Tween-20 0.1% pH7.6) y se incubó con un anticuerpo secundario anti-Rabbit IgG acoplado a peroxidasa (dilución 1:3000) por 1 hora a temperatura ambiente. Se volvió a lavar tres veces con TBS-Tween y se reveló con un kit de quimioluminiscencia (Millipore). La densidad de las bandas se cuantificó con un software Alpha Ease FC.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los experimentos se realizaron por triplicado. Se realizaron pruebas de ANOVA de una vía y factorial utilizando el software GraphPad Prism 7, utilizando la prueba post hoc de Tukey, considerando una $p < 0.05$ como significancia estadística.

RESULTADOS

NIVELES DE GLUCOSA EN SANGRE

Los niveles de glucosa en sangre (mg/dL) aumentaron hasta tres veces después de la inyección de stz y no disminuyeron por la administración de L-NAME o quercetina. (Tabla 3). Por otra parte, el tratamiento de insulina causó una disminución parcial de los niveles de glucosa en sangre, aunque ésta no fue estadísticamente significativa (Tabla 3).

Tratamientos	7d	20d	45d
<i>Control</i>		136 ± 10	
<i>Stz</i>	406 ± 42*	459 ± 38*	453 ± 40*
<i>Stz + L-NAME</i>	463 ± 32*	470 ± 36*	466 ± 35*
<i>Stz + Q</i>	447 ± 10*	454 ± 42*	452 ± 54*
<i>Stz + ins1</i>		390 ± 33*	430 ± 11*
<i>Stz + ins7</i>		365 ± 21 *	354 ± 48*

Tabla 3. Valores concentración glucosa en sangre en ratas controles y diabéticas. Los controles sin stz se inyectaron con buffer citrato pH 4.5. STZ+ L-NAME, diabéticas tratadas con L-NAME; STZ+Q, diabética tratada con quercetina; ins1, administración de insulina al tiempo de inducción de DM; ins 7, administración de insulina 7 días después de la inyección con stz. n=4. * P > 0.05 respecto al control.

NIVELES DE HEMOGLOBINA GLICADA (HbA1c)

Los niveles de hemoglobina glicada aumentaron considerablemente desde los 20 días posteriores a la administración de stz (tabla 4), presentándose a los 45 días de hiperglicemia valores tres veces más altos que el control. Los altos niveles de HbA1c no disminuyeron con los tratamientos de L-NAME o quercetina. Los tratamientos con insulina causaron una ligera disminución de HbA1c pero no llegan a los niveles del control (tabla 4).

Tratamientos	Promedio % HbA1c
<i>Control</i>	3.7
<i>7d</i>	4.6
<i>7d L-NAME</i>	5.6
<i>20d</i>	9.1
<i>20d L-NAME</i>	8.8
<i>45d</i>	11.9
<i>45d L-NAME</i>	11.5
<i>45d quercetina</i>	12.8
<i>20d ins1</i>	6.7
<i>45d ins1</i>	11.5
<i>20d ins7</i>	7.5
<i>45d ins7</i>	9.7

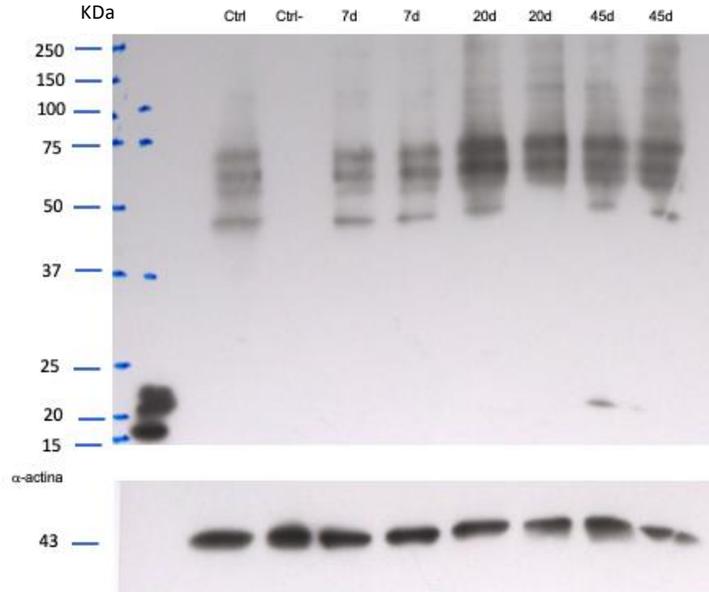
Tabla 4. Niveles de hemoglobina glicosilada en las ratas controles e hiperglicémicas. n=3

OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS EN EL EPR DE RATAS CONTROLES Y DIABÉTICAS

La carbonilación de las proteínas totales del EPR se analizó como un parámetro de alteración del equilibrio oxido-reducción. En la figura 10 se muestra la oxidación de proteínas en el EPR de ratas normales e hiperglucémicas; en el EPR de ratas control se observaron niveles relativamente altos de proteínas oxidadas. Los niveles de proteínas oxidadas no se modificaron a los 7 días de hiperglucemia, pero aumentaron casi al doble a los 20 y 45 días de hiperglucemia con respecto al control.

