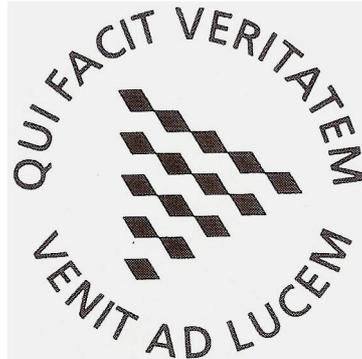


Universidad Cardenal Herrera-CEU

Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología



El estrés oxidativo como mecanismo de la retinopatía diabética: efectos del tratamiento con ácido lipoico.

TESIS DOCTORAL

Presentada por: Maria Garcia Pous

Dirigida por: Dr. Salvador García Delpech

Dr. Manuel Díaz Llopis

Dr. Francisco Bosch Morell

VALENCIA

2008

*Als meus pares i
al meu company de viatge, Javi.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Salvador Garcia Delpech, al cual desde el primer día que conocí ya me inspiró confianza y seguridad. Su incansable capacidad de trabajo es un ejemplo para mí y sin su gran apoyo y esfuerzo esta tesis no hubiese visto la luz. Pero ante todo, para mí es un gran amigo.

Al Dr. Manuel Díaz Llopis, la persona que me ha inculcado un gran amor por mi profesión como oftalmóloga. El Dr. Manuel Díaz es una persona excepcional tanto profesionalmente como a nivel personal, y es un orgullo haber aprendido a su lado. Su inquietud por investigar e innovar ha sido el impulso para que iniciase esta tesis.

Al Prof. Francisco Bosch Morell, persona que ha estado en todo momento ahí dirigiendo la tarea más ardua y laboriosa de esta tesis. Persona de fácil acceso y comprensión, gracias por toda su ayuda.

A Siv Johnsen, una gran ayuda en todo momento en el laboratorio y fuera de él. Sin su paciencia con mis dudas y preguntas esta tesis no se hubiese acabado nunca.

A Leticia, mi técnico de laboratorio particular, por su gran eficacia y rapidez en las fases finales de esta tesis.

A todas las Marias del laboratorio, en especial a M Miranda, por estar siempre dispuesta a echarme una mano con una gran sonrisa.

A toda la gente del laboratorio de la Universidad Cardenal Herrera-CEU que he conocido (Emma, Inma, Samuel...) por haberme acogido como una más y ayudarme en lo que les he necesitado.

A Victoria Vallés, sin su ayuda todo el papeleo de presentar una tesis sería imposible de realizar.

Y como no, a mis compañeros del Hospital General Universitario de Valencia, con muchísimo cariño para Patricia y David. Habéis puesto un listón muy alto como compañeros de trabajo y amigos. Gracias por haberos conocido.

A todos mis amigos, sobretodo a M^a José, Diego y el que está de camino. Gracias por vuestro apoyo, y... con los problemas informáticos.

Por último, gracias a mis padres por ser como sois. Estoy orgullosa de vosotros. Y a Javi, por estar ahí desde el primer día que empecé mi carrera como médico y luego hacia el doctorado.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ÍNDICE DE TABLAS

ÍNDICE DE FIGURAS

INTRODUCCIÓN	1
1. Diabetes mellitus.....	1
1.1. Definición.....	1
1.2. Clasificación.....	2
1.3. Epidemiología.....	7
1.4. Tratamiento.....	8
1.4.1. Dieta.....	9
1.4.2. Insulina.....	9
1.4.3. Hipoglucemiantes orales.....	10
1.4.4. Ejercicio.....	11
1.4.5. Nuevas tendencias en el tratamiento de la diabetes.....	11
2. Retinopatía diabética.....	14
2.1. Definición y epidemiología.....	14
2.2. Factores de riesgo.....	14
2.3. La retina normal.....	16
2.3.1. Las capas de la retina.....	17
2.4. Fisiopatología de la retinopatía diabética.....	20
2.5. Clasificación de la retinopatía diabética.....	24
2.6. Diagnóstico y tratamiento.....	27

2.7.Utilidad del electroretinograma.....	30
2.7.1. El electroretinograma en la diabetes.....	32
3. Fisiopatología del estrés oxidativo y radicales libres.....	34
3.1.Estrés oxidativo y radicales libres.....	34
3.1.1. Papel fisiológico.....	36
3.1.2. Papel patológico.....	37
3.1.3. Generación de radicales libres.....	37
3.2.Peroxidación lipídica.....	38
3.2.1. Concepto.....	38
3.2.2. Productos de la peroxidación de lípidos.....	40
3.2.3. Malondialdehído.....	41
3.3.Defensa antioxidante.....	43
3.3.1. Sistemas antioxidantes de importancia biológica.....	43
3.3.2. El sistema glutathion.....	44
3.3.3. Otros antioxidantes naturales.....	48
3.3.4. El ácido lipoico como antioxidante natural.....	52
3.3.5. Antioxidantes sintéticos.....	62
4. Diabetes y estrés oxidativo.....	63
4.1.El estrés oxidativo en la retinopatía diabética.....	67
5. Apoptosis.....	69
5.1.Apoptosis y estrés oxidativo.....	73
6. Modelos experimentales de diabetes.....	75
7. Epílogo.....	77

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	79
MATERIAL Y MÉTODOS	83
1. Aparatos.....	85
2. Reactivos.....	86
3. Diseño del experimento.....	88
3.1. Tratamiento de los animales.....	88
3.2. Inducción de la diabetes en ratones.....	88
3.3. Diseño del experimento.....	89
3.3.1. Administración del ácido lipoico.....	89
3.3.2. Administración de la insulina.....	90
4. Obtención de las muestras.....	90
4.1. Sangre.....	90
4.2. Retina.....	90
5. Procedimiento analíticos.....	92
5.1. Determinación de la glucemia.....	92
5.2. Determinación de la hemoglobina glicosilada (HbA1C).....	96
5.3. Determinación de proteínas.....	98
5.4. Determinación de la glutatión peroxidasa.....	100
5.5. Determinación del malondialdehído.....	104
5.6. Determinación del glutatión.....	108
6. Procedimientos electrofisiológicos.....	112
6.1. El electroretinograma.....	112
7. Estudios histoquímicos.....	114
7.1. Fijación y corte de los ojos.....	114
7.2. Tinción de los cortes.....	114

7.2.1. Tinción con hematoxilina-eosina.....	114
7.2.2. Tinción Bcl-2.....	115
7.2.3. Protocolo de valoración anatómico-patológica.....	116
7.2.4. Tinción TUNEL.....	117
7.2.5. Tinción TUNEL con biotina.....	121
7.2.6. Tinción con AVIDINA.....	126
8. Estudio estadístico.....	128
8.1. Análisis descriptivo.....	128
8.2. Análisis bivalente.....	130
RESULTADOS.....	133
1. Estudio de las variables descriptivas.....	135
1.1. Estudio del peso.....	135
2. Estudio del plasma.....	140
2.1. Estudio del % de hemoglobina glicosilada en sangre.....	140
2.2. Estudio de las glucemias.....	143
3. Estudio bioquímico de la retina.....	145
3.1. Estudio de la concentración de malondialdehído en el homogenado de ojo.....	145
3.2. Estudio de la concentración de glutatión en el homogenado de ojo.....	149
3.3. Estudio de la actividad de la glutatión peroxidasa en el homogenado de ojo.....	153
4. Estudio electrofisiológico de la retina: el electroretinograma.....	157
5. Estudio histológico e inmunohistoquímico de la retina.....	161

5.1. Estudio histológico.....	161
5.2. Estudio inmunohistoquímico: expresión de la proteína Bcl-2.....	167
6. Estudio del daño oxidativo a nivel nuclear mediante la tinción con avidina.....	170
7. Estudio de la apoptosis mediante técnica de TUNEL en la retina.....	173
DISCUSIÓN.....	177
1. Estudio de los parámetros indicadores de estrés oxidativo en la retina.....	181
1.1. Estudio del MDA.....	185
1.2. Estudio del sistema glutatión.....	187
2. Estudio de las alteraciones en el electroretinograma.....	190
3. Estudios inmunohistoquímicos sobre la retina: determinación de la proteína Bcl-2.....	194
4. Estudios de la apoptosis y daño oxidativo en el homogenado de ojo ..	197
5. Epílogo.....	201
CONCLUSIONES.....	203
BIBLIOGRAFÍA.....	207
PUBLICACIONES.....	243

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADA: American Diabetes Association.

AGF : angiofluoresceíngrafía.

AL: ácido lipoico.

DCCT: Diabetes control and complications trial.

DM: diabetes mellitus

DMAE: degeneración macular asociada a la edad.

DMID: diabetes mellitus insulín dependiente.

EDTRS: early treatment diabetic retinopathy study research group.

EMD: edema macular diabético.

EOG: electrooculograma.

EPR: epitelio pigmentario de la retina.

ERG: electrorretinograma.

ERGP: electroretinograma patrón.

GSH: glutatión reducido.

GSH-Px: glutatión peroxidasa

HbA1C: hemoglobina glicosilada

MDA: malondialdehído.

mERG: electrorretinograma multifocal.

OCT: optical coherence tomography.

PVE: potencial visual evocado.

RD: retinopatía diabética.

RDP: retinopatía diabética proliferante.

RL: radicales libres.

ROS: especies reactivas de oxígeno.

TUNEL: TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling

UKPDS: The United Kingdom prospective diabetes study.

WESDR: The Wisconsin epidemiologic study of diabetic retinopathy.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: clasificación etiológica de la diabetes mellitus.

Tabla 2: clasificación internacional de la retinopatía diabética.

Tabla 3: clasificación internacional del edema macular.

Tabla 4: clasificación del edema macular diabético en base a los patrones de la OCT.

Tabla 5. Valores medios de pesos de los diferentes grupos estudiados durante el experimento.

Tabla 6. Variación del peso final-inicial (%) según grupo.

Tabla 7. Estudio estadístico de la distribución de variación de peso según grupo.

Tabla 8. Estudio estadístico del peso al final del experimento según grupo.

Tabla 9. Niveles medios de HbA1c de los ratones de todos los grupos al finalizar el estudio.

Tabla 10. Valores medios de las glucemias basales y tras 21 día de experimento en los seis grupos de estudio.

Tabla 11. Niveles medios de concentración de MDA (nmol/mg proteínas) en los diferentes grupos estudiados.

Tabla 12. Estudio estadístico de la concentración media de MDA (nmol/mg) en el homogenado de ojo en los diferentes grupos estudiados

Tabla 13. Concentración media de los niveles de glutatión (nmol/mg proteínas) de todos los grupos estudiados.

Tabla 14. Estudio estadístico de la concentración de GSH en los diferentes grupos.

Tabla 15. Valores medios de la actividad de la glutatión peroxidasa en el homogenado de ojo de los seis grupos estudiados.

Tabla 16. Estudio estadístico de la actividad de la GSH peroxidasa en el homogenado de ojo en lo grupos estudiados.

Tabla 17. Amplitud de la onda b del electrorretinograma (mv) de los ratones de los seis grupos estudiados.

Tabla 18. Estudio estadístico de la amplitud de la onda b en los seis grupos estudiados.

Tabla 19. Tabla de espesor (μm) de las diferentes capas de la retina y de toda la retina en todos los grupos estudiados.

Tabla 20. Expresión de la proteína Bcl-2 ($\text{cel}/\mu\text{m}^2$) en los diferentes grupos estudiados.

Tabla 21. Concentración media del número de células apoptóticas por unidad de área en la retina de los seis grupos estudiados.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Las capas de la retina.

Figura 2. Representación gráfica de la onda bifásica del ERG.

Figura 3. Esquema de los mecanismos implicados en la lipoperoxidación.

Figura 4. Estructura química del MDA.

Figura 5. Representación del sistema glutathion.

Figura 6. Ácido lipoico (a) y su forma reducida ácido dihidrolipoico (b).

Figura 7. Esquema de las alteraciones bioquímicas en la diabetes mellitus y su posible corrección mediante la administración oral de ácido lipoico.

Figura 8. Posibles mecanismos que conducen al estrés oxidativo.

Figura 9. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico.

Figura 10. Curva patrón de MDA obtenida por HPLCA.

Figura 11. Reacción del glutathion con el ácido iodoacético y el reactivo de Sanger.

Figura 12. Curva patrón de GSH obtenida mediante HPLC.

Figura 13. Método TUNEL de detección de apoptosis.

Figura 14. Método de detección de apoptosis mediante el kit ApoptTag® peroxidasa.

Figura 15. Diagrama de barras de los valores medios de pesos de los diferentes grupos en cada momento del estudio.

Figura 16. Gráfico promedio de variación de peso de los distintos grupos.

Figura 17. Valores medios de la Hb1Ac según grupo al final del experimento.

Figura 18. Diagrama de barras de la glucemia media en cada grupo estudiado.

Figura 19. Concentración media de MDA (nmol/mg proteínas) en el homogenado de ojo de todos los grupos estudiados.

Figura 20. Concentración media de GSH (nmol/mg proteínas) en el homogenado de ojo de todos los grupos estudiados.

Figura 21. Concentración media de la actividad de la GPx (nml/nmg proteínas/min) en los seis grupos estudiados.

Figura 22. Valores medios de la amplitud de la onda b (mv) en los seis grupos estudiados.

Figura 23. Espesor de toda la retina (μm) según los grupos estudiados.

Figura 24. Espesor de las diferentes capas de la retina (% μm) según los grupos estudiados.

Figura 25. Tinción hematoxilina-eosina de la retina de un ratón control y un ratón diabético.

Figura 26. Tinción DAPI de la retina de un ratón control y un ratón diabético para estudio del espesor de las capas de la retina.

Figura 27. Concentración media de la expresión de la proteína Bcl-2 ($\text{cel}/\mu\text{m}^2$) en los seis grupos estudiados.

Figura 28. Imagen de la tinción Bcl-2 en un ratón control y un ratón diabético.

Figura 29. Concentración media del número de células positivas para avidina por unidad de área en los seis grupos estudiados.

Figura 30. Imagen de la tinción con avidina de un ratón control y un ratón diabético.

Figura 31. Número de células apoptóticas por unidad de área en los diferentes grupos estudiados.

Figura 32. Tinción TUNEL con biotina de un ratón control y de un diabético como marcador de apoptosis celular.

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES MELLITUS

1.1 DEFINICIÓN

La diabetes mellitus (DM) es la enfermedad plurimetabólica más frecuente en humanos. Se produce como consecuencia de dos mecanismos principalmente; el primero es debido a un déficit en la secreción de la insulina, el segundo como consecuencia de un defecto en la captación celular de la glucosa por un mecanismo de resistencia a la acción de la insulina. Ambos mecanismos conllevan a un trastorno en el metabolismo de los hidratos de carbono, pero también del metabolismo lipídico y proteico (Alfaro V et al, 2006).

Se trata de un trastorno crónico caracterizado por tres tipos de manifestaciones:

1. Síndrome metabólico consistente en hiperglucemia, glucosuria, polifagia, polidipsia, poliuria y alteraciones en el metabolismo de los lípidos y las proteínas.

2. Síndrome vascular que puede ser macro y microangiopático, y que puede afectar a cualquier órgano pero principalmente al corazón, la circulación cerebral y periférica, los riñones y la retina.

3. Síndrome neuropático, tanto autónomo como periférico (Farreras y Rozman, 1998).

1.2 CLASIFICACIÓN

Los procesos patógenos que están implicados en el desarrollo de la diabetes son varios y van desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas, hasta situaciones en las que se observa resistencia a la insulina. Frecuentemente coexisten en el mismo paciente los defectos en la secreción de insulina y los defectos en la acción de la insulina y resulta difícil saber cual de las dos es la causa primaria de la hiperglucemia.

En función de los procesos patogénicos involucrados en el desarrollo de la diabetes primaria, se distinguen dos tipos:

- **DM tipo 1**, diabetes insulina dependiente (DMID) o diabetes juvenil. Está causada por una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, por destrucción autoinmune o idiopática de las células β del páncreas. Suele diagnosticarse antes de los 30 años. Se ha demostrado una relación entre la DM tipo 1 y el complejo mayor de histocompatibilidad mayor (HLA) en el cromosoma 6. Estos individuos con predisposición genética desarrollan la enfermedad si son expuestos a un mecanismo desencadenante, no conocido todavía (Pulido JS, 2003).

- **DM tipo 2**, diabetes no insulina dependiente (DMNID) o diabetes del adulto. Es la forma más prevalente y se debe a una resistencia a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta secretora de la misma. Existe un patrón

de herencia familiar. Suele asociarse a la obesidad y se diagnostica después de los 30 años.

La American Diabetes Association (ADA) recomienda una clasificación que introduce algunos cambios a la clasificación de 1979 del Grupo Nacional de Datos sobre la Diabetes (ADA, 2007).

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.

<p>I. Diabetes tipo 1 (destrucción de células β que normalmente conduce a la deficiencia absoluta de insulina).</p> <p>A. Autoinmunitaria</p> <p>B. Idiopática</p>
<p>II. Diabetes tipo 2 (que puede ir desde una resistencia predominante a la insulina con una deficiencia relativa de insulina hasta un defecto predominante secretor con resistencia a la insulina)</p>

III. Otros tipos específicos

A. Defectos genéticos de la función de las células beta

1. Cromosoma 12, HNF-1-alfa (antes MODY 3)
2. Cromosoma 7, glucokinasa (antes MODY 2)
3. Cromosoma 20, HNF-4-alfa (antes MODY 1)
4. Cromosoma 13, IPF-1 (promotor del factor 1 de la insulina) (MODY 4)
5. Cromosoma 17, HNF-1 β (MODY 5)
6. Cromosoma 2, neuroD1 (MODY 6)
7. DNA mitocondrial
8. Otros

B. Defectos genéticos de la acción de la insulina

1. Resistencia a la insulina Tipo A
2. Leprechaunismo
3. Síndrome de Rabson-Mendenhall
4. Diabetes lipoatrófica
5. Otros

C. Enfermedades del páncreas exocrino

1. Pancreatitis
2. Traumatismo/Pancreatectomía
3. Neoplasia
4. Fibrosis quística
5. Hemocromatosis
6. Pancreatopía fibrocalculosa
7. Otros

D. Enfermedades endocrinas

1. Acromegalia
2. Síndrome de Cushing
3. Glucagonoma
4. Feocromocitoma
5. Hipertiroidismo
6. Somatostatina
7. Aldosteronoma
8. Otros

E. Inducida por medicamentos o sustancias químicas

1. Vacor
2. Pentamidina
3. Acido nicotínico
4. Glucocorticoides
5. Hormonas tiroideas
6. Diazóxido
7. Agonistas adrenérgicos β
8. Tiacidas
9. Dillantin
10. Interferón α
11. Otros

F. Infecciones

1. Rubeola congénita
2. Citomegalovirus
3. Otros

G. Formas poco comunes de diabetes mediada por alteraciones

inmunológicas

1. Síndrome del “hombre tieso”
2. Anticuerpos antirreceptor de insulina
3. Otros

H. Otros síndromes genéticos que en ocasiones se relacionan con

diabetes

1. Síndrome de Down
2. Síndrome de Klinefelter
3. Síndrome de Turner
4. Síndrome de Wolfram
5. Ataxia de Friedreich
6. Corea de Huntington
7. Síndrome de Lawrence-Moon-Beidl
8. Distrofia miotónica
9. Porfiria
10. Síndrome de Prader-Will
11. Otros

IV. Diabetes mellitus gestacional

1.3 EPIDEMIOLOGÍA

La DM es una de las enfermedades generales más frecuentes y extendidas en todo el mundo. La prevalencia en la población general es del 6-10%, siendo el 90-95% de éstos tipo 2. La prevalencia aumenta con la edad (6-7% en personas de 45-64 años y un 10-12% en mayores de 65 años), y es distinta según países, raza y etnia (Lafuente López-Herrera, 2005).

