



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría en Ciencias (Neurobiología)**

**Facultad de Psicología**

**“EFECTO DE LA HIPERGLICEMIA/HIPERLIPIDEMIA SOBRE LA  
EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES A GABA EN LA CÉLULA DE  
MÜLLER DE MAMÍFERO”**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
Maestro en Ciencias**

**PRESENTA:**

**Biól. Alan Emmanuel Medina Arellano**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dr. Lenin David Ochoa de la Paz**  
**Facultad de Medicina**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra. Mónica Lamas Gregori**  
**CINVESTAV Sur**

**Dr. Rogelio Arellano Ostoa**  
**Instituto de Neurobiología**

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Junio, 2021**



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.

Este trabajo fue desarrollado en el *Laboratorio de Biología Molecular y Celular de la Glía* de la Facultad de Medicina de la UNAM, y en la Unidad de Investigación del Hospital de la Ceguera “Dr. Luis Sánchez Bulnes” APEC, y financiado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM, con número IN221820, por el APEC con el proyecto APEC-INB-20-21 y el Presupuesto Interno de la Facultad de Medicina, UNAM, otorgados al Dr. Lenin Ochoa de la Paz.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número 895582 para desarrollar mis estudios de maestría en el periodo de agosto 2019 a julio 2021.

**Facultad de Medicina**



Asociación para Evitar  
la Ceguera en México I.A.P.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por ser mi alma máter y permitir mi formación académica y científica.

Al Dr. Lenin David Ochoa de la Paz, por permitirme formar parte de su grupo de investigación y por siempre estar dispuesto a conversar y debatir sobre todos los temas posibles. También le agradezco por su apoyo, consejos y empatía durante todo este trayecto.

A los miembros del comité tutor, la Dra. Mónica Lamas Gregori y el Dr. Rogelio Arellano Ostoa, por las observaciones y el apoyo brindado a lo largo de estos dos años.

A los miembros del jurado; Dra. Edith Arnold Hernández, Dr. Carlos Guillermo Martínez Moreno y Dr. Yonathan Omar Garfias Becerra, por las observaciones y comentarios expresados para mejorar el manuscrito de la tesis.

Al Dr. Josué Orlando Ramírez Jarquín por sus consejos y apoyo técnico brindados para realizar este trabajo.

A la Mtra. Estela D'Abril Ruíz Leyja, la M. en C. Amabile Velo, la pM. en C. Jessica González Corona y el Biól. Miguel Ángel Guzmán Montoya, por sus enseñanzas en las técnicas empleadas en esta tesis.

Al Bioterio de la Facultad de Medicina-UNAM y la M.V.Z. Claudia Verónica Rivera Cerecedo, jefa de la Unidad Académica del Bioterio del Instituto de Fisiología Celular (IFC) UNAM, por los ratones utilizados para este estudio.

## **DEDICATORIAS**

Dedico esta tesis a mis padres, Pilar y Manuel, y a mis hermanos Valeria y Edwin, que significan el motor de mi vida.

A Vero: por acompañarnos, por entendernos y por caminar codo a codo.

A mis amigos y amigas de toda la vida: por estar ahí siempre.

A mis compañeras del Laboratorio de Neurobiología Molecular y Celular de la Glía, gracias por sus consejos y apoyo.

# Índice

1. <b>Resumen</b> .....	1
2. <b>Introducción</b> .....	1
2.1 La retina .....	1
2.2 Células de Müller .....	2
2.3 GABA y receptores GABA <sub>A</sub> .....	4
2.4 Retinopatía diabética .....	6
3. <b>Antecedentes</b> .....	8
4. <b>Justificación</b> .....	9
5. <b>Hipótesis</b> .....	9
6. <b>Objetivos</b> .....	9
6.1 General.....	9
6.2 Específicos.....	9
7. <b>Métodos</b> .....	10
7.1 Animales experimentales .....	10
7.2 Cultivos primarios.....	10
7.3 Modelo experimental.....	10
7.4 Medición de la viabilidad celular.....	11
7.5 Inmunofluorescencia.....	11
7.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR).....	13
7.7 Análisis estadístico.....	14
8. <b>Resultados</b> .....	14
8.1 Efecto de la hiperglicemia/hiperlipidemia (HG/HL) en la viabilidad de las células de Müller.....	14
8.2 Expresión de marcadores de estrés celular en la glía de Müller en respuesta a condiciones HG/HL .....	17
8.3 Identificación de las subunidades del receptor GABA <sub>A</sub> expresadas en las células de Müller de vertebrados a través de bioinformática .....	23
8.4 Expresión del ARNm de las subunidades del receptor GABA <sub>A</sub> en la célula de Müller de ratón en condiciones normales e HG/HL.....	24
9. <b>Discusión</b> .....	26
10. <b>Conclusiones</b> .....	31
11. <b>Bibliografía</b> .....	32

## **ABREVIATURAS**

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ADNc:** ADN complementario

**AP:** Ácido palmítico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ARNm:** ARN mensajero

**BSA:** Albúmina de suero bovino

**CPT1:** Carnitil palmitotransferasa 1

**CRALBP:** Del inglés, Cellular retinaldehyde-binding protein

**DMEM:** Del inglés, Dulbecco's Modified Eagle Medium

**DMSO:** Dimetil sulfóxido

**ERG:** Electroretinograma

**GABA<sub>A</sub>R:** Receptor a GABA tipo A

**GABA<sub>B</sub>R:** Receptor a GABA tipo B

**GABA<sub>R</sub>:** Receptores a GABA

**GABA:** Ácido gamma-aminobutírico

**GABA-T:** Enzima GABA transaminasa

**GAD:** Enzima ácido glutámico descarboxilasa

**GCL:** Capa de células ganglionares

**GFAP:** Proteína glial ácido fibrilar

**GLAST:** Transportador de Glutamato-aspartato 1

**HG/HL:** Hiperglicemia/Hiperlipidemia

**HIF-1 $\alpha$ :** Factor inducido por hipoxia 1 $\alpha$

**INL:** Capa nuclear interna

**IPL:** Capa plexiforme interna

**NFL:** Capa de fibras nerviosas

**ONL:** Capa nuclear externa

**OPL:** Capa plexiforme externa

**OS:** Capa de segmentos externos de los fotorreceptores

**PBS:** Buffer salino fosfato

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**PGC-1 $\alpha$ :** Coactivator-1 $\alpha$  de PPAR

**PPAR:** Receptores activados por proliferadores peroxisomales

**RD:** Retinopatía diabética

**RT-PCR:** PCR con transcripción reversa

**VEGF:** Factor de crecimiento endotelial vascular



## 1 RESUMEN

La retinopatía diabética (RD) es una de las principales complicaciones que subyacen a la diabetes mellitus y es la causa número uno de pérdida parcial o total de la visión. Se han descrito diferentes cambios en las funciones de las células retinales durante la RD, la mayoría asociados a la alteración de procesos homeostáticos regulados, en condiciones fisiológicas normales, por la glía de Müller. Uno de ellos es la alteración en la neurotransmisión, y en particular del sistema GABAérgico, del que hasta el momento se desconoce si existe alguna alteración sobre los receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R), así como el arreglo de estos receptores en la célula de Müller de los mamíferos. Para investigar el efecto de la RD en la expresión de los GABA<sub>A</sub>R, se realizaron cultivos primarios de células de Müller de ratones CD1 de 5-7 días postnatales. Para simular la RD, se empleó el modelo experimental *in vitro* propuesto por Capozzi *et al.* (2018) que considera un aporte hiperglicémico e hiperlipidémico (HG/HL); D-Glucosa 25 mM y ácido palmítico 250 μM, respectivamente. El ácido palmítico (AP) se incluye como un elemento metabólico clave de la RD. Las células se mantuvieron en los tratamientos experimentales durante 24, 48, 72 o 96h, para posteriormente, determinar la viabilidad de las células de Müller a través de la técnica de exclusión de azul tripano. Se realizaron inmunofluorescencias contra CRALBP, GFAP y VEGF<sub>A</sub> para evaluar el efecto del modelo metabólico de RD sobre las células de Müller cuantificando la intensidad de fluorescencia, así como diferentes parámetros morfológicos. La expresión de las subunidades del GABA<sub>A</sub>R fue analizada usando PCR con transcripción reversa (RT-PCR). Los resultados obtenidos indican que la condición HG/HL fue capaz de reducir la viabilidad celular de forma significativa a partir de las 48h de exposición. Este efecto estuvo acompañado de cambios morfológicos como la reducción del área celular y la condensación de la cromatina. Los ensayos de inmunofluorescencia muestran un incremento en la expresión de VEGF<sub>A</sub>, una proteína clave para los procesos angiogénicos que ocurren en la RD, y de GFAP un marcador de estrés glial en la retina. Los análisis por RT-PCR sugieren un arreglo α1/β2/γ2 de los GABA<sub>A</sub>R expresados en las células de Müller, que coincide con la conformación más abundante en el tejido nervioso. Interesantemente, la exposición a HG/HL, y principalmente el AP, disminuyó la transcripción de la subunidad α1. Considerando estos datos, se muestra que las células de Müller son capaces de responder a las concentraciones de ácidos grasos circundantes en el medio extracelular a través de un incremento en la expresión de VEGF<sub>A</sub>. Lo anterior sustenta el papel de la glía de Müller como la principal fuente endógena de síntesis de VEGF en la retina. Por otra parte, el arreglo tradicional de los GABA<sub>A</sub>R en la célula de Müller de ratón respondería a funciones homeostáticas importantes como la neurotransmisión e inclusive el mantenimiento de un adecuado pH extracelular. Por último, el AP es capaz de regular la expresión de este receptor, lo que sugiere implicaciones importantes de los ácidos grasos saturados sobre la regulación GABAérgica en patologías como la RD.

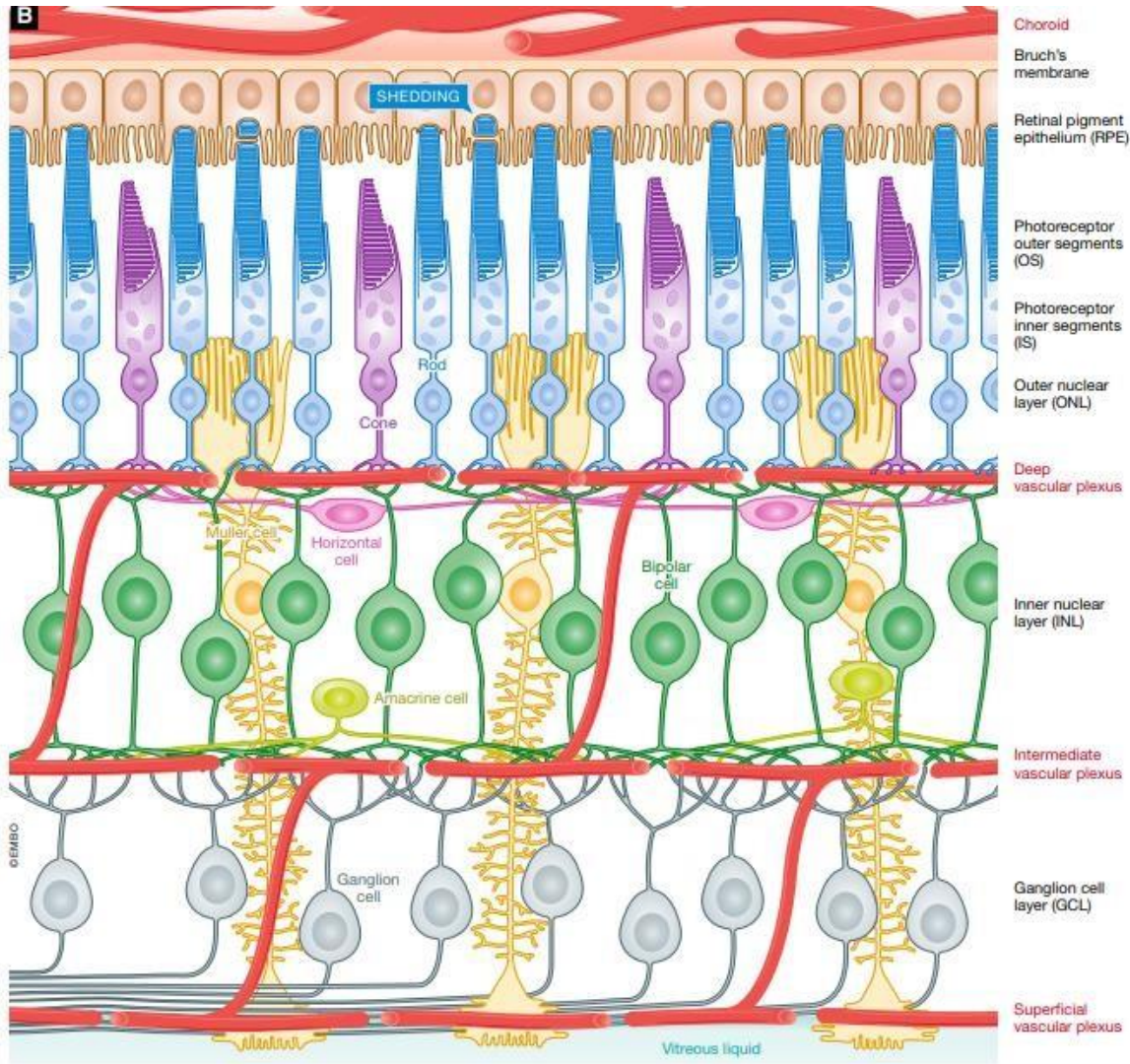
## 2 INTRODUCCIÓN

### 2.1 La retina

La visión es un complejo proceso fisiológico que depende fundamentalmente de una correcta homeostasis en la retina. Este tejido se encuentra en el ojo y posee características estructurales y funcionales particulares que le permiten la captación de luz y su transducción a señales químicas y eléctricas que posteriormente son procesadas en la corteza visual (López Bolaños, 2012).

Estructuralmente, la retina se divide en dos secciones; la sección no neural o *zona del epitelio pigmentado*, y la sección neural, o *neuroretina*, que corresponde a los diferentes estratos retinales. La neuroretina es la encargada de captar, procesar y transmitir el estímulo visual, y posee nueve estratos; de la parte externa hacia la interna: la capa de conos y bastones (OS), la membrana limitante externa, la capa nuclear externa (ONL), la capa plexiforme externa (OPL), la capa nuclear interna (INL), la capa plexiforme interna (IPL), la capa de células ganglionares (GCL), la capa de fibras nerviosas (NFL) y la membrana limitante interna (Fu et al., 2019) (Figura 1).