En algunos geles se observaban bandas de todos los pesos moleculares pero en otros no se observan bandas en pesos moleculares bajos o altos, por lo tanto se seleccionó para el análisis las bandas que siempre fueron constantes, que son las que se encuentran entre el peso molecular de 75-37 KDa .

A



B

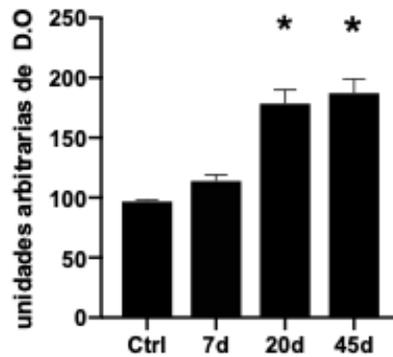


Figura 10. Niveles de oxidación de proteínas en el EPR de ratas controles y diabéticas. **A** oxyblot representativo. **B** cuantificación de las proteínas oxidadas. Ratas controles con normoglicemia (ctrl), control negativo (Ctrl-), ratas con 7, 20 y 45 días hiperglicemia (7d, 20d y 45d). * $p < 0.05$ significativo respecto a control, $n=4$, prueba posthoc Tukey.

EFFECTO DEL L-NAME Y QUERCETINA EN LA OXIDACIÓN DE LAS PROTEÍNAS

Con el fin de evaluar el posible efecto protector de antioxidantes y de inhibidores de NOS en las etapas tempranas de hiperglicemia, se utilizaron tratamientos de quercetina y L-NAME, además de manera indirecta nos puede dar un indicio sobre

si la oxidación de proteínas ocurre principalmente por ROS o RNS a tiempos cortos de hiperglucemia.

El tratamiento con L-NAME no produjo cambios en los niveles de oxidación de proteínas, tanto en el EPR de ratas control como a distintos tiempos de hiperglucemia (figura 11). Asimismo, el tratamiento con quercetina tampoco tuvo efecto en la oxidación de proteínas, tanto en los animales control como los diabéticos (figura 12).