La prevalencia de la DM ha aumentado en los últimos años, debido principalmente al aumento de la vida en la población general, a la disminución de la mortalidad precoz de los pacientes diabéticos y a la dificultad de prevenir la aparición de la enfermedad. Pero también han influido los cambios en el estilo de vida, principalmente en los países industrializados, como la obesidad, relacionada directamente con la DM tipo 2, la disminución del ejercicio físico y la dieta alimenticia rica en grasas e hidratos de carbono refinados.

La Organización Mundial de la Salud estima que actualmente existen más de 125 millones de personas con DM, y espera un aumento del 40% en las naciones industrializadas, y de un 170% en los países subdesarrollados, para el año 2025; por lo que se prevé que la cifra de diabéticos sea de 300 millones para ese año (Pulido JS, 2003).

1.4 TRATAMIENTO

Al iniciar el tratamiento de un paciente es importante mejorar los síntomas atribuibles a la diabetes y evitar las consecuencias graves a corto plazo de un control deficiente. La atención continua del paciente diabético conlleva dos objetivos: mantener corregido el desequilibrio metabólico y prevenir las complicaciones crónicas. Para ello, se debe intentar mantener normales los niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada en sangre.

El control estricto de la glucemia ha demostrado que es la forma más eficaz de evitar las complicaciones a largo plazo de esta enfermedad, por lo que la tendencia actual en el tratamiento de la DM es el de imitar la secreción fisiológica de insulina más que dar suplementos por el déficit de insulina y además, disminuir al máximo posible el número de inyecciones al día.

El control de la glucemia normal requiere de la disponibilidad de insulina de acción rápida durante las comidas para evitar las excursiones transitorias de la hiperglucemia postprandial, y una insulina basal para mantener la glucemia entre las comidas. Además evitar los episodios de hipoglucemia también es un factor importante a la hora de plantear un tratamiento (DCCT, 1993).

Tradicionalmente el tratamiento de la diabetes mellitus se ha basado en dieta, insulina, hipoglucemiantes orales y ejercicio. Para conseguir un tratamiento eficaz es necesaria la educación del paciente y autovigilancia de la glucemia capilar. Así mismo, para evitar complicaciones es necesario

considerar los niveles de colesterol y triglicéridos entre los índices metabólicos que deben mantenerse normales, además de corregir los factores de riesgo cardiovasculares relacionados, como la hipertensión arterial, tabaquismo y obesidad.

Para evitar las secuelas de las complicaciones, es importante su detección temprana con el fin de iniciar cuanto antes los tratamientos adicionales que previenen las lesiones (como la fotocoagulación para prevenir la ceguera) o que modifican de forma favorable el curso de la complicación (antihipertensivos en nefropatía).

1.4.1. Dieta.

Todos los pacientes diabéticos deben llevar una dieta de por vida, que conviene ir modificando con el tiempo. Es conveniente una dieta hipocalórica ya que mejora la glucemia y la sensibilidad a la insulina. Se pretende lograr un peso ligeramente por debajo del ideal con un estado nutricional óptimo. Aquellos pacientes que utilizan insulina deben ajustarse perfectamente la dosis al tipo de dieta establecida y ser muy cuidadosos con los horarios de las comidas.

1.4.2. Insulina.

La insulina, es una hormona que se produce en las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas y permite la utilización de la glucosa en los

tejidos. La insulina está indicada en los pacientes con diabetes tipo 1 en los que la producción de insulina está muy disminuida o es nula, y que además necesitan de su aplicación para sobrevivir. También se aplica en situaciones especiales en diabéticos tipo 2, en algunos casos de diabetes secundaria a otras enfermedades y, con frecuencia, en la diabetes gestacional.

Inicialmente la insulina se obtenía de páncreas de buey o de cerdo, pero a partir de la década de los 80 se consigue insulina idéntica a la humana mediante métodos químicos y de recombinación genética.

La insulina, debido a su estructura proteica, es hidrolizada por los jugos gastrointestinales y no puede ser administrada por vía oral. En general, se administra por vía subcutánea, pero con la insulina regular de acción rápida se pueden utilizar otras vías como la intramuscular, intravenosa e intraperitoneal.

1.4.3. Hipoglucemiantes orales.

Los hipoglucemiantes orales (sulfonilureas, biguanidas, inhibidores de las glucosidasas alfa, etc), están indicados como tratamiento de primera elección en la diabetes tipo 2. Su mecanismo de acción antidiabética puede ser de tres formas: 1) promover una mayor secreción pancreática de insulina, 2) mejorar la sensibilidad del organismo a la acción de la insulina y 3) retardar la absorción intestinal de los carbohidratos.

1.4.4 Ejercicio.

La dieta debe acompañarse de la práctica de ejercicio físico moderado y regular, que amortigua la hiperglucemia postprandial e incrementa la sensibilidad a la insulina.

1.4.5 Nuevas tendencias en el tratamiento de la diabetes.

Además de la terapia clásica que se acaba de exponer, continuamente se están ensayando nuevos tratamientos para controlar e incluso evitar esta enfermedad.

Para cumplir los objetivos de tratamiento existen en el mercado ya insulinas de acción rápida y de acción mantenida. El tratamiento de insulina continuado mediante bombas de infusión permite un gran control de la glucemia y disminuir el número de inyecciones al día. Además, se están poniendo en marcha nuevas técnicas que permiten una conexión directa entre los niveles de glucemia y la liberación de insulina simulando un páncreas artificial (Renard ER, 2007). Así mismo, se han diseñado nuevas formas de administración de la insulina como es la vía inhalada o la vía oral.

Para evitar o al menos mitigar las complicaciones de esta enfermedad se ha propuesto el uso de antioxidantes vía oral (Ceriello A, 2003).

Finalmente, con el fin de erradicar o al menos evitar la aparición de esta enfermedad, actualmente se está invirtiendo mucho esfuerzo en el trasplante de islotes y la terapia génica.

El trasplante de islotes reemplaza las células productoras de insulina del páncreas, que están destruidas en pacientes con diabetes tipo 1. Este trasplante puede permitir a los pacientes llevar una vida libre de las inyecciones de insulina con niveles glucémicos plasmáticos normales y reducir, de este modo, el riesgo de complicaciones, como el fallo renal o la ceguera (Shapiro AM et al, 2000). Evitaríamos así los problemas del trasplante de páncreas (dificultad de encontrar órganos adecuados y el riesgo de los tratamientos inmunosupresores a largo plazo). La posibilidad de realizar este trasplante hace que surja la necesidad de investigar las maneras de cultivar células β . La reciente tecnología de las células madre ha reavivado el interés sobre este tema.

En cuanto a la terapia génica, ésta consiste en sustituir los genes defectuosos que causan la diabetes por copias sanas. La DM tipo 1 representa una de las enfermedades diana con mayor posibilidades de éxito de tratamiento con la terapia génica. La patogenia de la enfermedad es bien conocida y las secuencias génicas afectas también, lo que favorece el estudio y desarrollo de tratamientos basados en la genética. Sin embargo, la limitación más importante actualmente es la disponibilidad de un método eficaz para la liberación y expresión del DNA transferido, ya que la mayoría de vectores genéticos provienen de virus. Recientes mejorías en los vectores genéticos de

los virus hacen suponer que esta será una terapia eficaz en un futuro no muy lejano para la DM (Zaia JA, 2007).

2. RETINOPATÍA DIABÉTICA

2.1. DEFINICIÓN Y EPIDEMIOLOGÍA

La Retinopatía Diabética (RD) es una complicación microvascular crónica de la DM, y por lo tanto necesita entre 5 y 10 años de hiperglucemia mantenida para desarrollarse. En los países industrializados se ha convertido en la principal causa de deficiencia visual y ceguera en adultos entre los 25 y 74 años de edad (Alfaro V et al, 2006).

Aproximadamente el 98% de las personas con diabetes tipo 1, el 80% de los diabéticos tipo 2 insulín-dependientes y el 50% de los no insulín-dependientes desarrollarán RD en los primeros 20 años después del diagnóstico de la diabetes. Tras 20 años de enfermedad, el 50% de los diabéticos tipo 1 presentarán una RD frente al 10% de los diabéticos tipo 2 (Lafuente López-Herrera, 2005). Pero no todos los pacientes con RD van a desarrollar una pérdida visual severa, si no que depende principalmente de dos entidades clínicas: la RD proliferante y el edema macular.

2.2. FACTORES DE RIESGO

Los factores que más inciden en la prevalencia de la RD son dos: 1) el tiempo de evolución de la diabetes, y 2) la edad en el momento del diagnóstico de la DM. La retinopatía diabética proliferante (RDP) es más frecuente y precoz

su desarrollo en los diabéticos de inicio juvenil. Sin embargo, en global hay más RDP en pacientes diabéticos tipo 2, al ser este grupo mayor significativamente.

Otros factores de riesgo que también inciden en el desarrollo y progresión de la RD son:

- mal control de la glucemia: las complicaciones de la diabetes son consecuencia directa de la hiperglucemia crónica, siendo la RD una de ellas. En el Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), se llega a la conclusión que todas las complicaciones microvasculares pueden disminuir significativamente y la progresión de las mismas puede retrasarse en los pacientes que llevan un control glucémico optimizado (DCCT, 1993).

- DM insulino dependiente; en diferentes estudios se ha demostrado que los pacientes con DM tratados con insulina necesitan más tiempo para desarrollar la RD, pero la desarrollan más frecuentemente. Los pacientes que no precisan insulina, la desarrollan antes pero con menor frecuencia.

- microalbuminuria

- niveles elevados de hemoglobina glicosilada

- hipertensión arterial diastólica; el estudio The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) mostró que el control intensivo de la hipertensión arterial en pacientes DM tipo 2 retrasa la progresión de la RD

(UKPDS,1998) y el estudio The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy (WESDR) (WESDR, 1993) demostró que la HTA diastólica está relacionada con la progresión a la RDP y a la mayor incidencia de edema macular.

- embarazo

- factores oculares

2.3. LA RETINA NORMAL

La retina es una membrana fina y transparente que tapiza la pared interna del globo ocular. Se encuentra en contacto en su cara externa con la coroides y en su cara interna con el vítreo. Está firmemente unida en la ora serrata y en la papila.

En la parte más posterior de la retina se encuentra una depresión llamada fovea central donde sólo hay conos. Es la zona de máxima visión. Está rodeada de una zona de color amarillo llamada mácula lútea, que también goza de una alta sensibilidad. A medida que nos alejamos de la fovea la sensibilidad de la retina decae a ritmo geométrico.

Próxima a la región macular y nasal a ella, se encuentra la papila óptica correspondiente a la zona de salida de las fibras del nervio óptico. Es una zona carente de retina y, por tanto, se corresponde con la mancha ciega del campo

visual. En el centro de la papila se encuentra la entrada de la arteria y la salida de la vena central de la retina.

2.3.1. Las capas de la retina.

En la retina los fotorreceptores detectan la luz y las células del epitelio pigmentario de la retina proporcionan su aporte metabólico. La estructura retiniana interna está sostenida por las células de Müller; el tejido neurorretiniano restante integra y procesa la información visual, de forma que en el momento en que la señal visual alcanza los axones del nervio óptico ya existe una codificación considerable de la visión.

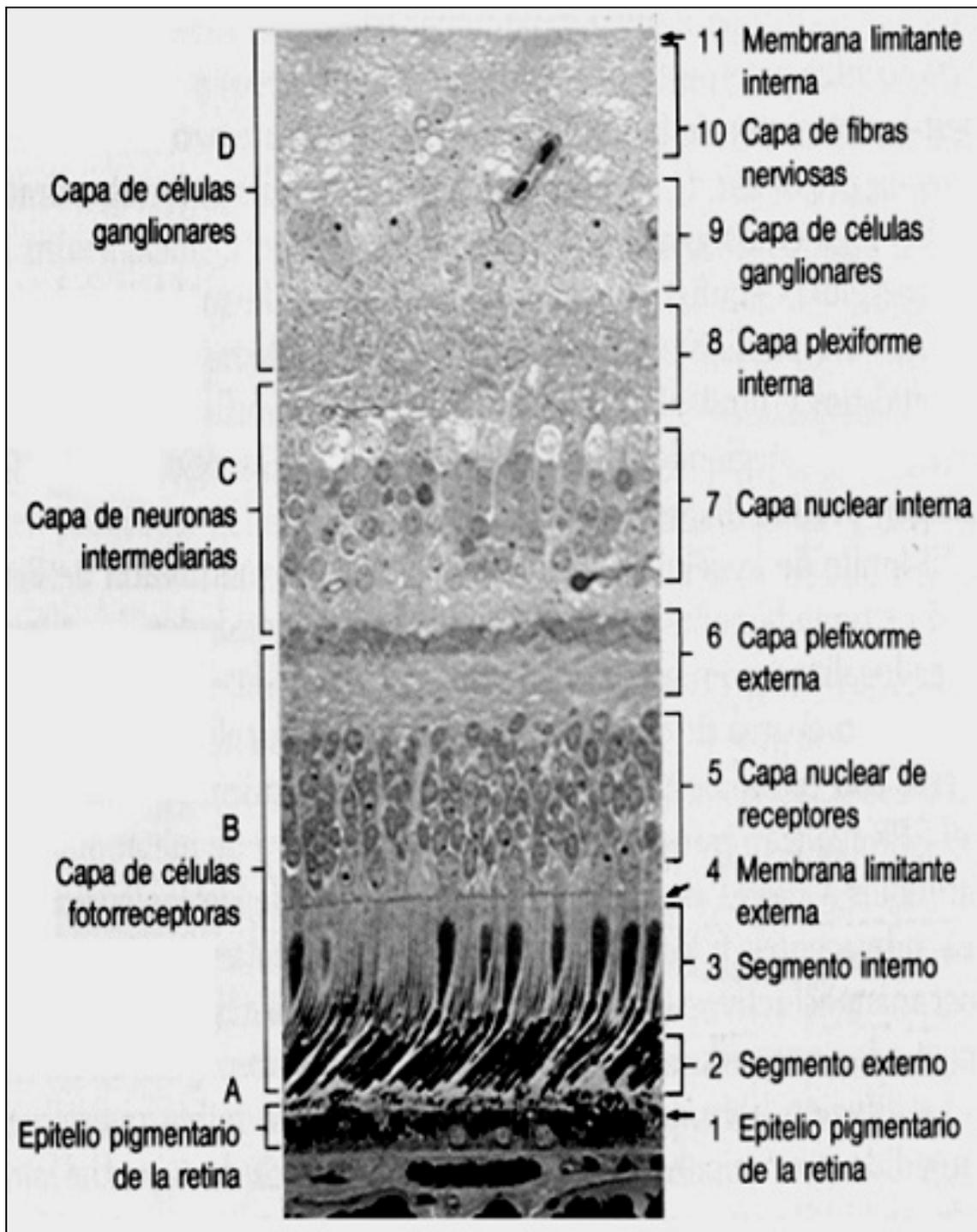


Figura 1. Las capas de la retina (En: La retina normal, Spalton, DJ.; Marshall, J. Atlas de oftalmología clínica, pag.13.3)

- Membrana de Bruch: Es una compleja membrana basal que se dispone entre el epitelio pigmentario de la retina y la coroides.

- El epitelio pigmentario (EPR): Es una única capa de células hexanocuboideas dispuesta sobre la membrana de Bruch. La función del EPR es apoyar y mantener las células fotorreceptoras suprayacentes, y con este fin sustenta cinco procesos fundamentales:

- 1.- La absorción de la luz dispersa.
- 2.- El transporte activo de metabolitos.
- 3.- La provisión de una barrera hematorretiniana.
- 4.- La regeneración de los pigmentos visuales.
- 5.- La fagocitosis.

- Las células fotorreceptoras: Son de dos tipos (conos y bastones), pero ambas muestran la misma organización estructural. Los conos son los encargados de la visión en condiciones de luminosidad alta y nos permiten percibir el color. Los bastones están especializados en responder en condiciones de baja luminosidad y no son sensibles al color.

- La retina interna: Formada por diferentes tipos de células, como las células bipolares, amacrinas y células de Müller. Transforman las señales recibidas por los fotorreceptores en estímulos nerviosos para que puedan ser conducidos hasta la corteza occipital. La capa de células ganglionares, junto con su capa de fibras nerviosas, es la más interna de la retina.

2.4. FISIOPATOLOGÍA DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.

Las lesiones que se observan en los pacientes diabéticos y que constituyen la retinopatía diabética en sus diferentes estadios son consecuencia directa de la microangiopatía diabética que sufren los capilares retinianos. Es la hiperglucemia mantenida el factor fundamental para el daño de los pequeños vasos retinianos (Fong DS et al, 2004) y el desarrollo de la enfermedad microvascular.

Existen dos peculiaridades en la retina que son importantes para explicar el desarrollo exclusivo de algunas lesiones diabéticas a nivel ocular: su gran capacidad metabólica y la gran cobertura por pericitos de los capilares retinianos.

La diabetes afecta a la circulación microvascular de la retina. Los primeros cambios estructurales se producen en los capilares retinianos con pérdida de pericitos murales, engrosamiento de la membrana basal, pérdida de células endoteliales y falta de perfusión capilar, siendo la secuencia y la interrelación de estos cambios muy compleja.

