

Inducción de cataratas experimentales en ratas diabetizadas con estreptozotocina.

PATRICIA VIT¹, ROSA DE JESÚS^{1,2}, MILEYNA GUDIÑO², TIM JACOB³.

¹ Apiterapia y Vigilancia Ambiental (APIVA), Departamento de Ciencia de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela, e-mail: vit@ula.ve ². Bioterio Central, Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela. ³ Physiology Unit, Molecular and Medical Bioscience Department, University of Wales, Cardiff, UK.

RESUMEN

Las cataratas son la primera causa de ceguera en el mundo, con mayor prevalencia en los países tropicales. El implante de lente intraocular es costoso; sin embargo, es válido porque aún no se ha demostrado la acción anticatarata de un agente universal. En este trabajo se comparan dos aplicaciones de estreptozotocina para reproducir un modelo experimental de cataratas obtenidas en ratas diabetizadas. Este modelo es aceptado en la literatura científica. La validación de su protocolo se realiza con fines de investigación y de docencia en la lucha contra la ceguera. Sólo se obtuvieron cataratas en las ratas inyectadas intraperitonealmente y aún en este grupo, la variabilidad fue elevada. Futuros ajustes son requeridos para aumentar la repetibilidad dentro del grupo con cataratas experimentales.

ABSTRACT

Cataracts are the first cause of blindness in the world with major prevalence in the tropics. Intraocular lens is an expensive solution and is valid because a universal anticataract agent is not available. In this work, two streptozotocin applications are compared to reproduce an experimental cataract model in diabetic rats. This model is accepted in the scientific literature. The validation of this protocol is for research and teaching purposes in the fight of blindness. Cataracts were obtained only in the group with intraperitoneal injection and even here the variability was high. Further refinement is required to increase repeatability within the cataractous group.

PALABRAS CLAVE

Catarata, diabetes, estreptozotocina, glucosa sanguínea, intraperitoneal, intravenosa, lámpara de hendidura.

AGRADECIMIENTO

Este trabajo ha sido financiado por un Premio para el Desarrollo de Investigación en Medicina Tropical del Wellcome Trust, UK, Ref:049309/Z/96/Z/077/CSD/JL. Los autores agradecen al personal técnico del Bioterio Central de la Universidad de Los Andes por el mantenimiento de los animales y a Topcon de Venezuela por su asistencia técnica. Este trabajo no habría sido posible sin la ayuda recibida por el CDCHT-ULA con sus programas integrados para financiamiento de proyectos y apoyo directo a grupos.

INTRODUCCIÓN

Las cataratas son la primera causa de ceguera en el mundo, con mayor prevalencia en los países tropicales (Harding, 1991). El implante de lente intraocular es efectivo pero la cirugía es costosa. Aún no se ha demostrado la acción anticatarata de un agente universal. La reproducción de cataratas experimentales es de suma importancia para el estudio de agentes anticatarata. Si bien existen numerosos tipos de cataratas, la catarata diabética es quizás la preferida en trabajos experimentales a fin de estudiar los componentes osmóticos que intervienen en la opacificación del cristalino.

Las ratas son los animales experimentales más reportados en la literatura científica de cristalinos y cataratas. La inducción de diabetes en ratas puede lograrse con inyecciones de aloxan y de estreptozotocina o también con alimentación a base de galactosa. Las ratas diabéticas generan cataratas a distinta velocidad dependiendo del tipo de inducción de diabetes. En los estados diabéticos no se produce suficiente insulina y ello eleva la glucosa sanguínea, lo cual causa un incremento de la glucosa en el cristalino ocular (Spiro, 1976), donde puede penetrar por simple difusión (Patterson y Delamere, 1992). Este elevado nivel de glucosa ocasiona la glicación de las proteínas

lenticulares y pérdida de la transparencia del cristalino, proceso que también se ha utilizado para explicar el envejecimiento de proteínas de larga duración (Monnier y Cerami, 1979). La glicación causa además efectos de autofluorescencia, propiedad que ha sido utilizada para su control en forma no invasiva (Abiko *et al.*, 1999). Cualquier medicamento que prevenga la glicación, estaría retardando la aparición de cataratas oculares causadas por diabetes. Por ejemplo, se ha demostrado la protección de la aspirina, el paracetamol y el ibuprofen en bioensayos con ratas diabéticas (Blakytyn y Harding, 1992).