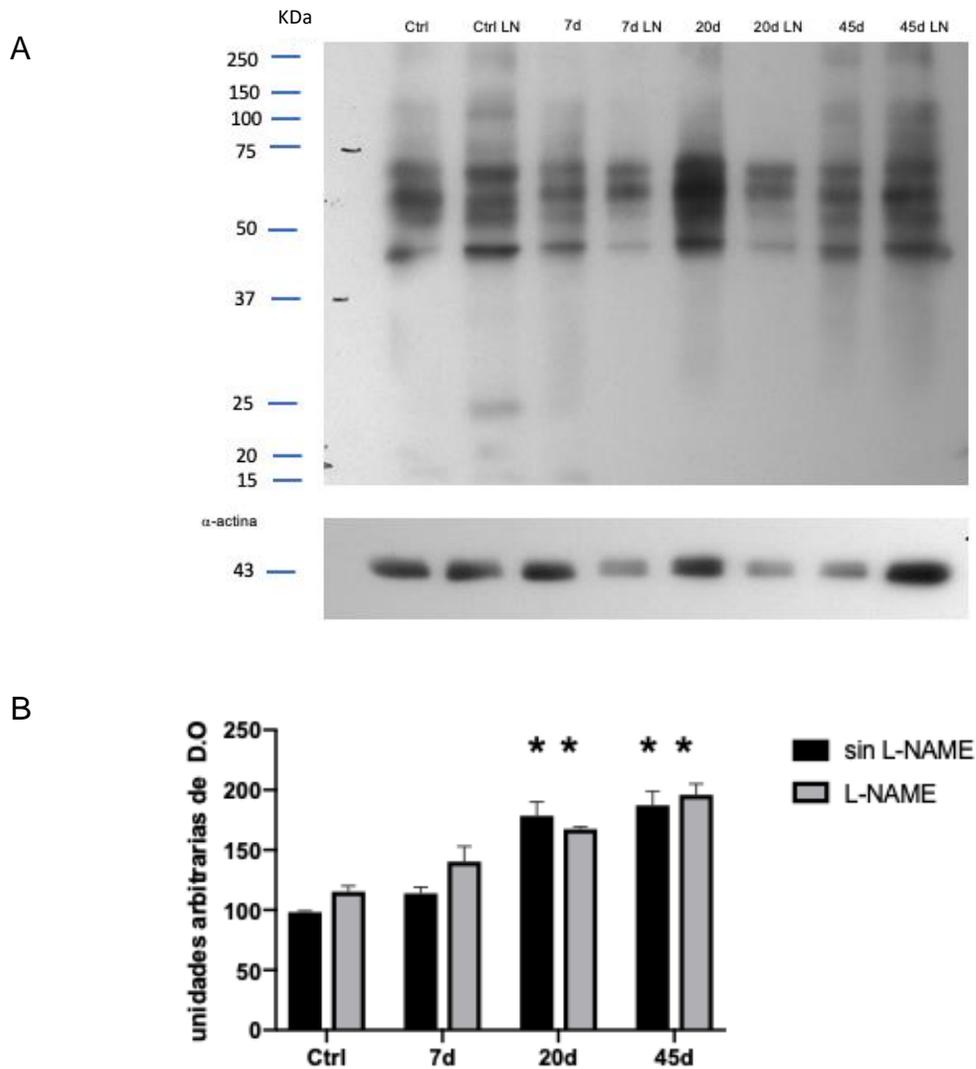
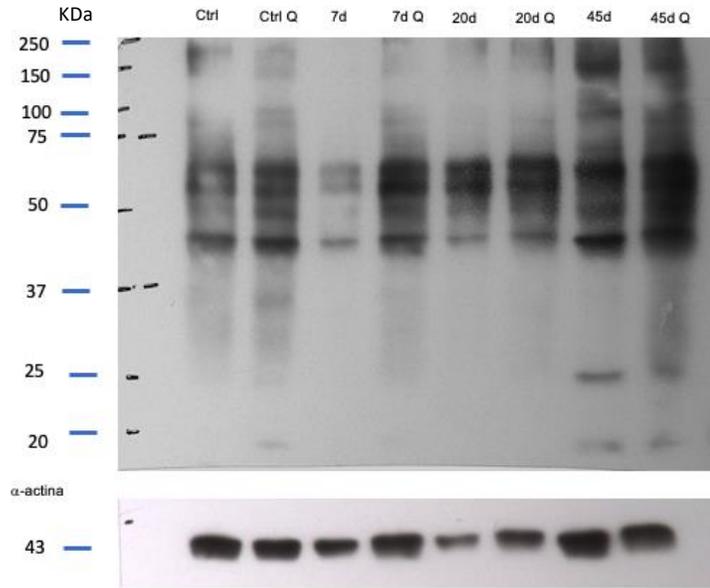


Figura 11. Niveles de oxidación de proteínas en el EPR de ratas controles, diabéticas y tratadas con L-NAME. **A** oxyblot representativo. **B** cuantificación de las proteínas oxidadas. Ratas controles con normoglucemia (ctrl), ratas con 7, 20 y 45 días hiperglicemia (7d, 20d y 45d), tratamiento con L-NAME (L-N). * $p < 0.05$ significativo respecto a control, $n=4$, interacción = 0.020, prueba posthoc Tukey.

A



B

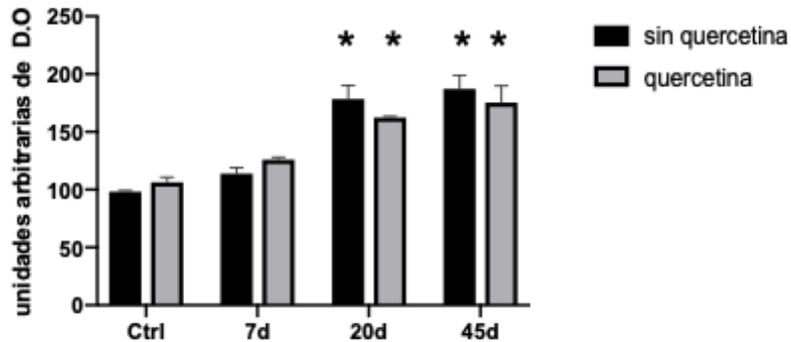
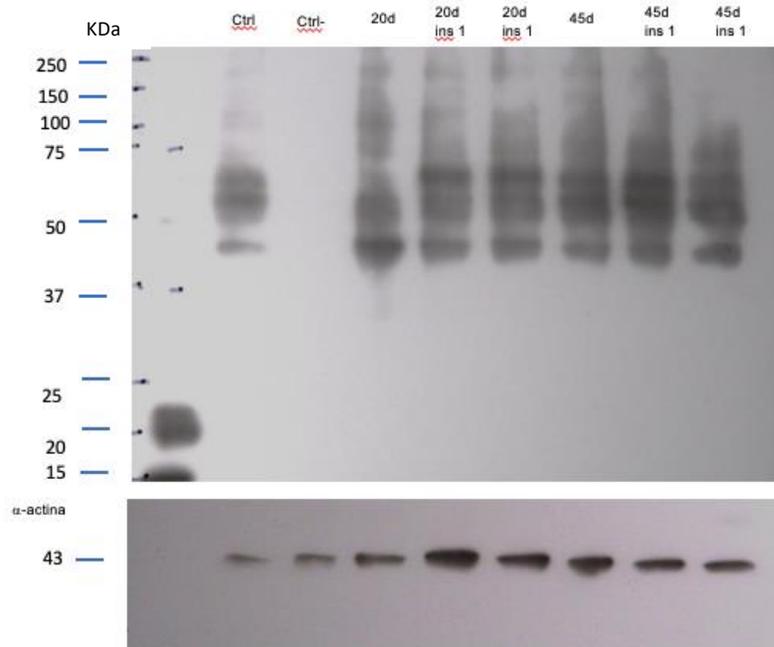


