



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**POSIBLE PARTICIPACIÓN DEL ESTRÉS OXIDANTE EN
LA PATOGÉNESIS DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

JESÚS ERNESTO HERNÁNDEZ RAMÍREZ

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES**

MÉXICO, D. F.

2014





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Hernández

Ramírez

Jesús Ernesto

53 56 85 81

Universidad Nacional Autónoma de
México

Facultad de Ciencias

Biología

30500396-4

2. Datos del tutor

Dra.

Rocío

Salceda

Sacanelles

3. Datos del sinodal 1

Dr.

José

Pedraza

Chaverrí

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Rolando Efraín

Hernández

Muñoz

5. Datos del sinodal 3

Dra.

Angélica María

Pablo

Velázquez

6. Datos del sinodal 4

M. en C.

Bertha

Molina

Alvarez

7. Posible participación del estrés oxidante en la patogénesis de la retinopatía diabética

44 p

2014

RESUMEN

La diabetes es una enfermedad caracterizada por la hiperglucemia, dicha enfermedad afecta varios órganos, entre ellos, la retina. La retinopatía diabética (RD) es una enfermedad crónica degenerativa neuro-vascular, siendo la primera causa de ceguera a nivel mundial. Uno de los mecanismos propuestos como patogénicos en la RD es el estrés oxidante, el cual se refiere a la pérdida en el balance dinámico óxido- reductor celular, por un aumento en la generación de radicales libres y/o la disminución de la capacidad antioxidante.

El estrés oxidante se ha documentado a períodos de mediano y largo plazo de establecida la enfermedad y mayoritariamente en células endoteliales, las cuales solo constituyen el 5% de la composición de la retina; no obstante, no se conoce si el estrés oxidante está presente a tiempos cortos de la enfermedad y si es detonante de las alteraciones observadas en la RD.

En el presente trabajo, se estudió la generación de superóxido -principal ERO-, por la mitocondria, en la cual no se apreció un cambio. Además, se estudiaron los niveles de GSH, el cual no varió en su concentración, así como, la superóxido dismutasa (SOD) cuya actividad se encontró aumentada. Por otra parte, se realizó un análisis histoquímico de la óxido nítrico sintasa (NOS) por su actividad de diaforasa NADPH-d, la cual se encontró aumentada. Por lo que, a tiempos cortos en la RD, no se apreció la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) que pudiesen llevar a estrés oxidante. Sin embargo, la actividad de la NOS sugiere un estrés nitrosativo que puede generar un daño oxidante a inicios de la RD.

Lista de abreviaturas

ADP (adenosina difosfato)
AEM (amortiguador de extracción mitocondrial)
AFP (amortiguador de fosfato potasio)
AGE (productos finales de glucosilación avanzada)
AR (aldosa reductasa)
ATP (adenosina trifosfato)
AFS (amortiguador de fosfato sodio)
CAT (catalasa)
CG (Capa ganglionar)
CNE (capa nuclear externa)
CNI (capa nuclear interna)
CPE (capa plexiforme externa)
CPI (capa plexiforme interna)
CTRL (control)
Cu²⁺/Zn⁺ SOD (superóxido dismutasa de cobre/zinc)
DAG (diacilglicerol)
DTNB (ácido 5,5'-ditiobis,2-nitrobenzoico o Reactivo de Ellman)
DMSO (dimetil sulfoxido)
DNA (ácido desoxirribonucleico)
EDTA (ácido etilendiaminotetraacético)
EPR (epitelio pigmentario de la retina)
ERG (electroretinograma)
ERO (especies reactivas de oxígeno)
ERN (especies reactivas de nitrógeno)
FAD (flavina adenina dinucleótido)
FADH (flavina adenina dinucleótido reducido)
FMH₂ (flavina mononucleótido reducido)
GLUT 2 (transportador de glucosa tipo 2)
GSH (glutatión reducido)
GSSG (glutatión oxidado)
GR (glutatión reductasa)
IGF (factor de crecimiento parecido a la insulina)
MLE (membrana limitante externa)
MLI (membrana limitante interna)
MnSOD (superóxido dismutasa de manganeso)
NAD (nicotinamida dinucleótido difosfato)
NADPH (nicotinamida dinucleótido difosfato reducido)
NADPH- d (nicotinamida dinucleótido difosfato reducido- diaforasa)
NBT (nitro azul de tetrazolio)
NH₂OH (hidroxilamina)

NO (óxido nítrico)
NOS (óxido nítrico sintasa)
NOX's (nicotinamida dinucleótido difosfato oxidasas)
PKC (proteína cinasa tipo C)
RAGE (receptores de productos de glicosilación avanzados)
RD (retinopatía diabética)
SDH (sorbitol deshidrogenasa)
SOD (superóxido dismutasa)
STZ (estreptozotocina)
TNB (ácido 2-nitro, 5 benzoico)
VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)

Índice

RESUMEN	2
LISTA DE ABREVIATURAS	3
INTRODUCCIÓN	7
Estructura del ojo	7
Estructura de la retina	9
Homeostasis redox y los radicales libres.....	11
Fuentes celulares de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno	13
Estrés oxidante	15
Diabetes.....	18
Retinopatía diabética	19
El estrés oxidante en la RD	20
HIPÓTESIS.....	22
OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	22
PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	22
Modelo animal	22
Inducción de la diabetes.....	23
Determinación de glutatión	23
Determinación de la formación mitocondrial de superóxido	25
Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)	25
Histoquímica de la NADPH-d (diaforasa) / óxido nítrico sintasa (NOS)	26
Determinación de proteína.....	27
Análisis estadístico.....	27
RESULTADOS	27
Producción de superóxido.....	27

Concentración de GSH	28
Actividad de la enzima SOD.....	29
Histoquímica de la NADPH-d/NOS.....	29
DISCUSIÓN	34
CONCLUSIONES.....	39
BIBLIOGRAFÍA.....	40

Introducción

Estructura del ojo

El ojo de los vertebrados es un órgano fotosensible que permite controlar el paso de luz que llega a la retina, por lo que representa el sentido de la vista y una vía de entrada de información para el conocimiento del medio a los organismos. En los vertebrados la composición histológica del ojo es la siguiente (Fig.1):

- *La capa fibrosa*, que forma la cubierta externa del ojo denominada esclerótica, que es una estructura de tejido conjuntivo fibroso (haces y redes de fibras de colágena tipo I), en su porción posterior es blanca y opaca; en su porción anterior forma la córnea, transparente e incolora, la cual está constituida por cinco subcapas histológicas: epitelio corneal, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio.

- *La capa vascular*, es la capa media; Se subdivide en tres subcapas: Cuerpo ciliar, coroides e iris. El cuerpo ciliar, rodea la parte interna anterior del ojo a nivel del cristalino, forma los procesos ciliares, los cuales dan soporte, movimiento y sostén en la parte anterior del ojo y sus células secretan el humor acuoso. El iris, es la estructura formada por tejido fibrovascular y células pigmentadas, regula a manera de obturador el paso de luz entrante y la dirige a la retina. La coroides (capa coriocapilar) es la capa vascular pigmentada constituida por tejido conjuntivo fibroso que irriga la retina. La coroides y la retina se encuentran separadas entre sí por la membrana de Brunch (membrana basal del epitelio pigmentario de la retina) y el epitelio pigmentario de la retina.

- *La capa nerviosa o retina* es la capa interna del globo ocular, consiste de dos componentes: el epitelio pigmentario de la retina (EPR), y la retina neural o retina propiamente dicha (Salceda, 1998).

Además, en la porción anterior se encuentra el cristalino, que es un disco transparente flexible y biconvexo con células epiteliales, compuesto por 3 partes: la cápsula del cristalino (lámina basal), la cual permite la refracción de la luz; el epitelio subcapsular (células cuboides), con gran número de uniones comunicantes y las fibras del cristalino formadas por células alargadas que permiten concentrar el haz de luz.

El humor acuoso, contenido en la porción anterior del ojo, se secreta por el cuerpo ciliar y es drenado por canales venosos externos, y mantiene la presión intraocular y proporciona los nutrientes necesarios para el cristalino y la córnea. Está compuesto por alrededor de 98% de agua, electrolitos, glucosa, y una diversidad de proteínas. El humor vítreo, es de composición densa, transparente y avascular; constituye dos terceras partes del peso y volumen del ojo, y contiene principalmente colágena y ácido hialurónico (McCaa ,1982).

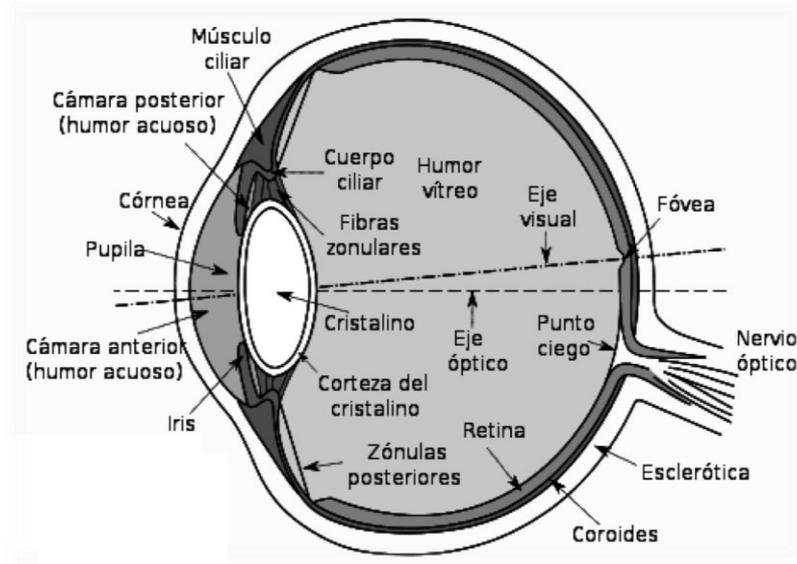


Figura. 1. Anatomía del ojo. Tomado y modificado de [<http://educoptica.blogspot.mx>]

Estructura de la retina

La retina, está formada por el EPR y la retina neural propiamente dicha. El EPR está constituido por una monocapa de células pigmentadas de origen neuroepitelial, adyacente a la coroides y a la membrana de Bruch por su cara basal-lateral y a la retina neural por su cara apical. El EPR constituye la barrera hemato-retiniana externa, mientras que la barrera hemato-retiniana interna está formada por las células endoteliales de los vasos sanguíneos que la irrigan de manera directa. Entre las principales funciones fisiológicas del EPR se encuentran: el transporte de nutrientes, iones y agua, absorción de la luz y protección contra la foto-oxidación, reisomerización del *todo-trans-retinal* a *11-cis-retinal*, fagocitosis de membranas de los segmentos externos de los fotorreceptores y secreción de factores tróficos esenciales para mantener la integridad de la retina (Simó *et al.*, 2010).