Los capilares retinianos están soportados por una abundante población de pericitos, y se propone en algunas hipótesis que la lesión de estas células juega un papel fundamental en la génesis de la retinopatía diabética. Se ha demostrado que los pericitos contienen aldosa reductasa y que pueden resultar dañados por la vía del sorbitol (Akagi Y et al, 1983). Además, Mizutani et al.

propusieron que existe una pérdida de pericitos y células endoteliales por apoptosis que precede a la evidencia biológica de la retinopatía (Mizutani et al, 1996).

A la pérdida del endotelio capilar le sigue una falta de perfusión de los capilares y de pérdida de lecho capilar retiniano. La presencia de microaneurismas es la característica fundamental de la retinopatía diabética. Al desarrollarse las anomalías microvasculares aparece extravasación de plasma, hemorragia y derivación vascular. Parece que la neovascularización está controlada por factores estimuladores e inhibidores, siendo los factores de crecimiento, como los factores de crecimiento fibroblásticos A y B y los factores de crecimiento insulínicos, moléculas estimuladoras.

Aunque se conocen bien los cambios vasculares que ocurren en la retinopatía diabética, se sabe mucho menos sobre los cambios neurológicos que ocurren en la retina. Sin embargo, cada día adquiere más fuerza la hipótesis de que la retinopatía diabética debe ser tratada como una enfermedad en la que hay afectación neuroretinal además de los cambios vasculares contribuyendo ambos a los mecanismos patogénicos de esta enfermedad (Lieth et al, 2000). Está descrita la presencia de atrofia de células ganglionares y degeneración de la capa nuclear interna de las retinas de pacientes diabéticos. La pérdida de neuronas comienza pronto en la diabetes y esta degeneración es la que da lugar a los cambios vasculares.

En animales de experimentación se ha demostrado que se produce la apoptosis de células nerviosas en la retina después de un mes del establecimiento de la diabetes (Barber AJ et al, 1998) y que su tasa disminuye con la administración de insulina. Estudios más recientes han demostrado que concentraciones altas de glucosa inducen apoptosis de las células de Müller en cultivo (Kusner LL et al, 2004) y que las células nerviosas de retinas de pacientes diabéticos expresan marcadores de apoptosis (Abu-el-Asrar AM et al, 2004). Así mismo, se han observado cambios en el electroretinograma de los pacientes diabéticos que preceden a los cambios vasculares (DiLeo et al, 1994). Todo esto, nos confirma la importancia de los cambios nerviosos precoces en el desarrollo de la retinopatía diabética.

Los procesos bioquímicos que dan lugar al desarrollo de la retinopatía diabética no son bien conocidos, aunque se cree que la hiperglucemia crónica es el defecto subyacente, puesto que hay una relación entre el control de la glucemia a largo plazo y el desarrollo de la retinopatía diabética (Silever RD, 1998). Sin embargo, existen muchas otras anomalías metabólicas presentes en los diabéticos que podrían influir en el desarrollo de la retinopatía diabética, como:

- la glicosilación no enzimática de proteínas, que lleva la formación de los AGEs (Advanced Glycation End Products). La formación de AGEs extracelulares puede contribuir al engrosamiento de las membranas y a la oclusión de los vasos en la retinopatía diabética. También puede alterar la función de las proteínas de la matriz celular e inducir la apoptosis de pericitos y

células endoteliales retinianas (Kowluru RA, 2005). El uso de inhibidores de la formación de los AGEs, ha demostrado ser eficaz en la prevención de la retinopatía diabética y en su tratamiento (Giardino I et al, 1998; Stitt AW et al, 2004).

- Es posible que también tengan importancia los niveles aumentados de factores de crecimiento circulantes (Grant M et al, 2004), que a su vez pueden provocar una compleja disfunción hormonal (Chantelau E et al, 2004).

- Existe aldosa reductasa en la retina y los inhibidores de esta enzima (como el sorbinil) impiden el desarrollo de la retinopatía diabética en animales de experimentación (Asnaghi V et al, 2003), pero hasta el momento no se ha demostrado su eficacia en la enfermedad humana.

- La diabetes aumenta el estrés oxidativo y este aumento probablemente está implicado en el desarrollo de sus complicaciones (Baynes JW y Torpe SR, 1996). Aunque la retina dispone de diversos mecanismos de protección frente al estrés oxidativo, ha sido demostrada su existencia en la diabetes experimental (Kowluru RA et al, 1997).

2.5. CLASIFICACIÓN DE LA RETINOPATÍA DIABÉTICA

Es esencial tener una clasificación de la RD que describa su severidad y del edema macular para su correcto manejo clínico.

La clasificación clínica universalmente aceptada es la llamada EDTRS, formulada por el Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group, en la que se incluyen las diferentes lesiones oftalmoscópicas y el riesgo de progresión de las mismas (EDTRS, 1991). Esta clasificación se considera el “gold Standard” en los ensayos clínicos ya que es reproducible y ampliamente validada. Sin embargo, es demasiado compleja para su uso diario en la práctica clínica.

Para la práctica diaria se utiliza la clasificación propuesta por el Global Diabetic Retinopathy Project Group (Wilkinson CP et al, 2003). Esta clasificación se basa en la evidencia científica proveniente de estudios previos, sobretodo el EDTRS y WESDR.

Tabla 2. Clasificación Internacional de la RD. (Wilkinson CP et al, 2003)

Nivel de severidad	Hallazgos en fondo de ojo
No RD aparente	No anomalías en el fondo de ojo
RDNP leve	Sólo microaneurismas (Ma)
RDNP moderada	Más que Ma, pero menos que la RDNP severa
RDNP severa	Alguno de los siguientes (regla 4:2:1) <ul style="list-style-type: none"> • > 20 Hg intrarretinianas en 4 cuadrantes • Arrosamiento venoso en 2 cuadrantes • AMIR en 1 cuadrante sin signos de RDP
RDP	Uno o más de los siguientes : <ul style="list-style-type: none"> • Neovascularización • Hg vítrea o prerretiniana

RDNP: retinopatía diabética no proliferante. RDP: retinopatía diabética proliferante. Ma: microaneurismas. Hg: hemorragia. AMIR: anomalías microvasculares intrarretinianas.

Tabla 3. Clasificación Internacional del Edema Macular (Wilkinson CP et al, 2003).

Nivel de severidad	Hallazgos en fondo de ojo
EMD ausente	No existe aparentemente engrosamiento de la retina o exudados duros en polo posterior
EMD presente	<p>Existe engrosamiento de la retina o exudados duros en polo posterior.</p> <ul style="list-style-type: none"> • Leve : lejos de la mácula • Moderado : cerca de la mácula sin afectación central • Severo : afectación del centro de la mácula

EMD: edema macular diabético.

Actualmente para el diagnóstico del edema macular utilizamos además de la fundoscopia y angiografía, la tomografía de coherencia óptica (OCT). Esta técnica permite la detección temprana de las alteraciones en la mácula y cuantificar su respuesta tras el tratamiento (Lattanzio R et al, 2002).

La OCT permite cuantificar de forma objetiva el espesor retiniano y en base a esta técnica se han descrito tres patrones diferentes de edema macular.

Tabla 4. Clasificación del EMD en base a los patrones de OCT.

EM esponjiforme	Engrosamiento difuso y generalizado de la mácula
EM quístico	Aparición de espacios quísticos en la capa plexiforme interna
Desprendimiento seroso de la retina	Separación de la retina neurosensorial del EPR

2.6. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.

Para realizar un diagnóstico correcto del grado de RD es necesario conocer la historia clínica del paciente, el tipo y duración de su diabetes, y sobre todo conocer su control metabólico de la glucemia y de los factores de riesgo asociados.

El diagnóstico de la RD se realiza mediante un estudio de fondo de ojo, que debe ser anual a partir de los 5 años de diagnóstico de la diabetes tipo 1 y desde el momento del diagnóstico en los pacientes diabéticos tipo 2.

En el diagnóstico y seguimiento de la RD se utilizan varias pruebas complementarias destacando principalmente la angiografía fluoresceínica (AFG) y la tomografía de coherencia óptica (OCT). La AFG es una prueba de contraste en la que se inyecta fluoresceína sódica intravenosa y se realizan fotografías del fondo de ojo. Nos permite identificar múltiples lesiones que

pueden pasar desapercibidas en la fundoscopia, valorar las zonas de neovascularización e isquemia, y controlar los efectos del tratamiento aplicado. La OCT es una prueba de diagnóstico por la imagen y realiza unos cortes de la retina de 10 μ de grosor que nos permiten ver una imagen casi histológica de las capas de la retina y las alteraciones que en ellas aparecen. En la RD es muy útil para el diagnóstico del EMD, su clasificación y su evolución tras el tratamiento.

Tanto el tratamiento médico como el tratamiento oftalmológico mediante diferentes técnicas son imprescindibles para el control de la RD.

No existe ningún tratamiento médico con efectividad probada para tratar directa o localmente la RD. La única actuación médica con capacidad demostrada para prevenir la incidencia y el desarrollo de la RD es mantener un buen control glucémico. La hiperglucemia mantenida en el tiempo es la causante del desarrollo de las alteraciones microvasculares de esta enfermedad y éstas aparecen tras 5-10 años de hiperglucemia crónica (Lafuente López-Herrera, 2005). La aparición y progresión de la RD va ligado por lo tanto a la hiperglucemia mantenida, pero también va ligado a otros factores sistémicos como son la tensión arterial o la hiperlipidemia.

Diferentes estudios multicéntricos, Diabetes Control and Complications Trial (DCCT), The United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS), y The Wisconsin Epidemiology Study of Diabetic Retinopathy (WESDR), dejan claro que la aparición de la RD y su desarrollo, va a ser dependiente de una serie de

factores de riesgo. Sobre algunos de ellos no podremos influir, como es el caso de la edad, la duración o tipo de la DM, o los factores genéticos, pero otros factores sí son modificables y sobre ellos debemos actuar para prevenir el desarrollo y progresión de la enfermedad ocular en los pacientes diabéticos. El European Diabetes Policy Group propone una serie de recomendaciones a seguir como que el paciente diabético debe mantener unas cifras adecuadas de hemoglobina glicosilada y de presión arterial, que reciba un tratamiento adecuado en caso de anemia o nefropatía o que mantenga unos niveles de lípidos adecuados en sangre (European Diabetes Policy Group, 1999).

Una vez instaurada la RD, aquellos casos que precisan tratamiento consiste principalmente en la fotocoagulación retiniana mediante láser argón. El objetivo de la fotocoagulación no es mejorar la visión sino estabilizar la progresión de la RD y prevenir la pérdida visual severa. Se ha demostrado que la fotocoagulación mejora el pronóstico visual de la RD y evita el deterioro visual en la maculopatía diabética exudativa y edematosa, pero no en las formas isquémicas (EDTRS, 1991). La eficacia de la fotocoagulación se basa principalmente en que disminuye el consumo de oxígeno por la retina al destruir las células fotorreceptoras (con elevado consumo de oxígeno) y sustituirlas por cicatrices gliales (con bajo consumo de oxígeno). En los pacientes con hemorragias vítreas, fibrosis prerretinianas, edemas maculares crónicos, etc, estaría indicado el tratamiento quirúrgico mediante vitrectomía.

Otros tratamientos utilizados actualmente son las inyecciones intravítreas de triamcinolona (Gilles MC et al, 2006), sobretudo en casos de

edema macular difuso, y de antiangiogénicos como el bevacizumab (antiVEGF) (Haritoglou C et al, 2006), tanto para el edema macular como para la neovascularización secundarias a la diabetes. En estudio están los dispositivos intravítreos de corticoesteroides como el acetónido de fluocinolona, inhibidores de la proteinquinasa C como la ruboxistaurina (Schwartz SJ y Flyn HW, 2007) o el PKC412, capaces de inhibir la PKC y al VEGF con la consiguiente disminución de la permeabilidad vascular y mejorando el edema macular.

También han demostrado ser eficaces otros fármacos como la acetazolamida vía oral como coadyuvante en el tratamiento del edema macular y la atorvastatina, estatina que reduce la severidad de los exudados duros en pacientes diabéticos tipo 2 y en algunos hasta el edema macular (Gupta A et al, 2004).

2.7. UTILIDAD DEL ELECTORRETINOGRAMA.

La electrorretinografía es la inscripción o registro gráfico de la corriente eléctrica o potencial de acción desencadenado en la retina en respuesta a un estímulo luminoso. La respuesta eléctrica generada por el ojo a la luz como un potencial de masa (es decir, una respuesta ocular completa) puede utilizarse para valorar la función retiniana, ya sea desde un punto de vista clínico o experimental.

Las pruebas de la práctica clínica habitual son el electrooculograma (EOG), el electrorretinograma (ERG), el electrorretinograma multifocal (mERG),

el electroretinograma patrón (ERGP) y el potencial visual evocado (PVE), también se utiliza la adaptación a la oscuridad.

Las técnicas para las pruebas electrodiagnósticas se han estandarizado recientemente, y las respuestas y los valores normales aún difieren entre los distintos laboratorios, debido a la variedad existente en cuanto a equipos y técnicas.

El ERG es un potencial complejo, que refleja cambios en la capa de células bipolares y las células de Müller tras un estímulo luminoso, y depende de impulsos de los fotorreceptores. Realmente estamos valorando la respuesta tardía del potencial de acción de los segmentos externos de los fotorreceptores retinianos. Para ello se utilizan unos electrodos que suelen ser:

- a.- Un *electrodo activo*, generalmente representado por una lente de contacto corneal.
- b.- El *electrodo de referencia* (inactivo), que se coloca en la piel.
- c.- Un *electrodo de tierra* colocado en el centro de la cabeza.

Tras el estímulo luminoso obtenemos una onda bifásica con una depresión negativa al inicio (onda a), que se corresponde con la hiperpolarización de los fotorreceptores, seguida de un pico positivo mayor (onda b) correspondiente a la despolarización de las células de Müller.

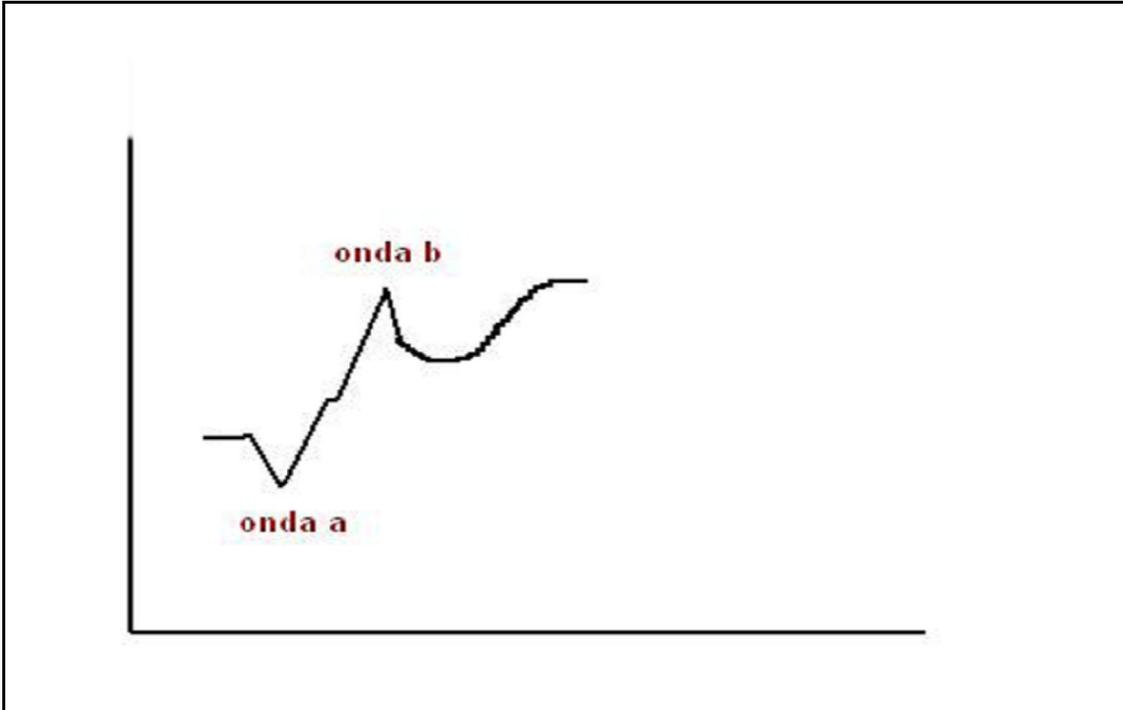


Figura 2. Representación gráfica de la onda bifásica del ERG.

2.7.1. El electroretinograma en la diabetes

Un tratamiento precoz es importante en la retinopatía diabética ya que cuando ocurren las lesiones vasculares generalmente se ha llegado a un “punto de no retorno” en la retinopatía diabética (Palmowski et al, 1997). Esta es la razón por la que el ERG puede ser de utilidad. Se han demostrado cambios significativos en el ERG incluso antes de aparecer los primeros síntomas oftalmoscópicos de retinopatía diabética así como a la aparición de alteraciones vasculares (DiLeo M et al, 1994; Li Q et al, 2002), confirmándose así la importancia de los cambios nerviosos precoces en el desarrollo de la retinopatía diabética.

El electroretinograma también puede ser medido en animales, siendo probablemente los roedores los animales utilizados más frecuentemente para este estudio, debido a que su respuesta escotópica es similar a la de los humanos (Racine et al, 2005), existiendo en la literatura una amplia descripción de la utilidad de este registro como parámetro evaluador en la retinopatía diabética (Lli Q et al, 2002; Lowitt S et al, 1993).

Los cambios electrofisiológicos en la retinopatía diabética comienzan en la conducción nerviosa de las vías visuales, continúan en las capas retinianas más internas y en la mácula y terminan en las capas más externas (Parisi V et al, 1997). Una de las alteraciones más frecuentes en el ERG son las alteraciones en la onda b (Holopiagian K et al, 1992), que refleja los cambios de potencial generados por las células de Müller dependiendo de impulsos de los fotorreceptores. Estas alteraciones se corresponden además, con las alteraciones precoces presentes en las células de Müller durante la retinopatía diabética (Lli Q et al, 2002; Mizutani M et al, 1998; Guidry C, 2005).

3. FISIOPATOLOGÍA DEL ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES

3.1. ESTRÉS OXIDATIVO Y RADICALES LIBRES.

Las reacciones donde intervienen oxidantes y radicales han jugado un papel esencial en el origen de las formas de vida aerobia y son una parte integral de la homeostasis celular. La aparición del oxígeno en la atmósfera constituyó un prerequisite para el desarrollo de las especies animales del mundo incluido el hombre.

