



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

POSIBLES ALTERACIONES EN LOS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL
NRF2, POR ALTAS CONCENTRACIONES DE GLUCOSA, EN LAS CÉLULAS
GLIALES DE MÜLLER DE LA RETINA

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biólogo. JESÚS SILVESTRE ALBERT GARAY

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM

COMITÉ TUTOR

DRA. SELVA LUCIA RIVAS ARANCIBIA
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, 02 de mayo del 2023



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.

Reconocimientos.

Esta tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Rocío Salceda Sacanelles, en el laboratorio AL-102 del departamento de Neurodesarrollo y Fisiología del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

El jurado del examen estuvo constituido por:

Presidente – Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal
Vocal – Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno
Vocal – Dra. Stephanie Colette Thebault
Vocal – Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores
Secretario – Dr. Rolando Efraín Hernández Muñoz

El comité tutorial que asesoró el desarrollo de este trabajo estuvo conformado por:

Dra. Rocío Salceda Sacanelles	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dra. Selva Lucia Rivas Arancibia	Facultad de Medicina, UNAM
Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores	Facultad de Medicina, UNAM

Agradezco al Dr. Juan Rafael Riesgo Escovar por su colaboración en la realización y publicación de esta investigación.

Agradezco a los miembros de mi comité tutorial por sus aportaciones académicas y seguimiento durante la realización de este trabajo. A los miembros del jurado del examen profesional por su revisión y comentarios realizados al manuscrito de tesis.

Agradezco al Biol. Gustavo Sánchez Chávez y al Dr. Juan Manuel Murillo Maldonado por su colaboración y asistencia técnica y académica para la realización del presente trabajo. Dra. Arlet del Carmen Loza Huerta del Laboratorio Nacional de Canelopatías (Instituto de Fisiología Celular, UNAM) por su asistencia técnica y apoyo computacional. M.C. Adriana González Gallardo de la Unidad de Proteogenómica (Instituto de Neurobiología, UNAM) por su asistencia técnica en el desarrollo de la técnica de PCR.

Se reconoce el apoyo del personal del Bioterio y Biblioteca del Instituto de Fisiología Celular por sus servicios y colaboración en el desarrollo de mi investigación. César A. Bolaños Vidal, auxiliar del laboratorio AL-102 por su apoyo en el mantenimiento de los recursos del laboratorio. Sara Méndez Ibañez integrante de la Coordinación de Enseñanza del Instituto de Fisiología Celular, UNAM por su apoyo administrativo en los trámites del programa de doctorado.

El alumno recibió una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de beca 613013.

Este trabajo fue apoyado por una subvención de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico/Programa de Apoyo de Investigación e Innovación Tecnológica: DGAPA/PAPIIT-UNAM proyecto IN203520 (Dra. Rocío Salceda) y proyecto IN207719 (Dr. Juan Rafael Riesgo).

Contenido

1. Resumen.....	1
Palabras clave:.....	1
Abstract	2
2. Abreviaturas	3
3. Introducción	5
3.1 Sistema visual	5
3.1.1 Anatomía del ojo	5
3.1.2 Retina	6
3.1.3 Células gliales de Müller.....	8
3.1.4 Transporte de glucosa a la retina	11
3.2 Homeostasis de los niveles de glucosa en sangre.....	12
3.2.1 El páncreas: glándula maestra en el control de la glucosa sanguínea	12
3.2.2 Señalización celular mediada por insulina	13
3.3 Diabetes.....	16
3.4 Retinopatía diabética	17
3.4.1 Células gliales de Müller en la patogénesis de la retinopatía diabética	18
3.4.2 Alteraciones metabólicas en la retinopatía diabética.....	20
3.5 Estrés oxidativo	22
3.6 Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2) en la respuesta antioxidante inducible.....	24
3.6.1 Estructura del Nrf2	25
3.6.2 Mecanismos de regulación en la activación del Nrf2.....	26
3.6.3 Elemento de respuesta antioxidante (ARE)	29
3.6.4 Alteraciones del Nrf2 en la retinopatía diabética	30
4. Hipótesis.....	32
5. Objetivos	32
5.1 Objetivo general:.....	32
5.2 Objetivos particulares:	32
6. Métodos	33
6.1 Cultivo primario de células gliales de Müller de la retina de la rata.....	33
6.2 Tratamientos experimentales.	34
6.3 Inmunohistoquímica.	34
6.4 Western Blot	35

6.5 Aislamiento del ARNm y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)...	37
6.6 Determinación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.....	39
6.7 Determinación de los niveles de GSH reducido.	40
6.8 Actividad de catalasa.....	40
6.9 Viabilidad celular.....	40
6.10 Ensayo de la deshidrogenasa láctica (LDH).....	41
6.11 Ensayo de TUNEL.....	41
6.12 Análisis estadístico.....	41
7. Resultados.....	43
7.1 Cultivos primarios de células gliales de Müller.....	43
7.2 Efecto citotóxico de las altas concentraciones de glucosa sobre las células gliales de Müller.	44
7.3 Las altas concentraciones de glucosa incrementan las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.....	46
7.4 La exposición a altas concentraciones de glucosa altera la expresión del Nrf2 en las células gliales de Müller.....	47
7.5 Distribución subcelular del Nrf2 en las células gliales de Müller.....	48
7.6 Las altas concentraciones de glucosa afectan la expresión de genes antioxidantes regulados por el Nrf2.....	50
7.7 Sistemas de degradación del Nrf2 bajo altas concentraciones de glucosa en las células gliales de Müller.....	52
7.8 Las altas concentraciones de glucosa afectan la expresión génica del Nrf2.....	54
7.9 Las altas concentraciones de glucosa promueven la expresión de proteínas inflamatorias en las células gliales de Müller.....	55
8. Discusión.....	57
9. Conclusión.....	64
10. Referencias.....	65
Anexo 1.....	82
Primers para PCR.....	82
Publicaciones.....	83

1. Resumen

La retinopatía diabética es una complicación de la diabetes mellitus que puede conducir a la ceguera. Reciente evidencia sugiere al estrés oxidativo como un factor crucial relacionado a la progresión de la retinopatía diabética. Las células gliales de Müller (CGM) son uno de los principales tipos celulares afectados en la retinopatía diabética. En este trabajo, se evaluó el efecto de las altas concentraciones de glucosa (25 mM) sobre la expresión del Factor Nuclear Eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2), principal regulador de la respuesta antioxidante, en las CGM de la rata *in vitro*. Las CGM expuestas por tiempos cortos (1-3 h) a altas concentraciones de glucosa mostraron una disminución de los niveles totales y nucleares del Nrf2, así como una disminución en la expresión de enzimas antioxidantes. Durante la exposición a alta glucosa (1-48 h) se observó un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno. A tiempos prolongados (48 h) de exposición a alta glucosa se observó un incremento significativo de los niveles nucleares de Nrf2 y la expresión de enzimas antioxidantes. Además, se observó un incremento de los niveles de NF-κB y de sus genes blanco a tiempos cortos de exposición a concentraciones altas de glucosa. Los resultados sugieren una regulación negativa del Nrf2 mediada por NF-κB, que lleva a una disminución de los sistemas antioxidantes provocando un estrés oxidativo en las CGM.

Palabras clave:

Retinopatía diabética; células gliales de Müller; Nrf2; especies reactivas de oxígeno (EROs); NF-κB

Abstract

Diabetic retinopathy is a complication of diabetes mellitus that can lead to blindness. Recent evidence suggests oxidative stress a crucial factor related to the progression of diabetic retinopathy. Müller glial cells (MGCs) are one of the main cell types affected in diabetic retinopathy. In this work, we evaluated the effect of high concentrations of glucose (25 mM) on the expression of nuclear erythroid factor 2-related factor 2 (Nrf2), the main regulator of the antioxidant response, in rat MGC in vitro. MGCs exposed for short times (1-3 h) to high concentrations of glucose showed a decrease in total and nuclear levels of Nrf2, as well as a decrease in the expression of antioxidant enzymes. During exposure to high glucose (1-48 h) an increase in the production of reactive oxygen species was observed. At prolonged time (48 h) of exposure to high glucose, a significant increase in nuclear Nrf2 levels and antioxidant enzyme expression was observed. In addition, an increase in the levels of NF- κ B and its target genes was observed at short times of exposure to high glucose concentrations. The results suggest an NF- κ B-mediated down-regulation of Nrf2, leading to a decrease in antioxidant systems causing oxidative stress in MGCs.

2. Abreviaturas

$^1O^2$	Oxígeno singulete
AGEs	Productos finales de glucosilación avanzada
AP-1	Proteína Activadora 1
AQP	Acuaporina
AQP4	Acuaporina-4
ARE	Elemento de Respuesta Antioxidante
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
ATP	Adenosín trifosfato
Bach	Proteínas con homología BTB-CNC 1 y 2
BHRs	Barreras hemato-retinianas
BTB	Domino tramtrack y Bric-a-Brac
b-ZIP	Cremallera básica de leucina
CBP	Coactivador proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
CECR	Células endoteliales capilares de la retina
CG	Células ganglionares
CGM	Células gliales de Müller
CHD6	Proteína de unión al DNA ATPasa/helicasa
CnC	Capín Collar
CNE	Capa nuclear externa
CNI	Capa nuclear interna
CPE	Capa plexiforme externa
CPI	Capa plexiforme interna
Cul3	Culina 3
DM	Diabetes mellitus
E2	Enzima conjugadora de ubiquitina
E3 ^{Keap1}	Complejo ubiquitina ligasa mediado por Keap1
EPR	Epitelio pigmentario de la retina
ERK	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ERK1 y 2	Cinasas reguladas por señales extracelulares
ERNs	Especies reactivas de nitrógeno
EROs	Especies reactivas de oxígeno
FADH	Flavina adenina dinucleótido reducido
FOXO1	Forkhead Box O 1
FOXO1	Forkhead Box O 1
G25	Glucosa 25 mM
G5	Glucosa 5 mM
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
GLAST	Transportador electrogénico glutamato-aspartato
GluS	Glutamina sintetasa
GLUT-1	Transportador de glucosa tipo 1
GLUT-2	Transportador de glucosa tipo 2
GLUT-3	Transportador de glucosa tipo 3
GLUT-4	Transportador de glucosa tipo 4
GPX	Glutación peroxidasa

GS	Glucógeno sintasa
GSH	Glutación reducido
GSK-3 β	3-cinasa de la glucógeno sintasa
GSTs	Glutación transferasa
H \bullet	Átomos de hidrogeno
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogeno
HO \bullet	Radical hidroxilo
HOCl	Ácido hipocloroso
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule 1
IGF-1	Factor de crecimiento parecido a insulina
IL	Interleucina
iNOS	Oxido nítrico sintasa inducible
IVR	Región de intervención central
Keap1	Proteína 1 asociada a elementos ECH similar a Kelch
Kir	Canales de rectificación interna de potasio
NAD ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido reducido
Neh	Dominios de homología Nrf2-ECH
NOS	Óxido nítrico sintasa
NOS	Óxido nítrico sintasas
NOX	NADPH oxidasas
Nrf2	Factor Nuclear Eritroide 2 Relacionado al Factor 2
N-terminal	Amino-terminal
O \bullet^-	Superóxido
ON \bullet	Oxido nítrico
ONOO $^-$	Peroxinitrito
p45 NFE2	Factor Nuclear Eritroide 2, subunidad p45
PKD1	Cinasa dependiente de PIP3
PI3K	3-cinasa de fosfoinositidos
PIP3	Fosfatidilinositol-3',4',5'-trifosfato
PRDX	Peroxirredoxina
RBX1	Proteína-1 caja de anillo
RD	Retinopatía diabética
RI	Receptor de insulina
RL	Radical libre
ROO \bullet	Radical peroxilo
RXR	Receptor α retinoide X
SKN-1	Skinhead
SOD	Superóxido dismutasa
SRI	Sustrato del receptor de insulina
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
TRX	Tiorredoxina
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
β -TrCP	Proteína con repeticiones β -Transducina

3. Introducción

3.1 Sistema visual

El sentido de la vista desempeña un papel fundamental en las actividades cotidianas del ser humano y de casi todos los grupos de vertebrados, que van desde el reconocimiento del medio ambiente hasta una forma de comunicación compleja. El sistema visual detecta e interpreta los estímulos luminosos, que son ondas electromagnéticas con longitudes entre los 400 y 750 nm ¹. La visión comprende la transmisión y refracción de la luz por la óptica ocular, la transducción de la energía luminosa en señales electroquímicas por las células fotorreceptoras, los mecanismos de integración de señales por medio de las interacciones sinápticas en los circuitos neuronales internos de la retina². Así mismo, la visión implica la transmisión de las señales de la retina hacia la corteza visual y el procesamiento cerebral que interpreta las señales luminosas en imágenes visuales perceptibles por los organismos ³.

3.1.1 Anatomía del ojo

El globo ocular de los vertebrados se puede dividir anatómicamente en tres capas. La capa externa incluye a la esclerótica, la córnea y la conjuntiva⁴. La esclerótica es una capa fibrosa compuesta principalmente por colágeno, la cual proporciona protección y soporte al globo ocular. En la parte frontal del ojo la esclerótica se continúa con la córnea, un tejido transparente que permite la entrada de luz a la parte interna del ojo ⁴.

La capa media es vascular y está compuesta por la coroides, el cuerpo ciliar y el iris. La coroides se encuentra debajo de la esclerótica y contiene a los vasos sanguíneos que nutren a la parte interna del ojo⁴. El iris se compone de dos capas de músculo liso pigmentado, el cual determina el color de los ojos. En medio del iris se forma un orificio denominado pupila cuya función es regular la cantidad de luz que ingresa a la retina por medio de su apertura⁵. Detrás del iris se encuentra el cristalino, una estructura biconvexa, avascular y transparente que se encarga de enfocar los rayos de luz sobre la retina. Alrededor del cristalino los músculos ciliares

provenientes del cuerpo ciliar regulan su forma proporcionando un enfoque adecuado de las imágenes sobre la retina⁶. El iris divide el espacio entre la córnea y el cristalino en dos cámaras llenas de líquido denominadas cámara anterior y posterior. Ambas cámaras contienen humor acuoso, un líquido transparente producido por los procesos ciliares que nutre a la parte anterior del ojo⁵. La cámara más grande del ojo es el segmento posterior, el cual contiene un material gelatinoso denominado humor vítreo, que ocupa dos tercios del volumen ocular (Fig. 1) ⁵.

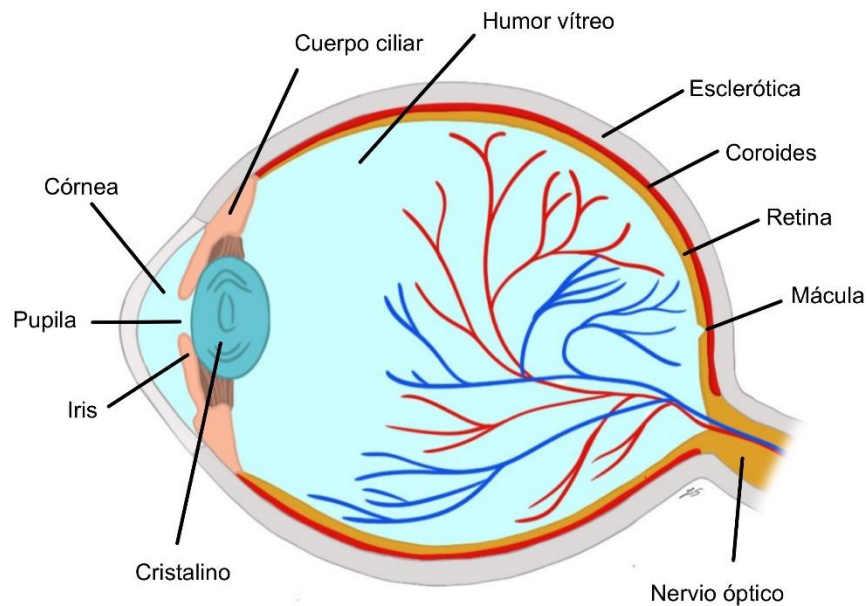


Figura 1. Estructura básica del ojo de los vertebrados.

3.1.2 Retina

La retina corresponde a la capa interna del ojo. En este tejido se lleva a cabo el proceso de la fototransducción y se compone estructuralmente por el epitelio pigmentario de la retina (EPR) y la retina neural. ^{3,5}.

El EPR es una monocapa de células de origen neuroepitelial que contienen una alta concentración de melanina. La membrana apical de las células del EPR presenta microvellosidades que tienen contacto con los segmentos externos de los fotorreceptores, mientras que la membrana basolateral se encuentra frente a la membrana de Bruch que está en contacto con la coroides⁷. El EPR contribuye de

forma activa al mantenimiento de la retina, sus principales funciones involucran el soporte metabólico a las células fotorreceptoras, el reciclamiento de los pigmentos visuales, fagocitación de los segmentos externos y la absorción de la luz por sus gránulos de melanina ^{1,5}.

La retina neural está organizada en una serie de capas celulares estratificadas: la capa nuclear externa (CNE) contiene los somas de las células fotorreceptoras. Los fotorreceptores se dividen en dos tipos celulares: los bastones involucrados en la visión escotópica y los conos en la visión fotópica⁸. 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) donde tienen sinapsis con las dendritas de las células bipolares y horizontales. La capa nuclear interna (CNI) contiene los somas de las células bipolares, horizontales y amacrinas². Los axones de estas células forman sinapsis con las células ganglionares en la capa plexiforme interna (CPI). La última capa se compone por las células ganglionares (CG). Los axones de las CG forman el nervio óptico a través del cual la información de la retina es transmitida al cerebro^{1,2,9} (Fig. 2).

La retina recibe suministro sanguíneo a partir de dos fuentes principales: la coroides se encarga de nutrir la parte externa de la retina (EPR, CNE y CPE) y la arteria retiniana central suministra nutrientes a la retina interna (CNI, CPI y CG) ^{10,11}

Además de las neuronas, la retina cuenta con tres tipos de células gliales: las células gliales de Müller, los astrocitos y la microglía ¹².

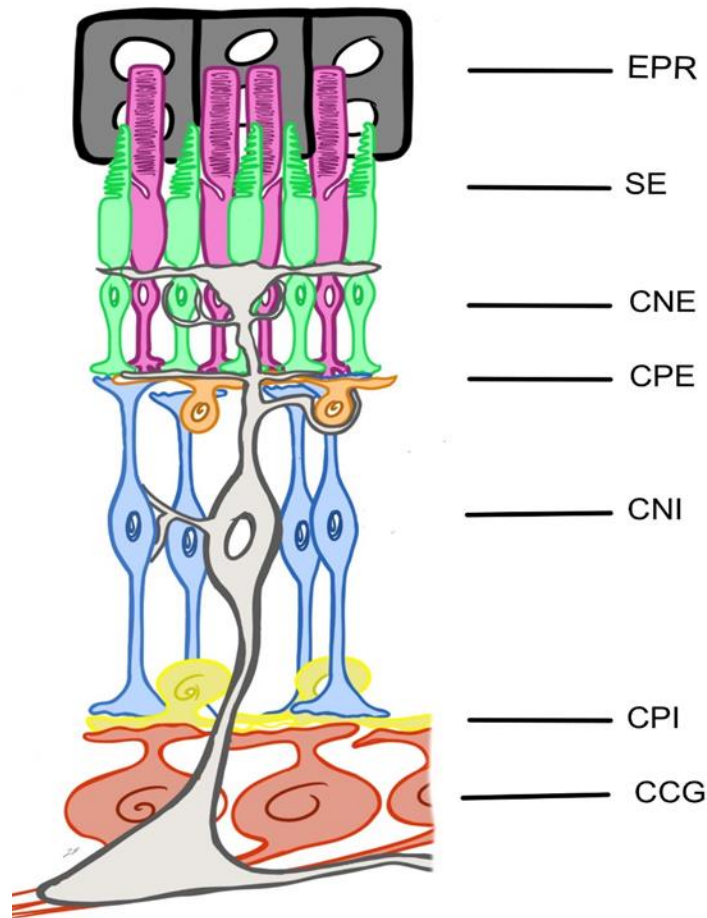


Figura 2. Estructura interna de la retina. La retina se compone de los siguientes tipos celulares: conos (morado), bastones (verde), células horizontales (naranja), células bipolares (azul), células amacrinas (amarillo), células ganglionares (rojo), células gliales de Müller (gris) y epitelio pigmentario de la retina (negro; EPR). La retina se divide estructuralmente en las siguientes capas: segmentos externos de los fotorreceptores (SE), capa nuclear externa (CNE), capa plexiforme externa (CPE), capa nuclear interna (CNI), capa plexiforme interna (CPI) y capa de células ganglionares (CCG).

3.1.3 Células gliales de Müller

En la retina de los vertebrados, las células gliales de Müller (CGM) se encuentran situadas verticalmente a través del tejido, esta localización particular les permite tener contacto con todas las capas nucleares y sinápticas de la retina¹³. El soma de las CGM se localiza en la CNI y a partir de este surgen dos procesos principales en direcciones opuestas: un proceso se dirige hacia la retina externa, el cual tiene contacto con las células fotorreceptoras y constituye a la capa limitante externa. El otro proceso se proyecta hacia la retina interna, y presenta una estructura

especializada denominada pie final de la glía (end-foot), la cual tiene contacto directo con las células ganglionares y el vítreo¹⁴. La disposición radial de las CGM permite que sus procesos se proyecten dentro de la retina envolviendo a los vasos sanguíneos e interactuando con todos los tipos neuronales de la retina¹³.

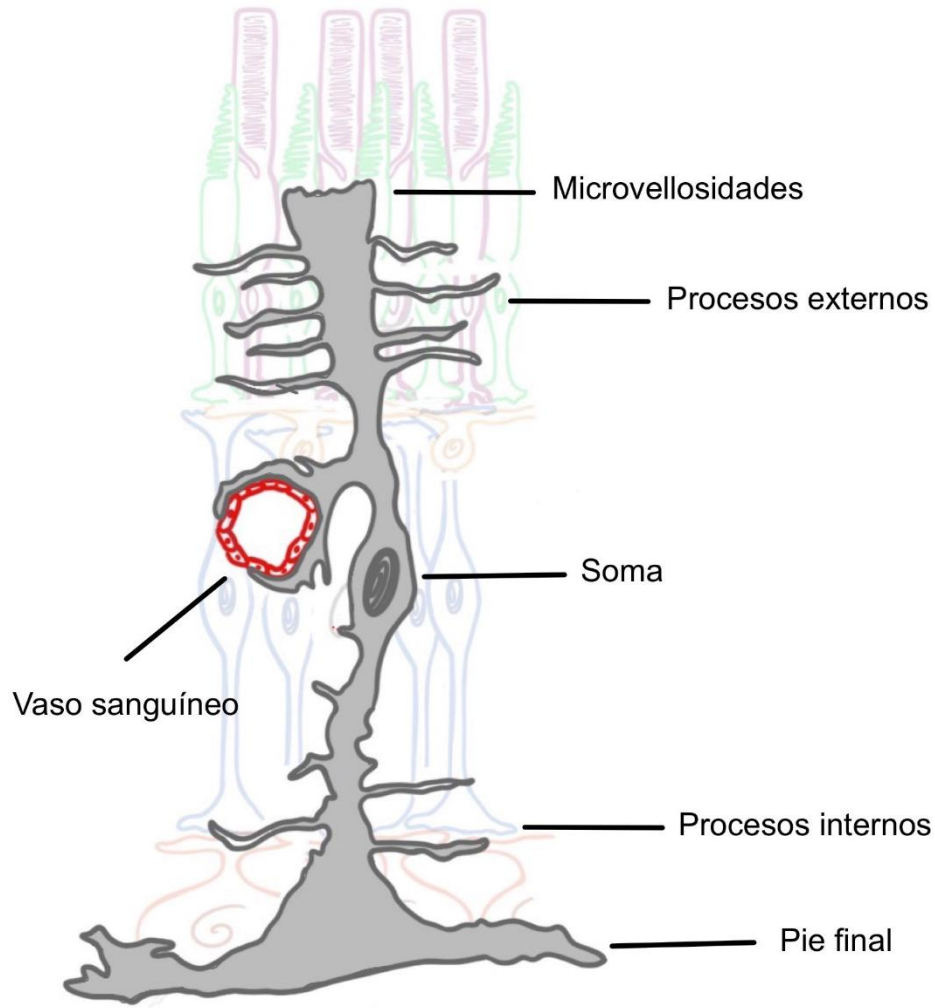


Figura 3. Estructura de las células gliales de Müller en la retina.

Las CGM juegan un papel fundamental en la homeostasis de la retina, desempeñando diversas funciones que regulan el microambiente intra retiniano y la actividad neuronal de la retina^{12,14}.

Por ejemplo, absorben el exceso de potasio del espacio extracelular y lo transportan fuera de la retina donde la concentración de potasio es menor¹⁵. Además, las CGM

expresan varios tipos de canales de potasio y la amortiguación de potasio es principalmente regulada por los canales de rectificación interna de potasio (Kir; inward rectifying potassium channels) en particular el Kir4.1¹². Los canales Kir4.1 colocalizan con los canales de agua acuaporina-4 (AQP4; aquaporin-4), en dominios de membrana de las CGM que están en contacto con los vasos sanguíneos, lo que sugiere que los gradientes osmóticos entre la retina y la sangre son compensados por un flujo bidireccional entre el potasio y el agua^{16,17}. Las CGM liberan sustancias que son capaces de regular el tono vascular ante las demandas metabólicas del tejido, la liberación de ATP es capaz de constreñir a los vasos mientras que la señalización regulada por calcio ejerce el efecto contrario¹⁸.

Las CGM poseen sistemas de captura e intercambio de varios neurotransmisores, incluyendo al glutamato y al GABA¹⁵. El glutamato es el principal neurotransmisor excitatorio de la retina y el exceso de este neurotransmisor provoca excitotoxicidad. La remoción del exceso de glutamato de la terminal sináptica ocurre a través del transportador electrogénico glutamato-aspartato (GLAST; electrogenic glutamate-aspartate transporter) y el transportador Xc⁻¹⁹. El glutamato capturado es convertido a glutamina por la glutamina sintetasa (GluS), la cual se expresa exclusivamente en las CGM en la retina y subsecuente la glutamina es transportada a las neuronas donde es reconvertida a glutamato. Las CGM también liberan gliotransmisores que pueden tener efectos excitatorios (glutamato y ATP) o inhibitorios (adenosina) sobre las neuronas^{16,20,21}

La glucólisis es la principal fuente de producción de ATP en las CGM, a pesar de que las CGM contienen una gran cantidad de mitocondrias que se distribuyen a lo largo de toda la célula^{22,23}. Una función esencial de las CGM es nutrir a las neuronas de la retina de acuerdo con las demandas metabólicas del tejido²⁴. En contraste con el metabolismo energético de las CGM dependiente principalmente de la glucólisis, las neuronas presentan un metabolismo que preferentemente se basa en la fosforilación oxidativa²⁵⁻²⁷. En períodos de intensa actividad neuronal (como en la oscuridad) las CGM liberan el lactato producido durante la glucólisis al medio extracelular a través de sus transportadores de monocarboxilatos²⁸. Las neuronas

capturaran el lactato liberado por las CGM y pueden metabolizarlo directamente por el ciclo de Krebs produciendo equivalentes reductores (NADH y FADH), utilizados por la cadena de transporte de electrones mitocondrial para producir ATP ^{12,29-31}. Además, las CGM son capaces de almacenar grandes concentraciones de glucógeno que disminuyen al incrementar la actividad neuronal de la retina ³².

3.1.4 Transporte de glucosa a la retina

La retina es el tejido con mayor actividad metabólica y consumo de oxígeno del cuerpo³³. El transporte de nutrientes del torrente sanguíneo a la retina ocurre a través de las barreras hematoretinianas (BHRs), las cuales regulan el movimiento de fluidos y moléculas entre los vasos sanguíneos oculares y la retina, evitando así la entrada de moléculas con potencial dañino para la retina y el mantenimiento del microambiente retiniano ¹⁰.

La BHR externa está compuesta por el EPR que separa a la retina neural del endotelio fenestrado de la coroides^{10,33}, mientras que la BHR interna se compone por las células endoteliales de los capilares de la retina (CECR) que están rodeadas por los pericitos y los procesos de las CGM ³⁴.

La glucosa es la principal fuente de energía en la retina, y su transporte del torrente sanguíneo a la retina es independiente de insulina, mediado principalmente por el transportador de glucosa tipo 1 (GLUT1; glucose transporter 1) ^{10,35}. El GLUT1 es altamente expresado en las CECR así como en el EPR, las CGM, las CG y los fotorreceptores ³⁵⁻³⁷. Otras isoformas de los transportadores de glucosa como el GLUT-2 y 3 se expresan en las CGM y en los procesos neuronales de la capa plexiforme interna, respectivamente ³⁶. Además, se ha identificado al transportador sensible a insulina GLUT-4 en las capas nucleares de la retina de la rata y la rana ³⁸.

El transporte de glucosa por el EPR involucra a los transportadores GLUT1 y GLUT3, ambos transportadores se expresan en la membrana apical y basolateral del epitelio. El GLUT1 puede incrementar su expresión y por lo tanto el transporte de glucosa ante la demanda metabólica del tejido⁵.

En la BHR interna, el GLUT-1 se localiza en las membranas luminal y basolateral de las CECR, pero su expresión es desigual: la membrana abluminal contiene una mayor expresión del transportador que la membrana luminal^{34,39}. La distribución asimétrica del GLUT-1 sugiere que el transporte de glucosa está más limitado en la interfase sangre-luminal que en la interfase abluminal-intersticial⁴⁰.

3.2 Homeostasis de los niveles de glucosa en sangre

Las células utilizan la energía proveniente de los alimentos para desempeñar sus funciones como el crecimiento, la diferenciación y la reproducción. Entre los diversos macronutrientes, la glucosa es la principal molécula que proporciona energía a los organismos⁴.

Los procesos digestivos descomponen los hidratos de carbono complejos consumidos por la alimentación a glucosa, la cual se absorbe por la mucosa intestinal y se transporta al torrente sanguíneo donde es distribuida a todo el cuerpo⁴¹. En el humano, los niveles de glucosa en sangre en ayunas deben mantenerse en un rango estrecho alrededor de 100 mg/dL (5.6 mM), por lo que el incremento o descenso en la concentración de glucosa es regulado por un sistema complejo de señales endocrinas y paracrinas, mediado primordialmente por las hormonas insulina y glucagón producidas por el páncreas⁴²⁻⁴⁵.

3.2.1 El páncreas: glándula maestra en el control de la glucosa sanguínea

El páncreas es una glándula mixta que se compone de una parte exocrina y una endocrina⁴⁶. En los humanos, aproximadamente el 85 % del volumen pancreático es tejido exocrino, mientras que la porción endocrina compone alrededor del 2 % y el volumen restante es ocupado por matriz extracelular y vasos sanguíneos⁴¹. La parte exocrina contiene células que secretan el jugo pancreático que contiene múltiples enzimas que facilitan los procesos de digestión. La parte endocrina se compone de agrupaciones de células denominadas islotes de Langerhans⁴¹. Los islotes contienen diversos tipos celulares encargados de producir y liberar hormonas al torrente sanguíneo. Por lo tanto, son zonas altamente vascularizadas⁴⁶. Los

diferentes tipos celulares en el islote sintetizan y liberan un tipo específico de hormona: células α – glucagon, células β – insulina, células δ – somatostatina, células ϵ – grelina y células PP – polipéptido pancreático. Todas las células del islote se comunican entre sí a través del medio extracelular por lo tanto, la liberación de una hormona de una célula influye en la función de otra ⁴⁶⁻⁴⁸.

El incremento de los niveles de glucosa en sangre por la alimentación promueve una mayor captura de glucosa por las células β del páncreas a través de los transportadores GLUT-2⁴⁹. La glucosa que ingresa a la célula β es metabolizada rápidamente, incrementando los niveles intracelulares de ATP. El ATP induce el cierre de los canales de potasio dependientes de ATP despolarizando el potencial de membrana de la célula β ⁴⁸. La despolarización de la membrana promueve la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje permitiendo la entrada de calcio a la célula. El calcio activa diversas vías de señalización intracelular que promueven la secreción de vesículas contenedoras de insulina al medio extracelular y a los vasos sanguíneos⁴⁹.

3.2.2 Señalización celular mediada por insulina

Las células β sintetizan a la insulina desde un precursor peptídico denominado preproinsulina. En el retículo endoplásmico la preproinsulina se pliega a través de dos puentes de disulfuro y es rápidamente cortada a proinsulina. La proinsulina se empaqueta en vesículas dentro del aparato de Golgi, donde es escindida por proteasas a insulina y el péptido C, los cuales son exocitados en cantidades equimolares ^{45,49}.

La acción de la insulina comienza con la unión de la hormona al receptor de insulina (RI) en la superficie celular. El RI es un receptor heterotetrámero compuesto por dos subunidades α y dos subunidades β unidas por puentes de disulfuro⁵⁰. La unión de la insulina a las subunidades α promueve la autofosforilación de las subunidades β en tres sitios de tirosina (1158, 1162 y 1163), provocando un cambio conformacional en el receptor activando su función de tirosina cinasa⁵¹. La activación del RI le permite interactuar con una familia de proteínas de acoplamiento

llamada sustratos del receptor para insulina (IRS), las cuales suministran sitios para la unión de proteínas con dominios de homología Src 2 (SH2) como la 3-cinasa de fosfoinositidos (PI3K; phosphoinositide 3-kinase)⁵². La asociación de la PI3K al IRS activa su función, promoviendo la formación de fosfatidilinositol-3',4',5'-trifosfato (PIP₃). El PIP₃ se localiza en la parte citosólica de la membrana plasmática, originando sitios de unión para proteínas con dominios PH como la cinasa dependiente de PIP₃ (PDK1; 3'-phosphoinositide-dependent kinase). El reclutamiento de PDK1 en la membrana plasmática crea un ambiente en el que la PDK1 puede fosforilar y activar a la proteína cinasa Akt (protein kinase B). Akt es un regulador maestro involucrado en la regulación de múltiples procesos como la captura de glucosa, síntesis de proteínas, incremento de glucógeno, lipogénesis y la anti-lipolisis⁵³.

La principal función de la insulina en el músculo esquelético y en el tejido adiposo es la captura de glucosa. El transportador de glucosa GLUT-4 realiza el transporte de glucosa dependiente de insulina. En ausencia de insulina, el GLUT-4 se encuentra almacenado en vesículas intracelulares. El tráfico vesicular del GLUT-4 a la membrana plasmática es regulado por varios mecanismos entre los que se encuentra la proteína sustrato de Akt de 160 kDa (AS160). AS160 regula negativamente la actividad de las proteínas G pequeñas Rab, las cuales son necesarias en el tráfico vesicular del GLUT-4⁵². La activación de Akt por la vía de señalización de la insulina inhibe a la proteína AS160, promoviendo la activación de la GTPasa Rab incrementando así el tráfico vesicular del GLUT-4 a la membrana plasmática. La translocación del GLUT-4 provoca una mayor captura de glucosa por las células disminuyendo los niveles de glucosa sanguínea ^{41,50,54}. Cuando los niveles de glucosa disminuyen fuera del rango fisiológico por la insulina, se liberan hormonas contra-reguladoras como el glucagon, la epinefrina, el cortisol y la hormona del crecimiento que antagonizan los efectos de la insulina⁴¹. Estas hormonas favorecen la formación de glucosa a partir de la glucogenólisis y la gluconeogénesis ⁵⁵.

A nivel hepático, la activación de Akt por la señalización del RI inhibe la gluconeogénesis y activa la glucogenogénesis⁵². 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 por la acción de la insulina conduce al descenso de la actividad de GSK-3, incrementando así la actividad de GS y en consecuencia la formación de glucógeno^{41,55} (Fig. 4).

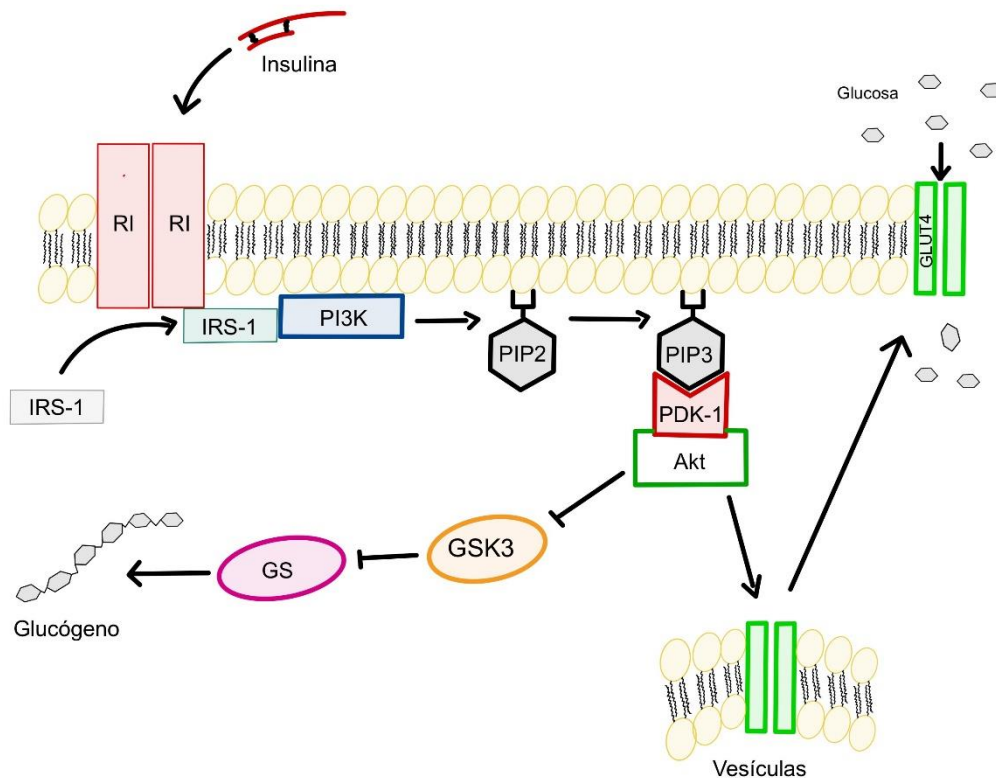


Figura 4. Vía de señalización de la insulina. Tras la unión de la insulina a su receptor de tirosina cinasa, se induce la dimerización y activación del receptor. Este receptor acopla y fosforila a la proteína IRS-1 la cual funciona como un adaptador molecular activando varias vías de señalización. Entre las vías mediadas por IRS se encuentran la de PI3K/Akt, la cual tiene un papel crucial en la activación y la regulación de diversos eventos metabólicos, que incluyen el transporte de glucosa y la síntesis de glucógeno.

En el sistema nervioso central, el RI se expresa en todo el cerebro, pero es altamente abundante en el hipotálamo, el bulbo olfatorio, el hipocampo, el estriado, la corteza cerebral y el cerebelo⁵³. Los niveles de insulina en el fluido cerebroespinal presentan valores similares a los niveles de insulina en el plasma, indicando que el

páncreas es la principal fuente de insulina en el sistema nervioso⁵⁶. La insulina ingresa al sistema nervioso central por medio de transportadores saturables en las células endoteliales de la barrera hematoencefálica ^{56,57}.

A nivel celular, el RI se expresa altamente en las neuronas y es menos abundante en las células gliales. La insulina en el sistema nervioso central activa principalmente las vías de señalización de PI3K/Akt/FoxO1 (Forkhead Box O 1) y la vía RAS/cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1 y 2). La insulina juega un papel clave en la sobrevivencia neuronal, la plasticidad neuronal, la función neuro-sináptica, la defensa antioxidante y la captura de glucosa entre otras funciones ^{51,53,58}.