La retina neural, de un grosor aproximado de 500 μm consiste de 6 tipos principales de células organizados en capas (Wäsle, 2004). Las capas de la retina son las siguientes (Fig. 2):

La capa nuclear externa (CNE), está formada por dos tipos de células fotorreceptoras: conos y bastones, parcialmente embebidas en las células del EPR. En la mayoría de las especies de mamíferos los bastones superan en número (aproximadamente 20 veces más) a los conos (Masland, 2001); ambos tipos celulares se encargan de transducir la señal luminosa a eléctrica. Estas células transductoras poseen dos segmentos, uno externo que se encuentra en aposición con el EPR, mientras el interno comunica con las células de la capa nuclear interna (CNI). En la CNI se encuentran los somas de las células bipolares, horizontales y amacrinas que se comunican con la capa más interna constituida por las células ganglionares (CG) cuyos axones estructuran el nervio óptico y dirigen los estímulos hacia los centros visuales en el cerebro. La zona de sinápsis

constituida por las proyecciones (axones y dendritas) de las neuronas de la CNE y la CNI, es llamada la capa plexiforme externa (CPE) y la zona de sinápsis que comunica la CNI y células ganglionares es la capa plexiforme interna (CPI).

Un tipo celular adicional es la glía retiniana, mejor conocida como célula de Müller. Las células de Müller representan 90 % de la población glial (de 10^6 a 10^7 células) están orientadas radialmente a través de la retina neural (Sarthy & Ripps, 2002) desde las células ganglionares hasta el segmento interno de los fotorreceptores (definen la membrana limitante interna y la membrana limitante externa, respectivamente); debido a sus procesos celulares, pueden interactuar con los distintos tipos neuronales presentes en la retina. Las células de Müller participan en el sustento metabólico de las neuronas, homeostasis del agua, iones y pH, protección al estrés oxidante, señalización neuronal, reciclaje de fotorpigmentos, liberación de sustancias neuroactivas (glutamato, ATP) y liberación de sustancias vasoactivas (Bringmann *et al.*, 2006). Por otra parte, otros tipos de células gliales, los astrocitos y la microglía, cuyo origen embriológico es distinto, generalmente se localizan en la CPI de las retinas vascularizadas y junto con los oligodendrocitos en los axones ganglionares (nervio óptico).

Los estímulos nerviosos provenientes de la retina conducidos por el nervio óptico son organizados y dirigidos de manera paralela hacia regiones subcorticales como son: el complejo geniculado lateral, el núcleo supraquiasmático, el pretectum, el colículo superior; y finalmente llegan a la corteza (Wäsle, 2004), en donde se realiza una integración de la información y se genera una respuesta adecuada a cada estímulo visual.

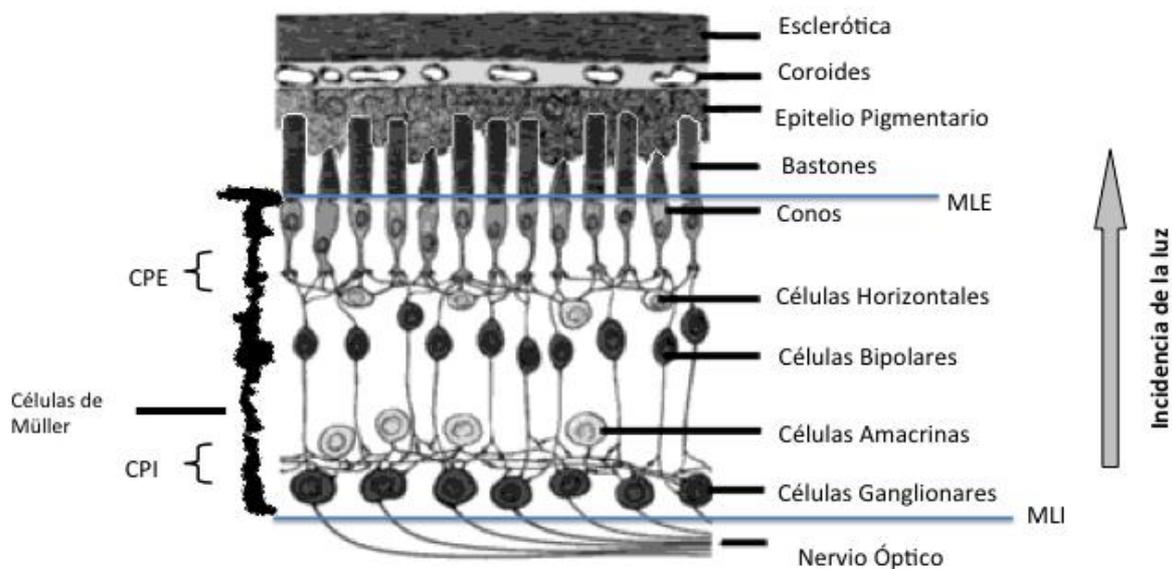


Figura 2. Estructura celular retiniana. Modificado de <http://www.catalase.com/retina.html>
 CPE: Capa plexiforme externa. CPI Capaplexiforme interna
 MLE: Membrana limitante externa. MLI. Membrana limitante interna.

Homeostasis redox y los radicales libres

Las diversas entidades moleculares orgánicas e inorgánicas presentes en las células, conllevan a una miríada de procesos de oxidación-reducción (redox) que de manera electroquímica se aprecia como la transferencia (ganancia o pérdida) de electrones entre las moléculas. En el transcurso de algunas reacciones redox se presenta la formación de moléculas inestables y reactivas llamadas radicales libres. En condiciones fisiológicas, existe un balance oxido- reductor en “steady-state” tanto a nivel extracelular como intracelular, determinante en la manutención de la homeostasis general de la célula.

Un *radical libre* se define como una molécula o átomo con un electrón no apareado en su orbital más externo (Yu, 1994), los radicales libres pueden generar reacciones en cadena formando a su vez radicales con centros de oxígeno o especies reactivas de oxígeno

(ERO), con moléculas de nitrógeno diatómico o especies reactivas de nitrógeno (ERN) (Buonocore, *et al.*, 2010) (Tabla 1).

Tabla 1. Propiedades especies reactivas y radicales libres relevantes.

Especies reactivas	Propiedades
Anión superóxido (O₂⁻)	Poco oxidante, Buen reductor. Posee alta capacidad de difusión. Es producto de la respiración mitocondrial; de enzimas como la xantina oxidasa y las NADPH oxidasas (NOX's).
Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)	Oxidante, pero poco reactivo con sustratos orgánicos incluyendo antioxidantes de bajo peso molecular. Posee una alta tasa de difusión. Producto de la catálisis de la SOD y el metabolismo de peroxisomas. Propuesto como un segundo mensajero en señalización redox.
Radical hidroxilo (-OH)	Altamente Reactivo. Tasa de difusión muy baja. Se genera como producto de la reacción de Haber-Weiss y Fenton catalizada por metales (Fe ²⁺). Daña el esqueleto de desoxiribosa y las bases nitrogenadas del DNA.
Óxido nítrico (ON·)	Se genera como producto de la NOS. Funciona como vasodilatador y neurotransmisor.
Peroxinitrito (ONOO·)	Se forma debido a la reacción entre el O ₂ ⁻ y el NO. Oxida a las proteínas de manera directa ya que es reactivo con los grupos tiol y metionina. Puede

	provocar la fragmentación de DNA y la oxidación de lípidos.
Ácido hipocloroso (HOCl)	Buen oxidante. Reacciona de manera particular con grupos tiol y residuos de metionina.
Radical fenol (PhO·)	Oxidante. Se produce por la oxidación de tirosinas, metabolitos fenólicos y xenobióticos.
Radical peroxilo (ROO·)	Poco oxidante en comparación con el OH·, Tiene alta capacidad de difusión.
Singlete de oxígeno (¹O₂)	Altamente reactivo. Producto del metabolismo de la mitocondria.

Fuentes celulares de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno

Todos los organismos aeróbicos usan O₂ para generar energía en forma de ATP, como parte de un ciclo entre la fotosíntesis y la respiración aerobia [H₂O-O₂-H₂O]; puesto que el O₂ es altamente disponible a los organismos, las células presentan mecanismos que facilitan su utilización. Por ejemplo, el oxígeno es difusible a través de las membranas y se puede unir a grupos funcionales de ciertas proteínas (hemoglobinas y citocromos) (Buonocore *et al.*, 2010). Normalmente >95% del oxígeno que se consume en los organismos aeróbicos eucariontes se reduce en agua mediante la adición de 4 e⁻ y 4 H⁺ a través de la cadena respiratoria de la mitocondria (Yu, 1994; Castro & Freeman, 2001; Nelson & Cox, 2008).

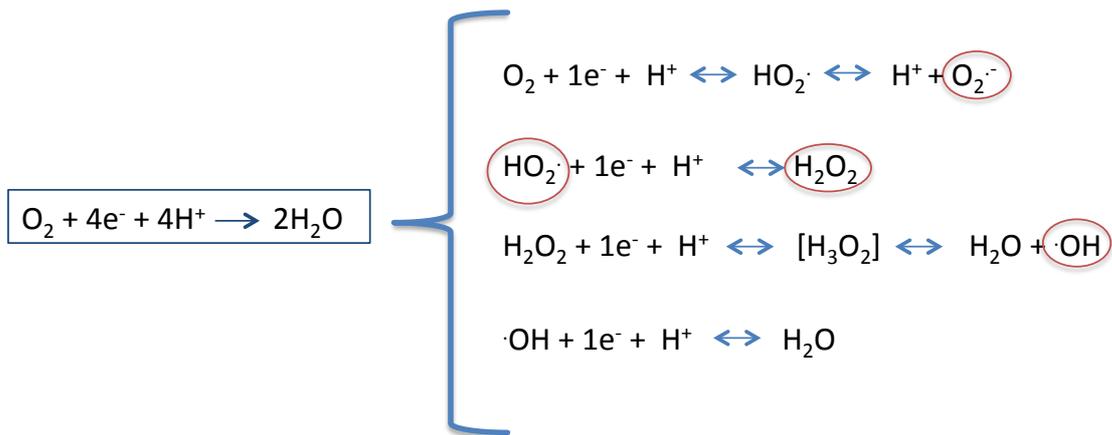


Figura 3. Reducción del oxígeno (vía univalente) en el metabolismo celular.
Tomado de Buonocore et al., 2010.

