



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EFEECTO DE LAS ELEVADAS CONCENTRACIONES
DE GLUCOSA SOBRE LA VIABILIDAD DEL
EPITELIO PIGMENTARIO DE LA RETINA EN
CULTIVO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

P R E S E N T A:

Yoselin Alejandra Ramírez Padrón



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

Ciudad de México.

Noviembre, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
Secretaría General
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE
Directora General
Dirección General de Administración Escolar
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

Efecto de las elevadas concentraciones de glucosa sobre la viabilidad del epitelio pigmentario de la retina en cultivo

realizado por **Yoselin Alejandra Ramírez Padrón** con número de cuenta **310282228** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietario Dr. Luis Alonso Lemus Sandoval

Propietaria Dra. Sandra Margarita Morales Mulia

Propietaria Dra. Rocío Salceda Sacanelles
Tutora

Suplente Dr. Adonis Germinal Cocho Gil

Suplente Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 18 DE JUNIO DE 2018

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

Agradecimientos

Dra. Rocío Salceda, le agradezco por permitirme la estancia en su laboratorio. Por su apoyo, el tiempo, los comentarios y la paciencia que mostró durante la realización de este trabajo. Por supuesto, gracias por las enseñanzas independientes al trabajo.

A los Dres. Luis Lemus, Sandra Morales, Germinal Cocho y Josué Ramírez. Gracias por aceptar ser mis sinodales. Además, por sus valiosos comentarios y por el tiempo dedicado a la revisión del presente escrito.

Agradezco al Biól. Gustavo Sánchez Chávez, por su incomparable asesoría académica y la invaluable asistencia técnica durante las actividades experimentales.

Agradezco al personal del bioterio, de la unidad de cómputo y del taller del Instituto de Fisiología Celular.

Dedicatorias

Con todo el amor y respeto a dos auténticas personas: mi mamá y mi abuelita. Por la ternura y cariño transmitidos en múltiples formas. Por sus enseñanzas infinitas. Y por el ejemplo de perseverancia y fortaleza.

A Nathalia, Maleni, Michelle, Jonathan y Aritzy, mis primos. Por sus risas. Por enseñarme que la razón y la imaginación no son capacidades excluyentes.

A Hugo.

A Pawis, por las aventuras y batallas compartidas en la Facultad de Ciencias.

A Ixchel, por el apoyo y amistad a pesar de la distancia.

A Germinal Cocho, por ser un ejemplo de persona.

A Ricardo Noguera, por los consejos y los cafés con memoria.

A los integrantes del laboratorio AL-102, por la compañía que aligeró el trabajo.

A la vida, porque su fugacidad nos hace a valorar el día a día.

*Porque el solvente universal es el tiempo
y nosotros, partículas nada más...*

*“Empieza por el principio, y sigue hasta llegar al
final; allí te paras.”*

Lewis Carroll

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Resumen	1
INTRODUCCIÓN	2
La retina	5
El epitelio pigmentario de la retina	7
Funciones del epitelio pigmentario de la retina	11
Transporte transepitelial	11
Isomerización del pigmento visual	12
Fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores	13
Secreción de factores de crecimiento	14
Antecedentes directos	18
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
MÉTODOS	21
RESULTADOS	25
Caracterización del cultivo primario de epitelio pigmentario de la retina de la rata	25
Efecto de la alta concentración de glucosa en:	
la producción de especies reactivas de oxígeno	27
la viabilidad celular del EPR	29
la liberación de deshidrogenasa láctica (DHL)	31
la tinción con yoduro de propidio	33
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES	41
REFERENCIAS	42
Apéndice	47

Lista de abreviaturas no estándares

AC	anhidrasa carbónica
ADH	ácido docosaheptanoico
AMD	degeneración macular relacionada con la edad
CNE	capa nuclear externa
CNI	capa nuclear interna
BHE	barrera heteroretineana externa
DNAsa	desoxirribonucleasa I
DHL	deshidrogenasa láctica
EPR	epitelio pigmentario de la retina
ERO	especies reactivas de oxígeno
GABA	ácido γ -aminobutírico
GLUT 1	transportador de glucosa tipo 1
IP	ioduro de propidio
MB	membrana de Bruch
MCT	transportadores de monocarboxilato
MV	microvellosidades
RD	retinopatía diabética
SEF	segmentos externos de los fotorreceptores
UE	uniones estrechas
ZO	zónula ocludente
ZONAB	proteína de unión a ácido nucleico asociada a ZO

Resumen

La diabetes es una enfermedad caracterizada por hiperglucemia que lleva a distintas complicaciones, entre las cuales encontramos a la retinopatía diabética (RD). Durante la RD se desarrollan múltiples mecanismos que desencadenan daño celular en la retina y que finalmente llevan a la ceguera. El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células ubicada entre la retina y la coroides. Las células del EPR se consideran células nodrizas de la retina debido a las importantes funciones que desempeñan, mismas que están relacionadas con la estabilidad estructural y funcional retiniana. Existe evidencia de que mantener a los tejidos bajo condiciones de hiperglucemia genera un estrés oxidante, incluso se han reportado marcadores de estrés oxidante en las retinas aisladas *post mortem* de pacientes diabéticos, sin embargo, no está claramente definido lo que sucede bajo las mismas circunstancias en las células del EPR. Nuestra hipótesis es, que las altas concentraciones de glucosa pudieran alterar la producción de especies reactivas de oxígeno y la viabilidad del EPR. Esto podría ser la causa de las alteraciones observadas en la retina durante la RD.

La hipótesis se probó analizando la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la viabilidad celular del EPR en cultivo tratado con altas concentraciones de glucosa. Las ERO producidas aumentaron en el EPR en presencia de altas concentraciones de glucosa de 12-48 horas, mientras que la viabilidad celular no se modificó en ninguno de los tiempos estudiados. Los resultados sugieren que las células del EPR son resistentes al incremento en ERO observado en presencia de altas concentraciones de glucosa y que posiblemente se requiera de un mayor tiempo de exposición a las mismas para alterar su viabilidad.

Introducción

El catabolismo de la glucosa tiene un papel fundamental en el metabolismo de los sistemas biológicos, funciona como un proveedor de carbono para sintetizar nuevos materiales celulares y también como fuente de energía para llevar a cabo diversos procesos en la célula.

En los mamíferos, para la utilización adecuada de la glucosa es necesaria la acción de la insulina, una hormona producida en el páncreas (específicamente en las células tipo beta que se agrupan formando los islotes de Langerhans) y que se encarga de estimular la captación de glucosa en el hígado, tejido adiposo y músculo, así como de su almacenamiento en forma de glucógeno, lípidos y proteínas respectivamente. Sin la acción de la insulina, la captación de glucosa por estos tejidos no es óptima, lo que promueve un exceso en su concentración dentro del torrente sanguíneo, característica principal de la enfermedad denominada diabetes.

La diabetes se presenta en el 8.5 % de la población adulta del mundo (<http://www.who.int/diabetes/global-report/es/>). La prevalencia de diabetes a nivel mundial va en incremento y se estima que para 2036 habrá 366 millones de pacientes afectados. Es importante tener en cuenta que ésta alteración metabólica impacta negativamente en la calidad de vida de los enfermos porque implica nuevos desafíos fisiológicos, psicológicos y sociales para los mismos y de manera concomitante representa un problema económico.

Entre los síntomas genéricos de la enfermedad se incluyen: sed y micción excesivos, así como pérdida de peso inusual.

Se clasifica generalmente en diabetes tipo 1 y 2, en la primera se presenta una deficiencia de insulina por destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas y la diabetes tipo 2 es caracterizada por la acción insuficiente de la insulina [1].

La exposición constante de los tejidos a hiperglucemia causa complicaciones en varios órganos. Entre los principales están: el riñón, el corazón, nervios periféricos y la retina.

La retinopatía diabética (RD) es asintomática en sus etapas tempranas, pero se conoce que la mayoría de los individuos con diabetes tipo 1 y más del 60 % de los individuos que padecen diabetes tipo 2, presentan algún grado de retinopatía después de veinte años de diagnosticada la enfermedad. Y de hecho se sabe que el 50 % de los diabéticos presentan una notable disminución de su capacidad visual cinco años después de haber sido diagnosticados con RD [2].

La visión, es la capacidad de percibir los cambios de iluminación, así como distinguir entre formas y colores de los objetos. Por lo tanto, es una de las maneras en que recibimos e interpretamos el ambiente externo y tiene como principal órgano sensorial el ojo [3, 4].

En el interior del globo ocular se encuentra el cristalino, que es un disco biconvexo, flexible y transparente capaz de funcionar como una lente debido a que los cambios en su curvatura modifican el enfoque de la imagen en la retina. La concavidad posterior tras el cristalino está llena de agua con pocas fibras de colágeno y se conoce como humor vítreo [3].

En la pared del globo ocular de los vertebrados se pueden apreciar al menos tres capas tisulares [5]: La esclerótica, la capa más externa, consiste en haces entrelazados de tejido conectivo fibroso denso con pocas fibras elásticas. Esta capa sirve principalmente como sostén; en la parte anterior del ojo es transparente y forma la córnea.

La túnica media se compone de tejido conjuntivo laxo y alberga abundantes vasos, esta capa está representada en la parte anterior del ojo por el iris, un músculo liso que funciona como un diafragma ajustable. Regula el diámetro de la pupila y modifica la cantidad de luz que penetra en el ojo.

Por su parte, la túnica interna, está formada por la retina neural y el epitelio pigmentario de la misma (Fig. 1). La importancia de estos tejidos se señala a continuación.

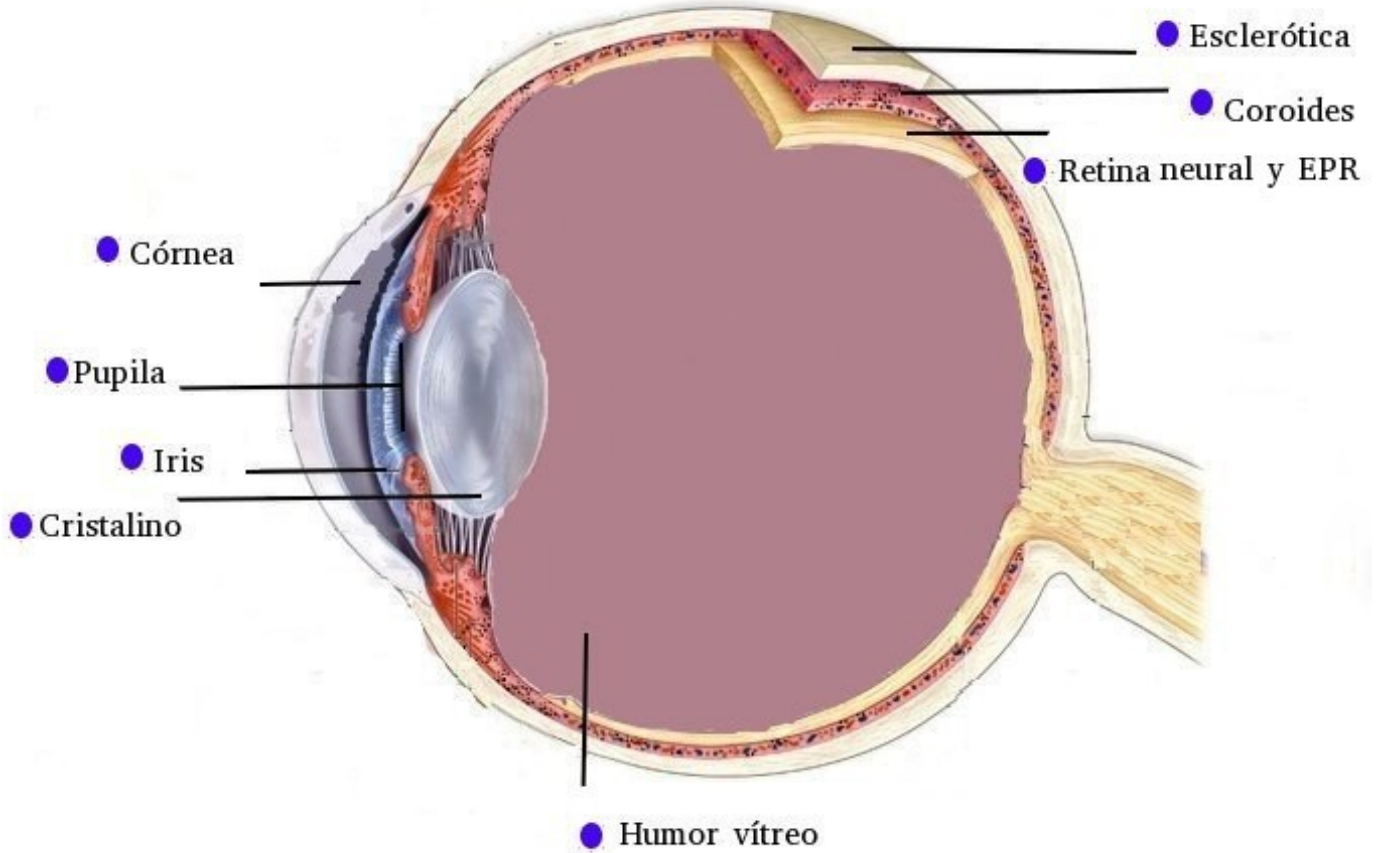


Figura 1. Diagrama general del ojo de los vertebrados. Modificado de “eye anatomy on McGraw-Hill website (<https://www.iris-pharma.com/eye-structures>)”.

La retina

La retina es el tejido neural responsable de la captación de radiación electromagnética de un intervalo particular de energía comprendido entre 400-700 nm y su posterior transformación en señales electroquímicas, las cuales son interpretadas en el cerebro.

La retina neural se conforma de seis capas de diferentes tipos celulares (Fig. 2). La capa de células fotorreceptoras que pueden ser de dos tipos: conos y bastones (capa nuclear externa: CNE). La capa de somas de células bipolares, horizontales, amacrinas e interplexiformes (capa nuclear interna: CNI); y la capa de células ganglionares. Intercaladas entre estas tres capas, los procesos dendríticos y axonales de las neuronas dan lugar a dos capas más, denominadas plexiformes. Las terminales de las células de la CNI al establecer sinapsis con los fotorreceptores forman la capa plexiforme externa (CPE) y al interconectarse con las células ganglionares forman la capa plexiforme interna (CPI). Los axones de las células ganglionares forman el nervio óptico, a través del cual la información de la retina es enviada a la corteza visual. La glía de Müller, que es el tipo representativo de glía en la retina, hace contacto con todos los tipos celulares de la retina, iniciando en la membrana limitante interna, formada por los axones de las células ganglionares y vasos retinianos y prolongándose hacia la membrana limitante externa donde sus procesos hacen contacto con los fotorreceptores [6, 7].