Se define el estrés oxidativo como una situación de desequilibrio entre agentes oxidantes y antioxidantes en favor de los primeros (Sies H, 1991). La vida aerobia se caracteriza por una formación constante de prooxidantes balanceada por la desaparición de los mismos debida a los antioxidantes.

Se conoce como daño oxidativo el daño biomolecular producido por las especies reactivas durante el estrés oxidativo y que conduce a varias consecuencias:

- adaptación de las células del organismo mediante la regulación de los sistemas de defensa
- daño celular
- muerte celular (apoptosis y necrosis)

Se denominan radicales libres a todas aquellas moléculas que contienen en su orbital más externo un electrón desapareado, es decir, el electrón de dicho orbital necesita de otro para poseer una configuración bioquímica y electromagnéticamente estable. Los radicales libres tienden a reaccionar ávidamente con otras moléculas cercanas para eliminar este orbital incompleto, pero desestabilizan la configuración electrónica de las moléculas con las que reaccionan, convirtiéndolas a su vez en especies reactivas y pudiendo desencadenar reacciones en cadena (Whitten KW y Galley KD, 1985).

La terminología empleada para designar estas especies químicas presenta cierta confusión. En el organismo y en condiciones normales, la mayoría de los radicales libres (RL) proceden de la respiración aerobia y contienen oxígeno (como el anión superóxido y el radical hidroxilo), por este motivo muchos autores los llaman “especies reactivas de oxígeno” (ROS). Estas dos denominaciones (RL y ROS) no son exactamente sinónimos, puesto que algunas ROS no son radicales (como el peróxido de hidrógeno o el ácido hipocloroso). Otros autores hablan de oxidantes. Por todas estas razones lo habitual es referirse indistintamente a los radicales libres, las ROS o los oxidantes (Halliwell B et al, 2004).

Existe además, las especies reactivas de nitrógeno (RNS) que derivan del denominado estrés nitrosativo, que se produce cuando existe una producción excesiva o desregulada de óxido nítrico y las especies reactivas

que de él derivan, como el peroxinitrito (ONOO⁻), trióxido dinitrógeno (N₂O₃), dióxido de nitrógeno (.NO₂), o nitratos (NO₃⁻) y nitritos (NO₂⁻). Esta situación puede ocurrir in vivo en distintas patologías, entre ellas las asociadas a procesos inflamatorios, neurotoxicidad o isquemia.

Los radicales libres intervienen tanto en situaciones fisiológicas como patológicas en el organismo vivo.

3.1.1. Papel fisiológico.

Se ha demostrado la función de los radicales libres en la defensa antimicrobiana y antitumoral, también como mensajeros e inductores genéticos (Hardy K et al, 2004; Zimmerman C et al, 2002). Pueden intervenir en la inactivación o activación de ciertas enzimas (Filleeben C y Pantopoulos K, 2002), o contribuir a la regulación de la extensión del proceso inflamatorio (Bourbon A et al, 2004). Además, se ha postulado que el balance oxidante-antioxidante puede intervenir en el proceso de la apoptosis (Svensk AM et al, 2004; Buttke TM, Sandstrom PA, 1994). El óxido nítrico interviene en la regulación de funciones en los sistemas inmunológico, cardiovascular y nervioso (Mayer B y Hemmens B, 1997).

3.1.2. Papel patogénico.

Los radicales libres pueden relacionarse, entre otros, con la hipertensión (Touyz RM, 2004), la disfunción cardiovascular, la inflamación (Telfer JF y Brock JH, 2004 y enfermedades como la diabetes (Miranda M et al, 2004; Hermenegildo C et al, 1993), el SIDA (Jareño EJ et al, 2002), la epilepsia (Patel M, 2004) etc. Estos radicales libres actúan alterando varios mecanismos celulares y fisiológicos, e incluso alterando macromoléculas vitales para los seres vivos, como el DNA (provocando mutaciones), los lípidos de membrana a través de su peroxidación o las proteínas, alterando sus actividades enzimáticas.

3.1.3. Generación de radicales libres.

Los radicales libres y otras especies oxigenadas reactivas proceden de fuentes metabólicas endógenas o de agresiones oxidativas externas.

Dentro de las fuentes endógenas de producción de radicales libres podemos incluir las siguientes:

1. La cadena electrónica mitocondrial (Kas J y Blattna J, 1986).
2. Una excesiva actividad de la NADPH fagocitaria (Gabig TJ y Babior MB, 1979).
3. La activación del metabolismo del ácido araquidónico en procesos inflamatorios (Winyard PG et al, 1994).

4. La deslocalización de metales de transición (Fe^{2+} y Cu^+) de sus sitios de depósito (Halliwell B y Gutteridge JM, 1986)

5. La hiperactividad de la xantina oxidasa (Chambers DE et al, 1985).

6. La activación de la enzima óxido nítrico sintetasa (Beckman JS et al, 1990).

7. Menor capacidad de los mecanismos protectores antioxidantes (Giugliano D et al, 1996).

Algunas de las fuentes exógenas de daño oxidativo son:

1. Radiaciones ionizantes (Fridovich I, 1983).

2. Aumento en la disponibilidad de metales de transición en algunas enfermedades metabólicas y en procesos inflamatorias (Halliwell B y Gutteridge JM, 1986).

3. Acción de xenobióticos y fármacos (Trush MA et al 1982).

4. El exceso en la concentración de oxígeno o los procesos en los que hay fenómenos de isquemia-reperfusión (Roy RS y McCord JM, 1983).

3.2. PEROXIDACIÓN LIPÍDICA.

3.2.1. Concepto.

La peroxidación lipídica consiste en el deterioro oxidativo de grasas, oxígeno dependiente, y sobre todo de los ácidos grasos poliinsaturados. Generalmente ocurre cuando el $\bullet\text{OH}$ es generado en la proximidad de las

membranas y ataca a los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos, como el ácido araquidónico o el docohexanoico. La reacción extrae el átomo de hidrógeno del carbono del doble enlace, y a la vez que se destruye el $\bullet\text{OH}$ se genera un carbono de tipo radical en el seno de la membrana. Un $\bullet\text{OH}$ puede convertir cientos de ácidos grasos de la membrana en lípidos hidroperoxidados. Estos compuestos son muy inestables y rápidamente se descomponen en otros productos, pudiéndose producir nuevos radicales libres que pueden a su vez iniciar nuevas cadenas de peroxidación.

La peroxidación de lípidos produce alteraciones a nivel celular básicamente por tres mecanismos:

1. La alteración en la función de la membrana celular y las enzimas de la misma.

2. La inactivación y alteración de enzimas y constituyentes celulares por los radicales libres formados.

3. Por la generación de aldehídos reactivos y otros compuestos tóxicos. Estos aldehídos tienen una vida media relativamente larga en comparación con los radicales libres reactivos, y pueden ser responsables de algunos efectos a larga distancia promovidos por la peroxidación de lípidos.

La peroxidación de lípidos es un fenómeno que puede conducir a la muerte celular, pero también puede inducir la formación de intermediarios derivados de los lípidos.

3.2.2. Productos de la peroxidación de lípidos.

Existen múltiples aldehídos derivados de la peroxidación de lípidos, pero los mayormente estudiados son el malondialdehído (MDA) y los 4-hidrosialquenales, sobretodo el 4-hidroxinonenal (HNE) y el 4-hidroxihexenal (Esterbauer H et al, 1991).

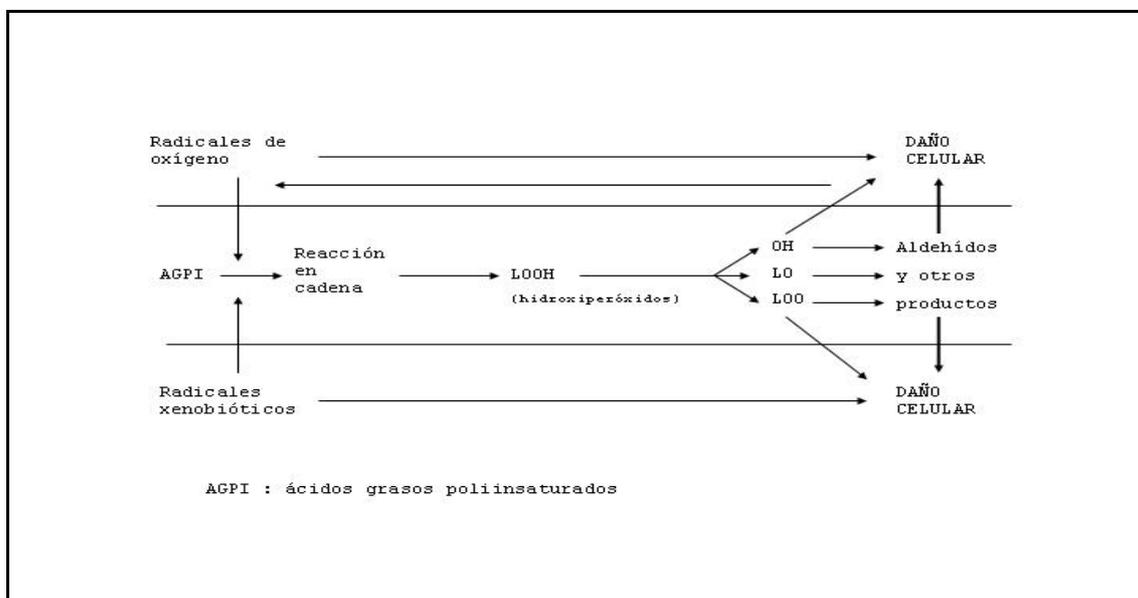


Figura 3: Esquema de los mecanismos implicados en la lipoperoxidación (Janero DR, 1990).

3.2.3. Malondialdehído (MDA).

El MDA es una molécula volátil, de bajo peso molecular (PM = 72,07), con un grupo 1,3- dicarbonilo siendo moderadamente ácido (Figura 4). En solución y en fase gaseosa, el MDA está enteramente enolizado manteniéndose a través de un enlace de hidrógeno intramolecular un equilibrio entre dos formas asimétricas.

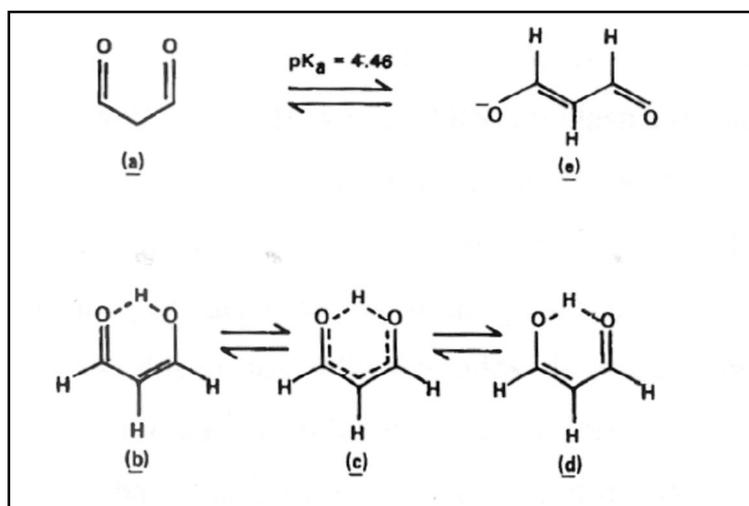


Figura 4: estructura química del MDA (Janero DR, 1990)

Resulta de la degradación oxidativa de los ácidos grasos poliinsaturados, especialmente del ácido araquidónico y el ácido docosahexanoico. Han sido varias las rutas hipotetizadas para esta formación (Pryor A y Stanley P, 1975; Wilson RL, 1979), pero todas implican una primera ciclación del ácido graso poliinsaturado originario, que tras sucesivos

intermediarios, se rompe para formar, entre otros productos de degradación, el MDA. Dado que este compuesto es un producto final común de la peroxidación lipídica independientemente del ácido graso poliinsaturado oxidado, su determinación ha sido aceptada ampliamente como marcador de este proceso (Halliwell B, 2000).

Desde que el estrés oxidativo y la peroxidación de lípidos han sido implicadas causalmente en la patogénesis de algunas enfermedades humanas, la determinación de remanentes de la peroxidación de lípidos, como el MDA, en tejidos o fluidos humanos, ha recibido considerable atención. Hasta ahora se han utilizado diferentes técnicas que se basan en la reacción del MDA con el ácido tiobarbitúrico. Sin embargo, en la determinación de este producto hay que tener en cuenta la técnica empleada. En un estudio de Esterbauer se puede observar como el nivel de remanentes de la peroxidación de lípidos en plasma de sujetos sanos puede variar según la técnica empleada desde 0 (indetectable) a 47,2 nmol/ml (Esterbauer H et al, 1991). El problema estriba en que el nivel de MDA detectado por algunas técnicas proviene, además de la degradación de ácidos grasos poliinsaturados, de la degradación de otros productos (como azúcares, aminoácidos, aldehídos, ácidos orgánicos...) (Janero DR, 1990). La literatura señala a la determinación de MDA por HPLC como una de las más adecuadas para reflejar el índice de peroxidación lipídica de una muestra biológica.

3.3. DEFENSA ANTIOXIDANTE.

3.3.1. Sistemas antioxidantes de importancia biológica.

Un antioxidante se define como cualquier sustancia que, cuando está presente a concentraciones bajas en comparación con las del sustrato oxidable, retrasa o previene significativamente la oxidación de dicho sustrato (Halliwell B y Gutteridge JM, 1986). El término “sustrato oxidable” incluye casi todo lo que se encuentra en las células vivas, como proteínas, lípidos, carbohidratos y DNA.

La desintoxicación de las especies reactivas del oxígeno es uno de los requisitos para la vida aerobia, por lo que se ha desarrollado un importante sistema defensivo antioxidante formado por recolectores y neutralizadores no enzimáticos que se llaman antioxidantes, proporcionados o no por la dieta (vitaminas C y E, glutathione, etc.), por las enzimas con actividad antioxidante directa o primaria, llamadas así por inactivar directamente especies activadas de oxígeno (catalasa, superóxido dismutasa, glutathione peroxidasa, etc.), y por las enzimas con actividad antioxidante secundaria, que contribuyen al mantenimiento de otros sistemas antioxidantes o bien conjugan sustancias derivadas de la acción tóxica de los radicales (glutathione S-transferasa, glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, etc.) (Sies H, 1991).

3.3.2 El sistema glutathion

Se denomina sistema glutathion, al conjunto formado por el glutathion y los enzimas relacionados con su metabolismo, que son además responsables del mantenimiento de su estado redox en condiciones fisiológicas (Meister A, Anderson ME, 1983) (Figura 5).

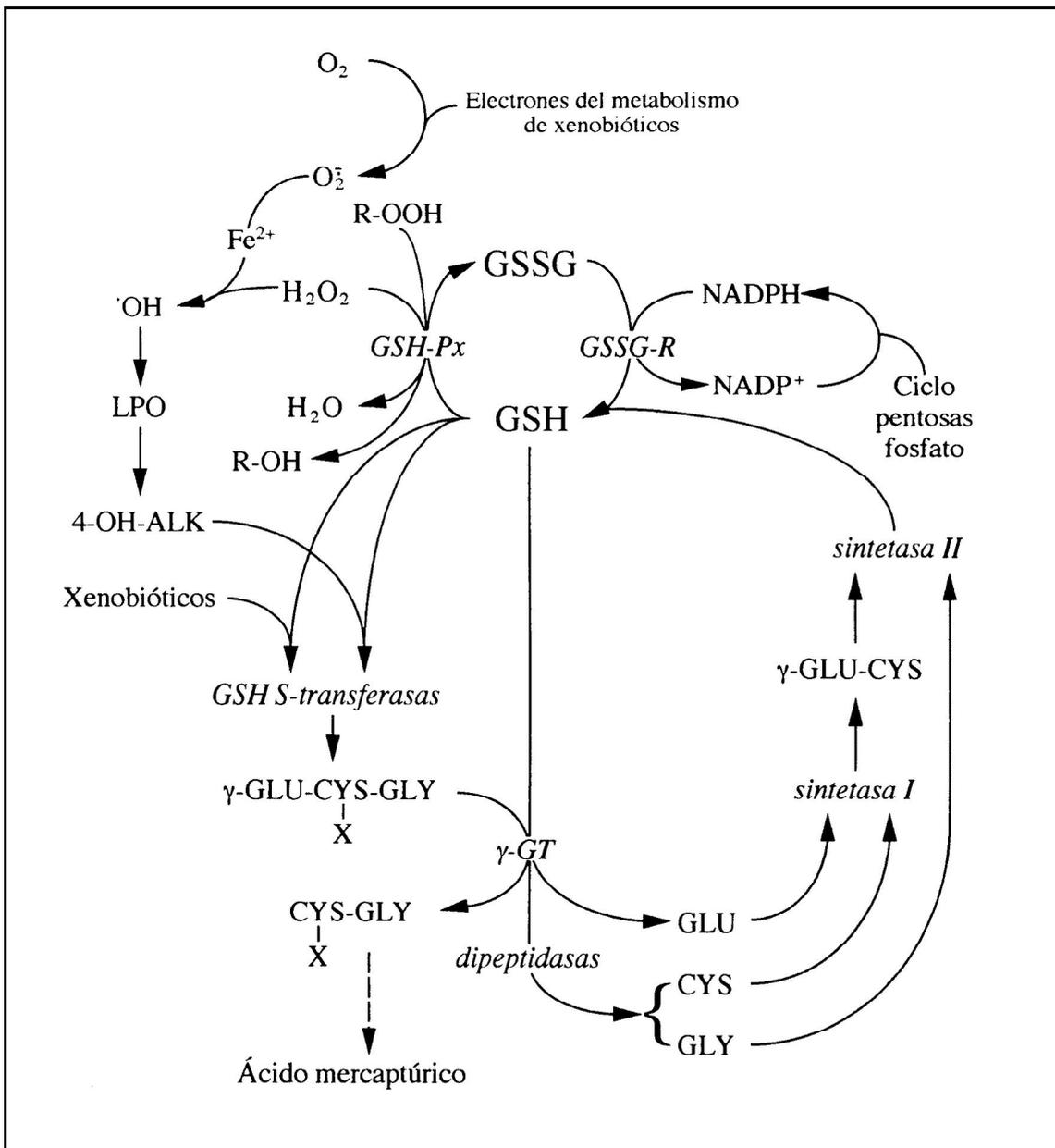


Figura 5: Representación del sistema del glutathion.