3.3 Diabetes

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica caracterizada por altas concentraciones de glucosa en la sangre, condición denominada hiperglucemia⁵⁹. La anomalía fundamental de la enfermedad, es una alteración en la señalización de la insulina provocada por una deficiencia o resistencia de los tejidos a esta, lo cual provoca una captación deficiente de la glucosa sanguínea por diversos tejidos incrementando sus concentraciones en la sangre ⁴².

La DM representa un importante problema de salud pública, dado que es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad prematura en el mundo. La Federación Internacional de Diabetes estima que en México hay alrededor de 13 millones de personas con diabetes ⁶⁰ y la enfermedad ocupa el segundo lugar en causas de muerte sólo por debajo de las enfermedades cardíacas ⁶¹.

La diabetes puede dividirse en tres categorías de acuerdo con sus características fisiopatológicas: la diabetes tipo 1 es causada por la destrucción autoinmune de las células β pancreáticas, ocasionando una deficiencia absoluta de la insulina⁶². Entre los marcadores de la destrucción inmunitaria se encuentran los anticuerpos contra insulina, descarboxilasa de ácido glutámico y fosfatasa de tirosina IA-2. Este tipo de diabetes se presenta con mayor frecuencia en niños y adolescentes, pero puede aparecer en cualquier etapa de la vida ^{63,64}. La diabetes tipo 2 abarca a los pacientes con resistencia y/o deficiencia relativa de insulina⁶³. Se desconoce la etiología

específica de este tipo de diabetes, pero se ha reconocido la participación de diversas alteraciones en su desarrollo como el incremento en la secreción de glucagon, defectos en la secreción de integrinas e incremento de la reabsorción renal de glucosa; un factor importante de riesgo para este tipo de diabetes es la obesidad ⁵². La última categoría se refiere a formas específicas de diabetes que incluye a la diabetes gestacional, los síndromes de diabetes monogénica, enfermedades del páncreas exocrino y la diabetes asociada a drogas ⁶³.

Durante la progresión de la diabetes, se presentan una serie de complicaciones a corto y a largo plazo, las cuales afectan de forma significativa la calidad de vida de los pacientes. A corto plazo, los pacientes pueden desarrollar complicaciones agudas como la cetoacidosis y el síndrome diabético hiperosmolar; ambas condiciones representan un alto riesgo de mortalidad en los pacientes⁶³. A largo plazo, la hiperglucemia crónica afecta diversos órganos como el ojo, el riñón, el corazón y a los nervios periféricos ^{42,65}.

3.4 Retinopatía diabética

La retinopatía diabética (RD) es una de las complicaciones más comunes presentadas durante la progresión de la DM, afectando a millones de adultos en edad laboral en el mundo. En esta complicación, la retina se daña progresivamente provocando la pérdida de la visión⁶⁶. Frecuentemente, la RD es diagnosticada en sus estadios más avanzados, debido a que en sus fases iniciales no manifiesta sintomatología perceptible por el sujeto⁶⁶. Esta complicación es irreversible y progresiva, a pesar de que los pacientes tengan un buen control de su glucemia la probabilidad de padecer algún signo de retinopatía incrementa con el tiempo de diabetes, a los 5 años es del 25 %, a los 10 años del 60 % y después de los 15 años es más del 80 %⁶⁷. Esto indica que en la pato-fisiología de la RD, se activan múltiples mecanismos en respuesta a la hiperglucemia que no son inhibidos cuando los niveles de glucosa en sangre regresan a niveles normales.

Clínicamente, la RD está categorizada por las lesiones vasculares visibles: el primer estadio de la RD se denomina no proliferativo, y éste se caracteriza por la presencia de lesiones vasculares como la formación de microaneurismas, hemorragias

retinales y exudados duros⁶⁶. La RD proliferativa se observa en pacientes con un largo periodo de diabetes o con un mal control glucémico, y esta etapa se distingue por la formación de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización). Una categoría adicional en la RD es el edema macular diabético, condición en la cual se observa una acumulación de fluidos en la mácula de la retina, conduciendo a cambios en el grosor de la retina y a su desprendimiento ^{66,68}.

Aunque la RD se ha distinguido por el daño microvascular de la retina, se han reportado alteraciones en la función de la retina antes de la aparición de las primeras lesiones vasculares. En animales y pacientes diabéticos, se han observado cambios en los patrones del electroretinograma^{69,70}, alteraciones en las pruebas micropérimétricas y perimétricas, reducción en los potenciales oscilatorios en el electroretinograma multifocal⁷¹, anormal adaptación a la oscuridad y la pérdida de la sensibilidad al contraste y al color ⁶⁸.

3.4.1 Células gliales de Müller en la patogénesis de la retinopatía diabética

Las CGM tienen una fuerte habilidad para detectar y responder a las fluctuaciones del microambiente retiniano. Ante diversos estímulos dañinos como la hipoxia o traumatismos, las CGM presentan una serie de cambios morfológicos y fisiológicos denominados en conjunto como una gliosis reactiva¹². Específicamente en las CGM el proceso de gliosis se caracteriza por la hipertrofia celular; aumento en la expresión de proteínas de filamentos intermedios como la proteína ácida fibrilar glial (GFAP; glial fibrillary acidic protein), vimentina y nestina, así como un incremento en la liberación de factores de crecimiento e inflamatorios y en algunos casos la proliferación celular⁷². La gliosis reactiva es considerada como una respuesta protectora ante el daño de la retina, pero su activación por un tiempo prolongado provoca un ambiente pro-inflamatorio que puede llevar al deterioro de la retina.

Diversos estudios han reportado que las CGM son uno de los primeros tipos celulares de la retina en verse afectados durante la progresión de la RD⁷³. Estudios realizados en modelos animales y pacientes diabéticos han reportado el proceso de gliosis reactiva en las CGM desde etapas tempranas de la enfermedad⁷⁰.

En la RD, las CGM presentan alteraciones en la expresión de los filamentos intermedios: la expresión de GFAP y nestina incrementan desde etapas tempranas de la enfermedad, mientras que los niveles de vimentina disminuyen⁷⁴⁻⁷⁶. A la par, las CGM sufren alteraciones morfológicas e incrementan su capacidad proliferativa en los primeros estadios de la RD (1 mes)⁷⁷. Estudios *in vitro* han observado fenómenos similares en CGM expuestas a altas concentraciones de glucosa, en donde se han observado cambios en la morfología celular⁷⁸ e incremento de la expresión de GFAP⁷⁹.

Las CGM presentan alteraciones en su fisiología durante la patogénesis de la RD; las CGM provenientes de animales diabéticos (6 meses) muestran una fuerte disminución de los canales de potasio Kir4.1 y alteraciones en los patrones de expresión de las acuaporinas (AQPs), lo cual contribuye a la pérdida del control osmótico en las CGM durante la RD^{75,80}.

A la par, las CGM de animales diabéticos (4 meses) han mostrado una disminución de la captura de glutamato del medio extracelular, fenómeno que conduce a un incremento en las concentraciones de glutamato en el microambiente retiniano que pueden ser excitotóxicas para las neuronas. La disminución de la captura de glutamato se debe a que las CGM tienen una disminución de los transportadores de glutamato (GLAST y X_{c-})^{21,81} y de la glutamina sintetasa. Este fenómeno se manifiesta también en cultivos de CGM expuestas a altas concentraciones de glucosa⁸².

Las CGM de animales diabéticos en estadios relativamente tempranos de la RD (3 meses), sobre-expresan genes relacionados con proteínas pro-inflamatorias de fase aguda⁸³, entre las cuales se encuentran al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), Interleucina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α). Debido a esto, se considera que las CGM contribuyen de forma activa a la formación del ambiente pro-inflamatorio que se presenta en la RD. Asimismo, a tiempos largos de diabetes (6 meses), se ha reportado que las CGM sufren un proceso de muerte celular por apoptosis o por piroptosis^{68,73}.

3.4.2 Alteraciones metabólicas en la retinopatía diabética.

El mecanismo por el cual la diabetes causa retinopatía sigue sin ser esclarecido, se han postulado varias teorías para explicar la patogénesis de la RD entre las cuales se encuentran la acumulación de polioles, la activación de la proteína cinasa C, la formación de productos finales de glicación avanzada, liberación de factores proinflamatorios y el estrés oxidativo ^{67,84}.

3.4.2.1 Vía de los polioles

La aldosa reductasa es la enzima principal de la vía de los polioles la cual reduce los aldehídos tóxicos a alcoholes. En condiciones de hiperglucemia, el exceso de glucosa puede ser metabolizada a sorbitol por la aldosa reductasa, la cual convierte el grupo aldehído de la glucosa a un grupo hidroxilo, utilizando como cofactor al NAD(P)H. El sorbitol es oxidado a fructosa por la sorbitol deshidrogenasa, utilizando como cofactor al NAD⁺ formando NADH. La aldosa reductasa se expresa en las CERC, CGM y CG ^{66,85,86}.

El incremento en el flujo de la vía del polirol provoca diversas alteraciones. El sorbitol es un alcohol que no difunde a través de las membranas celulares por lo que su acumulación intracelular puede conducir a un estrés osmótico. La vía de los polioles altera las concentraciones de cofactores fundamentales en la homeostasis celular, el aumento de la actividad de la aldosa reductasa disminuye los niveles de NAD(P)H, un cofactor esencial en el reciclamiento de moléculas antioxidantes y la actividad de la sorbitol deshidrogenasa incrementa los niveles de NADH, lo que puede incrementar el flujo de electrones por la cadena de transporte mitocondrial ^{66,85}.

Modelos experimentales han demostrado la acumulación de sorbitol en la retina de animales diabéticos y su asociación con el desarrollo de microaneurismas y pérdida de pericitos retinianos⁶⁷. Además, la inhibición farmacológica de la aldosa reductasa atenúa el daño microvascular observado en la RD ⁸⁵.

3.4.2.2 Productos finales de glicación avanzada

Los productos finales de glicación avanzada (AGEs; Advanced Glycation End Products) son formados a través de una serie de reacciones que inician con la reacción no enzimática entre el grupo carbonilo electrofílico de la glucosa con los grupos amino de las proteínas (especialmente residuos básicos de lisina o arginina), formando compuestos inestables conocidos como bases de Schiff. El reordenamiento molecular de las bases de Schiff promueve la formación de compuestos más estables denominados productos de Amadori⁸⁷. Alternativamente, estos compuestos pueden sufrir procesos de oxidación, deshidratación, polimerización y degradación formando a los AGEs. Estos compuestos contienen un grupo carbonilo que puede reaccionar de forma irreversible con otros grupos amino de proteínas, lípidos y DNA formando aductos o enlaces cruzados⁸⁷.

Los AGEs no solo actúan por medio de sus propiedades químicas intrínsecas, sino también actúan a través de la interacción con sus receptores específicos. Los receptores para AGEs son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas de receptores de superficie celular, los cuales son receptores de reconocimiento de unión de patrones. La activación de los receptores a AGEs estimula vías de señalación involucradas en la inflamación y el estrés oxidativo. Diversos estudios en animales diabéticos (6 meses) han demostrado que los AGEs fomentan la disfunción endotelial a través de la inflamación crónica y la degeneración neuronal de la retina. Se ha identificado que existe una fuerte correlación entre la formación de AGEs y el grado de RD en muestras post-mortem de pacientes diabéticos^{84,87}.

3.4.2.3 Activación de la proteína cinasa C

La proteína cinasa C (PKC; Protein Kinase C) es una familia de 10 enzimas en la cual la isoforma $\beta 1/2$ se ha encontrado asociada con el desarrollo de la RD⁸⁸. La hiperglucemia incrementa el metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis, promoviendo la síntesis de diacilglicerol, un fuerte activador de la PKC. Estudios clínicos han demostrado el incremento de diacilglicerol y la activación de la isoforma $\beta 1/2$ de PKC en la retina de pacientes diabéticos. La activación de PKC influye directamente en vías como la inflamación, neovascularización y cambios

hemodinámicos en la retina. El uso de inhibidores de la PKC en animales diabéticos atenúa la aparición de signos relacionados a la RD ^{67,88}.

3.4.2.4 Inflamación

Diversos estudios han destacado el papel de la inflamación en el desarrollo de la RD. En la retina de pacientes y animales diabéticos en estadios largos de la enfermedad, se ha observado el incremento de proteínas pro-inflamatorias como la IL-1 β , IL-6, IL-8, moléculas de adhesión celular como la molécula 1 de adhesión intercelular (ICAM-1; Intercellular Adhesion Molecule 1) y la expresión de factores de crecimiento como el VEGF, factor de crecimiento parecido a insulina (IGF-1; insulin-like growth factor) y el TNF α ⁶⁸.

En la actualidad, una de las principales alternativas terapéuticas que reducen la neovascularización en la RD proliferativa, es el uso de inhibidores del VEGF y TNF- α ⁸⁸. Debe resaltarse que la hiperglucemia, la formación de AGEs y la activación de PKC contribuyen a la formación de un ambiente pro-inflamatorio.

3.5 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es una alteración del estado redox en la cual hay un desbalance entre los agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los oxidantes, conduciendo al daño oxidativo de moléculas ⁸⁹⁻⁹¹. La formación de un ambiente oxidativo puede deberse a varios mecanismos como son el incremento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs), disminución de las reservas antioxidantes, inactivación y disminución de la síntesis de enzimas antioxidantes ⁹².

El metabolismo aeróbico es esencial para la producción de energía en los organismos, pero paradójicamente el consumo de oxígeno produce subproductos altamente reactivos como los radicales libres ^{93,94}. Un radical libre (RL) es una especie molecular que contiene un electrón desapareado en su último orbital, este electrón desapareado vuelve a los RL altamente inestables y reactivos ⁹³. Los RL se forman con frecuencia por procesos de oxidación, eliminación de átomos de hidrogeno (H \bullet) y por el corte homolítico de un enlace covalente ⁹⁵.

Las EROs son moléculas oxidantes producidas durante el metabolismo que pueden ser RL como el superóxido ($O_2^{\bullet-}$), el radical hidroxilo (HO^{\bullet}) y el radical peroxilo (ROO^{\bullet}) o especies no radicales como el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), el ácido hipocloroso ($HOCl$) y el oxígeno singulete (1O_2). Existe un subgrupo de EROs que contienen un átomo de nitrógeno denominadas especies reactivas de nitrógeno (ERNs) que igual pueden ser RL como el óxido nítrico (NO^{\bullet}) o no radicales como el peroxinitrito ($ONOO^-$)⁹⁵⁻⁹⁷.

Bajo condiciones fisiológicas, las EROs se generan en diferentes compartimientos celulares y por varios sistemas enzimáticos. Algunos compartimientos intracelulares son más oxidantes, como el retículo endoplásmico, los lisosomas y los peroxisomas, mientras que otros presentan un ambiente más reductor como la mitocondria y el núcleo^{98,99}. La mitocondria es el organelo que genera la mayor cantidad de EROs, se ha estimado que el 2 % del oxígeno total consumido por la mitocondria es convertido a EROs¹⁰⁰. Los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones mitocondrial son los principales productores de $O_2^{\bullet-}$. Otros sistemas generadores de EROs son la oxidación peroxisomal de ácidos grasos, la familia de las NADPH oxidasas (NOX), la familia del citocromo P450, el metabolismo de compuestos xenobióticos, las lipoxigenasas, las ciclooxigenasas y el sistema xantina oxidasa. La producción de NO^{\bullet} es mediada por la actividad de las sintasas de óxido nítrico (NOS; nitric oxide synthases) y las mieloperoxidasas generan ácido hipocloroso^{96,98,101}.

El estado redox celular es regulado principalmente por cinco componentes antioxidantes⁹²: 1) la dismutación del $O_2^{\bullet-}$ a H_2O_2 por las superóxido dismutasas (SODs); 2) descomposición del H_2O_2 a H_2O y O_2 por la catalasa (CAT); 3) atenuación de oxidantes por el sistema glutatión (GSH) de forma directa o como un donador de electrones para la glutatión peroxidasa (GPX); 4) atenuación de oxidantes por el sistema tiorredoxina (TRX) de forma directa o como un donador de electrones para las peroxi-redoxinas (PRDXs); 5) detoxificación de xenobióticos por las glutatión transferasas (GSTs)^{91,101}. Otras moléculas de bajo peso molecular que

actúan como antioxidantes directos son el ácido ascórbico (vitamina C), el tocoferol (vitamina E), los carotenoides, las antocianinas, los polifenoles y el ácido úrico¹⁰².

Las EROs se consideran como productos tóxicos para las células debido a que son capaces de producir un daño oxidativo irreversible en macromoléculas esenciales (DNA, lípidos y proteínas). Sin embargo, una amplia gama de reacciones metabólicas generan EROs desempeñando un papel fundamental en la fisiología celular^{96,97}. La alta reactividad de las EROs permite una rápida señalización redox localizada^{101,103}, la cual puede modificar la actividad de factores de transcripción, fosfatasa, cinasas y canales iónicos^{96,104}.

Diversos estudios han observado alteraciones en el estado redox durante la progresión de la RD. En la retina de animales diabéticos, se ha reportado el incremento de EROs y la disminución de los niveles de GSH desde estadios tempranos de la enfermedad (2-4 semanas)^{81,105}. En estadios tardíos (2-8 meses), la retina de animales diabéticos sufre un estado de estrés oxidativo crónico caracterizado por un aumento de EROs principalmente $O_2^{\bullet-}$ y H_2O_2 ; disminución de la capacidad antioxidante total; disminución de la expresión y actividad de enzimas antioxidantes (SOD, CAT y GPx) y la disminución de cofactores involucrados en el reciclamiento de moléculas antioxidantes (NADH y NADPH). Además, se ha detectado la presencia de marcadores de daño oxidativo como la carbonilación de proteínas, incremento de los niveles malondialdehído un producto de la oxidación de lípidos y la presencia de 8-hidroxiguanosina¹⁰⁶⁻¹¹⁰. En pacientes diabéticos *post mortem*, se ha observado el incremento de marcadores de daño oxidativo en el vítreo y la retina¹¹¹. La activación de las NOX y el incremento del flujo de electrones a través de la cadena de transporte de electrones mitocondrial, son los sistemas principales generadores de EROs en la retina durante la diabetes^{81,112,113}.

3.6 Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2) en la respuesta antioxidante inducible.

El estado redox celular se regula a través de factores de transcripción sensibles a los cambios en los niveles de oxidantes/reductores, estos factores inducen la transcripción de enzimas antioxidantes para restablecer el estado redox celular^{92,102}.

Entre los principales factores que participan en esta regulación se encuentran a la Proteína Activadora 1 (AP-1) y al Factor Nuclear Eritroide 2 Relacionado al Factor 2 (Nrf2; Nuclear factor erythroid 2–related factor 2) ⁹⁴.

El Nrf2 se considera como el principal factor de transcripción que regula la respuesta antioxidante debido a que regula la transcripción de una gran diversidad de enzimas antioxidantes y enzimas que promueven la formación de cofactores reductores (NADH y NAD(P)H) necesarios en el reciclamiento de moléculas antioxidantes ¹¹⁴.

Nrf2 es miembro de la familia Capín´Collar (CnC), la cual comprende a los factores: Skinhead (SKN-1) de *Caenorhabditis Elegans*; Capín´Collar de *Drosophila melanogaster*; Factor Nuclear Eritroide 2, subunidad p45 (p45 NFE2), factores relacionados a NFE2 (Nrf1, Nrf2 y Nrf3) y a las proteínas con homología BTB-CNC 1 y 2 (Bach1 y 2) de vertebrados ¹¹⁵. La familia CNC en mamíferos está implicada en el desarrollo del sistema hematopoyético y contribuye al mantenimiento de la homeostasis en respuesta a varios tipos de estrés. Esta familia de factores de transcripción contiene un dominio de cremallera básica de leucina (b-ZIP) y una región conservada de 43 aminoácidos denominada dominio CnC localizado en el amino terminal (N-terminal) del dominio de unión al DNA. El dominio b-ZIP consta de una región con aminoácidos básicos responsables de la interacción con el DNA y una región hidrofóbica constituida por un patrón de un residuo de leucina por cada 7 aminoácidos, esta región hidrofóbica permite la heterodimerización de Nrf2 con otros factores de transcripción ¹¹⁶.

3.6.1 Estructura del Nrf2

Nrf2 contiene siete dominios de homología Nrf2-ECH (Neh 1-7) ¹¹⁷. El dominio Neh1 contiene las regiones CnC y bZIP, a través de las cuales se da la formación de heterodímeros con las proteínas pequeñas de fibrosarcoma de músculo aponeurótico (Mafs; small musculoaponeurotic fibrosacoma) ¹¹⁸; el dominio Neh2 contiene los motivos DLG y ETGE, involucrados en la retención y degradación de Nrf2 mediada por Keap1. El dominio Neh3 contiene un sitio de trans-activación, el cual recluta a la proteína de unión al DNA ATPasa/helicasa (CHD6; Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 6). Los dominios Neh4 y Neh5 son dominios de

transactivación ricos en residuos acídicos, y éstos interactúan con el coactivador proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CBP; CREB (cAMP Responsive Element Binding protein) Binding Protein) y con el cofactor nuclear RAC3/AIB1/SRC-3 ¹¹⁹. El dominio Neh6 contiene a los motivos DSGIS y DSAPGS que regulan la degradación de Nrf2 mediada por la proteína con repeticiones β -Transducina (β -TrCP) y el dominio Neh7 está involucrado en la represión de la actividad transcripcional de Nrf2 mediada por el receptor α retinoide X (RXR) ^{104,120,121}.

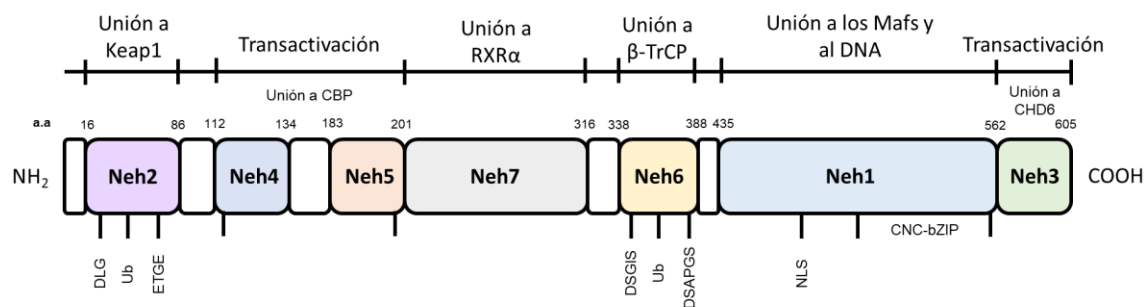


Figura 5. Dominios funcionales del Nrf2. Modificado de Qin¹²²

3.6.2 Mecanismos de regulación en la activación del Nrf2

En condiciones basales, el Nrf2 es continuamente ubiquitinado por diferentes sistemas promoviendo su rápida degradación. Se ha estimado que en condiciones basales Nrf2 presenta un tiempo de vida medio de aproximadamente 20 min, cuando las células se exponen a estrés oxidativo o agentes químicos que activan al Nrf2, este incrementa su vida media entre 50-100 min.

El principal sistema involucrado en la degradación de Nrf2, es el complejo ubiquitina ligasa dependiente de la proteína 1 asociada a elementos ECH similar a Kelch (Keap1; Kelch-like ECH-associated protein 1)⁸⁹. La Keap1 está compuesta por cinco dominios estructurales: una región N-terminal, un dominio tramtrack y Bric-a-Brac (BTB), una región de intervención central, un dominio contenedor de repeticiones tipo Kelch y una región C-terminal ¹⁰⁴. La degradación de Nrf2 mediada por Keap1 requiere la formación de un complejo ubiquitina ligasa E3, compuesto por culina 3 (Cul3; Cullin 3) – proteína-1 caja de anillo (RBX1) - Keap1 (E3^{Keap1}). La retención de

Nrf2 en el citoplasma necesita la formación de homodímeros de Keap1 a través de su dominio BTB, este dominio también se encarga de reclutar a las proteínas Cul3, RBX1 y a la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) del complejo de ubiquitinación^{103,104}. Los dominios Kelch del homodímero de Keap1 interactúan con los motivos DLG y ETGE del dominio Neh2 de Nrf2. En condiciones de equilibrio redox, Keap1 promueve la poli-ubiquitinación de Nrf2 en los residuos de lisina 44, 50, 52, 53, 56, 64 y 68 ubicados entre los motivos DLG y ETGE, promoviendo la posterior degradación de Nrf2 por el proteasoma 26S¹¹⁴.

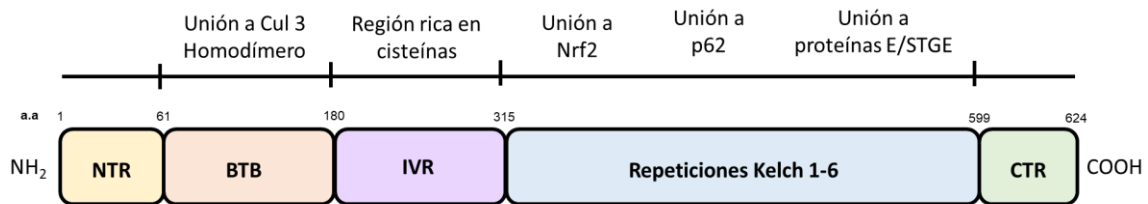


Figura 6. Dominios funcionales de Keap1. Modificado de Qin¹²²

La región de intervención de Keap1 es rica en residuos de cisteína, y estos residuos actúan como sensores redox. Los residuos de cisteína 151, 273 y 288 de Keap1 son altamente reactivos y susceptibles a modificaciones covalentes como la oxidación y la nitrosilación. Estas modificaciones promueven cambios conformacionales en Keap1 que permiten la liberación del Nrf2 y su posterior translocación al núcleo. La cisteína 151 en la IVR es el principal sensor redox, debido a que forma un puente disulfuro intramolecular en el homodímero de Keap1^{123,124}.

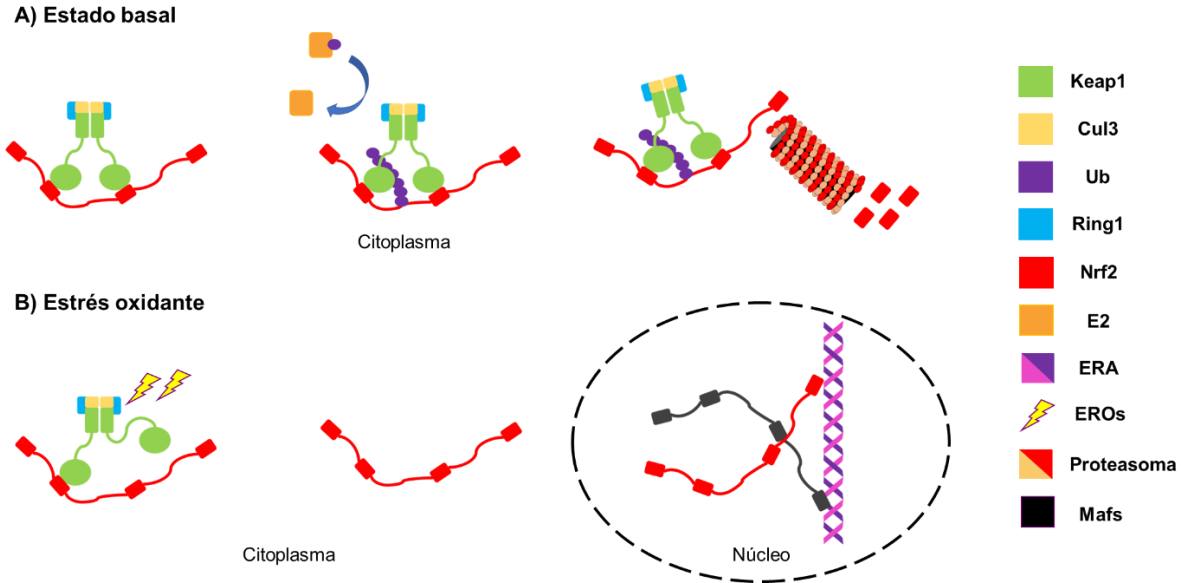


Figura 7. Regulación negativa del Nrf2 mediada por Keap1. En condiciones basales Nrf2 es constantemente ubiquitinado en el citoplasma por Keap1 y posteriormente degradado por el proteasoma 26S. Bajo un ambiente oxidativo las cisteínas de Keap1 sufren un proceso de oxidación provocando un cambio conformacional en la molécula liberando al Nrf2, Nrf2 se transloca al núcleo donde forma heterodímeros con los factores Mafs. El heterodímero Nrf2-Mafs se une al elemento de respuesta antioxidante activando la transcripción de sus genes blanco. Especies reactivas de oxígeno (EROs); proteína con repeticiones tipo Kelch, (Keap1); Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2); Pequeñas proteínas de fibrosarcoma muscular (Mafs); Enzima conjugadora de ubiquitina (E2); Elemento de respuesta antioxidante (ERA); Cullina 3 (Cul3); Nuevo gen relativamente interesante (Ring1); Ubiquitina (Ub).

El segundo mayor represor de Nrf2, es la proteína con repeticiones de β -transducina (β -TrCP; β -transducin repeat-containing protein). Las regiones N-terminal y C-terminal del dominio Neh6 del Nrf2, contienen las secuencias DSGIS y DSAPGS respectivamente, las cuales son secuencias consenso de unión a β -TrCP. β -TrCP es una proteína adaptadora de sustrato para el complejo ubiquitina ligasa compuesto por la proteína 1 asociada a la cinasa de fase S (Skp1)- Cullina 1 (Cul1)- y la Proteína de caja F (SCF) ($E3^{\beta\text{-TrCP}}$). A diferencia de la degradación mediada por $E3^{\text{Keap1}}$ que requiere la unión estricta a los motivos ETGE y DLG, los motivos DSGIS y DSAPGS pueden reclutar de forma independiente a β -TrCP y promover la ubiquitinación de Nrf2¹¹⁷. Se ha reportado que la fosforilación de los residuos de serina en el motivo DSGIS por GSK-3 β promueve una acelerada ubiquitinación de Nrf2 mediada por β -TrCP. En contraste, el motivo DSAPGS no es afectado por la actividad de GSK-3^{117,125}.

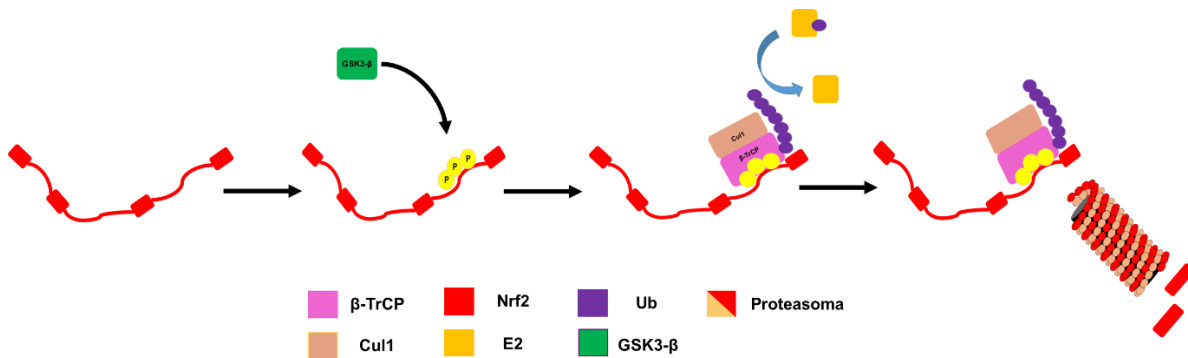


Figura 8. Regulación negativa del Nrf2 mediada por GSK3-β. La fosforilación de Nrf2 por la GSK3-β permite el acoplamiento de la β-TrCP a Nrf2, la cual promueve la ubiquitinación del Nrf2 y su posterior degradación por el proteasoma 26S. Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2); enzima conjugadora de ubiquitina (E2); Cullina 1 (Cul1); ubiquitina (Ub); proteína con repeticiones de β-transducina (β-TrCP); cinasa de glucógeno sintasa (GSK3-β).

3.6.3 Elemento de respuesta antioxidante (ARE)

Dentro del núcleo, el Nrf2 forma heterodímeros con los factores de transcripción de la familia Mafs (MafK, MafG y MafF) a través de sus dominios bZIP. El heterodímero Nrf2-Maf puede unirse a una secuencia específica en el DNA denominada elemento de respuesta antioxidante (ARE; Antioxidant Response Element) y promover la transcripción de enzimas antioxidantes^{89,126}.

Los AREs son secuencias potenciadoras que actúan en cis en los sitios promotores de enzimas antioxidantes. Las secuencias dentro del ARE son esenciales para la regulación específica de un grupo de genes en un contexto particular. Los AREs se agrupan en cuatro clases diferentes: la clase 1 contiene un ARE de 16 pb con una secuencia de tres nucleótidos denominado motivo TMA (T=timina, M=adenina/citosina, A=adenina) en su extremo 5' y un sitio de unión a AP-1 (TGASTCA; S=citosina o guanina, G=guanina, C=citosina): 5'-**TCA**ccc**TGAGTCA**GCG-3'. La clase 2 contiene un ARE de 16 pb con un motivo TMA y la ausencia de un sitio de unión a AP-1: 5'-**TAA**tgg**TGAC**caa**AGCA**-3'. La clase 3 tiene un ARE de 11 pb que carece del motivo TMA y contiene un sitio de unión a AP-1: 5'-tg**TGACTCA**gc-3'. Finalmente, la clase 4 tiene un ARE de 11 pb que carece del motivo TMA y del sitio de unión a AP-1: 5'-gga**TGAC**at**Ag**-3'. Los AREs de clase I y II que contienen el motivo TMA son activados por el heterodímero Nrf2-Mafs^{104,126,127}.

Aunque el ARE se ha descrito principalmente en los promotores de enzimas antioxidantes, éste también se ha encontrado en enzimas que están involucradas en el metabolismo de carbohidratos y lípidos, inflamación, degradación de proteínas y en diversos factores de transcripción¹¹⁴.

3.6.4 Alteraciones del Nrf2 en la retinopatía diabética

Diversos autores han observado alteraciones en la expresión y activación del Nrf2 durante la progresión de la RD. En la retina de animales diabéticos de 4-6 meses se ha observado un incremento de los niveles de Nrf2, pero su acumulación nuclear, unión al ARE y actividad transcripcional se encuentran disminuidas, lo que conlleva a la disminución de la expresión de sus genes blanco como la HO-1 y la NQO1^{109,128,129}. A la par se ha observado un incremento de la expresión de Keap1 y un aumento de la asociación de Nrf2 con Keap1 en el citoplasma, lo que provoca la disminución de su translocación al núcleo durante la diabetes^{128,130}.

En la retina de animales diabéticos se han observado alteraciones de los niveles del Nrf2 desde tiempos muy cortos de la enfermedad. En un estudio previo del laboratorio, se analizaron los niveles del Nrf2 en la retina de ratas diabéticas por STZ. Desde los 7 días de la inducción de diabetes se observó una disminución de los niveles totales y nucleares del Nrf2, de igual modo una disminución de su expresión génica¹³¹. La disminución de los niveles del Nrf2 fue temporal, puesto que a los 45 días de diabetes se observó un incremento tanto del mensajero como de la proteína superior a los de animales normales¹³¹ (Sección 10.1). Estos resultados indican que durante la diabetes existen alteraciones temporales en la expresión del Nrf2 que pueden llevar al estrés oxidativo observado a tiempos prolongados de la enfermedad.

La mayoría de los estudios que han evaluado la contribución del estrés oxidativo en la RD, se han realizado a través del análisis de la retina completa, lo que no ha permitido identificar cual es la contribución de cada tipo celular en la formación del estrés oxidante. Las CGM son uno de los primeros tipos celulares en presentar alteraciones durante la RD, por lo que éstas podrían presentar modificaciones en

su homeostasis redox que lleven al desbalance de sus funciones fisiológicas ocurridas durante la diabetes.

4. Hipótesis

La exposición a altas concentraciones de glucosa produce alteraciones en la función del factor de transcripción Nrf2, lo cual propicia un desbalance en el estado redox celular, llevando a un estrés oxidativo en cultivos de células gliales de Müller de la retina de la rata.

5. Objetivos

5.1 Objetivo general:

Determinar si las altas concentraciones de glucosa causan estrés oxidativo en las CGM en cultivo debido a una alteración en la función del Nrf2.

5.2 Objetivos particulares:

En cultivos primarios de células gliales de Müller de rata expuestas a 5 mM y 25 mM de glucosa:

- Evaluar el curso temporal de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.
- Determinar el curso temporal de los niveles totales, citoplasmáticos y nucleares del Nrf2.
- Determinar la activación del Nrf2 por medio de la transcripción de sus genes blanco.
- Evaluar las principales vías de señalización que regulan los niveles de Nrf2.
- Examinar la viabilidad de las CGM.

6. Métodos

Todos los procedimientos realizados en este trabajo estuvieron de acuerdo con las normas del Instituto Mexicano de Investigación en Salud (DOF. NOM-062-Z00-1999) y con la Declaración sobre el Uso de Animales en Investigación Oftálmica y de la Visión de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología. El protocolo fue aprobado por el Comité de Ética en Experimentación Animal del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM (número de protocolo RSS43-14). Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices y reglamentos ARRIVE guidelines¹³².

6.1 Cultivo primario de células gliales de Müller de la retina de la rata.

Ratas Long-Evans de siete días postnatales fueron decapitadas y se les enuclearon los ojos bajo condiciones de esterilidad. Los ojos, se incubaron en Medio Dulbecco's (25 mM glucosa, 2.5 µg/mL anfotericina B, 100 unidades (U)/ml penicilina y 2 mM glutamina; sigma D6546) toda la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Al otro día, los ojos se lavaron con etanol al 70% e incubaron ahora con 0.1% de tripsina en solución salina de Hank libre de calcio y magnesio (HBSS-CMF; sigma H4641, 40 mM NaHCO₃, 2.5 µg/mL anfotericina B, 100 U/ml penicilina) durante 30 min a 37 °C. Después de la incubación con tripsina los ojos se colocaron en Medio Dulbecco's con 10 % de suero (DMEM-SFB; 5.5 mM glucosa, 2.5 µg/mL anfotericina B, 100 U/ml penicilina, 2 mM glutamina y 10 % de suero fetal bovino (SFB); sigma D6546).

Por medio de una incisión ecuatorial en el ojo se eliminó la parte anterior y se obtuvo la copa óptica, de la cual la retina fue separada agitándola suavemente en el medio DMEM-SFB. Las retinas se recuperaron en 3 ml de DMEM-SFB con 100 µL de desoxirribonucleasa I (DNasa 4000 U/mL) y se disociaron por medio de pasajes mecánicos a través de una pipeta Pasteur. La suspensión celular se dejó sedimentar durante 20 s y se recuperó el sobrenadante. El sedimento celular se resuspendió disoció nuevamente en 3 mL de DMEM-SFB, y este sobrenadante recuperado se juntó con el primero. El conteo celular se determinó a través de una cámara de Neubauer.