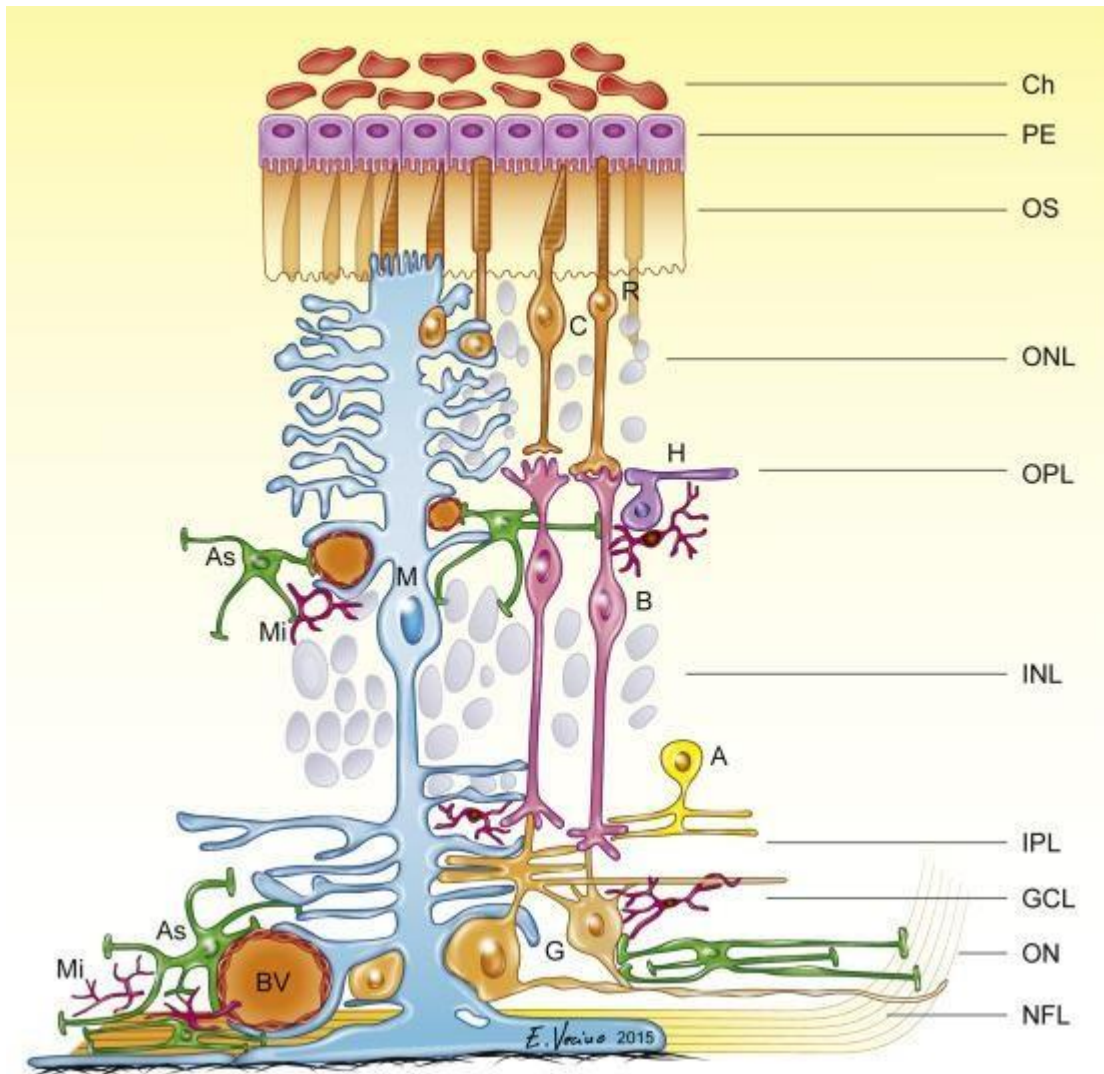
En la retina neural existen dos tipos celulares muy bien diferenciados; las neuronas y las células gliales. Las neuronas se encargan de convertir el estímulo luminoso a impulsos químicos y eléctricos. Este estímulo visual es procesado por estas células en el siguiente orden: fotorreceptores, células bipolares y células ganglionares. Además, existen interneuronas, células horizontales y células amacrinas, las cuales regulan este flujo de información. Por otro lado, las células gliales se encargan de regular procesos fisiológicos para el correcto funcionamiento de la retina, tales como: la osmorregulación, la transmisión sináptica y el metabolismo neuronal, entre otros. Las células gliales de la retina se dividen en microglía, astrocitos y células de Müller. La microglía se encuentra en las capas plexiformes de la retina (OPL e INL), y los astrocitos se concentran en la ONL, mientras que las células de Müller se distribuyen desde la ONL hasta la NFL (Vecino et al., 2016).



**Figura 1. Estructura de la retina.** Esquema que muestra el arreglo celular (neuronas y glía) y vascular en la retina. Se indican las principales capas de la retina. Tomado de Fu y colaboradores (2019).

## 2.2 Células de Müller

Las células de Müller son las células gliales con mayor proporción en la retina de los mamíferos (Coughlin, 2017). Poseen una morfología bipolar con el soma localizado en la INL, desde donde extienden sus procesos hacia el segmento interno de los fotorreceptores (formando la membrana limitante externa) y hacia la capa de las fibras nerviosas (formando la membrana limitante interna), adquiriendo la forma de pie terminal (Bringmann et al., 2006). El arreglo estructural de estas células les permite estar en contacto con prácticamente todos los tipos celulares de la retina neural, inclusive aquellas células de la vasculatura (Coughlin, 2017; Fu et al., 2020) (Figura 2).



**Figura 2. Localización de las células de Müller en la retina.** Esquema que muestra la morfología de las células de Müller. Es importante enfatizar el contacto que establece la glía de Müller con prácticamente todas las células que conforman la retina, incluyendo neuronas, células gliales y células de la vasculatura. Tomado de Vecino et al. (2016).

Debido a que las células de Müller presentan características morfológicas, celulares y bioquímicas muy particulares, se ha descrito su participación en diferentes funciones involucradas en la fisiología retinal como:

- A) Regular el metabolismo y suministro de nutrientes para las neuronas, a partir de su reservorio de glucógeno y la liberación de lactato/piruvato (Poitry-Yamate et al., 1995; Winkler et al., 2000).
- B) Regular el transporte de agua, controlando la composición del fluido del espacio extracelular (Reichenbach y Bringmann, 2013).
- C) Actividad antioxidante al ser más eficientes en la remoción de peróxido de oxígeno (Grosche et al., 2016), activación del factor transcripcional Nfr2

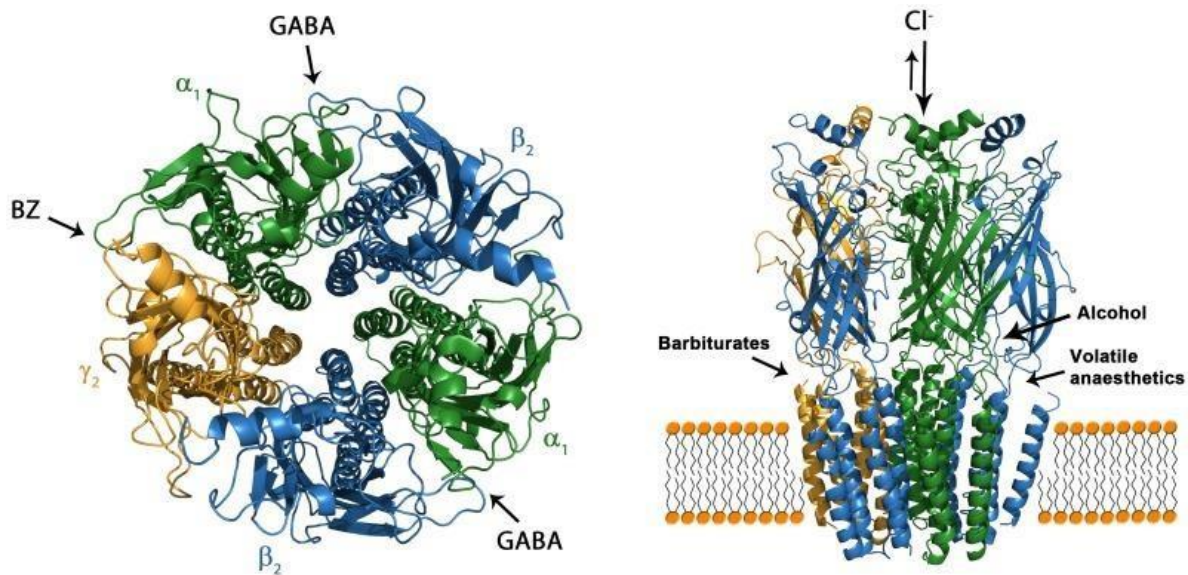
(factor nuclear eritroide-2) e incrementar la expresión de proteínas involucradas en la eliminación de especies reactivas de oxígeno (Xu et al., 2014).

- D) Actividad osmoreguladora a través de la movilización de iones  $K^+$ , por canales iónicos Kir 2.1 y Kir 4.1 (Coughlin et al., 2017), y de moléculas de agua a través de AQP4 (Jo et al., 2015).
- E) Permitir el paso eficiente de los fotones a través de su citoplasma hacia los segmentos de los fotorreceptores, debido a sus propiedades morfológicas y físicas como la disposición vertical a lo largo de la retina y orientada hacia la dirección de propagación de la luz, la forma de embudo extendido y el índice de refracción mayor al del tejido circundante (Franze et al., 2007).
- F) Remoción de neurotransmisores del espacio sináptico (glutamato y GABA) a través de los transportadores GLAST y GAT, respectivamente (Brecha y Weigmann, 1994; Harada et al., 1998).

### **2.3 GABA y receptores GABA<sub>A</sub>**

El GABA o ácido gamma-aminobutírico, es un aminoácido no esencial ampliamente conocido como el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central (SNC) y la retina de los mamíferos; modula la transmisión sináptica, promueve la neurogénesis, y juega un papel preponderante en condiciones patológicas del SNC como el insomnio y la depresión (Hübner y Holthoff, 2013, Gutiérrez-Castañeda et al., en proceso).

Los receptores a GABA (GABA<sub>R</sub>) son proteínas de membrana activadas por ligando, que de forma clásica es el aminoácido GABA. Se clasifican como; GABA<sub>A</sub> (ionotrópicos) y GABA<sub>B</sub> (metabotrópicos) (Hirano, 2016). Los receptores GABA<sub>A</sub> (GABA<sub>A</sub>R) son canales iónicos conformados por cinco diferentes subunidades (hetero-pentámeros) que al activarse permiten el paso de iones cloruro a través de un poro central. Hasta el momento han sido descritas 19 diferentes subunidades, agrupadas dentro de ocho diferentes familias de acuerdo con la homología de su secuencia ( $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ 1-3) (Naffaa et al., 2017). En la retina, la conformación del GABA<sub>A</sub>R principalmente expresada es  $\alpha$ 1/ $\beta$ 2/ $\gamma$ 2 (Wässle et al., 1998) (Figura 3).



**Figura 3. Arreglo clásico de los receptores a GABA<sub>A</sub> en el SNC.** Izquierda: Vista superior del modelo estructural del GABA<sub>A</sub>R que muestra la organización de las subunidades en un complejo hetero-pentamérico, así como los sitios propuestos para la unión del neurotransmisor GABA y diazepam (DZP). Derecha: Vista lateral del GABA<sub>A</sub>R insertado en una membrana celular que muestra algunos de los sitios de unión para fármacos y el flujo de iones a través del canal. Tomado de Cossette, Lachance-Touchette y Rouleau (2012).

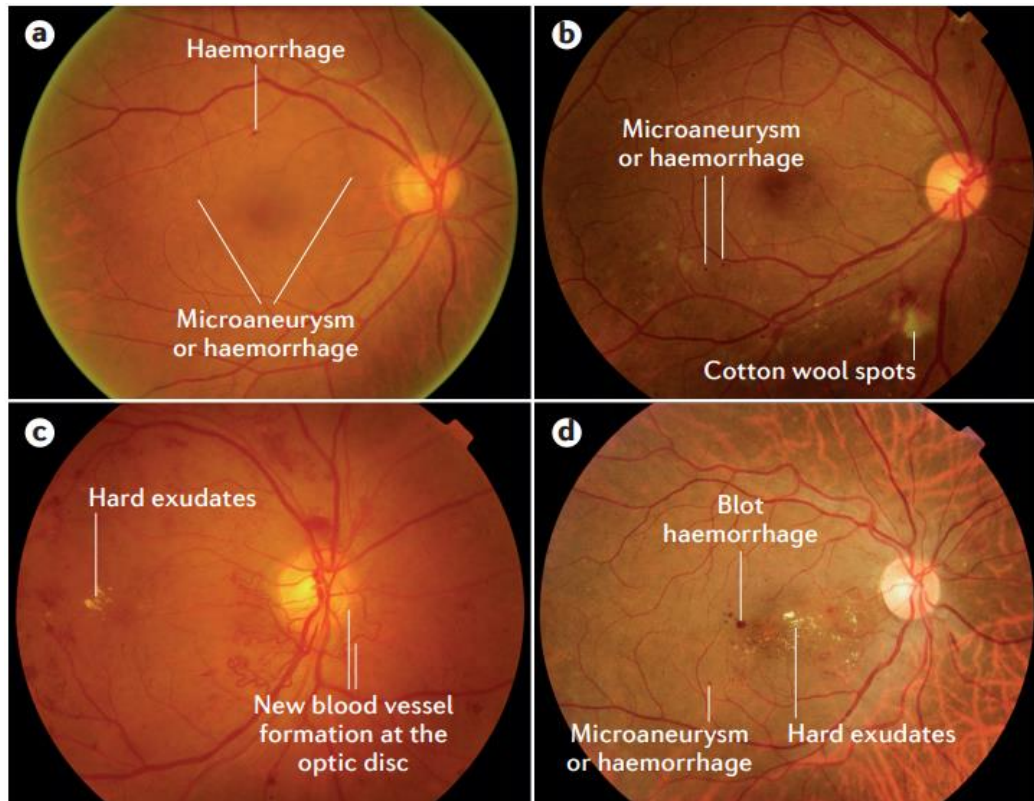
La expresión del GABA<sub>A</sub>R ha sido reportada en las células bipolares, horizontales, amacrinas y ganglionares de diferentes especies, incluyendo al humano (Greferath et al., 1993; Greferath, 1994; Vardi y Sterling, 1994). Este mismo receptor ha sido descrito en múltiples ocasiones en las células de Müller de diferentes mamíferos como la rata (Hinds et al., 2013), los babuinos (Reichelt et al., 1996) y los humanos (Biedermann et al., 2004; Reichelt et al., 1997). En la célula de Müller de humanos, se expresa principalmente en el pie terminal, en el soma y en el extremo distal de la célula que interactúa con los fotorreceptores (Biedermann et al., 2004). A pesar de que este receptor ha sido descrito en diferentes especies, se desconoce actualmente el arreglo específico de las subunidades que pudiera conformar en la célula de Müller de los mamíferos.

## 2.5 Retinopatía diabética

El mantener un correcto funcionamiento de la retina es de vital importancia para el proceso visual, sin embargo, existen condiciones que alteran estas funciones, comprometiendo la homeostasis retinal. Una de las condiciones relacionadas con el desequilibrio de las funciones fisiológicas de la retina es la retinopatía diabética (RD).

La RD es una de las complicaciones más comunes de la diabetes mellitus, y una de las principales causas de pérdida de visión en personas en edad laboral (Andonetti et al., 2010; Wong et al., 2016; Park y Park, 2020). Esta enfermedad se caracteriza por un incremento en la concentración de glucosa en sangre, así como la formación de nuevos vasos sanguíneos anormales en la retina. Pacientes con RD avanzada presentan alteraciones clínicas importantes como: hemorragias retinianas, microaneurismas, manchas algodinosas, exudados lipídicos, edema macular y oclusión capilar. Los estados más severos de esta patología incluyen la RD proliferativa, etapa caracterizada por el incremento anormal de la neovascularización retiniana (Wang et al., 2015; Wong et al., 2016) (Figura 4).

Tradicionalmente se considera que la RD es una enfermedad microvascular, sin embargo, la evidencia en los años recientes apoya la idea de que eventos como la neurodegeneración y la pérdida de funciones en la retina pueden ocurrir en etapas tempranas de la RD (Wang et al., 2015; Wong et al., 2016). Una de estas alteraciones es la reducción en los potenciales oscilatorios en los electroretinogramas (ERG) de pacientes diabéticos (Tzekov y Arden, 1999). Actualmente, la administración intraocular de agentes que inhiben el factor de crecimiento endotelial vascular (anti-VEGF) continúa siendo una de las alternativas para el tratamiento de la RD (Wong et al., 2016). También, es importante señalar que la dislipidemia se ha asociado con una progresión acelerada de la RD, particularmente por el incremento de las concentraciones séricas de los ácidos grasos saturados (Sacks et al., 2014; Hammer y Busik, 2017; Fu et al., 2020; Park y Park, 2020).



**Figura 4. Fondoscopia que muestra algunos eventos clínicos de la retinopatía diabética.** A. Retinopatía diabética no proliferativa (RDNP) con microaneurismas y hemorragias. B. RDNP moderada con microaneurismas, hemorragia y exudados algodinosos. C. Retinopatía diabética proliferativa (RDP) mostrando neovascularización alrededor del disco óptico. D. Edema macular diabético mostrando exudados duros en el centro de la fovea. Tomado de Wong et al. (2016).

Existen diferentes estudios que describen cambios en la fisiología de la célula de Müller en la RD, algunos de ellos son:

- a) Disminución de la conductancia del  $K^+$  en la membrana plasmática, probablemente por la alteración del canal de potasio Kir4.1 (Pannicke et al., 2006).
- b) Aumento en la liberación de factores de crecimiento como VEGF (Mu et al., 2009) y de citocinas pro-inflamatorias e interleucinas como  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  y factor de necrosis tumoral alfa ( $TNF-\alpha$ , por sus siglas en inglés) (Yego et al., 2009; Liu et al., 2015).
- c) Acumulación de la enzima GAPDH en el núcleo (Yego et al., 2009).
- d) Aumento de la muerte celular por la liberación de caspasa-1 (Mohr et al., 2012).
- e) Acumulación de GABA en el soma (Ishikawa et al., 1996a).
- f) Disminución de la actividad del transportador GLAST y de la enzima glutamina sintetasa (Li y Puro, 2002).