El glutathion es un tripéptido (constituido por ácido glutámico, cisteína y glicina) de interesantes propiedades biológicas debido a dos de sus características estructurales: el enlace γ -glutamilo que lo protege de las peptidasas, y la presencia de un grupo tiol libre (-SH) perteneciente a la cisteína. Gracias a éste, el glutathion es extraordinariamente reactivo para con las sustancias tóxicas o no, naturales o exógenas a la célula e incluso para consigo mismo. Aunque es un antioxidante muy extendido, la mayor parte del GSH es sintetizado en el hígado.

Es el tiol no proteico más abundante de prácticamente todas las células animales (Dringen R, 2000) y su presencia se puede explicar en función de su protección frente a la toxicidad del oxígeno (Fahey R et al, 1987)

Se considera estado del glutathion al equilibrio entre las distintas formas en las que este tripéptido se puede presentar (Kosower NS y Kosower E, 1978) . Podemos encontrarlo en forma de tiol reducido (GSH), en forma oxidada (GSSG) y en forma de disulfuros mixtos en su mayoría GS-S-proteína. El término estado no implica unos valores constantes para el glutathion, sino que estos quedan supeditados a las alteraciones del sistema.

El papel protector del glutathion se realiza a muchos niveles, entre los cuales nos interesa en especial la inactivación de radicales libres, el mantenimiento de la integridad celular y la protección frente a la peroxidación de lípidos.

En el mantenimiento de la integridad celular, el glutathion actuaría interceptando radicales libres e impidiendo entre otras la peroxidación de los lípidos de la membrana celular. Un ejemplo, lo podemos encontrar en la formación de la catarata. En la mayoría de casos, los factores cataratógenos acaban produciendo una disminución del glutathion y de los enzimas antioxidantes con él relacionados, en algunos casos de hasta el 70% de sus niveles. Esta disminución permitiría que los radicales libres provocaran modificaciones oxidativas en las proteínas o lípidos del cristalino, con pérdida de la transparencia del mismo. Se han encontrado en cristalinos cataratosos actividades enzimáticas relacionadas con el glutathion menores que las descritas en cristalinos sanos (Romero FJ y Roma J, 1989).

El glutathion está relacionado con la actividad de algunas enzimas como:

❑ **Actividad peroxidasa**, que está representada por tres enzimas :

1. Glutathion peroxidasa (GSH-Px): es una enzima que contiene selenio, capaz de reducir el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) a agua. Es la forma más común de actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos. La función de este enzima es proteger a las membranas celulares del daño oxidativo. El hígado por ejemplo, que es uno de los principales lugares para la detoxificación y está expuesto a altos niveles de oxidantes, posee una actividad elevada de glutathion peroxidasa. Los animales con deficiencias en selenio, presentan un descenso de la actividad de esta enzima (Van Vleet JF et al, 1981).

2. Glutation transferasa con acción peroxidasa: algunos isoenzimas de la glutatión S-transferasa también tienen actividad frente a hidroperóxidos orgánicos, mientras que no la tienen frente al peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Bajo condiciones de deficiencia de selenio en la rata, la glutatión peroxidasa está disminuida mientras que la actividad glutatión transferasa está aumentada (Schramm H et al, 1985).

3. Glutation peroxidasa frente a fosfolípidos peroxidados: actúa sobre fosfolípidos peroxidados de membranas biológicas. Este enzima es una GSH-Px de fosfolípidos hidroperóxidos, llamada PHGPx. Es un monómero y ha sido descubierta como una selenoenzima distinta de la clásica GSH-Px basándose en su cDNA y secuencia aminoácido (Ursini F et al, 1982).

Actividad glutatión disulfuro reductasa

El glutatión disulfuro (GSSG) formado en las reacciones de peroxidación se reduce por acción del NADPH mediante una reacción catalizada por la glutatión reductasa. Por tanto esta enzima mantiene el estado reducido del glutatión, necesario a su vez para muchos procesos de detoxificación celular.

Actividad gamma glutamil transpeptidasa

Es una enzima del catabolismo del glutatión que cataliza la transferencia del grupo gamma glutamilo. Normalmente está asociada a la membrana celular

y orientada con su sitio activo hacia el exterior. Constituye el paso extracelular del ciclo del gamma-glutamilo (Meister A y Anderson ME, 1983).

3.3.3 Otros antioxidantes naturales.

Además del glutatión existen otros compuestos biológicos encargados del mantenimiento del equilibrio redox en el organismo. Entre ellos destacan la vitamina E (tocoferol), vitamina C (ácido ascórbico), los carotenoides, como la luteína, dependiendo del medio, y el ácido lipoico.

La **vitamina E** es una vitamina liposoluble esencial que incluye ocho esteroisómeros de los cuales el más conocido es el α -tocoferol. Se localiza preferentemente en las membranas celulares. La vitamina E es el único antioxidante natural liposoluble que puede inhibir la peroxidación lipídica en las membranas celulares (Burton GW et al, 1983). El déficit severo de α -tocoferol es raro, pudiendo ocurrir en recién nacidos prematuros, pacientes con colestasis crónica, en la abetalipoproteinemia y en los síndromes de malabsorción de grasas (Diplock AT, 1983). Este déficit puede provocar esterilidad, hemólisis y anemia, degeneración neurológica y muscular y necrosis hepática.

La vitamina E desempeña un papel protector en el daño por radicales libres asociado a cáncer, enfermedad cardiovascular y en el envejecimiento prematuro. En otras enfermedades como el asma y los trastornos inflamatorios

de vías aéreas se aprecia un incremento en la oxidación lipídica sobre la que podría actuar esta vitamina (Sies H y Murphy ME, 1991).

En el caso de la diabetes, la vitamina E es capaz de inhibir la peroxidación lipídica y reducir la glicosilación proteica en pacientes diabéticos (Ceriello A et al, 1991), y se ha sugerido que el tratamiento con vitamina E podría prevenir la disfunción glomerular en ratas diabéticas (Koya D et al, 1997). Además, la vitamina E posee propiedades protectoras cardiovasculares en la diabetes (Gazis A et al, 1997). Otros estudios demuestran que el tratamiento con vitamina E normaliza los valores del flujo sanguíneo retiniano y de la hiperfiltración renal en pacientes diabéticos tipo 1 (Bursell SE et al, 1999).

A pesar de estos antecedentes, nuevos estudios han mostrado resultados contradictorios sobre los efectos beneficiosos de la vitamina E (Marchioli R et al, 2001), y se recomienda ser cautos a la hora de recomendar suplementos, puesto que un exceso de vitaminas puede tener efectos adversos (Chartow B, 2004).

La habilidad de sintetizar **vitamina C** (ácido ascórbico) a partir de la glucosa está ausente en un pequeño grupo de especies animales incluida el hombre, los primates, el cerdo, el murciélago, etc... Estas especies dependen de la fuente externa de la vitamina C en su dieta. El ácido ascórbico o vitamina C (C₆H₈O₈) es una querolactona, estructuralmente similar a la glucosa. La vitamina C actúa como cofactor de múltiples enzimas, posee acción antihistamínica y estimula la síntesis de colágeno, proteoglicanos y otros

constituyentes orgánicos de la matriz intercelular (Levine M, 1986). Es el antioxidante hidrofílico más potente del organismo. Actúa como un potente donador de electrones y es entonces reducido a ácido ascórbico por el glutatión. Se ha visto que la suplementación con vitamina C es capaz de regenerar la vitamina E y aumentar los niveles de glutatión (Stall W y Sies H, 1997).

La posible acción antitumoral de la vitamina C es controvertida. Estudios in vitro demuestran que el ácido ascórbico previene la opacidad del cristalino y que existe una relación inversa entre los niveles séricos de vitamina C y la aparición de cataratas (Robertson JM et al, 1989).

En pacientes con DM insulín dependiente el tratamiento con vitamina C mejoró la vasodilatación del endotelio y en ratas disminuyó la albuminuria, la transformación glomerular del factor de crecimiento β y el tamaño glomerular (Craven PA et al, 1997). Al igual que la vitamina E, se ha demostrado que el ácido ascórbico es capaz de revertir la activación aberrante de la PKC que tiene lugar en la diabetes (Carter CA y Kane CJ, 2004).

La **luteína** es un compuesto carotenoide que pertenece a la clase de las xantófilas, así como también la zeaxantina. Son compuestos un poco más polares que el resto de carotenoides, por su estructura ciclada con un grupo hidroxilo, y los tejidos animales no son capaces de sintetizarlos, por lo que su presencia se debe únicamente a la ingesta de alimentos. Son liposolubles, por lo que se almacenan en la grasa, y su concentración está influida por una dieta

rica en alimentos que los contengan (Johnson EJ et al, 2000). Se encuentran en diversos tejidos como el tejido adiposo, adrenal, hígado, páncreas o riñón, pero su mayor concentración es nivel ocular, alcanzando siendo su máximo a nivel de la mácula lútea (Snodderly DM, 1995).

La zeaxantina es el pigmento macular más abundante a nivel de la mácula, con mayor densidad de conos, mientras que la luteína es el pigmento mayoritario en el resto de la retina, formada sobretodo por bastones (Handelman GJ et al, 1998). Ambos pigmentos tienen la capacidad de filtrar la luz azul en todo el tejido retiniano, disminuyendo así la aberración cromática asociada a bajas longitudes de onda de la luz visible. Esto se debe a su especial disposición en las membranas biológicas fortaleciendo su estructura (Sujak A et al, 1999). Se ha demostrado que ambos pigmentos poseen propiedades antioxidantes (Young AJ y Lowe GM, 2001), y por lo tanto pueden reducir el daño oxidativo producido por la constante exposición a la luz.

Actualmente, existen diversos estudios clínicos, experimentales y de cultivos celulares que demuestran el papel de la luteína en la protección de enfermedades oculares, como la DMAE (Richer S et al, 2002), las cataratas (Olmedilla B et al, 2003), o la retinosis pigmentaria (Dagnelie G et al, 2000). En relación a la diabetes, se ha demostrado que en pacientes con diabetes tipo II, la concentración plasmática de luteína está disminuida (Polidori M et al, 2000). Sin embargo, en otros estudios con pacientes con diabetes tipo I no se han encontrado diferencias significativas en las concentraciones en suero (Olmedilla B et al, 1997).

En un estudio recientemente publicado, se ha demostrado que los suplementos de luteína en ratones diabéticos tienen efectos beneficiosos tanto a nivel retiniano como a nivel del hipocampo (Muriach M et al, 2006), ya que disminuye los efectos nocivos derivados del estrés oxidativo a estos niveles y mejora el electroretinograma en los ratones diabéticos.

3.3.4 El ácido lipoico como antioxidante natural.

El ácido lipoico (AL) fue descubierto por Reed et al y se describió como un factor de recambio de acetato (Reed LJ et al, 1951; Reed L.J, 1957) Se trata de una molécula insoluble en agua pero soluble en disolventes orgánicos. En cuanto a su nomenclatura, existen diferentes nombres con el que se le conoce: ácido tiótico; ácido 1,2- ditiolano-3 pentanoico; ácido 1,2-ditiolano-3 valerico y ácido 6,8-tiótico. El AL en su forma nativa contiene una unión disulfido, la reducción de la cual lo convierte en su forma activa: el ácido dihidrolipoico (DHHLA) (Figura 6).

□ Características bioquímicas :

En principio se clasificó como una vitamina, pero posteriormente se descubrió que el ser humano y los animales son capaces de sintetizarlo (Carreau JP, 1979).

- Presenta un átomo de carbono asimétrico causante de su actividad (Bilska A y Wtodek L, 2005).
- En la naturaleza, su configuración es en R y es dextro-rotatorio.

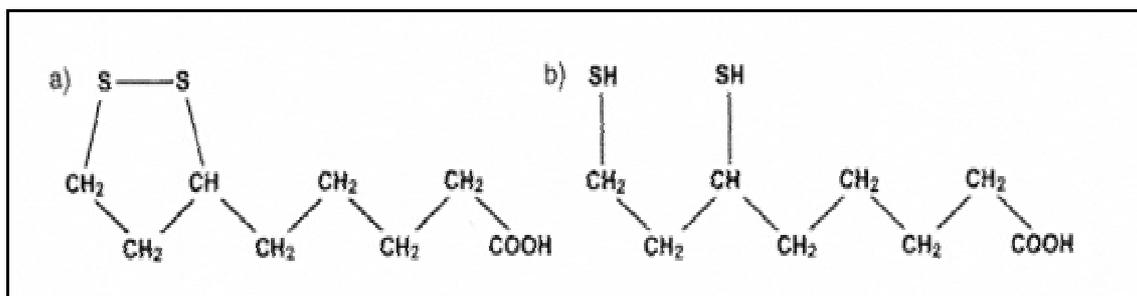


Figura 6: ácido lipoico (a) y su forma reducida ácido dihidrolipoico (b).
(Bilska A y Wtodek L, 2005)

En el ser humano, el AL existe como una lipoamida en al menos cinco proteínas donde se encuentra ligado covalentemente a los residuos de lisina (Roy S y Packer L, 1998). Esta lipoamida es una coenzima E2 (dihidrolipoato acetiltransferasa), subunidad de los complejos multienzimáticos mitocondriales que catalizan la decarboxilación oxidativa del piruvato, α -quetoglutarato y α -quetoácidos, formados por la transaminación de la leucina, isoleucina y valina (Bilska A y Wtodek L, 2005)

- Forma parte del complejo mitocondrial de 4 proteínas que participan en la síntesis y degradación de la glicina.

Se forma en las mitocondrias a partir del ácido octanoico y cisteína (Bilska A y Wtodek L, 2005)

- En animales y plantas el AL se ha detectado en su forma de lipolisina en grandes concentraciones en las espinacas (3,5mg/g peso seco) y en el hígado y corazón bovino (Roy S y Packer L, 1998).

□ **Funciones del AL en el ser humano :**

1. Coenzima en las reacciones mitocondriales mediadas por las enzimas piruvato y α -quetoglutarato-deshidrogenasa para la producción de energía celular (ATP).

2. El α -AL y su forma reducida, ácido dihidrolipoico, se consideran el “antioxidante universal”(Packer L et al, 1995) ya que:

- el AL se absorbe de la dieta y rápidamente se metaboliza en DHLA en múltiples tejidos

- ambos actúan en la captura de numerosos radicales libres tanto en la membrana celular como en las zonas acuosas

- ambos actúan como quelantes de metales de transición en sistemas biológicos

o el DHLA actúa de forma sinérgica con otros antioxidantes y por lo tanto, es capaz de regenerarlos desde su forma inactiva, como son las vitaminas C y E. Además, es capaz de incrementar el glutatión intracelular (Maritim AC et al, 2003), ya que el DHLA mejora la disponibilidad intracelular de la cisteína y por lo tanto, acelera la síntesis de GSH (Packer L et al,1995). De esta forma es capaz de prevenir la peroxidación de lípidos de membrana y el daño de proteínas (Figura 7).

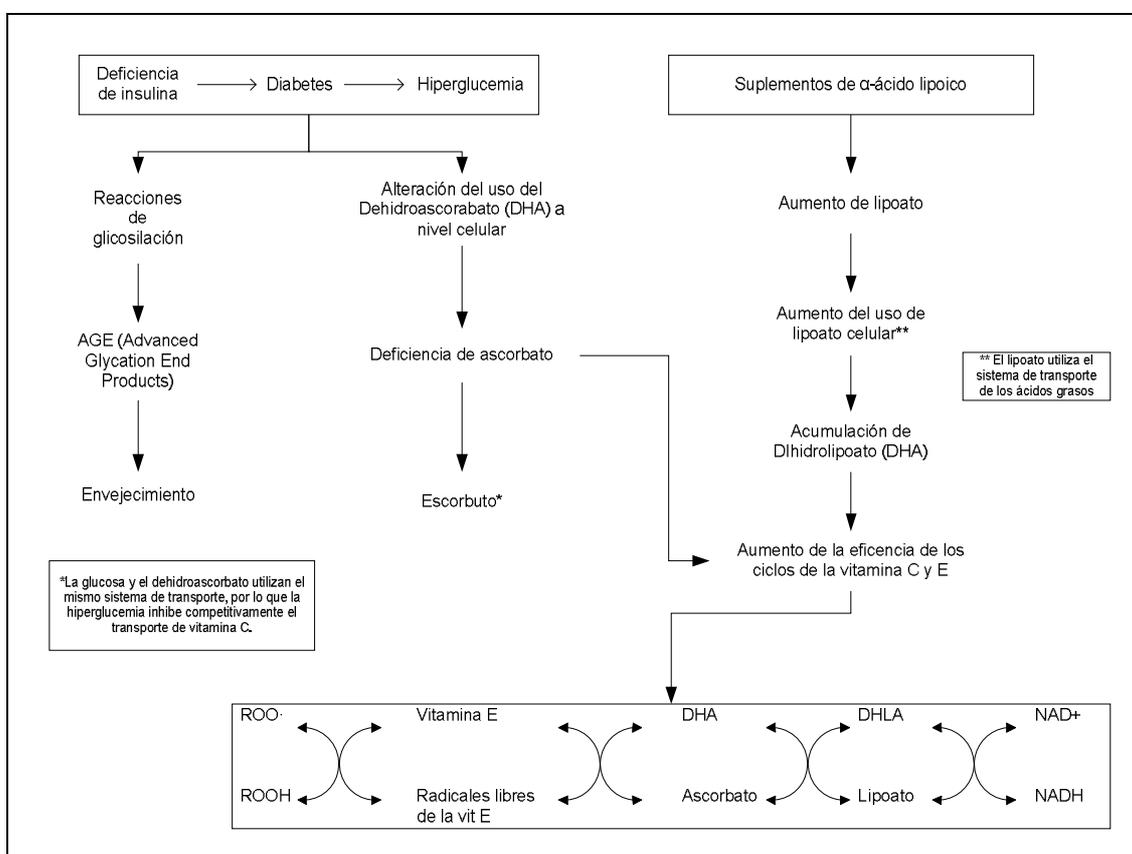


Figura 7: Esquema de las alteraciones bioquímicas en la diabetes mellitus y su posible corrección mediante la administración oral de ácido lipoico (Packer L et al,1995)

3. Regulador en la transcripción/expresión de genes apoptóticos. NF- κ B (factor nuclear kappa B) es un factor de transcripción sensible al estrés oxidativo y relacionado con múltiples patologías inflamatorias, infecciosas (HIV), etc. El AL, tanto en su forma R como S, y el DHLA son capaces de inhibir la acción del NF- κ B de manera dosis dependiente actuando específicamente sobre el loci que regula los efectos de dicha proteína (Sen CK y Packer L, 1996). El lipoato inhibe la acción del NF- κ B a nivel citosólico mediante la regulación del calcio intracelular, y a nivel de los sitios de unión κ B de la forma activa de la proteína NF- κ B (Sen CK et al, 1996). Además, el AL a dosis relevantes es capaz de regular la expresión de moléculas de adhesión celular ICAM-1 y VCAM-1, las cuales están así mismo reguladas por varios factores activadores de la transcripción, entre ellos NF- κ B (Roy S et al, 1997).