Las células se cultivaron en cajas de 6 pozos (1,000,000 células/pozo), 24 pozos (500,000 células/pozo) y 96 pozos (100,000 células/pozo) de acuerdo con el experimento. A los tres días de la siembra, las células se incubaron con medio DMEM sin suero por 6 h para inducir la muerte neuronal y obtener un cultivo con alta pureza. Al terminar la incubación las células se lavaron golpeando con el medio de cultivo el fondo del pozo, se les retiró el medio y se adicionó DMEM-SFB nuevo. Las células se crecieron en una incubadora a 37 °C con una atmosfera húmeda (5% CO₂/95% aire) durante 15 días alcanzando una confluencia aproximada del 90%. Cada tercer día se les cambio el medio de cultivo a las células por DMEM-SFB nuevo.

6.2 Tratamientos experimentales.

Se incubaron a las CGM bajo concentraciones normales (G5; 5 mM) o altas (G25; 25 mM) de glucosa por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Los experimentos con G5 y G25 se corrieron en paralelo y el medio inicial se mantuvo constante durante todo el tiempo del experimento. Como control osmótico las células expuestas a medio de cultivo con G5 se complementaron con 19.5 mM de manitol.

6.3 Inmunohistoquímica.

Las células cultivadas sobre cubreobjetos se lavaron dos veces con buffer de fosfatos (PBS) frío y se fijaron con paraformaldehído al 4% con 4 % de sacarosa en PBS por 10 min. Las células se lavaron tres veces con PBS por 10 min, se permeabilizaron con saponina al 0.4% en PBS por 7 min y bloquearon con 1% de albumina de SFB-PBS durante 60 min. Las células se incubaron toda la noche con los anticuerpos: anti-Nrf2 (1:250; abcam, ab137550), anti-Keap1 (1:250; Santa Cruz, sc-33569) y anti-vimentina (1:250; Dako, Mo72529) en PBS-1 % de albumina. Posteriormente las células se lavaron tres veces con PBS por 10 min y se incubaron con un anticuerpo secundario conjugado con Cy3 (1:500, Chemicon) en PBS-1 % de albumina por 2 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda protegida de la luz. Para teñir los núcleos, las células fueron incubadas con 300 nM de DAPI (D4592, Sigma) en PBS por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron tres veces con PBS por 10 min. Los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos con glicerol

al 79 % (V/V en PBS) y almacenaron protegidos de la luz. Como controles de tinción los anticuerpos primarios fueron omitidos. Las muestras se examinaron usando un microscopio de epifluorescencia (Nikon Alphaphot) y fotografiadas con una cámara digital Nikon DXM1200 (Nikon Corp., Tokyo, Japón).

La cuantificación de la fluorescencia se calculó como la corrección total de fluorescencia por célula (CTCF; correct total cell fluorescence). $CTCF = \text{densidad integrada} - (\text{área de selección} \times \text{media de las lecturas de fondo de fluorescencia})^{133}$. Para cada imagen se emplearon tres áreas de fondo para normalizar la fluorescencia de fondo.

La cuantificación del área, perímetro y circularidad de las células se determinó a través del software libre Cell Profile V4.0 ^{134,135}. El perímetro se determinó como el número total de píxeles alrededor del límite de cada célula (unidad de longitud). El área se determinó como el número de píxeles en la región seleccionada por cada célula (unidad cuadrada). La circularidad fue calculada como $4 \cdot \pi \cdot (\text{área} / \text{perímetro}^2)$, un puntaje de 1 representa a un objeto circular y conforme baja el puntaje el objeto se aparta de la circularidad.

6.4 Western Blot

Para la extracción de proteínas y posterior identificación por Western blot, las células (3 pozos de caja de 6) se lavaron dos veces con PBS para retirar el medio de cultivo. Las células se rasparon, se homogenizaron con 100 μ L de buffer de lisis (1 mM EGTA, 158 mM NaCl, 10 mM Na_2MoO_4 , 25 mM NaF, 10 mM Tris-HCL, 100 mM EDTA, 1 mM Na_3VO_4 , 1 mM PMSF, 1% Tritón X-100, 0.2 % SDS y anti proteolíticos) y almacenaron a -80 °C durante una noche. Al día siguiente los homogenados se incubaron a 1,200 rpm por una hora a 4°C y posteriormente se centrifugaron a 17,000 g durante 30 min. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C, hasta su uso posterior.

Para el fraccionamiento subcelular, las células (6 pozos de caja de 6) se homogenizaron con 100 μ L de buffer de homogenización (50 mM HEPES, 0.3 M sacarosa, 1 mM EDTA y anti proteolíticos) y se incubaron en hielo durante 15 min.

A continuación, el homogenado se centrifugó a 6,500 g durante 15 min, el pellet recuperado es la fracción nuclear y el sobrenadante la fracción citoplasmática. La fracción nuclear se homogenizó en 100 µL de buffer nuclear (50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1% Tritón X-100, 1% SDS, anti proteolíticos). Ambas fracciones se incubaron durante 2 horas con agitación a 1,200 rpm a 4°C y se centrifugaron a 17,000 g durante 30 min. Los sobrenadantes se almacenaron a -80°C, hasta su posterior uso.

La expresión de las proteínas se determinó mediante la técnica de Western Blot. 25 µg de proteína se hirvieron en Buffer Laemmli's por 5 min y posteriormente se separaron en un gel SDS/PAGE al 10% junto con marcadores de peso molecular (Precision Plus Protein Kaleidoscope standards, Bio-Rad). Las proteínas se transfirieron a una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de acuerdo con técnicas estándar. Después de la transferencia, las membranas se tiñeron con Ponceau S para confirmar la misma carga y estabilidad de las proteínas en todos los carriles. Las membranas se bloquearon con TBS-Tween-5% leche libre de grasa (P/V) (Trizma 20 mM, NaCl 136 mM, Tween-20 0.1%, pH 7.6) para bloquear sitios no específicos de unión a proteínas, durante 4 h a temperatura ambiente. Después del bloqueo las membranas se incubaron por 36 h a 4°C con los siguientes anticuerpos primarios: Nrf2 (1:800; Abcam, ab137550), Keap1 (1:500; Santa Cruz, sc-33569), H2b (1:1000; Cell Signaling, 12364), Actina (1:3000, Abcam #ab-3280), iNos (1:1000, Abcam, ab95441), GSK3-β (1:1000; Cell Signaling, 9315), P-GSK3 (Ser9) (1:800; Cell Signaling, 9323), NF-κB (1:1000, Cell Signaling, 8242), Vimentina (1:1000, Dako, Mo72529), P-Akt (Ser473) (1:1000, Cell Signaling, 92715), Akt (1:1000, Cell Signaling, 92727) e IL-1 (1:1000, Abcam, ab9787); diluidos en TBS-Tween con 0.25 % de albumina de suero fetal bovino y 0.01% de timerosal. Al término de la incubación, las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween-1 % de leche libre de grasa (P/V) por 10 min y posteriormente se incubaron con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (1:8000; Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore Corp), al finalizar la incubación las membranas se lavaron tres veces con TBS-Tween-1 % de leche libre de grasa (P/V) por 10 min. La visualización de la señal se detectó utilizando un

sustrato quimio-luminiscente para peroxidasa (Millipore Corp, Billerica, Ma.) y la intensidad de las señales fue revelada en placas de fotografía Hyperfilm ECL (GE Healthacare Ltd). Las placas se digitalizaron con el programa DigiDoc Rt Alfa (Alpha Innotech). La cuantificación de las densidades ópticas relativas de las bandas se realizó a través del software Alpha Ease FC Stand Alone (Alpha Innotech). La carga de proteína se normalizó usando los valores de densidad óptica de la actina (totales y fracción citoplasmática) y la H2b (fracción nuclear). Los niveles relativos de las proteínas bajo condiciones experimentales se obtuvieron al comparar las densidades ópticas de las muestras experimentales con la de sus respectivos controles en el mismo Western Blot¹³⁶.

La proteína total de las muestras se determinó mediante el método de Lowry, usando el kit comercial DC Protein Assay (Bio-Rad), utilizando albumina como estándar.

6.5 Aislamiento del ARNm y la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR)

El mRNA fue aislado usando TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Las células (6 pozos de la caja de 6) se rasparon con 1 mL de TRIzol y se almacenaron en congelación a -70 °C por una noche. Las células se homogenizaron e incubaron a temperatura ambiente por 5 min. A cada muestra se le adicionó 200 µL de cloroformo por cada mL de TRIzol, se agitaron vigorosamente durante 15 s e incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12 000 g por 15 min a 4 °C, y al finalizar la centrifugación se recuperó la fase acuosa, a la cual se le adicionaron 200 µL de isopropanol por cada mL de TRIzol utilizado, las muestras se incubaron durante 30 min a -70 °C para precipitar el mRNA, al finalizar la incubación las muestras se centrifugaron a 12, 000 g por 10 min a 4 °C. Los pellets recuperados se lavaron con 300 µL de etanol al 75% y luego se centrifugaron a 12, 000 g por 5 min a 4 °C. Se retiró el exceso de alcohol fue retirado y los pellets se dejaron secar a temperatura ambiente durante 15 min. Los pellets se disolvieron en 30 µL de agua libre de RNasas.

La concentración del mRNA se determinó por medio de NanoDrop 1000 (ThermoScientific, USA) usando una absorbancia de 260 nm; la pureza del mRNA se determinó a través de la relación de absorbancia 260/280, donde todas las muestras presentaron un valor de 2 indicando una alta pureza del mRNA.

La síntesis del cDNA a partir del mRNA se realizó utilizando la transcriptasa reversa M-MLV (M-MLV-RT; Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Promega, M170A). La mezcla de síntesis del cDNA contiene: 14 µL del mRNA, 5 µL de Buffer de Reacción M-MLV 5X, 2.5 µL de dNTPs (10 mM), 0.5 µL de inhibidor de ribonucleasa recombinante RNasin (25 U), 0.5 µL de M-MLV-RT (200 U) y 2.5 µL de Oligo dT (500 µg/mL). La reacción se incubó por 6 h a 42 °C y posteriormente se almacenó a -20 °C. La concentración del cDNA se determinó por medio de NanoDrop 1000 (ThermoScientific, USA) usando una absorbancia de 260 nm.

La RT-PCR fue realizada con el termociclador LightCycler 2.0 (Roche), utilizando la siguiente mezcla de reacción: 1.5 µL de agua libre de RNasas, 5 µL de Green I Master (Roche; 04 707 516 001), 1 µL de primer follower (5 µM), 1 µL de primer reverse (5 µM) y 1 µL de la muestra (1000 ng). Los primers usados se describen en la siguiente tabla (información adicional en anexo 1).

Primers (5´-3´)	
Tiorredoxina (TXN)	For: ATGACTGCCAGGATGTTGCT
	Rev: ACTCCCCAACCTTTTGACCC
Superóxido dismutasa 2 (SOD 2)	For: GCTTGAATTGCTTGGACGCT
	Rev: GCCCCAACACAGAGATGGAA
Glutamato-cisteína ligasa, subunidad catalítica (GCLc)	For: GAGCGAGATGCCGTCTTACA
	Rev: TTGCTACACCCATCCACCAC
Actina B (ACTB)	For: ATGTGGATCAGCAAGCAGGA
	Rev: AAGGGTGTA AACGCAGCTCA
Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2)	For: CACATCCAGACAGACACCAGT
	Rev: CTACAAATGGGAATGTCTCTGC
Kelch-like ECH-associated protein (Keap1)	For: CATCGGCATCGCCA ACTTC
	Rev: AAGAACTCCTCCTCCCCGAA

Las muestras se corrieron en el termociclador de acuerdo con los siguientes ciclos de temperatura: la desnaturalización inicial de un ciclo a 95 °C por 10 s; seguido por la amplificación con 50 ciclos a 95 °C por 10 s, 62–69 °C por 10 s y 72 °C por 10 s; seguido por el análisis de la curva *melting* con un rango de temperaturas desde los 60°C hasta los 95 °C. Cada muestra se amplificó por duplicado y se usó la media del valor de Ct (cycle threshold) para determinar el porcentaje de cambio en la expresión. El porcentaje de cambio fue calculado usando el método comparativo de Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)¹³⁷, donde la expresión de los niveles de RNAm se normalizó con la expresión de ACTB.

6.6 Determinación de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno

La generación intracelular de EROs se cuantificó a través de dos marcadores sensibles a EROs: diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA; detecta principalmente H₂O₂ y superóxido) y el dihidroetidio (DHE; marcador específico de superóxido). La generación de ERNs fue determinada por el 4-amino-5-metilamino 2',7'-difluoresceína (DAF-FM; detecta principalmente óxido nítrico).

Las CGM se cultivaron en placas de 96 pozos bajo diferentes condiciones experimentales. Al terminar los tratamientos, las células se lavaron con PBS e incubaron con 25 µM H₂DCFDA (Molecular Probes, Ref-C400) o DAF-FM (Life technologies, D-23842) en PBS por 30 min a 37 °C en una atmósfera húmeda con 95% aire/ 5% CO₂. A continuación, las células se lavaron con PBS y se les añadieron 100 µl de PBS para realizar la medición. Se midió la fluorescencia con un lector de placas multi modal (FlexStation; Molecular Devices) a 488 nm de excitación y 535 nm de emisión. Los niveles de EROs y ERNs se expresaron como el porcentaje de la fluorescencia relativa por µg de proteína (método de BCA, Sigma, 500-0006). Para la microscopia, las células se cultivaron sobre cubreobjetos e incubadas con los reactivos bajo las mismas condiciones, las muestras se montaron y visualizaron de acuerdo con los procedimientos descritos para la inmunohistoquímica.

Para la tinción con DHE, las células se cultivaron sobre cubreobjetos con 10 µM DHE (Sigma, D7008) en medio DMEM por 30 min a 37 °C. Las células se lavaron

tres veces con PBS, se montaron y visualizaron de acuerdo con los procedimientos de inmuno-histoquímica.

6.7 Determinación de los niveles de GSH reducido.

Las células (6 pozos de caja de 6) se lavaron con PBS frío y aisladas en buffer GSH frío (1% ácido sulfosalicílico, 0.1% Tritón X-100, 5 mM EDTA en buffer fosfatos (0.1 M), pH 7.5). Se midieron los niveles de GSH en los extractos celulares por el método de reciclamiento DTNB-glutatión disulfuro reductasa¹³⁸. Las concentraciones de GSH en las muestras se determinaron usando una curva estándar de calibración de GSH. La concentración de GSH en la muestra se expresó como nanomoles de GSH por miligramo de proteína.

6.8 Actividad de catalasa

La actividad de catalasa se determinó por medio de la disminución de la concentración de H₂O₂. Las células se homogenizaron con 0.1% de Tritón X-100 en PBS y centrifugaron a 17,000 g por 30 min a 4°C. 15 µL de la muestra se incubó con 235 µL de H₂O₂ (5 mM). La disminución del H₂O₂ se midió a 240 nm por 3 min en intervalos de 30 s usando un lector de microplacas. La actividad de la catalasa en las muestras fue determinada usando una curva de calibración estándar de catalasa (0-150 u/mL). La actividad de la catalasa se expresó como unidades por miligramo de proteína, en donde una unidad descompone 1 µmol de H₂O₂ a oxígeno y agua a una concentración de 10.3 mM por minuto a pH 7.0 y 25°C.

6.9 Viabilidad celular

La viabilidad celular fue medida a través del ensayo de 3-(4,5- dimetiliazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). Las células cultivadas en cajas de 96 pozos se incubaron con una solución de MTT (5 mg/mL en PBS) por 4 h a 37 °C. Al término de los tratamientos, se removió el medio de incubación y el precipitado se disolvió con 200 µL de dimetil sulfoxido (DMSO). La densidad óptica a 510 nm se midió en un lector de microplacas. Cada experimento se realizó por triplicado. La viabilidad celular se calculó como el porcentaje de la densidad óptica con respecto a aquella de las células expuestas a glucosa normal (G5).

6.10 Ensayo de la deshidrogenasa láctica (LDH)

Para la determinación de la actividad de la LDH en el medio de cultivo, se colectaron 500 μ L del medio cultivo de los diferentes tiempos de incubación y se centrifugaron a 5,000 g por 10 min. 100 μ L del sobrenadante se incubó con 50 μ L de solución de NADH (120 μ M de NADH en 0.1 M de PBS) por 3 min a temperatura ambiente. La reacción se inició al adicionar 50 μ L de solución de piruvato (2.3 mM piruvato en 0.1 de PBS). La actividad de LDH de las muestras fue determinada por la disminución de la absorbancia del NADH a 340 nm por 4 min usando un lector de microplaca. Como control positivo las células se lisaron con 1 % de Tritón X-100 por 10 min a temperatura ambiente. La actividad de LDH fue expresada como unidades por ml, en donde una unidad equivale a la oxidación de 1 μ mol de β -NADH por minuto.

6.11 Ensayo de TUNEL

Para el ensayo de TUNEL, se usó el kit de detección de muerte celular in-situ (Roche Diagnostic). Las células en cubreobjetos fueron fijadas como se describió en el apartado de inmunohistoquímica y permeabilizadas con 0.1% Tritón X-100 en 0.1 % de buffer citratos por 2 min en hielo, luego fueron incubadas con la reacción de TUNEL a 37 °C por 1 h. La incubación sin la enzima deoxinucleotidil transferasa fue considerada como el control negativo. Para el control positivo las células fueron tratadas con DNAsa I (0.1 mg/mL) por 15 min a 37 °C antes de la reacción de TUNEL. A las muestras se le adicionó DAPI, montaron y visualizaron de acuerdo con los procedimientos de inmunohistoquímica. Las células apoptóticas y no apoptóticas fueron contadas en múltiples campos seleccionados aleatoriamente y los datos fueron presentados como el porcentaje de células apoptóticas respecto del total.

6.12 Análisis estadístico

Todos los resultados se expresaron como la media \pm el error estándar (\pm SEM). La valoración de la distribución normal de los datos se llevó a cabo mediante la prueba de Shapiro-Wilk y se utilizó la prueba de Levene para evaluar la homogeneidad de la varianza entre los grupos experimentales. La significancia estadística se determinó mediante la prueba de t de Student o ANOVA seguido de la prueba post

hoc de Tukey para comparaciones múltiples, ya que la distribución de los datos fue determinada como normal. Se definió una diferencia significativa entre el grupo control y el experimental con un valor de $P \leq 0.05$. Los detalles específicos de cada experimento se proporcionan en las leyendas de las figuras correspondientes. Se utilizó el software GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, C.) para la realización de las gráficas y el análisis estadístico.

7. Resultados

7.1 Cultivos primarios de células gliales de Müller.

Las CGM en cultivo presentaron una morfología elongada tipo fibroblasto, ricas en citoplasma con gránulos densos y uninucleadas (Fig. 9.A). La pureza del cultivo se determinó por la inmunoreactividad positiva a vimentina (Fig. 9.B) y glutamina sintetasa (Fig. 9.C) e inmunoreactividad negativa a las proteínas RPE65 (Fig. 9. D) y MAP2A (Fig. 9.E), marcadores del EPR y neuronas respectivamente.

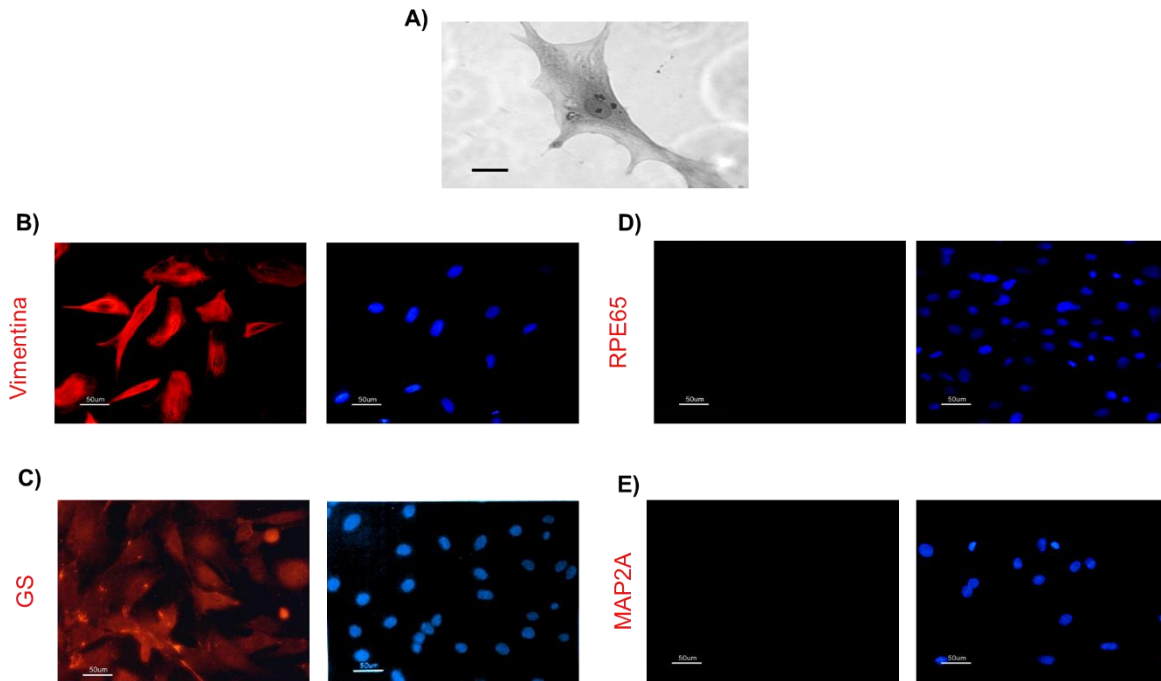


Figura 9. Células gliales de Müller en cultivo. Morfología de las CGM en cultivo a los 15 días de crecimiento (A). Las células expresaron marcadores específicos de las CGM como vimentina (B) y glutamina sintetasa (C) y no fueron inmunopositivas a marcadores de EPR (RPE65; D) y neuronas (MAP2A; E). Núcleos en azul (DAPI). Barra de escala: 100 μm (a); 50 μm (b, c, d y e).

7.2 Efecto citotóxico de las altas concentraciones de glucosa sobre las células gliales de Müller.

La viabilidad celular se evaluó por medio del ensayo del MTT. Las CGM incubadas con altas concentraciones de glucosa (G25) mostraron una disminución significativa en la viabilidad celular a las 6 h, pero ésta se restableció a los niveles del control a las 12 h y se mantuvo constante a tiempos posteriores (Fig. 10.A). El efecto citotóxico de la exposición a G25 se determinó a través de liberación de la LDH al medio de cultivo (muerte por necrosis) y por el ensayo de TUNEL (muerte por apoptosis). Las CGM expuestas a G25 por diferentes periodos de tiempo (1-48 h), no mostraron cambios significativos en la actividad de la LDH (Fig. 10.B), ni células positivas para el ensayo de TUNEL (Fig. 10.C).

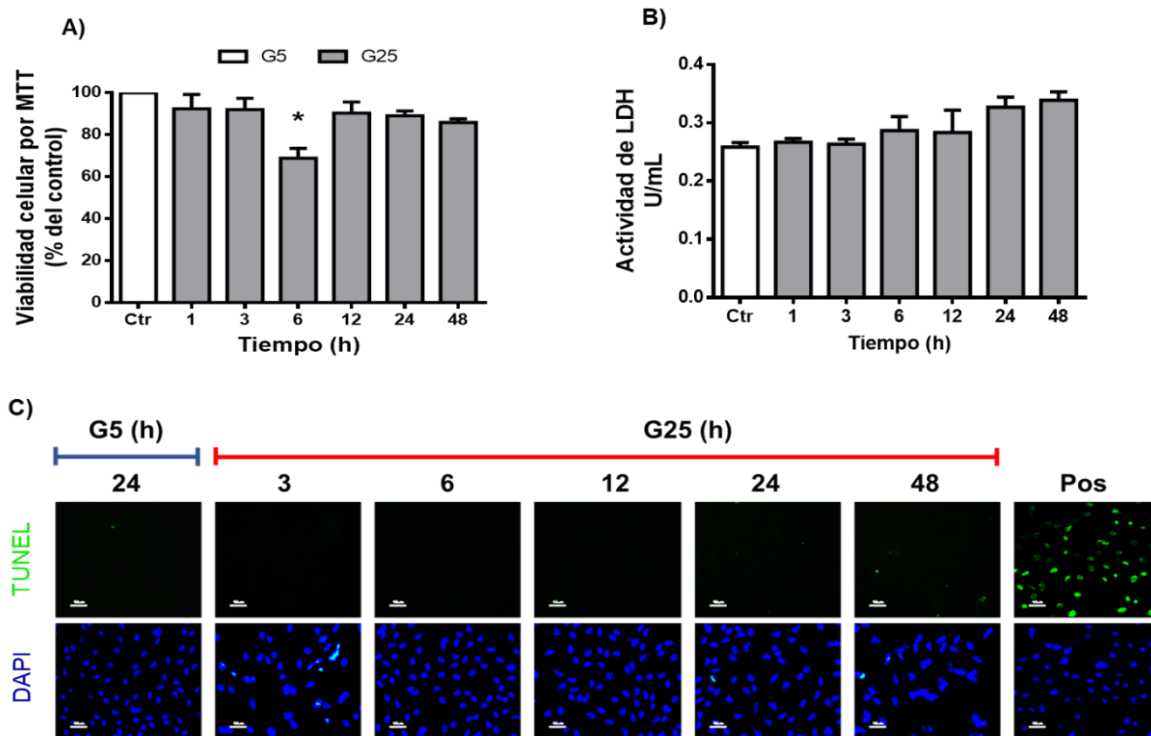


Figura 10. Las altas concentraciones de glucosa no afectan la viabilidad de las CGM en cultivo. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). La viabilidad celular de las CGM expuestas a G25 se expresó como el porcentaje de la densidad óptica con respecto su grupo control expuesto a G5 (A). La actividad de la LDH en el medio de cultivo fue expresada como unidades por ml (U/ml); la actividad de la LDH en el medio de

cultivo de las CGM expuestas a G25 fue comparada con la actividad promedio de las CGM expuestas a G5 por los diferentes periodos de tiempo (B). Micrografías de fluorescencia del ensayo de TUNEL. Los núcleos en azul (DAPI) (C). El control (Ctr) representa el promedio de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm SEM de cultivos realizados por duplicado (n=5). Barra de escala: 50 μ m. *p < 0.05 con respecto al Ctr, **p < 0.01 con respecto al Ctr, ***p < 0.001 con respecto al Ctr.

A pesar de que la exposición a G25 no mostró un efecto citotóxico sobre las CGM, y la morfología de las CGM no mostró alteraciones significativas bajo condiciones de G25 (Fig. 11), éstas presentaron alteraciones en su morfología nuclear. Los núcleos de las CGM bajo G25, perdieron su forma ovoide característica y mostraron una estructura amorfa con una o varias protuberancias a partir de las 12 h de exposición (Fig. 12).

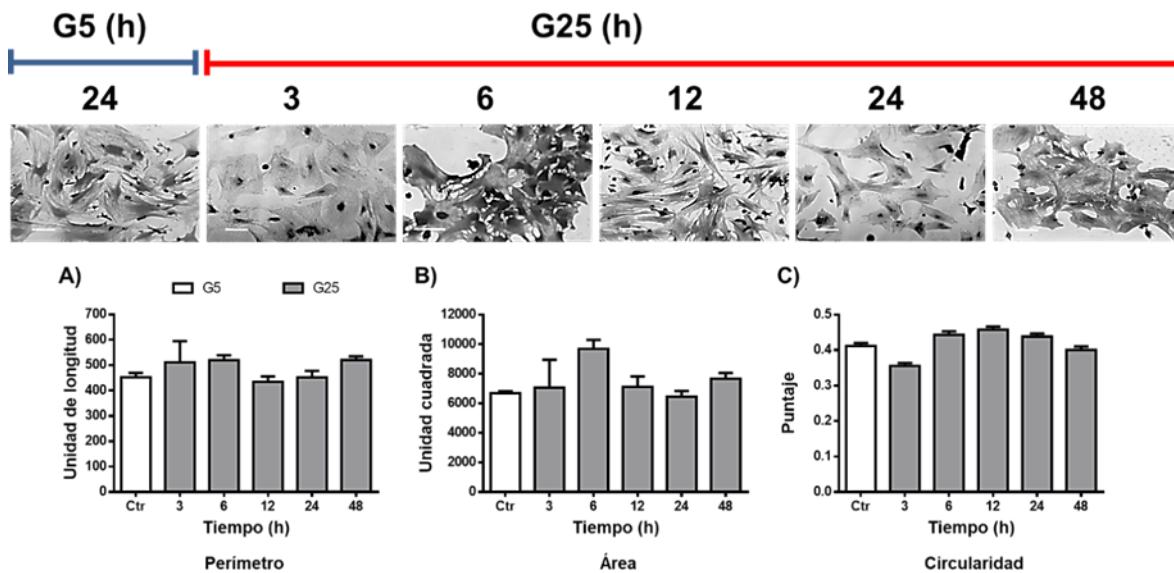


Figura 11. Morfología de las CGM bajo altas concentraciones de glucosa. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). En la parte superior, micrografías de campo claro de las CGM expuestas a G25. La cuantificación del perímetro, área y circularidad se realizó a través del software Cell Profile 4.0, utilizando como parámetro de medición los pixeles de la imagen. El control (Ctr) representa el promedio de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. Se realizó la cuantificación de 100 células por experimento. A) Perímetro (unidad de longitud); B) Área (unidad cuadrada); C) Circularidad (puntaje). Los datos son expresados como la media \pm SEM (n=5). Barra de escala: 50 μ m.

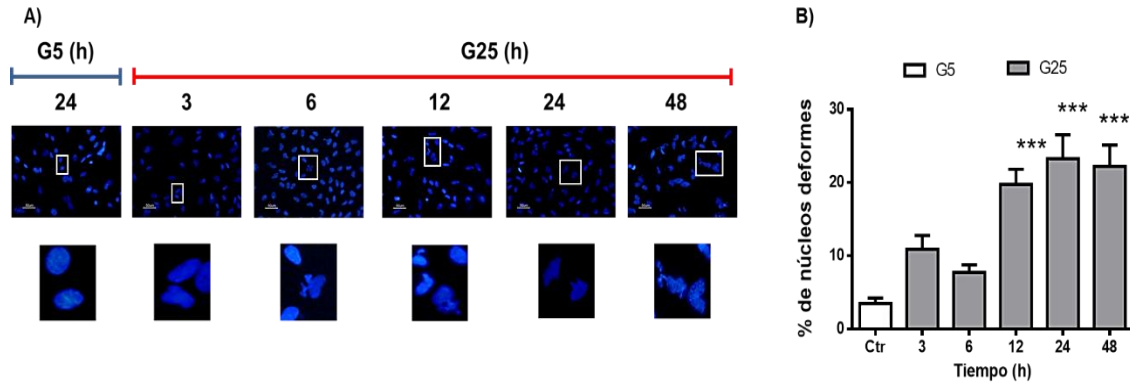


Figura 12. Las CGM expuestas a altas concentraciones de glucosa presentan alteraciones en la morfología nuclear. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Micrografías de fluorescencia de la tinción con DAPI y amplificación de los núcleos señalados (cuadros blancos; A). Cuantificación del porcentaje de núcleos deformes por cada 500 células. El control (Ctr) representa el promedio del porcentaje de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. Los datos se expresan como la media \pm SEM de cultivos duplicados ($n=5$). Barra de escala: 50 μ m. *** $p < 0.001$ con respecto al Ctr.

7.3 Las altas concentraciones de glucosa incrementan las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno.

Las CGM incubadas con G5 mostraron niveles basales de EROs, detectadas por la prueba del H₂DCFDA; la emisión de fluorescencia del H₂DCFDA se observó principalmente en la zona perinuclear de las células (Fig. 13.A). La exposición a G25 incrementó continuamente la intensidad de fluorescencia del H₂DCFDA a través de los diferentes tiempos experimentales (Fig. 13.A). La cuantificación de la fluorescencia mostró un incremento significativo en los niveles de EROs a partir de las 12 h de incubación con G25, manteniéndose niveles elevados a los tiempos experimentales posteriores (Fig. 13.B). Las CGM expuestas a G5 no fueron positivas a la tinción con DHE; en cambio las células expuestas a G25 presentaron un incremento significativo de la tinción desde las 6 h el cual se mantuvo constante a los tiempos experimentales posteriores (Fig. 13.C).

De forma similar a las EROs, las CGM expuestas a G5 producen niveles basales de ERNs detectadas por medio de la fluorescencia del DAF-FM; la fluorescencia del marcador se concentró principalmente en la zona perinuclear de las células. La exposición a G25 incrementó la intensidad de la fluorescencia con el tiempo de

incubación (Fig. 13.A). La cuantificación de la fluorescencia mostró un incremento significativo en los niveles de ERNs una hora después de la exposición a G25, niveles que se mantuvieron elevados durante el periodo experimental (Fig. 13.D).

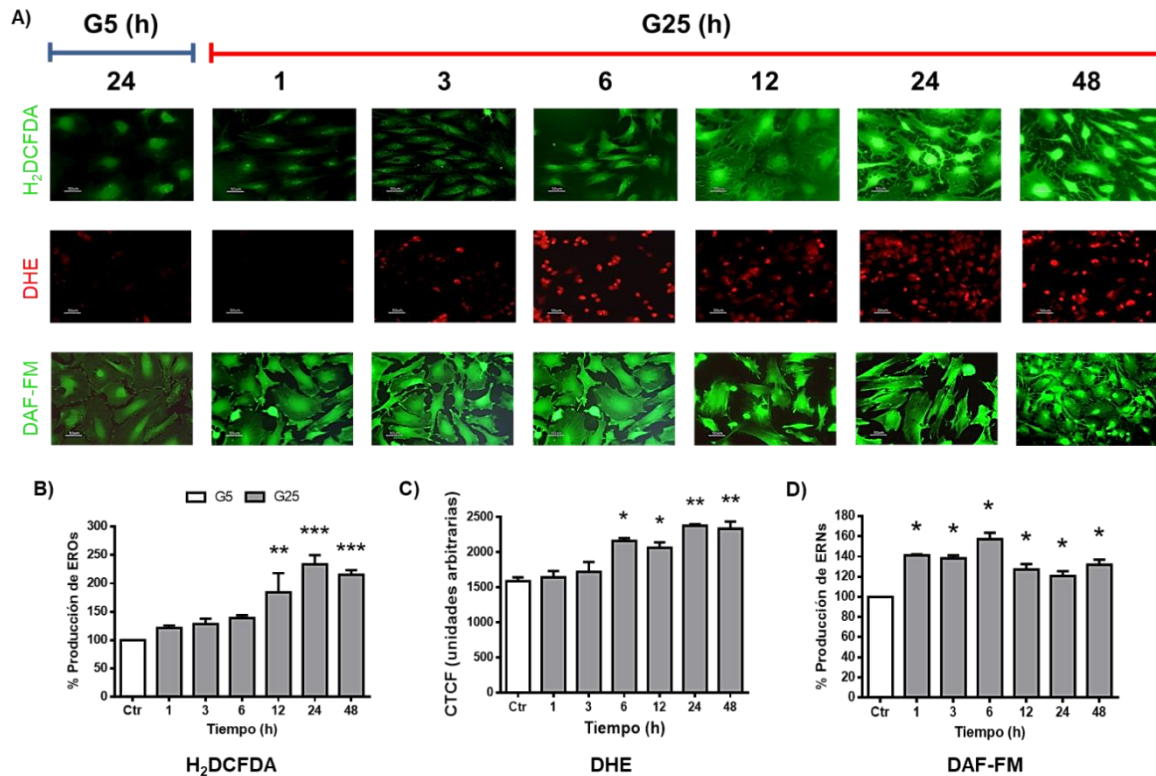


Figura 13. Las altas concentraciones de glucosa incrementan las EROs y ERNs en las CGM. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Micrografías de fluorescencia representativas del H₂DCFDA, DHE y DAF-FM a los diferentes tiempos experimentales (A). Porcentaje de fluorescencia relativa del H₂DCFDA por μ g de proteína (B). Cuantificación total de la fluorescencia de la tinción de DHE (C). Porcentaje de fluorescencia relativa del DAF-FM por μ g de proteína (D). Los datos se expresan como la media \pm SEM de experimentos realizados por duplicado (n=5). El control (Ctr) representa el promedio de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. Barra de escala: 50 μ m. *p < 0.05 con respecto al Ctr, **p < 0.01 con respecto al Ctr, ***p < 0.001 con respecto al Ctr.

7.4 La exposición a altas concentraciones de glucosa altera la expresión del Nrf2 en las células gliales de Müller.

Los niveles de expresión del Nrf2 en las CGM se analizaron por medio de Western blot. El inmuno-marcaje reveló una sola banda con un peso molecular de 68 kDa correspondiente al peso molecular reportado para el Nrf2^{114,139}. Los niveles del Nrf2 no mostraron cambios en las CGM expuestas a G5 durante los diferentes tiempos experimentales (Fig. 14.A y B). Las CGM expuestas a G25 presentaron una

disminución significativa del 50% de los niveles de Nrf2 a las 3 h y posteriormente un incremento recuperando los niveles del control a las 48 h (Fig. 14.D). Similarmente, los niveles de Keap1 disminuyeron a las 3 h de exposición a G25 y se recuperaron alcanzando los niveles del control a las 48 h (Fig. 14.E).

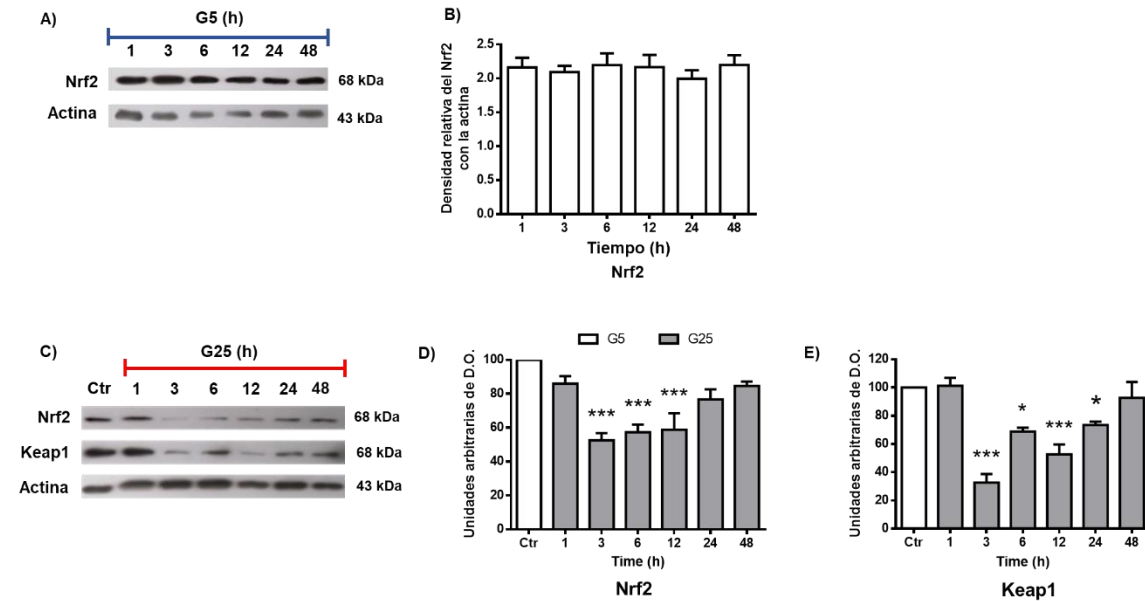


Figura 14. Las altas concentraciones de glucosa disminuyen los niveles de Nrf2 y Keap1 en las CGM. Análisis de Western Blot de los niveles de Nrf2 y Keap1 en homogenados de CGM expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Western Blot representativo (A) y cuantificación de la densitometría del Nrf2 (B) en células expuestas a G5 por diferentes periodos de tiempo. Western Blot representativo (C) y cuantificación de la densitometría del Nrf2 (D) y Keap1 (E) en células expuestas a G25. Kilodaltones (kDa); Densidad óptica (D.O.); horas (h). Los datos son expresados como la media \pm SEM de experimentos realizados por duplicado ($n=7$). El control (Ctr) representa el promedio normalizado como el 100% de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. * $p < 0.05$ con respecto al Ctr, ** $p < 0.01$ con respecto al Ctr, *** $p < 0.001$ con respecto al Ctr.