Figura 12. Niveles de oxidación de proteínas en el EPR de ratas controles, diabéticas y tratadas con quercetina. **A** oxyblot representativo. **B** cuantificación de las proteínas oxidadas. Ratas controles con normoglicemia (ctrl), ratas con 7, 20 y 45 días hiperglicemia (7d, 20d y 45d), tratamientos con quercetina (Q). * $p < 0.05$ significativo respecto a control, $n=4$, interacción = 0.26 prueba posthoc Tukey.

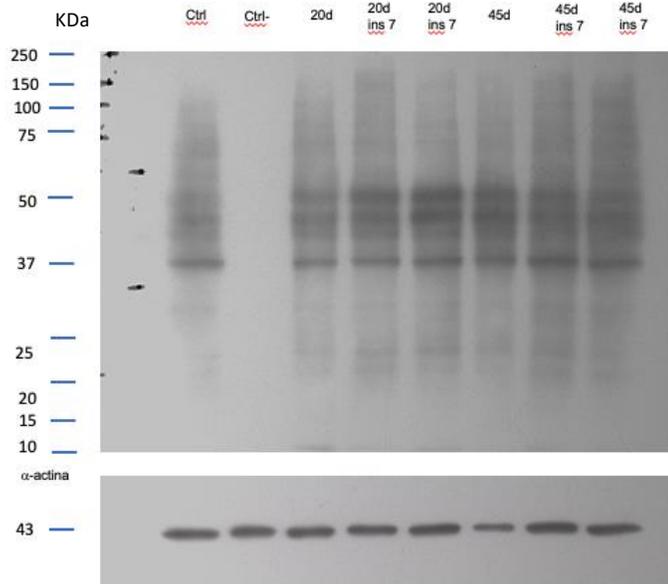
EFFECTO DE LA INSULINA EN LA OXIDACIÓN DE PROTEÍNAS

Para evaluar el posible efecto de la insulina en la oxidación de proteínas se estudiaron dos condiciones, la administración de insulina desde la inyección de stz (ins1) o 7 días posteriores a ésta (ins7). Ninguna de las dos condiciones presentó un efecto significativo en los niveles de proteínas oxidadas (figura 13).

A



B



C

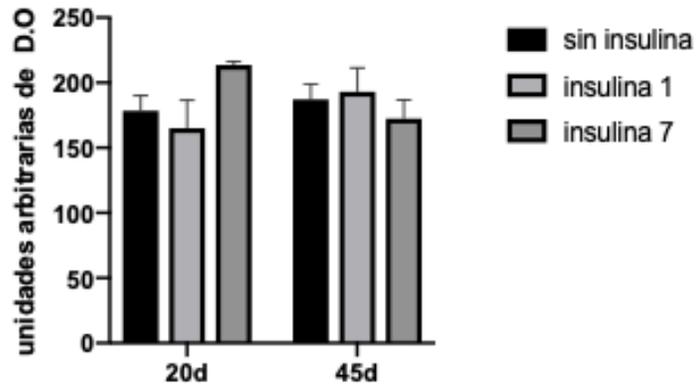


Figura 13. Niveles de oxidación de proteínas en el EPR de ratas controles, diabéticas y tratadas con insulina. **A** oxyblot representativo ins 1. **B** Oxyblot representativo ins 7. **C** cuantificación de las proteínas oxidadas. Ratas con 20 y 45 días hiperglicemia (20d y 45d), tratamientos con insulina desde la inducción de DM (ins1), tratamiento de insulina 7 días de DM (ins7), n=4, interacción = 0.08, prueba posthoc Tukey.