La distribución del oxígeno cambia a través de la retina, debido a las diferentes demandas de las diversas células que la conforman y la irrigación que reciben. La irrigación de la retina se puede dividir en externa e interna ya que recibe sus nutrientes de dos circulaciones separadas. La retina interna (células ganglionares) se provee de oxígeno y nutrientes a partir de una red de capilares provenientes de la arteria retiniana, que ingresan en la capa de células ganglionares y conforman de esta manera la vasculatura intrarretiniana. Mientras que la retina externa (fotorreceptores) se nutre a través de los coriocapilares fenestrados que están en contacto directo con el epitelio pigmentario de la

retina, por lo que éste constituye efectivamente la barrera hematorretiniana externa (BHE) [8].

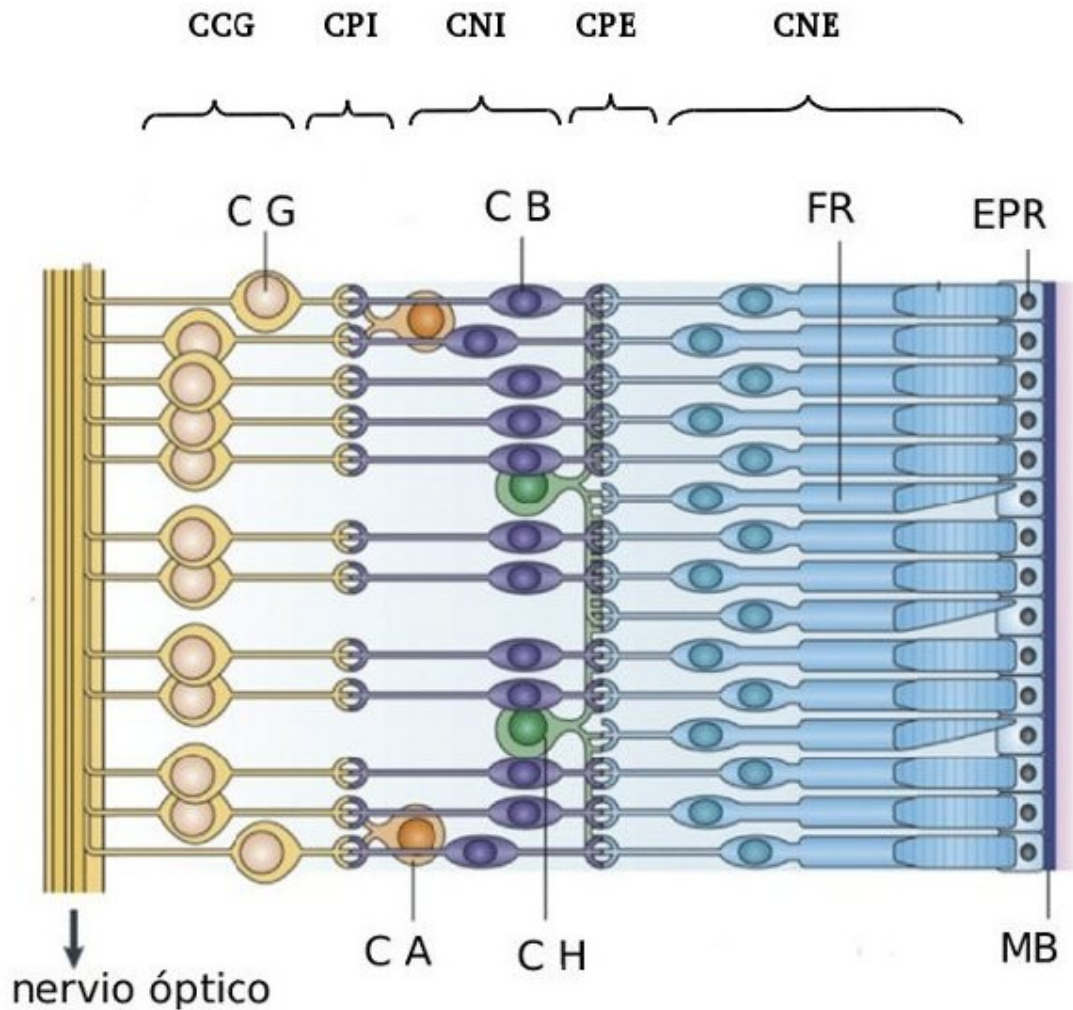


Figura 2. Estructura de la retina de un vertebrado. Capa de células ganglionares (CCG): célula ganglionar (CG). Capa plexiforme interna (CPI). Capa nuclear interna (CNI): célula bipolar (CB), célula amacrina (CA), célula horizontal (CH). Capa plexiforme externa (CPE). Capa nuclear externa (CNE): conos y bastones (FR). Epitelio pigmentario de la retina (EPR) y membrana de Bruch (MB). Modificado de Higuchi, A. et al. (2017) [9].

El epitelio pigmentario de la retina

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una monocapa de células especializadas que se localiza entre la coroides y los segmentos externos de los fotorreceptores de la retina.

Durante el desarrollo embrionario, la neuroretina y el EPR son un continuo de células y derivan del neuroectodermo. Posteriormente, al inicio de la formación de las somitas a cada lado de la placa neural se forman dos engrosamientos, que darán lugar al área óptica, ésta se invagina y produce dos capas: externa e interna, la primera es estratificada y dará lugar a la retina, la segunda no estratificada es el futuro EPR.

El EPR está formado por células epiteliales con forma cúbicas, con un diámetro de 14-60 μm dependiente de su posición en el ojo, las células en la región macular son más pequeñas comparadas con las células de la periferia [10]. La monocapa de las células se mantienen unidas entre sí por la existencia de contactos intercelulares localizados en sus membranas laterales, los cuales se caracterizan por presentar uniones estrechas (UE), uniones adherentes, desmosomas y uniones comunicantes. Las primeras son un componente esencial del EPR, se localizan en la parte más apical del complejo de las uniones y forman parte de la BHE. Las UE diferencian en las células epiteliales un lado apical y otro basolateral (Fig. 3), es decir, forman un epitelio polarizado, produciendo una asimetría en su estructura y diversidad en ambos compartimentos con respecto a la organización de las proteínas de membrana y de los organelos [11, 12].

Existen tres tipos de proteínas que componen a las UE: 1) proteínas integrales de membrana (occludina y claudinas); 2) proteínas citoplasmáticas que organizan a las proteínas integrales de membrana y las conectan a los filamentos de actina o a otras proteínas citoplasmáticas asociadas a la periferia (zonula ocludente 1, 2 y 3 (ZO)) y 3) proteínas de señalización (β -catenina y ZONAB: proteína de unión a ácido nucleico asociada a ZO) cuya función es activar ciertas vías de señalización en el interior de la célula

y además regular la transcripción de diferentes genes asociados con el movimiento y la proliferación celular [12, 13].

Las UE son responsables de que exista una resistencia eléctrica paracelular diez veces mayor que la transcelular, de aproximadamente $350\text{-}600 \Omega \text{ cm}^2$ y que caracteriza al EPR como un epitelio de alta impermeabilidad, que impide el paso de micro y macromoléculas, por lo que tienen que ser transportadas específicamente por el EPR para llegar a la retina neural [12, 13].

La membrana basal del EPR secreta la lámina basal, o membrana de Bruch (MB), a la que se adhiere por medio de hemidesmosomas. La MB del EPR está compuesta principalmente por colágeno tipo IV, laminina, fibronectina, sulfato de heparán y sulfato de condroitina [14].

En la zona basal del epitelio pigmentario se encuentra el núcleo (de forma ovoide). Algunas células poseen dos núcleos, específicamente las células que están en contacto con la región más anterior de la retina conocida como *ora serrata* [10].

Además, se ha observado que el número de núcleos en las células del epitelio pigmentario de ratón aumenta con la edad y se piensa que esta multinucleación es el resultado de citocinesis anormales [15]. Sin embargo, es raro encontrar células del EPR en mitosis [10].

Las mitocondrias en el EPR son numerosas, lo que refleja su alta actividad metabólica. El complejo de Golgi y retículo endoplásmico se observan bien desarrollados. También presenta un elevado número de lisosomas y cuerpos residuales que contienen restos de los segmentos externos de los fotorreceptores [16].

Por su parte, el citoplasma apical de estas células está lleno de gránulos de melanina, que se pueden encontrar en dos diferentes estados: premelanosoma (melanosomas parcialmente melanizados) y melanosoma (gránulo maduro de melanina) [10]. Este último es un organelo relacionado con los lisosomas que contiene enzimas y proteínas estructurales necesarias para la síntesis y almacenamiento de melanina. La melanina es

sintetizada a partir del L-DOPA durante el desarrollo. En el adulto la ausencia de actividad de tirosinasas y premelanosomas indican que la síntesis de melanina es mínima y en ocasiones disminuye con la edad [17].

La parte apical del EPR se encuentra en contacto con la matriz interfotorreceptora (IPM), nombre con el que se denomina a la matriz extracelular que conecta al EPR con la retina neural y que es una mezcla de componentes no celulares, entre los cuales están la fibulina, fibronectina, laminina, trombospondina, variadas enzimas, factores de crecimiento, proteínas de unión al hialuronato, algunos proteoglicanos y moléculas solubles (ácidos grasos, retinoides, aminoácidos, etc). Desde su descubrimiento se postuló que la IPM actúa como un “pegamento”, ayudando a mantener la adhesión normal entre la retina y el EPR [18].

La membrana de la zona apical de las células del EPR presenta prolongaciones citoplasmáticas, cuya forma es cilíndrica y que corresponden a las microvellosidades, las cuales dependiendo del tamaño que poseen se pueden clasificar en dos tipos: 1) las microvellosidades largas (5-7 μm), que maximizan la superficie apical para el transporte epitelial y 2) las microvellosidades más cortas (3-4 μm) que forman estructuras envolventes de los segmentos externos de los fotorreceptores, y se encargan de fagocitarlos, proceso que participa en la renovación continua de estas células [10].

La polaridad de la célula se refleja en la distribución de proteínas, las cuales pueden estar localizadas en la zona apical como la ATPasa Na^+/K^+ , o en la parte basolateral como el canal de cloruro activado por calcio (bestrofina 1). Estas proteínas tienen una localización características en el EPR, misma que es opuesta en otros epitelios, en donde por ejemplo la ATPasa Na^+/K^+ se sitúa en la zona basal [19]. En la membrana apical del EPR también se presentan proteínas como CFTR (regulador de la conductancia transmembranal, que actúa como un canal de cloruro), la glicoproteína CD147/EMMPRIN (inductor de la síntesis de metaloproteinasas de matriz), la integrina $\alpha\text{V}\beta\text{5}$ (participa en la fagocitosis de los fotorreceptores) y MCT1 (el transportador 1 de monocarboxilato) [10].

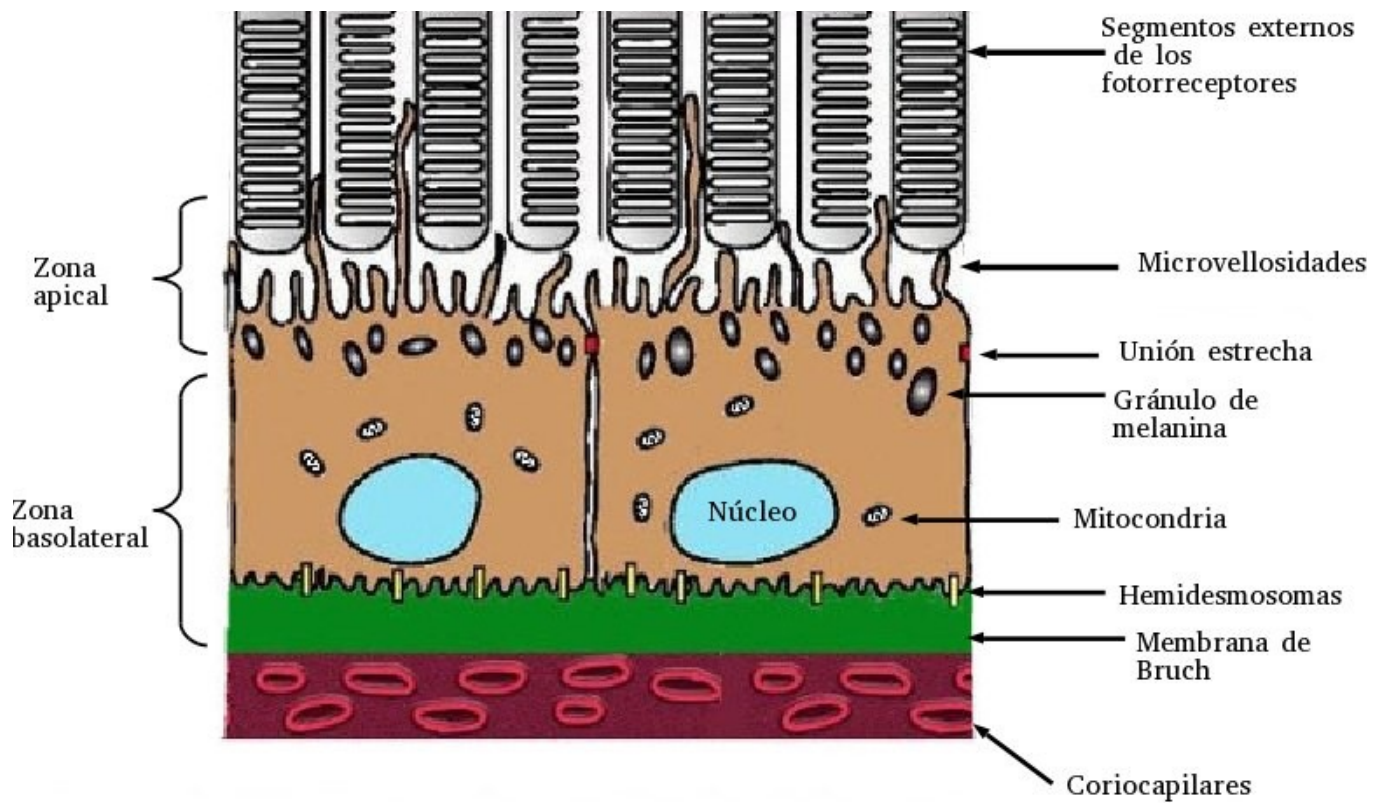


Figura 3. Esquema de la estructura del EPR. Se muestra la asimetría celular generada por las uniones estrechas. Se resaltan los característicos gránulos de pigmento (melanina) de éstas células. Se muestra que en la parte superior las células están en contacto con los fotorreceptores. Mientras que en la inferior, las células se adhieren a la membrana de Bruch y están en contacto con los coriocapilares [11, 12 y 14].