### 3 ANTECEDENTES

Diferentes estudios muestran que las células de la retina son vulnerables durante la retinopatía diabética (RD), modificando, entre otras características, las vías de señalización relacionadas con el sistema GABAérgico. Por ejemplo, se ha observado una correlación en el incremento de la concentración de GABA y de VEGF en el vítreo de pacientes diabéticos (Ambati et al., 1997). En modelos animales de diabetes inducida con estreptozotocina, hay una disminución en la cantidad de la enzima GAD (ácido glutámico descarboxilasa) y la GABA-T (GABA transaminasa), así como un aumento en contenido intracelular de GABA en las células de Müller (Ishikawa et al., 1996b).

En pacientes con RD, los ERG muestran una reducción en las amplitudes de la onda b y de los potenciales oscilatorios, componentes del ERG sensibles a la actividad de los receptores a GABA y a su proceso de inhibición lateral (Tzekov y Arden, 1999, Ramsey et al., 2007). Malchow y colaboradores, pioneros en describir la presencia de los GABA<sub>A</sub>R en las células de Müller de la mantarraya, mencionan la posibilidad de que estos receptores expresados en la célula de Müller regulen los potenciales transretinales afectando el comportamiento de los ERG (Malchow et al., 1989).

Además, en la ilusión de cuadrícula de Hermann-Hering, una herramienta utilizada para estudiar la función de la retina a partir de la percepción de las imágenes, los pacientes con diabetes mellitus mostraron una limitada capacidad de percepción relacionada a una progresiva pérdida del procesamiento visual espacial y una disfunción de la inhibición lateral, proceso relacionado a las interneuronas GABAérgicas de la retina (células amacrinas y horizontales) (Davies y Morland, 2002).

Finalmente, en células bipolares provenientes de ratas inyectadas con streptozotocina (modelo animal de diabetes), se ha reportado un aumento en la corriente del receptor a GABA<sub>A</sub>, resultado de la modificación de la expresión de las subunidades  $\rho 1$  y  $\rho 2$ , lo que altera su estequiometría y en consecuencia sus propiedades funcionales (Ramsey et al., 2007). Por lo tanto, a pesar del papel fundamental de las células de Müller en la homeostasis de la retina, y a la evidencia que indica una alteración de la señalización GABAérgica en la retina durante la RD, existe poca información sobre el efecto de estas condiciones patológicas en los receptores a GABA que se expresan en las células de Müller. Aunado a esto y a pesar de que los estudios muestran una respuesta electrofisiológica a GABA en células de Müller, hasta el momento no se ha caracterizado a nivel molecular las subunidades que conforman al GABA<sub>A</sub>R en este tipo celular.

## 4 JUSTIFICACIÓN

La retinopatía diabética (RD) es la principal causa de pérdida de visión en individuos diabéticos (Antonetti et al., 2010; Park y Park, 2020). Diferentes estudios señalan una alteración en la fisiología de la retina, particularmente en procesos asociados al funcionamiento de las células de Müller como la movilización de  $K^+$  y la recaptura y respuesta a neurotransmisores (Ishikawa et al., 1996a, Li y Puro, 2002; Pannicke et al., 2006). A pesar de que la presencia del receptor  $GABA_A$  ha sido descrita, solo por técnicas electrofisiológicas e inmunocitoquímicas, en las células de Müller de mamíferos, incluyendo humanos, actualmente se desconoce el arreglo específico de sus subunidades, y el efecto de la RD en la expresión de estas mismas (Reichelt et al., 1996; Reichelt et al., 1997; Bringmann et al., 2002; Biedermann et al., 2004; Hind et al., 2013). Considerando lo anterior, el dilucidar el efecto de condiciones experimentales de RD (*in vitro*) en los  $GABA_A$ R presentes en la glía de Müller de mamíferos, permitirá entender los mecanismos a través de los cuales esta condición patológica altera la actividad sináptica inhibitoria y originando una pérdida en la homeostasis de la retina.

## 5 HIPÓTESIS

El efecto hiperglucémico/hiperlipidémico (HG/HL), característico de la retinopatía diabética (RD), modifica la expresión del receptor  $GABA_A$  presente en células de la glía de Müller.

## 6 OBJETIVOS

### 6.1 General

Estudiar la expresión del receptor  $GABA_A$  en células de Müller de ratón, cultivadas *in vitro*, bajo condiciones HG/HL.

### 6.2 Específicos

- a) Determinar alteraciones en la morfología de células Müller cultivadas *in vitro* bajo condiciones HG/HL.
- b) Estudiar los posibles cambios en expresión de VEGF-A de células Müller cultivadas *in vitro* bajo condiciones HG/HL.
- c) Dilucidar la presencia del ARNm de las subunidades del  $GABA_A$ R en células de Müller cultivadas *in vitro* bajo condiciones HG/HL.

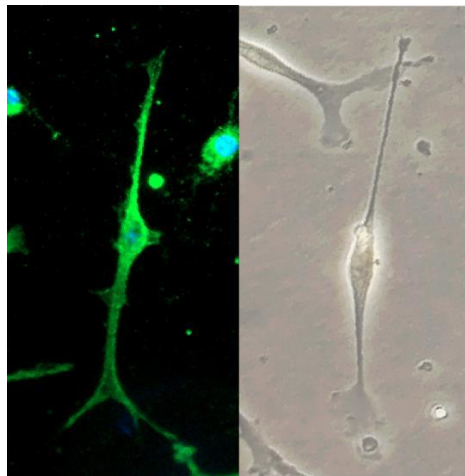
## 7 MÉTODOS

### 7.1 Animales experimentales

Se usaron ratones de 5 a 7 días postnatales de edad, de la cepa CD1. Los ratones fueron proporcionados por la Unidad de Bioterio de la Facultad de Medicina UNAM y del Instituto de Fisiología Celular UNAM.

### 7.2 Cultivos primarios

Las células de Müller fueron aisladas de la retina de ratones CD1 (*Mus musculus*). Brevemente, los globos oculares (4) de dos ratones se mantuvieron en medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, 3.15 g/L de D-Glucosa) F12 (Sigma-Aldrich, #51445C) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y 1% de penicilina/estreptomicina (Gibco), en agitación durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, la retina fue disecada y disociada, y posteriormente sembrada en medio DMEM-F12 + 10% SFB + 1% pen./estrep. y 20 ng/ $\mu$ L de factor de crecimiento epidérmico (EGF, Roche). Las células fueron cultivadas en monocapas sobre cajas de Petri de plástico (60 mm) (Corning) en incubadora (95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C). Los pases de cultivo se realizaron cada 3 días, y se utilizó el pase número 2 para todos los experimentos posteriores.



**Figura 5.** Imagen representativa de una célula de Müller en cultivo con marcaje fluorescente contra GFAP (izquierda) y microscopia de campo claro (derecha). Medina-Arellano et al., en proceso.

### 7.3 Modelo experimental

Se utilizó el modelo experimental propuesto por Capozzi y colaboradores (2018) para simular los efectos *in vitro* de la retinopatía diabética en cultivos celulares.

Este modelo considera el factor hiperglucémico está representado por una alta concentración de D-glucosa y el aporte dislipidémico representado por el ácido palmítico (AP). Se utilizó D-manitol como control osmótico. Los tres reactivos fueron adquiridos en Sigma Aldrich. Ambas azúcares fueron disueltas directamente en DMEM-F12 + 2% SFB + 1% pen./estrep. Se preparó un stock de AP disuelto en DMSO a 30 mM, posteriormente se preparó una solución de AP a 250  $\mu$ M en DMEM + 2% SFB + 1% pen./strep. Todos los medios fueron mantenidos a 4°C y oscuridad. El stock de ácido palmítico se almacenó a -20°C y oscuridad hasta el momento de su preparación.

#### 7.4 Medición de la viabilidad celular

Se sembraron células de Müller con una densidad de  $7 \times 10^4$  células/pozo en placas de doce pozos (Corning) y, al alcanzar el 70% de confluencia, fueron cultivadas en condiciones bajas de suero (DMEM + 2% SFB) durante 12 horas. Una vez concluido este periodo, los cultivos se trataron en las siguientes condiciones:

- Control (**CTR**): DMEM + 2% SFB
- D-manitol (**D-M25**): DMEM + 2% SFB + D-manitol 25 mM
- D-glucosa 25 mM (**D-G25**): DMEM + 2% SFB + D-glucosa 25 mM
- D-glucosa 50 mM (**D-G50**): DMEM + 2% SFB + D-glucosa 50 mM
- DMSO 0.008% (**DMSO**): DMEM + 2% SFB + DMSO 0.008%
- Ácido palmítico 250  $\mu$ M (**AP**): DMEM + 2% SFB + AP 250  $\mu$ M
- AP 250  $\mu$ M + D-M25 mM (**AP/D-M25**): DMEM+2% SFB+ AP 250  $\mu$ M + D-M25 mM
- AP 250  $\mu$ M + D-G25 mM (**AP/D-G25**): DMEM+2% SFB+ AP 250  $\mu$ M + D-G25 mM
- AP 250  $\mu$ M + D-G50 mM (**AP/D-G50**): DMEM+2% SFB+ AP 250  $\mu$ M + D-G50 mM

La lectura de viabilidad por azul tripano se realizó cada 24 horas durante 4 días. La viabilidad celular se calculó como el número de células vivas sobre el número de células totales, multiplicado por cien.

#### 7.5 Inmunofluorescencia.

Para conocer la expresión y localización de las diferentes proteínas de interés en las células de Müller en condiciones control y de tratamiento, se siguió el protocolo mencionado en el punto 7.4 a una densidad de  $4 \times 10^4$  células/pozo sobre cubreobjetos redondos de 18 mm de diámetro (Pearl), pretratados con poli-D-lisina (Sigma). Los cultivos fueron mantenidos durante 72 horas en las condiciones experimentales.

Concluido el tiempo, se retiró el medio, se lavaron las células con PBS 1x (Gibco) y se fijaron con paraformaldehído 4%, para después lavarse con PBS 1x y PBS/BSA 1%. Posteriormente, se bloquearon las células con PBS/BSA 1% + SFB 10% + Tritón X-100 3% (solución de bloqueo). Se realizaron lavados con PBS/BSA 1% y

se incubaron con la solución del anticuerpo primario de interés; anti-CRALBP (1:250), anti-GFAP (1:250) o anti-VEGFA (1:250). Las características de los anticuerpos se resumen en la tabla 1. Se utilizó Alexa Fluor 488 (1:500) como anticuerpo secundario. Los núcleos se marcaron con Hoechst (1:1000, Thermo Fisher). Los cubreobjetos se montaron en portaobjetos con la solución Fluoromonting-G (Electron Microscopy Sciences), y se prepararon para su visualización en el equipo Cytation 5.

Las imágenes se capturaron en aumentos de 10, 20 y 40X, seleccionando campos representativos para cada condición. La morfometría celular (área, perímetro y morfología circular) e intensidad de fluorescencia fueron medidas en el programa ImageJ (NIH).

Los niveles de fluorescencia celular fueron determinados a partir de imágenes de microscopía de fluorescencia en ImageJ. Brevemente, las células fueron seleccionadas dentro de un polígono, en donde se midió la intensidad integrada del área (area integrated intensity) y la media del valor gris (mean grey value). La Fluorescencia celular total corregida (CTCF= Corrected total cell fluorescence) se calculó con la siguiente fórmula:

$$CTCF = \text{Integrated Density} - (\text{Area of selected cell} * \text{Mean fluorescence of background readings})$$

**Tabla 1.** Número de catálogo, casa comercial y características de los anticuerpos utilizados para las inmunofluorescencias.

Anticuerpo	Número de catálogo	Casa comercial	Características	Dilución utilizada
Anti-CRALBP (B2)	sc-59487	Santa Cruz Biotechnology	Anticuerpo primario IgG monoclonal producido en ratón. Producido contra la proteína CRALBP de origen murino y humano.	1:250
Anti-GFAP (2E1)	sc-33673	Santa Cruz Biotechnology	Anticuerpo primario IgG monoclonal producido en ratón. Producido contra la proteína GFAP de rata, ratón y humano.	1:250
Anti-VEGFA (C-1)	sc-7269	Santa Cruz Biotechnology	Anticuerpo primario IgG monoclonal producido en ratón. Detecta la proteína VEGFA de origen murino y humano.	1:250
Anticuerpo secundario Alexa Fluor 488	A-11001	Thermo Fisher	Anticuerpo secundario IgG policlonal producido en cabra anti-ratón. Anticuerpo conjugado al fluoróforo Alexa Fluor 488.	1:500

## 7.6 Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR)

Se sembraron células a una densidad de  $5 \times 10^5$  células en cajas Petri de 60 mm de diámetro (Corning) y, al alcanzar al 70% de confluencia, se cultivaron en condiciones bajas de suero (DMEM + 2% SFB) durante 12 horas previas al tratamiento. Las condiciones experimentales fueron las mismas que se mencionan en el apartado 7.4. A las 72 h de incubación, el medio de cultivo se retiró de los cultivos, se realizó un lavado con PBS 1x estéril frío (Corning) y se añadieron 350  $\mu$ L de TRIzol (Invitrogen) para lisar las células. La extracción de ARN total se realizó siguiendo los pasos del TRIzol™ Reagent RNA Extraction Protocol (Invitrogen). Se utilizaron 400 ng del ARN total para realizar la reacción de Transcripción Reversa con el High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo-Scientific).

La PCR de punto final se realizó con 500 ng del ADNc y el kit PCR Master Mix (2X) (Thermo FisherScientific). Los oligonucleótidos fueron sintetizados en el Instituto de Biotecnología de la UNAM. Los productos de la PCR fueron resueltos en un gel de agarosa al 2%, teñidos con 6X Trirack DNA Loading Dye suplementado con GelRed (ThermoScientific). Se ocupó el GeneRuler DNA Mix del GeneRuler DNA Ladder Mix, ready-to-use (ThermoScientific) como marcador de peso molecular. Los geles fueron visualizados en un transiluminador de luz UV (UVP).

Las secuencias de los oligonucleótidos, así como las  $T_m$  y las condiciones generales para la PCR de punto final, se resumen en las Tablas 2, 3 y 4. Las secuencias de los oligonucleótidos para las diferentes subunidades y GAPDH fueron obtenidas de Mendu et al. (2012) y de Franco et al. (2017), respectivamente.

**Tabla 2.** Secuencias de los oligonucleótidos (forward y reverse) y tamaño del amplicón para los genes correspondientes a las subunidades de GABA<sub>A</sub>R de ratón.

Gen	Forward	Reverse	Amplicón (pb)
GABRA1	AAAAGCGTGGTTCCAGAAAA	GCTGGTTGCTGTAGGAGCAT	84
GABRA2	GCTGGTTGCTGTAGGAGCAT	GACTGGCCAGCAAATCATACT	117
GABRA3	GCCGTCTGTTATGCCTTTGTATTT	TTCTTCATCTCCAGGGCCTCT	118
GABRA4	AGAACTCAAAGGACGAGAAATTGT	TTCACTTCTGTAACAGGACCCC	118
GABRA5	GATTGTGTTCCCATCTTGTGGC	TTACTTTGGAGAGGTGGCCCCTTTT	100
GABRA6	GGTGACCGGGCATCCCAGTGA	TGTTACAGCACCCCCAAATCCTGGC	197
GABRB1	GGTTTGTGTGCACACAGCTCC	ATGCTGGCGACATCGATCCGC	153
GABRB2	GCTGGTGAGGAAATCTCGGTCCC	CATGCGCACGGCGTACCAA	70
GABRB3	GAGCGTAAACGACCCCGGGAA	GGGACCCCGAAGTCGGGTCT	100
GABRG1	ATCCAATCTCATTCCCATGAACAGC	ACAGAAAAAGCTAGTACAGTCTTTGC	100
GABRG2	ACTTCTGGTGACTATGTGGTGAT	GGCAGGAACAGCATCCTTATTG	147
GABRG3	ATTACATCCAGATTCCACAAGATG	CACAGGTGTCTCAAATTCCT	149
GAPDH	ACTGGCATGGCTTCCGTGTTCTA	TCAGTGTAGCCCAAGATGCCCTTC	149

**Tabla 3.** Condiciones generales utilizadas para la PCR de punto final. La temperatura de alineamiento (Ta, annealing temperature) varía de acuerdo con la temperatura de fusión (Tm, melting temperature) de cada secuencia.

Etapa	Número de ciclos	T°C	Tiempo
Desnaturalización inicial	X1	95°C	03 min
Desnaturalización	X30	95°C	30 seg
Alineamiento		58°C-63°C	30 seg
Extensión		72°C	30 seg
Extensión final	X1	72°C	05 min

**Tabla 4.** Temperatura de alineamiento (Ta) de cada primer utilizado en este estudio. También se muestra el tejido utilizado como control positivo, así como la cantidad de ADNc empleado.