7.5 Distribución subcelular del Nrf2 en las células gliales de Müller

Se conoce en varios sistemas que, en respuesta al incremento de las EROs el Nrf2 se libera de Keap1 y se transloca al núcleo de las células¹⁴⁰. Por lo que la translocación del Nrf2 al núcleo de las CGM se evaluó, por medio de su expresión en fracciones subcelulares y por inmunofluorescencia.

Los estudios de inmunofluorescencia en las CGM bajo condiciones normales de glucosa mostraron que el Nrf2 se encuentra distribuido en el soma de las células con un alto marcaje en el núcleo y en la zona perinuclear, en la que se observó una zona de mayor densidad (Flecha blanca Fig.15). Las CGM expuestas a G25 mostraron una disminución del inmunomarcaje del Nrf2 en el citoplasma, pero mantuvieron su marcaje en la zona nuclear (Fig. 16.A).

La cuantificación de los niveles de Nrf2 en el núcleo y el citoplasma se valoró por medio del Western Blot de fracciones subcelulares. Los niveles nucleares del Nrf2 disminuyeron significativamente a las 3 h de exposición con G25, pero a tiempos posteriores mostraron un incremento progresivo, presentando niveles significativamente mayores que el control a las 48 h (Fig. 16.B). Mientras que los niveles citoplasmáticos del Nrf2 disminuyeron desde las 3h de exposición a G25 y se mantuvieron bajos hasta las 48 h (Fig. 16.C).

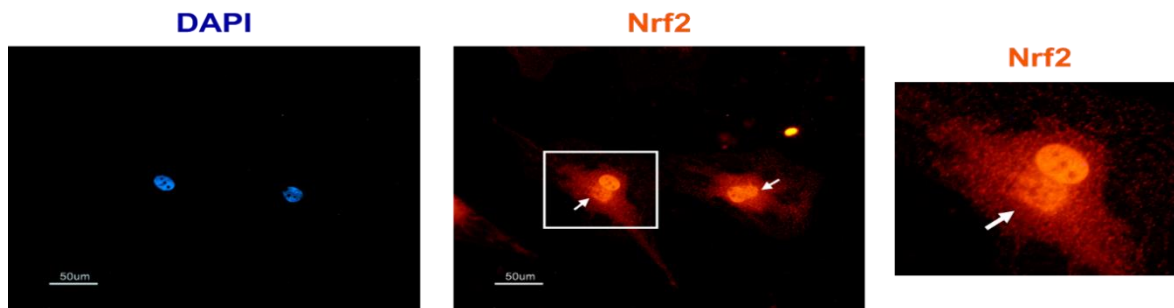


Figura 15. Ilustración de la distribución del Nrf2 en las células gliales de Müller. Las CGM expuestas a G5 (glucosa 5 mM) mostraron un fuerte marcaje del Nrf2 en el núcleo y zona perinuclear. Inmunomarcaje del Nrf2 en rojo y núcleos en azul (DAPI). Las flechas blancas indican un alto marcaje del Nrf2 en una zona específica junto al núcleo. Cuadro blanco: zona correspondiente al acercamiento de la imagen. Barra de escala: 50 μ m.

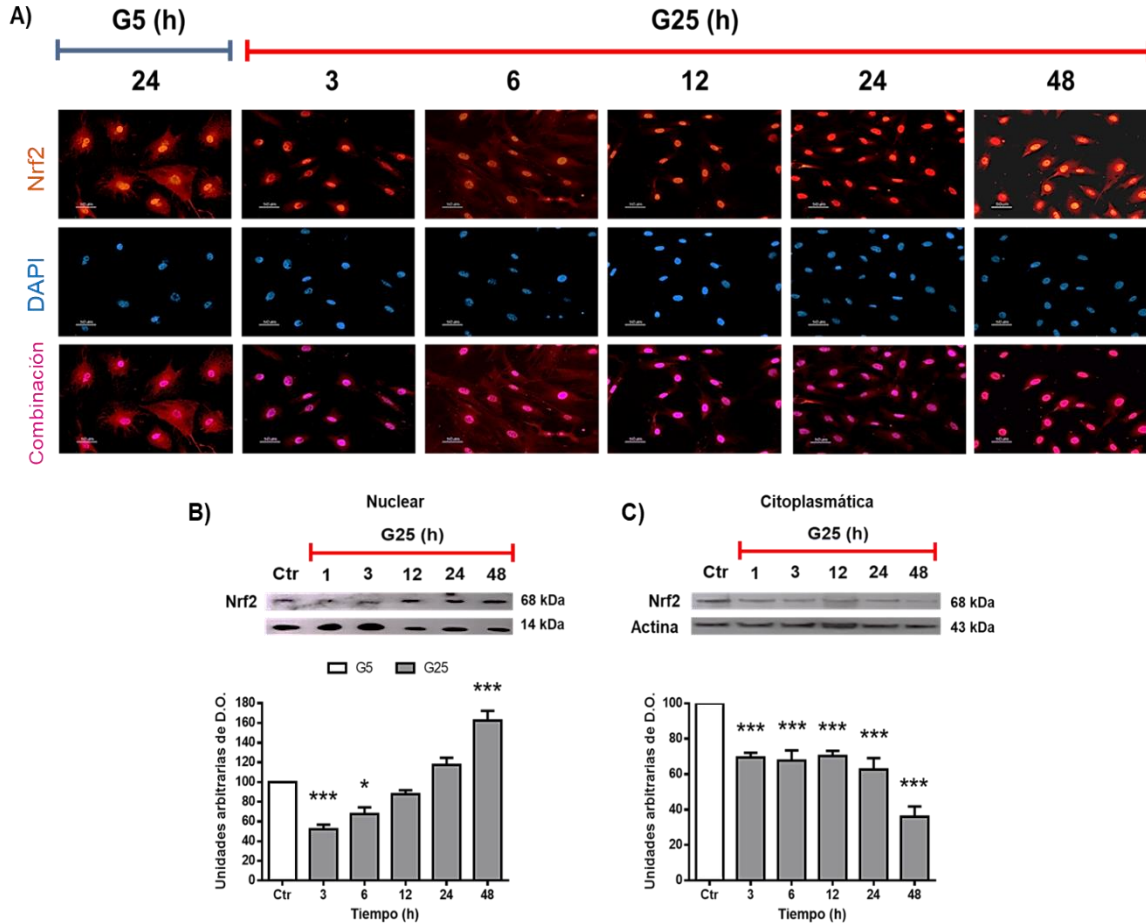


Figura 16. Localización subcelular del Nrf2 en CGM expuestas a altas concentraciones de glucosa. Las células se expusieron a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Micrografías del Inmunomarcaje del Nrf2 en CGM expuestas a G25. Núcleos en azul (DAPI); inmunofluorescencia del Nrf2 en rojo y en rosa la combinación de las tinciones. Cuantificación de los niveles relativos del Nrf2 en la fracción nuclear (B) y en la fracción citoplasmática (C). Se normalizaron los niveles de expresión relativa usando actina (citoplasma) o H2b (nuclear). Kilodaltones (kDa); Densidad óptica (D.O.); horas (h). Los valores representan la media \pm SEM de experimentos realizados por duplicado ($n=5$). El control (Ctr) representa el promedio normalizado como el 100% de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. Barra de escala: 50 μ m * $p < 0.05$ con respecto al Ctr, ** $p < 0.01$ con respecto al Ctr, *** $p < 0.001$ con respecto al Ctr.

7.6 Las altas concentraciones de glucosa afectan la expresión de genes antioxidantes regulados por el Nrf2.

La activación del Nrf2 promueve su translocación al núcleo donde se une a los AREs en los promotores de enzimas antioxidantes promoviendo su transcripción¹⁴¹. La expresión de los genes para la *Gclc* (Fig. 17.A), *Sod2* (Fig. 17.B) y *Txn* (Fig. 17.C) que son regulados por el Nrf2, se redujeron significativamente a partir de una hora

de exposición a G25 y se mantuvo disminuida hasta las 24 h (Fig. 17). A las 48 h de exposición a G25, la expresión de estos tres genes incrementó significativamente, presentando niveles superiores a los del control (Fig.17).

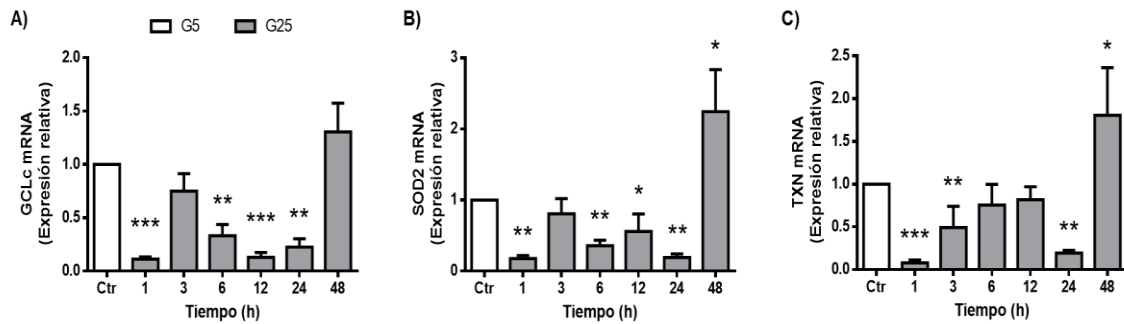


Figura 17. Las altas concentraciones de glucosa alteran la expresión de enzimas antioxidantes. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Niveles de mRNA de GCLc (A), SOD2 (B) y TXN (C). Los niveles relativos de mRNA se normalizaron usando actina. Los valores son la media \pm SEM de experimentos realizados por duplicado ($n=4$). El control (Ctr) representa el promedio normalizado como 1 de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. * $p < 0.05$ con respecto al Ctr, ** $p < 0.01$ con respecto al Ctr, *** $p < 0.001$ con respecto al Ctr.

El Nrf2 regula positivamente dos de los principales sistemas antioxidantes: el GSH y la catalasa^{94,142}. Las CGM expuestas a G25 mostraron una disminución significativa de los niveles de GSH a partir de las 3 h de exposición, los cuales se mantuvieron bajos a tiempos posteriores (Fig. 18.A). Por su parte, la actividad de la catalasa presentó una disminución significativa a las 3 h de exposición a G25, pero a las 48 h, fue mayor que la observada en el control (Fig. 18.B).

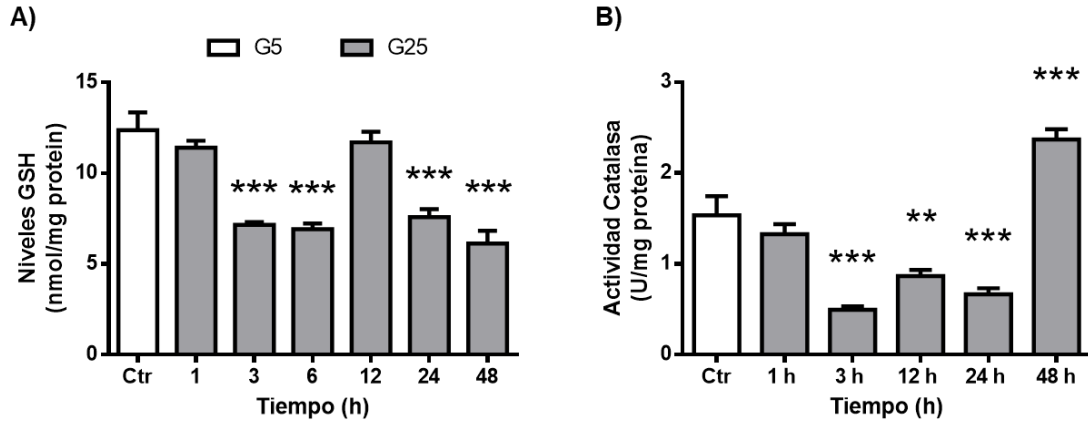


Figura 18. Las altas concentraciones de glucosa disminuyen los principales sistemas antioxidantes en las CGM. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Los niveles de GSH son expresados como nmol/mg de proteína. La actividad de la catalasa se expresa como U/mg de proteína. Los valores son la media \pm SEM de experimentos realizados por duplicado ($n=4$). El control (Ctr) representa el promedio de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. * $p < 0.05$ con respecto al Ctr, ** $p < 0.01$ con respecto al Ctr, *** $p < 0.001$ con respecto al Ctr.

7.7 Sistemas de degradación del Nrf2 bajo altas concentraciones de glucosa en las células gliales de Müller

Keap1 es el principal regulador negativo del Nrf2, el cual promueve su retención en el citoplasma y posterior degradación por el proteasoma 26S^{115,124}. El análisis de inmunofluorencia de Keap1 mostró una distribución homogénea en el citoplasma de las CGM expuestas a G5. Las CGM expuestas a G25 mostraron una disminución de la inmunoreactividad de Keap1 a partir de las 3 h, la cual incrementó a los tiempos posteriores (Fig.19).

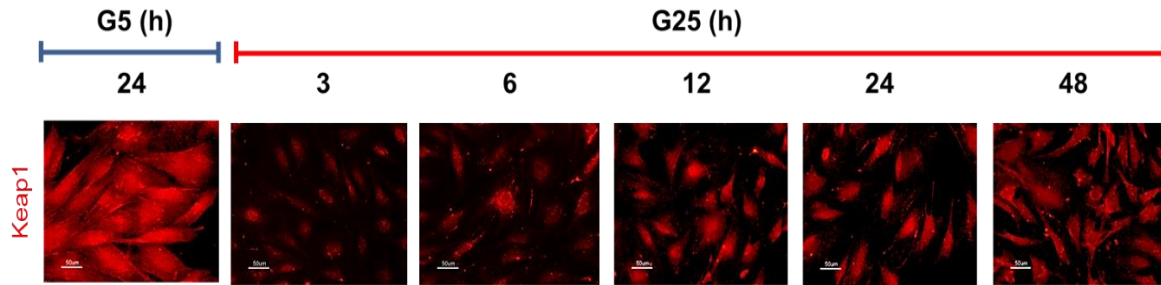


Figura 19. Las altas concentraciones de glucosa alteran la expresión de Keap1 en las CGM. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Micrografías de fluorescencia de Keap1 en las CGM expuestas a G25 a diferentes tiempos (3-48 h). Barra de escala: 50 μ m.

En diferentes tipos celulares se conoce que el Nrf2 es regulado por la GSK3; la activación de esta enzima promueve la degradación de Nrf2 de una forma independiente de Keap1^{117,143}. La actividad de GSK3- β es a su vez regulada a través de su fosforilación en la Ser9, y la fosforilación de este residuo inhibe la actividad catalítica de la enzima¹⁴⁴. La exposición de las CGM a G25 promovió un incremento significativo de la fosforilación de la Ser9 de GSK3- β a tiempos cortos (1-3 h); mientras que, a tiempos largos (6-48 h) la fosforilación de GSK3- β disminuyó significativamente (Fig. 20.A). Los niveles totales de GSK3- β no sufrieron alteraciones bajo condiciones de G25 (Fig.20.A). Por otro lado, Akt es la principal cinasa que regula la actividad de GSK3- β , y la activación de Akt requiere la fosforilación de su Ser473^{50,145}. Las CGM expuestas a G25 incrementaron significativamente la fosforilación de Akt a tiempos cortos (1-3 h) y ésta disminuyó a tiempos largos (6-48 h) (Fig. 20.B), indicando que Akt podría regular la actividad de GSK3- β bajo concentraciones altas de glucosa. Los niveles totales de Akt no cambiaron con la exposición a G25 (Fig. 20.B).

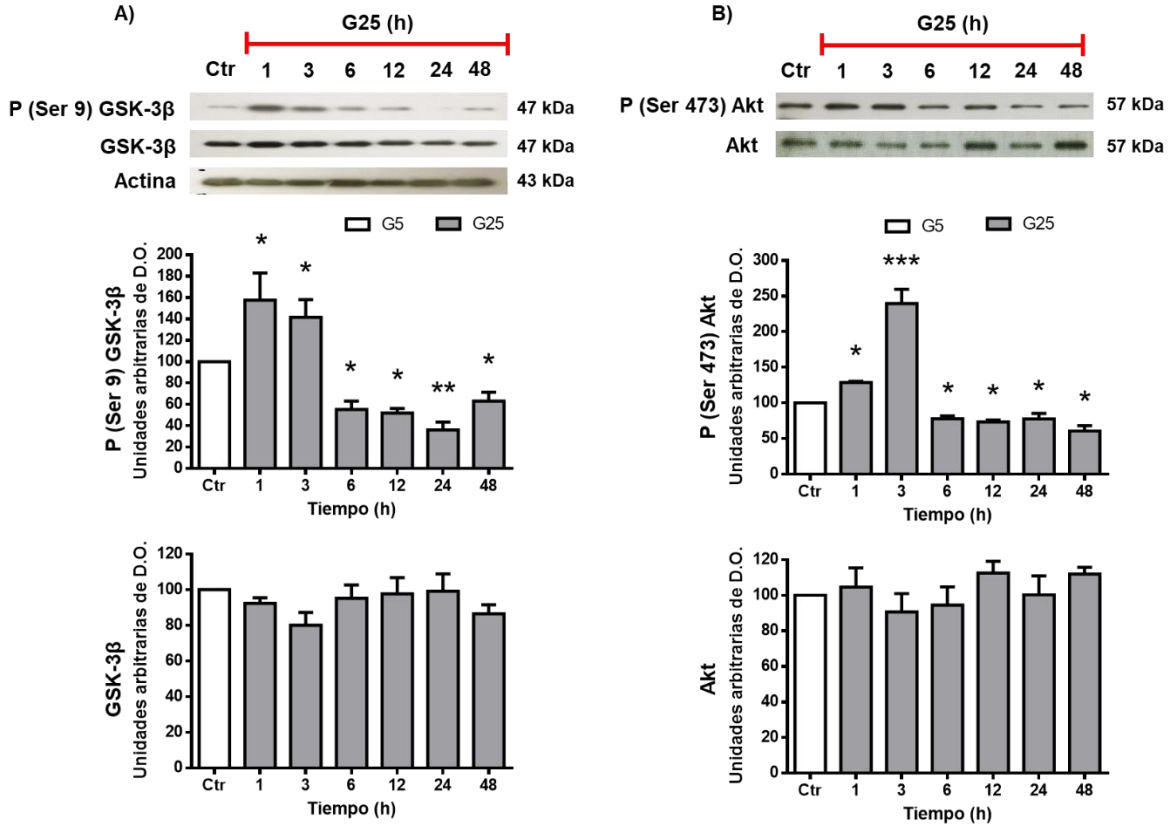


Figura 20. Las altas concentraciones de glucosa alteran la vía de señalización Akt-GSK3β en las CGM. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Cuantificación de los niveles de fosforilación en la Ser9 de GSK-3β (A). Los niveles de fosforilación de GSK-3 se normalizaron con los niveles totales de GSK-3. Cuantificación de los niveles de fosforilación de la Ser473 de Akt; los niveles de fosforilación de Akt se normalizaron con los niveles totales de Akt. Kilodaltones (kDa); Densidad óptica (D.O.); horas (h). Los valores representan la media ± SEM de experimentos realizados por duplicado (n=4). El control (Ctr) representa el promedio normalizado como el 100% de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. *p < 0.05 con respecto al Ctr, **p < 0.01 con respecto al Ctr, ***p < 0.001 con respecto al Ctr.

7.8 Las altas concentraciones de glucosa afectan la expresión génica del Nrf2

Las CGM presentaron una disminución significativa de la expresión del mRNA del Nrf2 a tiempos cortos (1-3 h) de exposición a G25, pero estos incrementaron 3-4 veces con respecto al control a las 6 h de exposición y se mantuvieron elevados hasta las 48h (Fig. 21).

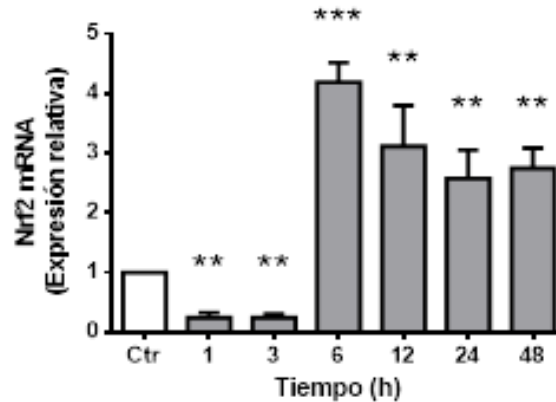


Figura 21. Las altas concentraciones de glucosa alteran la expresión del Nrf2. Las células fueron expuestas a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Los niveles relativos del mRNA del Nrf2 fueron normalizados usando actina. Los valores son la media \pm SEM de experimentos realizados por duplicado ($n=4$). El control (Ctr) representa el promedio normalizado como 1 de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. * $p < 0.05$ con respecto al Ctr, ** $p < 0.01$ con respecto al Ctr, *** $p < 0.001$ con respecto al Ctr.

7.9 Las altas concentraciones de glucosa promueven la expresión de proteínas inflamatorias en las células gliales de Müller.

La expresión génica del Nrf2 puede ser regulada negativamente por el factor de transcripción NF- κ B¹⁴⁶, por lo que analizamos la expresión de este factor de transcripción y sus proteínas blanco. Las CGM expuestas por 60 minutos a G25 incrementaron significativamente (60-70 %) los niveles de la subunidad P65 del NF- κ B y de sus proteínas blanco: IL-1 β y la iNOS. Los niveles de P65 (Fig. 22.A) y de la iNOS (Fig. 22.B) se mantuvieron elevados durante todos los tiempos estudiados, mientras que la IL-1 β presentó un pico máximo de expresión a las 3 h y posteriormente sus niveles disminuyeron a los del control a las 48 h (Fig. 22.C).

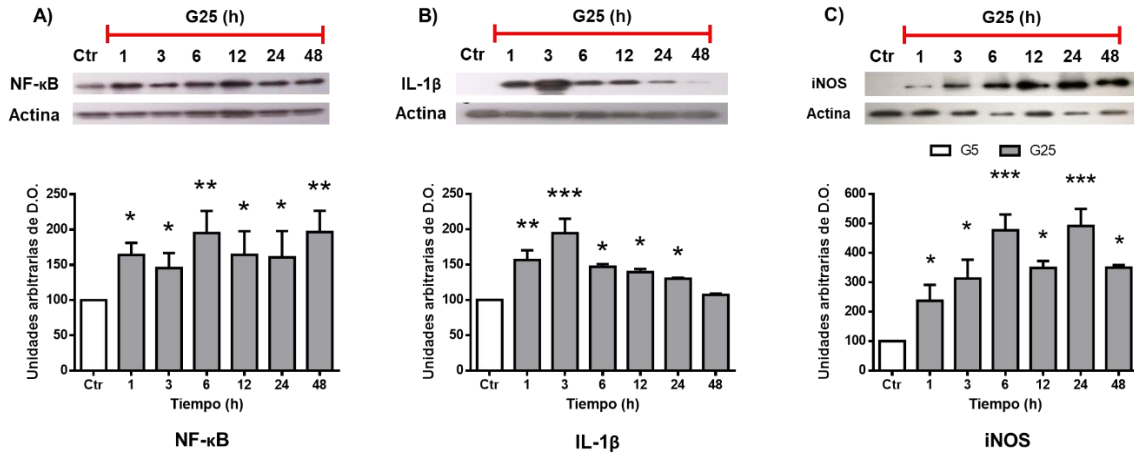


Figura 22. Las altas concentraciones de glucosa inducen la expresión de proteína inflamatorias en las CGM. Las células se expusieron a G5 (glucosa 5 mM) o G25 (glucosa 25 mM) por diferentes periodos de tiempo (1-48 h). Western Blot y cuantificación de la densitometría de NF-κB (A), IL-1β (B) e iNOS (C) en homogenados de CGM. La expresión de las proteínas fue normalizada usando actina. Kilodaltones (kDa); Densidad óptica (D.O.); horas (h). Los valores representan la media ± SEM de experimentos realizados por duplicado (n=5). El control (Ctr) representa el promedio normalizado como el 100% de los valores de las CGM expuestas a G5 por los diferentes tiempos experimentales. *p < 0.05 con respecto al Ctr, **p < 0.01 con respecto al Ctr, ***p < 0.001 con respecto al Ctr.

8. Discusión

En este trabajo, se evaluó si la exposición de las CGM a altas concentraciones de glucosa provoca un estrés oxidativo inducido por alteraciones en la función del Nrf2. En comparación con otros estudios *in vitro*, donde solo se evalúa un solo tiempo de incubación con altas concentraciones de glucosa; en este estudio se realizó un seguimiento temporal con el fin de dilucidar los eventos que llevan a la formación de un ambiente oxidativo en las CGM.

La retina es uno de los principales tejidos en verse afectados durante la diabetes, y se considera a la hiperglucemia presentada durante la enfermedad ha sido considerada como el principal factor que provoca alteraciones neurales y vasculares en este tejido conduciendo a la RD⁶⁶. Los mecanismos exactos por los cuales la hiperglucemia provoca las alteraciones en la retina, no se han dilucidado por completo, pero diversos estudios han sugerido al estrés oxidativo como un factor clave en el desarrollo de la RD^{112,147}.

En la retina de animales con diabetes experimental crónica, se ha observado un incremento en los niveles de especies reactivas de oxígeno (EROs) y la aparición de marcadores de daño oxidativo como el malondialdehído, la 8-hidroxiguanosina, la nitrotirosina y la carbonilación de proteínas^{107,108,110,148-152}. Además, los sistemas antioxidantes también se encuentran alterados en la retina de estos animales. Se ha reportado disminuciones de los niveles de glutatión y la disminución de la actividades de enzimas antioxidantes como la catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa^{109,148-150,153,154}.

El Nrf2 es el principal factor de transcripción que regula la expresión inducible de enzimas antioxidantes en respuesta al estrés oxidativo. En la retina de animales con tiempos prolongados de diabetes (3-6 meses), se ha observado una disminución en la expresión, acumulación nuclear y actividad transcripcional del Nrf2^{148,149,151,153-155}. Mientras que a tiempos cortos de diabetes (7-20 días), la expresión del Nrf2 en la retina también presenta una disminución de su expresión y localización nuclear, pero a los 45 días de la enfermedad, los niveles totales y nucleares del Nrf2 incrementan significativamente¹³¹ (Publicación 10.1). En estos tiempos, no se han

observado alteraciones en los sistemas antioxidantes^{107,136,156}. Estos resultados sugieren que, durante la progresión de la diabetes, se presentan oscilaciones temporales en la expresión del Nrf2 que podrían conducir a las alteraciones del estado redox celular de la retina observados a tiempos prolongados de la enfermedad.

La retina es un tejido complejo que se compone de una gran variedad de tipos celulares, por lo que discernir la participación de cada tipo celular en la progresión de la RD es fundamental para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas. Las CGM son el principal tipo glial de la retina¹³ y presentan funciones fundamentales en el soporte estructural, fisiológico y metabólico del tejido⁸⁰. En la RD, se ha observado que las CGM es uno de los primeros tipos celulares en verse afectados desde etapas tempranas de la enfermedad. En la RD, las CGM exhiben un proceso de gliosis reactiva caracterizado por hipertrofia celular, incremento en la expresión de la GFAP y disminución de los niveles de la glutamina sintetasa^{77,88}. Estudios *in vitro* en CGM bajo altas concentraciones de glucosa exhiben un proceso de gliosis reactiva similar al que se presenta en la RD^{78,79}.

En este trabajo se empleó un modelo *in vitro*, para evaluar los cambios que provocan las altas concentraciones de glucosa sobre las CGM, con el objetivo de dilucidar las vías afectadas por esta condición. Al ser un modelo *in vitro*, se deben considerar las limitaciones de ser un sistema aislado a la señalización celular que ocurre en el microambiente de la retina durante la RD.

Estudios *in vitro* en CGM expuestas a altas concentraciones de glucosa por tiempos prolongados (48-168 h) han reportado la disminución de la viabilidad celular y el incremento de la muerte celular por apoptosis¹⁵⁷⁻¹⁶⁰. En este trabajo, la exposición de las CGM a altas concentraciones de glucosa por 48h no mostró un efecto citotóxico (Fig. 10), ni alteraciones en la morfología celular (Fig.11), pero se observaron alteraciones en la morfología nuclear las cuales incrementaron con el tiempo de exposición a G25 (Fig. 12). Las alteraciones en la morfología nuclear podría ser un evento inicial de la muerte celular observada a tiempos prolongados de exposición a alta glucosa observada por otros autores.

El análisis temporal de la exposición de las CGM a altas concentraciones de glucosa mostró que hay un incremento en la producción de EROs y ERNs, pero éstas incrementan a diferentes tiempos. En orden secuencial la primera especie reactiva en incrementar sus niveles es el óxido nítrico (1 h), seguido por el superóxido (6 h) y al final el peróxido de hidrógeno (12 h) (Fig. 13). A la par, se observó desde 3 h de exposición a alta glucosa, una disminución significativa de los niveles de GSH y actividad de la catalasa (Fig. 18), lo que sugiere un estrés nitrosativo/oxidativo en las CGM. El incremento de las EROs y ERNs a diferentes tiempos, plantea que la activación de vías de señalización temporales facilita la producción de especies reactivas particulares cuyos niveles se mantienen sostenidos a través de los diferentes tiempos experimentales. Estos resultados concuerdan con otros estudios en los cuales se ha reportado el incremento de las EROs por la condición hiperglucémica a partir de las 24 h de exposición^{161–165}.

Nrf2 es un factor de transcripción que induce la expresión de enzimas antioxidantes ante condiciones de estrés oxidativo¹⁴¹. En condiciones basales, Nrf2 se encuentra retenido en el citoplasma por Keap1 y es degradado constantemente, presentando un tiempo de vida medio alrededor de 20 minutos¹⁶⁶. La degradación del Nrf2 es mediada por su ubiquitinación a través de Keap1, esta modificación funciona como una señal para su degradación por el proteasoma 26S¹²³. En condiciones de estrés oxidativo, algunos residuos de cisteína en Keap1 son oxidados induciendo un cambio estructural en la molécula, permitiendo así la liberación del Nrf2¹²³. Nrf2 contiene en su estructura un elemento de importación nuclear, el cual le permite su translocación al núcleo¹²⁴. Dentro del núcleo, Nrf2 forma heterodímeros con los factores de transcripción de la familia Mafs¹⁶⁷. El heterodímero Nrf2-Maf induce la expresión de enzimas antioxidantes a través de su unión al elemento de respuesta antioxidante, ubicado en los promotores de estas enzimas¹⁶⁷. Al contrario de lo reportado en otros tipos celulares, las CGM de la rata *in vitro* presentan una alta concentración del Nrf2 tanto en el citoplasma como en el núcleo en condiciones de cultivo basales (5 mM de glucosa) (Fig. 15). La constante translocación del Nrf2 al núcleo de las CGM sin un estrés oxidativo aparente (Fig. 13), sugiere funciones adicionales al mantenimiento de la homeostasis redox en las CGM. Se ha reportado,

que Nrf2 induce la transcripción de enzimas involucradas en la regulación de la glucólisis, la vía de las pentosas fosfato, el metabolismo de los ácidos grasos y el metabolismo de la glutamina^{168,169}. La acumulación nuclear del Nrf2 en las CGM podría estar involucrado en el mantenimiento de actividades metabólicas particulares de este tipo celular como es la conversión de glutamato a glutamina²⁰.

Las altas concentraciones de glucosa provocaron oscilaciones en los niveles del Nrf2 en las CGM a los diferentes tiempos experimentales. A tiempos cortos (3-12 h), se observó una disminución de los niveles del Nrf2, los cuales recuperaron niveles similares a los del control a tiempos prolongados (24-48 h) (Fig. 14). La disminución de los niveles del Nrf2 podría ser provocada por el incremento de su degradación o por la disminución de su síntesis. Al evaluar los niveles de Keap1, principal regulador negativo del Nrf2¹⁷⁰, se encontraron oscilaciones en su expresión similares a las presentadas por el Nrf2, una disminución a tiempos cortos (3-24 h) y un restablecimiento de sus niveles a tiempos prolongados de exposición a altas concentraciones de glucosa (48 h) (Fig. 6 y 11). La región promotora del gen de Keap1 contiene un ARE a través del cual Nrf2 puede regular la transcripción de este¹¹⁴, por lo tanto la disminución de los niveles de Nrf2 puede influir de forma negativa en la expresión de Keap1.

El Nrf2 también se regula negativamente por la GSK-3 β ¹⁷¹. El dominio Neh6 del Nrf2 contiene motivos de unión a β -TrCP una proteína adaptadora de sustrato del complejo ubiquitina ligasa¹¹⁷, residuos de serina dentro del dominio Neh6 pueden ser fosforilados por GSK-3 β incrementando su afinidad de unión a β -TrCP y en consecuencia la ubiquitinación y posterior degradación del Nrf2^{117,125}. La actividad de GSK-3 β es regulada a través de la fosforilación de su Ser9, la fosforilación de este residuo inhibe su actividad¹⁴⁵. Las CGM expuestas por tiempos cortos (1-3 h) a altas concentraciones de glucosa presentaron un aumento en la fosforilación de la Ser 9 de la GSK-3 β , lo que indica una inhibición de su actividad; mientras que a tiempos prolongados (6-48 h) la fosforilación de la Ser9 de GSK-3 β disminuyó, indicando un incremento de su actividad (Fig. 20). La actividad de GSK-3 β es principalmente regulada por la proteína cinasa Akt; la fosforilación de Akt en su

Ser473 es fundamental para su activación^{50,145}. Las CGM expuestas a altas concentraciones de glucosa por tiempos cortos (1-3 h) exhibieron un incremento de la fosforilación de Akt (Fig. 20), lo cual correlaciona con el incremento de la fosforilación de GSK-3 β . A tiempos prolongados (6-48 h), tanto la fosforilación de Akt como de GSK-3 β disminuyeron significativamente. La diferencia en la temporalidad entre la activación de GSK-3 β y la disminución de Nrf2, sugiere que esta vía no contribuye de forma significativa en la reducción de los niveles del Nrf2 en las CGM a tiempos cortos de exposición a alta glucosa.

El análisis de los niveles de Nrf2 en fracciones nucleares y citoplasmáticas en las CGM reveló que, durante los diferentes tiempos de exposición a la alta glucosa, los niveles citoplasmáticos de Nrf2 disminuyeron significativamente a partir de la primera hora y se mantuvieron disminuidos a los tiempos posteriores (Fig. 16). Por el contrario, los niveles nucleares del Nrf2 mostraron cambios transitorios; a tiempos cortos (3-6 h), los niveles nucleares disminuyeron significativamente, pero sus niveles incrementaron progresivamente durante los diferentes tiempos experimentales mostrando un incremento significativo a las 48 h (Fig. 16). Interesantemente, la expresión de genes regulados por Nrf2 como la SOD2, TXN y GCLc, disminuyó e incrementó de acuerdo con los niveles nucleares del Nrf2 (Fig. 17). Estos resultados muestran que los cambios en los niveles nucleares del Nrf2 por las altas concentraciones de glucosa afectan la transcripción de enzimas antioxidantes en las CGM.

Los niveles del ARNm del Nrf2 mostraron una disminución significativa a tiempos cortos (1-3 h) de exposición a concentraciones altas concentraciones de glucosa, pero se observó un incremento a tiempos prolongados (6-12 h). Este resultado revela que la disminución significativa de los niveles del Nrf2 a tiempos cortos de exposición a alta glucosa se debe a una disminución de su síntesis y no de un incremento en su degradación. Una de las principales vías que regula de forma negativa la expresión del Nrf2 es el Factor Nuclear kappa B (NF- κ B)¹⁷².

El NF- κ B es un factor de transcripción que induce la expresión de genes involucrados principalmente en la respuesta inmune e inflamatoria¹⁷³⁻¹⁷⁵. En

condiciones basales, NF- κ B se encuentra inactivado y secuestrado en el citoplasma por medio de la proteína inhibitoria de NF- κ B (I κ B). La exposición de las células a un estímulo pro-inflamatorio dispara la activación de la cinasa de I κ B (IKK β), la cual fosforila a la proteína I κ B¹⁷⁴. La fosforilación de I κ B promueve su ubiquitinación regulada por β -TrCP y su posterior degradación por el proteasoma 16s¹⁷⁶. La degradación de I κ B permite la translocación nuclear del NF- κ B y activar la transcripción de proteínas proinflamatorias¹⁷⁷. Diversos estudios han demostrado que la exposición de las CGM a altas concentraciones de glucosa por tiempos prolongados (≥ 24 h), incrementan la síntesis y secreción de proteínas inflamatorias como el VEGF, IL-1 β y TNF- α ⁶⁸, este incremento de proteínas inflamatorias también se ha observado en las CGM de pacientes y animales diabéticos¹⁷⁸.

En este trabajo, se evaluó la activación de NF- κ B en las CGM a través de los niveles de su subunidad canónica P65 y dos de sus genes blanco: IL-1 β e iNOS. La exposición de las CGM a altas concentraciones de glucosa incrementó los niveles de P65 desde la primera hora de incubación y éstos se mantuvieron elevados a tiempos posteriores (Fig. 22). Interesantemente, los niveles de la iNOS incrementaron a partir de la primera hora de exposición a alta glucosa y éstos se mantuvieron constantes a tiempos posteriores. La producción de ON por la iNOS, podría contribuir de forma activa en la formación de ERNs en las CGM bajo altas concentraciones de glucosa (Fig. 13). La expresión de IL-1 β presentó un incremento en su expresión a tiempos cortos (1-3 h) de exposición a alta glucosa, pero sus niveles disminuyeron a tiempos posteriores (Fig. 22).

Diversos trabajos han señalado la regulación negativa entre los factores de transcripción Nrf2 y NF- κ B, la sobre-expresión de un factor suprime la actividad del otro^{146,179}. P65 y Nrf2 compiten mutuamente por la proteína de unión al coactivador transcripcional CREB (CBP; CREB Binding Protein), la cual es un factor esencial para la unión de estos factores de transcripción al DNA^{146,180}. La fosforilación de P65 por vías pro-inflamatorias, incrementa su afinidad por CBP inhibiendo así su interacción con el Nrf2. Además, P65 facilita el reclutamiento de la desacetilasa de histonas 3 (HDAC3; histone deacetylase 3) a la proteína MafK factor de

transcripción con la cual Nrf2 forma heterodímeros¹⁸¹. La unión de HDAC3 a MafK provoca la hipo-acetilación local de histonas en el ARE inhibiendo la actividad del Nrf2¹⁴⁶. Por el otro lado, Nrf2 puede unirse a regiones proximales de los promotores de genes pro-inflamatorios regulados por NF- κ B, la unión de Nrf2 en estos sitios evita el reclutamiento de la RNA polimerasa II inhibiendo la transcripción. Keap1 también influye en la activación de NF- κ B. Keap1 puede unirse a IKK β y promover su degradación por la vía de la autofagia. Se ha observado que la expresión ectópica de Keap1 disminuye la activación de NF- κ B, mientras que la depleción de Keap1 conduce a un incremento de la actividad de NF- κ B¹⁸².