Funciones del EPR

Entre la plétora de tareas que lleva a cabo el EPR encontramos funciones asociadas a su importante papel de barrera (Fig. 4).

I. Transporte transepitelial

Las células del EPR tienen como función principal la regulación de nutrientes entre fotorreceptores y la sangre, mientras de manera simultánea remueven sus desechos metabólicos. De tal forma que el transporte transepitelial del EPR se lleva a cabo de la sangre hacia los fotorreceptores pero también en la dirección opuesta. Este proceso de intercambio es altamente importante para mantener el sustento de las células fotorreceptoras y su homeostasis metabólica en general.

Los fotorreceptores se nutren por medio de la circulación externa (coroides) y las células del EPR transportan glucosa hacia la dirección apical. Se ha propuesto que la glucosa pasa desde los coriocapilares a través de las células del EPR y luego a la retina, transporte mediado por el transportador 1 de glucosa (GLUT1) que se expresa tanto en la membrana apical como en la basolateral del epitelio [20, 21]. Poco se conoce acerca del transporte de aminoácidos a través del EPR, pero se sabe que entre los aminoácidos transportados se encuentran el GABA, la leucina, el glutamato y la taurina [20] y que la deficiencia de taurina en los fotorreceptores lleva a la degeneración de los mismos [22]. Además, las membranas de los fotorreceptores y neuronas de la retina están constituidos por fosfolípidos que tienen un alto contenido de ácido docosahexaenoico (ADH). El mecanismo molecular preciso por el que el ADH llega a la retina, se desconoce, sin embargo, se sabe que el precursor de esta molécula, el ácido linoleico, se obtiene de la dieta y es tomado por el hígado para desaturarlo y formar el ADH, quien posteriormente se esterifica en fosfolípidos, se secreta hacia la sangre dentro de lipoproteínas y a través de los coriocapilares es entregado al EPR [23].

La presión intraocular origina un flujo de agua desde el cuerpo vítreo hasta la retina y junto con el metabolismo activo de los fotorreceptores, se produce gran cantidad de agua (H_2O) y dióxido de carbono (CO_2) en el espacio subretinal. El CO_2 y H_2O en exceso puede prodir acidosis y desprendimiento de la retina, respectivamente, por lo que la eliminación de éstos por medio del EPR es sumamente importante. Se conoce que la acuaporina 1 contribuye a un transporte eficaz de agua [24]. El CO_2 puede difundir a través de la membrana apical de las células del EPR, o ser transportado como bicarbonato de sodio (HCO_3^-) gracias a la conversión mediada por la enzima anhidrasas carbónicas (ACs) encontradas en la membrana apical (IV, IX, XII y XIV), el citosol (II) o en la membrana basolateral (IX) del EPR. Además está reportado que un aumento en el CO_2 en la parte apical del EPR activa el transporte de fluidos ligados a soluto, lo cual ayuda al transporte de agua [25].

Por otra parte, se estima que la concentración de ácido láctico en el espacio subretiniano son de 7 a 13 mM, mientras que en la sangre la concentración es de 1 mM. Lo anterior implica que para regular el pH en el espacio subretiniano, es necesario eliminar grandes cantidades de lactato producido por la retina neural. Este transporte se lleva a cabo por transportadores de monocarboxilatos (MCT). El EPR cuenta con dos tipos de transportadores de monocarboxilatos: el MCT1 y el MCT3, expresados en la parte apical y basolateral respectivamente [26]. El MCT1 deja entrar a la célula del EPR grandes cantidades de lactato provenientes del espacio subretinal. Evitando que la concentración de lactato dentro del EPR disminuya su pH intracelular, el MCT3 lleva a cabo un flujo de salida del lactato desde el interior del EPR hacia la circulación [27].

II. Isomerización del retinal 11-*cis* a retinol todo-*trans* en el ciclo visual

El 60% de la luz que pasa a través de las capas celulares de la retina es absorbida por el EPR, específicamente por la melanina de los melanosomas. De esta manera el EPR sirve como defensa a la retina contra la fotooxidación y aberración visual por rebote de fotones dentro del ojo [11]. Los fotones que llegan hasta las células fotorreceptoras inician la

transducción visual al ser captados por la rodopsina. Esta proteína contiene al pigmento retinal 11-*cis*, que con la absorción de luz cambia su conformación a retinal todo-*trans*. Los fotorreceptores no poseen la isomerasa *cis-trans*, por lo que el reciclado del retinal 11-*cis* se lleva a cabo en el EPR [28].

Las retinol deshidrogenasas (RDH) aún en el citoplasma de los segmentos externos, catalizan la reacción de retinal todo-*trans* a retinol todo-*trans*, es en ésta configuración que la molécula se transporta al interior del EPR por la proteína IRBP (proteína intrafotorreceptora de unión al retinol). Dentro del EPR la proteína denominada CRBP (proteína de unión al retinol celular) acarrea al retinol todo-*trans* hasta el retículo endoplasmático de las células, en donde las LRAT (Lecitina de retinol aciltransferasa) transfieren un grupo acilo de la fosfatidilcolina de la membrana al retinol, catalizando así la esterificación de retinol todo-*trans* en retinil ésteres todo-*trans*. A pesar de que se desconoce el mecanismo, se sabe que la proteína RPE-65 (proteína de 65 kD específica del epitelio pigmentario de la retina) es responsable de hidrolizar e isomerizar los retinil ésteres todo-*trans* en retinol 11-*cis*. CRALBP (proteína de unión a retinaldehído celular) facilita que RDH5 lleve a cabo la oxidación de retinol 11-*cis* a retinal 11-*cis* [11, 28, 29]. Para que el retinal 11-*cis* se utilice nuevamente uniéndose a la rodopsina, el IRBP lo transporta a los fotorreceptores [11].

III. Fagocitosis de los segmentos externos de los fotorreceptores

El mantenimiento en la excitabilidad de los conos y bastones requiere de una renovación constante de sus segmentos externos, el recambio total del segmento externo se lleva a cabo de entre 7-12 días [17]. Esta renovación para preservar la integridad celular se compone de dos fases: una anabólica, que se lleva a cabo en la misma célula fotorreceptora y que consiste en la transcripción de RNA, síntesis de proteínas y la generación de las nuevas membranas; y una fase catabólica, en donde los últimos discos de los segmentos externos de los fotorreceptores (SEF) se desprenden y/o son fagocitados

por el EPR, el cual los digiere. Así, moléculas esenciales tales como el ácido docosahexaenoico (DHA) y el retinal, pueden ser transportados nuevamente hacia el fotorreceptor y ser utilizados por éste. Los SEF, se encuentran expuestos a cambios continuos de iluminación, lo que produce una acumulación de radicales libres, proteínas y lípidos foto-oxidados, que pueden acelerar su recambio.

Se calcula que cada día, el EPR de la rata fagocita aproximadamente 20 000-30,000 discos de los SEF [17]. En este proceso se requiere una interacción mediada de ligandos y receptores, cuya activación desencadena una variedad de vías de señalización río-abajo que juegan un papel en la fagocitosis. Además del receptor transmembranal de tirosina cinasa (MerTK) que es responsable de la internalización de SEF, se han identificado múltiples receptores que se encuentran en la membrana celular del EPR, dentro de estos se encuentran: el receptor de manosa 6-fosfato, la integrina $\alpha V\beta 5$ y varias glicoproteínas [17, 28].

IV. Secreción de varios factores de crecimiento

El EPR es un tejido que se considera metabólicamente muy activo, se sabe que es capaz de liberar gran cantidad de factores anti/angiogénicos, neurotróficos, citocinas y quimiocinas, cuya importancia en la conservación de las células de la retina está ampliamente demostrada [30].

Hasta el momento se ha identificado que el secretoma del EPR está constituido por: el factor derivado del epitelio pigmentario (PEDF), factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), factores de crecimiento fibroblástico (FGF-1, FGF-2 y FGF-5), factor de crecimiento transformante (TGF- β), factor de crecimiento 1 similar a la insulina (IGF-1), factor de crecimiento nervioso (NGF), factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF), factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado del epitelio de la lente (LEDGF), metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), metaloproteinasas de tejido (TIMP), factor de crecimiento de placenta (PIGF), somatostatina, eritropoyetina (Epo), y apolipoproteína A1 (Apo) [30].

De entre estos factores se consideran de particular relevancia al PEDF y al VEGF. El primero es secretado en la parte apical del EPR y mantiene un ambiente antiangiogénico en la retina [19], sirve además como factor neurotrófico para los fotorreceptores. Mientras que el VEGF es considerado un potente factor pro angiogénico y se secreta en la parte basal del EPR [19]. Existe un balance de concentraciones entre estos dos factores de crecimiento, que si se perturba, produce vascularización anormal de la retina.

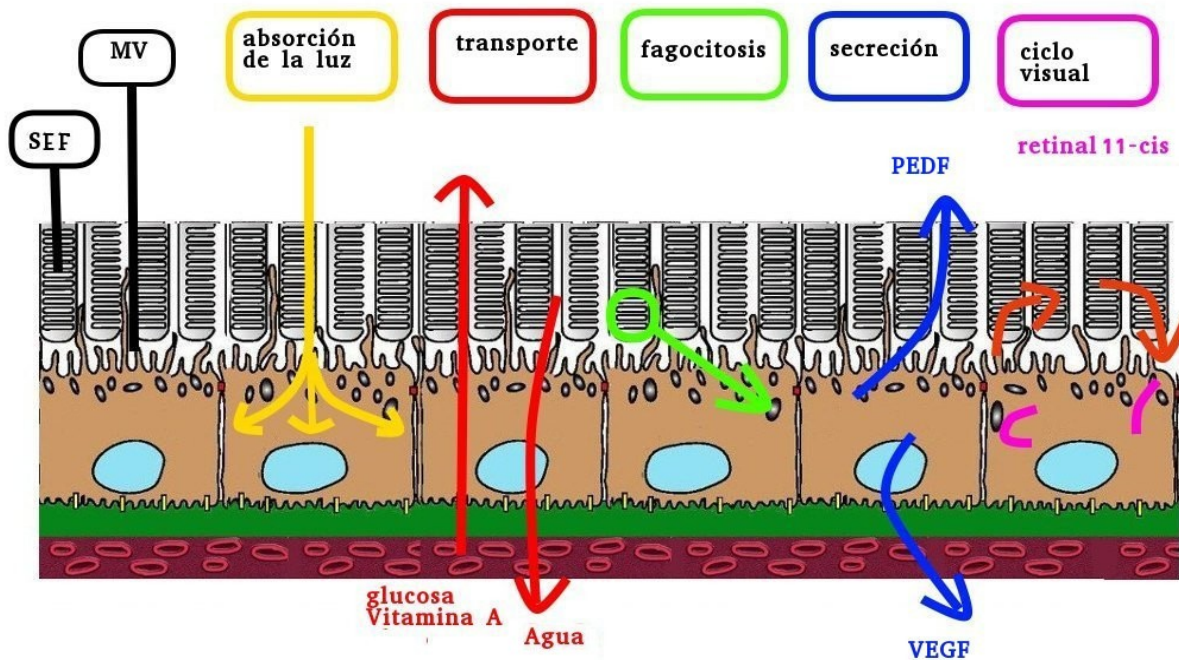


Figura 4. Esquema de las funciones del EPR. Microvellosidades (MV), segmentos externos de los fotorreceptores (SEF), PEDF (factor derivado del epitelio pigmentario) y VEGF (factor de crecimiento vascular endotelial). Modificado de Strauß, O. (2016) [31].

El estado homeostático de la retina depende en mucho de una buena condición tanto estructural como funcional del EPR. Alteraciones del EPR llevan a diversas enfermedades que causan ceguera. Tal es el caso de la degeneración macular relacionada con la edad, en

donde se afecta en forma negativa al EPR y como consecuencia la retina [32]; se piensa que un proceso similar podría generarse en otras patologías, incluyendo la RD.

La patogénesis de la RD es altamente compleja debido a la interrelación de múltiples mecanismos que desencadenan daño celular y respuestas de la retina. Clínicamente se clasifica a la retinopatía diabética en proliferativa (RDP) y no proliferativa (RDNP). La RDNP se caracteriza por microaneurismas (pequeñas protuberancias en los vasos sanguíneos de la retina que con frecuencia dejan escapar líquidos), hemorragias en la retina y algunas veces exudados duros. Ésta puede ser dividida en diversas etapas de progresión: leve, moderada y severa; si no se trata la etapa severa (también llamada pre proliferativa), puede finalizar en RDP, la cual se caracteriza por una neovascularización de la retina, lo que resulta en hemorragias vítreas y retinianas, así como el desprendimiento traccional de la retina y la subsecuente pérdida de la visión.

Las terapias implementadas para contrarrestar las consecuencias de la RD incluyen a la fotocoagulación y la inyección intraocular de inhibidores del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), sin embargo estas terapias tienen un efecto positivo únicamente en etapas tempranas de la enfermedad y no eliminan el riesgo de la pérdida de visión [2].

Adicionalmente a las alteraciones vasculares se han demostrado cambios en las neuronas de la retina y en el EPR. A través de la examinación *post mortem* de retinas de pacientes diabéticos se demostró una tasa alta de apoptosis y adelgazamiento en la capa de células ganglionares [1]. También la sobreexpresión de la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP) en las células de Müller, esta condición denominada gliosis puede llevar a la alteración del soporte neurotrófico para las células neuronales [1]. Por otro lado, en un modelo de diabetes inducida por estreptozotocina se reportó apoptosis de los fotorreceptores [33], así como modificaciones en el núcleo, el retículo endoplasmático y una distribución alterada de los melanosomas de las células del EPR [34].

El estrés oxidante se ha reconocido como un factor clave en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes. Además, el metabolismo del sorbitol, la vía de la hexosamina, la fosforilación oxidativa y la activación de la proteína cinasa C (PKC), son rutas metabólicas a través de las cuales la hiperglucemia podría generar un daño en los tejidos; todas las vías implican de alguna manera estrés oxidante [35].