Gen	Ta	Control positivo	ADNc (ng)
GABRA1	59°C	Corteza	500
GABRA2	62°C	Corteza	500
GABRA3	60°C	Corteza	500
GABRA4	60°C	Corteza	500
GABRA5	65°C	Corteza	500
GABRA6	65°C	Cerebro	500
GABRB1	65°C	Corteza	500
GABRB2	65°C	Bulbo olfatorio	500
GABRB3	65°C	Corteza	500
GABRG1	61°C	Lóbulo frontal	500
GABRG2	61°C	Lóbulo frontal	500
GABRG3	59°C	Lóbulo frontal	500
GAPDH	63°C	-	500

## 7.7 Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron por triplicado (n=3) y se analizaron los datos con un análisis de varianzas (ANOVA) seguido de una prueba *post-hoc* de Bonferroni, o una prueba de t de Student. Se consideró como significativos aquellos valores p menores a 0.05 ( $\alpha=5$ ).

El análisis de las imágenes y la densitometría fueron realizadas en el programa ImageJ (NIH). Los análisis estadísticos fueron realizados en el programa GraphPad Prism 5.0.

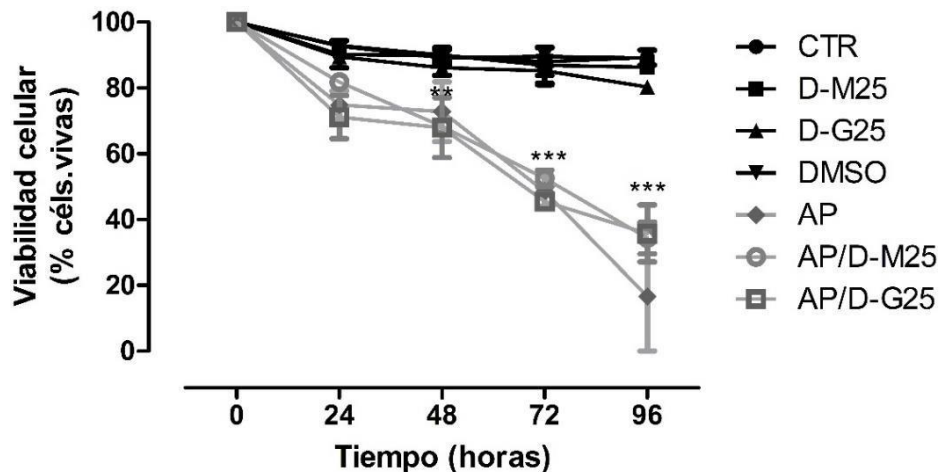
## 8 RESULTADOS

### 8.1 Efecto de la hiperglicemia-hiperlipidemia (HG/HL) en la viabilidad de células de Müller.

Con la finalidad de evaluar el efecto del aporte hiperglicémico (D-G25) e hiperlipidémico (AP), así como el de su co-aplicación (AP/D-G25), en la viabilidad

de las células de Müller, se cuantificó el porcentaje de células vivas a lo largo de cuatro días de exposición (Figura 6). Los resultados indican que el número de células vivas se mantiene parecido al control (CTR) en las condiciones de D-G25 y D-M25, independientemente del tiempo evaluado. Por el contrario, la viabilidad disminuye significativamente a partir de las 48 horas de exposición a AP. Con la intención de descartar un efecto por parte del vehículo (DMSO 0.008%) en el que fue disuelto el AP, se incluyó una curva de exposición a DMSO a los mismos tiempos antes evaluados. Los resultados muestran que no hay cambios en la viabilidad celular bajo esta condición experimental, por lo tanto, los efectos en la viabilidad se deben fundamentalmente a la acción que ejerce el AP sobre las células de Müller.

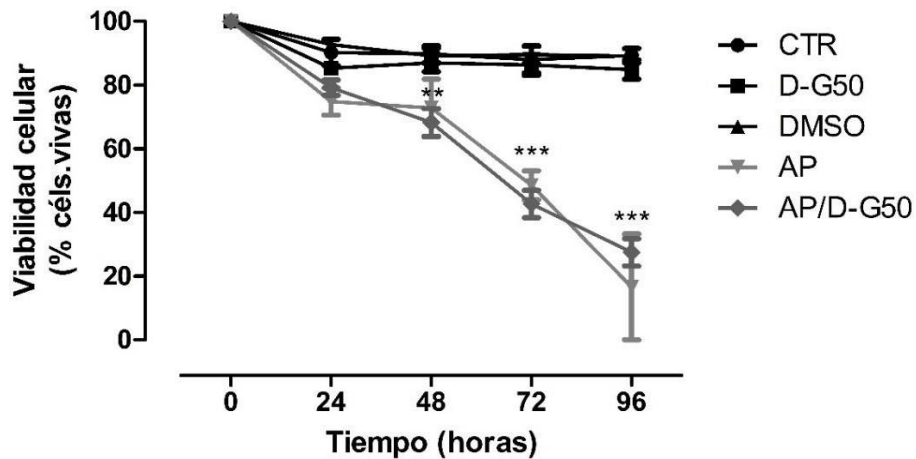
En la co-aplicación (AP/D-G25), el comportamiento de la viabilidad respecto al tiempo tiene una respuesta similar al observado en el tratamiento con AP. Este mismo comportamiento se repite en la co-aplicación de AP/D-M25. Los datos indican que el AP reduce la viabilidad de la glía de Müller, y este efecto es dependiente del tiempo de exposición, pero independiente de la presencia de glucosa o manitol.



**Figura 6. Efecto de las condiciones HG/HL sobre la viabilidad de las células de Müller en cultivo.** Se muestra la disminución de la viabilidad dependiente del tiempo en las condiciones experimentales que contienen AP. Los tiempos de exposición son a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciado el tratamiento. Los datos se muestran como la media  $\pm$  e.e.m. ANOVA con prueba *post-hoc* de Bonferroni, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

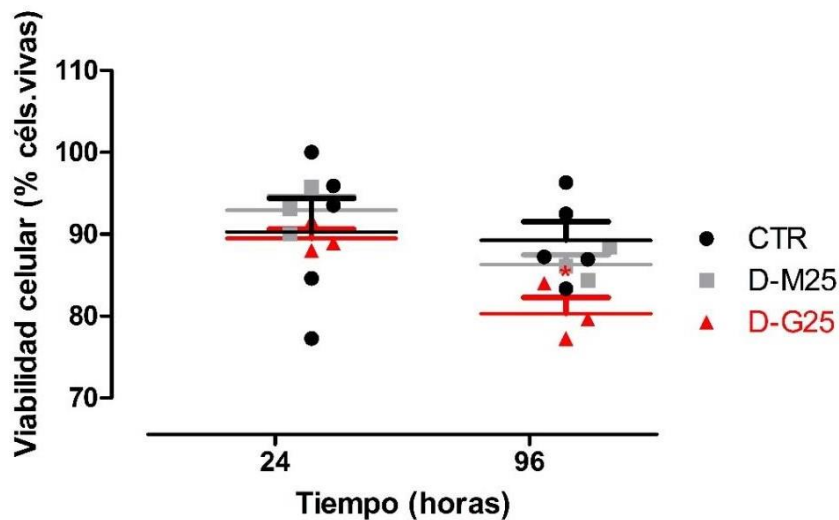
Para evaluar la contribución de la concentración de la glucosa en el modelo experimental, se realizó el mismo ensayo en las condiciones de D-G50 y AP/D-G50 (Figura 7).





**Figura 7. Efecto de las condiciones HG/HL sobre la viabilidad de las células de Müller con glucosa 50mM.** Se muestra la disminución de la viabilidad dependiente del tiempo de exposición en presencia de AP y AP/G-50 a las 24, 48, 72 y 96 horas de iniciado el tratamiento. Los datos se muestran como la media  $\pm$  e.e.m. ANOVA con prueba *post-hoc* de Bonferroni, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Los resultados obtenidos no muestran diferencias en la viabilidad celular de la condición que contiene D- glucosa (D-G50) ( $p > 0.05$ ) respecto al CTR, descartando un efecto sobre la viabilidad celular de la glía de Müller. Sin embargo, para la condición de AP/D-G50 ( $p < 0.001$ ), el porcentaje de células vivas disminuyó con una tendencia similar al observado en AP y AP/D- G25 (Figura 7). Interesantemente, los resultados obtenidos muestran diferencias significativas entre la viabilidad celular en D-G25 ( $t_{(1,4)} = 4.080$ ,  $p = 0.0151$ ) y D-M25 ( $t_{(1,4)} = 3.253$ ) a las 24 horas comparado con la observada a las 96 horas, pero no así para D-G50 ( $t_{(1,6)} = 0.1095$ ,  $p < 0.05$ ) y CTR ( $t_{(1,8)} = 0.2140$ ,  $p < 0.05$ ) (Figura 8). Estos resultados muestran un cambio en la viabilidad de las células de Müller a diferentes tiempos.

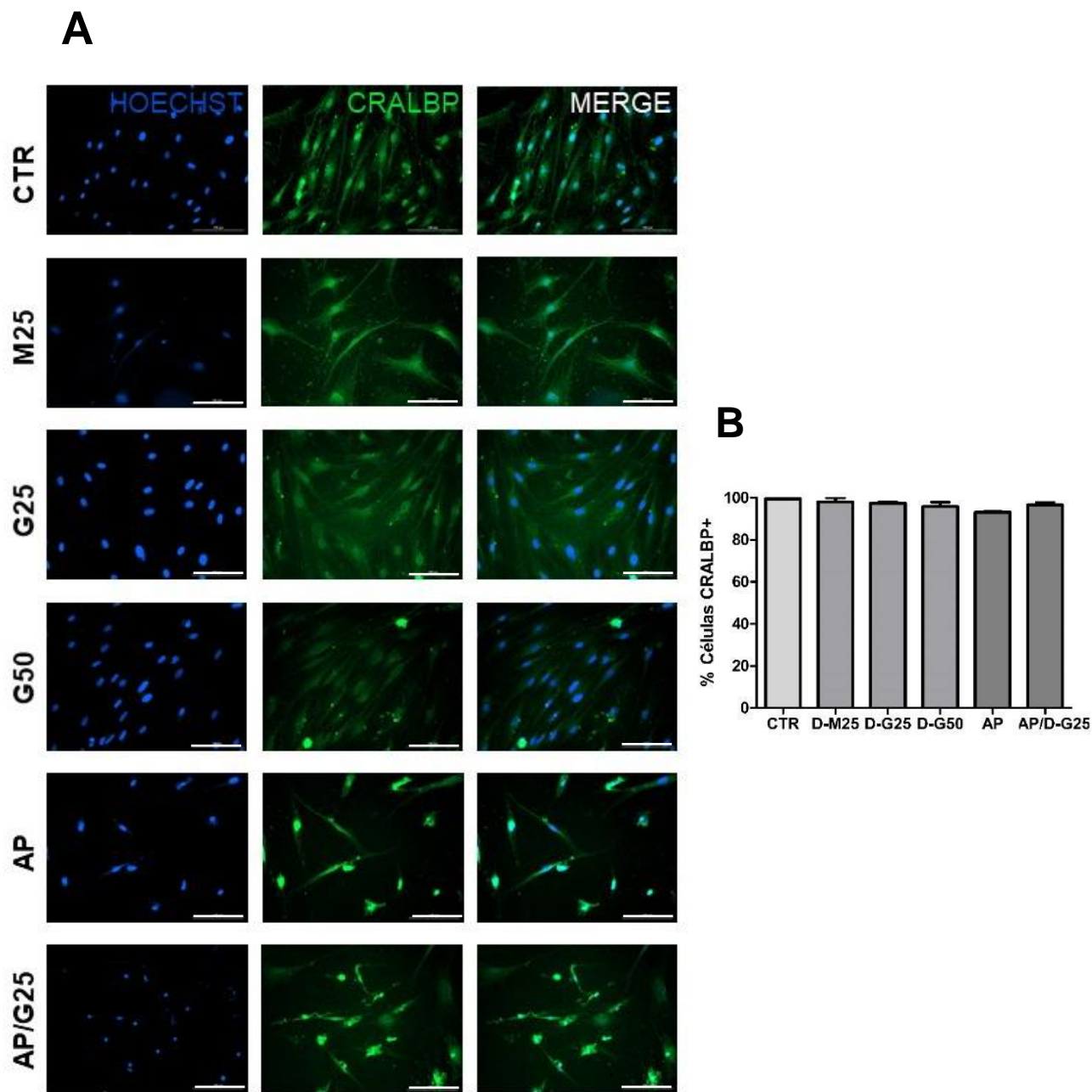


**Figura 8. Efecto de D-G25 en la viabilidad celular de la glía de Müller a diferentes tiempos de exposición.** Se muestra que, en D-G25, la viabilidad de la glía de Müller es diferente a las 24 horas contra las 96 horas de iniciado el tratamiento, pero no para CTR. Se muestra la dispersión de los datos y la media. Prueba t de Student \* $p < 0.05$ .

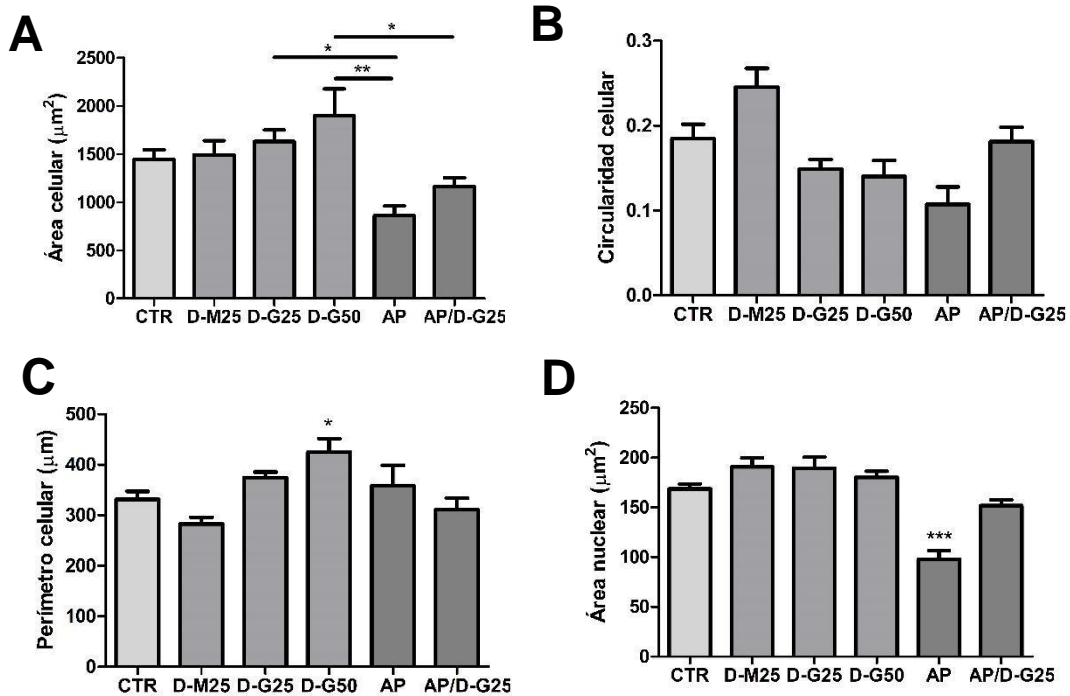
En modelos *in vivo* e *in vitro*, se ha observado una alteración de la morfología celular en presencia de ácidos grasos saturados como el ácido palmítico (Ji et al., 2005; González-Giraldo et al., 2017), o de grandes concentraciones de glucosa (Li et al., 2003; Trudeau et al., 2010), además de la expresión característica de distintos marcadores de estrés celular asociados a la retinopatía diabética (Pusparajah et al., 2016). Por esta razón, decidimos cuantificar proteínas asociadas al estrés en la RD, y las alteraciones morfológicas que sufren las células de Müller en respuesta a este estrés.

## 8.2 Expresión de marcadores de estrés celular en la glía de Müller expuesta a condiciones de hiperglicemia-hiperlipidemia (HG/HL).

Inicialmente, se realizó un marcaje contra CRALBP, una proteína citoplásmica específica de la glía de Müller. Los resultados muestran que, bajo nuestras condiciones experimentales, alrededor del 97% son células CRALBP+. Este porcentaje no cambia entre las diferentes condiciones evaluadas ( $p > 0.05$ ) (Figuras 9 A, B). Las células de Müller en la condición CTR presentan una morfología alargada, similar a la descrita en la literatura (Reichenbach y Bringmann, 2013) (Figuras 5 y 9). Las mediciones morfológicas realizadas indican que no hay un cambio en el tamaño del área celular en comparación con las células CTR bajo los diferentes tratamientos experimentales ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, se observa un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el perímetro de las células expuestas a D-G50 respecto al CTR (Figura 10).