El mecanismo inicial por el cual las altas concentraciones de glucosa provocan la activación temprana de NF- κ B y en consecuencia la inhibición de la expresión del Nrf2, aún sigue siendo una incógnita. Un posible mecanismo por el cual las altas concentraciones de glucosa podrían estar contribuyendo a la activación de NF- κ B, es la formación de productos finales de glicosilación avanzada (AGEs). Las altas concentraciones de glucosa en el medio de cultivo podrían favorecer la glicosilación no enzimática de proteínas en las CGM promoviendo la formación de AGEs. Las CGM expresan el receptor a AGEs (RAGEs) y se ha observado que este receptor incrementa su expresión y translocación a la membrana plasmática en condiciones de hiperglucemia (48 h)¹⁷⁸. La activación de los RAGEs desencadena vías de señalización que activan al NF- κ B¹⁷⁸. La formación de AGEs podría promover la activación temprana de NF- κ B y regular negativamente la expresión de Nrf2 a tiempos cortos de exposición a alta glucosa (1-3 h). La activación del NF- κ B se vio reflejada en el incremento de sus genes blanco. El aumento de la expresión de la iNOS sugiere ser el principal contribuyente en la formación de ERNs observadas en las CGM expuestas a altas concentraciones de glucosa, lo cual podría ser el paso desencadenante para la formación del ambiente oxidativo observado a tiempos prolongados. A pesar de que a tiempos prolongados observamos un incremento en los niveles de Nrf2 y la expresión de sus genes blanco, el ambiente inflamatorio y oxidativo continúan. La activación del Nrf2 a tiempos prolongados de exposición a alta glucosa puede provocar una estabilización parcial en la homeostasis de las

CGM, pero el ambiente oxidativo/inflamatorio constante puede alterar vías de señalización fundamentales en la supervivencia celular, que no pueden ser restablecidas solo por la activación del Nrf2 y provocar la muerte celular observada a tiempos prolongados en otros trabajos.

9. Conclusión.

Las altas concentraciones de glucosa provocan una disminución temporal de la expresión del Nrf2, lo cual propicia la formación de un ambiente oxidativo con el incremento de especies reactivas de oxígeno y la disminución de agentes antioxidantes en las células gliales de Müller de la rata. La reducción temprana de los niveles de Nrf2 puede deberse a una regulación negativa mediada por el NF- κ B, el cual se activa desde etapas tempranas de la exposición a alta glucosa, sugiriendo una fuerte contribución entre las vías antioxidantes e inflamatorias en el daño de las células gliales de Müller bajo condiciones hiperglucémicas.

10. Referencias

1. Kolb, H., Nelson, R., Fernandez, E. & Jones, B. *Webvision. The organization of the retina and visual system.* (2018). doi:10.1111/j.1540-4560.1950.tb02170.x.
2. Demb, J. B. & Singer, J. H. Functional Circuitry of the Retina. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **1**, 263–289 (2015).
3. Schachat, A. P., Hinton, D. R. & Sadda, S. *Ryan's Retina.* (2017).
4. Costanzo, L. S. *Fisiología.* (2014).
5. Levin, L. A., Nilsson, S. F. E., Ver Hoeve, J. & Wu, S. M. *Physiology of the Eye.* (2011). doi:10.1113/expphysiol.1964.sp001697.
6. Artal, P. Image Formation in the Living Human Eye. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **1**, 1–17 (2015).
7. Hurley, J. B. Retina Metabolism and Metabolism in the Pigmented Epithelium: A Busy Intersection. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **7**, 665–692 (2021).
8. Brainard, D. H. Color and the Cone Mosaic. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **1**, 519–546 (2015).
9. Adler, R. & Farber, D. *The Retina: A Model for Cell Biology Studies.* (1986). doi:10.1136/bjo.71.10.804.
10. Liu, L. & Liu, X. *Roles of drug transporters in blood-retinal barrier. Advances in Experimental Medicine and Biology* vol. 1141 (2019).
11. *The blood-retinal barriers.* (1979). doi:10.1007/BF00146764.
12. Subirada, P. V. *et al.* A journey into the retina: Müller glia commanding survival and death. *Eur. J. Neurosci.* **47**, 1429–1443 (2018).
13. Sarthy, V. & Ripps, H. *The retinal Müller cell: structure and function.* (Kluwer Academic Publishers, 2001).
14. Newman, E. & Reichenbach, A. The Muller cell: A functional element of the

- retina. *Trends Neurosci.* **19**, 307–312 (1996).
15. Coughlin, B. A., Feenstra, D. J., Mohr, S., Freenstra, D. J. & Mohr, S. Müller cells and diabetic retinopathy. *Vision Res.* **139**, 93–100 (2017).
 16. Reichenbach, A. & Bringmann, A. Glia of the human retina. *Glia* **68**, 768–796 (2020).
 17. Pannicke, T., Ivo Chao, T., Reisenhofer, M., Francke, M. & Reichenbach, A. Comparative electrophysiology of retinal Müller glial cells—A survey on vertebrate species. *Glia* **65**, 533–568 (2017).
 18. Newman, E. A. Glial cell regulation of neuronal activity and blood flow in the retina by release of gliotransmitters. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**, 1–9 (2015).
 19. De Melo Reis, R. A., Ventura, A. L. M., Schitine, C. S., De Mello, M. C. F. & De Mello, F. G. Müller glia as an active compartment modulating nervous activity in the vertebrate retina: Neurotransmitters and trophic factors. *Neurochem. Res.* **33**, 1466–1474 (2008).
 20. Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X. & Sharma, S. C. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **51**, 1–40 (2016).
 21. Mysona, B., Dun, Y., Duplantier, J., Ganapathy, V. & Smith, S. B. Effects of hyperglycemia and oxidative stress on the glutamate transporters GLAST and system xc⁻ in mouse retinal Müller glial cells. *Cell Tissue Res.* **335**, 477–488 (2009).
 22. Reichenbach, A. & Bringmann, A. *Müller Cells in the healthy and diseased retina*. (Springer-Verlag New York, 2010).
 23. Toft-Kehler, A. K. *et al.* Mitochondrial function in Müller cells - Does it matter? *Mitochondrion* **36**, 43–51 (2017).
 24. Winkler, B. S., Arnold, M. J., Brassell, M. A. & Puro, D. G. Energy

- metabolism in human retinal Muller cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 3183–3190 (2000).
25. Kanow, M. A. *et al.* Biochemical adaptations of the retina and retinal pigment epithelium support a metabolic ecosystem in the vertebrate eye. *Elife* **6**, 1–25 (2017).
 26. Viegas, F. O. & Neuhauss, S. C. F. A Metabolic Landscape for Maintaining Retina Integrity and Function. *Front. Mol. Neurosci.* **14**, 1–12 (2021).
 27. Narayan, D. S., Chidlow, G., Wood, J. P. M. & Casson, R. J. Glucose metabolism in mammalian photoreceptor inner and outer segments. *Clin. Exp. Ophthalmol.* **45**, 730–741 (2017).
 28. Toft-Kehler, A. K., Skytt, D. M. & Kolko, M. A Perspective on the Müller Cell-Neuron Metabolic Partnership in the Inner Retina. *Mol. Neurobiol.* **55**, 5353–5361 (2018).
 29. Ola, M. S. & LaNoue, K. F. Molecular basis for increased lactate formation in the Müller glial cells of retina. *Brain Res. Bull.* **144**, 158–163 (2019).
 30. Tsacopoulos, M. Lactate Released by Müller Glial Cells Is Metabolized Photoreceptors from Mammalian Retina. **15**, 5179–5191 (1995).
 31. Vohra, R. *et al.* Disturbed mitochondrial function restricts glutamate uptake in the human Müller glia cell line, MIO-M1. *Mitochondrion* **36**, 52–59 (2017).
 32. Tsacopoulos, M., Poitry-Yamate, C. L., MacLeish, P. R. & Poitry, S. Trafficking of Molecules and Metabolic Signals in the Retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **17**, 429–442 (1998).
 33. Usui, Y. *et al.* Angiogenesis and Eye Disease. *Annu. Rev. Vis. Sci.* **1**, 155–184 (2015).
 34. Tombran-Tink, J. & Barnstable, C. J. *Ocular transporters in ophthalmic diseases and drug delivery.* (2008).
 35. Badr, G. A., Tang, J., Ismail-Beigi, F. & Kern, T. S. Diabetes downregulates

- GLUT1 expression in the retina and its microvessels but not in the cerebral cortex or its microvessels. *Diabetes* **49**, 1016–1021 (2000).
36. Kumagai, A. K. Glucose transport in brain and retina: Implications in the management and complications of diabetes. *Diabetes. Metab. Res. Rev.* **15**, 261–273 (1999).
 37. Yang, S., Zhang, J. & Chen, L. The cells involved in the pathological process of diabetic retinopathy. *Biomed. Pharmacother.* **132**, 110818 (2020).
 38. Sánchez-Chávez, G., Peña-Rangel, M. T., Riesgo-Escovar, J. R., Martínez-Martínez, A. & Salceda, R. Insulin Stimulated-Glucose Transporter Glut 4 Is Expressed in the Retina. *PLoS One* **7**, 1–7 (2012).
 39. Ashim K., M. *OCULAR TRANSPORTERS AND RECEPTORS. Elsevier Science* (2013).
 40. Fernandes, R., Suzuki, K. ichi & Kumagai, A. K. Inner blood-retinal barrier GLUT1 in long-term diabetic rats: An immunogold electron microscopic study. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 3150–3154 (2003).
 41. Holt, R. I. & Hnaley, N. A. *Essential endocrinology and diabetes.* (2012).
 42. Bilous, R., Donnelly, R. & Idris, I. *Handbook of diabetes.* (2021).
 43. Tao, Y.-X. *Glucose homeostatis and the pathogenesis of diabetes mellitus.* (2014).
 44. Al-Shura, A. N. Etiology of blood sugar disorders. *Metab. Disord. Shen Integr. Cardiovasc. Chinese Med.* 11–16 (2021) doi:10.1016/B978-0-12-818922-1.00002-7.
 45. Brady, M. J. & Saltiel, A. R. Insulin and Glucagon. *Encycl. Life Sci.* 1–7 (2001) doi:10.1038/npg.els.0000638.
 46. Röder, P. V., Wu, B., Liu, Y. & Han, W. Pancreatic regulation of glucose homeostasis. *Exp. Mol. Med.* **48**, e219 (2016).
 47. Casillas, J. *et al. Multidisciplinary teaching atlas of the pancreas.* (2016).

doi:10.1007/978-3-662-46745-9.

48. Beger, H. G. *et al.* *The Pancreas: An Integrated Textbook of Basic Science, Medicine, and Surgery: Second Edition.* (2009).
doi:10.1002/9781444300123.
49. Steer, M. *Pancreatic physiology and functional assessment. Blumgart's Surgery of the Liver, Biliary Tract, and Pancreas* vol. 1 (Elsevier Inc., 2012).
50. Najjar, S. Insulin Action: Molecular Basis of Diabetes. *eLS* 1–10 (2003)
doi:10.1038/npg.els.0001402.
51. Scherer, T., Sakamoto, K. & Buettner, C. Brain insulin signalling in metabolic homeostasis and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* **17**, 468–483 (2021).
52. James, D. E., Stöckli, J. & Birnbaum, M. J. The aetiology and molecular landscape of insulin resistance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **22**, 751–771 (2021).
53. Lee, S. H., Zabolotny, J. M., Huang, H., Lee, H. & Kim, Y. B. Insulin in the nervous system and the mind: Functions in metabolism, memory, and mood. *Mol. Metab.* **5**, 589–601 (2016).
54. Haeusler, R. A., McGraw, T. E. & Accili, D. Biochemical and cellular properties of insulin receptor signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 31–44 (2018).
55. Fazakerley, D. J., Krycer, J. R., Kearney, A. L., Hocking, S. L. & James, D. E. Muscle and adipose tissue insulin resistance: Malady without mechanism? *J. Lipid Res.* **60**, 1720–1732 (2019).
56. Begg, D. P. Insulin Transport into the Brain and Cerebrospinal Fluid. *Vitam. Horm.* **98**, 229–248 (2015).
57. Filippi, B. M., Abraham, M. A., Yue, J. T. Y. & Lam, T. K. T. Insulin and glucagon signaling in the central nervous system. *Rev. Endocr. Metab. Disord.* **14**, 365–375 (2013).
58. Reznik, Y. *Handbook of diabetes technology.* (2019). doi:10.1007/978-3-319-

98119-2.

59. Dreyer, M. Type 1 diabetes. *Diabetologe* **15**, 400–407 (2019).
60. International Diabetes Federation. *Atlas de la diabetes de la FID. Atlas de la Diabetes de la FID* (2019).
61. Shamah, L. T. et al. *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2018-19. Resultados Nacionales. Instituto Nacional de Salud Pública* (2020).
62. Pociot, F. & McDermott, M. F. Genetics of type 1 diabetes mellitus. *Genes Immun.* **3**, 235–249 (2002).
63. Ochoa Martínez, C. *Manual práctico del manejo de la diabetes mellitus y sus comorbilidades.* (Editorial Alfil, 2019).
64. La Greca, A. M. & MacKey, E. R. Type 1 diabetes mellitus. *Behav. Approaches to Chronic Dis. Adolesc. A Guid. to Integr. Care* **3**, 85–100 (2009).
65. Tim, H. & Sudhesh, K. *ABC in Diabetes.* (2010).
66. Wong, T. Y., Cheung, C. M. G., Larsen, M., Sharma, S. & Simó, R. *Diabetic retinopathy. Nature Reviews Disease Primers* vol. 2 (2008).
67. Poretzky, L. *Principles of diabetes mellitus.* (2010). doi:10.1007/978-0-387-09841-8.
68. Rübsam, A., Parikh, S. & Fort, P. E. Role of Inflammation in Diabetic Retinopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–31 (2018).
69. Kur, J., Burian, M. A. & Newman, E. A. Light adaptation does not prevent early retinal abnormalities in diabetic rats. *Sci. Rep.* **6**, 1–8 (2016).
70. Fletcher, E. L., Phipps, J. A. & Wilkinson-Berka, J. L. Dysfunction of retinal neurons and glia during diabetes. *Clin. Exp. Optom.* **88**, 132–145 (2005).
71. Tzekov, R. & Arden, G. B. The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Surv. Ophthalmol.* **44**, 53–60 (1999).

72. Wang, M., Ma, W., Zhao, L., Fariss, R. N. & Wong, W. T. Adaptive Müller cell responses to microglial activation mediate neuroprotection and coordinate inflammation in the retina. *J. Neuroinflammation* **8**, 173 (2011).
73. Carpi-Santos, R., de Melo Reis, R. A., Gomes, F. C. A. & Calaza, K. C. Contribution of Müller Cells in the Diabetic Retinopathy Development: Focus on Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants* **11**, 617 (2022).
74. Wang, P. & Xia, F. EPO protects Müller cell under high glucose state through BDNF/TrkB pathway. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 8083–8090 (2015).
75. Iandiev, I., Pannicke, T., Reichenbach, A., Wiedemann, P. & Bringmann, A. Diabetes alters the localization of glial aquaporins in rat retina. *Neurosci. Lett.* **421**, 132–136 (2007).
76. McDowell, R. E. *et al.* Müller glial dysfunction during diabetic retinopathy in rats is reduced by the acrolein-scavenging drug, 2-hydrazino-4, 6-dimethylpyrimidine. *Diabetologia* **61**, 2654–2667 (2018).
77. Rungger-Brändle, E., A. Dosso, A. & M. Leuenberger, P. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **41**, 32–34 (2000).
78. Guidry, C., King, J. L. & Mason, J. O. Fibrocontractive müller cell phenotypes in proliferative diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **50**, 1929–1939 (2009).
79. Picconi, F. *et al.* Activation of retinal Müller cells in response to glucose variability. *Endocrine* **65**, 542–549 (2019).
80. Thompson, K. *et al.* Advanced glycation end (AGE) product modification of laminin downregulates Kir4.1 in retinal Müller cells. *PLoS One* **13**, 1–13 (2018).
81. Carpi-Santos, R. *et al.* Early changes in system xc- and glutathione in the retina of diabetic rats. *Exp. Eye Res.* **146**, 35–42 (2016).

82. Wang, J. *et al.* Sigma 1 receptor regulates the oxidative stress response in primary retinal Müller glial cells via NRF2 signaling and system xc-, the Na⁺-independent glutamate-cystine exchanger. *Free Radic. Biol. Med.* **86**, 25–36 (2015).
83. Gerhardinger, C. *et al.* Expression of acute-phase response proteins in retinal Müller cells in diabetes. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **46**, 349–357 (2005).
84. Shamsul Ola, M. *Diabetic retinopathy*. (2012).
85. Forbes, J. M. & Cooper, M. E. Mechanisms of Diabetic Complications. *Physiol. Rev.* **93**, 137–188 (2013).
86. Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615–1625 (2005).
87. Gkogkolou, P. & Böhm, M. Advanced glycation end products: Keyplayers in skin aging? *Dermatoendocrinol.* **4**, 259–270 (2012).
88. Tarr, J. M. *et al.* Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN Ophthalmol.* **2013**, 343560 (2013).
89. Li, Q. *et al.* Reasonably activating Nrf2: A long-term, effective and controllable strategy for neurodegenerative diseases. *Eur. J. Med. Chem.* **185**, (2020).
90. Sies, H. *Oxidative Stress: Eustress and Distress in Redox Homeostasis. Stress: Physiology, Biochemistry, and Pathology* (Elsevier Inc., 2019). doi:10.1016/B978-0-12-813146-6.00013-8.
91. Betteridge, D. J. What is oxidative stress? *Metabolism.* **49**, 3–8 (2000).
92. Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224**, 164–175 (2014).
93. Moldogazieva, N. T. *et al.* ROS and RNS signalling : adaptive redox switches through oxidative / nitrosative protein modifications. *Free Radic. Res.* **52**,

- 507–543 (2018).
94. Mathers, J. *et al.* Antioxidant and cytoprotective responses to redox stress. *Biochem. Soc. Symp.* **71**, 157–176 (2004).
 95. Jacob, C. & Winyard, P. G. *Redox signaling and regulation in biology and medicine.* (2009).
 96. Russell, E. G. & Cotter, T. G. *New Insight into the Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cellular Signal-Transduction Processes. International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 319 (Elsevier Ltd, 2015).
 97. Costa, T. J. *et al.* The homeostatic role of hydrogen peroxide, superoxide anion and nitric oxide in the vasculature. *Free Radic. Biol. Med.* **162**, 615–635 (2021).
 98. Malone, P. E. & Hernandez, M. R. 4-Hydroxynonenal, a product of oxidative stress, leads to an antioxidant response in optic nerve head astrocytes. *Exp. Eye Res.* **84**, 444–454 (2007).
 99. Checa, J. & Aran, J. M. Reactive oxygen species: Drivers of physiological and pathological processes. *J. Inflamm. Res.* **13**, 1057–1073 (2020).
 100. de Bari, L. *et al.* Interplay among Oxidative Stress, Methylglyoxal Pathway and S-Glutathionylation. *Antioxidants 2021, Vol. 10, Page 19* **10**, 19 (2020).
 101. Zhang, L. *et al.* Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* **26**, 101284 (2019).
 102. Dinkova-Kostova, A. T. & Talalay, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 128–138 (2008).
 103. Haddad, J. J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cell. Signal.* **14**, 879–897 (2002).
 104. Espinosa-Diez, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* **6**, 183–197 (2015).

105. Kowluru, R. A. *et al.* TIAM1-RAC1 signalling axis-mediated activation of NADPH oxidase-2 initiates mitochondrial damage in the development of diabetic retinopathy. *Diabetologia* **57**, 1047–1056 (2014).
106. Shi, Q. *et al.* Effects of rhaponticin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through NRF2/HO-1/NF- κ B signalling. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **34**, 1–9 (2020).
107. Sun, Y. *et al.* Grape seed proanthocyanidin extract protects the retina against early diabetic injury by activating the Nrf2 pathway. *Exp. Ther. Med.* **11**, 1253–1258 (2016).
108. Robinson, R. *et al.* Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. *Redox Biol.* **34**, 101574 (2020).
109. Li, S., Yang, H. & Chen, X. Protective effects of sulforaphane on diabetic retinopathy: activation of the Nrf2 pathway and inhibition of NLRP3 inflammasome formation. *Exp. Anim.* **68**, 221–231 (2019).
110. Du, Y., Veenstra, A., Palczewski, K. & Kern, T. S. Photoreceptor cells are major contributors to diabetes-induced oxidative stress and local inflammation in the retina. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16586–16591 (2013).
111. van Reyk, D. M., Gillies, M. C. & Davies, M. J. The retina: Oxidative stress and diabetes. *Redox Rep.* **8**, 187–192 (2003).
112. Kowluru, R. A. & Pooi-See, C. Oxidative stress in diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes Res.* **2007**, 1–11 (2007).
113. Cecilia, O. M. *et al.* Oxidative Stress as the Main Target in Diabetic Retinopathy Pathophysiology. *J. Diabetes Res.* **2019**, 8562408 (2019).
114. Hayes, J. D. & Dinkova-Kostova, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 199–218 (2014).

115. Niture, S. K., Khatri, R. & Jaiswal, A. K. Regulation of Nrf2 - An update. *Free Radic. Biol. Med.* **66**, 36–44 (2014).
116. Vinson, C. *et al.* Classification of Human B-ZIP Proteins Based on Dimerization Properties. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6321–6335 (2002).
117. Hayes, J. D., Chowdhry, S., Dinkova-kostova, A. T. & Sutherland, C. Dual regulation of transcription factor Nrf2 by Keap1 and by the combined actions of β -TrCP and GSK-3. 611–620 (2015) doi:10.1042/BST20150011.
118. Xiang, M., Namani, A., Wu, S. & Wang, X. Nrf2: Bane or blessing in cancer? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **140**, 1251–1259 (2014).
119. Zhang, D. D. Mechanistic studies of the Nrf2-Keap1 signaling pathway. *Drug Metab. Rev.* **38**, 769–789 (2006).
120. Cominacini, L. *et al.* Endoplasmic reticulum stress and Nrf2 signaling in cardiovascular diseases. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 233–242 (2015).
121. Tonelli, C., Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants Redox Signal.* **29**, 1727–1745 (2018).
122. Qin, J. J., Cheng, X. D., Zhang, J. & Zhang, W. D. Dual roles and therapeutic potential of Keap1-Nrf2 pathway in pancreatic cancer: A systematic review. *Cell Commun. Signal.* **17**, 1–15 (2019).
123. Dinkova-Kostova, A. T., Kostov, R. V. & Canning, P. Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 84–93 (2017).
124. Harder, B. *et al.* Molecular mechanisms of Nrf2 regulation and how these influence chemical modulation for disease intervention. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 680–686 (2015).
125. Xue, M. *et al.* Frequency Modulated Translocational Oscillations of Nrf2 Mediate the Antioxidant Response Element Cytoprotective Transcriptional Response. *Antioxid. Redox Signal.* **23**, 613–629 (2015).

126. Raghunath, A. *et al.* Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications. *Redox Biol.* **17**, 297–314 (2018).
127. Hayes, J. D., McMahon, M., Chowdhry, S. & Dinkova-Kostova, A. T. Cancer chemoprevention mechanisms mediated through the keap1-Nrf2 pathway. *Antioxidants Redox Signal.* **13**, 1713–1748 (2010).
128. Mishra, M., Zhong, Q. & Kowluru, R. A. Epigenetic modifications of Keap1 regulate its interaction with the protective factor Nrf2 in the development of diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **55**, 7256–7265 (2014).
129. Mishra, M., Zhong, Q. & Kowluru, R. A. Epigenetic modifications of Nrf2-mediated glutamate-cysteine ligase: Implications for the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon associated with its continued progression. *Free Radic. Biol. Med.* **75**, 129–139 (2014).
130. Zazueta, C. & Königsberg, M. Nrf2 : Molecular and epigenetic regulation during aging. **47**, 31–40 (2018).
131. Albert-Garay, J. S., Riesgo-Escovar, J. R., Sánchez-Chávez, G. & Salceda, R. Retinal Nrf2 expression in normal and early streptozotocin-diabetic rats. *Neurochem. Int.* **145**, 105007 (2021).
132. du Sert, N. P. *et al.* Reporting animal research: Explanation and elaboration for the arrive guidelines 2.0. *PLoS Biology* vol. 18 (2020).
133. El-Sharkawey, A. Calculate the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF). (2016) doi:10.13140/RG.2.1.1307.8008.
134. McQuin, C. *et al.* CellProfiler 3.0: Next-generation image processing for biology. *PLoS Biol.* **16**, 1–17 (2018).
135. Stirling, D. R. *et al.* CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC Bioinformatics* **22**, 1–11 (2021).
136. Sánchez-Chávez, G., Hernández-Ramírez, E., Osorio-Paz, I., Hernández-Espinosa, C. & Salceda, R. Potential Role of Endoplasmic Reticulum Stress

- in Pathogenesis of Diabetic Retinopathy. *Neurochem. Res.* **41**, 1098–1106 (2016).
137. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
 138. Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**, 3159–3165 (2007).
 139. Lau, A., Tian, W., Whitman, S. A. & Zhang, D. D. The predicted molecular weight of Nrf2: It is what it is not. *Antioxidants Redox Signal.* **18**, 91–93 (2013).
 140. Sykiotis, G. P. & Bohmann, D. Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci. Signal.* **3**, re3 (2010).
 141. Nerland, D. E. . The antioxidant/electrophile response element motif. *Drug Metab. Rev.* **39**, 235–248 (2007).
 142. Zhu, H., Itoh, K., Yamamoto, M., Zweier, J. L. & Li, Y. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: Protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *FEBS Lett.* **579**, 3029–3036 (2005).
 143. Rojo, A. I., Sagarra, M. R. De & Cuadrado, A. GSK-3 β down-regulates the transcription factor Nrf2 after oxidant damage: Relevance to exposure of neuronal cells to oxidative stress. *J. Neurochem.* **105**, 192–202 (2008).
 144. Jain, A. K. & Jaiswal, A. K. GSK-3 β acts upstream of Fyn kinase in regulation of nuclear export and degradation of NF-E2 related factor 2. *J. Biol. Chem.* **282**, 16502–16510 (2007).
 145. Mariappan, M. M., Shetty, M., Sataranatarajan, K., Choudhury, G. G. & Kasinath, B. S. Glycogen synthase kinase 3 β is a novel regulator of high glucose- and high insulin-induced extracellular matrix protein synthesis in

- renal proximal tubular epithelial cells. *J. Biol. Chem.* **283**, 30566–30575 (2008).
146. Liu, G. H., Qu, J. & Shen, X. NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1783**, 713–727 (2008).
 147. Tan, S. M. & de Haan, J. B. Combating oxidative stress in diabetic complications with Nrf2 activators: How much is too much? *Redox Rep.* **19**, 107–117 (2014).
 148. Ramos, H. *et al.* Antioxidant Effects of DPP-4 Inhibitors in Early Stages of Experimental Diabetic Retinopathy. (2022).
 149. Alsabaani, N. A., Osman, O. M., Dallak, M. A., Morsy, M. D. & Al-Dhibi, H. A. Maslinic Acid Protects against Streptozotocin-Induced Diabetic Retinopathy by Activating Nrf2 and Suppressing NF- κ B. *J. Ophthalmol.* **2022**, (2022).
 150. Shi, Q. *et al.* Palbinone alleviates diabetic retinopathy in STZ-induced rats by inhibiting NLRP3 inflammatory activity. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **34**, 1–8 (2020).
 151. Liu, H. W., Luo, Y., Zhou, Y. F. & Chen, Z. P. Probuocol Prevents Diabetes-Induced Retinal Neuronal Degeneration through Upregulating Nrf2. *Biomed Res. Int.* **2020**, (2020).
 152. Hernández-Ramírez, E., Sánchez-Chávez, G., Estrella-Salazar, L. A. & Salceda, R. Nitrosative Stress in the Rat Retina at the Onset of Streptozotocin-Induced Diabetes. *Cell. Physiol. Biochem.* **42**, 2353–2363 (2017).
 153. Su, Q., Dong, J., Zhang, D., Yang, L. & Roy, R. Protective Effects of the Bilobalide on Retinal Oxidative Stress and Inflammation in Streptozotocin - Induced Diabetic. *Appl. Biochem. Biotechnol.* (2022) doi:10.1007/s12010-022-04012-5.
 154. Xu, Z. *et al.* Urolithin A ameliorates diabetic retinopathy *via* activation of the

- Nrf2/HO-1 pathway. *Endocr. J.* 1–12 (2022) doi:10.1507/endocrj.ej21-0490.
155. Zhong, Q., Mishra, M. & Kowluru, R. A. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 3941–3948 (2013).
 156. Fan, J., Xu, G., Jiang, T. & Qin, Y. Pharmacologic induction of heme oxygenase-1 plays a protective role in diabetic retinopathy in rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **53**, 6541–6556 (2012).
 157. De Faria, J. M. L. *et al.* Defective autophagy in diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **57**, 4356–4366 (2016).
 158. Zhu, X. *et al.* Expression of Glial Cell Line-Derived Neurotrophic Factor and its Receptors in Cultured Retinal Müller Cells Under High Glucose Circumstance. *Anat. Rec.* **295**, 532–539 (2012).
 159. Han, N., Yu, L., Song, Z., Luo, L. & Wu, Y. Agmatine protects Müller cells from high-concentration glucose-induced cell damage via N-methyl-D-aspartic acid receptor inhibition. *Mol. Med. Rep.* **12**, 1098–1106 (2015).
 160. Chen, H. *et al.* Berberine attenuates apoptosis in rat retinal Müller cells stimulated with high glucose via enhancing autophagy and the AMPK/mTOR signaling. *Biomed. Pharmacother.* **108**, 1201–1207 (2018).
 161. Miller, W. P. *et al.* The stress response protein REDD1 promotes diabetes-induced oxidative stress in the retina by Keap1-independent Nrf2 degradation. *J. Biol. Chem.* **2**, jbc.RA120.013093 (2020).
 162. Giordano, C. R. *et al.* Catalase therapy corrects oxidative stress-induced pathophysiology in incipient diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 3095–3102 (2015).
 163. Xu, Z. *et al.* NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia* **57**, 204–213 (2014).
 164. Du, Y., Smith, M. A., Miller, C. M. & Kern, T. S. Diabetes-induced nitrate

- stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *Journal of Neurochemistry* vol. 80 771–779 (2002).
165. Du, J. *et al.* A prodrug of epigallocatechin-3-gallate alleviates high glucose-induced pro-angiogenic factor production by inhibiting the ROS/TXNIP/NLRP3 inflammasome axis in retinal Müller cells. *Exp. Eye Res.* **196**, 108065 (2020).
 166. Heurtaux, T. *et al.* Normal and Pathological NRF2 Signalling in the Central Nervous System. *Antioxidants* **11**, 1–36 (2022).
 167. Takahashi, S. *et al.* An Nrf2/Small Maf Heterodimer Mediates the Induction of Phase II Detoxifying Enzyme Genes through Antioxidant Response Elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **236**, 313–322 (2002).
 168. He, F., Antonucci, L. & Karin, M. NRF2 as a regulator of cell metabolism and inflammation in cancer. *Carcinogenesis* **41**, 405–416 (2020).
 169. Chartoumpekis, D. V, Wakabayashi, N. & Kensler, T. W. Keap1 / Nrf2 pathway in the frontiers of cancer and non-cancer cell metabolism. 639–644 (2015) doi:10.1042/BST20150049.
 170. Xue, M. *et al.* Frequency modulated translocational oscillations of Nrf2 , a transcription factor functioning like a wireless sensor. 669–673 (2015) doi:10.1042/BST20150060.
 171. Cuadrado, A. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3 / β -TrCP. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 147–157 (2015).
 172. Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J. & Tang, X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1863**, 585–597 (2017).
 173. Saha, S., Buttari, B., Panieri, E., Profumo, E. & Saso, L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules* **25**, 1–31 (2020).

174. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **1**, 1–10 (2009).
175. Abraham, E. NF-kappaB activation. *Crit. Care Med.* **28**, (2000).
176. Napetschnig, J. & Wu, H. Molecular basis of NF-κB signaling. *Annu. Rev. Biophys.* **42**, 443–468 (2013).
177. Leinonen, H. M., Kansanen, E. & Petri, P. Dysregulation of the Keap1 – Nrf2 pathway in cancer. 645–649 (2015) doi:10.1042/BST20150048.
178. Zong, H. *et al.* Hyperglycaemia-induced pro-inflammatory responses by retinal Müller glia are regulated by the receptor for advanced glycation end-products (RAGE). *Diabetologia* **53**, 2656–2666 (2010).
179. Holmström, K. M., Kostov, R. V. & Dinkova-Kostova, A. T. The multifaceted role of Nrf2 in mitochondrial function. *Curr. Opin. Toxicol.* **2**, 80–91 (2017).
180. Corporation, B. *et al.* CREB-binding protein p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 2927–2932 (1997).
181. Hwang, Y. J. *et al.* MafK positively regulates NF-κB activity by enhancing CBP-mediated p65 acetylation. *Sci. Rep.* **3**, 1–10 (2013).
182. Kim, J. E. *et al.* Suppression of NF-κB signaling by KEAP1 regulation of IKKβ activity through autophagic degradation and inhibition of phosphorylation. *Cell. Signal.* **22**, 1645–1654 (2010).

Anexo 1.

Primers para PCR

El diseño de los primers se realizó a través de las herramientas web: Primer Designing del NIH (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y Oligo Analysis de Eurofins-Genomics (<https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis/>).

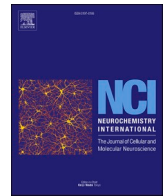
Especificaciones de los Primers:

# de acceso	Gen	Secuencia (5'-3')	Longitud	Tm	GC%	Tamaño del producto
NM_053800.3	Tiorredoxina (TXN)	For: ATGACTGCCAGGATGTTGCT	20	59.6	50	87
		Rev: ACTCCCCAACCTTTTGACCC	20	59.8	55	
NM_017051.2	Superóxido dismutasa 2 (SOD 2)	For: GCTTGAATTGCTTGGACGCT	20	59.7	50	70
		Rev: GCCCCAACACAGAGATGGAA	20	59.9	50	
NM_012815.2	Glutamato-cisteína ligasa, subunidad catalítica (GCLc)	For: GAGCGAGATGCCGTCTTACA	20	59.9	55	86
		Rev: TTGCTACACCCATCCACCAC	20	59.6	55	
NM_031144.3	Actina B (ACTB)	For: ATGTGGATCAGCAAGCAGGA	20	59.3	50	99
		Rev: AAGGGTGTA AACGCAGCTCA	21	60.4	47	
NM_031789.2	Factor nuclear eritroide 2 relacionado al factor 2 (Nrf2)	For: CACATCCAGACAGACACCAGT	21	59.6	52	121
		Rev: CTACAAATGGGAATGTCTCTGC	22	57.1	45	
NM_057152.2	Kelch-like ECH-associated protein (Keap1)	For: CATCGGCATCGCCAACTTC	19	59.6	57.8	99
		Rev: AAGA ACTCCTCCTCCCCGAA	20	59.8	55	

Publicaciones

Retinal Nrf2 expression in normal and early streptozotocin-diabetic rats. Neurochemistry International. 2021. DOI: 10.1016/j.neuint.2021.105007

High glucose concentrations induce oxidative stress by inhibiting Nrf2 expression in rat Müller retinal cells in vitro. Scientific reports. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05284-x>



Retinal Nrf2 expression in normal and early streptozotocin-diabetic rats

Jesús Silvestre Albert-Garay^{a,*}, Juan Rafael Riesgo-Escovar^b, Gustavo Sánchez-Chávez^a, Rocío Salceda^a

^a Instituto de Fisiología Celular, Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, Mexico

^b Instituto de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, Querétaro, Mexico

ARTICLE INFO

Keywords:

Nrf2
Keap1
Diabetic retinopathy
Diabetes
Oxidative stress

ABSTRACT

Diabetic retinopathy is the most common cause of vision loss among diabetic patients. Although hyperglycemia produces retinal oxidative stress in long-standing diabetes, the pathogenesis mechanism is unknown. The Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) plays a central role in cell responses against oxidative damage. We used adult Long Evans rats where diabetes was induced by streptozotocin. Normal and treated rats were sacrificed at 7, 20, and 45 days after streptozotocin injection. We analyzed Nrf2 and Keap1 expression in retinal homogenates, cytoplasmic, and nuclear retinal fractions. Normal retina showed Nrf2 expression in all retina nuclear layers. We found a transitory decrease of Nrf2 mRNA and protein expression at 7 and 20 days after the streptozotocin injection that recovered later on: moreover, the protein level increased after 45 days. Keap1 immunoprecipitation revealed similar levels as Nrf2 in normal and diabetic rat retinas, indicating that the diabetic condition did not lead to dissociation of the Keap1-Nrf2 complex. Indeed, glutathione levels and superoxide dismutase activity were not altered in the treated rat retinas. These results do not support oxidative stress in the retina shortly after diabetes induction.

1. Introduction

Diabetic retinopathy is a major complication induced by sustained hyperglycemia and a key cause of visual loss in adults. Although diabetic retinopathy is characterized by microvascular complications, early neural retina alterations have been demonstrated in animal models (Aung et al., 2013; Li et al., 2002; Shinoda et al., 2007). Hyperglycemia is known to lead to oxidative stress in endothelial cells and in the retina at long-standing diabetes induction (Baynes and Thorpe, 1999; Giacco and Brownlee, 2010), which have been attributed to Nrf2 decreased activity (Li et al., 2019; Zhong et al., 2013).

Normal cellular metabolism produces reactive oxygen species, a by-product of many metabolic reactions balanced by different cellular antioxidants. The cellular redox potential is maintained mainly by Nrf2 (Moi et al., 1994). Nrf2 regulates the expression of antioxidant enzymes and glutathione biosynthesis, protecting against oxidative stress (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014; Kensler et al., 2006). Under normal conditions, Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) retains Nrf2 in the cytoplasm, together with Cullin 3 (Cul3). The Keap1-Cul3 system degrades Nrf2 by ubiquitination (Hojzan et al., 2013). Oxidative stress

disrupts the Keap1-Cullin 3 system allowing Nrf2 to translocate to the nucleus. Nuclear Nrf2 binds antioxidant response elements (AREs), initiating the transcription of several antioxidant enzyme genes (Igarashi et al., 2008; Takahashi et al., 2002).

An increase in the production of reactive oxygen species (ROS) has the capacity to damage biomolecules resulting in the development of several disorders (D röge, 2015). The Nrf2-Keap1 system protects against these pathologies. Involvement of Nrf2 in diabetes and obesity has been suggested, based on increased oxidative and nitrosative stress in diabetic Nrf2-null mice (Yoh et al., 2008) and suppression of high fat diet-induced-obesity by an Nrf2 inducer (Liby et al., 2009). Moreover, genetic and pharmacological studies provide evidence that the Keap1-Nrf2 system contributes to the prevention of diabetes mellitus onset (Urano et al., 2013). In the retina, long-term diabetes increases Nrf2 expression but decreases its DNA binding at the ARE, leading to a decrease in glutathione levels (Li et al., 2019; Mishra et al., 2014; Zhong et al., 2016). Whether this effect triggers retinopathy or is the result of the disease remains elusive. Therefore, we studied whether Nrf2 function is altered at early stages of diabetes by analyzing Nrf2 expression.