El oxígeno es el segundo gas más abundante en la composición del aire, resulta indispensable para los organismos aerobios obligados y en su forma ozono (O_3) sirve como aislante de la radiación ultravioleta que llega a la atmósfera, permitiendo el desarrollo de formas de vida en la biósfera. A causa de sus características químicas el oxígeno es muy reactivo y se considera tóxico por su capacidad de formar radicales libres y especies oxidantes que no tienen electrones desapareados dentro de su estructura (y por lo tanto no son radicales libres), conocidas como especies reactivas de oxígeno (ERO). Tanto los radicales como las ERO tienen una reactividad mayor que el oxígeno mismo. Se considera ERO al dioxígeno (O_2), al ozono (O_3) y al superóxido ($O_2^{\bullet-}$), al peróxido de hidrógeno (H_2O_2), al radical hidróxilo ($\bullet OH$) y al hidroperóxido ($HO\bullet_2$), de los cuales el $HO\bullet_2$, el $O_2^{\bullet-}$ y el $\bullet OH$ son radicales libres [36].

El H_2O_2 tiene una estructura similar al agua, que lo hace de fácil difusión a través de las células. El H_2O_2 no interacciona con las proteínas ni con los ácidos nucleicos, su toxicidad se debe principalmente a que puede formar otras especies como producto de su reacción con metales de transición. Por ejemplo, el hierro puede reaccionar con el H_2O_2 y formar $\bullet OH$, éste a su vez genera modificaciones a las proteínas y al DNA [37].

La formación de ERO en las células es constante. Las fuentes intracelulares productoras de ERO más significativas incluyen a la cadena respiratoria mitocondrial, enzimas microsomales como el citocromo P450, las oxidasas de flavoproteínas y el metabolismo peroxisomal de los ácidos grasos.

En las células los posibles efectos citotóxicos de las ERO y de algunos radicales libres son controlados por una gran variedad de defensas antioxidantes, en las que se incluyen: 1) enzimas como la superóxido dismutasa, (SOD) 2) enzimas eliminadoras de hidroperóxido como la catalasa y la glutatión peroxidasa, 3) eliminadores hidrofílicos de radicales, como el ascorbato, urato y glutatión (GSH), 4) eliminadores lipofílicos de radicales como tocoferoles, flavonoides, carotenoides y ubiquinol y 5) sistemas de enzimas celulares que mantienen un ambiente reducido dependiente de NADH, NADPH y FADH (como la glucosa 6-fosfato deshidrogenasa) [37].

Bajo condiciones normales, el balance en ERO y antioxidantes sirve para mediar algunos eventos de señalización celular. Por ejemplo, el H_2O_2 activa la proteína reguladora de hierro 1, siendo el principal mediador en la homeostasis de hierro en las células de los mamíferos [36, 38]. Sin embargo, el equilibrio redox celular puede verse afectado. Ya sea por el incremento en la producción de ERO o por una disminución o el agotamiento de las reservas de antioxidantes. A este estado irreversible de desestabilización celular se le conoce como estrés oxidante [37].

Mantener a la célula en condiciones de estrés oxidante puede resultar en el daño de los tejidos. Las ERO pueden reaccionar y modificar la estructura y función de biomoléculas. Estas alteraciones pueden llevar a muerte celular apoptótica, la cual es un mecanismo intrínseco de cada célula y que se asocia a algunas enfermedades neurodegenerativas en las cuales se ha implicado el estrés oxidante [38].

Elucidar si la hiperglucemia causa estrés oxidante es entonces primordial para entender los mecanismos que causan la RD y generar estrategias terapéuticas que eviten la progresión del daño en la retina durante la enfermedad.

Antecedentes directos

La RD se ha caracterizado en general como una enfermedad vascular, debido a las alteraciones en la barrera hematorretiniana interna (BHI), conformada por la vasculatura

intrarretiniana. Por medio de inmunohistoquímica se observó la presencia de albúmina en la retina interna, lo que sugiere un aumento en la permeabilidad de las células endoteliales de los vasos de la retina [39]. Además, diversos estudios reportan que en células endoteliales aisladas tanto del cordón umbilical (HUVEC) como de la arteria coronaria de humano (HCAECs), tratadas con altas concentraciones de glucosa, se genera un estrés oxidativo que lleva a la muerte por apoptosis de las mismas [40-42].

El EPR, en cambio, como parte de la BHE ha recibido poca atención bajo condiciones de hiperglucemia. En dichas condiciones se comprobó el hinchamiento de algunos organelos del EPR [34], adicionalmente se vio disminuida la expresión de la proteína RPE-65, lo que podría promover una alteración para el abasto de 11-*cis*-retinal a los fotorreceptores [43] y también se observó que el EPR aumenta la secreción de factores angiogénicos e inflamatorios [30]. Además, está reportado en estudios *in vitro* que el estrés oxidante ocasionado por peróxido de hidrógeno, puede afectar las uniones intercelulares del EPR [44]. Así mismo, estresores externos como el extracto de humo de tabaco causa en células del EPR la disminución de su viabilidad [45].

Se ha sugerido un posible estrés oxidante en condiciones de hiperglucemia, pero se desconoce si es causa o efecto de la enfermedad [35] y el papel que desempeña el EPR en la relación hiperglucemia-estrés oxidante.

Como se mencionó, el EPR es importante para la función de la retina. El daño a este epitelio, causado por humo de tabaco y otros agentes oxidantes demuestran su sensibilidad al estrés oxidante. Por lo tanto, existe la necesidad de conocer los mecanismos moleculares presentes en estas células bajo altas concentraciones de glucosa, ya que los cambios observados en este tejido podrían ser causa de las alteraciones observadas en la retina neural.

Debido al difícil acceso *in vivo* al tejido por su localización en la parte posterior del ojo, así como al número limitado de células, trabajos *in vitro* representan un buen modelo de estudio.

Hipótesis

Las altas concentraciones de glucosa alteran la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) y la viabilidad del EPR.

Objetivo general

Investigar si la exposición de células del EPR de la rata en cultivo, a una concentración alta de glucosa durante periodos cortos de tiempo, causan estrés oxidativo y determinar si bajo esta condición se presenta muerte celular.

Objetivos particulares

- Determinar los niveles basales de producción de ERO en células de EPR en cultivo.
- Determinar si la glucosa 30mM causa un aumento en los niveles de ERO en células de EPR en cultivo.
- Determinar la viabilidad de células del EPR incubadas en presencia de una alta concentración de glucosa.
- Observar si un compuesto antioxidante (resveratrol) protege a las células del EPR del efecto de la alta concentración de glucosa.

Métodos

Cultivo primario de células de epitelio pigmentario de la retina (EPR)

Se utilizaron ratas Long Evans de siete días postnatales. Los animales fueron sacrificados por decapitación, se extrajeron los ojos, éstos se limpiaron de tejido conjuntivo, sumergieron en etanol al 70% y pasaron a solución salina de Hank (HBSS, sigma H1641) adicionado con: 40mM de bicarbonato de sodio, 1% anfotericina B y 1% de penicilina. Se realizó un corte a nivel ecuatorial y se eliminó la parte anterior del ojo, incluyendo las retinas y se recuperaron las copas ópticas.

Las copas ópticas (de ocho animales) se enjuagaron tres veces con solución salina de Hank libre de calcio y magnesio (HBSS-CMF; sigma H4641) suplementado con: 40 mM de bicarbonato de sodio, 1% anfotericina B y 1% de penicilina. Se eliminaron restos de tejido retiniano. Posteriormente las copas ópticas se incubaron durante 4 minutos en HBSS-CMF con 0.1% de proteinasa K (sigma P-6556). Al término de la incubación, el tejido se centrifugó (1000rpm, durante 5 minutos) y se reemplazó el sobrenadante por 3 ml de medio de cultivo (MC, medio TC-199, sigma M0650), adicionado con 10% de suero fetal bovino (Gibco-SFB-Ref: 16000-044), 40mM de bicarbonato de sodio, 1% de penicilina, 1% anfotericina B y 1% L-glutamina y 40U de DNAsa. Las células del EPR se disociaron mecánicamente pasando las copas ópticas a través de una pipeta Pasteur de vidrio (15 veces), se eliminaron las escleróticas y el sobrenadante que contiene a las células del EPR se centrifugó (1000rpm, durante 5 minutos); el pellet obtenido se disoció en 3ml de MC. Las células se contaron en una cámara de Neubauer y se sembraron en cajas de 24 pozos a una densidad de 80 000 células/pozo, o bien sobre cubreobjetos de vidrio (12 mm de diámetro). Todo el procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones de estricta esterilidad y con el material previamente siliconizado (con un recubrimiento de organopolisiloxano que torna a la superficie hidrófoba, evitando la adsorción de las proteínas).

Las células se mantuvieron a 37°C en una incubadora con atmósfera húmeda que contiene 95% de aire y 5% CO₂. Se cambió el medio cada tercer día. Las células se utilizaron entre los 12-15 días de cultivo, tiempo en el cual alcanzaron la confluencia (80%) y presentan una morfología de tipo epitelial y contienen pigmento.

Inmunocitoquímica para la proteína de 65 kD específica del epitelio pigmentario de la retina (RPE-65)

Células cultivadas en portaobjetos de vidrio, se fijaron con paraformaldehído y sacarosa al 4 % durante 5 minutos, se enjuagaron con PBS tres veces. Las células fueron permeabilizadas con saponina al 4 % durante 7 minutos. Posteriormente se bloqueó con buffer de fosfatos y albúmina al 1 % durante tres horas. Posteriormente se adicionaron 250 µl de anti RPE-65 (1:250) (Chemicon, MAB5428) y se dejó toda la noche. Al siguiente día, las células se enjuagaron por 8 minutos tres veces con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón (cy3 1:500, AP-182C Chemicon) durante dos horas. Los portaobjetos con las células se montaron con una gota de glicerol al 79 % y se observaron en un microscopio de epifluorescencia.

Incubación con alta concentración de glucosa

Las células en confluencia (12-15 días cultivo) se transfirieron a un medio normal fresco o con una elevada concentración de glucosa (30 mM) y se incubaron por 48 horas.

En algunos experimentos, los cultivos se adicionaron con resveratrol a una concentración de 50 µg/ml.

Cuantificación de la producción intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Las células incubadas en medio normal o con una alta concentración de glucosa, se trataron con diacetato de diclorodihidrofluoreceína (sigma D-6883) [5 µl/ml de medio] (ver apéndice). Treinta minutos después se retiró el medio y se eliminó el exceso de reactivo lavando tres veces con PBS durante cinco minutos. Las células se montaron con una gota

de PBS, y se observaron en el microscopio de epifluorescencia (Nikon alphaphot). Se tomaron fotografías con una cámara Nikon digital Dxm 1200. La intensidad de la fluorescencia se determinó con el programa de dominio público Image J.

Como control positivo de la producción de estrés oxidante, se añadieron al cultivo 50 μ l de peróxido de hidrógeno/ml de medio, a una concentración final de 0.05 mM y se incubaron por 30 minutos.

Determinación de la viabilidad celular por medio del ensayo MTT

Las células (5×10^4) fueron cultivadas en cajas de 96 pozos, al término de los distintos tratamientos, se añadieron a cada pozo 5 μ g/ml de MTT [Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol] (sigma, M-2128). Después de 3 horas se retiró el medio de cultivo y se lavó con medio normal. A cada pozo 200 μ l de dimetil sulfóxido (DMSO), se mantuvo en agitación durante cinco minutos y posteriormente se leyó la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Los resultados se expresaron en porcentaje de viabilidad respecto al control.

Ensayo de viabilidad celular a través la actividad de la enzima deshidrogenasa láctica (DHL)

Las células (8×10^4) se cultivaron en cajas de 24 pozos en las mismas condiciones descritas anteriormente; al término de los tratamientos el medio de cultivo se retiró, se centrifugó (17000 g durante cinco minutos) y la actividad enzimática de la deshidrogenasa láctica (DHL) se midió en el sobrenadante. Por otro lado las células se lavaron con buffer de fosfatos 0.05 M (K_2HPO_4 , 40mM; KH_2PO_4 , 10mM), se homogenizaron en 100 μ l de éste buffer y se determinó la actividad de la DHL.

La actividad de la DHL se determinó en un buffer de fosfatos 0.05 M que contiene piruvato 0.3 mM, NADH 170 μ M, Tritón al 0.005 % y 10 μ l de la muestra (células o medio de cultivo), y se midió la absorbancia a 340 nm a 30 °C durante diez minutos. Como control positivo se

utilizó DHL purificada. La actividad enzimática se presenta como unidades/mg de proteína, en donde una unidad equivale a un 1 μmol del sustrato reducido (piruvato a lactato)/min.

Cuantificación de proteína

La proteína total se cuantificó utilizando un *Kit* basado en el método de Lowry [46], usando como estándar albúmina de suero bovino.

Ensayo de viabilidad celular por exclusión de células teñidas con yoduro de propidio

Otra forma de conocer la viabilidad de las células es observar el estado de su membrana. Las células vivas y funcionales tienen la membrana íntegra, lo que le permite tener selectividad en el transporte de solutos. En cambio, las células con algún daño, no regulan el intercambio de sustancias a través de su membrana.

Concluidos los tratamientos con una alta concentración de glucosa, se reemplazó el medio de cultivo por PBS conteniendo 10 μM de yoduro de propidio (IP) (sigma P4170). Después de 10 minutos el colorante se retiró y se realizaron dos lavados con PBS. Posteriormente las células se fijaron colocando paraformaldehído más sacarosa al 4% durante ocho minutos y se llevaron a cabo tres lavados con PBS. Se colocó en cada pozo 50 μl DAPI (4', 6-Diamidino- 2 -fenilindol dihidrocloruro; Sigma D8417), se eliminó el exceso de DAPI y los cubre objetos se montaron con una gota de glicerol al 79 % y se observaron al microscopio de epifluorescencia. La muerte celular se reporta como número de núcleos teñidos con el yoduro de propidio / total de núcleos.

Como control, se añadieron al cultivo 50 μl de peróxido de hidrógeno/ml de medio, a una concentración final de 0.05mM, durante 30 minutos.

Análisis estadístico Los resultados se analizaron con la prueba ANOVA de una vía seguida de Tukey, utilizando el programa Graphpad Prism 6. El valor de una $p \leq 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

Resultados

Caracterización del cultivo primario de epitelio pigmentario de la retina de la rata

En nuestra condición de incubación, las células muestran una forma fibroblástica durante los primeros ocho días posteriores al cultivo. A partir del día nueve de cultivo, algunas de las células adquieren forma epitelial y presentan pigmento. A los quince días, cuando alcanzan la confluencia, la mayoría de las células adquieren una morfología epitelioide y mayor pigmentación (Fig. 5).

Con la finalidad de determinar la pureza del cultivo celular, se determinó por inmunocitoquímica la presencia de la proteína RPE-65 (proteína de 65 kD específica del epitelio pigmentario de la retina). La inmunoreactividad positiva de RPE-65 en el citoplasma (Fig. 6A-C) se observó en aproximadamente el 90% de las células, indicando la pureza en el cultivo.