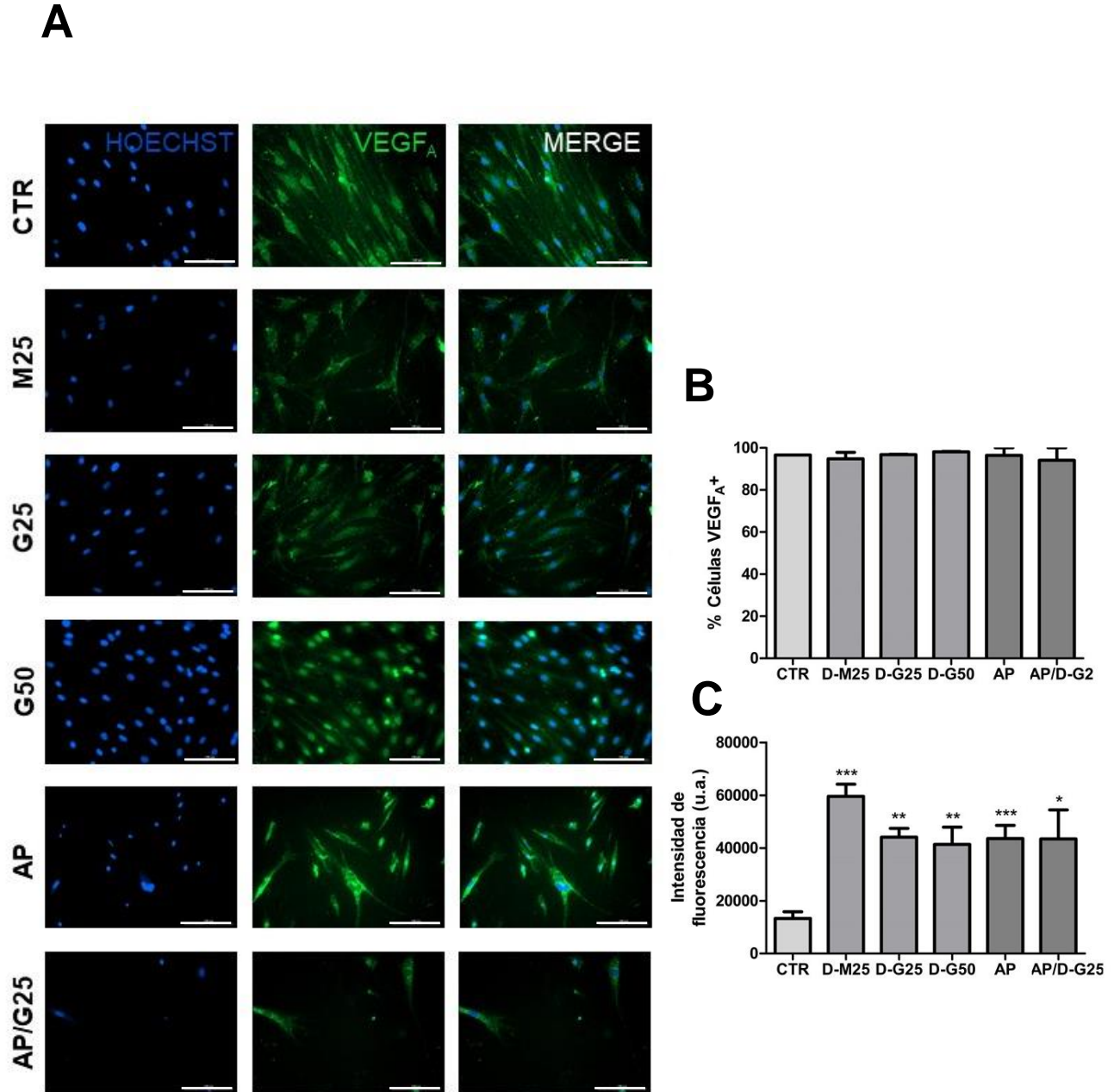


**Figura 9. A)** Expresión de CRALBP (verde) en las células de Müller expuestas a diferentes condiciones experimentales durante 72 horas. Se utilizó la tinción de Hoechst para identificar el núcleo (azul). Imágenes tomadas en aumento de 20X. Escala: 100  $\mu$ m. **B)** Cuantificación de células CRALBP+ en los cultivos expuestos a las diferentes condiciones experimentales. Los datos se muestran como la media  $\pm$  e.e.m. ANOVA con prueba *post-hoc* de Bonferroni,  $p > 0.05$ .



**Figura 10. Morfometría de las células de Müller expuestas a HGL/HL.** A-D nótese el cambio de los diferentes parámetros morfológicos, A) área celular; B) circularidad celular; C) perímetro celular; y D) área celular, siendo las condiciones D-G25, D-G50 y AP las que contienen cambios más claros en estos parámetros. Los datos se muestran como la media  $\pm$  e.e.m. ANOVA con prueba *post-hoc* de Bonferroni \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ .

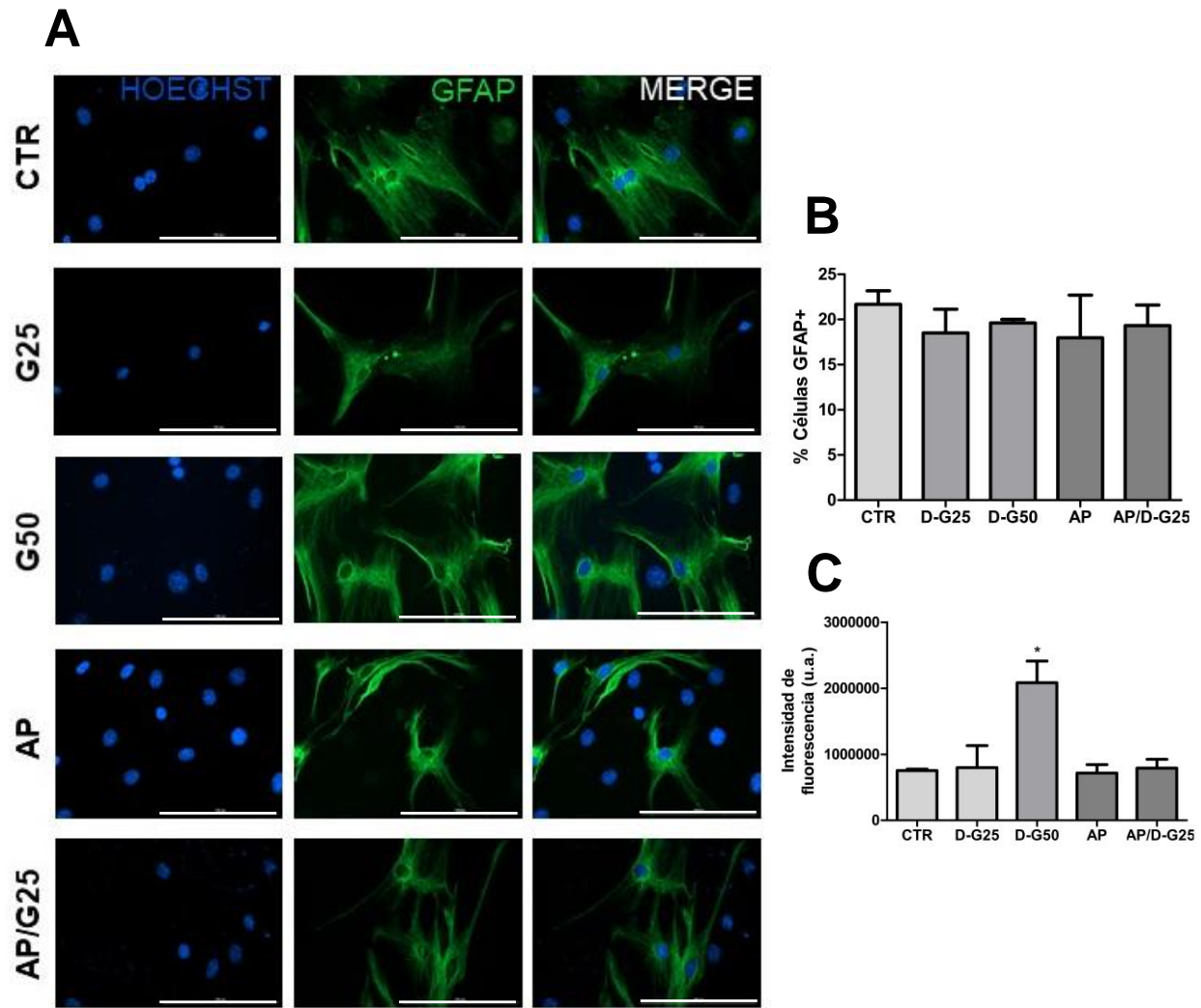
Uno de los procesos degenerativos, característico de la RD, es la neovascularización intraocular. Diferentes estudios señalan al VEGF como un factor clave asociado a este proceso (Bai et al., 2009; Sun et al., 2013). Considerando esto, se realizó en nuestro modelo de RD *in vitro* la medición de VEGF<sub>A</sub>. Como se observa en la Figura 11, los análisis de inmunofluorescencia muestran células VEGF<sub>A+</sub> en todas las condiciones experimentales incluyendo el control (Figuras 11 A y B), sin embargo, se observa un incremento en la intensidad defluorescencia de los diferentes tratamientos experimentales, comparados contra el control (Figura 11C).



**Figura 11. Los tratamientos HG, HL y su co-aplicación (HG/HL) indican posibles cambios en la expresión de VEGF<sub>A</sub>.** A) Expresión de la proteína VEGF<sub>A</sub> (verde) en las células de Müller mantenidas con las diferentes condiciones experimentales durante 72 horas. Se utilizó Hoechst para identificar el núcleo (azul). Imágenes tomadas en aumento de 20X. Escala: 100  $\mu$ m. B) Porcentaje de células positivas para VEGFA. C) Intensidad de fluorescencia para VEGFA en las diferentes condiciones experimentales. Los datos se muestran como la media  $\pm$  e.e.m. ua: unidades arbitrarias. ANOVA con prueba *post-hoc* de Bonferroni \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

GFAP es una proteína asociada al citoesqueleto, característica de las células gliales. En las células de Müller, su expresión ha sido descrita como una respuesta al estrés, incrementando en glía de Müller reactiva (Bringmann y Wiedemann, 2012). Considerando esta característica, se midió de forma indirecta (intensidad de fluorescencia) la expresión de GFAP en las células de Müller expuestas a nuestras condiciones experimentales. Los resultados indican que el número de células GFAP+ no difiere en comparación al grupo CTR ( $p > 0.05$ ), sin embargo, la intensidad de fluorescencia es mayor en D-G50 ( $p < 0.05$ ) (Figura 12). Los resultados obtenidos en este modelo de RD *in vitro* muestran un comportamiento similar al obtenido en modelos *in vivo* de RD, con énfasis particular en la condensación nuclear, el incremento en la expresión de VEGF y de GFAP.

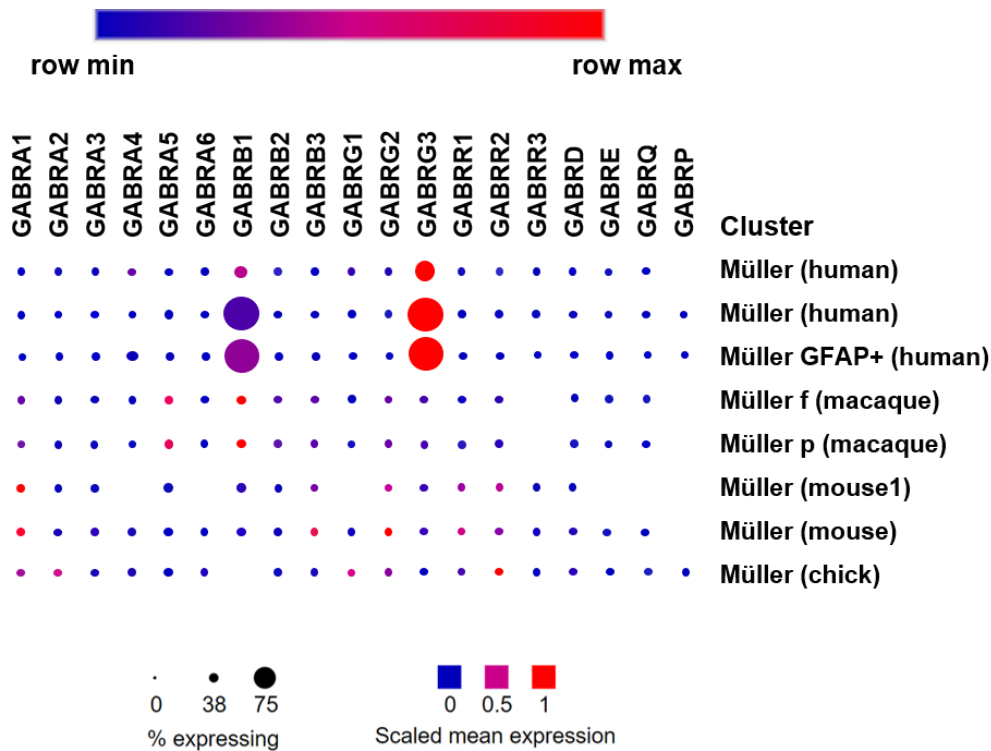
Existen diferentes reportes que muestran alteraciones en el sistema GABAérgico de las células de la retina y de la célula de Müller en condiciones de RD, asociados a la acumulación del aminoácido GABA en el soma, disminución de la expresión de las enzimas GAD y GABA-T, así como el cambio en la expresión de las subunidades del GABA<sub>A</sub>R en otros tipos retinales como las células bipolares (Ramsey et al., 2007). Sin embargo, hasta el momento no ha sido descrito un cambio asociado a GABA<sub>A</sub>R en la célula de Müller bajo condiciones de RD. Por esta razón, decidimos evaluar los cambios en la expresión de las células de Müller expuestas a condiciones *in vitro* que simulan la RD (estímulos HG/HL).



**Figura 12. Efecto de los tratamientos HG/HL en la expresión de GFAP de células de Müller en cultivo.** Sólo los tratamientos hiperglicémicos indican posibles cambios de GFAP en las células de Müller. A) Expresión de la proteína GFAP (verde) en las células de Müller expuestas a las diferentes condiciones experimentales durante 72 horas. Se utilizó la tinción de Hoechst para identificar el núcleo (azul). Imágenes tomadas en aumento de 40X. B) Porcentaje de células GFAP positivas. C) Intensidad de fluorescencia para GFAP en los diferentes tratamientos experimentales. Los datos se muestran como la media  $\pm$  e.e.m. ua: unidades arbitrarias. ANOVA con prueba *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ . Escala: 100  $\mu$ m.

### 8.3 Identificación de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> expresadas en las células de Müller de vertebrados a través de bioinformática.

Con la finalidad de conocer cuáles podrían ser las subunidades que conforman el receptor GABA<sub>A</sub> de la célula de Müller, se realizó una búsqueda bioinformática de datos transcriptómicos. Las bases de datos muestran información de células de Müller de humano (*Homo sapiens sapiens*), macaco (*Macaca fascicularis*), ratón (*Mus musculus*) y pollo (*Gallus gallus*), obtenidas a través de secuenciación de ARN y Drop-seq (Macosko et al., 2015; Shekhar et al., 2016; Peng et al., 2019; Yan et al., 2020; Orozco et al., 2020; Yamagata et al., 2021). Los datos de ratón corresponden a individuos de 14 (Macosko et al., 2015) y 17 días (Shekhar et al., 2016) postnatales. Es importante destacar que el trabajo de Peng y colaboradores (2019) muestra las diferencias de expresión de distintos genes, entre ellos los relacionados al GABA<sub>A</sub>R en la fóvea y en la retina periférica del macaco. De forma similar, el trabajo de Orozco y colaboradores (2020) muestra la alteración de la expresión de los genes en individuos sanos y en pacientes con degeneración macular asociada a la edad (AMD) (Müller + GFAP).



**Figura 13. Mapa de expresión de los genes de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en células de Müller de humano, macaco, ratón y pollo.** El tamaño del círculo determina el porcentaje de expresión en las células, mientras que el color representa la expresión media escalada (scaled mean expression). Análisis de expresión realizado en Single Cell Portal (The Broad Institute, MIT - Harvard) con las bases de datos obtenidas de Macosko et al. (2015), Shekhar et al. (2016), Peng et al. (2019), Yan et al. (2020), Orozco et al. (2020) y Yamagata et al. (2021).