* Corresponding author. Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, 04510, Mexico.

E-mail addresses: jalbert@email.ifc.unam.mx, silvestre.alb@gmail.com (J.S. Albert-Garay).

<https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105007>

Received 24 August 2020; Received in revised form 14 January 2021; Accepted 25 February 2021

Available online 3 March 2021

0197-0186/© 2021 The Authors.

Published by Elsevier Ltd.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Abbreviations

Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2
Keap1	Kelch-like ECH-associated protein 1
Cul3	Cullin 3
AREs	Antioxidant response elements
ROS	Reactive oxygen species
GSK3 β	Glycogen synthase kinase-3
PKC	Protein kinase C
PERK	PKR-like endoplasmic reticulum kinase
STZ	Streptozotocin
GSH	Glutathione
SOD	Superoxide dismutase

2. Methods

2.1. Experimental animals

Fifty female adult Long Evans rats (two-months-old) were used. Diabetes was induced by a single intraperitoneal administration of streptozotocin (STZ) (98 mg/kg) dissolved in citrate buffer (pH 4.5) (Coffe et al., 2008). Insulin was not administered. Control (non-diabetic) rats were injected with vehicle alone. The animals were housed under standard laboratory conditions (25 °C, 12 h light-dark cycle). All animals survived during the study. Animals were sacrificed along with age-matched control rats after 7, 20, 30, and 45 days of STZ administration. Blood was collected, eyes were quickly enucleated, and retinas isolated; liver and brain tissue were dissected under ice. All efforts were made to minimize animal suffering and reduce the number of animals used.

All procedures were in agreement with the Mexican Institutes of Health Research rules (DOF. NOM-062-Z00-1999) and with the Statement on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. The protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Instituto de Fisiología Celular (protocol number RSS43-14).

2.2. RT-PCR analysis

Total retinal RNA was extracted using Trizol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. The concentration and purity of RNA were evaluated with a NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific). Purified RNA (2 μ g) was used to generate first-strand cDNA using the M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, 9PIM170). We used this cDNA for PCR amplification with the following primers: Nrf2, 5'-CTCTCTGGAGACGGCCATGACT-3' (forward) and 5'-CTGGGCTGGGACAGTGGTAGT-3' (reverse); GAPDH, 5'-CAACTCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' (forward) and 5'-GGCATG-GACTGTGGTCATGA-3' (reverse) (T4 Oligo) (Langnaese et al., 2008; Zhong et al., 2013). Real-time PCR was performed using SYBR green and the Light Cycler 2.0 (Roche Diagnostics). PCR conditions were as follows: initial denaturing step at 95 °C for 10 s, followed by 40 cycles at 95 °C for 10 s, annealing at 56 °C for 10 s, and extension at 72 °C for 15 s, and a final cycle at 72 °C for 5 min; final melting curve analysis confirmed the purity of the end products. The relative expression was normalized using GAPDH as a reference gene. Statistical analysis of relative gene expression was evaluated by the comparative $2^{-\Delta\Delta}$ Ct method (Livak and Schmittgen, 2001).

2.3. Nuclear and cytosolic fractionation

Retinas were isolated in calcium-magnesium free Hank's medium (HK; Sigma H-4641), gently stirred for 5 min, and then incubated at

room temperature for 10 min in HK containing 0.1% trypsin. Retinas were transferred to TC-199 medium (Sigma M-0650) and cells dissociated by passing them several times through a Pasteur pipette. After repeating this procedure twice, the suspension was centrifuged at 1000 \times g for 5 min. The resulting pellet corresponded to the nuclear fraction and the supernatant to the cytoplasmic fraction. The nuclear pellet was homogenized in 50 mM Hepes buffer, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton-X-100. Antiproteolitics (5 μ g/ml bacitracin, 0.01 mM benzamidine, 0.5 μ g/ml soybean trypsin inhibitor, 0.05 μ g/ml pepstatin, 0.1 μ g/ml aprotinin, 0.1 μ g/ml leupeptin) were added to both cellular fractions, and they were incubated for 6 min at 4 °C with shaking; samples were then stored at -70 °C until used.

2.4. Immunoprecipitation and immunoblotting

Rat liver, brain and retina were homogenized in RIPA lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 158 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 mM Na₂MoO₄, 25 mM NaF, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1 mM EDTA, antiproteolitics, 1% Triton X-100, 0.2% SDS). The homogenates were centrifuged 20 min at 17,000 g, and the supernatant was stored at -70 °C until use. For immunoprecipitation assays, 100 μ g of protein was incubated in the presence of anti-Nrf2 (Abcam, #ab-137550) or anti-Keap1 (Santa Cruz Biotechnology, #sc-33569) (immunoprecipitating antibodies), previously coupled to protein A-sepharose beads (0.1 mg/ μ L; Sigma P-3391). The samples were incubated at 4 °C under constant shaking for 18 h and centrifuged at 20,800 g for 2 min. The pellet was then washed three times with RIPA lysis buffer (without SDS).

Tissue extracts and immunoprecipitated complex were solubilized in Laemmli sample buffer (150 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1.67% 2-mercaptoethanol, 1.67% sodium dodecyl sulfate, 10% glycerol and bromophenol blue) and boiled for 5 min (Laemmli et al., 1970). Equal amounts of samples were resolved in 10% SDS polyacrylamide gels. The proteins were transferred to PVDF Immobilon membranes (Millipore Corp, Billerica). Blots were stained with Ponceau S to confirm that protein loading was the same in all lanes. The membranes were blocked with 5% non-fat milk in TBS-T (Trizma 20 mM, NaCl 136 mM, and 0.1% Tween 20) for 2 h at room temperature. After blocking, membranes were incubated overnight with either rabbit anti-Nrf2 (1:800, Abcam #ab-137550), mouse anti-Nrf2 (1:1000, Abcam #ab89443), rabbit anti-Keap-1 (1:800, Santa Cruz Biotechnology #sc-33569), mouse anti-ubiquitin (1:1000, Cell Signaling #3936), mouse anti-actin (1:3000, Abcam #ab-3280), or rabbit anti-histone 2B (H2b; 1:1000, Cell Signaling #12364). Membranes were washed and incubated for 2 h with horseradish-peroxidase-conjugated antibodies (1:8000–10000, Santa Cruz Biotechnology). The signal was detected using an enhanced Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corp, Billerica). The signals on Hyperfilm ECL (GE Healthcare) were digitized with an Alpha DigiDoc RT (Alpha Innotech) and analyzed using relative optical densities derived from a densitometry program (Alpha Ease FC Stand Alone, Alpha Innotech).

2.5. Glutathione and superoxide dismutase assay

Total glutathione (GSH) levels were determined by a colorimetric method based in the GSH reductase-DTNB (5'5 dithiobis-2-nitrobenzoic acid) recycling assay (Rahman et al., 2007). Retinas were homogenized in phosphate buffer (phosphate 0.1 M, pH 7.5, 0.6% of sulfosalicylic acid, 5 mM EDTA and 0.1% Triton X-100). The homogenate was incubated in the presence of β -NADPH, DTNB, and glutathione-reductase. The change in optical density was measured at 10 min at 412 nm using a microplate spectrophotometer (Powerwave, BioTek). GSH concentration in the samples was determined using a standard GSH calibration curve.

The superoxide dismutase (SOD) activity was measured by the reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) to quantify superoxide radicals

produced by hydroxylamine. Retinas were homogenized in sodium carbonate buffer (Na_2CO_3 50 mM, pH 10.2). The homogenate was incubated with EDTA (0.1 mM), Triton x-100 (0.03%) and NBT (12 μM). Reduction of NBT was followed by an increase in absorbance at 560 nm. One unit of enzymatic activity equals to the amount of enzyme required to inhibit the NBT reduction by 50% (Hernández-Ramírez et al., 2017; Kono, 1978).

2.6. Immunohistochemistry

The eyecups were fixed in 4% paraformaldehyde (0.1 M phosphate buffer, 4% (w/v) paraformaldehyde, pH 7.4), cryo-protected, and 10 μm sections obtained in a cryostat. The sections were incubated overnight at 4 °C with a rabbit antibody against Nrf2 (1:200, Abcam), followed by a 2-h incubation with a Cy3-conjugated anti-rabbit antibody (1:500, Chemicon). For controls, the primary antibody incubation was omitted. Samples were examined using a Nikon microscope (Nikon Corp., Tokyo, Japan) and photographed with a Nikon DXM1200 digital camera (Nikon Corp., Tokyo, Japan). The fluorescent quantification was determined using the calculation for corrected total cell fluorescence (CTCF) = integrated density–(area of selected layer \times mean fluorescence of background readings) (El-Sharkawy, 2016), using FIJI software (Schindelin et al., 2012). For each image, three background areas were used to normalize against autofluorescence.

2.7. Protein content and glucose assessment

Total protein content was determined with a commercial assay kit from BioRad (# 500-0116), using bovine serum albumin (BSA; Sigma A-9647) as standard. Glucose concentration in the blood was determined using a blood glucose monitor (Accu-Chek Active, Roche).

2.8. Statistical analysis

All data are expressed as the mean \pm SEM and were analyzed with GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, C.) All experiments were performed as a minimum three times. Statistical analysis was conducted by Student's test, and one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey post hoc comparison tests was used to compare the levels of different experimental groups. A significant difference between the control and experimental group was defined as a P-value of ≤ 0.05 . The specific details of each experiment are provided in the corresponding figure legends.

3. Results

Animals were considered diabetic if they showed impaired growth, polyuria, and blood glucose levels over 250 mg/dl during the treatment and at the moment of sacrifice, in accordance with previous reports (Coffe et al., 2008) (Table 1).

We first examined Nrf2 protein expression in the retina from non-diabetic rats (normal retina). A relatively intense single band of ≈ 68 kDa was found, which corresponds to the reported molecular weight of Nrf2. The retinas from non-diabetic rats did not show significant

Table 1
Characteristics of STZ-diabetic rats.

Days of treatment	Blood glucose (mg/dl)		Body Weight (g)	
	Normal	STZ	Normal	STZ
7	136 \pm 3	355 \pm 14*	187 \pm 12	179 \pm 7
20	135 \pm 3	483 \pm 15*	273 \pm 23	170 \pm 15*
30	136 \pm 4	522 \pm 37*	323 \pm 27	162 \pm 20*
45	134 \pm 7	473 \pm 38*	370 \pm 25	157 \pm 23*

Values are the mean \pm SEM of 3 animals per group. *p < 0.05 with respect to their corresponding controls.

differences in Nrf2 expression along the times studied (Supplementary Fig. 1). We then compared retinal Nrf2 expression levels with those in the brain and liver, two other tissues with high metabolic activity. Remarkable, Nrf2 expression levels were slightly higher in the retina than in the brain and liver (Fig. 1A). While retinal nuclear Nrf2 levels were similar to those in the brain and considerably higher than in the liver, retinal cytoplasmic Nrf2 levels were four-fold higher than in the brain but equal to those in the liver (Fig. 1B).

In the diabetic rat retina, total Nrf2 expression decreased by 20% after 7 and 20 days after STZ administration but was 25% higher than the control value after 45 days of treatment (Fig. 2A). Interestingly, total levels of Keap1 also decreased (35%) after 7 days of treatment, then showed a gradual increase reaching values 35% higher than the control 45 days after STZ injection (Fig. 2B). Control values of untreated animals were evaluated in parallel at the same ages as the STZ injected rats (Supplementary Fig. 1), but they were found not to vary significantly among themselves and were collated and normalized to 100 (Fig. 2).

Immunohistochemical studies showed intense Nrf2 labeling in all nuclear layers of the normal retina (Fig. 3A). Fluorescence quantification evidenced a significant intensity decrease in the inner nuclear layer (INL) and outer nuclear layer (ONL) at 20 days after STZ injection. However, after 45 days of STZ injection, Nrf2 labeling levels had recovered in both retinal cell layers. (Fig. 3B and C). Quantification of fluorescence did not show changes in the ganglion cell layer (Fig. 3D).

We then studied the subcellular distribution of Nrf2 and Keap1 in normal and diabetic rat retinas by centrifugation fractionation. In the normal retina, relatively high levels of Nrf2 were found in both cytoplasmic and nuclear fractions. In the diabetic retina, nuclear levels of Nrf2 were reduced (40%) at 7 and 20 days of diabetes but bounced back after 30 days, a level maintained at 45 days after the STZ injection (Fig. 4B). Cytoplasmic Nrf2 levels did not change at 7 or 20 days after STZ treatment but increased (30%) at 45 days (Fig. 4 C). Meanwhile, nuclear and cytoplasmic Keap1 levels showed a slight decrease at 7 days but had normal levels up to 45 days after STZ injection (Fig. 5).

The transient nuclear decrease of Nrf2 found at 7 and 20 days did not appear to affect the redox state of the tissue because normal glutathione levels and superoxide dismutase activity were found at these times (Table 2).

In order to determine whether changes in nuclear Nrf2 levels at the onset of diabetes are due to changes in its transcription, we evaluated Nrf2 mRNA by RT-PCR. Nrf2 mRNA levels were reduced by 40% at 20 days of diabetes, but normal levels were found at 45 days of diabetes (Fig. 6).

The increase in cytoplasmic Nrf2 levels at 45 days of diabetes may be explained by an alteration in the Nrf2-Keap1 complex formation; therefore, we immunoprecipitated Keap1 and determined the levels of Nrf2. As shown in Fig. 7, Keap1 immunoprecipitation revealed similar Nrf2 levels in normal and diabetic rat retinas, indicating that the Keap1-Nrf2 complex is stable (Fig. 7B). Conversely, immunoprecipitation of Nrf2 (Fig. 8B) showed a small decrease (20%) of Keap1 levels after 45 days of STZ treatment. In addition, immunoprecipitation studies show a statistically significant reduction (25–30%) of ubiquitinated Nrf2 and/or Keap1 (Figs. 7C and 8C). Interestingly, immunoprecipitation of Nrf2/Keap1 showed additional bands for ubiquitin in normal and 20 days diabetic rat retina, which disappeared at 45 days diabetes (Supplementary Fig. 2). However, these bands might also correspond to other proteins immunoprecipitated on those days.

4. Discussion

Diabetic retinopathy is one of the most prevalent complications of diabetes and the leading cause of blindness in working-age adults (Sieving et al., 2017). Several molecular mechanisms have been invoked to explain hyperglycemia-induced retinopathy, in particular, impaired endogenous antioxidant ability (Baynes and Thorpe, 1999; Kowluru and Pooi-See, 2007). Nrf2 is considered the main regulator of the redox state

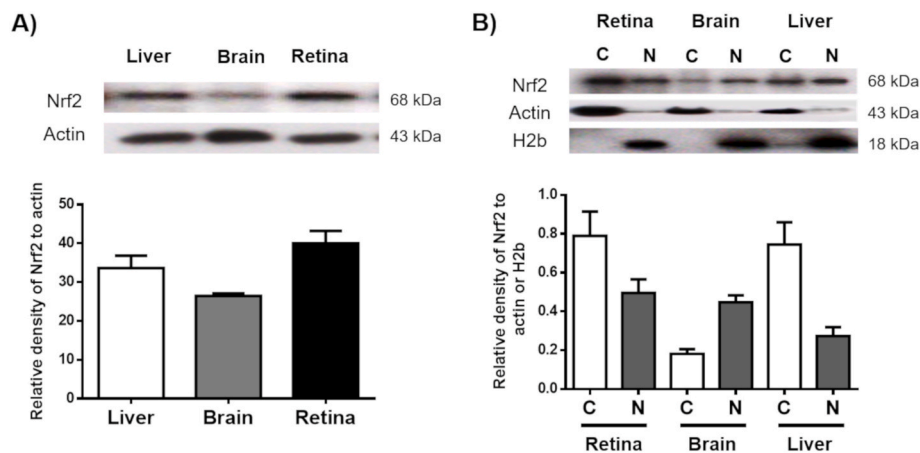


Fig. 1. Expression levels of Nrf2 in different tissues of the adult rat. (A) Western blot of Nrf2 expression in the retina, brain, and liver homogenates from 2 to 3 months old-rats. (B) Nuclear and cytoplasmic Nrf2 expression levels. The upper part, representative Western blot; lower part quantitative analyses. The relative expression levels of Nrf2 were normalized with actin or H2b (histone 2b). Values are the average of three independent experiments carried out in duplicate. Values are the mean \pm SEM. Nuclear fraction (N) and cytoplasmic fraction (C).

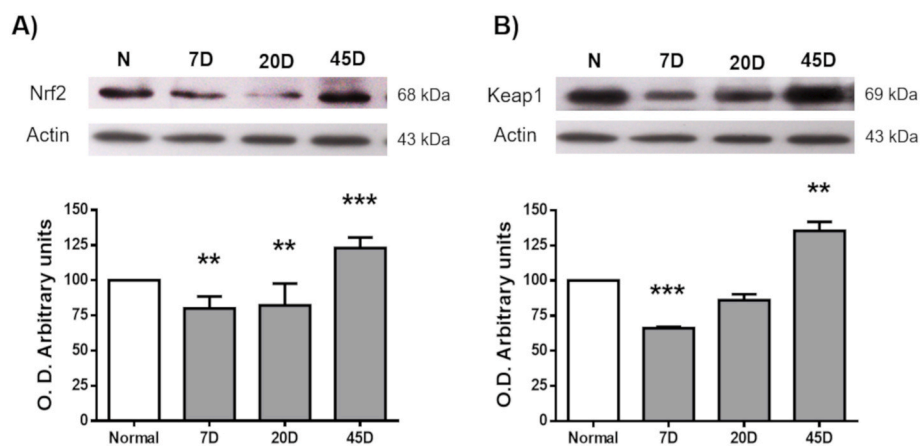


Fig. 2. Expression levels of Nrf2 and Keap1 in the retina of the diabetic rat. Western blot analysis of Nrf2 and Keap1 expression in homogenates from normal and diabetic rat retinas. The upper part, representative Western blot. The lower part, quantification of the expression levels of Nrf2 (A) and Keap1 (B). The relative expression levels were normalized with actin. Animals were sacrificed along with age-matched control rats after 7, 20, and 45 days of STZ administration. In this and following figures, control animals treated with vehicle did not show significant differences between them at different days, and so, values obtained were averaged together and normalized. We graphed the normalized values as reference. Values are the mean \pm SEM (n = 6 per group) carried out in duplicate. N, normal; 7, 20, and 45 (D) days after STZ injection. **p < 0.01 with respect to the normal; ***p < 0.001 with respect to the normal.

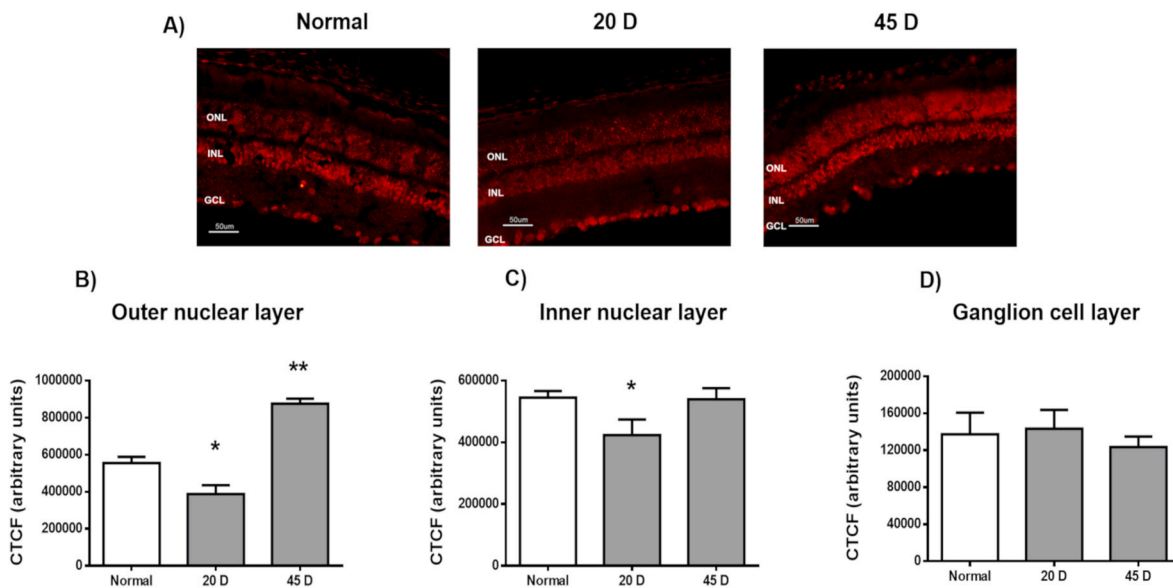


Fig. 3. Immunofluorescent localization of Nrf2 in vertical sections of the rat retina. (A) Labeling is distributed in all retinal somas of the normal, the 20 days, and 45 days STZ treated rat retinas. Fluorescent quantification of ONL (B), INL (C), and GCL (D) of the normal, 20 and 45 days STZ treated rat retinas. Values are the mean \pm SEM (n = 3 per group). Each group was compared with their respective control treated with vehicle. *p < 0.05 with respect to the normal retina; **p < 0.01 with respect to normal retina. ONL, outer cell layer; INL, inner cell layer; GCL, ganglion cell layer.

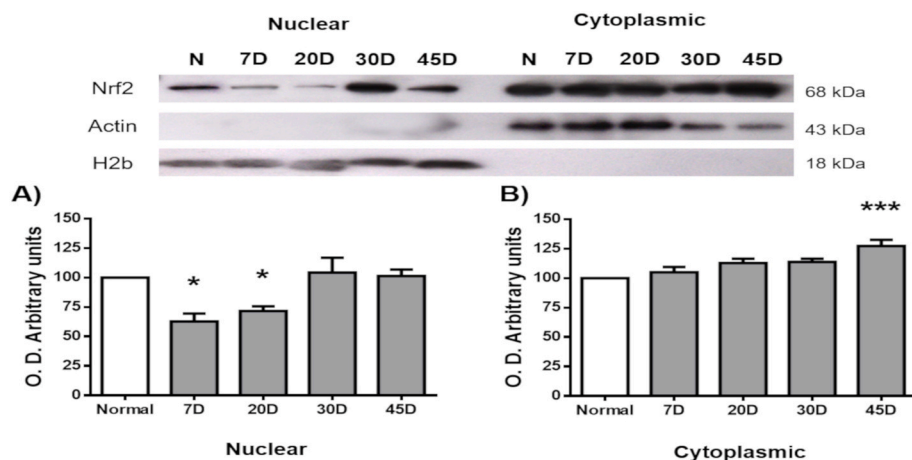


Fig. 4. Nuclear and cytoplasmic Nrf2 expression in the normal and the STZ treated rat retinas. The upper part, representative Western blot of Nrf2. The lower part, quantification of the relative levels of Nrf2. The relative expression levels were normalized with actin (cytoplasmic) or H2b (histone 2b; nuclear). Animals were sacrificed along with age-matched controls after 7, 20, 30, and 45 days of STZ administration. The relative expression levels were normalized with their respective controls treated with vehicle. Values represent the mean \pm SEM (n = 4 per group) carried out in duplicate. N, normal; 7, 20, 30, and 45 (D) days after STZ injection. *p < 0.05 with respect to the normal; ***p < 0.001 with respect to the normal.

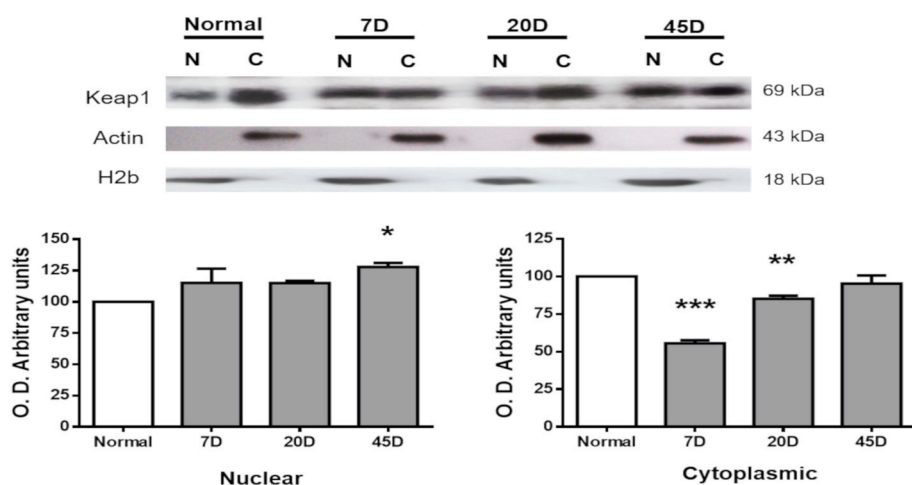


Fig. 5. Nuclear and cytoplasmic Keap1 expression in the normal and the STZ treated rat retinas. The upper part, representative Western blot of Keap1; lower part, quantification of their relative levels. The relative expression levels were normalized with actin (cytoplasmic) or H2b (nuclear), and each group was compared with its respective age-matched control treated with vehicle. Normal; 7, 20, and 45 (D) days after STZ injection. Nuclear fraction (N) and cytoplasmic fraction (C). Values represent the mean \pm SEM (n = 4 per group) carried out in duplicate. *p < 0.05 with respect to the normal; **p < 0.01 with respect to the normal; ***p < 0.001 with respect to controls.

Table 2
Glutathione levels and superoxide dismutase activity in normal and diabetic rat retina.

Condition	GSH	SOD
Normal	4.8 \pm 0.1	3.5 \pm 0.6
Diabetic 20 days	3.8 \pm 0.4	14 \pm 0.2*
Diabetic 45 days	4.1 \pm 0.4	3.0 \pm 0.7

Glutathione levels and superoxide dismutase activity in normal and diabetic rat retinas. Total glutathione (GSH) values are expressed as nmol/mg protein; superoxide dismutase activities (SOD) are expressed as U/mg protein, as described in Methods. Data are the mean \pm SEM for three to six different experiments; each group was compared with their respective age-matched controls. *p < 0.05 with respect to controls.

system, even though its regulation is likely complex involving numerous pathways. Under stressed conditions, Nrf2 is activated and accumulates in the nucleus, where it binds to ARE-dependent genes, inducing the expression of several antioxidant enzymes (Chanas et al., 2002; Igarashi et al., 2008; Kowluru and Pooi-See, 2007; Nitire et al., 2014; Takahashi et al., 2002). Furthermore, diabetic Nrf2-null mice retinas showed an increase in oxidative and nitrosative stresses compared to diabetic wild-type mice (Xu et al., 2014; Yoh et al., 2008). In the rat retina, a decrease in Nrf2 activity has been demonstrated at long-standing diabetes induction (3–8 months) (Li et al., 2019; Zhong et al., 2016). However, the role of Nrf2 in retina redox state at early induction diabetes stages has not been addressed.

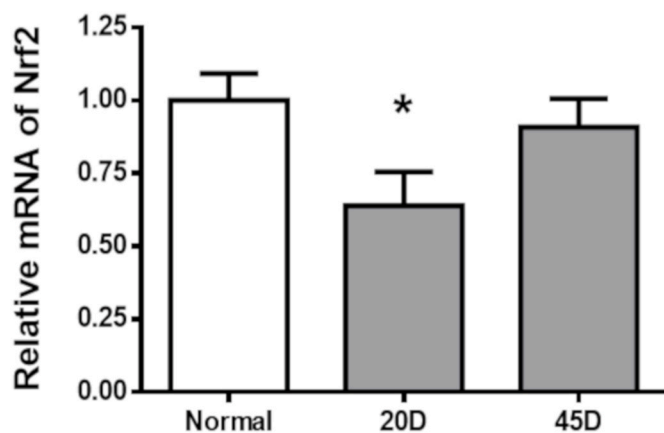


Fig. 6. mRNA Nrf2 expression in normal and diabetic rat retinas. The relative mRNA levels were normalized with GAPDH. Values are the mean \pm SEM (n = 3 per group) carried out in duplicate. Animals were sacrificed along with age-matched control rats after 20 and 45 days of STZ administration. The relative expression levels were normalized with their respective controls treated with vehicle. *p < 0.05 with respect to controls.

In the present study, we analyzed Nrf2 expression levels in the normal (non-diabetic) and in the early diabetic rat retinas to demonstrate possible alterations, which might lead to oxidative stress that could trigger retinopathy.

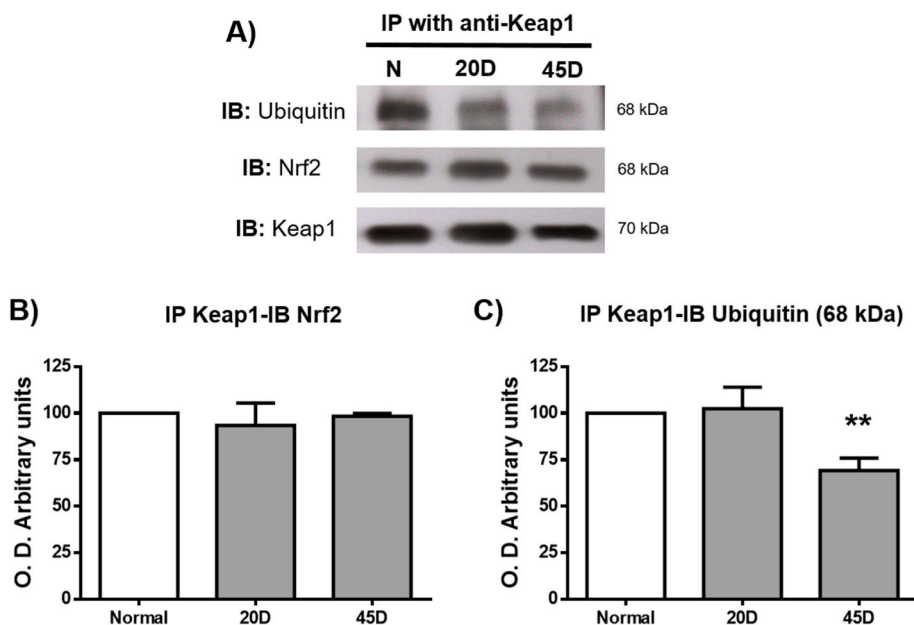


Fig. 7. Keap1 immunoprecipitation from normal and diabetic rat retina. (A) Representative Western blot of total immunoprecipitated Keap1. (B) Quantification of the relative levels of Nrf2. (C) Quantification of the relative levels of ubiquitin. Normal and STZ-diabetic rats (20D and 45D). The relative expression levels were normalized with Keap1, and each group was compared with its respective age-matched controls treated with vehicle. Values represent the mean \pm SEM (n = 4 per group) carried out in duplicate. **p < 0.01 with respect to controls.

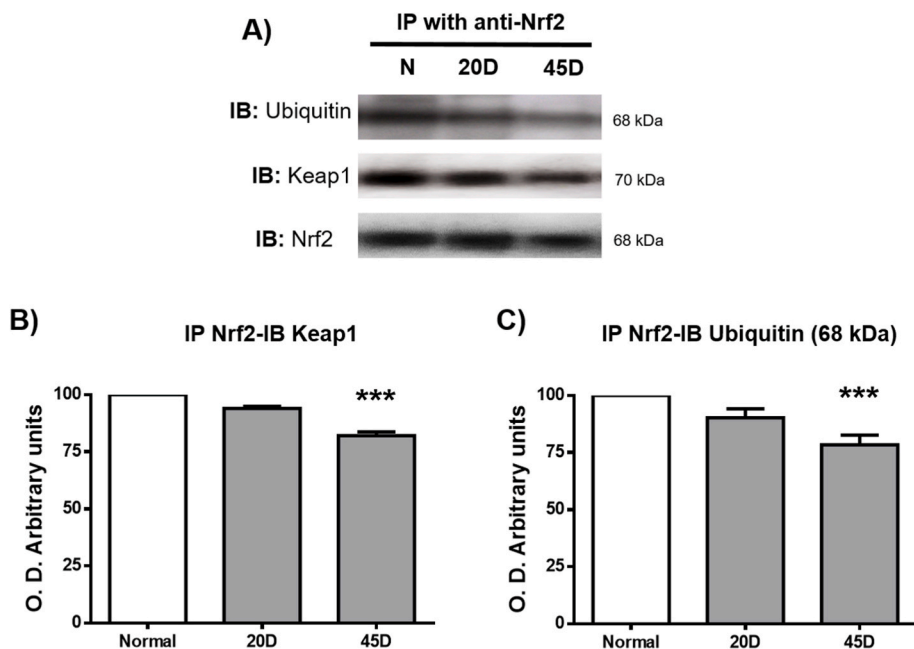


Fig. 8. Keap1-free Nrf2 levels increase in the retina of diabetic rats. (A) Representative Western blot of total immunoprecipitated Nrf2. (B) Quantification of the relative levels of Keap1. (C) Quantification of the relative levels of ubiquitin. For Normal (N) and STZ-diabetic rats (20 D, 45 D), the relative expression levels were normalized with Nrf2, and each group was compared with their respective age-matched controls treated with vehicle. Values represent the mean \pm SEM (n = 4 per group) carried out in duplicate. ***p < 0.001 with respect to controls.

We compared retinal Nrf2 expression levels to those in the brain and liver, tissues of high metabolic activity. Western blot analyses of total homogenates revealed relatively high levels of Nrf2 in the retina (Fig. 1). These results tie in with the immunohistochemical study that demonstrated intense labeling of Nrf2 in all retinal cell layers (Fig. 3).

Retinal nuclear levels of Nrf2 were also relatively high. Interestingly, cytoplasmic Nrf2 levels were four-fold higher in the retina and liver than in the brain (Fig. 1). Therefore, the high retinal Nrf2 levels may represent a protective mechanism and/or a high capacity to resist oxidant conditions. Indeed, the retina possesses a high respiratory rate and, due to its continuous light exposure, is highly susceptible to oxidative damage (Kooragayala et al., 2015). In this respect, light exposure increases Nrf2 levels and induces its translocation to the nucleus in retinal cells (Chen et al., 2017; Nagar et al., 2017).

Although the meaning of high cytoplasmic Nrf2 levels is not clear, it

might be related to its non-canonical regulation (Silva-Islas and Maldonado, 2018). In fact, these high expression levels are in accordance with the role of Nrf2 as a regulator of genes encoding proteins with a variety of cell functions (Hayes and Dinkova-Kostova, 2014). In this context, Nrf2 Knockout mice display retinal alterations, such as photoreceptor degeneration, inflammation, and visual deficits in both spatial and contrast sensitivity compared to wild-type mice (Wang et al., 2019; Zhao et al., 2011).

On the other hand, we found that retinal Nrf2 mRNA expression and protein levels were transiently decreased at 7 and 20 days after streptozotocin treatment. The immunohistochemical studies suggested that this transient decrease occurs in retinal cells located at the outer and inner nuclear layers, without apparent cellular degeneration (Fig. 3). The decrease of mRNA (Fig. 6) may explain the nuclear Nrf2 protein reduction (Fig. 4) since this nuclear factor regulates its own

transcription (Kwak et al., 2002). In spite of the transient nuclear decrease, the still high Nrf2 levels are apparently sufficient to avoid oxidative stress. Normal levels of glutathione and superoxide dismutase activity were found in the diabetic conditions studied (Table 2).

Moreover, we observed an increase in superoxide dismutase activity at 20 days of diabetes induction, which might indicate a cell adaptive response to neutralize ROS increases (Table 2). Besides, immunoprecipitation studies indicated that the Nrf2/Keap1 complex was stable, suggesting that Keap1 was not oxidized (Fig. 7). These results agree with previous studies in which no significant changes in the production of free radicals and lipid peroxidation levels were found up to 45 days after diabetes induction (Sánchez-Chávez et al., 2016).

The rise of cytoplasmic Nrf2 levels observed at 45 days suggests an increase of cellular Nrf2 protein to compensate for the previous transient nuclear reduction. Indeed, immunoprecipitation studies demonstrated that the diabetic condition did not modify the interaction between Nrf2 and Keap1 (Fig. 7A). However, the small increase of Nrf2 unbound to Keap1 (Fig. 7B) could lead to an unbalance in the complex formation. These results partially agree with those in which Nrf2 increased in the cytosolic fraction in the retina of STZ-treated rats for six to eight months (Zhong et al., 2013). These authors suggest that diabetes produces epigenetic modifications, resulting in an altered Nrf2 binding to the ARE (Mishra et al., 2014); however, other mechanisms cannot be ruled out.

Interestingly, immunoprecipitation of either Nrf2 or Keap1 revealed a remarkable decrease in ubiquitin-Nrf2/Keap1 conjugates, suggesting that a significant proportion of Nrf2/Keap1 at the Nrf2-Keap1 complex, as well as the free Nrf2, were not effectively degraded (Supplementary Fig. 2). These results may be explained by an altered capacity of Keap1 to bind to the cullin 3-ubiquitin system. Our results may also be explained by an upregulation of deubiquitinating proteins, that can rescue proteins targeted for degradation, allowing the cell to adapt quickly to physiological changes (Guterman and Glickman, 2005; Houson et al., 2018; Mishra et al., 2014). The changes observed in Nrf2 expression may also be explained by the action of different protein kinases (GSK3, PKC, PERK) known to modify Nrf2, and in so doing, regulating its synthesis and function (Saito et al., 2018; Silva-Islas and Maldonado, 2018). We are currently pursuing some of these avenues.

Taken together, our results indicate that at early stages of STZ-induced diabetes, although transitory changes in Nrf2 levels do occur, the retinal redox state is maintained; therefore, Nrf2 canonical function might be altered at longer times due to different Nrf2 regulators, which in turn might lead to the diabetic documented oxidative stress at longer times.

Author contributions

Jesús Silvestre Albert-Garay: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing-Original Draft, Visualization, Writing-Review & Editing. **Juan Rafael Riesgo-Escovar:** Methodology, Formal analysis, Resources, Writing-Review & Editing, Supervision. **Gustavo Sánchez-Chávez:** Methodology, Resources, Writing-Review & Editing. **Rocío Salceda:** Conceptualization, Investigation, Writing-Original Draft, Writing-Review & Editing, Project administration, Funding acquisition.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors would like to thank Ms T. Cortés and Ms D. Rodríguez for preparing retinal sections, M. of C. Adriana González-Gallardo of the Unidad de Proteogenómica, Instituto de Neurobiología-UNAM for her technical assistance, Hernández-Ramírez E for helping in some terminations, and to the Animal, Computational, and Library supporting Facilities Units of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM. This research was supported in part by a grant from DGAPA/PAPIIT-UNAM project IG200216. Jesús Silvestre Albert Garay is a PhD student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and has received CONACyT fellowship 613013.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105007>.