□ Aplicaciones del AL en diferentes patologías.

1. DIABETES MELLITUS

○ Efecto en modelos experimentales de diabetes tipo I: la diabetes tipo I se produce por la destrucción de las células β del páncreas por mecanismos inmunológicos e inflamatorios (Robertson RP, 2004). El DHLA reduce la aparición de la diabetes ya que inhibe los efectos del ácido nítrico y otras especies reactivas que actúan sobre las células β del páncreas destruyéndolas (Burkart V et al, 1993).

○ Efecto en el metabolismo de la glucosa en la diabetes tipo II: en la patogenia de la DM tipo II se produce una resistencia a la insulina, por lo tanto se crea un estado de hiperinsulinemia y no respuesta al tratamiento con insulina. En el tratamiento de estos pacientes es fundamental aumentar la utilización de glucosa en el músculo esquelético, ya que éste es la diana de la glucosa ingerida tras una comida. El AL, principalmente su isoforma R, aumenta la utilización de la glucosa en el músculo esquelético a través de dos mecanismos: estimulando la translocación de proteínas transportadoras de glucosa (GLUT-1 y GLUT-4) hacia la membrana plasmática, y favoreciendo el transporte de glucosa mediado por la insulina (Packer L et al, 1995)._Henriksen and cols demostraron que el tratamiento con AL aumentaba el uso de la glucosa independientemente de la presencia o no de insulina (Henriksen EJ et al, 1994). Jacob and cols demostraron en humanos con DM tipo II que la administración de AL aumentaba el uso de la glucosa mediada por insulina en un 50% (Jacob S et al, 1996). Todos estos efectos se pueden explicar porque:

- Los suplementos de AL normalizan los niveles de AL endógeno disminuidos en animales diabéticos
- El AL interactúa con diferentes grupos sulfhidrilo de la célula implicados en la regulación del transporte insulin-dependiente de la glucosa
- La acción antioxidante del AL

○ En las complicaciones crónicas de la DM hay múltiples mecanismos implicados entre ellos la glicación de proteínas y la glicoxidación. Se ha demostrado que el AL es capaz de inhibir la glicación de ciertas proteínas entre

ellas la albúmina y la LDL, protegiendo así de la aterosclerosis en pacientes diabéticos (Packer L et al, 1995).

○ Polineuropatía diabética: la hipoxia que se produce en las células nerviosas favorece el estrés oxidativo y como resultado final, una alteración de la conducción nerviosa. Múltiples antioxidantes, entre ellos el AL han demostrado una mejoría en la conducción nerviosa y una mejoría clínica de los síntomas en pacientes con polineuropatía (Kishi Y et al, 1999). En Alemania está aprobado el uso de suplementos de AL en pacientes diabéticos afectados de polineuropatía.

○ Cataratas : Existen 3 mecanismos por los que se forman las cataratas en pacientes DM :

- Aumento de la vía del poliol
- Glicación de las proteínas del cristalino
- Estrés oxidativo

El AL previene la formación de cataratas en ratones diabéticos. El acumulo de polioles intracelulares produce una alteración en la permeabilidad celular, disminución del glutatión reducido (GSH), disminución en la síntesis de aminoácidos y proteínas, y finalmente la formación de cataratas. El AL es capaz de disminuir en un 40% el grado de aparición de cataratas en modelos experimentales de DM aguda. Se ha comprobado que disminuye la actividad de la aldolasa reductasa intralenticular, enzima clave en el desarrollo de las cataratas. Como el acceso de la glucosa al cristalino es insulín-independiente,

el efecto del AL sobre la actividad específica de la aldolasa reductasa y la aparición de cataratas es más indirecto que directo, al disminuir los niveles de glucosa en sangre. También se ha demostrado que el tratamiento con AL aumenta los niveles de GSH y previene de la depleción de proteínas del cristalino (Borenshtein D et al, 2001). Además, el AL es capaz de prevenir el estrés oxidativo en el cristalino diabético ya que el DHLA es capaz regenerar la vitamina C intracelular a este nivel (Packer L et al, 1995).

- Retinopatía diabética: Kowluru y Odenbach han demostrado a nivel anatomopatológico que el tratamiento con suplementos de AL, en ratones diabéticos a una dosis de 400mg/Kg durante 11 meses, produce un descenso significativo de las células TUNEL positivas, es decir, disminuye el número de células en apoptosis y el número de capilares acelulares y por lo tanto disminuye las lesiones en la microvascularización retiniana (Kowluru RA y Odenbach S, 2004). Así mismo, se ha observado una normalización de los parámetros de estrés oxidativo, como son los niveles de DNA modificado (aumentados en la retinopatía diabética) y de glutatión (disminuidos en la retinopatía diabética). Finalmente, en sus estudios demuestran que el AL es capaz de inhibir al factor de transcripción NF-kB en la retina de pacientes diabéticos. NF-kB, factor de transcripción nuclear redox-sensible, es un regulador importante de las enzimas antioxidantes. La activación de este factor es la señal por la cual la glucosa es capaz de inducir la apoptosis en las células endoteliales retinianas (Kowluru RA et al, 2003).

En otro estudio experimental, Lin et al demuestran que el AL es capaz de disminuir la modificación de proteínas en la retina por la hiperglucemia crónica (Lin J et al, 2006). Para ello utiliza la nitrotirosina como marcador de modificación de proteínas vía N-carboximetil-lisina, la cual interacciona con el receptor RAGE favoreciendo la oxidación de las mismas vía NF-kB. La angiopoyetina-2 (ang-2) modula el reclutamiento de pericitos. En la RD se observan niveles detectables de ang-2 que el AL es capaz de normalizar. Así mismo, el VEGF (vascular endothelial growth factor) es un importante factor de supervivencia de las células endoteliales que está aumentado en los capilares retinianos en la diabetes y que el tratamiento con AL es capaz de disminuir en un 43%. Finalmente, al igual que el grupo de Kowluru et al., el AL es capaz de disminuir el número de capilares acelulares en las ratas diabéticas hasta en un 93%.

2. MODELOS DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

El daño tras un proceso de isquemia se produce por una explosión de radicales libres durante la reoxigenación del tejido dañado. Este daño es significativo en el tejido cardiaco y cerebral. El DHLA previene del daño tisular tras isquemia principalmente a través de la regeneración de la vitamina E en el tejido cardiaco (Serbinova E et al, 1999; Haramaki N et al, 1993). A nivel cerebral, el DHLA actúa mejorando los niveles de glutatión y disminuyendo los niveles de productos de la peroxidación lipídica tras un proceso de isquemia (Prehn JH et al, 1992).

3. PROCESOS INFECCIOSOS: HIV

El estrés oxidativo juega un papel importante en diferentes aspectos de la infección por HIV, como la activación de la replicación, inmunosupresión, iniciación y promoción tumoral, etc. Los pacientes infectados por el HIV se ha demostrado que son deficientes en varios antioxidantes (Packer L et al,1995). Tras tratamiento con suplementos de AL a un grupo de pacientes HIV se observó un aumento de los niveles de antioxidantes en sangre, de linfocitos T helper, y se evitó la replicación del virus y la activación del factor de transcripción NF-kB, ambos regulados por el estrés oxidativo.

4. ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS

El principal responsable de las enfermedades neurodegenerativas es la producción de radicales libres mitocondriales que dañan el DNA mitocondrial, produciendo así proteínas defectuosas. Las propiedades antioxidantes del AL, principalmente su capacidad como quelante de metales y como reductor de radicales hidroxil y superóxido, se han estudiado en múltiples patologías neurodegenerativas con buenos resultados (Packer L et al,1995).

5. EFECTOS SECUNDARIOS DE LA RADIACIÓN

La irradiación produce una cascada de radicales libres causantes de sus efectos secundarios. El AL junto con la vitamina E, son capaces de disminuir

los efectos secundarios derivados de la exposición a la radiación (Packer L et al, 1995).

3.3.5 Antioxidantes sintéticos.

Dada la importancia de los antioxidantes en la fisiología y fisiopatología de diferentes tejidos, se ha desarrollado la idea de que estas sustancias puedan tener una acción terapéutica e incluso profiláctica importante en el desarrollo de determinadas enfermedades. Ante esta opción se plantea inicialmente el uso de antioxidantes naturales, los cuales presentan la enorme ventaja de ser, en la mayoría de los casos, inocuos (a dosis razonablemente pequeñas). Una segunda alternativa es el empleo de sustancias sintéticas con potencia antioxidante diseñadas para anclarse en los diferentes tejidos u organelas diana de la acción de los radicales libres. Existe una amplia gama de estos compuestos, como son: el Trolox (derivado hidrosoluble de la vitamina E), el probucol, el butilhidroxitolueno (BHT), muchos quelantes de hierro y otros metales, los compuestos encuadrados en el grupo de los 21-aminoesteroides, o el ebselen, del que se ha demostrado su efecto beneficioso en el alcoholismo (Herrera DG et al, 2003), la uveítis (Bosch-Morell et al, 2002) o la retinopatía diabética (Miranda M et al, 2004).

4. DIABETES Y ESTRÉS OXIDATIVO

Aunque el Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) ha identificado la hiperglucemia como la causa principal de las complicaciones de la diabetes y que un estricto control de la glucemia está relacionado con la prevención de las mismas, se desconoce cuál es el mecanismo por el que este exceso de glucosa produce daño en los tejidos.

El tratamiento actual de la diabetes, con la insulina entre otros, permite un buen control de la glucemia, por lo que todos los esfuerzos van encaminados a evitar y tratar las complicaciones de la diabetes ya que el impacto médico y socioeconómico de las mismas es enorme.

Aunque existen numerosos trabajos que implican al estrés oxidativo en las complicaciones de la diabetes, se plantea la duda si la presencia de éste es consecuencia de las complicaciones de la DM o, por el contrario, es la causa de las mismas. En varios estudios, por ejemplo, se implica al estrés oxidativo en la regulación de la glucemia y por lo tanto, con las complicaciones de la DM. Se sabe que un aumento en las concentraciones plasmáticas de radicales libres puede alterar la acción de la insulina y producir hiperglucemia, mientras que ésta y la resistencia a la insulina, pueden por sí mismas producir estrés oxidativo (Ceriello A, 2000). Para dilucidar esta cuestión son necesarios estudios que revelen que el estrés oxidativo ocurre antes de la aparición de las complicaciones de la diabetes y que la terapia antioxidante no sólo disminuye

los indicadores de estrés oxidativo, sino que también disminuye las complicaciones de la DM.

Existen distintos mecanismos y vías que conducen al estrés oxidativo como consecuencia de la hiperglucemia como son la disminución de los niveles de antioxidantes, la síntesis de prostanoides, la vía del poliol, la autooxidación de la glucosa, la glicosilación de proteínas, las interacciones AGE-RAGE y la producción de radicales libres, como el anión superóxido. La producción aumentada de anión superóxido acompañada de una concentración elevada de óxido nítrico favorece la formación de peroxinitrito, un fuerte oxidante citotóxico, capaz de iniciar la peroxidación lipídica y afectar a diferentes vías de señalización (Ceriello A y Motz E, 2004).

En la figura 8 se presenta la posible relación entre el estrés oxidativo inducido por la hiperglucemia, la consecuente activación del factor NF- κ B y el desarrollo de complicaciones en los pacientes con diabetes mellitas (Nawroth PP et al, 2000).

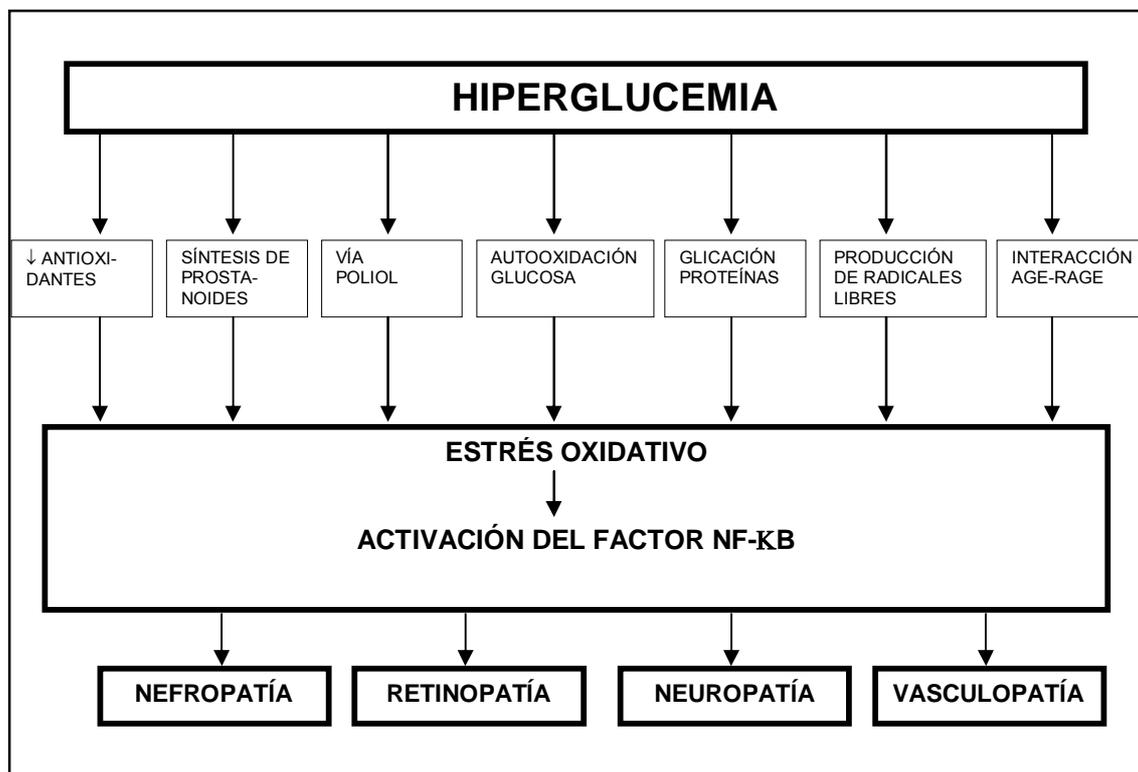


Figura 8. Posibles mecanismos que conducen al estrés oxidativo.
(Nawroth PP et al, 2000)

Además, todos estos posibles mecanismos están relacionados unos con otros, dando lugar a un “ciclo vicioso”. La autooxidación de la glucosa, catalizada por ciertos metales, como el hierro y el cobre, genera radicales libres (Wolf SP, 1993). La formación de radicales libres acelera la formación de los AGEs, que a su vez produce más radicales libres (Chappey O et al, 1997). La unión de los AGEs a sus receptores (RAGE) está asociada a la activación y traslocación nuclear del factor NF- κ B (Baynes JW y Thorpe SR, 1999). La reducción de la glucosa a sorbitol por la aldosa reductasa oxida NADPH, afectando directamente a la defensa antioxidante (Hohmann TC et al, 1997). La acumulación de sorbitol produce estrés osmótico que conduce al estrés

oxidativo a través de la disminución de glutatión y otros antioxidantes. El tratamiento con ARIs (inhibidores de la aldosa reductasa) corrige la disminución de glutatión (Baynes JW y Thorpe SR, 1999). En algunos tejidos diabéticos, pero no en todos, la activación de la vía de la aldosa reductasa conduce a la activación de la PKC (Kim J et al, 1991).

Todos estos datos nos hacen suponer que además de los niveles elevados de glucosa en los pacientes diabéticos, la producción aumentada de radicales libres es capaz de producir daño en diferentes tejidos y por lo tanto, contribuir al desarrollo de las complicaciones tardías e incluso al desarrollo de resistencia a la insulina. Por lo tanto, el tratamiento mediante antioxidantes puede prevenir el desarrollo de las complicaciones tardías de la diabetes.

En el nervio ciático se ha observado que las defensas frente al estrés oxidativo están disminuidas. Se ha visto que la GPx está disminuida en la neuropatía diabética experimental en ratones tratados con aloxana 7-21 días después de la inducción de la diabetes (Hermenegildo et al., 1993). El ácido lipoico se ha usado en el tratamiento de la neuropatía diabética tanto en modelos animales como en modelos humanos en ensayos clínicos (Packer L et al, 2001). Otros estudios han demostrado que el tratamiento con antioxidantes tiene efectos beneficiosos en la protección frente a las complicaciones vasculares de pacientes diabéticos (Mullan B et al, 2004; Okutan H et al, 2005). Haffner ha sugerido que uno de los factores de riesgo que pueden explicar la mayor tasa de enfermedad coronaria en pacientes diabéticos tipo 2 es el

aumento en el estrés oxidativo que presentan estos pacientes (Haffner S, 2000).

También en hígado de ratas diabéticas (duración de la diabetes 6 meses) se encontraron mayores concentraciones de distintos marcadores de la lipoperoxidación, como son el HNE y el MDA (Traverso M et al, 1999), así como un descenso en la defensa antioxidante que es posible revertir mediante la administración de vitamina E (Kaym A et al, 2004). El riñón es otro de los tejidos más afectados por la diabetes y, al igual que en el hígado, se ha descrito un aumento del estrés oxidativo tras el desarrollo de la diabetes que puede ser corregido administrando antioxidantes (Anwar M y Meki A, 2003).

4.1. EL ESTRÉS OXIDATIVO EN LA RETINOPATÍA DIABÉTICA.

La retina es el tejido neurosensorial del ojo y es extremadamente rica en membranas con lípidos poliinsaturados (Kagan VE et al, 1973). Esta característica la hace especialmente sensible a los radicales libres oxigenados y a la peroxidación lipídica. De hecho, hay distintas patologías retinianas que se han relacionado con la superproducción de radicales libres como la uveítis (Bosch-Morell F et al, 1999), la retinopatía del prematuro y la retinopatía diabética (Doly M y Droy-Lefaix M-T, 1992).