DISCUSIÓN

Como se mencionó en la introducción, un incremento en la oxidación de proteínas significa un posible daño derivado del desequilibrio redox. La carbonilación de proteínas es uno de los efectos más estables causados por un ambiente oxidante y, de acuerdo a numerosos estudios, a largo plazo son causantes de disfunción de las células y tejidos (Archer, 1999). Aunque en condiciones normales la producción de ROS/RNS es baja y regulada por los distintos sistemas antioxidantes, en condiciones patológicas el daño oxidativo depende del tipo celular y de la cantidad de especies reactivas, la duración del estresor, así como de la velocidad de síntesis y degradación de cada proteína (Konigsberg Fainstein, 2008). En el plasma, los niveles basales de carbonilación de proteínas están alrededor de 2mmol/g de proteína; en condiciones altamente oxidantes estos niveles pueden aumentar hasta 3 veces, lo que corresponde a un sitio carbonilado por cada 4,000 residuos de amino ácidos (Petrov & Zagrovic, 2011).

Durante la hiperglucemia se ha reportado un incremento en la producción de ROS en diversos tejidos incluyendo la retina de animales a tiempos largos de DM (Kowluru & Mishra, 2015). En el EPR se demostró por microscopía electrónica que en animales con 1 mes de hiperglucemia existen alteraciones en su estructura (Aizu, et al., 2002); además, se observó que la hiperglucemia induce disfunción mitocondrial y apoptosis (Chen, et al., 2016).

En esta investigación se estudió la oxidación de las proteínas como un índice de la incidencia de estrés oxidativo en el EPR de animales diabéticos y si dicho estrés puede ser reducido con el tratamiento de antioxidantes.

La aplicación de stz, como se ha demostrado en otros estudios (Ramos Rodriguez & Mendez, 1994) provocó una disminución en la ganancia de peso y desde las primeras 24h un aumento en la concentración de glucosa en sangre que se mantuvo superior a 250 mg/dL, lo cual indica el establecimiento del modelo de

DM. Además, los niveles de hemoglobina glicada se incrementaron considerablemente de manera continua a la progresión de la hiperglucemia. El tratamiento con el L-NAME o quercetina no tuvieron efecto en la concentración de glucosa en sangre o de hemoglobina glicosilada, lo cual era esperado ya que no hay reportes de que alguna de esas sustancias tenga efectos anti hiperglucémicos.

El EPR de ratas control presentó niveles relativamente altos de proteínas oxidadas, lo que puede deberse a su actividad fagocítica e isomerización del *all-trans-retinal*, reacciones que producen altas cantidades de ROS y NO[•] (Zhu, et al., 2016); la producción de estas ROS se ha propuesto pueden ser reguladas por una carboxilación reductora presente en el EPR (Du, et al., 2016).

A tiempos cortos de hiperglucemia (20-45 días) se observó aumento considerable (2 veces) en la carbonilación de proteínas. Es interesante el hecho de que, aunque los niveles de glucosa en plasma fueron significativamente elevados desde los 7 días de la administración de stz, las proteínas mantuvieron niveles de carbonilación similares a los controles. Estos resultados sugieren una gran capacidad antioxidante de las células del EPR, comparada con la de la retina, en la que se observó en condiciones similares un incremento en las proteínas oxidadas a partir de los 7 días de hiperglucemia (Hernandez Ramirez, et al., 2017).

Estos resultados sugieren que alteraciones en el EPR durante la DM son derivadas del estrés oxidativo crónico. Estas alteraciones pudieran llevar a la disrupción de la barrera hemato-retineana, como se ha observado en la pérdida de funciones de barrera en monocapas de células intestinales humanas asociado la carbonilación de actina (Dalle-Donne, et al., 2006).

El incremento en la carbonilación de proteínas no se modificó con el tratamiento de quercetina o L-NAME, además la interacción de los factores no es significativa. Estos resultados disienten con reportes donde el L-NAME tiene un efecto en la producción de NO[•], por ejemplo la administración de L-NAME a ratones

con DM inducida por stz disminuyó la actividad de la iNOS previniendo el daño en células endoteliales aórticas (Kopinova, et al., 2012); de igual forma se demostró un incremento en la producción NO \cdot y de la carbonilación de proteínas en la retina de ratas diabéticas, la cual se disminuyó con el tratamiento de L-NAME (Hernandez Ramirez, et al., 2017).