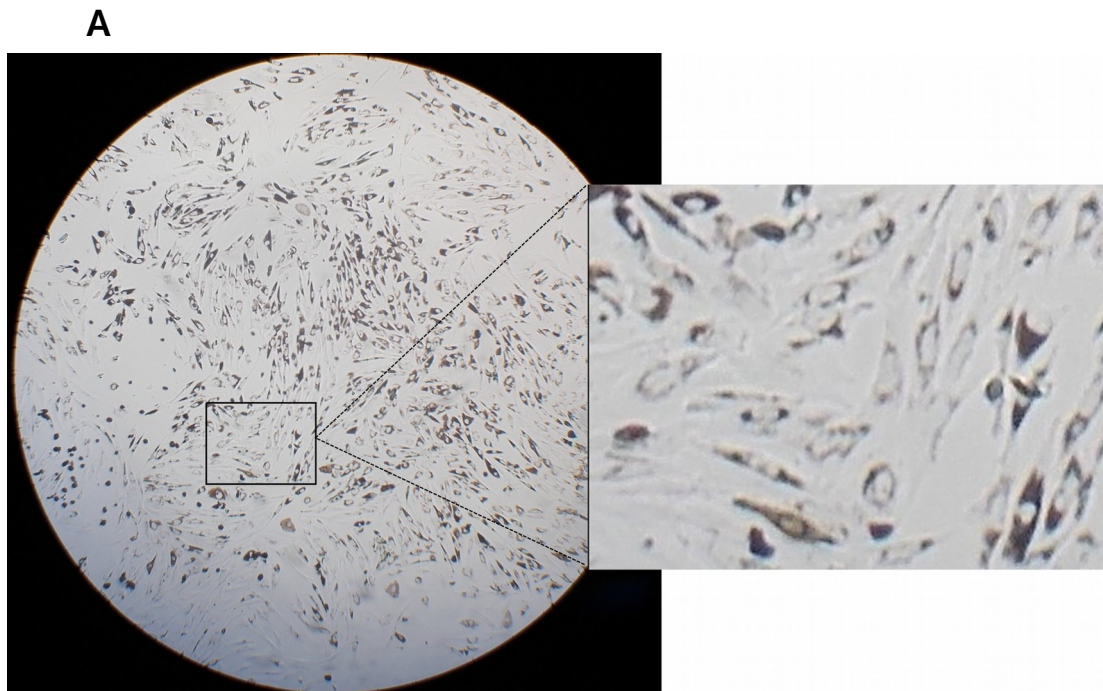


Figura 5. Cultivo primario de EPR de la rata. Se muestra una imagen representativa de células del de EPR a los 12 días de cultivo. Se observan células con diferente morfología y

cantidad de pigmento. La imagen se tomó con un objetivo de 10x. La imagen de la derecha es la amplificación de una zona.

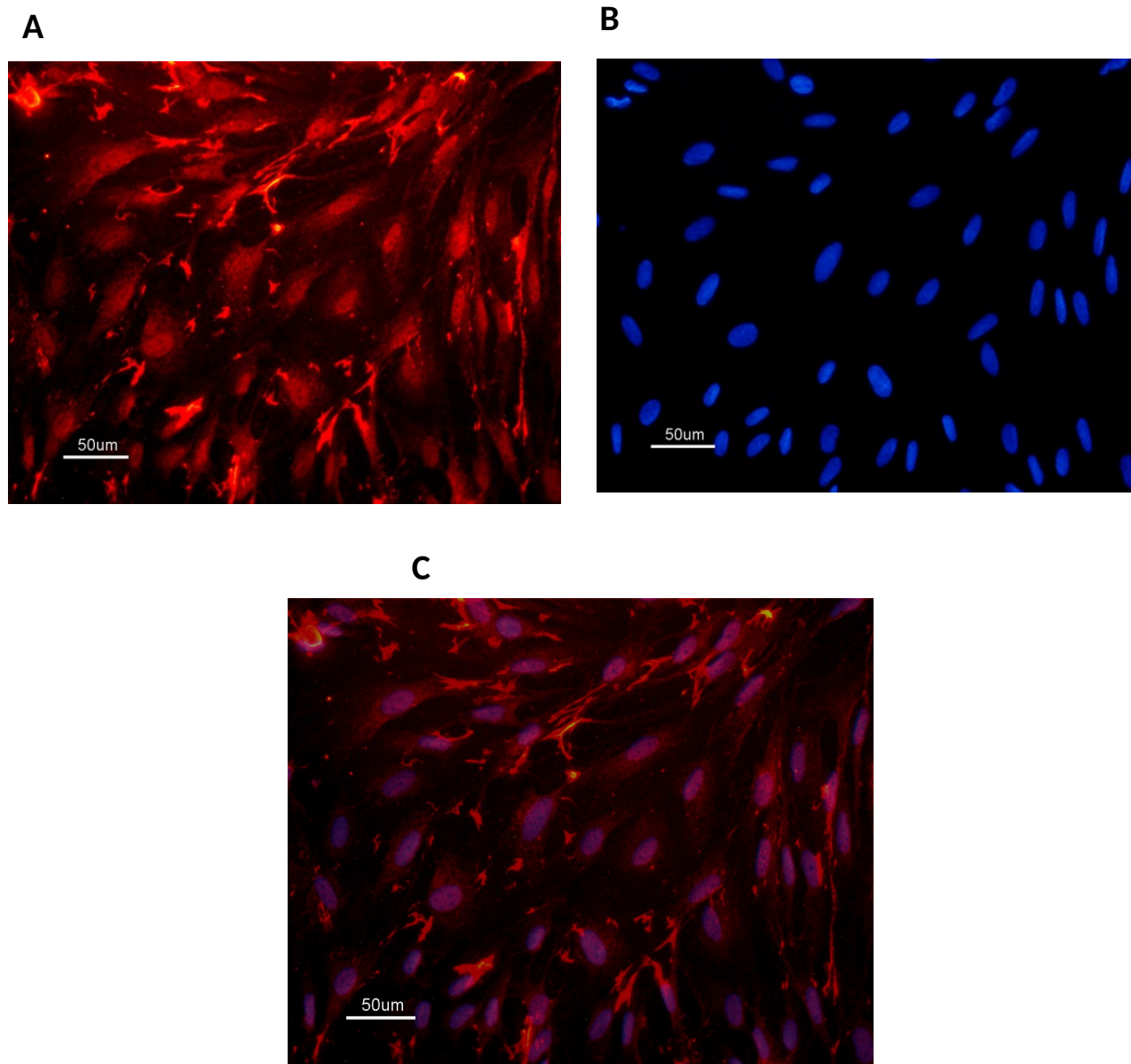


Figura 6. Inmunolocalización de RPE65 en el cultivo primario de células del EPR. **A**, en rojo se muestra la inmunoreactividad positiva a RPE-65. **B**, en azul se observa la tinción con DAPI. **C**, empalme de A y B.

Efecto de la alta concentración de glucosa en la producción de especies reactivas de oxígeno

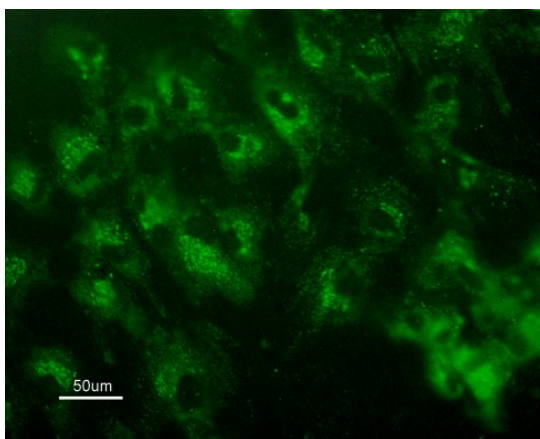
El efecto de la alta concentración de glucosa sobre la producción de ERO se analizó con el uso de DCFH₂-DA (ver apéndice). Como control positivo de la producción de ERO en las células del EPR, se utilizó peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La adición de 0.05mM de H₂O₂ durante 30 minutos, causó una intensa fluorescencia debida a la oxidación del DCFH₂-DA [55] (Fig. 7A).

Las células incubadas con 5 mM de glucosa, presentaron una baja fluorescencia durante los tiempos estudiados (6-48 horas) (Fig. 7B). La presencia de la alta concentración de glucosa (30 mM) causó un aumento significativo en la producción de ERO (Fig. 7D-F) a partir de las 12 horas y se mantuvo constante hasta las 48 horas de incubación. Como se observa en la figura 8, la producción de ERO fue de dos a tres veces mayor que la observada en el control.

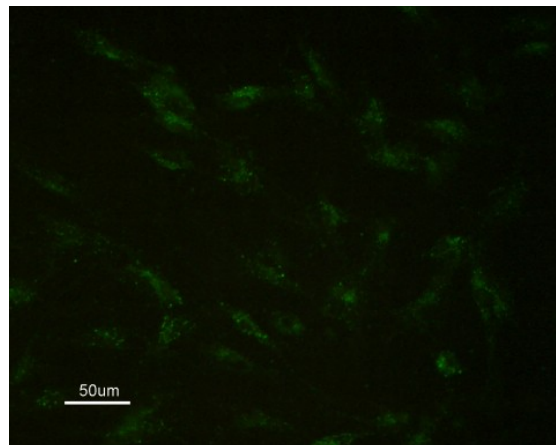
Este resultado indica que la presencia de una alta concentración de glucosa en el medio de cultivo de las células del EPR, coincide con el aumento en sus niveles de ERO. Las ERO generadas por el EPR, alcanzan un valor umbral en el cual se mantienen. Esto se retomará en la discusión.

Glucosa 5mM

A

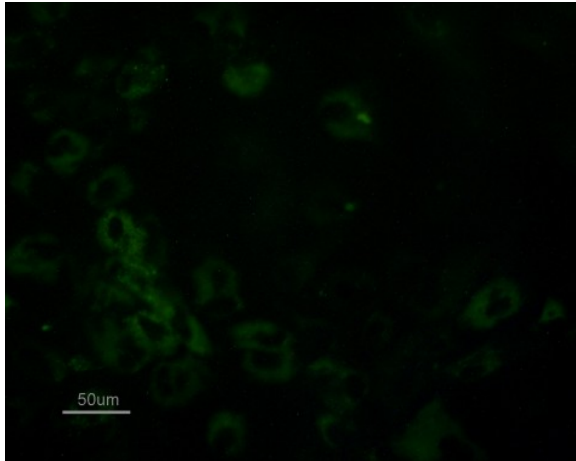


B

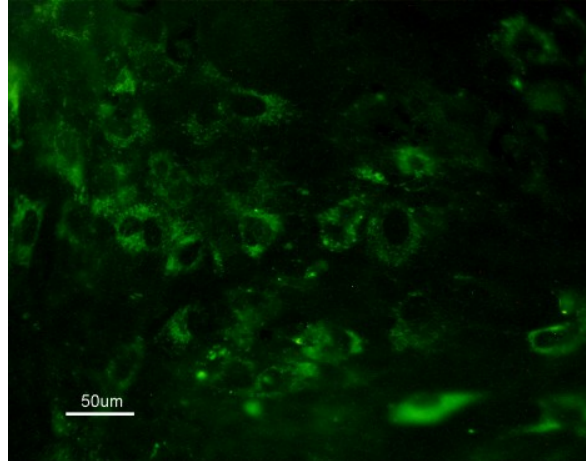


Glucosa 30mM

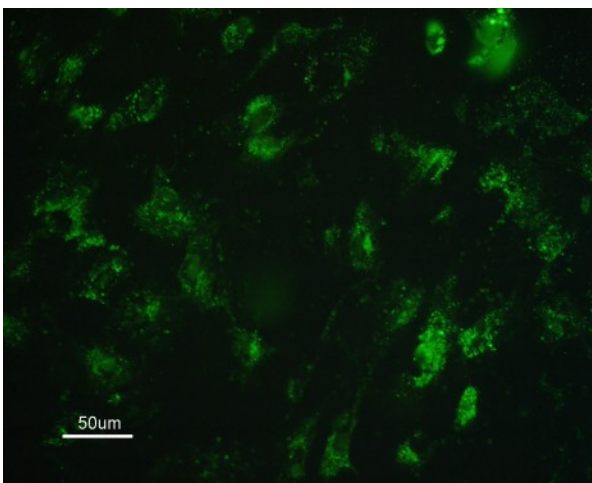
C



D



E



F

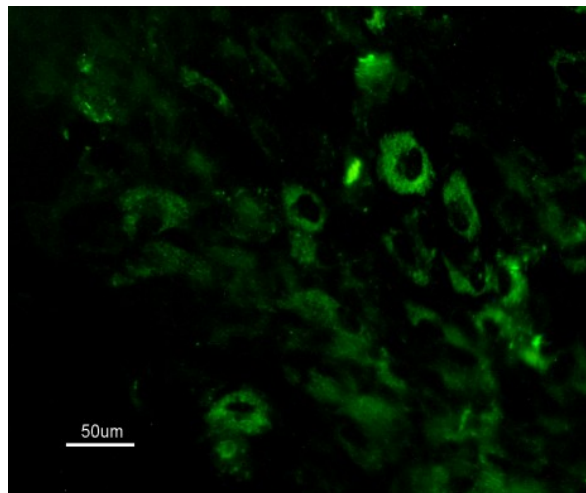


Figura 7. Producción de ERO en células del EPR. **A**, control positivo (30 minutos con glucosa 5 mM + 0.05 mM de H_2O_2). **B**, células en presencia de 5 mM de glucosa (48 h). **C-F**, células incubadas con 30 mM de glucosa, durante periodos de tiempo (t) diferentes (**C**, 6 h. **D**, 12 h. **E**, 24 h y **F**, 48 h).