Las mitocondrias son generadoras de la mayor cantidad de energía en las células en forma de ATP a través de la cadena respiratoria (Manoli *et al.*, 2007). Mediante esta vía metabólica, del 2% al 4% del oxígeno consumido corresponde a la producción de ERO, primordialmente el superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$). Otras fuentes de ERO son el citocromo P450, el sistema xantina oxidasa, las enzimas denominadas NADPH oxidasas (NOXs), el metabolismo de los peroxisomas, la oxido nítrico sintasa (NOS) (Valko *et al.*, 2007; Castro & Freeman, 2001; Winterbourn, 2008) y la autooxidación de moléculas como flavinas (FADH_2 , FMH_2), hemoglobina, catecolaminas, hidroxilaminas aromáticas, compuestos nitrogenados aromáticos, complejos con Fe (II) y Cu (II), tioles y melanina (Fieschi *et al.*, 1995).

Así, el superóxido es considerado como un radical primario (Valko *et al.*, 2007) el cual en una condición fisiológica, sufre una dismutación por acción de la superóxido dismutasa (SOD) (McCord & Fridovich, 1969), produciéndose peróxido de hidrógeno (H_2O_2), reacción que ocurre en dos pasos (Pierre, 1995). Sin embargo, el superóxido puede interactuar con distintas moléculas y generar radicales libres secundarios y/o especies reactivas (Tabla 1).

Estrés oxidante

Los radicales libres y las moléculas reactivas de oxígeno/nitrógeno son generados de manera fisiológica en cantidades reguladas, y participan en una extensa lista de procesos que incluyen la señalización celular, desarrollo embriológico, capacitación espermática, fecundación y respuesta inmune (Buonocore *et al.*, 2010). La sobreproducción de radicales libres y especies reactivas, o en su defecto la incapacidad de abatirlas promueve la peroxidación de lípidos, el daño al DNA y la oxidación de proteínas (Tabla 2), lo que genera un estado celular denominado *estrés oxidante*, que es la pérdida o descontrol en el balance dinámico oxido-reductor. Esto resulta en daño a las células y como último puede resultar en la muerte celular.

Tabla 2. Modificación de macromoléculas por oxidación-reducción (Modificado de Díaz-Acosta & Membrillo- Hernández, 2006).

Modificación por oxidación/reducción	Tipo de macromolécula	Reversible (R) / Irreversible (I)	Consecuencia
Glutathionilación	Proteína	R	Protección de cisteínas/regulación de la función.
S-Nitrosilación	Proteína	R	Protección de cisteínas/regulación de la función.
Nitración	Proteína	I	Cambio en la función/Degradación o agregación de proteínas
Enlace proteína - proteína	Proteína	I	Degradación/Agregación de proteínas
Ruptura de enlaces peptídicos	Proteína	I	Degradación/Agregación de proteínas
Glicosilación	Proteína	I	Modificación en la función /Agregación
Carbonilación	Proteína	I	Inactivación /Degradación/Agregación de proteínas
Peroxidación	Lípido	I	Modificación en la función,

Hidroxilación	DNA	I/R	acumulación / Ruptura. Entrecruzamiento de DNA- DNA o DNA- Proteína. Rompimiento de la doble cadena. Activación de mecanismos de reparación.
----------------------	-----	-----	---

En condiciones fisiológicas, las células y tejidos poseen mecanismos protectores antioxidantes capaces de prevenir y resarcir los daños causados por la oxidación, los cuales se pueden clasificar en: enzimas antioxidantes y antioxidantes no enzimáticos (Tabla 3). La propiedad de antioxidante es atribuida a cualquier sustancia que a bajas concentraciones es capaz de competir con otros sustratos oxidables y por tanto retardar significativamente o inhibir la oxidación de dichos sustratos (Dröge, 2002).

El estrés oxidante se ha asociado a la etiología de diversas enfermedades, tales como: cáncer, Alzheimer, Parkinson, desórdenes cardiovasculares, isquemia, procesos de inflamación, así como diabetes (Facchinetti *et al.*, 1998; Williams *et al.*, 2013).

Tabla 3. Sistemas antioxidantes.

Antioxidante	Estructura	Localización	Función
Sistema Antioxidante Enzimático			
Superóxido dismutasa	Cu ⁺² /Zn ⁺ Mn ⁺² Cu ⁺² /Zn ⁺	Citosol, núcleo, extracelular. Mitocondria Plasma	Cataliza la dismutación de O ₂ ^{·-} a H ₂ O ₂ .
Catalasa	Homoproteína tetramérica	Peroxisoma	Cataliza la conversión de H ₂ O ₂ en agua, reduce peróxidos etilo y metilo.
Ciclo redox del GSH			
GSH peroxidasa	Selenoproteína	Citosol y mitocondria	Cataliza la reducción del H ₂ O ₂ y otros hidroperóxidos (peróxidos lipídicos y productos de lipoxigenasas).
GSH reductasa	Proteína	Citosol y	Cataliza la reducción de

	dimérica	mitocondria	grupos disulfuro (S-S) a grupos SH de bajo peso molecular. Recicla el glutatión.
Sistema de moléculas antioxidantes			
<i>Liposolubles</i>			
Vitamina E	Vitamina liposoluble	Membranas celulares y fluidos extracelulares	Convierte el $O_2^{\cdot-}$; el $\cdot OH$ y radicales peroxilo en formas menos reactivas. Interrumpe reacciones en cadena de peroxidación de lípidos.
B- Caroteno	Precursor metabólico de la Vitamina A	Membranas de los tejidos	Neutraliza el $O_2^{\cdot-}$; reacciona directamente con radicales peroxilo.
Bilirrubina	Producto del catabolismo de hemoproteínas	Sangre	Reacciona con ROO^{\cdot} e interfiere con reacciones en cadena de oxidación.
Catalasa	Homoproteína tetramérica	Peroxisoma	Cataliza la conversión de H_2O_2 en agua, reduce peróxidos etilo y metilo.
<i>Hidrosolubles</i>			
Vitamina C	Vitamina hidrosoluble	Amplia distribución en fluidos intracelulares y extracelulares	Neutraliza el $O_2^{\cdot-}$ y el $\cdot OH$, así como; especies oxidantes derivadas de los neutrofilos. Contribuye a la regeneración de la vitamina E.
Ácido úrico	Purina oxidada	Amplia distribución	Previene la oxidación de la vitamina C. Se une a metales de transición. Neutraliza el $O_2^{\cdot-}$ y el $\cdot OH$. Oxidantes con grupos hemo y radicales peroxilo.
Glucosa	Carbohidrato	Amplia distribución	Neutraliza el $\cdot OH$.
Cisteína	Aminoácido	Amplia distribución	Reduce compuestos orgánicos, donando electrones del grupo SH.
Glutatión	Tripéptido	Intracelular	Es substrato primordial en el

ciclo redox enzimático.
Neutraliza el O_2 y el $\cdot OH$ y
radicales libres orgánicos.

Diabetes

La diabetes es una enfermedad crónica, identificada de manera clínica por una variedad de síntomas que consisten, entre otros, en la excreción excesiva de orina (poliuria), sed (polidipsia) y hambre constante (polifagia), pérdida de peso, trastornos visuales y cansancio los cuales pueden aparecer de forma súbita. Existen dos tipos principales de diabetes: La diabetes tipo I, también llamada insulino dependiente o juvenil, se debe debido a que la producción de insulina es nula o insuficiente, por lo que se requiere de la administración periódica de esta hormona para mantener la concentración homeostática de la glucosa sanguínea. En cambio, la diabetes tipo 2 se caracteriza por el funcionamiento ineficaz de la insulina en las células blanco (OMS, 2013).

La insulina es una hormona polipéptica secretada por las células β -pancreáticas en respuesta al incremento en el nivel de glucosa en el plasma sanguíneo. Esta hormona estimula la captura de glucosa en los órganos blanco, y como consecuencia la síntesis de glucógeno e inhibe la glucogenólisis y la gluconeogénesis, por lo que mantiene la normoglucemia en los organismos (Rhodes & White, 2002). Se sintetiza como proinsulina en el retículo endoplásmico y madura a su forma activa, insulina, dentro de los gránulos secretorios (de Pablo & de la Rosa, 1995; MacDonald *et al.*, 2005). Además, la insulina presenta efectos pleiotrópicos en una gran variedad de tejidos, como son: el transporte de iones, regulación de la síntesis de proteínas, metabolismo de lípidos, expresión de genes, el crecimiento y supervivencia celular.

La diabetes, por tanto, se caracteriza por un aumento sustancial en la concentración de la glucosa sanguínea o hiperglucemia, lo cual deriva en una serie de complicaciones que afectan distintos órganos y tejidos como el corazón, músculo esquelético, glándulas secretoras, riñones, nervios periféricos, huesos, piel y retina (Kowluru & Chan, 2007; Chowdhury, *et al.*, 2011; Gardner *et al.*, 2011).

Retinopatía diabética

La retinopatía diabética (RD) es una enfermedad crónica degenerativa neuro-vascular que lleva en última instancia a la ceguera (OMS, 2013). Se caracteriza clínicamente por la formación de microaneurismas, hemorragias retinianas, exudados duros, crecimiento de nuevos vasos sanguíneos (neovascularización), pérdida de pericitos y células endoteliales, así como engrosamiento de la membrana de Bruch, que finalmente lleva al desprendimiento de la retina (Chistiakov, 2011).

Adicionalmente, en pacientes y en modelos murinos se han descrito daños neurales. En modelos murinos, se han descrito cambios fisiológicos durante los primeros cuatro meses de la enfermedad dando como resultado global una disfunción visual temprana. Entre dichos eventos se encuentran: anormalidades en los potenciales oscilatorios, así como, en las ondas A y B del electroretinograma (ERG) (Shinoda *et al.*, 2007; Sasaki *et al.*, 2010). Asimismo, se han reportado diferentes alteraciones bioquímicas que incluyen el aumento en metabolitos como el sorbitol y la fructosa; disminución de piruvato, lactato, glutamato y α -cetoglutarato y cambios en la relación NAD^+/NADH (Salceda *et al.*, 1998; Obrosova *et al.*, 2006). Por otro lado, se han observado índices apoptóticos significativos en células de la retina en las capas formadas por los fotorreceptores y las células ganglionares, así como, activación de la glía (Barber *et al.*, 2011). Disminución en

el grosor de la retina de murinos ocurre a los 6 y 12 meses de iniciada la enfermedad (Yang *et al.*, 2012), y éste mismo fenómeno ocurre después de algunos años (cinco en adelante) en humanos (Kowluru & Chan, 2007).

Entre los mecanismos bioquímicos implicados en la RD se encuentran: aumento del flujo metabólico hacia la vía de los polioles, activación de la vía PKC mediada por DAG, incremento en la expresión de factores de crecimiento (factor de crecimiento endotelial-vascular, VEGF y el factor de crecimiento parecido a insulina, IGF), activación y aumento del sistema renina - angiotensina, formación de productos finales de glucosilación avanzada (AGE), cambios en el flujo sanguíneo retiniano, y estrés oxidante (Brownlee, 2001; Chistiakov, 2011).