En el caso de la quercetina, ésta presenta un efecto antiinflamatorio y antioxidante en distintos tejidos, incluyendo células del EPR en cultivo (Cao, et al., 2010); este efecto se ha relacionado con la activación de Nrf2 en células endoteliales aórticas (Li, et al., 2016). Sin embargo, éste no es el único caso donde se ha detectado la incapacidad de la quercetina de mitigar efectos causados por ROS; la administración de quercetina no mitigó las lesiones en el EPR de ratas con AMD (Age-related Macular Degeneration) (Cao, et al., 2010). Es posible que la dosis de quercetina empleada no es suficiente para contrarrestar la oxidación o bien que se asocie a otros factores, como en el caso de la superóxido dismutasa que puede ser inhibida con la nitración de su tirosina 34 (Demicheli, et al., 2014); de cualquier forma es necesario evaluar la síntesis de enzimas antioxidantes y su actividad en el EPR, para demostrar un estrés oxidante.

En cuanto al L-NAME, éste podría afectar la presión arterial, que se conoce incrementa las complicaciones de la DM y la retinopatía (Kopinova, et al., 2012) (Pinto, et al., 2009). Debido a que se usó un modelo de DM tipo I, la falta de insulina podría y su vía de señalización podrían afectar las funciones del EPR, ya que la insulina además de ejercer una regulación metabólica también actúa como factor de crecimiento a través de la activación de la vía de MAPK incrementando la síntesis de proteínas (Bedinger & Adams, 2015); además se sabe que el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-1) (que comparte altas similitudes con la vía de señalización de la insulina) promueve la supervivencia de células EPR en un modelo de AMD (Zheng, et al., 2016).

Los tratamientos con insulina causaron una ligera disminución en la concentración de glucosa en sangre (tabla 3) y de hemoglobina glicada (figura 11),

la interacción también resultó no significativa, lo que sugiere que se requieren de mayores dosis para controlar la hiperglucemia.

De manera interesante a pesar de la disminución de la concentración de glucosa en sangre, la oxidación de proteínas no se vio afectada por los tratamientos con insulina, lo que apoya el hecho de que la hiperglucemia es causante de dicha oxidación. En otros estudios la administración de insulina una vez al día no redujo el estrés oxidativo en células de tejido renal (Ryong Koo & Vaziri, 2003). Probablemente tener un tratamiento de insulina más constante (más de una vez al día) se podría mantener en normoglucemia a los animales si habría reducido la oxidación de proteínas.

Los resultados obtenidos confirman parcialmente la hipótesis planteada, pues si se observó un incremento en la cantidad de proteínas carboniladas en condiciones de hiperglucemia a corto plazo, pero los tratamientos para amortiguar los ROS/RNS (quercetina y L-NAME) y la activación de señales de supervivencia (insulina) no tuvieron efecto en disminuir el ambiente oxidativo. Con estos resultados no podemos definir que tipo de especies reactivas están ocasionando la oxidación de proteínas durante la DM. Por lo que sería relevante determinar que tipo de especies reactivas están produciéndose, así como analizar otros marcadores de estrés oxidativo, como pueden ser la determinación actividad de enzimas antioxidantes y niveles de glutatión, y así poder proponer tratamientos que puedan ser efectivos.

CONCLUSIÓN

Utilizando un modelo experimental de diabetes se evaluaron los cambios en la oxidación de proteínas en el EPR. Coincidiendo con lo que se ha reportado en otros tejidos, en el EPR la hiperglucemia contribuye a un estado celular oxidante, que se observa por un incremento en la oxidación de proteínas (oxyblot) a los 20 y 45 días de hiperglucemia, sin embargo los tratamientos no tuvieron efecto en los niveles de oxidación, por lo tanto la hipótesis se cumple parcialmente. Este trabajo contribuye al conocimiento del desarrollo de complicaciones de la DM como la retinopatía diabética, particularmente en las etapas tempranas.

REFERENCIAS

ADA, 2016. Standards of Medical Care in DM. *The Journal of Clinical and Applied Research and Education*, 39(1), pp. 13-23.

Aizu, Y., Oyanagi, K., Hu, J. & Nakagawa, H., 2002. Degeneration of retinal neuronal processes and pigment epithelium in the early stage of the streptozotocin-diabetic rats. *Neuropathology*, Volume 22, pp. 161-170.

Archer, D. B., 1999. *Diabetic retinopathy: some cellular, molecular and therapeutic considerations*. s.l., Eye.

Arnouk, H. et al., 2011. Early biosignature of oxidative stress in the retinal pigment epithelium. *Journal of Proteomics*, 2(1), pp. 254-261.