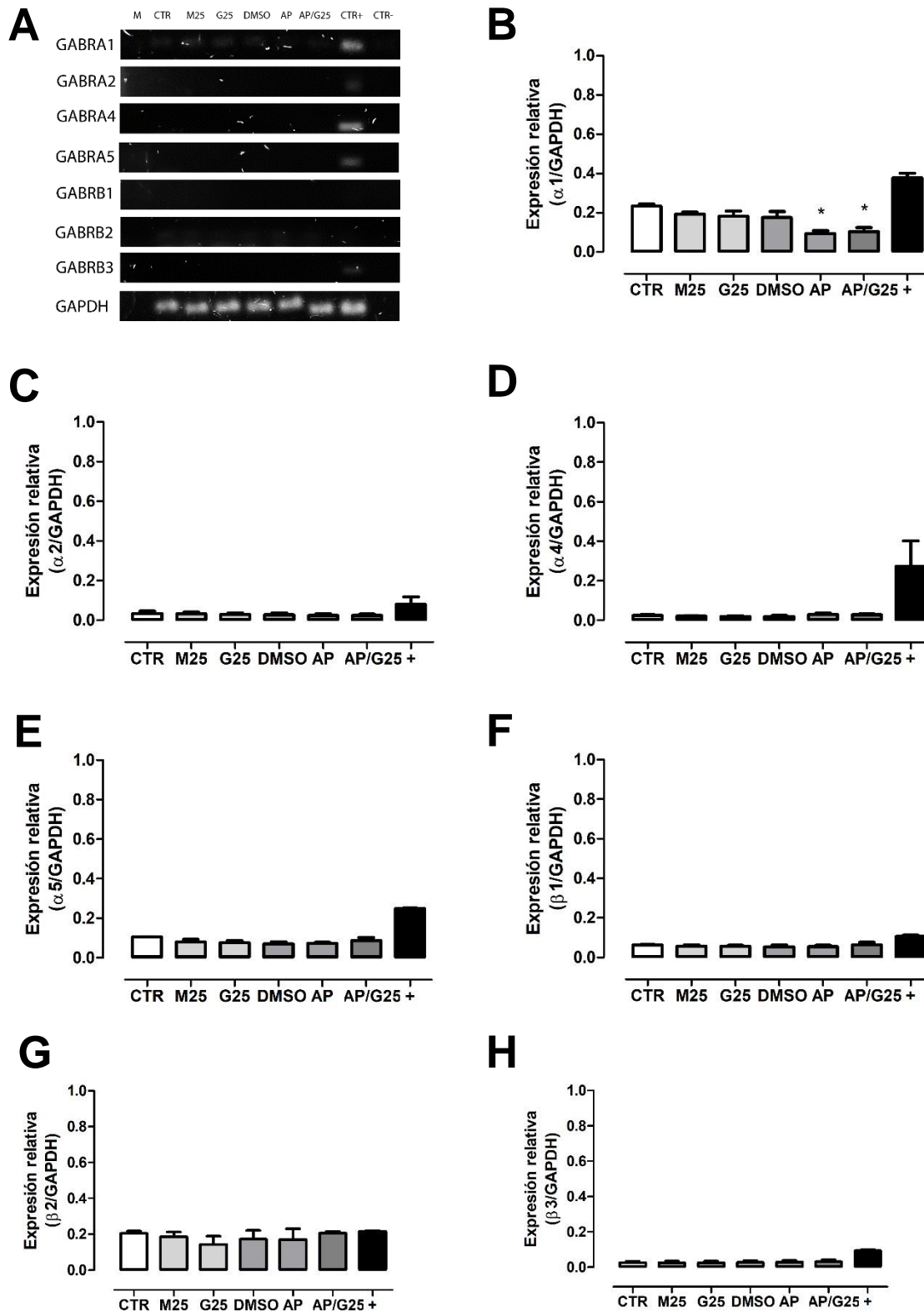
Los datos de los diferentes estudios fueron analizados en el Single Cell Portal (Broad Institute, <https://singlecell.broadinstitute.org/>) y arrojaron un mapa de expresión con la siguiente información; para la célula de Müller de humano las subunidades con mayor expresión son la  $\alpha 4$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 3$  (Yan et al., 2020; Orozco et al., 2020), en macaco:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 5$ ,  $\beta 1$  y  $\gamma 2$  (Peng et al., 2019), en ratón:  $\alpha 1$ ,  $\beta 3$ ,  $\gamma 2$  y  $\rho 1,2$  (Macosko et al., 2015; Shekhar et al., 2016), y finalmente en pollo:  $\alpha 1$ ,  $\alpha 2$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  y  $\rho 2$  (Yamagata et al., 2021) (Figura 13).

#### **8.4 Expresión del ARNm de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en la célula de Müller de ratón en condiciones normales e HG/HL.**

Para dilucidar el arreglo específico de los receptores a GABA<sub>A</sub> de la célula de Müller de ratón, realizamos RT-PCR de cultivos primarios en condiciones normales y en las condiciones de HG/HL. Los resultados muestran que las subunidades expresadas en las células de Müller en condiciones CTR son:  $\alpha 1$  (GABRA1) y  $\beta 2$  (GABRB3). Este arreglo coincide con las bases de datos de Macosko et al. (2015) y Shekhar et al. (2016), donde se reporta la presencia de  $\alpha 1$  en células de Müller de ratón. Es importante mencionar que en este ensayo no se logró detectar las subunidades  $\alpha 3$ ,  $\alpha 6$ ,  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$  y  $\gamma 3$ , tanto en la célula de Müller como en los diferentes controles positivos empleados (corteza, lóbulo frontal, cerebro completo, cerebelo). Esto puede deberse a la edad de los animales (5 a 7 días postnatales), edad en la que se ha reportado que existe una expresión diferencial de las subunidades del receptor a GABA<sub>A</sub>R (Laurie et al., 1992; Fritschy et al., 1994; Sim et al., 2000; Pape et al., 2001). A pesar de que la subunidad  $\gamma 2$  no fue detectada por RT-PCR, el análisis bioinformático predice el transcrito para esta subunidad en este tipo celular, por lo que el arreglo aparente de los GABA<sub>A</sub>R en célula de Müller estaría conformado por  $\alpha 1/\beta 2/\gamma 2$ . Esta conformación correspondería al arreglo tradicional que adquiere el GABA<sub>A</sub>R en los tejidos nerviosos (Wässle et al., 1998).

Como se observa en la Figura 14, las condiciones de AP y AP/G25 son capaces de regular a la baja la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  del GABA<sub>A</sub>R en la célula de Müller de ratón. Este efecto no se observa con ninguna de las otras subunidades estudiadas.

En conclusión, estos resultados señalan un arreglo  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ , para los GABA<sub>A</sub>R en la glía de Müller, cuya expresión es sensible a la presencia del ácido palmítico, pieza clave en el modelo metabólico *in vitro* de retinopatía diabética explorado en este estudio.



**Figura 14. Presencia de los ARNm para las diferentes subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en las células de Müller.** Se observa una expresión diferencial de las subunidades del GABA<sub>A</sub>R en células de Müller expuestas a HG/HL y comparadas con el control. A) Bandas representativas de la expresión de las subunidades del receptor GABA<sub>A</sub> en células de Müller control y con tratamiento. B-H) Expresión relativa para los genes de cada subunidad evaluada. Para el control positivo se

utilizaron muestras de diferentes tejidos nerviosos (reportados en la Tabla 3), el control negativo corresponde a la reacción sin el templado de ADNc. Los datos se muestran como la media  $\pm$  e.e.m. ANOVA con prueba *post-hoc* de Bonferroni. \* $p < 0.05$ .

## 9 DISCUSIÓN

Comparado al CTR, las condiciones de D-G25 y AP disminuyen la viabilidad de las células dependiendo del tiempo de exposición. En el caso de AP, este efecto es considerable, obteniendo únicamente el 16.6% de células viables a las 96 horas. En el caso de la glucosa, debido a su estructura y a su mecanismo de internalización, un incremento en la concentración extracelular de este glúcido puede generar un cambio osmótico en la morfología celular. Sin embargo, la reducción en la viabilidad celular observada representa, aparentemente, un efecto asociado al tiempo de exposición y no a su concentración. Una respuesta similar es reportada por Chen y colaboradores en células de Müller de rata cultivadas *in vitro*, en donde se observa una disminución en la viabilidad del 20% a las 48 horas de exposición a 30 o 60 mM de glucosa (Chen et al., 2018). No podemos descartar un efecto osmótico, aunque es necesario realizar más análisis al respecto. Es importante mencionar que aún es controversial el modelo de hiperglicemia, sin embargo, el análisis de los diferentes modelos experimentales indica que la respuesta a esta condición depende de las características del protocolo y del modelo celular (Chavira-Suárez, 2011; Sun et al., 2013; Vellanki et al., 2016; Capozzi et al., 2018). En cualquiera de los casos, las respuestas corresponden a una respuesta de la célula de Müller a una condición de estrés o daño.

Los resultados obtenidos con AP coinciden con lo observado en otros modelos celulares (Ahn et al., 2013; Liu et al., 2018; Zeng et al., 2020), incluyendo neuronas (Voss et al., 2013) y astrocitos (Gupta et al., 2012; Ortiz-Rodriguez et al., 2018). Las características observadas concuerdan con una compactación citoplasmática y condensación nuclear característica del proceso de apoptosis (Ahn et al., 2013; Voss et al., 2013; Liu et al., 2018). El mecanismo subyacente a estos cambios morfológicos y muerte celular puede ser similar a otros modelos celulares, como el caso de la inducción de estrés reticular con la liberación de especies reactivas de oxígeno y la acumulación de lípidos en el retículo endoplásmico (Ahn et al., 2013; Ortiz-Rodriguez et al., 2018). Además, también se han descrito un incremento en la expresión de proteínas pro-apoptóticas (Bax) y liberación citoplasmática de citocromo c (Ahn et al., 2013; Liu et al., 2018), lo que activa la vía apoptótica intrínseca (caspasa-3, caspasa-9 y el clivaje de PARP) (Liu et al., 2018).

Por otra parte, la co-aplicación de los estímulos, hiperglicémico e hiperlipídico (AP/D-G25 o AP/D-G50), induce la disminución de la viabilidad celular similar a la condición de AP. Los datos también muestran que existe una reducción significativa de la viabilidad a las 24 horas comparada con la viabilidad a las 96 horas en condiciones de D-G25 y D-M25, pero no así para D-G50 y CTR. Esto podría deberse a los mecanismos de regulación del metabolismo de glucosa que posee la célula de Müller. En conjunto, estos datos sugieren que el efecto

lipotóxico es preponderante en comparación con el efecto hiperglicémico. En las condiciones de co-aplicación, la morfometría indica que el área celular es mayor que en AP, muy parecida al grupo CTR. En el caso de la morfología y el área nuclear, el efecto es similar, sugiriendo que el aporte glucémico podría desencadenar mecanismos, probablemente osmóticos, que regulen estos cambios morfológicos sin modificar la viabilidad. Hernández-Benítez y col. reportan un efecto similar en neuronas de la zona subventricular (Hernández-Benítez et al., 2014).

En nuestras condiciones, la inmunoreactividad contra GFAP es mayor en D-G50, consistente como un indicador de estrés celular (Bringmann y Wiedemann, 2012) y característico de la respuesta de las células de Müller ante condiciones de alta glucosa (Guidri et al., 2009; Metteuci et al., 2014). De igual forma, las células expresan VEGF<sub>A</sub>, un marcador de estrés metabólico en la glía de Müller. Esta expresión muestra un incremento en todos los tratamientos experimentales, lo que coincide con las observaciones de otros grupos de investigación en modelos *in vivo* e *in vitro* de RD (Mu et al., 2009; Sun et al., 2013; Kida et al., 2021). Como lo demuestra Bai y colaboradores, el aumento de la expresión del VEGF<sub>A</sub> derivado de las células de Müller es un suceso clave para el desarrollo temprano de la RD, que conlleva a la ruptura de la barrera hematorretinal por un incremento en la permeabilidad vascular (Bai et al., 2009; Yang et al., 2020). Es relevante mencionar que nuestros datos son los primeros que muestran una relación directa, hasta el momento no descrita, entre la presencia de elevadas concentraciones de un ácido graso saturado (AP) y el incremento de la síntesis de VEGF-A. Esta observación es crucial, ya que permite tener un mayor panorama a la participación de los ácidos grasos en la retinopatía diabética como mediadores de la síntesis de factores angiogénicos, y que también apoya la hipótesis de la glía de Müller como la fuente celular de VEGF-A más importante en la neuroretina (Wang et al., 2015).

Durante la fisiopatología de la RD, se altera la captura y respuesta a neurotransmisores como el GABA (Ishikawa et al., 1996a, Li y Puro, 2002; Pannicke et al., 2006). Actualmente se sabe que el GABA<sub>A</sub>R está expresado en la glía de Müller, sin embargo, se desconoce el arreglo específico de sus subunidades. Hasta antes del 2013, diferentes grupos de investigación consideraban que las células de Müller de mamíferos no primates carecían de la expresión de los GABA<sub>A</sub>R. Esta hipótesis surge debido a que reportes señalaban que las células de Müller provenientes de animales como el cobayo, cerdo, ratón, rata y conejo carecían de corrientes cloruro de inactivación rápida, como las observadas en las células de Müller del babuino y humano. En su lugar, las respuestas eléctricas observadas eran corrientes pequeñas y sostenidas, que correspondían a “mecanismos electrogénicos” asociados a la actividad de los transportadores de GABA (Reichelt et al., 1996; Reichelt et al., 1997; Biedermann et al., 2004). Hinds y colaboradores, en 2013, publicaron la primera descripción de la presencia de los GABA<sub>A</sub>R en las células de Müller de rata, detectados a partir de inmunofluorescencia. A diferencia de lo descrito por Biedermann y

colaboradores (2004) para las células de humano, Hinds encuentra una distribución uniforme del receptor en la célula de Müller de la rata. Sin embargo, en este trabajo no se proporciona información acerca de las subunidades encontradas (Hinds et al., 2013).

Los datos obtenidos por el análisis bioinformático (Macosko et al., 2015; Shekhar et al., 2016) sugieren un posible arreglo  $\alpha 1/\beta 3/\gamma 2$  de los GABA<sub>A</sub>R expresados en la célula de Müller de ratón. Estos datos coinciden parcialmente con nuestros resultados preliminares obtenidos por RT-PCR, en donde se observa la presencia de los transcritos para las subunidades  $\alpha 1$  y  $\beta 2$ . Los experimentos de RT-PCR fueron incapaces de detectar la subunidad  $\gamma 2$ , sin embargo, nuestros análisis bioinformáticos sugieren la presencia de esta subunidad la célula de Müller. Esta observación concuerda con los registros eléctricos del GABA<sub>A</sub>R de glía de Müller en mantarraya y humano, los cuales responden a benzodiazepinas como el diazepam (Qian et al., 1994; Qian et al., 1996; Biedermann et al., 2004), en el que se ha descrito que su sitio de unión es la interfaz entre la subunidad  $\alpha$  y  $\gamma 2$  (Richter et al., 2012). Además, Biedermann et al. (2004) realiza un marcaje de células de Müller de humano con un compuesto fluorescente, análogo a benzodiazepinas (Bodipy FL Ro-1986). Con este método logra obtener señal en el soma, en el proceso distal hacia fotorreceptores y en el pie terminal, marcaje que se elimina al añadir un agonista competitivo como el diazepam. Estos reportes indican la posibilidad de que la subunidad  $\gamma 2$  esté evolutivamente conservada en las células de Müller.

Los análisis bioinformáticos del GABA<sub>A</sub>R en ratón muestran una predicción de arreglo distinto al receptor en primates (humano y macaco), que aparentemente presentaría las subunidades  $\alpha 1$ ,  $\alpha 4/\alpha 5$ ,  $\beta 1$ ,  $\gamma 3/\gamma 2$ , siendo conservadas únicamente las subunidades  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$  del ratón (Yan et al., 2020; Orozco et al., 2020; Peng et al., 2019). Es interesante mencionar que, en el caso de mamíferos, las bases consultadas únicamente muestran expresión de las subunidades p1-2 en las células de Müller de ratón, característica que no ha sido descrita hasta el momento en estas células. Este hallazgo, podría estar relacionado a un arreglo estructural y funcional del GABA<sub>A</sub>R, aún no descrito para la modulación GABAérgica en células de Müller. Las subunidades p2,  $\alpha 1$  y  $\gamma 2$  se expresan en las células de Müller de pollo, ratón y macaco (Yamagata et al., 2021), lo que podría sugerir una subunidad evolutivamente conservada en algunos grupos de vertebrados (Figura 8).