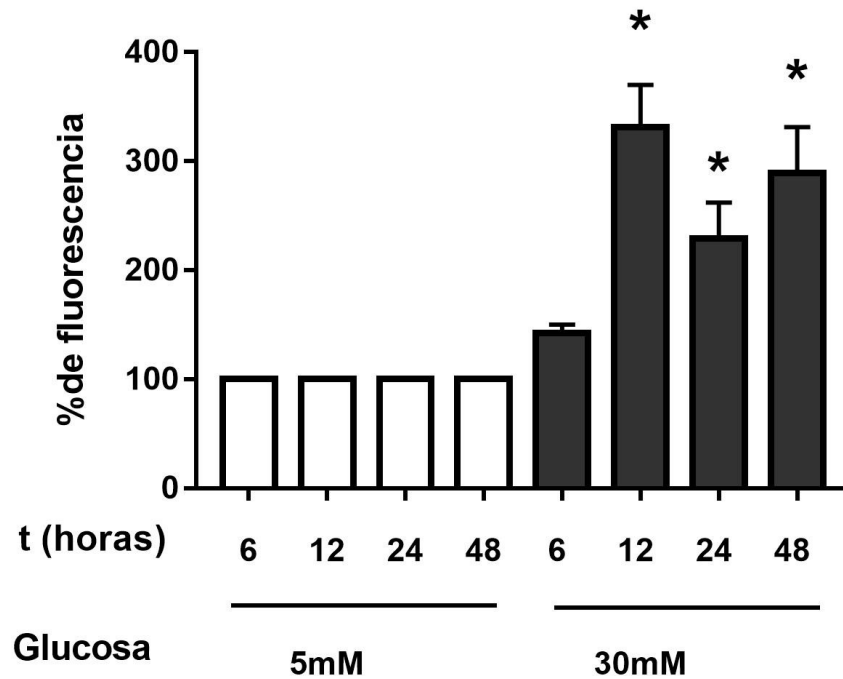


Figura 8. Cuantificación de la producción de ERO en células de EPR. Las células se incubaron durante periodos de tiempo (t) diferentes, en presencia de 5 mM o 30 mM de glucosa. * $P < 0.05$ respecto al control. Los datos son el promedio \pm el error estándar de tres experimentos diferentes, realizados por triplicado.

Efecto de la alta concentración de glucosa en la viabilidad celular del EPR

Con el fin de determinar si la alta concentración de glucosa causó daño en las células del EPR en cultivo, se analizó la viabilidad celular con el ensayo de MTT. Simultáneamente, se determinó la viabilidad incubando el cultivo con resveratrol, debido a su propiedad antioxidante. Esto con el objetivo de detectar una correspondencia entre la elevada producción de ERO y, si existiera, la alteración en la viabilidad. Como se observa en la figura 9, la viabilidad celular no se modificó cuando las células se incubaron con 30 mM de

glucosa a ninguno de los tiempos estudiados. De la misma forma, la adición de resveratrol (50 μ M) al medio de cultivo en presencia de 5 o 30 mM de glucosa, no afectó la viabilidad celular (Fig. 10).

Este resultado muestra que la elevada concentración de glucosa no modifica de forma alguna la actividad mitocondrial de las células del EPR.

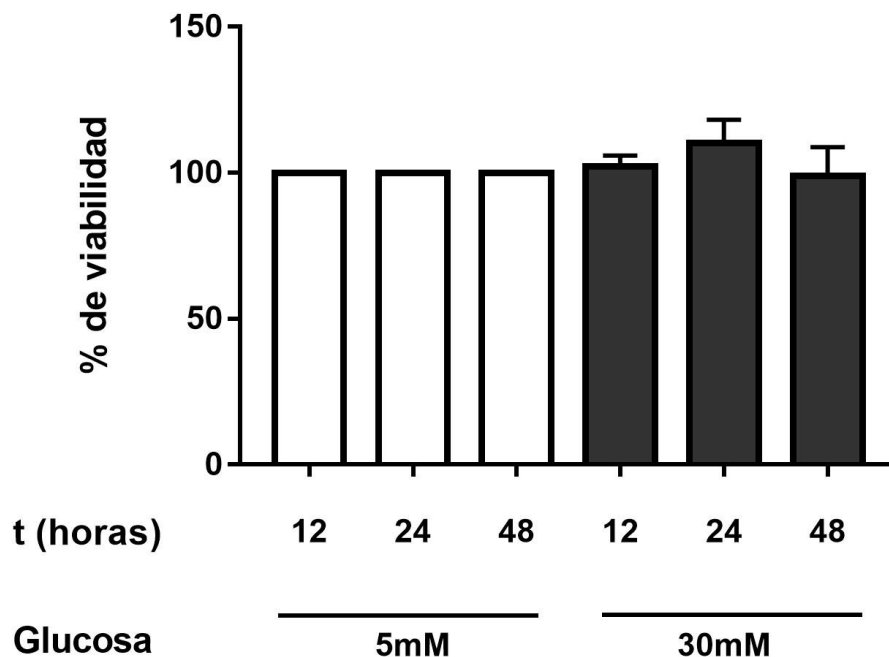


Figura 9. Efecto de la alta concentración de glucosa en la viabilidad de las células del EPR. Las células se incubaron en presencia de 5 o 30 mM de glucosa por distintos periodos de tiempo (t). Al finalizar éstos, se determinó la viabilidad por el ensayo MTT, como se describió en los métodos. Los valores son el promedio \pm el error estándar de cuatro experimentos llevados a cabo por triplicado.

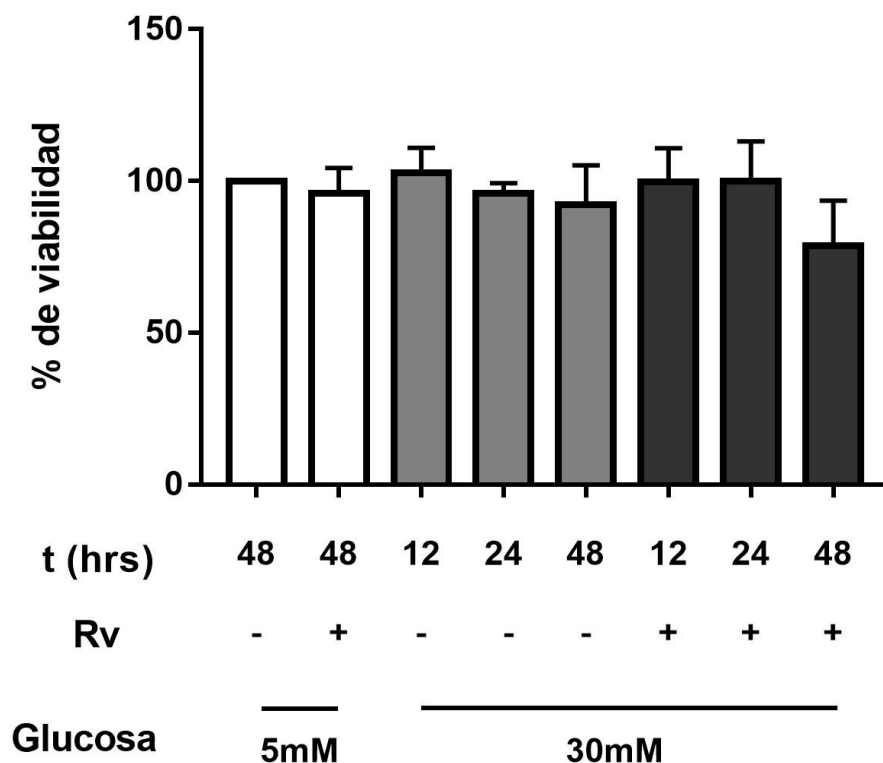


Figura 10. Efecto del resveratrol sobre la viabilidad de células del EPR en cultivo. Rv+ = resveratrol (50 µg/ml). t = tiempo en horas. Los datos representan el promedio ± el error estándar de tres experimentos por triplicado.

Efecto de la alta concentración de glucosa en la liberación de deshidrogenasa láctica (DHL)

La toxicidad de la alta concentración de glucosa se analizó por la actividad de la DHL en el medio de cultivo. Las células incubadas con 5 mM de glucosa presentaron una actividad de DHL de 2 ± 1 U/mg de proteína, por su parte las células incubadas con 30 mM de glucosa presentaron una actividad de 3 ± 1 U/mg de proteína (Fig. 11). De igual manera, la actividad de DHL en el medio de cultivo fue similar cuando las células se incubaron con 5 o 30 mM de glucosa (Fig. 12). No obstante, la actividad de la DHL en las células es aproximadamente 10 veces mayor que la observada en el medio de cultivo.

Esto indica que la elevada concentración de glucosa no resulta tóxica para las células del EPR, durante tiempos cortos de incubación. La LDH no se está liberando. Las células son viables después de la exposición a glucosa 30 mM.

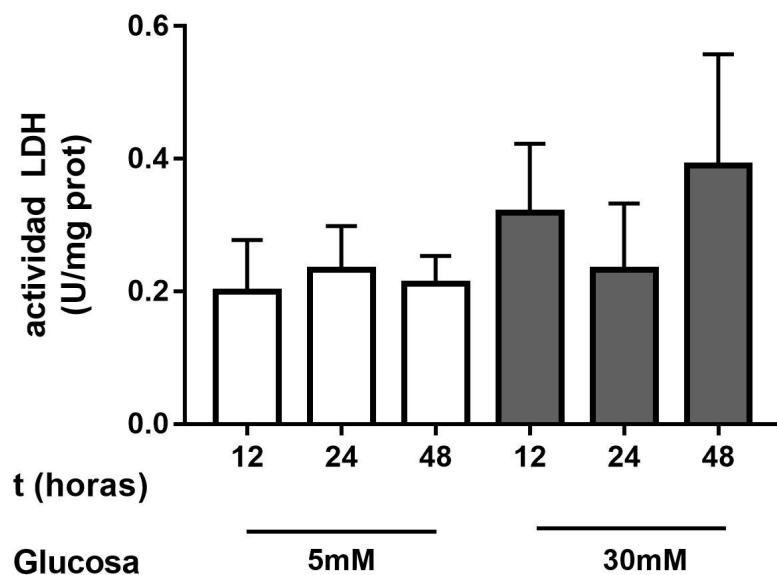


Figura 11. Actividad de la DHL dentro de las células, en condiciones control y de exposición a una elevada concentración de glucosa durante periodos de tiempo (t) diferentes. Los valores son el promedio \pm el error estándar de tres experimentos llevados a cabo por cuadruplicado. Una U de enzima reduce 1 μ mol del piruvato a lactato/min.

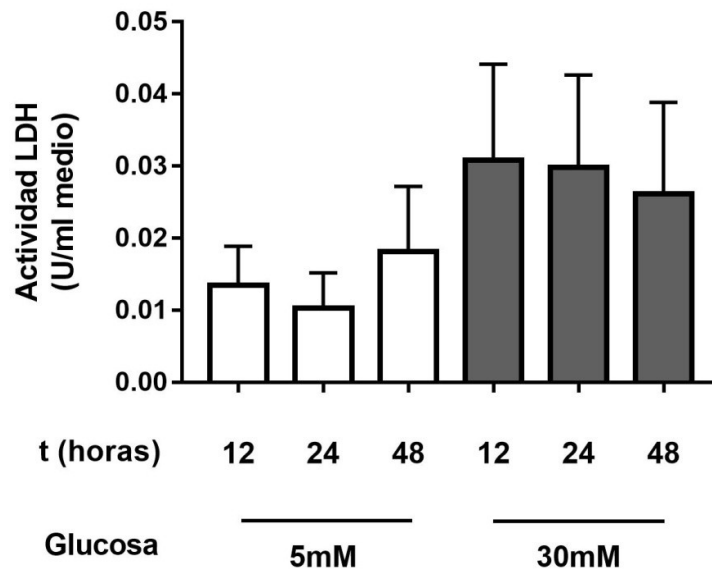


Figura 12. Actividad de la DHL en el medio de cultivo. La actividad enzimática de la DHL se determinó en el medio de cultivo de las células en presencia de concentraciones normales (5 mM) y de una alta concentración de glucosa (30 mM), durante periodos de tiempo (t) distintos. Los valores son el promedio \pm el error estándar de tres experimentos llevados a cabo por cuadruplicado. Una U de enzima reduce 1 μ mol del piruvato a lactato/min.

Tinción con yoduro de propidio

La tinción con yoduro de propidio (IP) reveló que la exposición de células del EPR a la elevada concentración de glucosa (30 mM) durante 48 horas no modifica la viabilidad celular. Por el contrario, la adición de H₂O₂ causó en 30 minutos de incubación, un aumento significativo del 15% en el número de núcleos teñidos con IP (Fig. 13 - 16).

El resultado revela que la integridad de la membrana plasmática no se ve comprometida cuando las células del EPR se exponen a glucosa 30 mM, durante 48 horas. Lo cual sugiere, que no hay muerte celular.

Glucosa 5mM

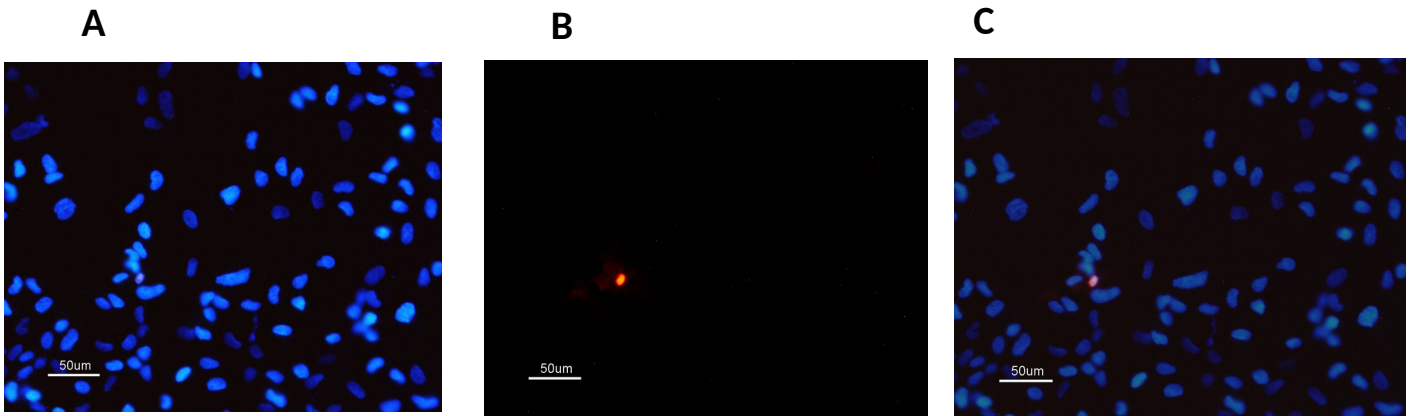


Figura 13. Se muestran imágenes de la tinción con IP de las células del EPR, después de su exposición a 5 mM de glucosa durante 48 horas. **A**, en azul tinción con DAPI. **B**, en rojo tinción con ioduro de propidio. **C**, superposición de A y B.