La retina posee distintos modos de defenderse de los radicales libres (Puertas FJ et al, 1993) :

- La SOD (superóxidodismutasa) es una metaloproteína que cataliza la transformación de $O_2^{\bullet-}$ en H_2O_2 y O_2 y está presente en los segmentos externos de los fotorreceptores y a nivel del epitelio pigmentario.

- La catalasa se puede encontrar en los segmentos externos de los bastones y en el epitelio pigmentario y cataliza la transformación de H_2O_2 en agua y O_2 .

- La glutatión peroxidasa está tanto en el citosol como en la mitocondria y previene la acumulación de H_2O_2 en el medio intracelular.

- Otra línea de defensa de la retina es la constituida por moléculas como la vitamina E o la vitamina C (Doly M et al, 1999).

Existen diversos estudios en la bibliografía que indican que el metabolismo retiniano está alterado en la diabetes. Kowluru et al demostraron que en retina había un aumento en la concentración de TBARS (productos de la peroxidación lipídica), un aumento en la actividad de la proteinkinasa C, y un aumento de óxido nítrico (NO) (Kowluru RA et al, 2001). También se ha demostrado un aumento en la vía del poliol, que conlleva a la conversión de la glucosa en sorbitol mediante la acción de la aldosa reductasa con la consiguiente disminución en las concentraciones de NADPH y finalmente de GSH (Asnaghi V et al, 2003). En otros estudios se ha demostrado además de la presencia de estrés oxidativo en la retinopatía diabética, la presencia de estrés nitrosativo ya que se ha observado la presencia de nitrotirosina en proteínas retinianas de animales diabéticos (Du Y et al, 2002).

5. APOPTOSIS.

La apoptosis es una forma de muerte celular morfológicamente distinta que juega un papel central en la embriogénesis y en la homeostasis de los tejidos. Los cambios ultraestructurales que caracterizan a la apoptosis fueron descritos por primera vez por Kerr et al (Kerr JF et al, 1972). Estos cambios son condensación de la cromatina del núcleo y segmentación del núcleo, formación de burbujas en la membrana que finalmente dará lugar a la desintegración celular y a la formación de los cuerpos apoptóticos los cuales a su vez serán fagocitados por los macrófagos, sin pérdida alguna del contenido celular al exterior. La apoptosis provee al organismo de un método seguro para mantener la integridad del organismo permitiéndole eliminar las células dañadas o no normales sin comprometer a las células vecinas.

La muerte por apoptosis puede ocurrir como consecuencia de exposición a agentes físicos (radiaciones ionizantes, hipertermia), a agentes tóxicos (peróxido de hidrógeno), por los efectos celulares de citoquinas, por infección viral y mecanismos inmunológicos (Hockenbery DM et al, 1993). Esta gran heterogeneidad de los promotores de la apoptosis sugiere que hay muchos mecanismos que conducen a unos mismos cambios morfológicos en las células que se mueren. La capacidad de genes como el Bcl-2 de proteger frente a la muerte por apoptosis sea cual sea el estímulo, sugiere que hay un mecanismo final común en la apoptosis (Reed JC, 1997).

Uno de los reguladores de la apoptosis más importante es la familia de genes Bcl-2, de los que se sabe que hay, por lo menos, 16 en humanos (Chao DT y Korsmeyer SJ, 1998). El gen supresor de la apoptosis se descubrió como un proto-oncogen que se encontraba en los linfomas de células B, y codifica una proteína de membrana integral, llamada Bcl-2, localizada en las membranas del retículo endoplásmico, envoltura nuclear y en las membranas externas de la mitocondria. Las proteínas de la familia Bcl-2 se han clasificado en tres subfamilias (Adams JM y Cory S, 1998):

- Subfamilia 1: sus miembros, como Bcl-2 y Bcl-XL, se caracterizan por poseer 4 dominios de homología (BH1-BH4) y por poseer una cola C-terminal hidrofóbica, que sitúa a la proteína en la membrana externa de la mitocondria, con el grueso de la proteína hacia el citosol. El hecho característico de los miembros del grupo I es que todos poseen actividad antiapoptótica.

- Subfamilia 2: está compuesto por proteínas con actividad proapoptótica. Los miembros de este grupo, como Bax y Bak, tienen una estructura general similar al grupo 1; contienen la cola hidrofóbica y todos los dominios menos el dominio BH4.

- Subfamilia 3: consiste en un conjunto diverso de proteínas cuyo único hecho común es la presencia del dominio BH3. Aunque algunos miembros del grupo III, como el Bid, son de hecho homólogos divergentes del Bcl-2 y Bax,

otros comparten muy poca semejanza estructural con los miembros del grupo 1 y 2.

Las proteínas de la familia Bcl-2 son proteínas multifuncionales. Se han identificado tres funciones generales para el Bcl-2 y algunos de sus homólogos antiapoptóticos, como el Bcl-Xl, que no necesariamente se excluyen entre si (Green DR y Reed JC, 1998):

1.- Dimerización con otros miembros de la familia Bcl-2.

En 1993, Oltvai et al. descubrieron que la proteína Bcl-2 era capaz de heterodimerizarse con la proteína proapoptótica Bax (Oltvai Z et al, 1993). De este hecho, surge la hipótesis de que los miembros pro y antiapoptóticos de la familia Bcl-2 pueden heterodimerizarse intentando bloquearse unos a otros. La relativa sensibilidad o resistencia de las células a los diversos estímulos apoptóticos dependería entonces de la relación entre los niveles de proteínas pro y antiapoptóticas. La dimerización se consigue cuando el dominio BH3 de una molécula se une en un bolsillo hidrofóbico formado por los dominios BH1, BH2 y BH3 de otra proteína.

2.- Función de segundo mensajero.

- Unión con otras proteínas no homólogas. De todas las proteínas con las que pueden interaccionar Bcl-2 y Bcl-Xl, las más importantes son aquellas que están relacionadas directamente con la activación de las caspasas, como

Apaf-1. Apaf-1 permanece en estado inactivo hasta que es activado por dATP y citocromo c, entonces forma un complejo con la pro-caspasa-9 induciendo la actividad de la caspasa-9 que a su vez activa las siguientes caspasas (Hu Y et al, 1998).

- Regulación de la liberación de citocromo C. Las proteínas antiapoptóticas también parecen mantener la integridad de las organelas, ya que Bcl-2 directa o indirectamente previene la liberación del citocromo C. se sabe que el Bid regula su liberación y que se une a las proteínas proapoptóticas y a las antiapoptóticas como el Bcl-2 (Yin XM, 2000).

3.- Regulación de la transición de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.

Las proteínas de la familia Bcl2 forman canales iónicos o poros, regulando la liberación de factores proapoptóticos, en particular citocromo C, del compartimento intermembranal de la mitocondria al citosol.

Se ha sugerido que las proteínas de la familia Bcl-2 pueden actuar insertándose en la membrana externa mitocondrial donde forman canales. La hipótesis general (Schendel S et al, 1998) es que las proteínas Bcl-2 citoprotectoras forman pequeños canales con una conformación más cerrada y que tienen preferencia por los cationes, mientras que las proteínas proapoptóticas, como Bax, forman canales más grandes, con una conformación más abierta y que prefieren aniones. Estos poros pueden explicar los cambios

en la permeabilidad de la membrana que ocurren en la apoptosis, y la habilidad de la Bcl-2 para regularla. La sobreexpresión de esta proteína evita la transición de la permeabilidad evitando la apoptosis (Reed JC,1997).

5.1. APOPTOSIS Y ESTRÉS OXIDATIVO.

Algunos procesos que son consecuencia del estrés oxidativo son la peroxidación lipídica, la pérdida de la homeostasis del calcio intracelular, y la alteración de las vías metabólicas. Todos estos procesos han sido recogidos en listas de modelos de apoptosis. Pero hay que diferenciar si son mecanismos efectores o simples cambios bioquímicos que ocurren como consecuencia de la muerte celular.

La ruptura de la membrana lipídica aumenta la concentración de lípidos biológicamente activos, tales como los metabolitos del ácido araquidónico, y la liberación de diacilgliceroles y ceramidas de la esfingomielina. Esto puede estimular la liberación del calcio desde sus lugares de almacenamiento intracelular lo que lleva a una pérdida de la homeostasis del calcio de la que dependen muchos sistemas enzimáticos. Se cree además que la activación de la endonucleasa dependiente del calcio es capaz de iniciar la fragmentación de la cromatina que se observa en las células apoptóticas (Lesmasters JJ et al, 1987). El calcio también puede activar las señales de transducción dependientes de la protein kinasa C y así modificar la transcripción génica (Wolf M et al, 1985).

La relación entre la Bcl-2 y el estrés oxidativo se evidencia por la localización de esta proteína en lugares de generación de radicales libres como son la mitocondria, el retículo endoplásmico y la membrana nuclear (Allsopp TE et al, 1993). Además, se ha sugerido que la Bcl-2 inhibe la muerte celular previniendo la oxidación intracelular crítica que presumiblemente es necesaria para que ocurra la apoptosis (Kannan K y Jain SK, 2000).

6. MODELOS EXPERIMENTALES DE DIABETES.

El estudio de la diabetes requiere un modelo animal adecuado, ya que el estudio en humanos está limitado, puesto que es una enfermedad crónica y por tanto los estudios se prolongarían durante años, a lo largo de los cuales cada persona sufre una serie de acontecimientos difícilmente comparables que condicionan la comparación de los resultados obtenidos. A pesar de todo, la extrapolación al hombre de los resultados obtenidos con animales requiere una cuidadosa interpretación.

Aunque se conoce desde hace tiempo la existencia de diabetes espontánea en numerosas especies animales, sólo está bien caracterizada en algunas de estas especies, como son ratones, perros y gatos (Mordes JP y Rossini AA, 1981).

Existen dos tipos de modelos animales para el estudio de la diabetes:

- Animales que son espontáneamente diabéticos, como es la rata BB, mutación espontánea de la rata Wistar, y el ratón db/db.

- Animales con diabetes inducida experimentalmente mediante la administración de hormonas con efecto contrario a la insulina (adrenalina, glucagón, glucocorticoides y hormona del crecimiento), la diabetes inducidas por virus (coxackie B, virus de la rubéola, reovirus y otros RNA virus) y la diabetes

inducida por tóxicos, fundamentalmente estreptozotocina y aloxana (Mordes JP y Rossini AA, 1981).

En el presente trabajo utilizamos el modelo de diabetes experimental inducida por aloxana. La aloxana (2,4,5,6-tetraoxihexahidropirimidina) es una molécula inestable y muy reactiva, que rápidamente se transforma en ácido dialúrico, forma tóxica del compuesto. Es muy selectiva de las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y produce poca o nula toxicidad en otros tejidos (Lenzen S y Panten U, 1988). La transformación de aloxana en ácido dialúrico consume oxígeno y produce peróxido de hidrógeno, probablemente debido a la estructura quinónica del compuesto. La autooxidación del ácido dialúrico produce H_2O_2 , O_2 , $O_2^{\cdot -}$ y $^{\cdot}OH$. La producción de radicales libres de O_2 tras la administración de aloxana ha sido puesta de manifiesto *in vivo* e *in vitro*. La elevada selectividad por las células β puede ser debida a que este tipo de células es capaz de captar grandes cantidades de aloxana y formar rápidamente radicales libres de O_2 (Oberley LW, 1988).

Los modelos animales de diabetes más ampliamente utilizados han sido rata y perro, sin embargo existen estudios concluyentes que ponen de manifiesto que el modelo de diabetes experimental en ratón es adecuado para el estudio de esta enfermedad, y más en concreto para la retinopatía diabética (Kowluru RA, 2002).

7. EPÍLOGO.

La diabetes mellitus es una enfermedad que afecta al metabolismo de la glucosa y que conduce a una hiperglucemia crónica. La retinopatía diabética se produce como consecuencia de ésta, siendo la primera causa de ceguera en los países desarrollados.

Se considera a la retinopatía diabética una enfermedad tanto vascular, ya que produce alteraciones en la microcirculación a nivel ocular, como una enfermedad neurodegenerativa, con atrofia de las células ganglionares y de la capa nuclear interna detectables ya en fases iniciales de la enfermedad, que conducen a alteraciones en el electroretinograma incluso antes de la aparición de manifestaciones clínicas.

Los mecanismos fisiopatológicos que conducen a estos cambios retinianos son múltiples, como la glicosilación enzimática que conduce a un aumento de AGEs, la presencia de estrés oxidativo o la disminución de los sistemas de defensa antioxidante. El estrés oxidativo conduce a un aumento de la apoptosis celular a través de varios mecanismos entre ellos alterando la expresión de proteínas supresoras de la apoptosis celular (Bcl-2).

Existen múltiples sistemas de defensa frente al estrés oxidativo, ya sean aportados a través de la dieta (vitamina C, ácido lipoico), ya sean propios del organismo (sistema glutatión). El ácido lipoico es un antioxidante natural,

presente en el ser humano a través de la dieta, con funciones como co-enzima en reacciones mitocondriales y como antioxidante universal. El ácido lipoico es capaz de disminuir el daño oxidativo en los modelos de retinopatía diabética experimental en ratas.

Los modelos de diabetes experimental en ratón han demostrado la presencia de alteraciones metabólicas que contribuyen a la aparición de la retinopatía diabética. En estos modelos se ha demostrado un aumento del estrés oxidativo a nivel de las células retinianas con alteración de los sistemas de defensa antioxidante similar al observado en ratas diabéticas pero con un menor daño a nivel neuronal. El tratamiento con suplementos de ácido lipoico en ratones diabéticos debería mejorar los factores de estrés oxidativo que se desencadenan como consecuencia de la hiperglucemia crónica y sus consecuencias a nivel retiniano.

Estudios de retinopatía diabética en humanos y en ratas han demostrado alteraciones precoces en la función retiniana con cambios en los patrones del electroretinograma. Pero en el modelo de retinopatía diabética en ratones no se ha objetivado previamente si también se producen alteraciones en el electroretinograma en la retinopatía diabética precoz, si éstas se pueden comparar a las obtenidas en los modelos experimentales en ratas y si el ácido lipoico es capaz de prevenir las posibles alteraciones electroretinográficas que se produzcan como consecuencia de al diabetes mellitus en los ratones.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

El ácido lipoico disminuye el estrés oxidativo producido por la hiperglucemia crónica y sus consecuencias en las células retinianas en el modelo de retinopatía diabética experimental en ratones.

OBJETIVOS

1. Establecer el grado de alteración de los sistemas de defensa antioxidante (glutathione y glutathione peroxidase) y la presencia de productos de la peroxidación lipídica (MDA) a nivel del homogenado de ojo en un modelo de retinopatía diabética experimental en ratones, y el efecto del tratamiento con ácido lipoico sobre estos parámetros indicadores de estrés oxidativo.

2. Evaluar las alteraciones que se producen en el electroretinograma en un modelo de retinopatía diabética experimental en ratones, y el efecto sobre las mismas del tratamiento con ácido lipoico.

3. Evaluar la expresión de mecanismos de defensa antiapoptóticos en las células de Müller de la retina en un modelo de retinopatía diabética experimental en ratones mediante el estudio de la proteína antiapoptótica Bcl-2, y el efecto del tratamiento con ácido lipoico sobre la expresión de esta proteína.

4. Establecer la presencia de daño oxidativo en el DNA de las células retinianas en un modelo de retinopatía diabética experimental en ratones, y el efecto antioxidante sobre el DNA nuclear del tratamiento con ácido lipoico versus al tratamiento con insulina.

5. Estudiar el grado de apoptosis de las células retinianas en un modelo de retinopatía diabética experimental en ratones mediante la detección de núcleos picnóticos con la técnica TUNEL, así como el efecto antiapoptótico del tratamiento con ácido lipoico.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. APARATOS

A continuación se detallan los aparatos utilizados en el presente trabajo:

Balanza (FY-300, AND, Japón)	Congelador de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, marca Zanussi
Balanza de precisión modelo Recator 6110.	Congelador de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, marca Sanyo, modelo Ultra Low
Centrífuga de mesa marca ALC, modelo 4206.	Espectrofotómetro de doble haz marca Kontron, modelo Uvikon 810
Centrífuga de mesa marca ALC, modelo 4214.	Estufa, modelo Revco ULTIMA
Congelador de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ marca Liebher, mo	Impresora Hewlet & Packard, modelo Deskjet 1510C
Balanza (FY-300, AND, Japón)	Impresora láser marca Oki 5200
Balanza de precisión modelo Recator 6110	Luminómetro (Turner Designs, Mountain View, CA)
Centrífuga de mesa marca ALC, modelo 4206.	Medidor de pH marca Crison, modelo micropH 2002
Centrífuga de mesa marca ALC, modelo 4214	Microondas, modelo KOR 6485, Daewoo
Congelador de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ marca Liebher, modelo GT 1401-1	Microscopio Olympus BH2
Microscopio invertido, modelo Axiovert 25, Zeiss	Ordenador portátil marca Packard Bell
Microtomo histológico (Tissue-Tek Miles Scientific).	Sistema de cromatografía líquida de alta presión compuesto por bombas e inyectores marca Kontron Instruments
Sistema de filtración de agua marca Millipore, modelos Milli-Ro plus, Milli-Q plus.	Sistema óptico : cámara C2400-47 (Hamamatsu, Sweden), lente 25mm (Schneider Optics, NY).
Software Image-Pro 4.0 (Media Cibernetics, Silver Spring, MD)	Termostato para baño marca Heto Birkerod modelo 02DBT623.
Trazador marca Kontron, modelo Plotter 800	

Se han utilizado otros pequeños aparatos propios de un laboratorio experimental como micropipetas, agitadores magnéticos, homogenizadores, etc que no se detallan puesto que son numerosos los laboratorios que los comercializan y existe una gran variedad de modelos.