Sin embargo, la caracterización de estas vías se ha realizado mayoritariamente en células endoteliales y por ende, los blancos terapéuticos propuestos están dirigidos en este sentido, por lo que se tiene menor información respecto a la retina neural. Las células neuronales y la glía representan el 95% de la masa tisular en la retina, mientras que las células endotelial es solo el 5%, por lo que recientemente se ha hecho énfasis en el estudio del efecto de la diabetes en la retina neural (Ola *et al.*, 2013)

El estrés oxidante en la RD

La retina es un tejido caracterizado por una demanda metabólica alta (alto consumo de oxígeno y glucosa), su exposición continua a la luz y el alto grado de lípidos insaturados en membranas celulares, hacen susceptibles a las células retinianas a procesos de oxidación. Se ha establecido que la hiperglucemia causa estrés oxidante por lo que se considera como posible disparador de la patogénesis y el desarrollo de las complicaciones diabéticas. No obstante, el mecanismo por el cual la hiperglucemia

genera el estrés oxidante aún no está definido (Chung *et al.*, 2003; Kowluru & Chang 2007; Chistiakov, 2011).

Se ha propuesto que la hiperglucemia promueve el aumento en la producción de ERO, inicialmente por un aumento en el flujo de la cadena respiratoria. Por otro lado el aumento de la fructosa y sus metabolitos como la fructosa-3-fosfato, la 3-deoxiglucosona y la glicación son agentes potenciales en la formación de AGE (Chung *et al.*, 2003). La unión de AGEs a su receptor lleva a activación de la NADPH oxidasa que a su vez produce ERO (Sedeek *et al.*, 2012). La NADPH oxidasa también aumenta su actividad mediante la activación de la vía de señalización Proteína Cinasa C-Diacilglicerol (PKC-DAG) (Chung *et al.*, 2003), lo que a su vez lleva a un aumento en la producción de VEGF.

La aparición de estrés oxidante se ha demostrado en la retina de murinos en estados avanzados de diabetes. En este sentido se han observado niveles reducidos de antioxidantes como vitamina C, vitamina E y GSH (Williams *et al.*, 2013). Los niveles de GSH pueden verse mermados debido a una disminución en la disponibilidad de NADPH (necesario para la actividad de la glutatión reductasa) causada por la elevación en el metabolismo de la glucosa en sorbitol por acción de la aldosa reductasa, la cual utiliza como cofactor el NADPH (Chung *et al.*, 2003). No obstante, la administración de estos antioxidantes o la inhibición de algunas vías metabólicas implicadas en la patogénesis de la retinopatía, no han llevado a un resultado adecuado para su aplicación terapéutica (Williams *et al.*, 2013). Por lo que resulta importante conocer el estado oxidativo en períodos recientes a la hiperglucemia para identificar si el estrés oxidante es un factor detonante en la patogénesis de la enfermedad.

Hipótesis

Si el estrés oxidante es un factor patogénico de la RD, éste debe observarse a tiempos cortos de inducida la diabetes.

Objetivo general

Determinar la presencia de estrés oxidante en estados tempranos de inducción de la diabetes.

Objetivos particulares

Determinar en la retina de ratas normales y diabéticas:

- ◆ Los niveles de GSH.
- ◆ La producción de superóxido generado por la vía mitocondrial.
- ◆ Determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa.
- ◆ Identificación histoquímica de la NADPH diaforasa / Oxido nítrico sintasa (NOS).

Procedimientos experimentales

Modelo animal

Los experimentos se realizaron en ratas normales y diabéticas de la cepa *Long Evans* mantenidas en condiciones 12/12 horas de luz - oscuridad con agua y alimento *ad libitum*.

Inducción de la diabetes

Se utilizó un modelo experimental de diabetes tipo I, éste consiste en la administración de estreptozotocina (STZ [Sigma]). La STZ se transporta a las células β -pancreáticas mediante el transportador de glucosa (GLUT 2), promueve la generación de radicales libres, la alquilación del DNA y la activación del mecanismo de reparación-polibosilación de ADP-(disminuye el NAD^+ y el ATP) y las células mueren por necrosis (Szkudelzki, 2001). La muerte de las células β -pancreáticas genera un estado hiperglucémico debido a la disminución en la producción de insulina.

A las ratas Long Evans (170g-200g / 2-3 meses de edad) se les administró vía intraperitoneal, una dosis de estreptozotocina (90 mg/kg) en amortiguador de citratos (ácido cítrico 90 mM; cloruro de sodio (10 mM), pH 4.7. Los animales se sacrificaron por decapitación a los 7 días (7D), 20 días (20D) y 45 días (45D) después de inducida la diabetes; paralelamente, se utilizaron animales normales (sin STZ, CTRL). Se realizó la enucleación de los ojos y la obtención de las retinas para los subsecuentes ensayos. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron de manera electrónica con el dispositivo Accu-Check active (Roche). Los animales se consideraron diabéticos si al momento del sacrificio los niveles de glucosa en sangre fueron > 300 mg/dl.

Determinación de glutatión

Las retinas aisladas se lavaron en solución salina (NaCl 0.9 %) y se homogenizaron en 0.5 mL de amortiguador fosfatos-potasio (AFP) 0.1 M que contiene 5 mM EDTA, 0.6% de ácido sulfosalisílico y 0.1% Triton X-100, pH 7.5.

La determinación cuantitativa de glutatión se llevó a cabo por el método enzimático de reciclaje (Rahman *et al.*, 2006) (Fig. 4), el cual se basa en la reacción del GSH con el ácido dinitrobenzoico (DNTB), la reacción produce un compuesto oxidado (GS-TNB) y el cromóforo TNB (que absorbe a 412 nm). La tasa de formación de TNB es proporcional a la concentración de GSH en la muestra. El producto GS-TNB se reduce después por la glutatión reductasa (GR) en presencia de β -NADPH, y el GSH de nuevo entra a la reacción.

Debido a que la GR reduce el GSSG de la muestra a 2 GSH, la cantidad de GSH total es la suma de las formas oxidadas y reducidas. Se preparó una curva estándar de GSH, a partir de una solución de 1 mg/ml en AFP, para obtener las concentraciones de 10 -175 μ M y se determinó la absorbancia a 412 nm en un lector de microplacas.

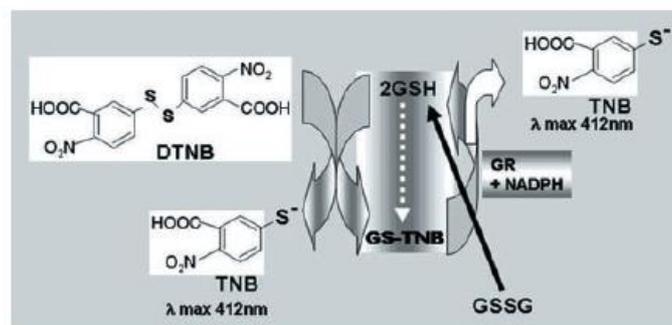


Figura 4. Formación del cromóforo TNB, proporcional a la cantidad de GSH. Tomada de (Rahman *et al.*, 2006).

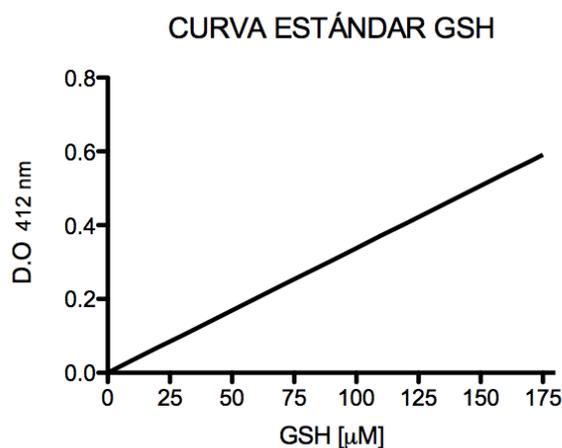


Figura 5. Curva estándar de GSH

Determinación de la formación mitocondrial de superóxido

Las mitocondrias se aislaron por un método establecido en el laboratorio (Osorio-Paz, no publicado). Las retinas se aislaron y homogenizaron en 1 ml de amortiguador de extracción mitocondrial (AEM) (manitol 220 mM; sacarosa 10 mM; HEPES 2 mM; taurina 10 mM; EDTA 1mM; albumina deslipidada al 1%). El homogenizado se centrifugó a 650 g por 10 min a 4°C, el pellet se re suspendió y se centrifugó a 650 g por 10 min. Nuevamente el pellet se re suspendió y se centrifugó a 8,200 g por 15 min para obtener las mitocondrias. La mitocondrias (50 µg de proteína) se incubaron en una mezcla de reacción [KCl 20 mM; MgCl₂ 1 mM; glutamato/malato 10 mM; Pi 2 mM; ADP 100 µM; GDP 5 µM; nitro azul de tetrazolio (NBT) 0.2 mM]. La producción de superóxido se determinó por la reducción del NBT durante 10 min medida espectrofotométricamente a 560 nm en un lector de microplacas. La reducción del NBT produce precipitados de monoformazan y diformazan, los cuales son producto de su interacción con dos y cuatro moléculas de superóxido. (Liu *et al.*, 2009). Las nmolas producidas se calcularon de acuerdo a la siguiente fórmula = $\Delta \text{ abs} / \epsilon \times d$; donde ϵ = coeficiente de extinción del NBT, d= dilución, la relación de formación de superóxido por estequiometria es NBT: O₂⁻ = 4 (Liu *et al.*, 2009).

Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

La determinación de la actividad de la enzima SOD se realizó por el método de Kono Y. (1978). Las retinas se aislaron y se homogenizaron en amortiguador de carbonato de sodio (Na₂CO₃) 50 mM; pH: 10.2 a 4°C. Posteriormente se centrifugó a 93 g durante 10 min a 4°C. Se incubaron 100 µg de proteína del sobrenadante en una mezcla de reacción

[EDTA 0.1 mM; Tritón x-100 0.03% (v/v); NBT 12 μ M; NH_2OH 0.1 mM en amortiguador 50 mM de Na_2CO_3] en un volumen final de 1 mL. La reducción del NBT se siguió espectrofotométricamente a 560 nm durante 30 min. La actividad de la enzima SOD se determinó como el porcentaje de inhibición en la reducción del NBT producida por la hidroxilamina; la inhibición en 50% equivale a una unidad de actividad enzimática (Kono, 1978).