References

- Aung, M.H., Kim, M.K., Olson, D.E., Thule, P.M., Pardue, M.T., 2013. Early visual deficits in streptozotocin-induced diabetic long evans rats. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 54, 1370–1377. <https://doi.org/10.1167/iov.12-10927>.
- Baynes, J.W., Thorpe, S.R., 1999. Role of oxidative stress in diabetic complications. *Diabetes* 48, 1–9. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.1.1>.
- Chanas, S.A., Jiang, Q., McWALTER, G.K., McLellan, L.I., Elcombe, C.R., Henderson, C.J., Wolf, C.R., Moffat, G.J., Itohs, K., Yamamoto, M., Hayes, J.D., 2002. Loss of the Nrf2 transcription factor causes a marked reduction in constitutive and inducible expression of the glutathione S-transferase Gsta1, Gsta2, Gstm1, Gstm2, Gstm3 and Gstm2 genes in the livers of male and female mice. *Biochem. J.* 365, 405–416. <https://doi.org/10.1081/IPH-120014726>.
- Chen, W.J., Wu, C., Xu, Z., Kuse, Y., Hara, H., Duh, E.J., 2017. Nrf2 protects photoreceptor cells from photo-oxidative stress induced by blue light. *Exp. Eye Res.* 154, 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.exer.2016.12.001>.
- Coffe, V., Salceda, R., Sánchez-Chávez, G., Luna-Ulloa, L.B., Hernández-Berrones, J., 2008. Effect of diabetes on glycogen metabolism in rat retina. *Neurochem. Res.* 33, 1301–1308. <https://doi.org/10.1007/s11064-007-9583-7>.
- Dröge, W., 2015. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* 82, 47–95. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>.
- El-Sharkawy, A., 2016. Calculate the corrected total cell fluorescence (CTCF). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1307.8008>.
- Giacco, F., Brownlee, M., 2010. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.* <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>.
- Guterman, A., Glickman, M.H., 2005. Deubiquitinating enzymes are IN(trinsic to proteasome function). *Curr. Protein Pept. Sci.* 5, 201–210. <https://doi.org/10.2174/1389203043379756>.
- Hayes, J.D., Dinkova-Kostova, A.T., 2014. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* 39, 199–218. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2014.02.002>.
- Hernández-Ramírez, E., Sánchez-Chávez, G., Estrella-Salazar, L.A., Salceda, R., 2017. Nitrosative stress in the rat retina at the onset of streptozotocin-induced diabetes. *Cell. Physiol. Biochem.* 42, 2353–2363. <https://doi.org/10.1159/000480007>.
- Hojzan, V., Chaikwad, A., Pike, A.C.W., Marsden, B.D., Murray, J.W., Gileadi, O., Canning, P., von Delft, F., Keates, T., Thangaratnarajah, C., Bullock, A.N., Cooper, C.D.O., Knapp, S., Krojer, T., 2013. Structural basis for Cul3 protein assembly with the BTB-Kelch family of E3 ubiquitin ligases. *J. Biol. Chem.* 288, 7803–7814. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.437996>.
- Houson, H., Rao, G., Awasthi, V., Teng, C., Nkepan, G., Yari, H., 2018. Induction of gut proteasome activity in hemorrhagic shock and its recovery by treatment with diphenyldihaloketones CLEFMA and EF24. *Am. J. Physiol. Liver Physiol.* 315, G318–G327. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00066.2018>.
- Igarashi, K., Itoh, K., Katoh, Y., Ishii, T., Yamamoto, M., Engel, J.D., Wakabayashi, N., 2008. Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev.* 13, 76–86. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.76>.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., Biswal, S., 2006. Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-nrf2-ARE pathway. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 47, 89–116. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.46.120604.141046>.
- Kono, Y., 1978. Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Arch. Biochem. Biophys.* 186, 189–195. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(78\)90479-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(78)90479-4).
- Kooragayala, K., Gotoh, N., Cogliati, T., Nellissery, J., Kaden, T.R., French, S., Balaban, R., Li, W., Covan, R., Swaroop, A., 2015. Quantification of oxygen consumption in retina ex vivo demonstrates limited reserve capacity of photoreceptor mitochondria. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 56, 8428–8436. <https://doi.org/10.1167/iov.15-17901>.
- Kowluru, R.A., Pooi-See, C., 2007. Oxidative stress in diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes Res.* 1–11. <https://doi.org/10.1155/2007/43603>, 2007.

- Kwak, Mi-Kyoung, Itoh, Ken, Masayuki Yamamoto, T.W.K., 2002. Enhanced expression of the transcription factor nrf2 by cancer chemopreventive agents: role of antioxidant response element-like sequences in the nrf2 promoter. *Mol. Cell Biol.* 22, 2883–2892. <https://doi.org/10.1128/MCB.22.9.2883>.
- Laemmli, U.K., Mölbert, E., Showe, M., Kellenberger, E., 1970. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* 49, 99–113. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(70\)90379-7](https://doi.org/10.1016/0022-2836(70)90379-7).
- Langnaese, K., John, R., Schweizer, H., Ebmeyer, U., Keilhoff, G., 2008. Selection of reference genes for quantitative real-time PCR in a rat asphyxial cardiac arrest model. *BMC Mol. Biol.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-53>.
- Li, Q., Zemel, E., Miller, B., Perlman, I., 2002. Early retinal damage in experimental diabetes: electroretinographical and morphological observations. *Exp. Eye Res.* 74, 615–625. <https://doi.org/10.1006/exer.2002.1170>.
- Li, S., Yang, H., Chen, X., 2019. Protective effects of sulforaphane on diabetic retinopathy: activation of the nrf2 pathway and inhibition of nlrp3 inflammasome formation. *Exp. Anim.* 68, 221–231. <https://doi.org/10.1538/expanim.18-0146>.
- Liby, K.T., Shin, S., Yamamoto, M., Wakabayashi, N., Aja, S., Dolan, P.M., Sporn, M.B., Kensler, T.W., Wakabayashi, J., Yates, M.S., 2009. Role of Nrf2 in prevention of high-fat diet-induced obesity by synthetic triterpenoid CDDO-imidazole. *Eur. J. Pharmacol.* 620, 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2009.08.022>.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.
- Mishra, M., Zhong, Q., Kowluru, R.A., 2014. Epigenetic modifications of Nrf2-mediated glutamate-cysteine ligase: implications for the development of diabetic retinopathy and the metabolic memory phenomenon associated with its continued progression. *Free Radic. Biol. Med.* 75, 129–139. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.001>.
- Moi, P., Chant, K., Asunis, I., Cao, A., Kant, Y.W., Kan, Y.W., 1994. Isolation of NF-E2-related factor 2 (Nrf2), a NF-E2-like basic leucine zipper transcriptional activator that binds to the tandem NF-E2/AP1 repeat of the β -globin locus control region. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 9926–9930. <https://doi.org/10.1073/PNAS.91.21.9926>.
- Nagar, S., Noveral, S.M., Trudler, D., Lopez, K.M., Mc Kercher, S.R., Han, X., Yates, J.R., Piña-Crespo, J.C., Nakanishi, N., Satoh, T., Okamoto, S., Lipton, S.A., 2017. MEF2D haploinsufficiency downregulates the NRF2 pathway and renders photoreceptors susceptible to light-induced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 114, E4048–E4056. <https://doi.org/10.1073/pnas.1613067114>.
- Niture, S.K., Khatri, R., Jaiswal, A.K., 2014. Regulation of Nrf2 - an update. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 36–44. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.02.008>.
- Rahman, I., Kode, A., Biswas, S.K., 2007. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* 1, 3159–3165. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.378>.
- Saito, Y., Kuse, Y., Inoue, Y., Nakamura, S., Hara, H., Shimazawa, M., 2018. Transient acceleration of autophagic degradation by pharmacological Nrf2 activation is important for retinal pigment epithelium cell survival. *Redox Biol.* 19, 354–363. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2018.09.004>.
- Sánchez-Chávez, G., Hernández-Ramírez, E., Osorio-Paz, I., Hernández-Espinosa, C., Salceda, R., 2016. Potential role of endoplasmic reticulum stress in pathogenesis of diabetic retinopathy. *Neurochem. Res.* 41, 1098–1106. <https://doi.org/10.1007/s11064-015-1798-4>.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.Y., White, D.J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., Cardona, A., 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat. Methods*. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>.
- Shinoda, K., Rejda, R., Schuettauf, F., Blatsios, G., Völker, M., Tanimoto, N., Olcay, T., Gekeler, F., Lehaci, C., Naskar, R., Zagorski, Z., Zrenner, E., 2007. Early electroretinographic features of streptozotocin-induced diabetic retinopathy. *Clin. Exp. Ophthalmol.* 35, 847–854. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9071.2007.01607.x>.
- Sieving, P., Lambrou, G., Gichuhi, S., Huang, J., Hejtmancik, J., Zheng, Y., Kempen, J., Dandona, L., Lansingh, V.C., Silvester, A., Raju, M., Dreer, L., Stevens, G.A., Ellwein, L., Peto, T., Barkana, Y., Taylor, H.R., Sandar, M., Quigley, H., Parodi, M.B., Rankin, Z., Varma, R., Keeffe, J., Pesudovs, K., Wiedemann, P., Pena, F.Y., Shetty, R., Stambolian, D., Resnikoff, S., Jonas, J., Naidoo, K., Hammond, B., Nangia, V., Khanna, R., Dana, R., Hirai, F., Wang, Y.X., Mansouri, K., Ingram, A., Rossetti, L., He, M., Braithwaite, T., Casson, R., Wang, N.-L., Khairallah, M., Cicinelli, M.V., Palaoui, M., Saaddine, J., Leasher, J., Cai, F., Ramulu, P., Bron, A., Morse, A., Taylor, H., George, R., Tejedor, J., Bourne, R.R.A., Stevens, G., Friedman, D., Del Monte, M., Flaxman, S.R., Munoz, B., Chakravarthy, U., Kim, J., de Silva, J., Wong, T., Budenz, D., Dekaris, I., Tahhan, N., Shen, T., Tielsch, J., Frazier, M., Silva, J.C., Mathew, A., Limburg, H., Virgili, G., Lanzetta, P., Ackland, P., Wong, T.Y., Reza, D., Tsilimbaris, M., van Meurs, J., Limburg, H., Das, A., Hartnett, M.E., Gonzalez, V., Serle, J., Gazzard, G., Ardit, A., Bozkurt, B., Choi, J., Sitorus, R.S., Jonas, J.B., Furtado, J., Javitt, J., Dandona, R., West, S., Frick, K., Robin, A., Lim, J., Bourne, R., Musch, D., Kempen, J.H., Congdon, N., Gao, H., Wormald, R., Cicinelli, M.V., Joslin, C., 2017. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob. Health* 5, e1221–e1234. [https://doi.org/10.1016/s2214-109x\(17\)30393-5](https://doi.org/10.1016/s2214-109x(17)30393-5).
- Silva-Islas, C.A., Maldonado, P.D., 2018. Canonical and non-canonical mechanisms of Nrf2 activation. *Pharmacol. Res.* 134, 92–99. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2018.06.013>.
- Takahashi, S., Oyake, T., Ishii, T., Chiba, T., Yamamoto, M., Itoh, K., Katoh, Y., Hayashi, N., Satoh, K., Igarashi, K., Hatayama, I., Nabeshima, Y., 2002. An nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 236, 313–322. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6943>.
- Urano, A., Furusawa, Y., Yagishita, Y., Fukutomi, T., Muramatsu, H., Negishi, T., Sugawara, A., Kensler, T.W., Yamamoto, M., 2013. The Keap1-Nrf2 system prevents onset of diabetes mellitus. *Mol. Cell Biol.* 33, 2996–3010. <https://doi.org/10.1128/MCB.00225-13>.
- Wang, K., Zheng, M., Lester, K.L., Han, Z., 2019. Light-induced Nrf2^{-/-} mice as atrophic age-related macular degeneration model and treatment with nanoceria laden injectable hydrogel. *Sci. Rep.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51151-7>.
- Xu, Z., Wei, Y., Gong, J., Cho, H., Park, J.K., Sung, E.R., Huang, H., Wu, L., Eberhart, C., Handa, J.T., Du, Y., Kern, T.S., Thimmulappa, R., Barber, A.J., Biswal, S., Duh, E.J., 2014. NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia* 57, 204–213. <https://doi.org/10.1007/s00125-013-3093-8>.
- Yoh, K., Hirayama, A., Ishizaki, K., Yamada, A., Takeuchi, M., Yamagishi, S.I., Morito, N., Nakano, T., Ojima, M., Shimohata, H., Itoh, K., Takahashi, S., Yamamoto, M., 2008. Hyperglycemia induces oxidative and nitrosative stress and increases renal functional impairment in Nrf2-deficient mice. *Gene Cell.* 13, 1159–1170. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2008.01234.x>.
- Zhao, Z., Chen, Y., Wang, J., Sternberg, P., Freeman, M.L., Grossniklaus, H.E., Cai, J., 2011. Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS One* 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019456>.
- Zhong, Q., Mishra, M., Kowluru, R.A., 2016. Transcription factor nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. <https://doi.org/10.1167/iov.13-11598>.



OPEN

High glucose concentrations induce oxidative stress by inhibiting Nrf2 expression in rat Müller retinal cells in vitro

Jesús Silvestre Albert-Garay^{1✉}, Juan Rafael Riesgo-Escovar² & Rocío Salceda¹

Diabetic retinopathy (DR) is a complication of diabetes. Several studies have implicated oxidative stress as a fundamental factor in the progression of the disease. The nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2) is one of the main regulators of redox homeostasis. Glia Müller cells (MC) maintain the structural and functional stability of the retina. The objective of this study was to evaluate the effect of high glucose concentrations on reactive oxygen species (ROS) production and Nrf2 expression levels in rat MC. MC were incubated with normal (NG; 5 mM) or high glucose (HG; 25 mM) for different times. Incubation with HG increased ROS levels from 12 to 48 h but did not affect cell viability. However, exposure to 3 h of HG caused a transient decrease Nrf2 levels. At that time, we also observed a decrease in the mRNA expression of Nrf2 target genes, glutathione levels, and catalase activity, all of which increased significantly beyond initial levels after 48 h of incubation. HG exposure leads to an increase in the p65 subunit of nuclear factor- κ B (NF- κ B) levels, and its target genes. These results suggest that high glucose concentrations lead to alteration of the redox regulatory capacity of Nrf2 mediated by NF- κ B regulation.

Diabetes mellitus is a metabolic disease characterized by increased blood glucose levels (hyperglycemia) resulting from defective insulin secretion or resistance to its action¹. Diabetic retinopathy (DR) is one of the most severe complications of diabetes and is a leading cause of blindness in adults². The precise mechanisms involved in triggering and the early progression of DR are still unknown, but it has been hypothesized that hyperglycemia causes oxidative stress^{3–5}, which in turn leads to oxidation of biomolecules^{6,7}. Indeed, hyperglycemic conditions increase the generation of reactive oxygen species (ROS), and the oxidation of retinal biomolecules of diabetic patients and long-term diabetic animals^{6,7}.

Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) is one of the primary regulators of cellular redox homeostasis. Nrf2 mediates basal and induced transcription of phase II antioxidant enzymes responsible for the clearance of ROS⁸. In normal conditions, Nrf2 is sequestered by its binding to the Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1) in the cytoplasm. Keap1 is a substrate adaptor protein for Cullin 3-RING-box protein 1 ubiquitin ligase and continuously targets Nrf2 for ubiquitination and its subsequent degradation by the 26S proteasome⁹. Several Keap1 cysteine residues are oxidized during oxidative stress conditions, causing a conformational change in the protein, and as a consequence, the release of Nrf2 allowing its translocation to the nucleus¹⁰. Nuclear Nrf2 heterodimerizes with one of the small Maf proteins (avian musculoaponeurotic fibrosarcoma homolog proteins). The Nrf2-Maf heterodimers recognize antioxidant response elements (AREs), promoting the anti-oxidant genes transcription^{11,12}. Nrf2 drives transcription of hundreds of genes, encoding enzymes involved in antioxidant defense, as well as in glucose and lipid metabolism¹³. Loss of Nrf2 has been shown to exacerbate oxidative damage in retinas under different stresses^{14–17}. Moreover, Nrf2 levels alterations have been reported in diabetic animal retinas^{18–21}.

Although most DR complications have been ascribed to vascular lesions, various studies in diabetic patients and experimental animals suggest alterations in neuronal and glial functions before vascular abnormalities²². Müller cells (MC) are the principal macroglia type of mammalian retina. These cells extend from the photoreceptor cell layer to the ganglionar cell layer, contributing to retinal homeostasis by regulating synaptic activity, and providing energy metabolites and trophic factors^{23–26}.

¹Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 CDMX, Mexico. ²Instituto de Neurobiología, Campus UNAM Juriquilla, Universidad Nacional Autónoma de México, 76226 Querétaro, Mexico. ✉email: silvestre.alb@gmail.com

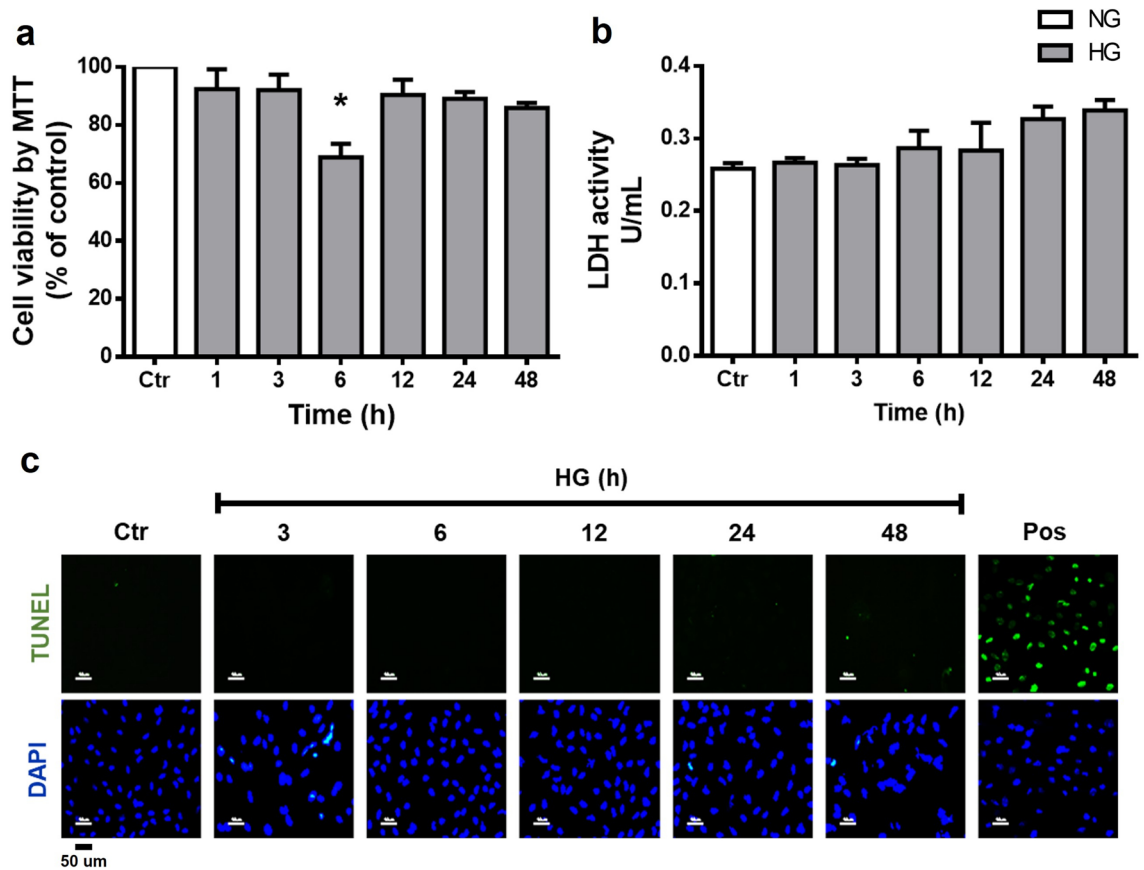


Figure 1. High glucose concentrations do not affect cell viability in MC. Cells were incubated with NG (Ctr; 5 mM glucose) or HG (25 mM glucose) for different time periods (1–48 h). **(a)** Cell viability was determined by the MTT assay; viability was expressed as the percentage of optical density respect to cells exposed to NG (100%). Cell death was measured through LDH release and TUNEL assay. **(b)** The results of LDH release are expressed as units per milliliter (U/ml). **(c)** Representative fluorescent micrographs of TUNEL-positive cells (green) compared to total cells (DAPI, blue) in MC exposed to NG or HG; positive control (pos: plus DNase). Data are expressed as the mean \pm SEM of duplicate cultures and are representative of three independent experiments. Scale bars: 50 μ m. * $p < 0.05$ with respect to NG.

Starting at early diabetic stages in the rat retina, MC undergo a gliosis process in which they overexpress glial fibrillary acidic protein (GFAP), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and pro-inflammatory proteins such as VEGF^{23,27–29}. Several studies have reported an increase in cell death in MC exposed to high concentrations of glucose (25–30 mM) for long periods of time (48–96 h)^{30–33}. Cell death has been associated with inactivation of AKT³³, increased phosphorylation of insulin receptor substrate (IRS)-1³², and accumulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in the nucleus of MC³¹.

However, the effect of hyperglycemic conditions on the MC redox state had received insufficient attention. Therefore, we studied the time course of high glucose concentrations on ROS production and Nrf2 expression levels in cultured MC.

Results

Effect of high glucose on cell viability. We first evaluate the cytotoxic effect of HG concentrations on MC using the MTT, LDH release, and TUNEL assays. As shown in Fig. 1, cell viability was not significantly affected by HG incubation. Cell viability determined by the MTT assay was not significantly affected by HG incubation, except a significant decrease in cell viability at 6 h incubation ($68.9\% \pm 4.6$; Fig. 1a). Similarly, LDH release did not show significant changes over the times studied (Fig. 1b). The TUNEL assay was also negative at all times examined (Fig. 1c).

High glucose concentration increases ROS and RNS production in Muller cells. We investigated the effect of HG on cellular ROS levels. MC had low ROS production under normal glucose concentrations, as revealed by the H₂DCFDA probe and DHE staining. Under HG incubation, a significant increase in ROS production determined by H₂DCFDA was observed at 12 h ($160\% \pm 33.8$), with levels remaining constant up to 48 h ($212\% \pm 8.1$; Fig. 2a). Likewise, DHE staining was observed after 6 h incubation in HG ($2190 \text{ CTCF} \pm 40.1$), and its intensity increased over incubation time (Fig. 2b). On the other hand, RNS production was relatively low

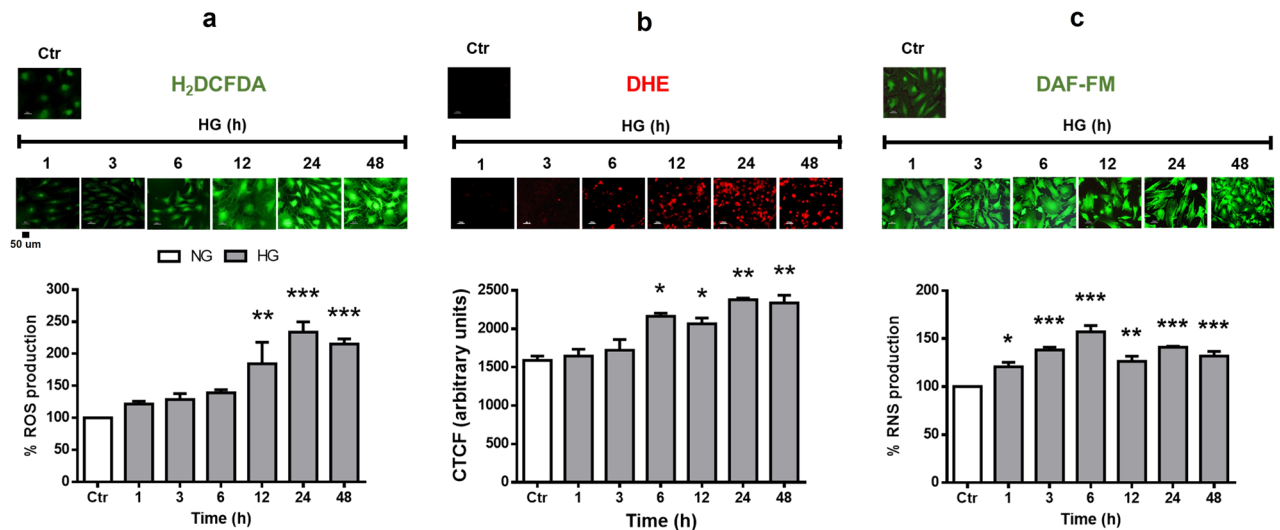


Figure 2. High glucose concentrations increase ROS and RNS production levels in MC. Cells were incubated with NG (Ctr) or HG for different time periods (1–48 h). **(a)** Production of ROS in MC. In the upper part, representative fluorescent micrographs. The lower part, the percentage of relative H₂DCFDA fluorescence per μ g protein. **(b)** Representative micrographs of DHE-positive cells (red). **(c)** Production of RNS in MC. The upper part, representative fluorescent micrographs. The lower part, the percentage of relative DAF-FM fluorescence per μ g protein. Data are expressed as the mean \pm SEM of duplicate cultures and are representative of five independent experiments. Scale bars: 50 μ m. NG, normal glucose; HG, high glucose. * p < 0.05 with respect to NG, ** p < 0.01 with respect to NG, *** p < 0.001 with respect to NG.

under low glucose concentrations, but was significantly increased after 1 h incubation in HG (140 ± 1.0) and remained high through all other times studied. (Fig. 2c).

Nrf2 expression in Müller cells. The Nrf2 expression levels from Müller cells extracts were analyzed by Western blot. Nrf2 immunoblotting revealed a single band of ≈ 68 kDa corresponding to the reported molecular weight. Nrf2 expression levels did not change in cells incubated with NG for different period times (Supplementary Fig. 3), so we averaged and normalized that as 100%. After 3 h incubation with HG, Nrf2 protein levels decreased by 48 ± 4.2 ; then, Nrf2 levels showed a progressive increase reaching control levels at 48 h (81 ± 2.5 ; Fig. 3a,b). Similarly, protein levels of Keap1 were significantly decreased in MC exposed to HG for 3 h (28 ± 6 ; Fig. 3a,c). Afterward, Keap1 protein levels gradually increased, reaching control levels at 48 h of incubation with HG (92 ± 11.1).

Nrf2 subcellular localization. In response to oxidative stress, Nrf2 is translocated to the nucleus. We evaluated Nrf2 activation by immunofluorescence and Western blot of cellular fractions. Immunofluorescence studies showed Nrf2 distributed in the cell soma with a higher nuclear intensity in MC incubated with NG. Nrf2 labeling in the MC exposed to HG was located predominantly in the nuclear region (Fig. 4a). Similarly, Western blot analysis of the nuclear fraction obtained by differential centrifugation revealed relatively high Nrf2 levels in MC incubated in NG. Nrf2 nuclear levels were reduced at 3 h (48 ± 4.5) in MC exposed to HG, but after that, Nrf2 levels showed a progressive increase reaching levels higher than the NG at 48 h (161 ± 4 ; Fig. 4b). In contrast, cytoplasmic Nrf2 levels continuously decreased from 3 to 48 h (69 ± 2.7 – 34 ± 5.7) (Fig. 4c).

High glucose decreases expression of antioxidant enzymes regulated by Nrf2. Nrf2 binds to ARE DNA sequences, leading to transcription of antioxidant enzymes. We analyzed gene expression patterns of the Nrf2-regulated antioxidant enzymes Glutamate-Cysteine Ligase (catalytic subunit, GCLC) (Fig. 5a), Superoxide Dismutase 2 (SOD2) (Fig. 5b), and Thioredoxin (TXN) (Fig. 5c) in cultured MC. mRNA levels of these enzymes were considerably reduced after 1 h incubation within HG remaining low for up to 24 h incubation. Remarkably, mRNA expression of these enzymes was increased considerably at 48 h, reaching values higher than those in NG (Fig. 5a–c).

We also evaluated the effect of HG exposure on two of the main cellular antioxidants: catalase and glutathione (GSH). Catalase activity decreased in MC exposed to HG from 3 to 24 h ($0.4 \text{ U/mg} \pm 0.03$ – $0.6 \text{ U/mg} \pm 0.06$), but significantly increased at 48 h ($2.3 \text{ U/mg} \pm 0.1$; Fig. 5d). GSH levels were reduced after a 3 h incubation with HG ($7 \text{ nmol/mg} \pm 0.1$) and remained low up to 48 h ($5 \text{ nmol/mg} \pm 0.6$; Fig. 5e).

Moreover, HG incubation for 1–3 h induced a considerable decrease in Nrf2 mRNA levels (0.3 ± 0.08 – 0.1 ± 0.06), but they were remarkably increased at 6 h (4.25 ± 0.3), reaching fourfold higher values than those in NG, and remained constant up to 48 h (2.8 ± 0.3 ; Fig. 5f).

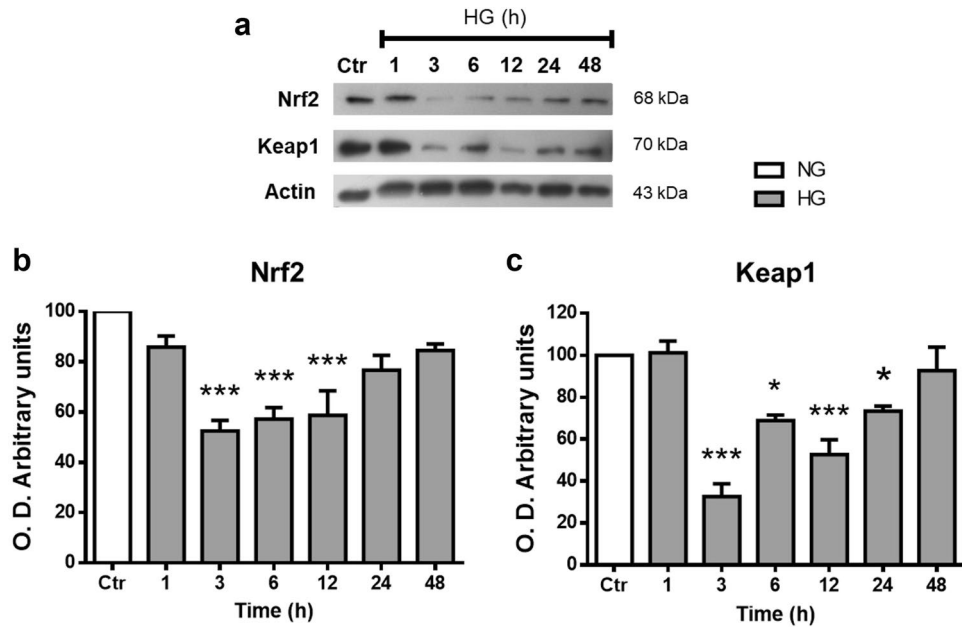


Figure 3. High glucose concentrations decrease Nrf2 and Keap1 levels in MC. Western blot analysis of Nrf2 and Keap1 expression in homogenates from MC exposed to NG (Ctr) or HG for different time periods (1–48 h). The upper part, representative western blot (a). The lower part, densitometric quantification of Nrf2 (b) and Keap1 (c) levels. The relative expression levels were normalized using actin. Values are the mean \pm SEM (n = 7 per group) carried out in duplicate. NG, normal glucose; HG, high glucose. * $p < 0.05$ with respect to NG, *** $p < 0.001$ with respect to NG. Full-size blots are presented in Supplementary Fig. 3.

GSK3- β phosphorylation. Because Gsk3 negatively regulates Nrf2 levels independently of Keap1, we evaluated Gsk3- β activation through its phosphorylation levels in Ser9. While total Gsk3- β levels did not change during all times and conditions studied, Gsk3- β phosphorylation levels were enhanced after 1 (151% \pm 25.5) and 3 h (149% \pm 16.4) HG incubation. After a 6 h incubation, Gsk3- β phosphorylation levels decreased (56% \pm 7.7) from those of controls and remained low up to 48 h incubation (69% \pm 8.3; Fig. 6).

High glucose promotes the expression of inflammatory proteins in Müller cells. In addition to Keap1 and Gsk3- β , Nrf2 activity is negatively modulated by the transcription factor NF- κ B. Therefore, we examined the effect of HG on its p65 subunit levels and of those of two of its target genes: interleukin-1 β (IL-1 β) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Fig. 7). Canonical NF- κ B subunit p65 levels were considerably increased since 1 h incubation in HG (171% \pm 8.5; Fig. 7a). Also, HG caused a significant increase in the iNOS expression after 1–48 h incubation. Whereas IL-1 β levels were elevated at 1 (154% \pm 13.8) to 3 h (198% \pm 20.3), and after that, its levels decreased progressively (Fig. 7b,c).

Discussion

Under redox homeostasis, cells produce moderate ROS concentrations involved in cell signaling processes that are rapidly eliminated by antioxidant systems³⁴. However, when the cellular redox state is altered by prolonged increases in ROS, surpassing the antioxidant defenses, cells suffer a state of oxidative stress leading to molecular damage^{35,36}. Cells have an efficient antioxidant system, consisting of several antioxidant molecules that neutralize or eliminate oxidant molecules and indirect antioxidants that are redox-sensitive transcription factors. Among these factors, Nrf2 is considered the master regulator of the antioxidant response^{37,38}. Oxidative stress has been strongly implicated in DR. Several studies have reported increases in ROS, decreases in antioxidant enzymes activities, and alterations in Nrf2 expression and function in the retina from long-term diabetic animals^{39,40}.

The retina is a tissue composed of several cell types, and each cell type contribution to the development and progression of oxidative stress in DR has not been elucidated. Among them, glial Müller cells play a main role in maintaining neuronal function. Hyperglycemia induces the stress protein marker GFAP expression in MC. Besides, *in vitro* studies have shown occurrence of HG induced oxidative stress in different cell types, including MC^{41–45}. There is also evidence that prolonged HG exposure increases hydrogen peroxide and nitric oxide levels in MC^{46,47}. However, these studies evaluated single time points, preventing ascertainment of whether the redox imbalance is HG induced or is an after effect.

Several studies have reported that high glucose concentrations induce cell death in MC^{30–32}. We observed a decrease in cell viability at 6 h of incubation with high glucose (Fig. 1a), however viability recovered values similar to the control in subsequent incubation times. The MMT assay is mainly associated with mitochondrial dehydrogenase activity, therefore its measurements can be affected by mitochondrial metabolism and by the

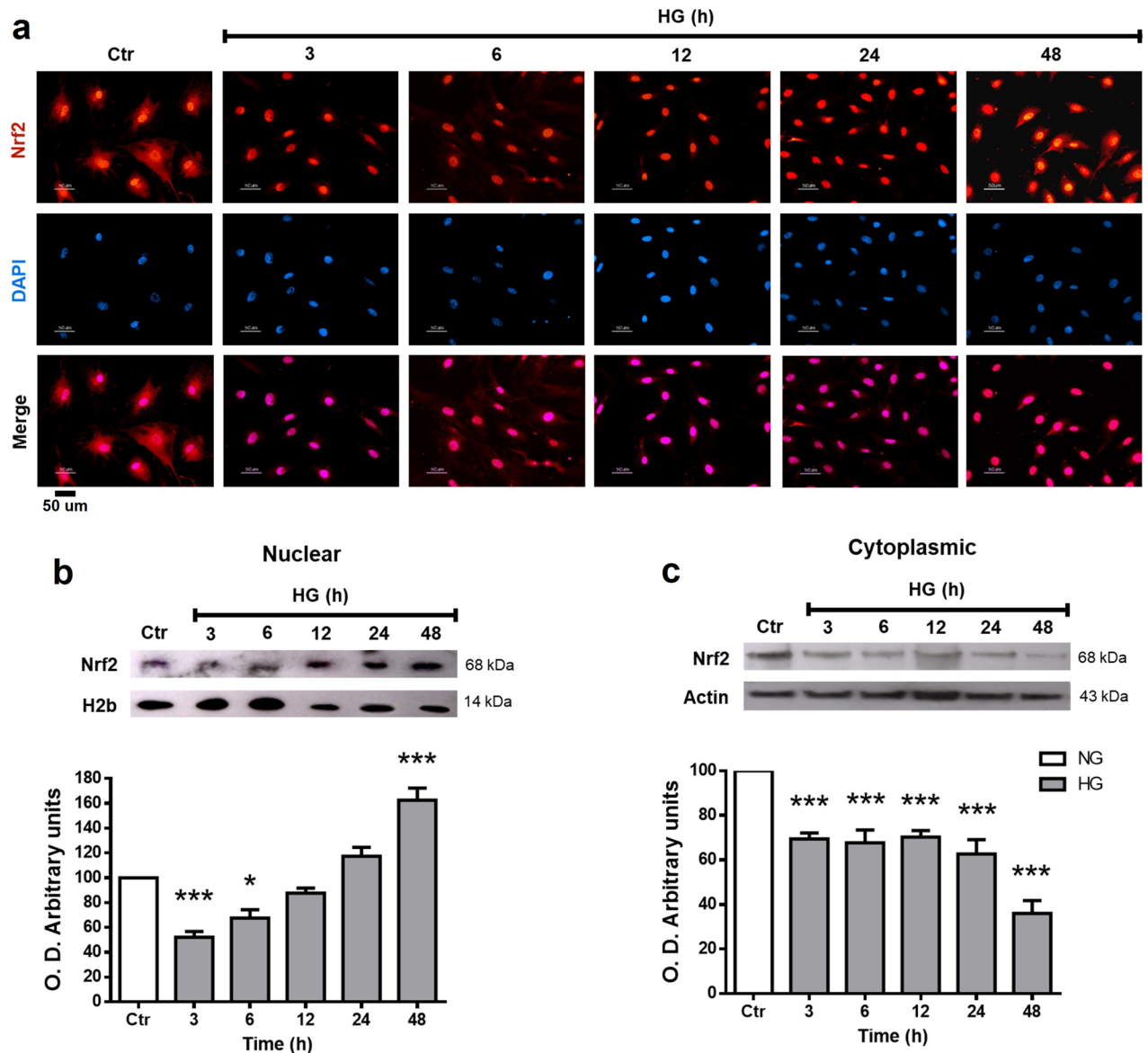


Figure 4. Nrf2 subcellular localization in MC. Cells were exposed to HG for the indicated time intervals. (a) Immunofluorescent localization of Nrf2 in MC. Blue marks nuclei (DAPI); Red, Nrf2-staining, and Pink, merge of blue and red indicating nuclear localization of Nrf2. (b) Nuclear and (c) Cytoplasmic Nrf2 expression in MC exposed to HG. The upper part, representative western blot of Nrf2. The lower part, quantification of the relative levels of Nrf2. The relative expression levels were normalized using actin (cytoplasmic) or H2b (histone 2b; nuclear). Values represent the mean \pm SEM ($n = 5$ per group) carried out in duplicate. NG, normal glucose; HG, high glucose. Scale bar represents 50 μ m. * $p < 0.05$ with respect to NG; *** $p < 0.001$ with respect to NG. Full-size blots are presented in Supplementary Fig. 4.

activity of other intracellular dehydrogenases^{48,49}, the decrease in cell viability at 6 h of exposure to high glucose could be due to transient changes in MC metabolism and not necessarily a reduction in cell viability. LDH (Fig. 1b) and TUNEL (Fig. 1c) assays did not show an increase in cell death. Studies that have reported changes in cell viability have used Müller glial cell lines (rMC-1 and MIO-M1)^{31,32,50} that might be more susceptible to the effect of high glucose than primary rat Müller glial cell cultures.

We analyzed the time course effect of HG incubation on ROS production in MC. As expected, ROS levels increased after a relatively short time incubation (6–12 h). We also found increase in RNS levels, and remarkably, they were elevated earlier than ROS (1 h) (Fig. 2). In agreement with the ROS increase, we observed that HG significantly reduced two main oxidant systems, GSH levels and catalase activity (Fig. 4), suggesting a redox homeostasis imbalance from early HG exposure. Nrf2 is known to regulate the basal and inducible transcription of various antioxidant enzymes, including catalase and enzymes regulating GSH synthesis¹³.