Glucosa 30mM

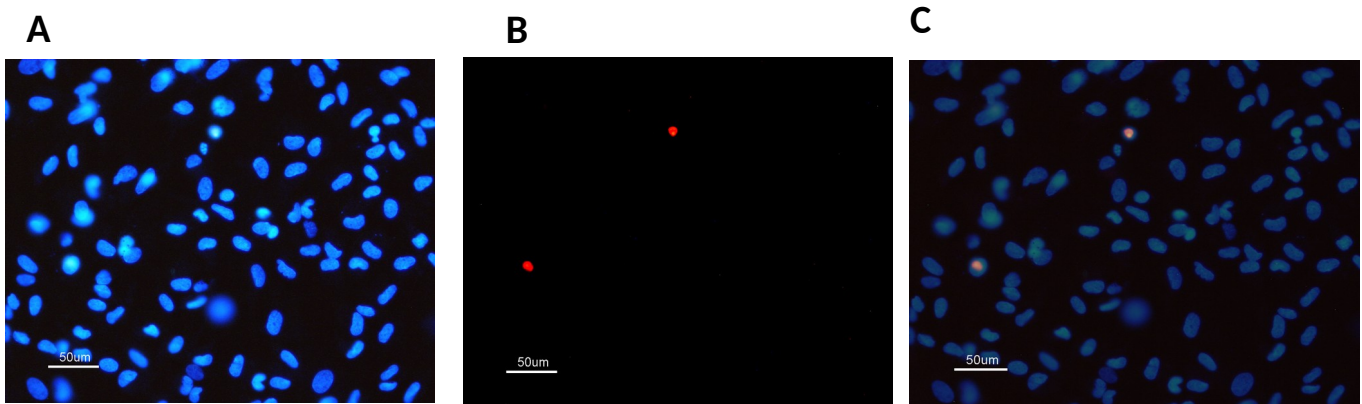


Figura 14. Se muestran imágenes de la tinción con IP de las células del EPR, previamente a expuestas a 30 mM de glucosa durante 48 horas. **A**, en azul tinción con DAPI. **B**, en rojo tinción con ioduro de propidio. **C**, superposición de A y B.

H₂O₂ 0.05mM

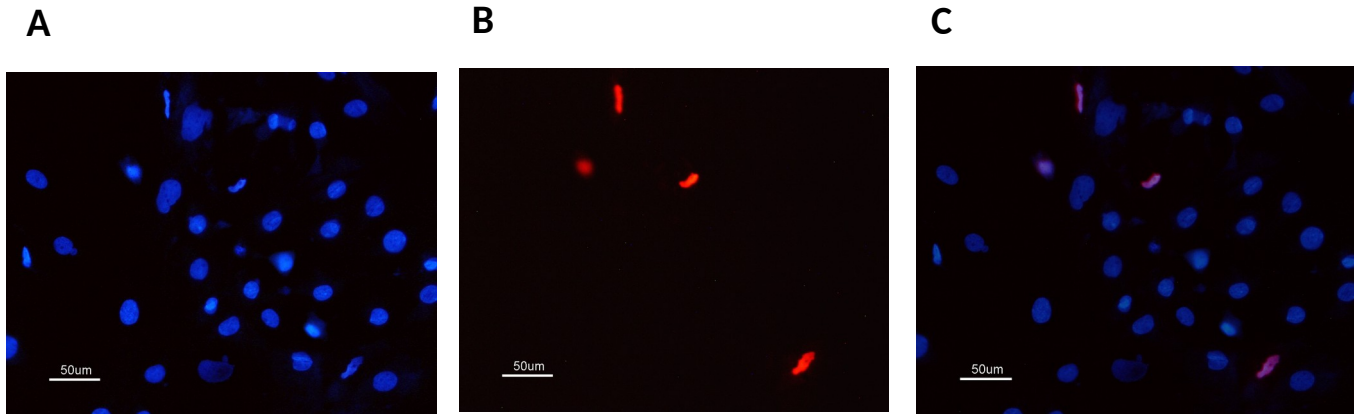


Figura 15. Se muestran imágenes de la tinción con IP de las células del EPR, después de ser expuestas a peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por 30 minutos. **A**, en azul tinción con DAPI. **B**, en tinción con ioduro de propidio. **C**, superposición de A y B.

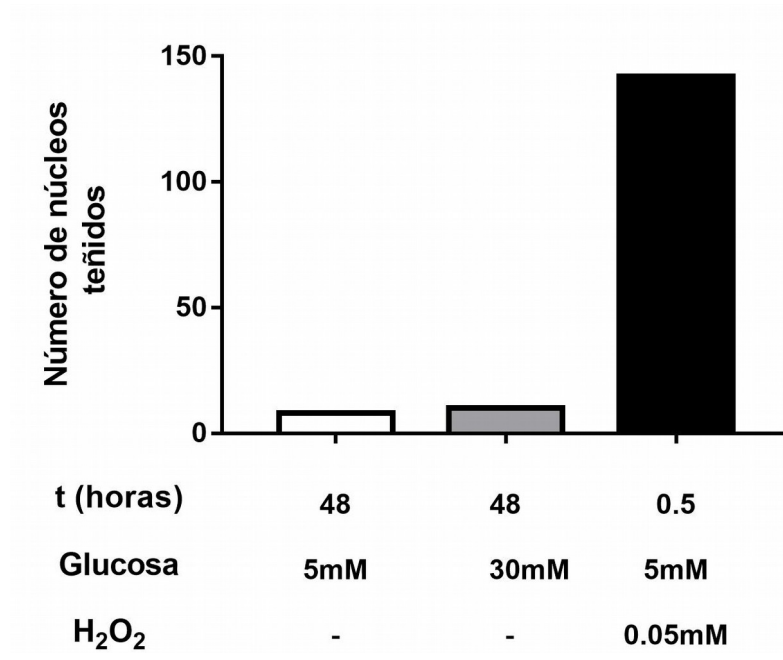


Figura 16. Cuantificación de las células teñidas con IP. En cada condición se contaron 1000 células (identificadas con DAPI). Los datos son el resultado de un experimento llevado a cabo por cuadruplicado.

Discusión

La diabetes es una enfermedad cuyas complicaciones afectan diferentes tejidos, entre estos a la retina, a este padecimiento se le conoce como retinopatía diabética y en su grado de afectación más alto puede llevar a la ceguera de quien la padece. La hipótesis más apoyada propone que la hiperglucemia (altas concentraciones de glucosa en sangre) desencadena un estrés oxidante y éste a su vez, promueve alteraciones en la retina [36], pero no se conoce con precisión el mecanismo por el que ocurre ni los tipos celulares de este tejido que se ven afectados.

El EPR es la capa no neural de la retina y está localizado entre la coroides y los fotorreceptores de la retina propiamente dicha, es importante para la homeostasis de la retina neural por sus características estructurales y funcionales dentro de las cuales se encuentran: el transporte de nutrientes y secreción de factores de crecimiento hacia la retina, restauración del pigmento visual, renovación de los discos de los segmentos externos de los fotorreceptores y la remoción de algunos desechos metabólicos de la retina [11, 47]. Se ha visto que el daño en el EPR subyace de manera importante en varias afectaciones visuales, por ejemplo en la degeneración macular relacionada con la edad [32]. Sin embargo, no se tiene evidencias que apoyen un daño similar de este epitelio durante la diabetes.

Utilizar cultivos celulares constituye una herramienta favorable porque adicional a contar con un tipo celular específico, el sistema permite un conocimiento y control preciso de las variables experimentales, de entre las cuales se puede destacar la concentración de distintos compuestos y el tiempo de exposición a los mismos. En el caso de las células del EPR, su cultivo representa una notable ventaja debido al difícil acceso y baja disponibilidad de tejido.

Aprovechando estas características se estudió el efecto de una concentración alta de glucosa (30 mM) en la producción de ERO y en la viabilidad celular en cultivos primarios del EPR de la rata, como un modelo para conocer los efectos de la hiperglucemia en este tejido.

De manera normal las células producen ERO continuamente como productos secundarios de la respiración y del metabolismo oxidativo. De igual forma las células contienen una variedad de

moléculas antioxidantes con lo que se genera un equilibrio dinámico. El concepto de estrés oxidante se introdujo en 1985 [37]. Se emplea para describir una condición alterada en el sistema redox celular, el cual podría generar un daño irreversible en las células, aunque existe una tendencia errónea a llamar estrés oxidante al aumento de ERO [48].

Los mecanismos por los cuales las altas concentraciones de glucosa producen un aumento de ERO, requieren ser estudiados. En este sentido, diferentes vías se han asociado al aumento de ERO inducidas por hiperglucemia en otros tejidos, incluido el metabolismo del sorbitol, la activación de la proteína cinasa C (PKC) y la fosforilación oxidativa [35], se ha postulado que el superóxido producido por la actividad mitocondrial es el factor que vincula a algunas de estas vías.

Nuestros estudios demostraron que la alta concentración de glucosa (30 mM) incrementó de 2-3 veces los niveles de ERO producidos, comparados con los niveles de ERO generados en células incubadas con glucosa 5 mM. Este resultado es semejante a lo reportado por otros autores, quienes reportaron la aparición de estrés oxidante en cultivo de células de EPR de humano, por la exposición con 40 mM de glucosa durante 5 días [49] o 5 semanas [50]. El aumento en ERO indica una disminución en la capacidad antioxidante de las células del EPR y sugiere la ocurrencia de estrés oxidante o un desbalance del estado redox de estas células. Resulta interesante que los niveles de ERO se mantuvieron constantes entre las 12 y 48 horas, lo que sugiere un cierto mecanismo regulador del estado redox.

De lo anterior nos cuestionamos si esta disminución en la capacidad antioxidante puede llevar a la pérdida de viabilidad.

La viabilidad celular analizada por el método del MTT, demostró que la exposición a la alta concentración de glucosa no afectó la viabilidad de células del EPR en ninguno de los tiempos estudiados (Fig. 9). Debido a que el ensayo de viabilidad por MTT se basa en la actividad de las deshidrogenasas mitocondriales, nuestros resultados indican que la producción de ERO no está asociada a alteraciones en la actividad mitocondrial. En oposición a nuestros resultados, otros estudios demostraron que las altas concentraciones de glucosa disminuyen el potencial mitocondrial en células endoteliales de la retina de rata [51], sin indicar si la viabilidad de las células se modificó.

Tanto las células endoteliales como las pigmentarias forman parte de la barrera hematorretiniana (barrera interna y externa respectivamente). La respuesta discrepante de ambos tipos celulares al mismo estímulo (glucosa alta), posiblemente radica en que las células del EPR son más resistentes por sus funciones y el microambiente altamente oxigenado en el que se encuentran.

Varios estudios *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que el resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxi-trans-estilbeno) tiene propiedades antioxidantes. Éste es un fenol natural que se encuentra en frutos como la manzana y la uva. Se considera que su efecto antioxidante se debe a la activación del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2), el cual activa la transcripción de una variedad de enzimas antioxidantes. En nuestras condiciones el resveratrol no afectó la viabilidad de las células del EPR incubadas con concentración alta (30 mM) o baja (5 mM) de glucosa; aunque sólo se empleó una concentración de resveratrol, ésta se ha demostrado tener efectos antioxidantes en otros sistemas [52].

El posible daño celular causado por la producción de ERO, se analizó a través de la cantidad de DHL en el medio de incubación. La actividad enzimática de la DHL en el medio de cultivo, fue muy baja con respecto a la actividad intracelular. Esto indica que la enzima no se está liberando de la célula, lo que implica que no existe un efecto tóxico causado por la elevada concentración de glucosa y producción de ERO. Este mismo resultado se obtuvo utilizando el IP, el cual es un fluoróforo que normalmente no permea la membrana celular; sin embargo, cuando la membrana está dañada o hay muerte celular, entonces penetra a la célula y se intercala entre los pares de bases nitrogenadas del DNA. Es interesante que la viabilidad determinada tanto por MTT, la liberación de DHL o por la tinción con IP no se afectó en las células tratadas con una alta concentración de glucosa, aunque no puede descartarse otro mecanismo de muerte celular.

El EPR se considera un tejido de alta susceptibilidad a un estrés oxidante. Los resultados indican, que a pesar del incremento en la producción de ERO, la elevada concentración de glucosa no causó un estrés oxidante que pueda llevar al daño de la células del EPR. Los resultados están de acuerdo con el hecho de que dicho tejido cuenta con una variedad de compuestos antioxidantes; presentando altos niveles la SOD y de la catalasa, así como de glutatión y carotenoides como la luteína y la zeaxantina, el ascorbato, α -tocoferol y β -carotenos [11].

Llama la atención que el H_2O_2 (0.05mM), causó una disminución del 15% en la viabilidad celular del EPR. De acuerdo con estos resultados, estudios realizados en la línea celular del EPR, ARPE19, demostraron que éstas células pueden eliminar eficientemente el H_2O_2 . En éstos estudios adicionalmente se encontró toxicidad del H_2O_2 con una IC_{50} (concentración necesaria para provocar citotoxicidad en el 50% de las células) de 950 μM en 24 horas [53]. Asimismo, se demostró la muerte apoptótica de células ARPE 19 generada por la incubación prolongada (5 semanas) en presencia de concentraciones de glucosa muy grandes (40 Y 80 mM) [54]. Contrario a lo que ocurre en las células del EPR, concentraciones relativamente bajas de glucosa (15 mM) llevan a la muerte de las células endoteliales debido al aumento en la producción de ERO [39-41]. Esto implica que las células del EPR tienen una elevada resistencia a estar bajo condiciones de estrés.

En conjunto, estos resultados señalan que las células de EPR presentan una elevada capacidad para mantener su estado redox. Y es altamente probable que posean mecanismos de adaptación a modificaciones en el mismo. El aumento en la producción de ERO debido a la presencia de la alta concentración de glucosa no afectando su viabilidad, sugiere que se requiere de un tiempo mayor de exposición a una elevada concentración de glucosa para causar un daño significativo al tejido.

Conclusiones

1. Las células del EPR aumentaron la producción de ERO a tiempos relativamente cortos (12-48 horas) de incubación con una elevada concentración de glucosa.
2. La alta concentración de glucosa no alteró la viabilidad celular del EPR.
3. Las células del EPR en cultivo, tienen una alta capacidad para mantener en estado fisiológico normal su estado redox.