Histoquímica de la NADPH-d (diaforasa) / óxido nítrico sintasa (NOS)

La actividad de la diaforasa/NOS se realizó mediante el método histoquímico de Sagar (1986). Las retinas se aislaron y mantuvieron extendidas entre dos cubreobjetos (montaje de retina completa), se fijaron inmediatamente por 60 minutos en paraformaldehído al 4% en amortiguador fosfato de sodio (AFS) [0.1 M, pH 7.4]. Al término del tiempo de fijación se lavaron 3 veces con AFS por intervalos de 10 minutos. Posteriormente, las retinas (2 ml por retina) se incubaron en un baño seco por 60 min a 37°C en buffer de reacción (malato de sodio 15 mM; NADP^+ 1 mM; NBT 0.2 mM; 1% de Tritón X-100; MnCl_2 1 mM en amortiguador Tris-HCl 0.1 M, pH 8.0). La reacción se terminó al transferir las retinas a BFS y se montaron en glicerol con la capa ganglionar hacia arriba. La cuantificación de células positivas se realizó en un microscopio Nikon Alphaphot y las imágenes se capturaron con una cámara Nikon DMX1200. El número de células positivas se obtuvo del análisis de 10 campos por retina utilizando un objetivo de 20x.

Para la histoquímica en cortes de retina, las copas ópticas se fijaron por 30-45 minutos en paraformaldehído al 4% en AFS. Al término de la fijación se lavaron 3 veces con BFS por intervalos de 10 minutos, posteriormente se mantuvieron en una solución de

sacarosa al 30% durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se embebieron Tissue-teck y se obtuvieron cortes de 15 µm. Los cortes se incubaron de igual manera que las retinas completas, se montaron en glicerol y observaron al microscopio.

Determinación de proteína

La cantidad de proteínas se determinó por el método de Lowry (1951), utilizando un kit comercial [Bio- Rad Headquarters Hércules, California] y albúmina de suero bovino como estándar.

Análisis estadístico

Se realizó el análisis de ANOVA de una vía con un análisis *post-hoc* de Tukey ($p>0.05$) y prueba de t-student ($p>0.05$). Se usó el software GraphPadPrism 5.

Resultados

Producción de superóxido

En nuestras condiciones las mitocondrias aisladas de la retina de ratas control producen 56.93 ± 7.69 µmol de NBT reducido/min/mg proteína (Fig.6), mientras que en las mitocondrias aisladas de las retinas de las ratas diabéticas la reducción de NBT fue de (7D, 48.67 ± 6.51 µmol/mg de proteína; 20D, 35.16 ± 5.69 µmol/mg de prot; 45D, 51.11 ± 12.3 µmol/mg de proteína). Si bien se notó una ligera disminución a los 20D, esta diferencia no fue estadísticamente significativa con ninguno de los otros grupos experimentales.

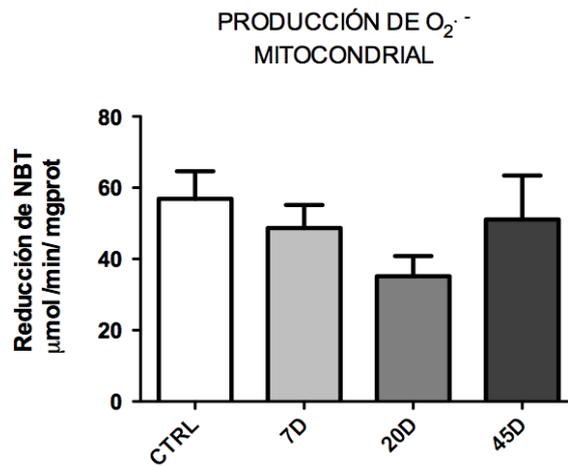


Figura 6. Producción de superóxido mitocondrial en ratas control, 7, 20 y 45 días de tratamiento con STZ. El superóxido se determinó por la reducción de NBT. Los datos son promedio \pm E.E. de al menos 3 ratas por grupo.

Concentración de GSH

En la retinas de ratas normales los niveles de GSH presentaron valores de 4.36 ± 0.55 nmol/mg de proteína. El contenido de GSH en las retinas de ratas diabéticas presentó valores menores que los observados en las control (7D, 3.48 ± 0.7 nmol/mg de proteína; 20D, 3.1 ± 0.45 nmol/mg de proteína; 45D, 4.17 ± 0.4 nmol/mg de proteína), a pesar de ello, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa con el grupo control (Fig. 7).

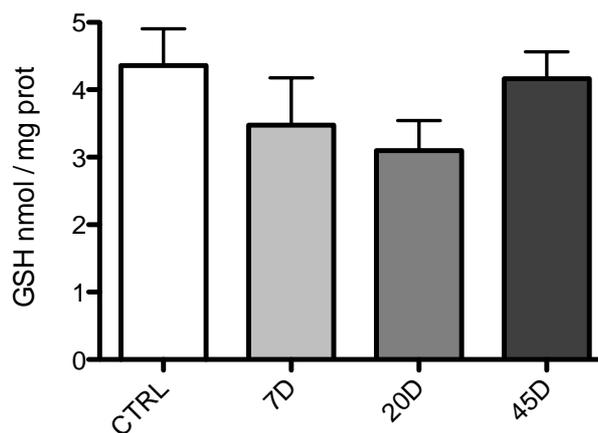


Figura 7. Concentración de GSH en retina de ratas control, 7, 20 y 45 después de inducida la diabetes. Promedio \pm E.E. de al menos 3 experimentos diferentes por grupo.

Actividad de la enzima SOD

La actividad de SOD en la retina de ratas control, y de 45D presentó valores de 4.28 ± 1.48 y 3.03 ± 0.92 U/mg de proteína, respectivamente. De manera interesante, la actividad de SOD presentó un aumento significativo en las retinas de 7D y 20D (10.8 ± 2.37 y 11.92 ± 2.76 U/mg de proteína, respectivamente) (Fig. 8).

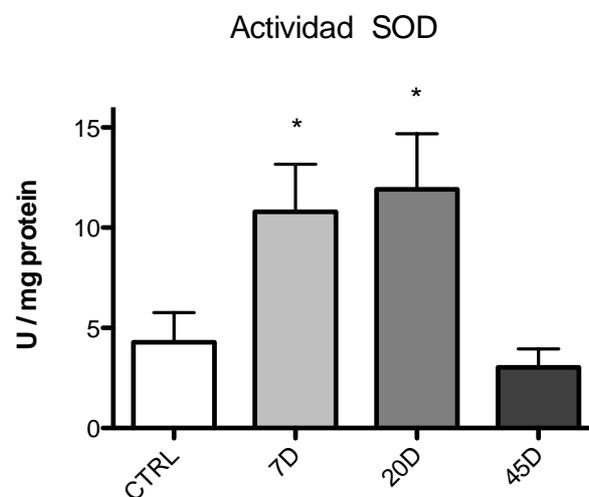


Figura 8. Actividad de la enzima SOD en retina. Control, 7, 20 y 45 después de inducida la diabetes. Promedio \pm E.E. ANOVA y post Hoc de Tukey * $p < 0.05$

Histoquímica de la NADPH-d/NOS

La actividad de la NADPH-d/NOS se determinó por la tinción en las células que la expresan activamente. En las retinas de animales control y de 7 días de diabetes, la actividad de NADPH-(d) presentó una tinción tenue en los somas; mientras que ésta se incrementó considerablemente en las retinas de ratas de 20 y 45 de diabetes, tinción que se extendió a los procesos neuronales y particularmente a los vasos sanguíneos (Fig. 10 y 11). Aunque la intensidad de la reacción fue mayor en la retina de ratas

diabéticas, el número de éstas no aumentó (Fig. 9). Estas células, con base en previos estudios (Roufail, et al., 1998; Palanza et al., 2005; Goto et al., 2005) y a su tamaño y morfología, muy posiblemente corresponden a células amacrinas y ganglionares [Fig. 11. Panel C-F].

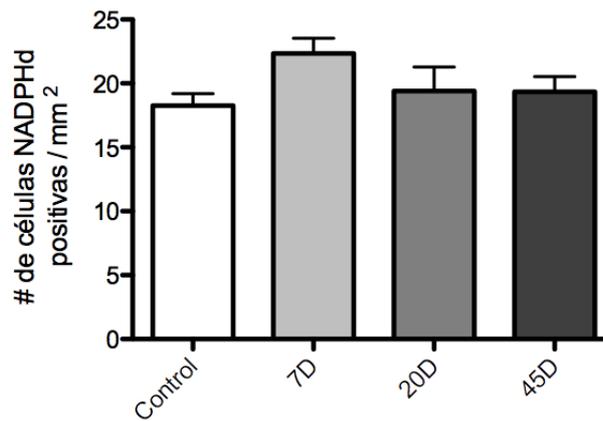


Figura 9. Número células NADPH-d positivas /mm² en la retina de ratas control, 7, 20 y 45 días de tratamiento con STZ. Los datos corresponden al promedio \pm E.E. de al menos 3 retinas por grupo.