Se sabe que las propiedades farmacológicas, localización y fisiología de los GABA<sub>A</sub>R dependen de la combinación de sus subunidades (Greferath et al., 1995; Korpi et al., 2002; Zhang et al., 2003). En este caso, el arreglo predicho para el receptor GABA<sub>A</sub> en la célula de Müller reforzaría la participación de estas células en procesos la transmisión neuronal GABAérgica retiniana (Biedermann et al., 2004), el control del pH debido a la permeabilidad del GABA<sub>A</sub>R a los iones bicarbonato (Bormann et al., 1987), homeostasis del Cl<sup>-</sup> extracelular (Bormann y Kettenmann, 1988), así como la captación de GABA a través de los

transportadores de GABA (Mager et al., 1996; Biedermann et al., 2004).

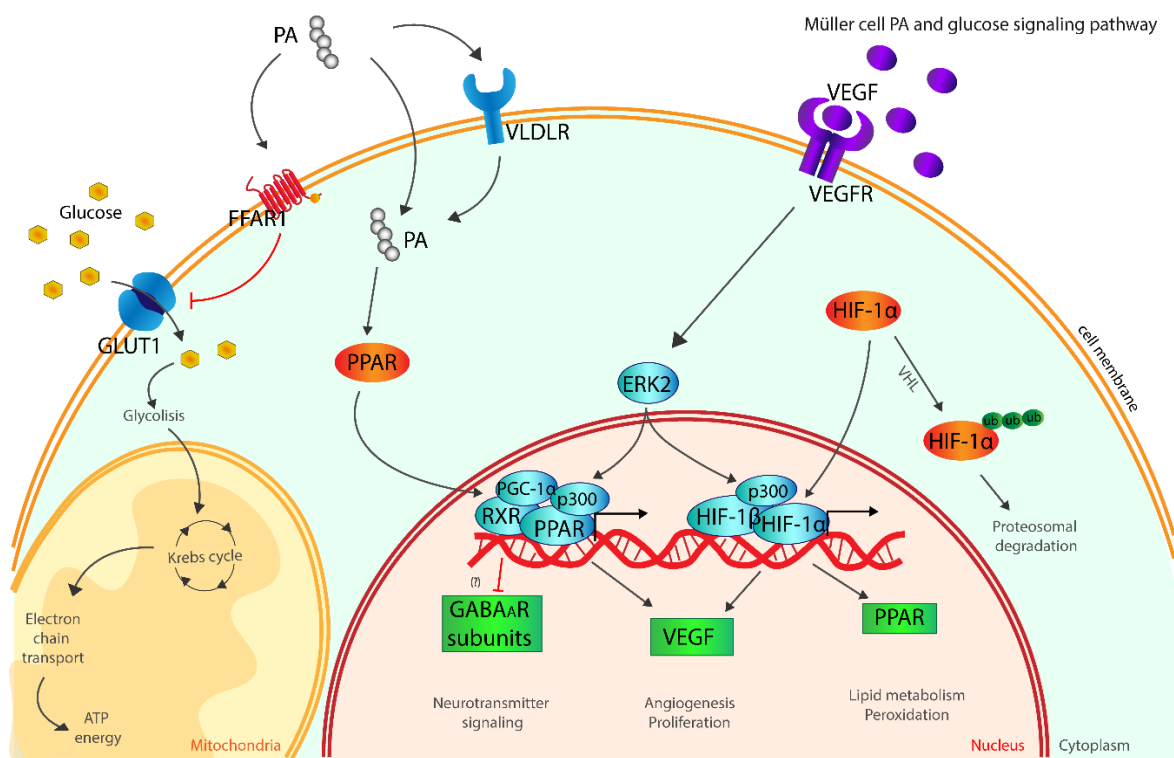
La expresión de la subunidad  $\gamma 2$  es interesante en el arreglo de los receptores GABA<sub>A</sub>R en la célula de Müller. Esta subunidad tiene una amplia distribución en el cerebro, en donde más del 80% de los receptores expresados la contienen y se ubican de manera postsináptica, principalmente durante la sinaptogénesis (Essrich et al., 1998; McKernan y Whiting, 1996; Seeburg et al., 1990). Por otro lado, esta subunidad, puede sugerir la capacidad de las células de Müller de establecer sinapsis con las células neuronales de la retina, con un arreglo parecido al que presentan las interneuronas del hipocampo que establecen sinapsis GABAérgicas con las células NG2 (Passlick et al., 2013; Balia et al., 2013). Esta propuesta surge de los datos obtenidos por bioinformática y RT-PCR (estructura  $\alpha 1\beta 2\gamma 2$ ), sin embargo, son necesarios experimentos que comprueben esta hipótesis.

Por otro lado, nuestros resultados muestran que el AP es capaz de reducir la expresión de la subunidad  $\alpha 1$  del GABA<sub>A</sub>R en las células de Müller, independientemente de la presencia de una alta concentración de glucosa (Figura 14). Hasta el momento, no se había descrito la actividad del AP como regulador transcripcional del GABA<sub>A</sub>R o de algún otro receptor o canal iónico, por lo que estos resultados aportan información novedosa acerca del efecto de la RD en la neurotransmisión GABAérgica, en donde la dislipidemia juega un papel importante en el desarrollo de esta patología. Orozco y colaboradores (2020) (Figura 13) muestran una posible regulación transcripcional de la subunidad  $\beta 1$  del GABA<sub>A</sub>R de la célula de Müller de pacientes con AMD, una patología ocular en donde también se ha encontrado una participación de lípidos en el proceso degenerativo (Fu et al., 2020; Park y Park, 2020).

Se han descrito diferentes funciones y actividades biológicas para el AP, todas dependen del balance entre ácidos grasos poliinsaturados y ácidos grasos saturados, y van desde la composición membranal, palmitilación de proteínas, precursor de moléculas como la palmitoil-coA y de la palmitoiletanolamida (PEA), hasta el crecimiento de tumores, inflamación y apoptosis (Carta et al., 2017), sin embargo poco se sabe acerca de las funciones que podría desempeñar en la alteración de la transcripción de genes. Por ejemplo, algunos estudios reportan un efecto del AP sobre la transcripción de genes involucrados en la oxidación mitocondrial de ácidos grasos de células que desempeñan funciones angiogénicas (Piqueras et al., 2007; Capozzi et al., 2013; Palomer et al., 2017). Este proceso es regulado por receptores PPAR (Peroxisome proliferator-activated receptor), a través de la co-activación de PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ ) (Palomer et al., 2017). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares a hormonas, que se expresan constitutivamente en la retina (Capozzi et al., 2013; Capozzi et al., 2016), en donde modulan la expresión de genes en respuesta a ácidos grasos y algunos agonistas sintéticos (Mukherjee et al., 1997; Rieck et al., 2008). En el cerebro, la expresión de PGC-1 $\alpha$  está localizada principalmente en interneuronas GABAérgicas, y recientemente

Vanaveski y colaboradores (2021) han descrito que la señalización de PGC-1 $\alpha$  incrementa la expresión de la subunidad  $\alpha 2$  del GABA $_A$ R en cerebros de ratón.

El tratamiento de células retinales endoteliales humanas con GW501516, un agonista de PPAR $\beta/\gamma$ , incrementa la expresión del ARNm y síntesis de VEGF (Piqueras et al., 2007). Krishnan y colaboradores (2009) demostraron que, en cardiomiocitos de ratón, HIF-1 $\alpha$  activó directamente la transcripción de PPAR $\gamma$ , un efector clave río abajo para la apoptosis y acumulación de ácidos grasos como el triacilglicerol. Interessantemente, en el laboratorio encontramos que en presencia de AP 250  $\mu$ M, incrementa la expresión del ARNm de HIF-1 $\alpha$  de células de Müller de ratón (datos no mostrados). Esto sugiere que, en las células de Müller, el AP y su co-tratamiento activan el mecanismo que involucra la señalización de PPAR-PGC1 $\alpha$ -HIF1 $\alpha$ , incrementando así síntesis de VEGFA, generando una condensación de la cromatina y modificando la expresión del ARNm de las subunidades del GABA $_A$ R (Figura 15).



**Figura 15. Esquema que muestra los procesos involucrados en la respuesta de las células Müller a las condiciones de hiperglicemia/hiperlipidemia, simuladas por alta glucosa y AP.** (Medina-Arellano et al., en proceso).

En resumen, estos hallazgos sugieren la importancia de la célula de Müller como una fuente endógena retinal de factores angiogénicos (VEGF-A), en respuesta a condiciones que simulan la RD (HG/HL). Por otro lado, el AP podría estar regulando negativamente la transcripción de las subunidades de GABA $_A$ R,

sugiriendo una alteración en la expresión de estos receptores bajo las condiciones patológicas de la RD.

## **10 CONCLUSIONES**

Las altas concentraciones de glucosa, de ácidos grasos saturados (como el AP), o su co-aplicación, inducen cambios morfológicos y un aumento de la expresión de proteínas de estrés como GFAP y VEGFA en las células de Müller de ratón.

Los análisis de los datos transcriptómicos, aunado a los datos obtenidos por RT-PCR, permiten sugerir al arreglo conformado por las subunidades  $\alpha 1/\beta 2/\gamma 2$  como candidatos a conformar el GABA<sub>A</sub>R de las células de Müller de ratón. La expresión del ARNm de la subunidad  $\alpha 1$  se modifica en presencia del ácido palmítico. Es importante mencionar que esta vía no ha sido caracterizada en las células de Müller, por lo que estos datos serían los primeros en reportar el proceso en células gliales, además, aporta información vital acerca del efecto de los ácidos grasos (hiperlipidemia) en la expresión de los receptores a GABA, proceso característico de la RD.



## 11 BIBLIOGRAFÍA

- Ahn JH, Kim MH, Kwon HJ, Choi SY y Kwon HY. (2013). Protective effects of oleic acid against palmitic acid-induced apoptosis in pancreatic AR42J cells and its mechanisms. *Korean J Physiol Pharmacol*, 17: 43-50.
- Ambati J, Chalam K, Chawla D, D'Angio CT, Guillet EG, Rose SJ y Ambati BK. (1997). Elevated  $\gamma$ -aminobutyric acid, glutamate, and vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy. *Arch Ophthalmol*, 115 (9): 1161-1166.
- Antonetti DA, Klein R, Gardner TW. (2010). Are individuals with diabetes seeing better? *Diabetes*, 59 (8): 1853-1860.
- Bai Y, Ma J, Guo J, Wang J, Zhu M, Chen Y y Le YZ. (2009). Müller cell-derived VEGF is a significant contributor to retinal neovascularization. *Journal of pathology*, 219 (4): 446-454.
- Balia M, Vélez-Fort M, Passlick S, Schäfer C, Audinat E, Steinhäuser C, Seifert G y Angulo MC. (2013). Postnatal down-regulation of the GABA<sub>A</sub> receptor  $\gamma$ 2 subunit in neocortical NG2 cells accompanies synaptic-to-extrasynaptic switch in the GABAergic transmission mode. *Cerebral cortex*, 25 (4): 1114-1123.
- Biedermann B, Bringmann A, Franze K, Faude F, Wiedemann P y Reichenbach A. (2004). GABA<sub>A</sub> receptors in Müller glial cells of the human retina. *Glia*, 46: 302-310.
- Bormann J, Hamill OP y Sakmann B. (1987). Mechanism of anion permeation through channels gated by glycine and gamma-aminobutyric acid in mouse cultured spinal neurones. *The Journal of Physiology*, 385(1): 243-286.
- Bormann J y Kettenmann H. (1988). Patch-clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor Cl-channels in cultured astrocytes. *PNAS*, 85(23): 9336-9340.
- Brecha N y Weigmann C. (1994). Expression of GAT-1, a high-affinity gamma-aminobutyric acid plasma membrane transporter in the rat retina. *Journal of Comparative Neurology*, 345: 602-611.
- Bringmann A, Panicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN y Reichenbach A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Prog. in Ret. and Eye Res.*, 25: 397-424.
- Bringmann A, Panicke T, Weick M, Biedermann B, Uhlmann S, Kohlen L, Wiedemann P y Reichenbach A. (2002). Activation of P2Y receptors stimulates potassium and cation currents in acutely isolated human Müller (glial) cells. *Glia*, 37: 139-152.
- Bringmann A y Wiedemann P. (2012). Müller glial cells in retinal disease. *Ophthalmologica*, 227: 1-19.

- Capozzi ME, Giglin MJ y Penn JS. (2018). Palmitic acid induces Müller cell inflammation that is potentiated by co-treatment with glucose. *Nature Scientific reports*, 8: 5459
- Capozzi ME, McCollum GW, Cousins DB y Penn JS. (2016). Linoleic acid is a diabetes-relevant stimulator of retinal inflammation in human retinal Müller cells and microvascular endotelial cells. *Journal of Diabetes Metab*, 7(12).
- Capozzi ME, McCollum GW, Savage SR y Penn JS. (2008). Peroxisome proliferator-activated receptor- $\beta/\delta$  regulates angiogenic cell behaviors and oxygen-induced retinopathy. *IOVS*, 54(6): 4197-4207.
- Carta G, Murri E, Banni S y Manca C. (2017). Palmitic acid: physiological role, metabolism and nutritional implications. *Frontiers in physiology*, 8: 902.
- Chavira-Suárez E, Sandoval A, Felix R y Lamas M. (2011). Expression and high glucose-mediated regulation of K<sup>+</sup> channel interacting protein 3 (KChIP) and KV4 channels in retinal Müller glial cells. *Biochem. and biophys. research comm.*, 404: 678-683.
- Chen H, Ji Y, Yan X, Su G, Chen L y Xiao J. (2018). Berberine attenuates apoptosis in rat retinal Müller cells stimulated with glucose via enhancing autophagy and the AMPK/mTOR signalling. *Biomedicine and pharmacology*, 108: 1201-1207.
- Cossette P, Lachance-Touchette P y Rouleau GA. (2012). Mutated GABA<sub>A</sub> receptor subunits in idiopathic generalized epilepsy. In: Jasper's Basic Mechanisms of the Epilepsies (4th Edition). National Center for Biotechnology, USA.
- Coughlin BA, Feenstra DJ y Mohr S. (2017). Müller cells and diabetic retinopathy. *Vision research*, 139: 93-100.
- Davies NP y Morland AB. (2002). The Hermann-Hering grid illusion demonstrates disruption of lateral inhibition processing in diabetes mellitus. *British Journal of Ophthalmology*, 86(2): 203-208.
- Essrich C, Lorez M, Benson JA, Fritschy JM y Lüscher B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABA<sub>A</sub> receptor subtypes requires the  $\gamma 2$  subunit and gephyrin. *Nature neuroscience*, 1(7): 563-571.
- Franco I, Ortiz-López L, Roque-Ramírez B, Ramírez-Rodríguez GB y Lamas M. (2017). Pharmacological inhibition of DNA methyltransferase 1 promotes neuronal differentiation from rodent and human nasal olfactory stem/progenitor cell cultures. *Int. J. Devl. Neuroscience*, 58: 65-73.
- Franze K, Grosche J, Skatchkov SN, Schinkinger S, Foja C, Schild D, Uckermann O, Travis K, Reichenbach A y Guck J. (2007). Müller cells are living optical fibers in the vertebrate retina. *PNAS*, 104 (20): 8287-8292.
- Fritschy JM, Paysan J, Enna A y Mohler H. (1994). Switch in the expression of rat GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes during postnatal development: an immunohistochemical study. *The Journal of Neuroscience*, 14 (9): 5302-5324.
- Fu Z, Chen CT, Cagnone G, Heckel E, Sun Y, Cakir B, Tomita Y, Huang S, Li Q, Britton W, Cho S, Kern T, Hellström A, Joyal JS y Smith L. (2019). Dyslipidemia in retinal metabolic disorders. *EMBO Molecular Medicine*, 11: e10473.