En este trabajo, se compara la inyección de estreptozotocina por vía intravenosa en la base de la cola, con la inyección por vía intraperitoneal para obtener ratas diabéticas a fin de inducir cataratas experimentales que puedan ser observadas con lámpara de hendidura y permitan el estudio de agentes anticatarata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Manipulación de ratas.

Se trabajó con ratas Wistar machos (BIOULA, Mérida, Venezuela) con pesos iniciales comprendidos en el rango 120-195 g., distribuidos en tres cajas de cinco animales con medias y desviaciones estándar similares. Cada semana se midió el peso corporal, la concentración de glucosa sanguínea y se capturaron imágenes digitalizadas de cristalinios oculares observados con lámpara de hendidura.

Aplicación de estreptozotocina.

Para inducir la diabetes, las ratas fueron inyectadas con estreptozotocina (Merck, USA). El grupo control recibió inyección intraperitoneal con buffer citrato de sodio 0.2M pH 4.5. La estreptozotocina se diluyó con el buffer inmediatamente antes de su uso y se mantuvo en hielo hasta inyectar 65 mg. kg⁻¹ por vía intraperitoneal y 30 mg. kg⁻¹ por vía intravenosa en la base de la cola (Figura 1). Los animales se observaron durante ocho semanas.

Observaciones del cristalino con la lámpara de hendidura.

Se utilizó una lámpara Topcon SL-4ED (Tokyo, Japan) que se muestra en la Figura 2. Cada rata se envolvió con una tela para sujetar la cabeza en la mentonera con el ojo paralelo al plano de la hendidura. El rayo luminoso se reguló a 35°, la longitud de la hendidura se fijó en 14, el anillo de barrido se mantuvo en 45° y el control de rotación de la hendidura se fijó a 90°. Se seleccionó el filtro blanco y se trabajó con un

aumento de 25x. Estas observaciones permitieron elaborar diagramas (Figura 3) como los sugeridos por Kinoshita (1974) para asignar el grado de evolución de la catarata según sea 1 (sin catarata), 2 (incipiente, con suturas engrosadas), 3 (progresiva, con opacidades radiales desde el ecuador), 4 (creciente, con vacuolas dispersas), 5 (madura, con opacificación generalizada).

Captura de imágenes.

Una cámara de video monocromática (Cohu serie 4910, San Diego, USA) y software Scion Image 1997 fueron utilizados para capturar imágenes luego de enfocar el ojo. Las imágenes capturadas en series fueron modificadas para aumentar el contraste entre las zonas sanas del cristalino y las deterioradas, a fin de identificar su ubicación espacial y realizar futuras comparaciones cuantitativas.

Glucosa sanguínea.

Se midió en suero obtenido por sangrado de colas laceradas de ratas mantenidas 4 h en ayuno. El análisis se realizó utilizando el kit (Ultralab, Caracas, Venezuela) a base de glucosa oxidasa. Las lecturas se realizaron a 546 nm en un espectrofotómetro (Boehringer, Mannheim, Alemania).

RESULTADOS

Se comparan los pesos corporales y el contenido de glucosa sanguínea (Figura 4) entre la primera y la octava semanas posteriores a la inyección de estreptozotocina. Según la escala hedónica de la Figura 3, sólo dos ratas del grupo inyectado intraperitonealmente presentaron cataratas en el período de observación, correspondientes al grado 2 incipiente y al grado 3 progresiva.

En la Figura 5 se presentan imágenes digitalizadas de un cristalino sano y de un cristalino opaco con catarata diabética. En éste último pueden observarse las suturas blanquecinas típicas de la catarata incipiente y las estrías radiales características de una catarata en progreso.