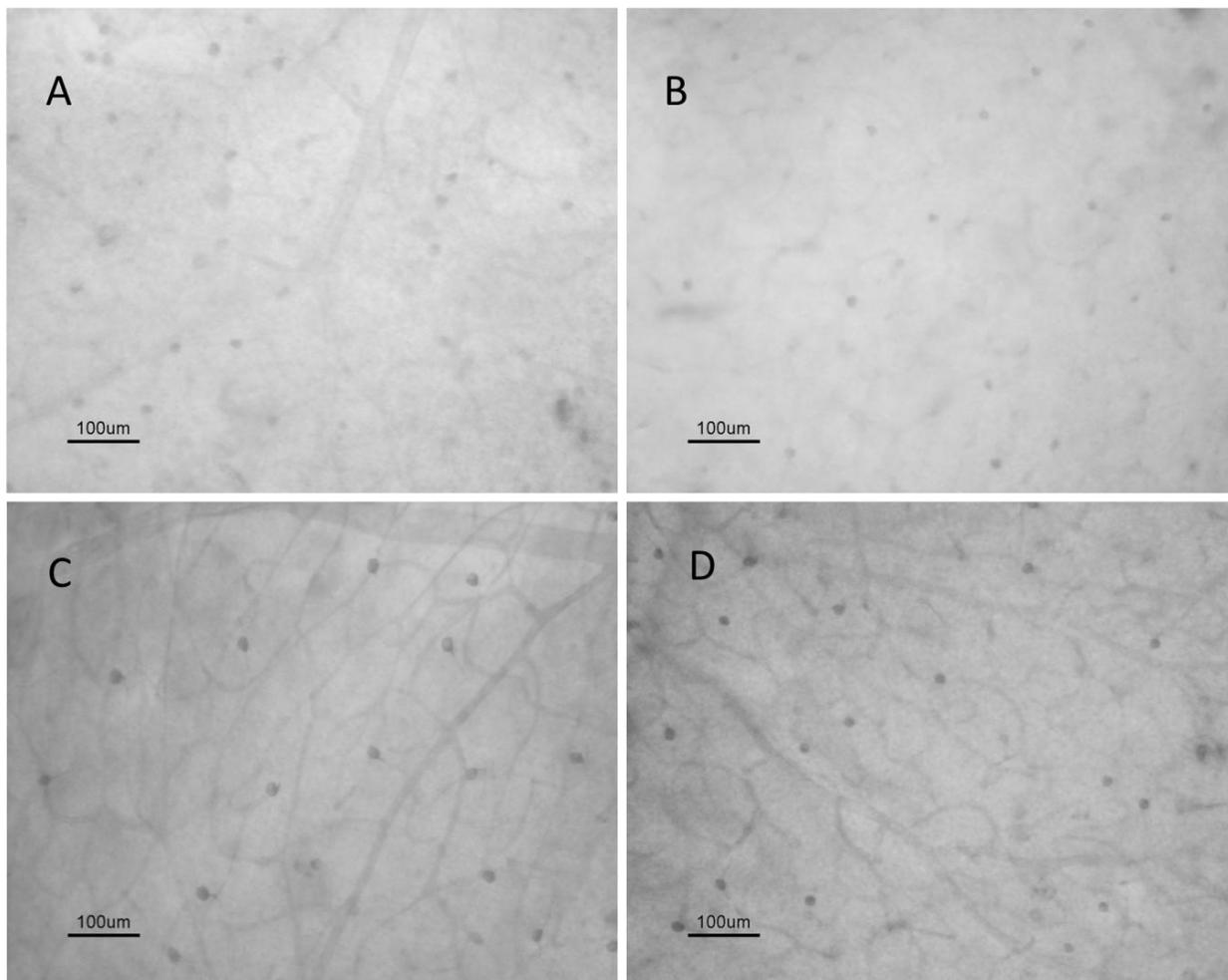


Figura 10. Identificación histoquímica de NADH-d (campo claro) en la retina completa de ratas normales (A) ,7(B), 20 (C) y (D) 45 días de inducida la diabetes.

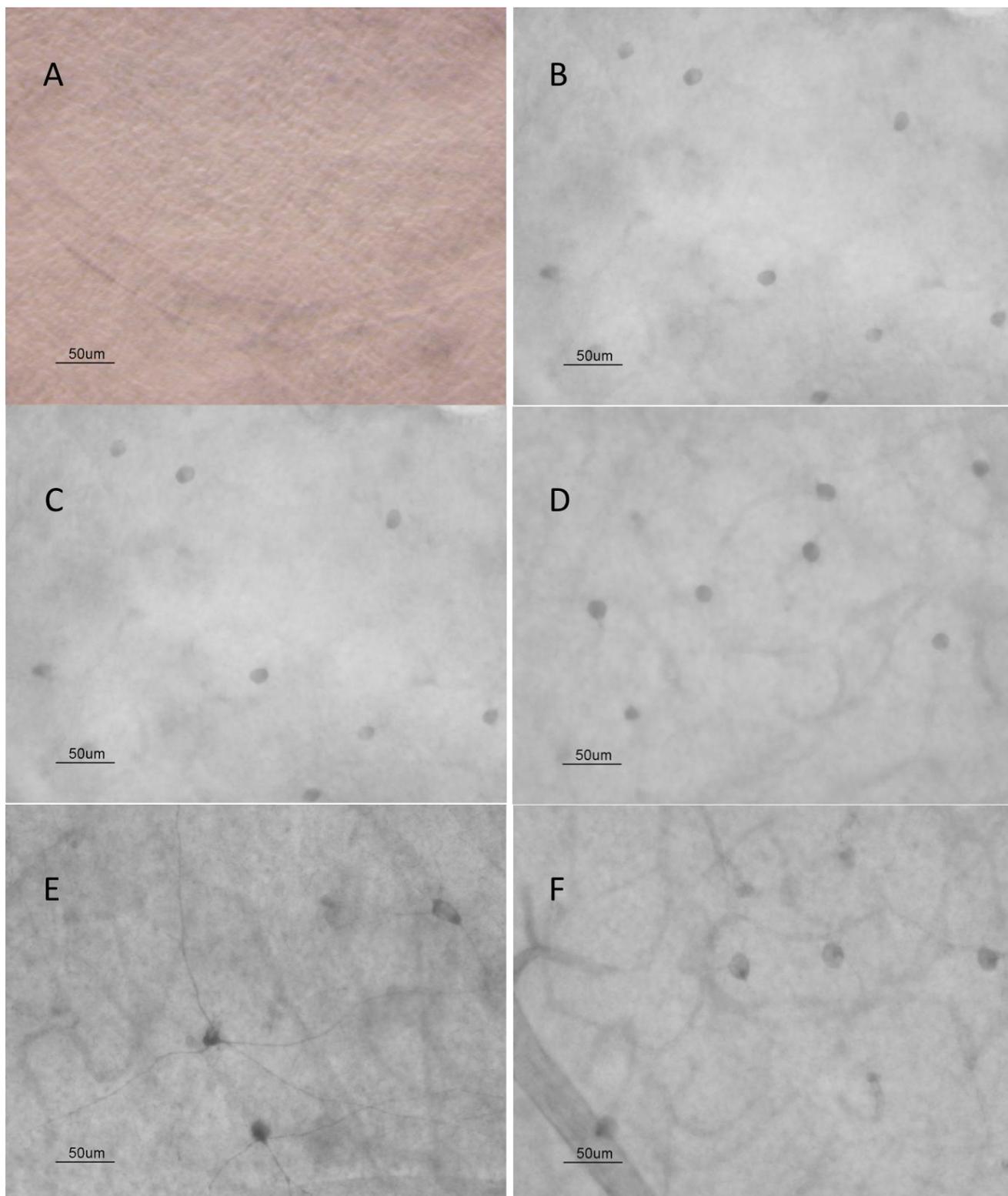


Figura 11. Identificación histoquímica en montaje completo de retina en campo claro (Panel A contraste de fases). Células NADPH-d positivas en ratas normales (A, sin NADP) (B y C), 7(D), 20 (E) y 45 días de tratamiento (F).

En la retina control, se observó una leve tinción correspondiente a la actividad de la NADPH-diaforasa, por el contrario en la retina de 20D y 45D se observó una intensa tinción en el segmento interno de los fotorreceptores y en menor grado en las capas CPE, CPI y CG. La tinción en las capas plexiformes presentó una apariencia punteada, posiblemente asociada a las terminales sinápticas. La tinción fue notablemente mayor a los 45D y particularmente en la CPI y CG (Fig. 12).

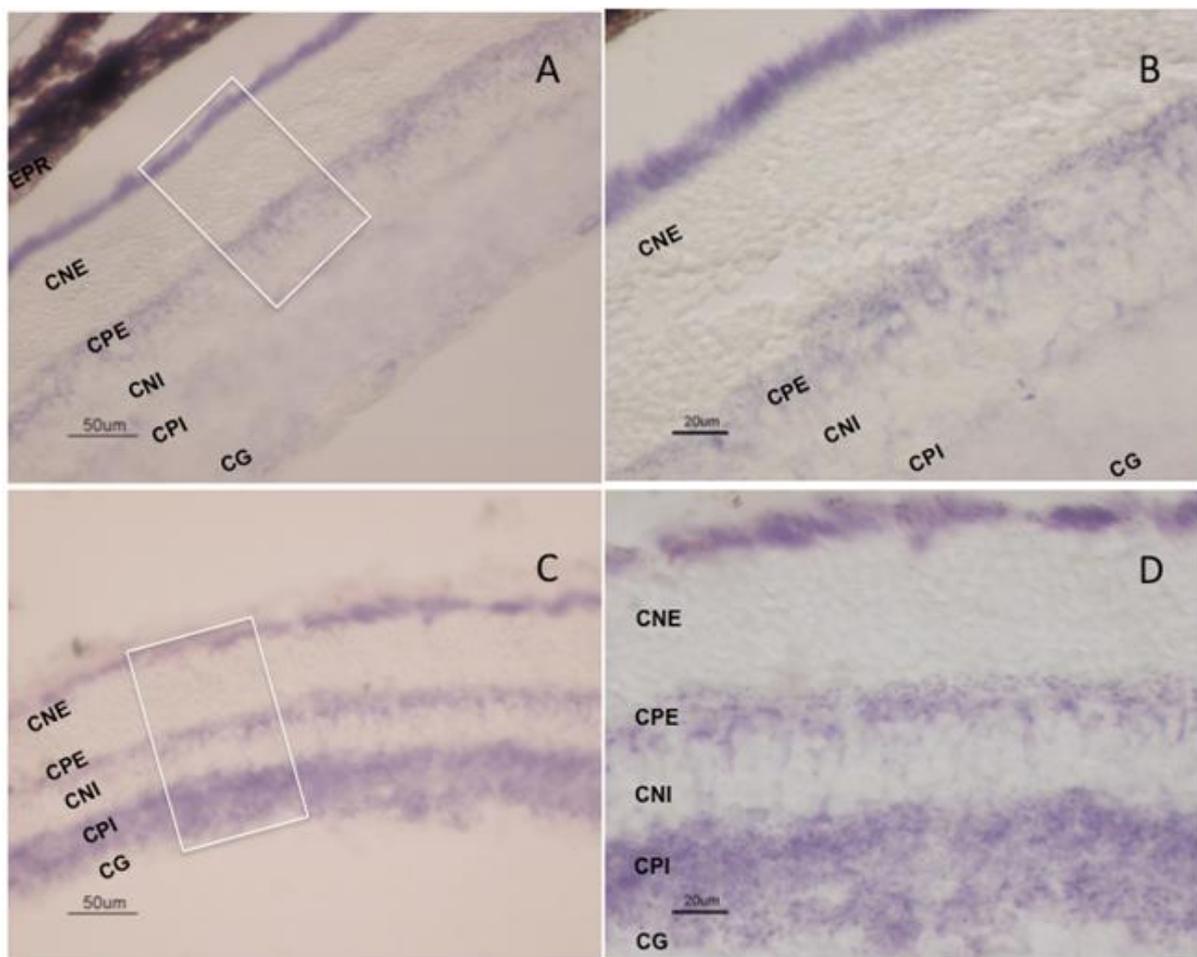


Figura 12. Histoquímica en cortes de retina, campo claro. En ratas de 20 (A y B) y 45 días de inducida la diabetes(C y D). Panel (B y D) en aumento. CNE: Capa nuclear externa. CPE: Capa plexiforme externa. CNI: Capa nuclear interna. CPI: Capa plexiforme interna. CG: Capa ganglionar

Discusión

La secuencia de eventos sucesivos a la condición de hiperglucemia causada por la diabetes que llevan a la RD no están caracterizados totalmente (Williams *et al.*, 2013). Una de las causas atribuida como patogénica en la RD es el estrés oxidante (Chistiakov, 2011). El estrés oxidante se define como la pérdida en el balance dinámico oxidoreductor celular; el cual de manera canónica se atribuye al aumento en la producción de ERO/ERN o la disminución de los sistemas antioxidantes.