- Fu Z, Kern TS, Hellström A y Smith LE. (2020). Fatty acid oxidation and photoreceptor metabolic needs. *Journal of Lipid Research*, jlr-TR120000618.
- González-Giraldo Y, Garcia-Segura LM, Echeverria V y Barreto GE. (2017). Tibolone preserves mitochondrial functionality and cell morphology in astrocytic cells treated with palmitic acid. *Molecular Neurobiology*, 55: 4453-4462.
- Greferath U, Müller F, Wässle H, Shivers B y Seeburg P. (1993). Localization of GABA<sub>A</sub> receptors in the rat retina. *Visual Neuroscience*, 10: 551-561.
- Grosche A, Hauser A, Lepper MF, Mayo R, von Toerne C, Merl-Pham J y Hauck SM. (2016). The proteome of native adult Müller glial cells from murine retina. *Molecular and cellular proteomics*, 15: 462-480.
- Guidri C, King JL y Mason III JO. (2009). Fibrocontractive Müller cell phenotypes in proliferative diabetic retinopathy. *IOVS*, 50 (4): 1929-1939.
- Gupta S, Knight AG, Gupta S, Keller JN y Bruce-Keller AJ. (2012). Saturated long-chain fatty acids activate inflammatory signaling in astrocytes. *Journal of Neurochemistry*, 120 (6): 1060-1071.
- Hernández-Benítez R, Sedeño-Cortés A, Ramos-Mandujano G y Pasantes-Morales H. (2014). Regulatory volumen decrease in neural precursor cells: taurine efflux and gene microarray analysis. *Cell Physiol Biochem*, 34(6):2038-2048.
- Hammer SS y Busik JV. (2017). The role of dyslipidemia in diabetic retinopathy. *Vision Res*, 139: 228–236.
- Harada T, Harada C, Watanabe M, Inoue Y, Sakagawa T, Nakayama N. (1998). Functions of the two glutamate transporters GLAST and GLT-1 in the retina. *PNAS*, 95 (8): 4663-4666.
- Hinds K, Monaghan KP, Frolund B, McGeown GJ y Curtis T. (2013). GABAergic control of arteriolar diameter in the rat retina. *IOVS*, 54 (10): 6798-6805.
- Hirano T (2016). GABA pathways and receptors. Capítulo 28. En: Gruol D, Koibuchi N, Manto M, Molinari M, Schmähmann JD y Shen Y (Eds.) *Essentials of Cerebellum and Cerebellar Disorders*. Springer International Publishing, 225-229 pp.
- Hübner C y Holthoff K. (2013). Anion transport and GABA signaling. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7 (177):1-12
- Ishikawa A, Ishiguro SI y Tamai M. (1996a). Accumulation of  $\gamma$ -aminobutyric acid in diabetic rat retinal Müller cells evidenced by electron microscopic immunocytochemistry. *Curr. Eye Res.*, 15(9): 958-964.
- Ishikawa A, Ishiguro S y Tamai M. (1996b). Changes in GABA metabolism in streptozotocin-induced diabetic rat retinas. *Curr. Eye Res.*, 15 (1): 63-71.
- Ji J, Zhang L, Wang P, Mu YM, Zhu XY, Wu YY, Yu H, Zhang B, Chen SM y Sun XZ. (2005). Saturated free fatty acid, palmitic acid, induces apoptosis in fetal hepatocytes in culture. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 56 (6): 369-376.
- Jo AO, Ryskamp DA, Phuong TT, Verkman AS, Yarishkin O, MacAulay N y Krizaj D. (2015). TRPV4 and AQP4 channels synergistically regulate cell volume and calcium

- homeostasis in retinal Müller glia. *The Journal of Neuroscience*, 35 (39): 13525-13537.
- Kida T, Oku H, Osuka S, Horie T, Ikeda T. (2021). Hyperglycemia-induced VEGF and ROS production in retinal cells is inhibited by the mTOR inhibitor, rapamycin. *Scientific reports*, 11(1): 1-9.
- Korpi ER, Gründer G y Lüddens H. (2002). Drug interactions at GABA<sub>A</sub> receptors. *Progress in neurobiology*, 67(2): 113-159.
- Krishnan J, Suter M, Windak R, Krebs T, Felley A, et al. (2009). Activation of a HIF1 $\alpha$ -PPAR $\gamma$  axis underlies the integration of glycolytic and lipid anabolic pathways in pathologic cardiac hypertrophy. *Cell metabolism*, 9 (6): 512-524.
- Laurie DJ, Wisden W y Seeburg PH. (1992). The distribution of thirteen GABA<sub>A</sub> receptor subunit mRNAs in the rat brain. III. Embryonic and postnatal development. *The Journal of Neuroscience*, 12 (11): 4151-4172.
- Li AF, Sato T, Haimovici R, Okamoto T y Roy S. (2003). High glucose alters connexin 43 expression and gap junction intercellular communication activity in retinal pericytes. *IOVS*, 44: 5376-5382.
- Li Q y Puro DG. (2002). Diabetes-induced dysfunction of the glutamate transporter in retinal Müller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43 (9): 3109-3116.
- Liu T, Chen X, Sun J, Jiang X, Wu Y, Yang S, Huang H, Ruan X y Du X. (2018). Palmitic acid-induced podocyte apoptosis via the reactive oxygen species-dependent mitochondrial pathway. *Kidney and Blood Pressure Research*, 43 (1): 206-219.
- López Bolaños, A. (2012). Capítulo 1. En: Rojas Juárez, S. y Saucedo Castillo (Eds), A. Retina y vítreo (2<sup>o</sup> Ed). Asociación Mexicana de Retina, A.C. Manual moderno: Ciudad de México.
- Macosko EZ, Basu A, Satija R, Nemesh J, Shekhar K, Goldman M, Tirosh I, Bialas AR, Kamitaki N, Martersteck EM, Trombetta JJ, Weitz DA, Sanes JR, Shalek AK, Regev A y McCarroll SA. (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets. *Cell*, 161 (5): 1202-1214.
- Mager S, Kleinberger-Doron N, Keshet GI, Davidson N, Kanner BI y Lester HA. (1996). Ion binding and permeation at the GABA transporter GAT1. *Journal of Neuroscience*, 16(17): 5405-5414.
- Malchow RP, Qian H y Ripps H. (1989). Gamma-aminobutyric acid (GABA)-induced currents of skate Müller (glial) cells are mediated by neuronal-like GABA<sub>A</sub> receptors. *PNAS*, 86: 4326-4330.
- McKernan RM y Whiting PJ. (1996). Which GABA<sub>A</sub>-receptor subtypes really occur in the brain? *Trends in Neurosciences*, 19(4): 139-143.
- Mendu SK, Bhandage A, Jin Z y Birnir B. (2012). Different subtypes of GABA-A receptors are expressed in human, mouse and rat T lymphocytes. *PloS one*, 7(8): e42959.
- Metteucci A, Gaddini L, Villa M, Varano M, Parravano M, Monteleone V, Cavallo F, Leo L, Macosko EZ, Basu A, Satija R, Shalek AK, Regev A y McCarroll SA (2015). Highly parallel genome-wide expression profiling of individual cells using nanoliter droplets.

*Cell*, 161 (5): 1202-1214.

- Mohr S, Xi X, Tang J, Kern T. (2012). Caspase activation in retinas of diabetic and galactosemic mice and diabetic patients. *Diabetes*, 51 (4): 1172-1179.
- Mu H, Zhang X, Liu J, Dong L, Feng Z. (2009). Effect of high glucose concentration on VEGF and PEDF expression in cultured retinal Müller cells. *Mol Biol Rep*, 36 (8): 2147-2151.
- Mukherjee R, Jow L, Croston GE y Paterniti JR Jr. (1997). Identification, characterization, and tissue distribution of human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) isoforms PPAR $\gamma$ 2 versus PPAR $\gamma$ 1 and activation with retinoid X receptor agonists and antagonists. *J Biol Chem*, 272: 8071-8076.
- Naffa MM, Hung S, Chebib M, Johnston GA y Hanrahan J. (2017). GABA-p receptors: distinctive functions and molecular pharmacology. *British Journal of Pharmacology*, 174: 1881-1894.
- Orozco LD, Chen HH, Cox C, Katschke KJ, Arceo R, et al. (2020). Integration of eQTL and a single-cell atlas in the human eye identifies causal genes for age-related macular degeneration. *Cell reports*, 30 (4): 1246-1259.
- Ortiz-Rodriguez A, Acáz-Fonseca E, Boya P, Arevalo MA y Garcia-Segura LM. (2018). Lipotoxic effects of palmitic acid on astrocytes are associated with autophagy impairment. *Molecular neurobiology*, 56(3): 1665-1680.
- Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E y Vázquez-Carrera M. (2017). Palmitic and oleic acid: the yin and yang of fatty acids in type 2 diabetes mellitus. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 29 (3): 178-190.
- Pannicke T, Iandiev I, Wurm A, Uckermann O, von Hagen F, Reichenbach A, Wiedemann P, Hammes HP, Bringmann A. (2006). Diabetes alters osmotic swelling characteristics and membrane conductance of glial cells in rat retina. *Diabetes*, 55 (3): 633-639.
- Pape JR, Skynner MJ, Sim JA y Herbison AE. (2001). Profiling  $\gamma$ -Aminobutyric acid (GABAA) receptor subunit mRNA expression in postnatal Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) neurons of the male mouse with single cell RT-PCR. *Neuroendocrinology*, 74: 300-308.
- Park SJ y Park DH. (2020). REvisiting lipids in REtinal diseases: a focused review on age-related macular degeneration and diabetic retinopathy. *Journal of Lipid Atherosclerosis*, 9(3): 406-418.
- Passlick S, Grauer M, Schäfer C, Jabs R, Seifert G y Steinhäuser C. (2013). Expression of the  $\gamma$ 2-subunit distinguishes synaptic and extrasynaptic GABAA receptors in NG2 cells of the hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 33(29): 12030-12040.
- Peng YR, Shekhar K, Yan W, Herrmann D, Sappington A, Bryman GS y Sanes JR. (2019). Molecular classification and comparative taxonomics of foveal and peripheral cells in primate retina. *Cell*, 176(5), 1222-1237.
- Piqueras L, Reynolds AR, Hodivala-Dilke KM, et al. (2007). Activation of PPAR $\beta$ /delta induces endothelial cell proliferation and angiogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*

(27):63–69.

- Poitry-Yamate CL, Poitry S y Tsacopoulos M. (1995). Lactate released by Muller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *Journal of Neuroscience*, 15(7): 5179-5191.
- Pusparajah P, Lee LH y Kadir KA. (2016). Molecular markers of diabetic retinopathy: potential screening tool of the future? *Front. Physiol.*, 7: 200.
- Qian H, Malchow RP, Chappell RL y Ripps H. (1994). The GABA<sub>A</sub> receptors of Müller (glial) cells in skate retina. *Biol. Bull*, 187: 263-265.
- Qian H, Malchow RP, Chappell RL y Ripps H. (1996). Zinc enhances ionic currents induced in skate Müller (glial) cells by the inhibitory neurotransmitter GABA. *Proc. R. Soc. Lond. B*, 263: 791-796.
- Ramsey D, Ripps H y Qian H. (2007). Streptozotocin-induced diabetes modulates GABA receptor activity of rat retinal neurons. *Experimental Eye Research*, 85 (3): 413-422.
- Reichelt W, Hernández M, Damian R, Kisaalita W y Jordan BL. (1996). GABA<sub>A</sub> receptor currents recorded from Müller glial cells of the baboon (*Papio cynocephalus*) retina. *Neuroscience Letters*, 203: 159-162
- Reichelt W, Pannicke T, Biedermann B, Francke M y Faude F. (1997). Comparison between functional characteristics of healthy and pathological human retinal Müller glial cells. *Survey of ophthalmology*, 42 (1): 105-117.
- Reichenbach A y Bringmann A. (2013). New functions of Müller cells. *Glia*, 61: 651-678.
- Richter L, de Graaf C, Sieghart W, Varagic Z, Mörzinger M, de Esch IJP, Ernst M. (2012). Diazepam-bound GABA<sub>A</sub> receptor models identify new benzodiazepine binding-site ligands. *Nature Chemical Biology*, 8(5), 455–464.
- Rieck M, Meissner W, Ries S, Müller-Brüsselbach S y Müller R. (2008). Ligand-mediated regulation of Peroxisome-proliferator-activated receptor (PPAR)  $\beta/\delta$ : A comparative análisis of PPAR-selective agonists and All-trans retinoic acid. *Molecular pharmacology*, 74: 1269-1277.
- Sacks FM, Hermans MP, Fioretto P, Valensi P, Davis T, Horton E, Wanner C, Al-Rubeaan K, Aronson R, Barzon I (2014). Association between plasma triglycerides and high-density lipoprotein cholesterol and microvascular kidney disease and retinopathy in type 2 diabetes mellitus: a global case-control study in 13 countries. *Circulation*, 129: 999–1008
- Seeburg PH, Wisden W, Verdoorn TA, Pritchett DB, Werner P, Herb A y Sakmann B. (1990). The GABA<sub>A</sub> receptor family: molecular and functional diversity. In Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology (Vol. 55, pp. 29-40). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Shekhar K, Lapan SW, Whitney IE, Cepko CL, Regev A y Sanes JR. (2016). Comprehensive classification of retinal bipolar neurons by single-cell transcriptomics. *Cell*, 166 (5): 1308-1323.
- Sim JA, Skynner MJ, Pape JR y Herbison AE. (2000). Late postnatal reorganization of GABA<sub>A</sub> receptor signalling in native GnRH neurons. *European Journal of*

*Neuroscience*, 12: 3497-3504.

- Sun Y, Wang D, Ye F, Hu DN, Liu X, Zhang L, Gao L, Song E y Zhang DY. (2013). Elevated cell proliferation and VEGF production by high-glucose conditions in Müller cells involve XIAP. *Eye*, 27(11): 1299-1307.
- Trudeau K, Molina AJ, Guo W y 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.
- Tzekov R y Arden GB. (1999). The electroretinogram in diabetic retinopathy. *Survey of Ophthalmology*, 44(1): 53-60.
- Vanaveski T, Molchanova S, Pham DD, Schäfer A, Pajanoja C, et al. (2021). PGC-1 $\alpha$  signaling increases GABA(A) Receptor subunit  $\alpha$ 2 expression, GABAergic neurotransmission and anxiety-like behavior in mice. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 14.
- Vardi N y Sterling P. (1994). Subcellular localization of GABA<sub>A</sub> receptor on bipolar cells in macaque and human retina. *Vision research*, 34(10): 1235-1246.
- Vecino E, Rodríguez FD, Ruzafa N, Pereiro X, Sharma SC. (2016). Glia-neuron interactions in the mammalian retina. *Progress in Retinal and Eye Research*, 1-39
- Vellanki S, Ferrigno A, Alanis Y, Betts-Obregon BS y Tsin AT. (2016). High glucose and glucose deprivation modulate Müller cell viability and VEGF secretion. *Int J Ophthalmol Eye Sci*, 4 (2): 178-183.
- Voss U, Sand E, Olde B y Ekblad E. (2013). Enteric neuropathy can be induced by high fat diet *in vivo* and palmitic acid exposure *in vitro*. *PLoS ONE*, 8 (12): e-81413-e81413
- Wang JJ, Zhu M y Le Z. (2015). Functions of Müller cell-derived vascular endothelial growth factor in diabetic retinopathy. *World Journal of Diabetes*, 6(5): 726-733.
- Wässle H, Koulen P, Brandstätter JH, Fletcher EL y Becker CM. (1998). Glycine and GABA receptors in the mammalian retina. *Vision Research*, 38: 1411-1430.
- Winkler BS, Arnold MJ, Brassell MA y Puro DG. (2000). Energy metabolism in human retinal Müller cells. *IOVS*, 41 (10): 3183-3190
- Wong TY, Gemmi Cheing CM, Larsen M, Sharma S y Simó R. (2016). Diabetic retinopathy. *Nature Reviews Disease Primers*, 2.
- Xu Z, Wei Y, Gong J, Cho H, Park JK, Sung ER, Huang H, Wu L, Eberhart C, Handa JT, Du Y, Kern TS, Thimmulappa R, Barber AJ, Biswal S y Duh EJ. (2014). NRF2 plays a protective role in diabetic retinopathy in mice. *Diabetologia*, 57: 204-213.
- Yamagata M, Yan W y Sanes JR. (2021). A cell atlas of the chick retina based single-cell transcriptomics. *eLife*, 10: e63907.
- Yan W, Peng Y, Zyl T, Regev A, Shekhar K, Juric D y Sanes JR. (2020). Cell atlas of the human fovea and peripheral retina. *Scientificreports*, 10(1): 1-17.
- Yang S, Zhang J y Chen L. (2020). The cells involved in the pathological process of diabetic retinopathy. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 132: 110818.

- Yego E, Vincent JA, Sarthy V, Busik JV, Mohr S. (2009). Differential regulation of High glucose-induced glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase nuclear accumulation in Müller cells by IL-1 $\beta$  and IL-3. *IOVS*, 50 (4): 1920-1928.
- Zeng X, Zhu M, Liu X, Chen X, Yuan Y, Li L, Liu J, Lu Y, Cheng J y Chen Y. (2020). Oleic acid ameliorates palmitic acid induced hepatocellular lipotoxicity by inhibition of ER stress and pyroptosis. *Nutrition and Metabolism*, 17(1): 1-14.
- Zhang J, De Blas AL, Miralles CP y Yang CY. (2003). Localization of GABAA receptor subunits  $\alpha$ 1,  $\alpha$ 3,  $\beta$ 1,  $\beta$ 2/3,  $\gamma$ 1, and  $\gamma$ 2 in the salamander retina. *The Journal of Comparative Neurology*, 459: 440-453.