Artemenko, K., Mi, J. & Bergquist, J., 2015. Mass-spectrometry-based characterization of oxidation in proteins. *Free Radical Research*, 49(5), pp. 477-493.

Barquera, S. et al., 2013. DM in Mexico: cost and management of DM and its complications and challenges for health policy. *Globalization and health*, 9(3), pp. 1-7.

Beckman, J. & Koppenol, W., 1996. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and the ugly. *American Journal of Physiology*, 271(5), pp. C1424-C1437.

Bedinger, D. & Adams, S., 2015. Metabolic, anabolic and mitogenic insulin responses: A tissue-specific perspective for insulin receptor activators. *Molecular and Cellular Endocrinology*, pp. 143-156.

Berlett, B. S. & Stadtman, E. R., 1997. Protein oxidation in aging disease, and oxidative stress. *The journal of biological chemistry*, 272(33), pp. 20313-20316.

Betteridge, D., 2000. What is oxidative stress?. *Metabolism*, Volume 49, pp. 3-8.

Birben, E. et al., 2012. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *World Allergy Organization Journal*, 5(1), pp. 9-19.

Busik, J. V., Mohr, S. & Grant, M. B., 2008. Hyperglycemia-induced reactive oxygen species toxicity to endothelial cells is dependent on paracrine mediators. *DM*, Volume 57, pp. 1952-1964.

Cao, X. et al., 2010. The effects of quercetin in cultured human RPE cells under oxidative stress and in Ccl2/Cx3xr1 double deficient mice. *Experimental eye reaserch*, 91(1), pp. 15-25.

Chen, M. et al., 2016. High glucose induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in human retinal pigmet epithelium cells via promoting SOCS1 and Fas/FasL. *Cytocina*, Volume 78, pp. 94-102.

Cunha-Vaz, J., 2010. An Integrated Perspective on Diabetic Retinopathy in Type 2 DM. In: J. Cunha-Vaz, ed. *Diabetic Retinopathy*. London: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd, pp. 279-312.

Dalle-Donne, I. et al., 2006. Protein carbonylation, cellular dysfunction, and disease progression. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 10(2), pp. 389-406.

Dalle-Donne, I. et al., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta*, 329(1-2), pp. 23-38.

Demicheli, V. et al., 2014. Mechanism of the Reaction of Peroxynitrite with Mn-Superoxide Dismutase: Nitration of Critical Tyrosine-34. *Free Radical Biology and Medicine*, pp. 138-139.

Du, J. et al., 2016. Reductive carboxylation is a major metabolic pathway in the retinal pigment epithelium. *PNAS*, 113(51), pp. 10-15.

Evans, J., Goldfine, I. D., Maddux, B. A. & Grodsky, G. M., 2002. Oxidative stress and stress-activated signaling pathways: A unifying hypothesis of type 2 DM. *Endocrine society*, 23(5), pp. 599-622.

Fedorova, M., Bollineni, R. C. & Hoffmann, R., 2013. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(2), pp. 79-97.

Ferrer-Sueta, G. et al., 2018. Biochemistry of Peroxynitrite and Protein Tyrosine Nitration. *Chemical Reviews*, Volume 118, pp. 1338-1408.

FID, 2017. *DM Atlas de la FID*, s.l.: International DM Federation.

Forouhi, N. G. & Wareham, N. J., 2014. Epidemiology of DM. *Medicine*, 42(12), pp. 698-702.

Gao, W. et al., 2018. Glutathione homeostasis is significantly altered by quercetin via the Keap1/Nrf2 and MAPK signaling pathways in rats. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 62(1), pp. 56-62.

Giacco, F. & Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circulation Research*, 107(9), pp. 1058-1070.

Goycheva, P., Gadjeva, V. & Popov, B., 2006. Oxidative stress and its complications in DM mellitus. *Trakia Journal of Science*, 4(1), pp. 1-8.

Hendrick, A. M., Gibson, M. V. & Kulshreshtha, A., 2015. Diabetic Retinopathy. *Primary Care: Clinics in Office Practice*, 42(3), pp. 451-464.

Hernandez Ramirez, E., Sanchez Chavez, G., Estrella Salazar, L. & Salceda, R., 2017. Nitrosative stress in the rat retina at the onset of streptozotocin-induced DM. *Cell Physiology Biochemistry*, pp. 2353-2363.

IMAIOS, 2018. *e-Anatomy*. [Online]
Available at: <https://www.imaios.com/en/e-Anatomy/Head-and-Neck/Eye-Illustrations>
[Accessed 1 Junio 2018].

Kassab, A. & Piwowar, A., 2012. Cell oxidant stress delivery and cell dysfunction onset in type 2 DM. *Biochimie*, Volume 94, pp. 1837-1848.