Tanto las pruebas en pacientes con RD como los estudios celulares y moleculares en modelos animales sugieren una vulnerabilidad al daño oxidante en la retina neural desde el comienzo de la hiperglucemia, el cual se presenta antes de cualquier signo de daño vascular (Ola *et al.*, 2013). Por lo que es importante conocer la existencia de estrés oxidante en la retina al inicio de la hiperglucemia, y si éste participa de manera determinante en la patogénesis de esta enfermedad. Para evaluar la presencia de estrés oxidante en la RD, en este trabajo se determinó la formación de superóxido mitocondrial y la actividad de la NOS, las cuales son generadoras en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, así como la concentración de GSH y la actividad de la SOD, encargados de la primera respuesta ante un reto oxidante.

Las mitocondrias se consideran la principal fuente de superóxido, debido a los cambios en el estado redox en los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones (Murphy, 2009). Se encontró que la producción de superóxido por mitocondrias aisladas de la retina de animales diabéticos, no se modificó en los tiempos estudiados de diabetes. En este sentido, es probable que los antioxidantes mitocondriales (GSH, MnSOD) sean capaces de neutralizar la producción de este radical, sea el caso que aumente o no su generación. En contraposición a lo obtenido, algunos estudios han

descrito el aumento en la generación de superóxido en la retina de ratas diabéticas a los 2 meses de establecida la diabetes, así como en células de Müller y endotelio en cultivo (Du *et al.*, 2003); la producción de superóxido regresó a los niveles control cuando se sobre expresaron las enzimas MnSOD y Cu/ZnSOD (Du *et al.*, 2003; Kowluru *et al.*, 2006). Adicionalmente Sasaki *et al* (2010) encontró un aumento en la producción de superóxido en cortes histológicos en retina de ratón después de un mes de inducida la diabetes, y éste aumento se registró solamente en la región de la CNI donde se encuentran una gran cantidad de vasos sanguíneos, por lo cual la producción de superóxido proviene posiblemente del tejido vascular, como consecuencia a la activación de las enzimas NADPH oxidasas (isoformas, 1, 2 y 4) (Seedek *et al.*, 2012). Por lo tanto, aunque en nuestro estudio no se apreció aumento en la producción de superóxido mitocondrial no se excluye la posibilidad de su producción por otras vías celulares.

Uno de los sistemas antioxidantes celulares por excelencia es el glutatión, el cual actúa a través de dos tipos de mecanismos: Directo, como donador de electrones, induciendo la reducción de peróxidos, radicales superóxido e hidroxilo; e indirectamente a través de la formación de enlaces disulfuro entre los grupos tiol de las proteínas (S-glutationilación). Adicionalmente, el GSH es un cofactor de enzimas antioxidantes y neuromodulador (Aoyama *et al.*, 2008). La síntesis de éste antioxidante es limitada por el transporte de cisteína y glutamato, los que comparten el mismo transportador, el cual puede afectarse por un estado celular oxidante (Aoyama *et al.*, 2008). Dichas propiedades hacen del GSH un buen indicador del estado oxidativo en los tejidos.

Las retinas de ratas diabéticas no presentaron una diferencia significativa en el contenido de GSH en relación con la retina de ratas normales, resultado que concuerda con lo informado por Agardh *et al.*, (1998) quien no observó cambios en los niveles de

GSH a 2 meses de diabetes, pero sí a los 6 meses. Asimismo, los niveles de glutatión oxidado (GSSG) en la retina de animales normales y diabéticas estaban por debajo de los niveles de detección del método empleado; resultado que está de acuerdo con el hecho de que en retina el GSSG solo representa el 1-5% del GSH total (Winkler & Giblin, 1983). Nuestros resultados sugieren que no existe estrés oxidante o bien un reciclaje rápido de la forma oxidada a la reducida o en su defecto un aumento en la síntesis del mismo.

Adicionalmente se demostró un aumento en la actividad de la SOD en la retina de ratas de 7 y 20 días de diabetes, sugiriendo que el aumento en la actividad de esta enzima puede regular los niveles de superóxido (ERO) si su producción hubiese aumentado. Un aumento de tres veces se reportó en la transcripción de la SOD a tan solo 3 días de inducida la diabetes (Joussen *et al.*, 2001). Esta respuesta antioxidante (el mantenimiento del nivel de GSH y aumento en la actividad de SOD), podría ser mediada por la activación de mecanismos de señalización tales como la mediada por el factor eritroide nuclear 2 (Nrf2, el cual se conoce que se internaliza al núcleo y activa la transcripción de genes en la región de -elementos de respuesta antioxidante - (sus siglas en inglés, ARE), los cuales incluyen la regulación del GSH y la SOD (Ma, 2010; Ma, 2013). Por otro lado, las ERN al igual que las ERO propician un estado oxidante. La fuente principal de ERN es el óxido nítrico (NO). El NO es un neurotransmisor (NT)/neuromodulador involucrado en la adaptación de luz en la retina de vertebrados (Vielma *et al.*, 2012), vasodilatador y fuente de peroxinitrito (ONOO⁻), dicha ERN es capaz de oxidar proteínas, DNA y lípidos (Tabla 1). La oxido nítrico sintasa (NOS), enzima encargada de su síntesis, se expresa de manera ubicua en el SNC, incluyendo la retina; y posee actividad de diaforasa (capacidad de reducir la sal de tetrazolio), la cual colocaliza al 100% con su inmunodetección (Roufail *et al.*, 1998), de aquí que, la histoquímica de la NADPH-(d) es un método común para identificar las tres isoformas

de la NOS (Li *et al.*, 2003). La NOS neuronal (NOSn) es la isoforma enzimática más abundante en la retina (Giove *et al.*, 2009).

En nuestro estudio, las retinas de animales normales y diabéticos presentaron un número equivalente de células positivas a la NOS. Estos resultados son contrarios a lo descrito por Roufail *et al.* (1998) quien encontró que el número de células con actividad de NOS, cuantificadas tanto por histoquímica como su presencia por inmunolocalización, disminuye desde la primera semana de inducida la diabetes. Este autor demostró que este efecto se pierde parcialmente con el tratamiento con aminoguanidina o insulina y no por el inhibidor de la NOS, el L-NAME.

Si bien el número de células positivas a NOS no se modificó durante la diabetes, nuestros resultados sugieren un aumento en la actividad de la enzima, ya que, la histoquímica se incrementó considerablemente tanto en los somas de las neuronas como en los vasos sanguíneos de las retinas de animales diabéticos de 20 y 45 días. En cuanto al endotelio vascular, Zheng *et al.* (2007) describió la participación en las lesiones vasculares y no vinculadas en las alteraciones neuronales de las isoformas NOSe y NOSi en animales diabéticos de 2 meses debido a la activación de algunos componentes de la respuesta inflamatoria en la retina.

Efectivamente, se encontró un aumento de la actividad de diaforasa en los cortes histológicos de la retina de manera sustancial en el segmento interno de los fotorreceptores, en la CPE, CPI y CG a los 20 y 45 días de inducida la diabetes. Dicho aumento en la activación de la NOS concuerda con informes anteriores en los que a períodos similares y más avanzados en la RD (Goto *et al.*, 2005; Giove *et al.*, 2009), donde la actividad de la NOS y su sustrato L- arginina aumenta; no obstante –y manera interesante - el número de células NOSn positivas disminuyen así como el nivel de expresión de la proteína.

El aumento en la actividad de la NOS puede incrementar la formación de ONOO⁻ y de manera consecuente podría inducir estrés nitrosativo y/o afectar la función neuromoduladora y vasodilatadora del NO; por ejemplo, la respuesta a la luz por medio de la señalización GCs-GMPc (Vielma *et al.*, 2012). Se han postulado dos mecanismos por los cuales se induce incremento en la actividad de la NOSn: la primera incluye una activación directa por el aumento intracelular de Ca²⁺ vía activación de los receptores de glutamato, y la segunda por la activación de la calcineurina, la cual desfosforila la Ser847 de la NOSn y la sobreactiva (Giove *et al.*, 2009).

En éste trabajo se demostró que a tiempos cortos de establecida la diabetes, (hiperglucemia) no se presentó un aumento en la generación de superóxido por la mitocondria y los niveles de GSH, el principal antioxidante celular, no se modificó e la retina de ratas diabéticas. Por otro lado, se observó un aumento en la actividad de la SOD, el cual representa un mecanismo protector ante un reto oxidante. No obstante, el aumento en la actividad de la NOS puede apuntar a la existencia de un estrés nitrosativo vía ONOO⁻, que en cuyo caso podría ser determinante en los cambios bioquímicos y fisiológicos presentes en estadios más avanzados de la RD, e incluso estar involucrado como factor patogénico.

Estos resultados apuntan que la participación del estrés oxidante en la patogénesis de la RD no es originado por la generación de superóxido mitocondrial, sin embargo, existen distintas vías oxidantes como la nitrosativa que pueden llevar a un cambio redox que afecte a la retina al inicio de la diabetes, que en cuyo caso, los resultados aquí presentados sugieren que la capacidad antioxidante celular responde al reto oxidante si este existe inicialmente, pero eventualmente este mecanismo protector decae y por ende el daño oxidante es observado a tiempos más avanzados de diabetes.

Conclusiones

- En la retina de ratas diabéticas a tiempos cortos de inducida la diabetes no se encontró un incremento en los niveles de superóxido generado por la vía mitocondrial, el cual pudiese desencadenar un estado de estrés oxidante celular. Esto es probablemente debido al incremento en la actividad de la SOD y la preservación de los niveles de GSH.
- La cuantificación de células positivas a la histoquímica de la NOS no varía a los distintos tiempos del estudio de la enfermedad, por lo que se sugiere que no hay disminución en la expresión de esta enzima.
- La histoquímica de la enzima óxido nítrico sintasa refleja un posible aumento en su actividad, por lo cual, sugiere un posible estrés nitrosativo en las retinas de ratas diabéticas a tiempos cortos de inducción de la enfermedad.

Bibliografía

Agardh CD, Agardh E, Qian Y, Hultberg B. (1998) Glutathione levels are reduced in diabetic rat retina but are not influenced by ischemia followed by recirculation. *Metabolism*. Mar; 47(3):269-272.

Aoyama K, Watabe M, Nakaki T.(2008). Regulation of neuronal glutathione synthesis. *Review. J Pharmacol Sci*. Nov; 108(3):227-238.

Barber AJ. (2003) A new view of diabetic retinopathy: a neurodegenerative disease of the eye. *Review. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 Apr;27(2):283-290.