Referencias

1. Stitt, A. W., Curtis, T. M., Chen, M., Medina, R. J., McKay, G. J., Jenkins, A., . & Lois, N. (2016). The progress in understanding and treatment of diabetic retinopathy. *Progress in retinal and eye research*, 51, 156-186.
2. Robinson, R., Barathi, V. A., Chaurasia, S. S., Wong, T. Y., & Kern, T. S. (2012). Update on animal models of diabetic retinopathy: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Disease models & mechanisms*, 5(4), 444-456.
3. Fanjul, M. L., & Hiriart, M. (Eds.). (1998). *Biología funcional de los animales*. Siglo XXI.
4. Eckert, R., Randall, R., & Augustine, G. (1988). *Animal physiology: mechanisms and adaptations* (No. ed. 3). WH Freeman & Co.
5. Aughey, E., & Frye, F. L. (2001). *Comparative veterinary histology with clinical correlates*. CRC Press.
6. Salceda, R. (1998). Diferenciación de la Retina de los vertebrados: mecanismos celulares y moleculares. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*, 48 : 115-124.
7. Runkle, E. A., & Antonetti, D. A. (2011). The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols*, 133-148.
8. Lechner, J., O'Leary, O. E., & Stitt, A. W. (2017). The pathology associated with diabetic retinopathy. *Vision Research*. 7-14. <https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.04.003>
9. Higuchi, A., Kumar, S. S., Benelli, G., Alarfaj, A. A., Munusamy, M. A., Umezawa, A., & Murugan, K. (2017). Stem cell therapies for reversing vision loss. *Trends in biotechnology*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.06.016>
10. Zinn, K. M., & Marmor, M. F. (1979). *The retinal pigment epithelium*. Harvard Univ Pr.
11. Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiological reviews*, 85(3), 845-881.
12. Jiménez-Salazar, J. E., González-Núñez, L., Königsberg-Fainstein, M., Gómez-Quiroz, L. E., Zentella-Dehesa, A., & Damián-Matsumura, P. (2012). Estructura y función de las uniones estrechas en la transición epitelio-mesénquima (TEM) y la tumorigénesis del cáncer de mama humano. *REB*, 31(2), 49-59.
13. Furuse, M. (2010). Molecular basis of the core structure of tight junctions. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(1), a002907
14. Booi, J. C., Baas, D. C., Beisekeeva, J., Gorgels, T. G., & Bergen, A. A. (2010). The dynamic nature of

Bruch's membrane. *Progress in retinal and eye research*, 29(1), 1-18.

15. Chen, M., Rajapakse, D., Fraczek, M., Luo, C., Forrester, J. V., & Xu, H. (2016). Retinal pigment epithelial cell multinucleation in the aging eye—a mechanism to repair damage and maintain homeostasis. *Aging cell*, 15(3), 436-445.

16. Bairati, A., & Orzalesi, N. (1963). The ultrastructure of the pigment epithelium and of the photoreceptor-pigment epithelium junction in the human retina. *Journal of ultrastructure research*, 9(5-6), 484-496.

17. R Sparrow, J., Hicks, D., & P Hamel, C. (2010). The retinal pigment epithelium in health and disease. *Current molecular medicine*, 10(9), 802-823.

18. Ishikawa, M., Sawada, Y., & Yoshitomi, T. (2015). Structure and function of the interphotoreceptor matrix surrounding retinal photoreceptor cells. *Experimental eye research*, 133, 3-18.

19. Kay, P., Yang, Y. C., & Paraoan, L. (2013). Directional protein secretion by the retinal pigment epithelium: roles in retinal health and the development of age-related macular degeneration. *Journal of cellular and molecular medicine*, 17(7), 833-843.

20. Takata, K., Hirano, H., & Kasahara, M. (1997). Transport of glucose across the blood-tissue barriers. In *International review of cytology* (Vol. 172, pp. 1-53). Academic Press.

21. Lehmann, G. L., Benedicto, I., Philp, N. J., & Rodriguez-Boulan, E. (2014). Plasma membrane protein polarity and trafficking in RPE cells: past, present and future. *Experimental eye research*, 126, 5-15.

22. Gaucher, D., Arnault, E., Husson, Z., Froger, N., Dubus, E., Gondouin, P., ... & Benahmed, M. A. (2012). Taurine deficiency damages retinal neurones: cone photoreceptors and retinal ganglion cells. *Amino Acids*, 43(5), 1979-1993.

23. Bazan, N. G. (2009). Cellular and molecular events mediated by docosahexaenoic acid-derived neuroprotectin D1 signaling in photoreceptor cell survival and brain protection. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81(2-3), 205-211.

24. Stamer, W. D., Bok, D., Hu, J., Jaffe, G. J., & McKay, B. S. (2003). Aquaporin-1 channels in human retinal pigment epithelium: role in transepithelial water movement. *Investigative ophthalmology & visual science*, 44(6), 2803-2808.

25. Adijanto, J., Banzon, T., Jalickee, S., Wang, N. S., & Miller, S. S. (2009). CO₂-induced ion and fluid transport in human retinal pigment epithelium. *The Journal of general physiology*, 133(6), 603-622.

26. Philp, N. J., Yoon, H., & Grollman, E. F. (1998). Monocarboxylate transporter MCT1 is located in the apical membrane and MCT3 in the basal membrane of rat RPE. *American Journal of Physiology-*

Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, 274(6), R1824-R1828.

27. Wolfensberger, T. J., Mahieu, I., Jarvis-Evans, J., Boulton, M., Carter, N. D., Nógrádi, A., ... & Bird, A. C. (1994). Membrane-bound carbonic anhydrase in human retinal pigment epithelium. *Investigative ophthalmology & visual science*, 35(9), 3401-3407.

28. Marmorstein, A. D. (2001). The polarity of the retinal pigment epithelium. *Traffic*, 2(12), 867-872.

29. Saari, J. C. (2000). Biochemistry of Visual Pigment Regeneration The Friedenwald Lecture. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 41(2), 337-348

30. Ponnalagu, M., Subramani, M., Jayadev, C., Shetty, R., & Das, D. (2017). Retinal pigment epithelium-secretome: A diabetic retinopathy perspective. *Cytokine*, 95, 126-135.

31. Strauß, O. (2016). Pharmacology of the retinal pigment epithelium, the interface between retina and body system. *European journal of pharmacology*, 787, 84-93.

32. Datta, S., Cano, M., Ebrahimi, K., Wang, L., & Handa, J. T. (2017). The impact of oxidative stress and inflammation on RPE degeneration in non-neovascular AMD. *Progress in retinal and eye research*, 60, 201-218.

33. Park, S. H., Park, J. W., Park, S. J., Kim, K. Y., Chung, J. W., Chun, M. H., & Oh, S. J. (2003). Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia*, 46(9), 1260-1268.

34. Xia, T., & Rizzolo, L. J. (2017). Effects of diabetic retinopathy on the barrier functions of the retinal pigment epithelium. *Vision Research*. 72-81.

35. Yang, H., Jin, X., Lam, K., Wai, C., & Yan, S. K. (2011). Oxidative stress and diabetes mellitus. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 49(11), 1773-1782.

36. Halliwell, B. (2005). Free radicals and other reactive species in disease. *ELS*.

37. Konigsberg Fainstein, M. A. M. (2008). Radicales libres y estrés oxidativo: aplicaciones médicas (No. Sirsi) i9789707293212).

38. Castro, L., & Freeman, B. A. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*, 17(2), 161-165.

39. Viores, S. A., Gadegbeku, C., Campochiaro, P. A., & Green, W. R. (1989). Immunohistochemical localization of blood-retinal barrier breakdown in human diabetics. *The American journal of pathology*, 134(2), 231.

40. Zhu, M., Wen, M., Sun, X., Chen, W., Chen, J., & Miao, C. (2015). Propofol protects against high

glucose-induced endothelial apoptosis and dysfunction in human umbilical vein endothelial cells. *Anesthesia & Analgesia*, 120(4), 781-789.

41. Chen, F., Chen, B., Xiao, F. Q., Wu, Y. T., Wang, R. H., Sun, Z. W., ... & Hu, S. J. (2014). Autophagy protects against senescence and apoptosis via the RAS-mitochondria in high-glucose-induced endothelial cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(4), 1058-1074.

42. Liu, T. S., Pei, Y. H., Peng, Y. P., Chen, J., Jiang, S. S., & Gong, J. B. (2014). Oscillating high glucose enhances oxidative stress and apoptosis in human coronary artery endothelial cells. *Journal of endocrinological investigation*, 37(7), 645-651.

43. Kirwin, S. J., Kanaly, S. T., Hansen, C. R., Cairns, B. J., Ren, M., & Edelman, J. L. (2011). Retinal gene expression and visually evoked behavior in diabetic long evans rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 52(10), 7654-7663.

44. Bailey, T. A., Kanuga, N., Romero, I. A., Greenwood, J., Luthert, P. J., & Cheetham, M. E. (2004). Oxidative stress affects the junctional integrity of retinal pigment epithelial cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 45(2), 675-684.

45. Huang, C., Wang, J. J., Jing, G., Li, J., Jin, C., Yu, Q., & Zhang, S. X. (2015). Erp29 Attenuates Cigarette Smoke Extract-Induced Endoplasmic Reticulum Stress and Mitigates Tight Junction Damage in Retinal Pigment Epithelial Cells Protective Role of ERp29 in RPE Cells. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(11), 6196-6207.

46. Lowry, O. H., Rosebrugh, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J., (1951) "Protein Measurement with the Folin Phenosl Reagent," *Journal of Biological Chemistry*, **193**: 265-275.

47. Runkle, E. A., & Antonetti, D. A. (2011). The blood-retinal barrier: structure and functional significance. *The Blood-Brain and Other Neural Barriers: Reviews and Protocols*, 133-148.

48. Sies, H. (2015). Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox biology*, 4, 180-183.

49. Farnoodian, M., Halbach, C., Slinger, C., Pattnaik, B. R., Sorenson, C. M., & Sheibani, N. (2016). High glucose promotes the migration of retinal pigment epithelial cells through increased oxidative stress and PEDF expression. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 311(3), C418-C436.

50. Giordano, C. R., Roberts, R., Krentz, K. A., Bissig, D., Talreja, D., Kumar, A., & Berkowitz, B. A. (2015). Catalase Therapy Corrects Oxidative Stress-Induced Pathophysiology in Incipient Diabetic Retinopathy Catalase Therapy in Incipient Diabetic Retinopathy. *Investigative ophthalmology & visual science*, 56(5), 3095-3102.

51. Trudeau, K., Molina, A. J., Guo, W., & Roy, S. (2010). High glucose disrupts mitochondrial morphology in retinal endothelial cells: implications for diabetic retinopathy. *The American journal of*

pathology, 177(1), 447-455.

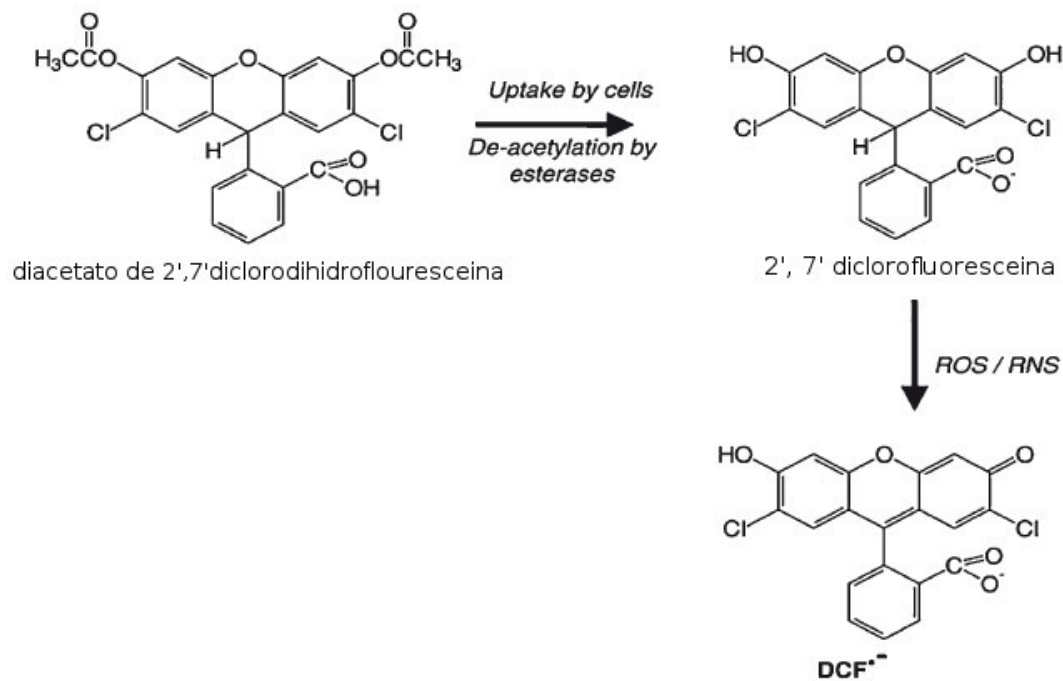
52. Madreiter-Sokolowski, C. T., Sokolowski, A. A., & Graier, W. F. (2017). Dosis Facit Sanitatem—Concentration-Dependent Effects of Resveratrol on Mitochondria. *Nutrients*, 9(10), 1117.
53. Iloki-Assanga, S. B., Lewis-Luján, L. M., Fernández-Angulo, D., Gil-Salido, A. A., Lara-Espinoza, C. L., & Rubio-Pino, J. L. (2015). Retino-protective effect of *Bucida buceras* against oxidative stress induced by H₂O₂ in human retinal pigment epithelial cells line. *BMC complementary and alternative medicine*, 15(1), 254.
54. Chen, M., Wang, W., Ma, J., Ye, P., & Wang, K. (2016). High glucose induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in human retinal pigment epithelium cells via promoting SOCS1 and Fas/FasL signaling. *Cytokine*, 78, 94-102
55. Eruslanov, E., & Kusmartsev, S. (2010). Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow cytometry. *Advanced protocols in oxidative stress II*, 57-72.
56. Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, 65(1-2), 55-63.

Apéndice

Fundamento del ensayo para cuantificación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

El diacetato de diclorodihidrofluoresceína (DCFH-DA) es una molécula que permea pasivamente a la membrana celular. Una vez dentro de la célula, las esterasas citosólicas lo hidrolizan a 2',7' diclorofluoresceína (DCFH₂), producto polar e impermeable a la célula, lo que garantiza su acumulación intracelular, y presenta fluorescencia si es oxidado por especies reactivas de oxígeno generadas por la célula [55].

El DCFH-DA es uno de los métodos más utilizados para medir cambios en la producción de ERO en función del incremento en su fluorescencia.



Fundamento del ensayo de viabilidad celular por MTT

Las deshidrogenasas mitocondriales tienen la capacidad de reducir el bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) y generar formazan. El formazan es un sustrato colorido que se puede solubilizar y cuantificar por medio de su absorbancia a 570 nm, la cantidad obtenida es proporcional a la capacidad de las enzimas de la mitocondria para romper el anillo de tetrazolio del formazan y refleja la proporción de células vivas [56].