DISCUSIÓN

Se obtuvieron cataratas diabéticas. La inyección de estreptozotocina intravenosa produjo un proceso de diabetes más lento que la inyección intraperitoneal. Si bien se trabajó con dos dosis, a fin de seguir los protocolos disponibles (Blakytyn y Harding, 1992; Lambertus de Marcucci, 1993), los efectos obtenidos permiten confirmar que las dosis empleadas son

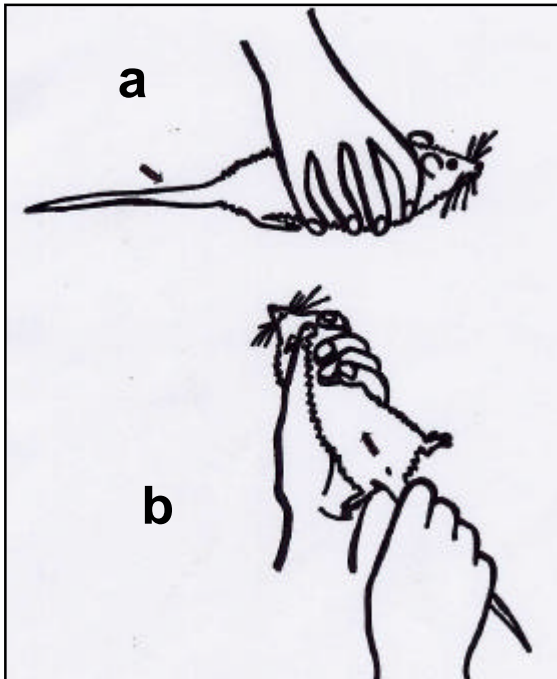


Figura 1. Posición de las inyecciones de estreptozotocina.
a) Intravenosa. b) Intraperitoneal.



Figura 2. Observación de la rata con la lámpara de hendidura.

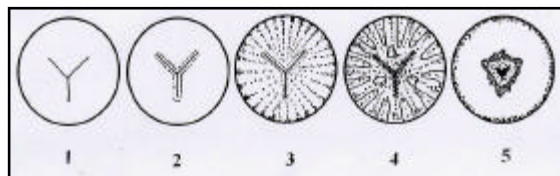


Figura 3. Grados de evolución de las cataratas experimentales.
1. Sin cataratas. 2. Incipiente con suturas engrosadas. 3. Progresiva, con opacidades radiales desde el ecuador. 4. Creciente, con vacuolas dispersas. 5. Madura, con opacificaciones generalizadas.

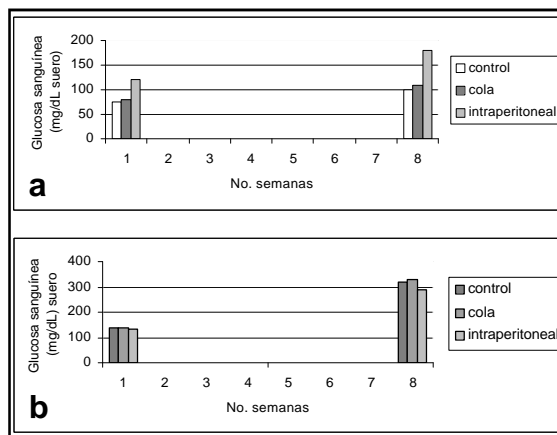


Figura 4. Comparación del tipo de aplicación de estreptozotocina en la primera y octava semanas. a) Pesos corporales. b) Glucosa sanguínea.

adecuadas para cada vía de administración a fin de producir y mantener ratas diabéticas. Sin embargo, la aplicación intraperitoneal fue más efectiva para producir cataratas tempranas. En el período de experimentación de ocho semanas, no ha sido necesario reinyectar los animales para mantener su condición diabética. Sólo se obtuvieron cataratas en las ratas inyectadas intraperitonealmente y aun en este grupo, la variabilidad fue elevada; por ello, futuros ajustes son requeridos para aumentar la repetibilidad dentro del grupo con cataratas experimentales.