Barber AJ, Gardner TW, Abcouwer SF. (2011). The significance of vascular and neural apoptosis to the pathology of diabetic retinopathy. *Review. Invest Ophthalmol Vis Sci*. Feb 28; 52(2):1156-1163.

Blog educativo de la salud visual. [en línea] <http://educoptica.blogspot.mx> visitada el Diciembre-2013.

Bringmann A, Pannicke T, Grosche J, Francke M, Wiedemann P, Skatchkov SN, Osborne NN, Reichenbach A. (2006). Müller cells in the healthy and diseased retina. *Review. Prog Retin Eye Res*. Jul; 25(4):397-424.

Brownlee M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. Dec 13; 414(6865):813-820.

Buonocore G, Perrone S, Tataranno ML. (2010). Oxygen toxicity: chemistry and biology of reactive oxygen species. *Semin Fetal Neonatal Med*. Aug; 15(4):186-190.

Castro L, Freeman BA. (2001). Reactive oxygen species in human health and disease. *Nutrition*. Feb; 17(2):161, 163-165.

Chistiakov DA. (2011). Diabetic retinopathy: pathogenic mechanisms and current treatments. *Diabetes Metab Syndr*. Jul-Sep; 5(3):165-172.

Chowdhury SK, Dobrowsky RT, Fernyhough P. (2011). Nutrient excess and altered mitochondrial proteome and function contribute to neurodegeneration in diabetes. *Mitochondrion*. Nov; 11(6):845-854.

Chung SS, Ho EC, Lam KS, Chung SK. (2003). Contribution of polyol pathway to diabetes-induced oxidative stress. *Review. J Am Soc Nephrol*. Aug; 14(8 Suppl3):S233-236.

de Pablo F, de la Rosa EJ. (1995). The developing CNS: a scenario for the action of proinsulin, insulin and insulin-like growth factors. *Review. Trends Neurosci*. Mar; 18(3):143-50.

Díaz- Acosta A. E, Membrillo- Hernández. J. (2006). Consecuencias fisiológicas de la oxidación de proteínas por carbonilación en diversos sistemas biológicos *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, UNAM, 9: 34-44

Dröge W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Review. Physiol Rev.* Jan; 82(1):47-95.

Du Y, Miller CM, Kern TS. (2003). Hyperglycemia increases mitochondrial superoxide in retina and retinal cells. *Free Radic Biol Med.* Dec 1; 35(11):1491-1499.

Facchinetti F, Dawson VL, Dawson TM. (1998). Free radicals as mediators of neuronal injury. *Review. Cell Mol Neurobiol.* Dec; 18(6):667-682.

Fieschi F, Nivière V, Frier C, Décout JL, Fontecave M. (1995). The mechanism and substrate specificity of the NADPH:flavin oxidoreductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* Dec 22; 270(51):30392-400.

Gardner TW, Abcouwer SF, Barber AJ, Jackson GR. (2011). An integrated approach to diabetic retinopathy research. *Arch Ophthalmol.* Feb; 129(2):230-235.

Giove TJ, Deshpande MM, Gagen CS, Eldred WD. (2009). Increased neuronal nitric oxide synthase activity in retinal neurons in early diabetic retinopathy. *Mol Vis.* Nov 9; 15:2249-58.

Goto R, Doi M, Ma N, Semba R, Uji Y. (2005) Contribution of nitric oxide-producing cells in normal and diabetic rat retina. *Jpn J Ophthalmol.* Sep-Oct; 49(5):363-370.

Joussen AM, Huang S, Poulaki V, Camphausen K, Beecken WD, Kirchhof B, Adamis AP. (2001). In vivo retinal gene expression in early diabetes. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* Nov; 42(12):3047-3057.

Kono Y. (1978). Generation of superoxide radical during autoxidation of hydroxylamine and an assay for superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys.* Feb; 186(1):189-195.

Kowluru RA, Kowluru V, Xiong Y, Ho YS. (2006). Overexpression of mitochondrial superoxide dismutase in mice protects the retina from diabetes-induced oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* Oct 15; 41(8):1191-1196.

Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Review. Exp Diabetes Res.* 2007:43603.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* Nov; 193 (1):265-75.

Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I. (2003) NADPH diaphorase activity in the rat retina during the early stages of experimental diabetes. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* Sep; 241 (9):747-56.

Liu Rui H., Fu S. Y., Zhan H. Y., Lucia L. A. (2009) General Spectroscopic Protocol to Obtain the Concentration of the Superoxide Anion Radical. *Ind Eng Chem Res.*48; 9331–9334.

Mac Donald PE, Joseph JW, Rorsman P.(2005) Glucose-sensing mechanisms in pancreatic beta-cells. Review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* Dec 29;360 (1464).

Ma Q. (2010). Transcriptional responses to oxidative stress: pathological and toxicological implications. *Pharmacol Ther.* Mar; 125(3):376-393.

Ma Q. (2013). Role of Nrf2 in oxidative stress and toxicity. Review. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2013; 53:401-26.

Manoli I, Alesci S, Blackman MR, Su YA, Rennert OM, Chrousos GP. (2007) Mitochondria as key components of the stress response. *Trends Endocrinol Metab.* Jul; 18(5):190-198.

Masland RH.(2001). The fundamental plan of the retina. Review. *Nat Neurosci.* Sep; 4(9):877-86.

McCaa CS. (1982). The eye and visual nervous system: anatomy, physiology and toxicology. *Environ Health Perspect.* Apr;44:1-8.

McCord JM, Fridovich I. (1969).Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* Nov 25; 244(22):6049-55.

Murphy MP. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. Review. *Biochem J.* Jan 1; 417(1):1-13.

Nelson DL, Cox MM (eds.) (2008). *Lehninger. Principles of biochemistry . Fifth Edition.* W. H. Freeman & Company. New York.

Obrosova IG, Drel VR, Kumagai AK, Szábo C, Pacher P, Stevens MJ. (2006) Early diabetes-induced biochemical changes in the retina: comparison of rat and mouse models. *Diabetologia.* Oct; 49(10):2525-2533.

Ola MS, Nawaz MI, Khan HA, Alhomida AS.(2013) Neurodegeneration and neuroprotection in diabetic retinopathy. *Int J Mol Sci.* Jan 28; 14(2):2559-2272.

OMS. Temas de salud- Diabetes. [en línea] www.who.int/topics/diabetes_mellitus/es/index.html visitada en Diciembre 2013.

Palanza L, Jhaveri S, Donati S, Nuzzi R, Vercelli A. (2005).Quantitative spatial analysis of the distribution of NADPH-diaphorase-positive neurons in the developing and mature rat retina. *Brain Res Bull.* 2005 Apr 30; 65(4):349-360.

Pierre J.L.(1995).Chemistry of dioxygen and its activated species. *Analysis of Free Radicals in Biological Systems.* Favier *et al.* (Eds.) Birkhauser Verlag Basel W.D. Switzerland.

Rahman I, Kode A, Biswas SK. (2006) Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. *Nat Protoc.* 1(6):3159-3165.

Retina [en línea] [http:// www.catalase.com /retina.html](http://www.catalase.com/retina.html) visitada en Noviembre 2013.

Rhodes CJ, White MF.(2002). Molecular insights into insulin action and secretion. *Review. Eur J Clin Invest.* Jun; 32 Suppl 3:3-13.

Roufail E, Soulis T, Boel E, Cooper ME, Rees S.(1998) Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine. *Diabetologia.* Dec; 41(12):1419-1425.

Sagar SM. (1986). NADPH diaphorase histochemistry in the rabbit retina. *Brain Res.* 1986 May 14; 373(1-2):153-158.

Salceda, R. (1998). Diferenciación de la retina de los vertebrados: mecanismos celulares y moleculares. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* 48:115-124.

Salceda R, Vilchis C, Coffe V, Hernández-Muñoz R. (1998). Changes in the redox state in the retina and brain during the onset of diabetes in rats. *Neurochem Res.* Jun;23(6):893-897.

Sarthy V, Ripps H. (2002). The retinal müller cell. Structure and function. *Perspectives in vision research.* Kluwer Academic Publishers.

Sasaki M, Ozawa Y, Kurihara T, Kubota S, Yuki K, Noda K, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K. (2010). Neurodegenerative influence of oxidative stress in the retina of a murine model of diabetes. *Diabetologia.* May; 53(5):971-979.

Sedeek M, Montezano AC, Hebert RL, Gray SP, Di Marco E, Jha JC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm K, Schiffrin EL, Wilkinson-Berka JL, Touyz RM. (2012). Oxidative stress, Nox isoforms and complications of diabetes--potential targets for novel therapies. *J Cardiovasc Transl Res.* Aug; 5(4):509-518.

Simó R, Villarroel M, Corraliza L, Hernández C, Garcia-Ramírez M.(2010). The retinal pigment epithelium: something more than a constituent of the blood-retinal barrier--implications for the pathogenesis of diabetic retinopathy. *J Biomed Biotechnol.* 190724.

Shinoda K, Rejdak R, Schuettauf F, Blatsios G, Völker M, Tanimoto N, Olcay T, Gekeler F, Lehaci C, Naskar R, Zagorski Z, Zrenner E. (2007) Early electroretinographic features of streptozotocin-induced diabetic retinopathy. *Clin Experiment Ophthalmol.* Dec; 35(9):847-54.

Szkudelski T. (2001) The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Review. Physiol Res.*; 50(6):537-46.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* Aug; 39(1):44-84.

Vielma AH, Retamal MA, Schmachtenberg O. (2012). Nitric oxide signaling in the retina: what have we learned in two decades? *Brain Res.* Jan 9; 1430:112-25.

Wässle H. (2004). Parallel processing in the mammalian retina. Review. *Nat Rev Neurosci.* Oct; 5(10):747-57.

Williams M, Hogg RE, Chakravarthy U. (2013). Antioxidants and diabetic retinopathy. *Curr Diab Rep.* 13:481-487

Winkler BS, Giblin FJ. (1983). Glutathione oxidation in retina: effects on biochemical and electrical activities. *Exp Eye Res.* Feb; 36(2):287-297.

Winterbourn CC. (2008). Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. Review. *Nat Chem Biol.* May; 4(5):278-286.

Yang Y, Mao D, Chen X, Zhao L, Tian Q, Liu C, Zhou BL. (2012). Decrease in retinal neuronal cells in streptozotocin-induced diabetic mice. *Mol Vis.* 18:1411-20.

Yu BP. (1994) Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. Review. *Physiol Rev.* Jan; 74(1):139-162.

Zheng L, Du Y, Miller C, Gubitosi-Klug RA, Ball S, Berkowitz BA, Kern TS. (2007). Critical role of inducible nitric oxide synthase in degeneration of retinal capillaries in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetologia.* Sep; 50(9):1987-1996.