Konigsberg Fainstein, M., 2008. *Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. primera edición ed. Ciudad de México: El Manual Moderno.

Kopincova, J., Puzserova, A. & Bernatova, I., 2012. L-NAME on the cardiovascular system-nitric oxide synthase activator?. *Pharmacological Reports*, Volume 64, pp. 511-520.

Kowluru, R. & Mishra, M., 2015. Oxidative stress, mitochondrial damage and diabetic retinopathy. *Biochimica et Biophysica Acta*, Volume 1852, pp. 2474-2483.

Kumar, B. et al., 2014. Retinal neuroprotective effects of quercetin in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental eye reaserch*, Volume 125, pp. 193-202.

Lechner, J., O'Leary, O. E. & Stitt, A. W., 2017. The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Research*, Volume 139, pp. 7-14.

Li, C., Zhang, W.-J. & Frei, B., 2016. Quercetin inhibits LPS-induced adhesion molecule expression and oxidant production in human aortic endothelial cells by p-38 Nrf2 activation and antioxidant enzyme induction. *Redox Biology*, pp. 104-113.

Lingam, G. & Wong, T. Y., 2013. Systemic Medical Management of Diabetic Retinopathy. *Diabetic Retinopathy Update*, 20(4), pp. 301-306.

Murugeswari, P., Subramani, M., Shetty, R. & Das, D., 2017. Retinal pigment epithelium-secretome: A diabetic retinopathy perspective. *Cytokine*, Volume 95, pp. 126-135.

Naskalski, J. W. & Bartosz, G., 2001. Oxidative modifications of protein structures. In: H. E. Spiegel, ed. *Advances in clinical chemistry*. San Diego, California: Academic Press, pp. 161-224.

Nishikawa, T. et al., 2000. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature*, Volume 404, pp. 787-790.

Petrov, D. & Zagrovic, B., 2011. Microscopic Analysis of Protein Oxidative Damage: Effect of Carbonylation on Structure, Dynamics and Aggregability of Villin Headpiece. *Journal of the American Chemical Society*, 133(18), pp. 7016-7024.

Pinto, C. et al., 2009. Arterial hypertension exacerbates oxidative stress in early diabetic retinopathy. *Free Radical Research*, pp. 1151-1158.

Purves, D., Augustine, G. & Fitzpatrick, D., 2001. Chapter 11 Vision: The Eye. In: D. Purves, et al. eds. *Neuroscience*. Sunderland: Sinauer Associates, pp. 259-281.

- Radi, R. et al., 2001. Unraveling Peroxynitrite Formation in Biological Systems. *Free Radical Biology & Medicine* , pp. 463-488.
- Radi, R. et al., 2000. Unraveling peroxynitrite formation in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, 30(2), pp. 463-488.
- Ramos Rodriguez, H. G. & Mendez, J. D., 1994. DM Mellitus Experimental. *Ciencia Veterinaria*, Volume 6, pp. 347-377.
- Ryong Koo, J. & Vaziri, N., 2003. Effects of DM, insulin and antioxidants on NO synthase abundance and NO interaction with reactive oxygen species. *Kidney International*, pp. 195-201.
- Salceda, R., Hernández-Espinosa, C. & Sánchez-Chávez, G., 2008. L-Arginine uptake in normal and diabetic rat retinal pigment epithelium. *Neurochemical Research*, Volume 33, pp. 1541-1545.
- Strauss, O., 2005. The Retinal Pigment Epithelium in Visual Function. *Physiological Review*, Volume 85, pp. 845-881.
- Strauss, O., 2016. Pharmacology of the retinal pigment epithelium, the interface between retina and body system. *European Journal of Pharmacology*, 787(15), pp. 84-93.
- Thebault, S., 2011. El epitelio pigmentario retineano como componenete de la barrera hemato-retinenana: implicación en la retinopatía diabética. *Revista Digital Universitaria*, 12(3), pp. 3-17.
- Whiting, D. et al., 2014. Global estimates of DM prevalence for 2013 and projections for 2035. *DM Research and Clinical Practice*, pp. 137-149.
- Zheng, W. et al., 2016. IGF-1-Mediated Survival from Induced Death of Human Primary Cultured Retinal Pigment Epithelial Cells Is Mediated by an AKT-Dependent Signaling Pathway. *Molecular Neurobiology*, pp. 1915-1927.
- Zhu, X. et al., 2016. Induction of oxidative and nitrosative stresses in human retinal pigment epithelial cells by all-trans-retinal. *Experimental Cell Research*, Volume 348, pp. 87-94.