Therefore, we analyzed the expression of Nrf2 in MC. Western blot studies revealed the expression of Nrf2, which showed a substantial decrease at 3 h of HG incubation. After that, total Nrf2 protein levels progressively increased over time, being at 48 h, similar to those in NG. Under NG conditions, immunofluorescence studies

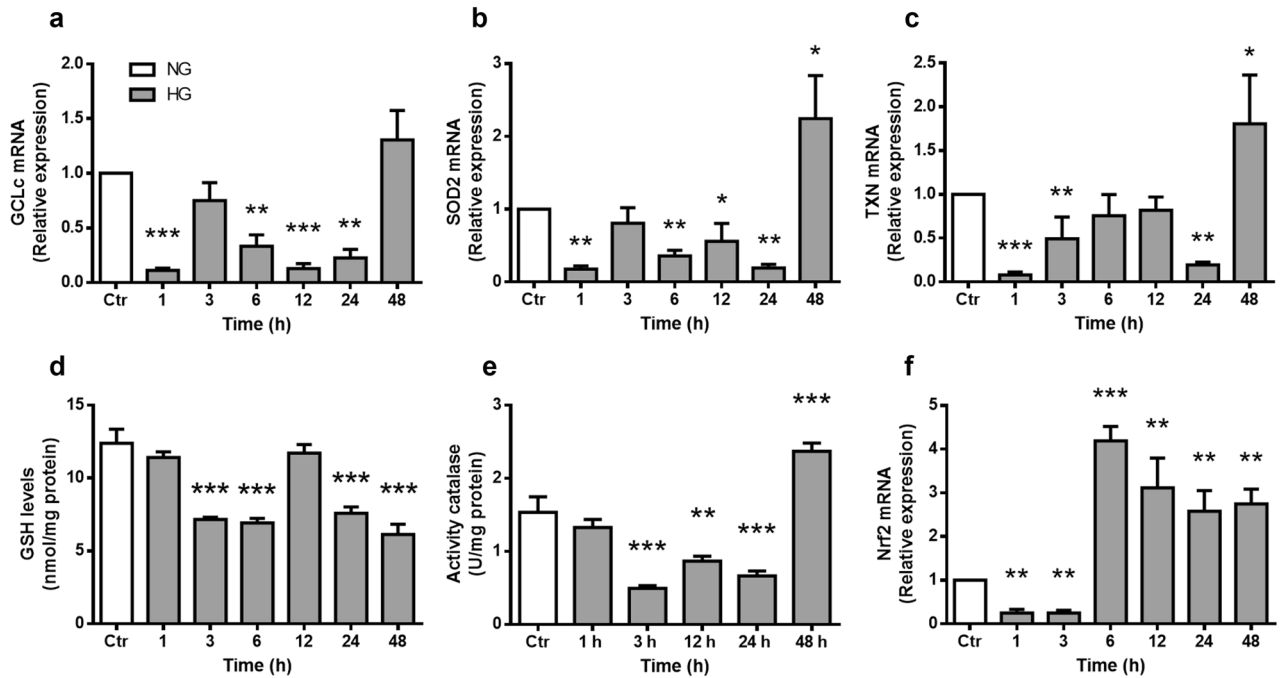


Figure 5. High glucose concentrations alter the expression of antioxidant enzymes and GSH levels. MC were exposed to HG for the indicated time intervals. mRNA levels of GCLc (a), SOD2 (b), TXN (c) and Nrf2 (f). The relative mRNA levels were normalized using ACT (actin). Values are the mean \pm SEM (n = 4 per group) carried out in duplicate. (d) Glutathione (GSH) levels are expressed as nmol/mg protein. (e) Catalase activity is expressed as U/mg protein, as described in Methods. Values are the mean \pm SEM (n = 5 per group) carried out in duplicate. NG, normal glucose; HG, high glucose. * $p < 0.05$ with respect to NG, ** $p < 0.01$ with respect to NG, *** $p < 0.001$ with respect to NG.

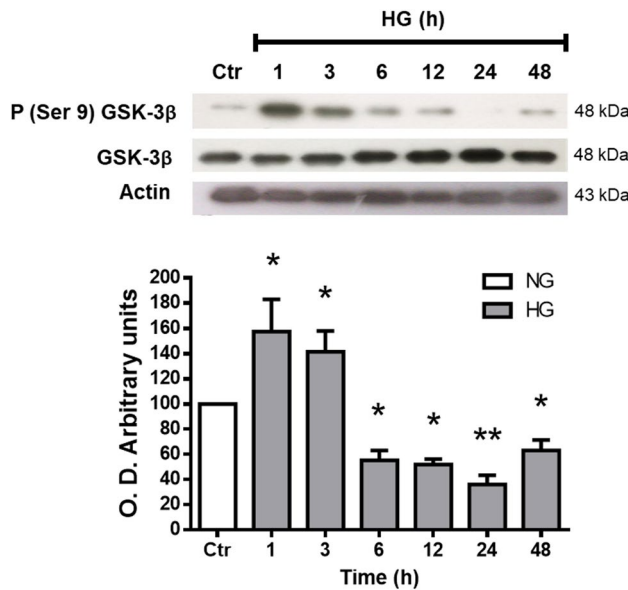


Figure 6. GSK3- β phosphorylation. Western blot analysis of phospho-GSK3- β (Ser 9) and GSK3- β expression in homogenates from MC exposed to NG (Ctr) or HG for different time periods (1–48 h). The upper part, representative western blot. The lower part, quantification of the expression levels. The relative expression levels were normalized with total GSK3- β . Values are the mean \pm SEM (n = 4 per group) carried out in duplicate. NG, normal glucose; HG, high glucose. * $p < 0.05$ with respect to NG, *** $p < 0.001$ with respect to NG. Full-size blots are presented in Supplementary Fig. 5.

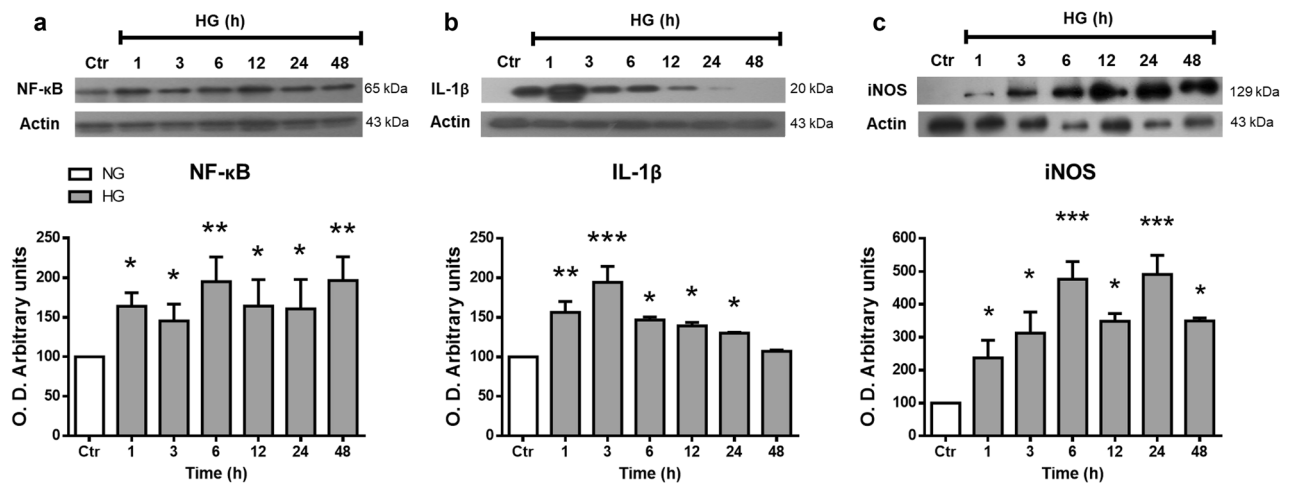


Figure 7. High glucose concentrations induced the expression of inflammatory proteins in MC. Western blot analysis of NF-κB (a), IL-1β (b), and iNOS (c) expression in homogenates from MC exposed to NG (Ctr) or HG for different time periods (1–48 h). The upper part, representative western blot. The lower part, quantification of the expression levels. The relative expression levels were normalized using actin. Values are the mean ± SEM (n = 5 per group) carried out in duplicate. NG, normal glucose; HG, high glucose. **p* < 0.05 with respect to NG, ****p* < 0.001 with respect to NG. Full-size blots are presented in Supplementary Fig. 6.

demonstrated intense labeling of Nrf2 in the nucleus of MC, unlike other cell types in which Nrf2 localization in the absence of oxidative stress is restricted to the cytoplasm^{51–53}. Thus, these results could indicate a high antioxidant capacity in MC. Proteomic studies have shown that MC have a high antioxidant capacity compared to different types of neurons in the retina⁵⁴. Moreover, under HG conditions, immunofluorescence studies showed that Nrf2 is mainly located in the nuclear and perinuclear regions.

MC incubated in NG expressed relatively high Nrf2 levels in both nuclear and cytoplasmic fractions at all incubation times studied, in immunofluorescence experiments. Interestingly, incubation of MC within HG induced a transient decrease of Nrf2 in both nuclear and cytoplasmic fractions. While Nrf2 nuclear levels progressively recovered from 6 to 48 h, cytoplasmic levels decline. Surprisingly, the Nrf2 mRNA levels were also remarkably reduced after 1 and 3 h HG incubation; afterwards, mRNA levels were considerably higher, reaching values four-fold higher than those in NG (Fig. 5f).

The transient Nrf2 nuclear levels reduction may affect transcription of antioxidant genes. We found that mRNA levels of three Nrf2 target genes GCLC, SOD2, and TXN were reduced likewise at short HG exposure times. Unexpectedly, although Nrf2 mRNA and protein nuclear levels recovered after 6 h incubation in HG, its target genes expression and catalase activity took much longer to recover, only after 48 h of incubation with HG. Moreover, GSH levels remained lower, suggesting the occurrence of oxidative stress in spite of elevated Nrf2 nuclear levels. Despite this oxidative stress, we did not observe cell viability changes, suggesting a high capacity in MC to adapt to these conditions.

Multiple mechanisms control cellular Nrf2 function. The best-characterized Nrf2 regulation mechanism is mediated by its interaction with the Keap1-Cullin3-Rbx1 complex, which leads to Nrf2 ubiquitination and subsequent proteasomal degradation⁵⁵. We found that Keap1 levels also decreased at short times of exposure to HG, but recovered in parallel to those of Nrf2, in agreement with Keap1 being a Nrf2 target gene⁵⁶.

In addition to Keap1, Nrf2 contains a group of serine residues in its Neh6 domain that can be phosphorylated by GSK-3β. This phosphorylation creates a phosphodegron motif, which can be recognized by the β-TrCP-Cul1-Rbx1 E3 ubiquitin ligase complex, promoting the degradation of Nrf2^{57,58}. We observed an increase of GSK-3β phosphorylation at short times upon HG exposure; therefore, consistent with the decrease of Nrf2 at early times. The decrease in GSK-3β phosphorylation over long periods could be due to a metabolic adaptation to HG exposure and appears not to affect Nrf2 levels. Moreover, the decrease in Nrf2 protein levels appears to be due to a decrease in its synthesis since we observed a transient decrease in its mRNA.

Various studies have identified that MC increase the secretion of pro-inflammatory protein levels in diabetic retinopathy^{28,59,60}. NF-κB is a transcription factor that controls genes associated with inflammation, and its activation can negatively regulate Nrf2 expression and its target genes⁶¹. Interestingly, we found that incubation with high glucose increases the p65 canonical NF-κB subunit after short incubation times (1 h). Also, HG increases the levels of two NF-κB target genes: iNOS and IL-1b. The rapid iNOS increase may explained the RNS production observed at early incubation time with HG. These results also agree with early iNOS expression of iNOS in MC at early timepoint streptozotocin diabetes induction in rats²⁹. These results are consistent with HG activating an inflammatory process, that in turn might negatively influences the expression of Nrf2 and causes the decrease of its target genes expression. Indeed, the p65 canonical NF-κB subunit competes with Nrf2 for the transcriptional coactivator CBP (CREB-binding protein) p300 complex^{62,63}. Also, p65 promotes HDAC3 association with MafK, thus preventing heterodimer formation with Nrf2 and, as a consequence decreasing the expression of ARE-related genes^{64,65}. It is noteworthy that Nrf2 controls its transcription, a fact that can also explain our results.

Therefore, our results are consistent with HG initially inducing an inflammatory process which could lead to oxidative stress. Interestingly, at longer incubation times, despite the Nrf2 recovery levels, there is a persistent redox state imbalance as shown by GSH levels, that may be part of an inflammatory response. Although viability was not affected, this imbalance might lead to alterations in cell homeostasis that can induce changes in the normal MC function, and this to homeostatic changes in other retinal cells, leading to retinopathy.

Methods

Müller Glia Culture. Retinal MC were isolated from postnatal (P 7–8 days) Long-Evans rats and were cultured using a protocol described by Hicks and Courtois⁶⁶. Briefly, eyes were dissected out in Hank's Ca²⁺ and Mg²⁺ free Balanced Salt Solution (H-4641 Sigma Aldrich) and incubated with trypsin (0.1%) at 37 °C for 30 min. Afterward, retinas were dissected in Dulbecco modified Eagles medium (D-2429 Sigma Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco), 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 2.5 µg/ml amphotericin (DMEM-SFB). The retinas were mechanically dissociated by successive aspirations of the DMEM-SFB containing DNase (100 U/ml). Suspended cells were counted using a Neubauer chamber and seeded in culture plates (6, 24, or 96 well) at a density of 160,000 cells/cm². Cells were maintained in DMEM-FBS containing glucose (1 g/l) at 37 °C in a humidified atmosphere with 95% air/5% CO₂. After 3 days in culture, the monolayer was vigorously rinsed to eliminate possible non-glia attached cells; medium was replaced every 3 days for fresh medium. Cells were used at approximately 90% confluency. The purity of Müller cell cultures was assessed by vimentin and glutamine synthetase immunofluorescence staining, specific markers of Müller glial cells. The percentage of the Müller glial cell purity is greater than 95% (Supplementary Fig. 1).

All procedures were in agreement with the Mexican Institutes of Health Research rules (DOF. NOM-062-Z00-1999) and with the Statement on the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research of the Association for Research in Vision and Ophthalmology. The protocol was approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Instituto de Fisiología Celular, UNAM (protocol number RSS43-14). All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations and ARRIVE guidelines.

Incubation conditions. MC were incubated DMEM-SFB in the presence of normal (5 mM; NG) or high glucose concentrations (25 mM; HG) for different time periods (1–48 h). The culture medium was not changed during the treatment times. The cells treated with HG were compared with their respective control (NG) at the same times. The osmotic control medium was 5.5 mM glucose with 19.5 mM mannitol (Supplementary Fig. 2). The culture medium maintained high glucose concentrations during the different times studied (Supplementary Table 1).

Western Blot. For Western Blot studies, MC were culture in 6-well plates, and after incubation with HG or NG, cells were rinsed with cold PBS and dislodged using a scraper. Cell samples were homogenized in RIPA lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 158 mM NaCl, 1 mM EGTA, 10 mM Na₂MoO₄, 25 mM NaF, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM EDTA, 2% Triton X-100, 0.2% SDS, and proteases-phosphatases inhibitors). The samples were incubated under constant shaking for 60 min at 4 °C and centrifuged at 17,000×g for 30 min at 4 °C. 25 µg of total protein for each sample were boiled in Laemmli's sample buffer⁶⁷ for 5 min and resolved by 10% SDS-PAGE together with molecular weight markers (Precision Plus Protein Kaleidoscope standards, Bio-Rad). The proteins were transferred to polyvinylidene difluoride membranes (Millipore Corp.) according to standard techniques. The membranes were stained with Ponceau S to confirm that protein loading was the same in all lanes. Nonspecific protein binding sites were blocked with 5% nonfat milk in TBS-Tween (0.1% Tween 20, 20 mM Tris-HCl, and 136 mM NaCl, pH 7.6) for 3 h at room temperature, and then, membranes were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: Nrf2 (1:800; Abcam, ab137550), Keap1 (1:500; Santa Cruz, sc-33569), H2b (1:1000; Cell Signaling, 12364), Actin (1:3000, Abcam #ab-3280), iNos (1:1000, Abcam, ab95441), GSK3-β (1:1000; Cell Signaling, 9315), Phospho-GSK3 (1:800; Cell Signaling, 9323) or NF-κB (1:1000, 8242, Cell Signaling), diluted with 0.25% BSA and 0.01% thimerosal in TBS-Tween buffer. The following day, membranes were washed three times with TBS-Tween and incubated for 3 h at room temperature with a secondary HRP-conjugated antibody (1:8000; Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore Corp.). The signal was detected using an enhanced Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corp, Billerica, MA). The signals on Hyperfilm ECL (GE Healthcare Ltd.) were digitized with an Alpha DigiDoc RT (Alpha Innotech.) and analyzed using relative optical densities derived from a densitometry program (Alpha Ease FC Stand Alone, Alpha Innotech). The optical density of protein levels were normalized with their respective loading control using actin. The relative protein levels under the experimental conditions was obtained as the optical density of samples from cells incubated with HG compared to those of the control (NG) on the same Western blot.

Protein content. Total protein content was determined according to Lowry et al.⁶⁸ with a commercial assay kit (BioRad DC) using BSA as the standard.

Subcellular fractionation. Cells were incubated in lysis buffer (50 mM HEPES (pH 7.5), 0.3 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 0.1% Triton X-100, and proteases-phosphatases inhibitors) for 10 min on ice and homogenized. The lysates were centrifuged at 1000×g for 10 min at 4 °C. The supernatants were used as cytoplasmic fractions. The pellets (nuclei) were homogenized in nuclear buffer (50 mM HEPES (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM Na₃VO₄, 1% Triton X-100, 1% SDS, and proteases-phosphatases inhibitors) and centrifuged at 17,000×g for 15 min at 4 °C. The fractions were analyzed by Western

blotting; immunoblot results for actin and histone H2b were used as markers for the cytoplasmic and nuclear fractions, respectively.

Immunofluorescence. Cells were grown on coverslips and fixed with paraformaldehyde-(4% paraformaldehyde (W/V)—4% sucrose in 0.1 M PBS, pH 7.4) for 10 min at room temperature. Samples were rinsed three times for 5 min each with PBS. Cells were permeabilized with 0.4% saponin-PBS. Then, samples were blocked with 1% BSA-PBS for 1 h at room temperature. Samples were then incubated overnight at 4 °C with primary antibodies: Nrf2 (1:250, Abcam, ab137550); Keap1 (1:250, Santa Cruz, sc-33569); and Vimentin (1:250, Dako, Mo72529). Samples were washed three times and incubated with secondary antibody: Cy3-conjugated anti-rabbit (1:500, Chemicon) for 2 h at room temperature in a light-protected humidified box. Cell nuclei were stained with 300 nM DAPI (D4592, Sigma) for 10 min at room temperature. Samples were then washed with PBS. Coverslips were mounted onto glass slides with 79% glycerol (V/V in PBS) and stored in a light-protected container. For controls, primary antibodies were omitted. Samples were examined using a Nikon microscope (Nikon Corp., Tokyo, Japan) and photographed with a Nikon DXM1200 digital camera (Nikon Corp., Tokyo, Japan).

Total RNA isolation and RT-PCR. Total RNA was extracted from the cells using the TRIZOL reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) in accordance with the manufacturer's protocol. cDNA was synthesized with M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, M170A). Subsequently, Real Time-PCR (RT-PCR) was performed using SYBR Green I Master (Roche; 04 707 516 001) in the LightCycler 2.0 (Roche) according to the following thermal cycling conditions: the initial denaturation of one cycle at 95 °C for 10 s; followed by amplification with 50 cycles at 95 °C for 10 s, 62–69 °C for 10 s and 72 °C for 10 s; followed by the melting curve analysis with temperatures ranging from 60 to 95 °C. Primers used were (5'–3'): Thioredoxin (TXN), forward: ATGACTGCC AGGATGTTGCT, reverse: ACTCCCCAACCTTTTGACCC; Superoxide Dismutase 2 (SOD2), forward: GCT TGAATTGCTTGGACGCT, reverse: GCCCAACACAGAGATGGAA; catalytic Glutamate-Cysteine Ligase (GCLc), forward: GAGCGAGATGCCGTCTTACA, reverse: TTGCTACACCCATCCACCAC; Actin B (ACTb), forward: ATGTGGATCAGCAAGCAGGA, reverse: AAGGGTGTAACGCAGCTCA and NRF2, forward: CACATCCAGACAGACACCAGT, reverse: CTACAAATGGGAATGTCTCTGC. Each biological sample was amplified in a technical replicate, and the average Ct (cycle threshold) value was used to determine the change in expression. Percentage change was calculated using the comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method, where target mRNAs were normalized to the ACTb expression.

Determination of ROS and RNS. The generation of intracellular reactive oxygen species was determined by two fluorescent markers sensitive to ROS: 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA, which detects mainly hydrogen peroxide and superoxide), and dihydroethidium (DHE, specific to superoxide). The generation of reactive nitrogen species (RNS) was determined by 4-amino-5-methylamino-2',7'-difluorescein (DAF-FM, detects nitric oxide).

MC were cultured in 96-well plates. After treatment, the culture medium was eliminated, and the cells were rinsed with PBS and incubated with 25 μM H₂DCFDA (Molecular Probes, Ref-C400) or DAF-FM (Life technologies, D-23842) in PBS for 30 min at 37 °C in a humidified atmosphere with 95% air/5% CO₂. After incubation, cells were washed with PBS, and 100 μl PBS was added to each well. Fluorescence was measured with a multi-mode microplate reader (FlexStation; Molecular Devices) at 488 nm excitation and 535 nm emission. ROS levels were expressed as the percentage of relative fluorescence per μg protein (BCA method, Sigma, 500-0006). For microscopy studies, cells were cultured on coverslips and incubated under the same conditions.

To detect superoxide accumulation, the cells were incubated on coverslips with 10 μM DHE (Sigma, D7008) in DMEM medium for 30 min at 37 °C. The cells were then washed three times with PBS and mounted on glass slides and observed under a fluorescence microscope. The fluorescent quantification was determined using the calculation for the corrected total cell fluorescence (CTCF) = integrated density – (area of select × mean fluorescence of background readings)⁶⁹. For each image, three background areas were used to normalize against autofluorescence.

GSH levels. Cells were washed with ice-cold PBS and scraped into ice-cold GSH buffer (1% sulfosalicylic acid, 0.1% Triton X-100 in 0.1 M phosphate buffer with 5 mM EDTA, pH 7.5). GSH levels in the cell extracts were measured by the DTNB-glutathione disulfide reductase recycling method described by Rahman et al.⁷⁰. GSH concentration in the samples was determined using a standard GSH calibration curve, and the amount of GSH in the sample was expressed as nanomoles of GSH per milligram of protein.

Catalase activity. Catalase activity was determined by measuring the decrease in H₂O₂. Cells were homogenized with 0.1% Triton in PBS and centrifuged at 17,000×g for 30 min at 4 °C. Supernatants were incubated with 5 mM H₂O₂ in PBS. The decrease of H₂O₂ was measured at 240 nm for 3 min at 30 s intervals, using a microplate reader (PowerWave HT, Biotek). Catalase activity in the samples was determined using a standard catalase calibration curve (Sigma, C1345; 0–150 u/ml). Catalase activity was expressed as units per milligram protein⁷¹.

Cell viability. Cell viability was assessed by the 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. After incubation with normal or high glucose, MTT (5 mg/ml-PBS) was added to each well and incubated for 4 h at 37 °C. The culture medium was then removed, and the insoluble precipitate was dissolved by adding 200 μl of dimethyl sulfoxide (DMSO). Optical densities at 510 nm were measured using

a microplate reader (PowerWave HT, Biotek). Each experiment was performed in triplicate. Cell viability was calculated as the percentage of optical density respect to cells exposed to NG.

Lactate dehydrogenase (LDH) assay. For LDH cell released determination, 500 μ l of culture medium were collected at different incubation times and centrifuged. Supernatants were incubated with 120 μ M NADH in 0.1 M of PBS for 3 min at room temperature, and the reaction was started with 2.3 mM pyruvate. The LDH activity of the samples was obtained by measuring the decreasing rate of NADH absorbance at 340 nm for 4 min using a microplate reader (PowerWave HT, Biotek). LDH activity was expressed as units per milliliter.

TUNEL assay. For the TUNEL assay, we used the *in-situ* cell death detection fluorescein kit (Roche Diagnostic). Briefly, cells on coverslips were fixed as described for immunocytochemistry studies and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in 0.1% citrate buffer for 2 min on ice, then incubated in TUNEL reaction mix at 37 °C for 1 h. Incubation without the deoxynucleotidyl transferase enzyme was conducted as a negative control. For positive control, cells were treated with DNase I (0.1 mg/mL) for 15 min at 37 °C before the TUNEL reaction. Afterward, the coverslips were incubated with DAPI and mounted on glass slides with 79% glycerol. Samples were examined using a fluorescence microscope.

Data presentation and statistics. All data are expressed as the mean \pm SEM and were analyzed with GraphPad Prism 7 (GraphPad Software, La Jolla, C.) All experiments were performed a minimum of three times. Assessment of normal distribution of data was carried out with the Shapiro–Wilk test. Levene’s test was used to assess the homogeneity of variance between groups. Statistical significance was assessed by unpaired two-tailed t-test for comparison between two groups. One-way ANOVA with Tukey post hoc test, for multiple comparisons. A significant difference between the control and experimental group was defined with a *p* value of ≤ 0.05 . The specific details of each experiment are provided in the corresponding figure legends.

Data availability

The datasets generated during and/or analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Received: 17 September 2021; Accepted: 31 December 2021

Published online: 24 January 2022

References

1. La Greca, A. M. & MacKey, E. R. Type 1 diabetes mellitus. *Behav. Approaches Chronic Dis. Adolesc. A Guid. Integr. Care* **3**, 85–100 (2009).
2. Wong, T. Y., Cheung, C. M. G., Larsen, M., Sharma, S. & Simó, R. Diabetic retinopathy. *Nat. Rev. Dis. Prim.* <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.12> (2016).
3. Brownlee, M. The pathobiology of diabetic complications: A unifying mechanism. *Diabetes* **54**, 1615–1625 (2005).
4. Cecilia, O. M. *et al.* Oxidative stress as the main target in diabetic retinopathy pathophysiology. *J. Diabetes Res.* **2019**, 8562408 (2019).
5. Kowluru, R. A. & Pooi-See, C. Oxidative stress in diabetic retinopathy. *Exp. Diabetes Res.* **2007**, 1–11 (2007).
6. Robinson, R. *et al.* Interleukin-6 trans-signaling inhibition prevents oxidative stress in a mouse model of early diabetic retinopathy. *Redox Biol.* **34**, 101574 (2020).
7. Robles-Rivera, R. R. *et al.* Adjuvant therapies in diabetic retinopathy as an early approach to delay its progression: The importance of oxidative stress and inflammation. *Oxid. Med. Cell. Longev.* <https://doi.org/10.1155/2020/3096470> (2020).
8. Sykiotis, G. P. & Bohmann, D. Stress-activated cap’n’collar transcription factors in aging and human disease. *Sci. Signal.* **3**, re3 (2010).
9. Villeneuve, N. F., Lau, A. & Zhang, D. D. Regulation of the Nrf2-keap1 antioxidant response by the ubiquitin proteasome system: An insight into cullin-ring ubiquitin ligases. *Antioxidants Redox Signal.* **13**, 1699–1712 (2010).
10. Dinkova-Kostova, A. T., Kostov, R. V. & Canning, P. Keap1, the cysteine-based mammalian intracellular sensor for electrophiles and oxidants. *Arch. Biochem. Biophys.* **617**, 84–93 (2017).
11. Tonelli, C., Chio, I. I. C. & Tuveson, D. A. Transcriptional regulation by Nrf2. *Antioxidants Redox Signal.* **29**, 1727–1745 (2018).
12. Nerland, D. E. The antioxidant/electrophile response element motif. *Drug Metab. Rev.* **39**, 235–248 (2007).
13. Hayes, J. D. & Dinkova-Kostova, A. T. The Nrf2 regulatory network provides an interface between redox and intermediary metabolism. *Trends Biochem. Sci.* **39**, 199–218 (2014).
14. Chen, W. J. *et al.* Nrf2 protects photoreceptor cells from photo-oxidative stress induced by blue light. *Exp. Eye Res.* **154**, 151–158 (2017).
15. Nagar, S. *et al.* MEF2D haploinsufficiency downregulates the NRF2 pathway and renders photoreceptors susceptible to light-induced oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E4048–E4056 (2017).
16. Zhao, Z. *et al.* Age-related retinopathy in NRF2-deficient mice. *PLoS ONE* **6**, e19456 (2011).
17. Sun, W., Yu, J. & Kang, Q. Upregulation of heme oxygenase-1 by Brahma-related gene 1 through Nrf2 signaling confers protective effect against high glucose-induced oxidative damage of retinal ganglion cells. *Eur. J. Pharmacol.* **875**, 173038 (2020).
18. Zhong, Q., Mishra, M. & Kowluru, R. A. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* <https://doi.org/10.1167/iovs.13-11598> (2016).
19. Xu, Z. *et al.* NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia* **57**, 204–213 (2014).
20. Carpi-Santos, R. & Calaza, K. C. Alterations in system xc—Expression in the retina of type 1 diabetic rats and the role of Nrf2. *Mol. Neurobiol.* **55**, 7941–7948 (2018).
21. Albert-Garay, J. S., Riesgo-Escovar, J. R., Sánchez-Chávez, G. & Salceda, R. Retinal Nrf2 expression in normal and early streptozotocin-diabetic rats. *Neurochem. Int.* **145**, 105007. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2021.105007> (2021).
22. RübSam, A., Parikh, S. & Fort, P. E. Role of inflammation in diabetic retinopathy. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1–31 (2018).
23. Subirada, P. V. *et al.* A journey into the retina: Müller glia commanding survival and death. *Eur. J. Neurosci.* **47**, 1429–1443 (2018).
24. Newman, E. & Reichenbach, A. The Müller cell: A functional element of the retina. *Trends Neurosci.* **19**, 307–312 (1996).
25. Vecino, E., Rodriguez, F. D., Ruzafa, N., Pereiro, X. & Sharma, S. C. Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Prog. Retin. Eye Res.* **51**, 1–40 (2016).

26. De Melo Reis, R. A., Ventura, A. L. M., Schitine, C. S., De Mello, M. C. F. & De Mello, F. G. Müller glia as an active compartment modulating nervous activity in the vertebrate retina: Neurotransmitters and trophic factors. *Neurochem. Res.* **33**, 1466–1474 (2008).
27. Sorrentino, F. S., Allkables, M., Salsini, G. & Perri, P. The importance of glial cells in the homeostasis of the retinal microenvironment and their pivotal role in the course of diabetic retinopathy. *Life Sci.* <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2016.08.001> (2016).
28. Coughlin, B. A., Feenstra, D. J. & Mohr, S. Müller cells and diabetic retinopathy. *Vision Res.* **139**, 93–100 (2017).
29. Hernández-Ramírez, E., Sánchez-Chávez, G., Estrella-Salazar, L. A. & Salceda, R. Nitrosative stress in the rat retina at the onset of Streptozotocin-induced diabetes. *Cell Physiol. Biochem.* **42**, 2353–2363 (2017).
30. Matteucci, A. *et al.* Neuroprotection by rat Müller glia against high glucose-induced neurodegeneration through a mechanism involving ERK1/2 activation. *Exp. Eye Res.* **125**, 20–29 (2014).
31. Eljarrat-Binstock, E., Raiskup, F., Stepensky, D., Domb, A. J. & Frucht-Pery, J. Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: A role in high glucose-induced apoptosis in retinal Müller cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **45**, 1553–1561 (2004).
32. Walker, R. J., Anderson, N. M., Bahouth, S. & Steinle, J. J. Silencing of insulin receptor substrate-1 increases cell death in retinal Müller cells. *Mol. Vis.* **18**, 271–279 (2012).
33. Pereiro Id, X. *et al.* Dexamethasone protects retinal ganglion cells but not Müller glia against hyperglycemia in vitro. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207913> (2018)
34. Zhang, L. *et al.* Biochemical basis and metabolic interplay of redox regulation. *Redox Biol.* **26**, 101284 (2019).
35. Lushchak, V. I. Free radicals, reactive oxygen species, oxidative stress and its classification. *Chem. Biol. Interact.* **224**, 164–175 (2014).
36. Dröge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol. Rev.* **82**, 47–95 (2015).
37. Dinkova-Kostova, A. T. & Talalay, P. Direct and indirect antioxidant properties of inducers of cytoprotective proteins. *Mol. Nutr. Food Res.* **52**, 128–138 (2008).
38. Espinosa-Diez, C. *et al.* Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biol.* **6**, 183–197 (2015).
39. Shi, Q. *et al.* Effects of rhaponticin on retinal oxidative stress and inflammation in diabetes through NRF2/HO-1/NF- κ B signalling. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **34**, 1–9 (2020).
40. Zhong, Q., Mishra, M. & Kowluru, R. A. Transcription factor Nrf2-mediated antioxidant defense system in the development of diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **54**, 3941–3948 (2013).
41. Zhang, W. *et al.* Intermittent high glucose-induced oxidative stress modulates retinal pigmented epithelial cell autophagy and promotes cell survival via increased HMGB1. *BMC Ophthalmol.* **18**, 1–8 (2018).
42. Buranasin, P. *et al.* High glucose-induced oxidative stress impairs proliferation and migration of human gingival fibroblasts. *PLoS ONE* **13**, 1–19 (2018).
43. Liu, W. Y., Liou, S. S., Hong, T. Y. & Liu, I. M. Protective effects of hesperidin (Citrus flavonone) on high glucose induced oxidative stress and apoptosis in a cellular model for diabetic retinopathy. *Nutrients* **9**, 1–15 (2017).
44. Chen, Q. *et al.* Oxidative stress mediated by lipid metabolism contributes to high glucose-induced senescence in retinal pigment epithelium. *Free Radic. Biol. Med.* **130**, 48–58 (2019).
45. Yang, X. *et al.* Paeoniflorin protects Schwann cells against high glucose induced oxidative injury by activating Nrf2/ARE pathway and inhibiting apoptosis. *J. Ethnopharmacol.* **185**, 361–369 (2016).
46. Du, Y., Smith, M. A., Miller, C. M. & Kern, T. S. Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J. Neurochem.* **80**, 771–779 (2002).
47. Giordano, C. R. *et al.* Catalase therapy corrects oxidative stress-induced pathophysiology in incipient diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **56**, 3095–3102 (2015).
48. Jo, H. Y. *et al.* The unreliability of MTT assay in the cytotoxic test of primary cultured glioblastoma cells. *Exp. Neurobiol.* **24**, 235–245 (2015).
49. Vistica, D. T. *et al.* Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting Formazan production. *Cancer Res.* **51**, 2515–2520 (1991).
50. Tien, T. *et al.* High glucose induces mitochondrial dysfunction in retinal müller cells: Implications for diabetic retinopathy. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* **58**, 2915–2921 (2017).
51. Mutter, F. E., Park, B. K. & Copple, I. M. Value of monitoring Nrf2 activity for the detection of chemical and oxidative stress. *Biochem. Soc. Trans.* **1**, 657–662 (2015).
52. Xue, M. *et al.* Frequency modulated translocational oscillations of Nrf2 mediate the antioxidant response element cytoprotective transcriptional response. *Antioxid. Redox Signal.* **23**, 613–629 (2015).
53. Wang, J. *et al.* Sigma 1 receptor regulates the oxidative stress response in primary retinal Müller glial cells via NRF2 signaling and system xc⁻, the Na⁺-independent glutamate–cystine exchanger. *Free Radic. Biol. Med.* **86**, 25–36 (2015).
54. Grosche, A. *et al.* The proteome of native adult Müller glial cells from Murine retina. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 462–480 (2016).
55. Suzuki, T. & Yamamoto, M. Molecular basis of the Keap1–Nrf2 system. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 93–100 (2015).
56. Chorley, B. N. *et al.* Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: Influence on retinoid X receptor alpha. *Nucleic Acids Res.* **40**, 7416–7429 (2012).
57. Cuadrado, A. Structural and functional characterization of Nrf2 degradation by glycogen synthase kinase 3 β -TrCP. *Free Radic. Biol. Med.* **88**, 147–157 (2015).
58. Zazueta, C. & Königsberg, M. Nrf2: Molecular and epigenetic regulation during aging. *Aging Res. Rev.* **47**, 31–40 (2018).
59. Deliyanti, D. *et al.* A potent Nrf2 activator, dh404, bolsters antioxidant capacity in glial cells and attenuates ischaemic retinopathy. *Clin. Sci.* **130**, 1375–1387 (2016).
60. McDowell, R. E. *et al.* Müller glial dysfunction during diabetic retinopathy in rats is reduced by the acrolein-scavenging drug, 2-hydrazino-4,6-dimethylpyrimidine. *Diabetologia* **61**, 2654–2667 (2018).
61. Ahmed, S. M. U., Luo, L., Namani, A., Wang, X. J. & Tang, X. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1863**, 585–597 (2017).
62. Gerriysen, M. E. *et al.* CREB-binding protein/p300 are transcriptional coactivators of p65. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 2927–2932 (1997).
63. Wardyn, J. D., Ponsford, A. H. & Sanderson, C. M. Dissecting molecular cross-talk between Nrf2 and NF- κ B response pathways. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 621–626. <https://doi.org/10.1042/BST20150014> (2015).
64. Liu, G. H., Qu, J. & Shen, X. NF- κ B/p65 antagonizes Nrf2-ARE pathway by depriving CBP from Nrf2 and facilitating recruitment of HDAC3 to MafK. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **1783**, 713–727 (2008).
65. Hwang, Y. J. *et al.* MafK positively regulates NF- κ B activity by enhancing CBP-mediated p65 acetylation. *Sci. Rep.* **3**, 1–10 (2013).
66. Hicks, D. & Courtois, Y. The growth and behaviour of rat retinal Müller cells in vitro 1. An improved method for isolation and culture. *Exp. Eye Res.* **51**, 119–129 (1990).
67. Laemmli, U. K., Mölbert, E., Showe, M. & Kellenberger, E. Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.* **49**, 99–113 (1970).
68. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275 (1951).
69. El-Sharkawy, A. Calculate the Corrected Total Cell Fluorescence (CTCF). <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.1307.8008> (2016).

70. Rahman, I., Kode, A. & Biswas, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat. Protoc.* **1**, 3159–3165 (2007).
71. Beers, R. F. & Sizer, I. W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J. Biol. Chem.* **195**, 133–140 (1952).

Acknowledgements

The authors would like to acknowledge Gustavo Sánchez-Chávez and Juan Manuel Murillo-Maldonado for expert technical support, Dra. Arlet del Carmen Loza Huerta, National Laboratory of Channelopathies, Instituto de Fisiología Celular-UNAM for her technical assistance and computational supporting; M.C. Adriana González-Gallardo, Proteogenomic Unit, Instituto de Neurobiología-UNAM for her technical assistance. This research was supported in part by a grant from DGAPA/PAPIIT-UNAM project IN203520 to RS and project IN207719 to JRRE, Jesús Silvestre Albert Garay is a PhD student from the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) and received a CONACyT fellowship 613013.

Author contributions

J.S.A.G.: Conceptualization, Methodology, Formal analysis, Investigation, Writing-Original Draft, Visualization, Writing-Review & Editing. J.R.R.E.: Methodology, Formal analysis, Resources, Writing-Review & Editing, Supervision, Funding acquisition. R.S.: Conceptualization, Investigation, Writing-Original Draft, Writing-Review & Editing, Project administration, Funding acquisition.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-05284-x>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to J.S.A.-G.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022