Este trabajo es una contribución para la validación de protocolos experimentales de bioensayos que permitan estudiar drogas anticatarata en la Universidad de Los Andes. A su vez, constituye un aporte para nuevas prácticas docentes de la carrera de Bioanálisis. Dos estudios inmediatos nos ocupan: 1. La evaluación de mieles de *Trigona (Tetragonisca) angustula angustula*, abeja sin aguijón conocida como angelita. Estas mieles tienen la aceptación popular de curar las cataratas en Brasil y Venezuela; sin embargo, no se ha evaluado científicamente tal propiedad curativa. 2. La evaluación de mieles de *Apis mellifera* utilizadas en Rumania para el mismo fin. Los flavonoides son los agentes más estudiados que podrían inhibir cataratas según la teoría osmótica, aunque hay poderosos agentes sintéticos potenciales (Kador, 1983). Estudios preliminares realizados en Venezuela permitieron encontrar que la luteolina y sus derivados son muy frecuentes en mieles de abejas sin aguijón (Vit *et al.*, 1997), y posiblemente sean principios activos en la creencia popular de las mieles anticatarata. Además del efecto inhibidor de la aldosa reductasa, los flavonoides podrían actuar como antioxidantes y otro modelo interesante para explorar la vía anticatarata de las mieles, sería la catarata inducida por exposición controlada a radiación ultravioleta (Michael *et al.*, 2000). Posiblemente, se trate de un efecto sinérgico entre la catarata osmótica y la oxidativa (Zatechka *et al.*, 1999), cuyos estudios son muy novedosos y de demostración compleja que requiere conocer la expresión del ARN para concertar enzimas en ambas vías.

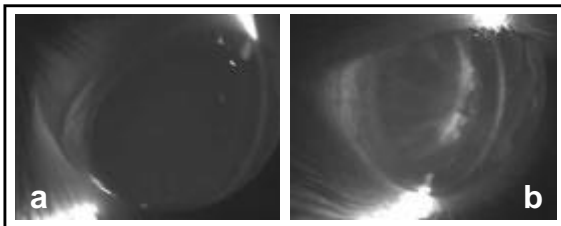


Figura 5. Imágenes digitales de cristalinios oculares observados con la lámpara de hendidura. a) Normal. b) Con catarata progresiva en estadio 3 según diagrama de la Figura 3.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abiko, T.; Abiko, A.; Ishiko, S.; Takeda, M.; Horiuchi, S.; Yoshida, A. 1999. **Relationship between autofluorescence and advanced glycation end products in diabetic lenses.** Experimental Eye Research 68(3):361-366.

Blakytyn, R; Harding, J.J. 1992. **Prevention of cataract in diabetic rats by aspirin, paracetamol (acetaminophen) and Ibuprofen.** Experimental Eye Research 54:509-518.

Harding, J.J. 1991. **Cataract: Biochemistry, Epidemiology and Pharmacology.** Chapman and Hall; London, UK; 333 p.

Kador, P.F. 1983. **Overview of the current attempts toward the medical treatment of cataract.** Ophthalmology 90(4):352-364.

Kinoshita, JH. 1974. **Mechanisms initiating cataract formation.** Investigative Ophthalmology 13:713-724.

Lambertus de Marcucci, O. 1993. **El complejo piruvato deshidrogenasa de mamíferos: Estructura, ensamblaje y regulación.** Trabajo de Ascenso a la Categoría de Profesor Titular. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.

Michael, R.; Vrensen, G.F.J.; van Marle, J.; Löfgren, S.; Söderberg, P.G. 2000. **Repair in the rat lens after threshold ultraviolet radiation injury.** Investigative Ophthalmology & Visual Science 41(1):204-212.

Monnier, V.M.; Cerami, A. 1981. **Nonenzymatic browning in vivo: possible process for aging of long-lived proteins.** Science 211; 491-493.

Patterson, C.A.; Delamere, N.A. 1992. **The lens.** Pp. 348-390. En: Ed. W.M. Hart Jr. **Adler's Physiology of the Eye.** 9th. Edition. Ed. Mosby; St. Louis; USA; 521 p.

Rao, C.M.; Zigler, J.S. 1992. **Levels of reduced pyridine nucleotides and lens photodamage.** Photochem. Photobiol.

Spiro, R.G. 1976. **Search for a biochemical basis of diabetes microangiopathy.** Diabetologia 12:1-14.

Vit, P.; Soler, C.; Tomás-Barberán, F.A. 1997. **Phenolic profiles of *Apis mellifera* and *Melipona* spp. honeys from Venezuela.** Zeitung für Lebensmittel Unters Forschung 204:43-47.

Zatechka, D.S.; Kador, P.F.; Lou, H.J. 1999. **Disruption of lens signal transduction cascades under diabetic conditions.** US-Japan CCRG Meeting, November 13-17; Kona, Hawaii; p. 69.