2. REACTIVOS

A continuación se describen los productos utilizados, así como los laboratorios que los fabrican:

Ácido cítrico (Fluka, Buchs, Switzerland).	Ácido clorhídrico (Sigma, St. Louis, Mo)
Ácido perclórico, purísimo (Pancreac, Barcelona, España)	Ácido 2 – tiobarbitúrico, purísimo (Sigma, St. Louis, Mo).
Ácido tricloroacético (Sigma, St. Louis, Mo).	Agua, purísimo (Riedel de Häen, Seelze, Germany).
Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma, St. Louis, Mo).	α -ácido lipoico (Sigma, St. Lous, Mo)
Aloxana (Sigma, St. Louis, Mo).	Azida sódica, purísima (Merck, NY, USA)
Bicarbonato potásico (Sigma, St. Louis, Mo)	Bicarbonato sódico, puro (Pancreac, Barcelona, España)
Carbonato sódico, puro (Pancreac, Barcelona, España)	Citrato sódico (Fluka, Buchs, Switzerland).
EDTA, sal disódica, purísimo (Boehringer Mannheim, Germany)	Eosina-floxina (Panreac, Barcelona, España)
Etanol (Riedel de Häen, Seelze, Germany)	Etanol 100%, purísimo (Riedel de Häen, Seelze, Germany)
Formaldehído 10% (Fluka, Buchs, Switzerland)	Fosfato de dihidrógeno dipotásico, purísimo (Fluka, Buchs, Switzerland)
Fosfato de dihidrógeno monopotásico, purísimo (Fluka, Buchs, Switzerland)	Glutation, puro (Boehringer Mannheim, Germany)

Glutation disulfuroreductasa (EC 1.6.4.2) de levadura 120 U/mg (Boehringer Mannheim, Germany)	Hematoxilina de Harris (Panreac, Barcelona, España)
Hidróxido potásico, puro (Fluka, Buchs, Switzerland)	Hidróxido sódico (Fluka, Buchs, Switzerland)
Kit DAKO-LSAB2 (Dako A/S, Denmark)	Medio sintético
Metanol, purísimo (Riedel de Hæn, Seelze, Germany)	NADPH sal tetrasódico, puro (Boehringer Mannheim, Germany)
Parafina (Panreac, Barcelona, España)	PBS (Fisher, Leicestershire, United Kingdom)
Peróxido de hidrógeno, 30%, purísimo (Fluka, Buchs, Switzerland)	Reactivo de Folin-Ciocalteu (Sigma, St. Louis, Mo)
Sulfato cúprico anhidro, purísimo (Fluka, Buchs, Switzerland)	Tartrato sódico potásico tetrahidratado, purísimo (Sigma, St. Louis, Mo)
Test para determinación de glucosa (Boehringer Mannheim, Germany)	Test para determinación de hemoglobina glicosilada (Byosystems, Barcelona, España)
1,1,3,3 – tetraetoxipropano, puro (Sigma, St. Louis, Mo)	Tolueno (JT Baker, Deventer, Holland)
Tween 20 (Acros, New Jersey, USA)	Xilol (Acros, New Jersey, USA)
MEBSTAIN® Apoptosi Kit Direct (MBL International Corporation)	

3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

3.1. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES

Para realizar el presente estudio se utilizaron ratone albinos machos de la raza Swiss. Todos ellos presentaban criterios de uniformidad en cuanto a la edad y peso, entre 25 y 30 gr, al inicio de los experimentos. En todos los casos se dejaron aclimatar al menos durante una semana antes de iniciar los experimentos.

Las estabulación se realizó en las instalaciones de la Unidad de Investigación del Departamento de Fisiología, Farmacología y Toxicología de la Universidad Cardenal Herrera-CEU. Las condiciones de estabulación durante los experimentos consistían en el mantenimiento de los ratones en jaulas en condiciones controladas de temperatura (20°) y humedad (50-60%), en ciclos constantes de luz-oscuridad de 12 horas y acceso a comida y agua add libitum.

3.2. INDUCCIÓN DE LA DIABETES EN RATONES

La diabetes fue inducida mediante la inyección subcutánea de una dosis única de aloxana disuelta en tampón citrato fosfato 10mM, pH 4,5, según el modelo experimental propuesto por el laboratorio de la Universidad Cardenal Herrera-CEU (Hermenegildo C et al, 1993). La dosis de aloxana empleada es de 200mg/Kg de peso.

Se consideran diabéticos aquellos ratones cuya glucemia fue superior a 16mM (300 mg/dl) a los tres días de la inyección con aloxana (Greene y Mackway 1980, Kim et al 1991).

3.3. DISEÑO DEL EXPERIMENTO

Se realizaron tres experimentos con el mismo diseño y duración. Tras la inducción de la diabetes los animales fueron divididos en seis grupos:

1. controles
2. controles tratados con ácido lipoico
3. diabéticos
4. diabéticos tratados con ácido lipoico
5. diabéticos tratados con insulina
6. diabéticos tratados con insulina y ácido lipoico.

3.3.1. Administración del ácido lipoico.

El ácido lipoico se administró via intraperitoneal a partir del 4º día tras la inducción de la diabetes a una dosis de 100mg/Kg/día (Chidlow G et al, 2002; Goraca A et Józefowicz-Okonkwo G, 2007). El DL- α -ácido lipoico se preparó según Cameron et al, disolviéndose en suero salino y NaOH hasta conseguir un pH 7.4 mediante la adición de HCl (Cameron et al, 1995).

3.3.2. Administración de la insulina.

Se administra a partir del 4º día tras la inducción de la diabetes, vía intraperitoneal a la dosis de 500mU/g peso, hasta el día previo al sacrificio.

4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

4.1. SANGRE

Para determinar la glucemia se realiza una pequeña incisión en el extremo de la cola mediante un bisturí. La sangre se recoge con ayuda de una tira reactiva y la glucemia se determina mediante un medidor de glucemia digital (glucometer).

En aquellos casos en los que se necesita mayor cantidad de sangre, por ejemplo para la determinación de la hemoglobina glicosilada, los animales se anestesian (mediante ketamina 100mg/Kg peso; azepromazina 2,5mg/Kg peso) y ésta se extrae directamente mediante punción cardiaca. La sangre se almacena en tubos con EDTA, siendo estable la muestra durante 10 días a 2-8°C.

4.2. RETINA

Los ratones se sacrificaron mediante dislocación cervical. Posteriormente, se enuclearon ambos globos oculares. De uno de ellos se extrajo el cristalino y posteriormente se homogenizaron los ojos en 1mL de tampón fosfato potásico 0.1mM,

pH 7, con un homogenizador Potter de teflón. Los homogenados se conservaron a -20°C hasta su posterior utilización para la determinación de proteínas, MDA y actividad peroxidasa.

Para la determinación de glutatión, inmediatamente después de la homogenización, se acidifican 360µl de este homogenado con 40µl de ácido perclórico al 20%, se centrifuga a 12000rpm durante 15 minutos y se recoge el sobrenadante, que se conserva a -20° hasta su utilización.

Para la realización de los cortes histológicos y estudio inmunohistoquímico, el otro ojo se fija mediante inmersión en formaldehído al 4% durante 24 horas. Posteriormente, se lava 4 veces con buffer Sörensen fosfato al 3% de sucrosa y luego, se mantienen durante una noche con buffer Sörensen fosfato al 25% de sucrosa para su crioprotección. Finalmente, se procede a su corte con criostato a -25°C y se realizan cortes de 8-12µm.

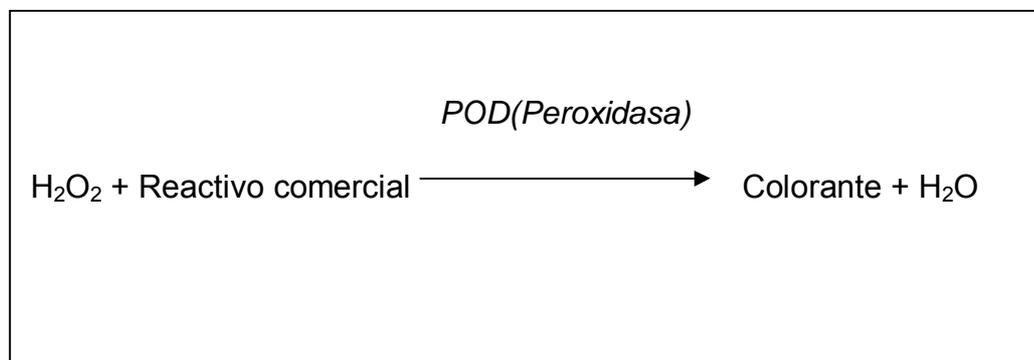
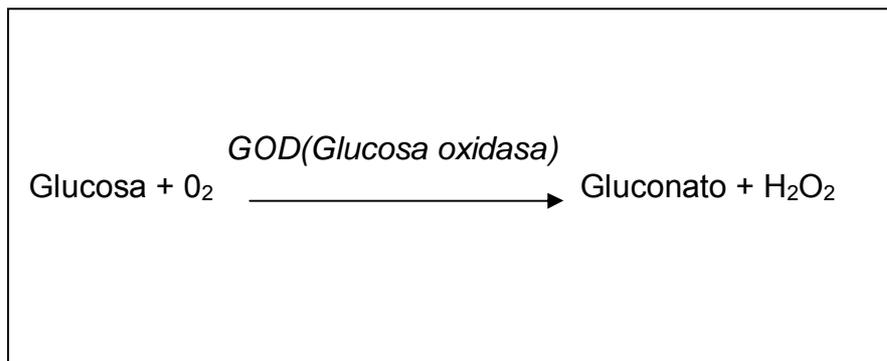
5. PROCEDIMIENTOS ANALÍTICOS

5.1. DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA

- Fundamento del método

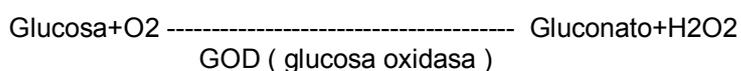
Para la determinación de la glucemia se utilizó un test, disponible comercialmente, de Boehringer Mannheim, basado en el procedimiento descrito por Kunst et al. (1984) y Werner et al.(1970).

Es un método enzimático de reacciones acopladas, cuyo fundamento es el siguiente:

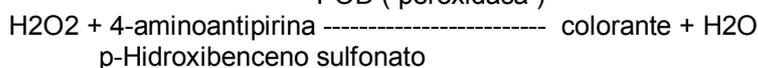


El colorante que se produce es proporcional a la cantidad de glucosa presente en la muestra, y se puede detectar espectrofotométricamente a una longitud de onda de 610 nm, con una cubeta de 1 cm de paso de luz y a una temperatura de incubación de 20-25°C.

Test de Sigma-Aldrich, basado en el método propuesto por Keston, con la modificación de Trinder (Keston 1956). Es un método enzimático de reacciones acopladas, cuyo fundamento es el siguiente:



POD (peroxidasa)



- se detecta espectrofotométricamente a 505nm
- el suero se diluye al 50% puesto que los niveles de glucemia en los ratones exceden el límite de detección del kit

- Soluciones

Solución 1: Glucosa 9.1mg/dl ó 0.505 mmol/l

Solución 2: POD (Peroxidasa) > 0.35 U/ml

GOD (Glucosa oxidasa) > 8 U/ml

ABTS (colorante) 1 mg/dl

1. estandar de glucosa 300 mg/ml
2. reactivo glucosa trinder :
 - 4- aminoantipirina 0.5mmol/l
 - p-hidroxibenceno sulfonato 20 mmol/l
 - glucosa oxidasa 15000U/l
 - peroxidasa 10000 U/l
 - tampón pH 7.0

- Procedimiento

Obtención de las muestras

Se extraen 50 μ l de sangre de la cola del ratón y se mezclan con 50 μ l de ácido tricloroacético al 10%, consiguiendo la precipitación de las proteínas. La muestra se mantiene a 4^a C durante 15 minutos. A continuación se centrifuga 15 minutos a 12000 x g, y el sobrenadante se mezcla con 10 μ l de KHCO_3 para conseguir su neutralización. El sobrenadante ya neutralizado se diluye 5 veces, puesto que, los niveles de glucemia de los ratones exceden el límite máximo de detección de este test.

Procedimiento

Se preparan dos tubos con una cantidad conocida de solución 1 (estándar de glucosa) y otro tubo con la misma cantidad de agua bidestilada (blanco). En tubos de ensayo distintos se pipetea dos cantidades distintas de nuestra muestra, preparada como se indica en el apartado anterior. A ambas se les añade 1 ml de solución 2 y la cantidad necesaria de agua bidestilada para que todos los tubos tengan el mismo volumen.

Se dejan incubar durante 45 minutos y, a continuación, se mide la absorbancia de las distintas muestras y de los estándares frente al blanco a una longitud de onda de 610 nm.

	SOLUCION 1	SOLUCION 2	AGUA	MUESTRA
BLANCO	--	1 ml	20 µl	--
ESTANDAR	20 µl	1 ml	--	--
MUESTRA 1	--	1 ml	10 µl	10µl
MUESTRA 1'	--	1 ml	--	20 µl

Los cálculos se realizan dividiendo la absorbancia de la muestra por la del estándar y multiplicando por la concentración de glucosa en el estándar y por el factor de dilución. Las unidades en la que se expresa el nivel de glucemia es mM.

$$C = 10,1 \times 5 \times 2,2 \frac{\text{Absorbancia muestra}}{\text{Absorbancia estándar}}$$

Se preparan tubos para blanco, estandar y muestras. Se pipetea 1ml de reactivo Glucosa Ttinder a cada uno de ellos, y se les añade 5µl de agua destilada, estándar de glucosa y suero respectivamente.

Se mezcla por inversión, se deja incubar 18 minutos a temperatura ambiente, y se mide la absorbancia a 505nm frente a agua destilada.

La concentración de glucosa en mg/dl será :

$$C = [(\text{Abs muestra} - \text{Abs blanco}) / (\text{Abs estandar} - \text{Abs blanco})] * \text{conc. estandar}$$

Para convertirlo a unidades del S.I (mmol/l) se multiplica el resultado por 0.0555.

El resultado se multiplica por 2, si el suero se ha diluido al 50%.

5.2. DETERMINACIÓN DE LA HEMOGLOBINA GLICOSILADA (HbA1c)

- Fundamento del método.

Para la determinación de la HbA1c se utiliza un método cromatográfico-espectrofotométrico y de intercambio iónico independiente de la temperatura, mediante un test disponible comercialmente por Bisosystems.

Después de preparar un hemolizado con la muestra de sangre, donde se elimina la fracción lábil, las hemoglobinas son retenidas por una resina de intercambio catiónico, eluyéndose la Hemoglobina A_{1c}, previa eliminación por lavado de la HbA_{1a+b}.

La estimación del porcentaje de HbA_{1c} se realiza por lectura de la absorbancia a 415 nm.

- Soluciones

Solución 1. Biftalato potásico 50 mmol/L, detergente, pH 5.

Solución 2. Tampón fosfato 48 mmol/L, pH 6,5, azida sódica 0.95 g/L.

Solución 3. Tampón fosfato 42 mmol/L, pH 6.4, azida sódica 0.95 g/L.

Microcolumnas. Contienen resina de intercambio iónico equilibrada.

- Procedimiento

En un tubo de ensayo se pipetea 50 µL de sangre y 200 µL de solución 1. Se agita y se deja a temperatura ambiente durante 10-15 min. De este hemolizado se cogen 50 µL, los cuales se aplican cuidadosamente sobre el disco superior de la columna. Una vez que ha penetrado todo el hemolizado, se añaden sucesivamente 200 µL y 2 mL de la solución 2 y dejamos gotear, desechando el eluido.

Colocamos la columna sobre un tubo de ensayo y añadimos 4 mL de la solución 3. Recogemos el eluido (Fracción HbA_{1c}). Agitamos el tubo de ensayo y leemos la absorbancia de esta fracción a 415 nm frente a agua destilada (AHbA_{1c}).

Para la lectura de la absorbancia de la Hb_{TOTAL} se pipetea en un tubo de ensayo 12 mL de la solución 3 y 50 µL del hemolizado, se agitan y se lee la absorbancia a 415 nm frente a agua destilada (AHb_{TOTAL}).

Los cálculos se realizan dividiendo la absorbancia de la HbA_{1c} por 3 veces la absorbancia de la absorbancia de la Hb_{TOTAL}.

$$\% \text{ HbA}_{1c} = \frac{\text{AHbA}_{1c}}{3 \times \text{AHb}_{\text{TOTAL}}} \times 100$$

5.3. DETERMINACION DE PROTEÍNAS

- Fundamento del método

Se realizó según el procedimiento descrito por Lowry , con las modificaciones utilizadas habitualmente en nuestro laboratorio, y que a continuación se detallan (Lowry et al, 1951).

- Soluciones

Solución A: Na₂CO₃ 4%, NaOH 0.8%

(disolver en 1 litro de agua bidestilada 40 g de carbonato
sódico y 8 g de hidróxido sódico).

Solución B: CuSO₄ 1.25 mM, C₄H₄KNaO₆ 1.42 mM.

(disolver en 1 litro de agua bidestilada 200 mg de sulfato de cobre y
400 mg de tartrato sódico potásico).

Las soluciones A y B se conservan a 4°C hasta su utilización.

Solución C: Reactivo de Folin-Ciocalteu 1N

(Se obtuvo por dilución 1:2 del reactivo de Folin-Ciocalteu
comercial)

Solución D: Solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) 1mg/mL

La solución D se conserva a -20°C hasta su utilización.

- Procedimiento

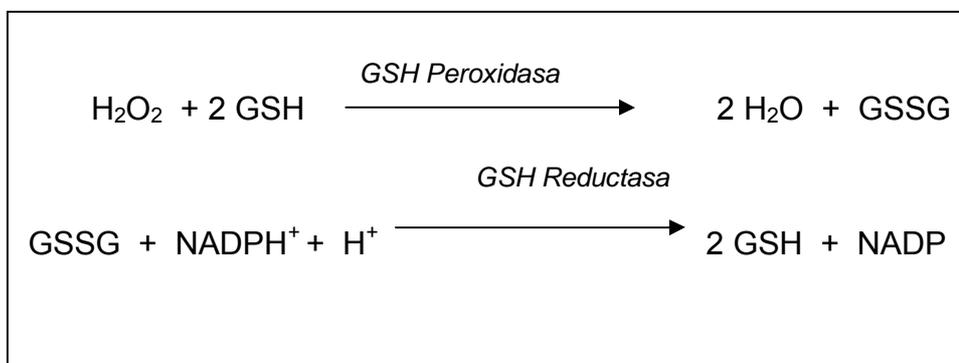
Se preparan tubos de ensayo con cantidades diferentes de la solución D (0, 10, 25, 50, 75 y 100 μ L) y con dos cantidades distintas de cada muestra (10 y 25 μ L). Se añade agua bidestilada hasta 200 μ L. Se mezclan las soluciones A y B a partes iguales y a cada tubo de ensayo se le añade 1 mL de esta mezcla. Se deja reaccionar durante 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añaden 100 μ L de la solución C a cada uno de los tubos. Se agita bien y se espera durante 25 ó 30 minutos.

Se mide la absorbancia de cada una de las soluciones en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 696 nm. La absorbancia a 696 nm es directamente proporcional a la concentración de proteínas. Con los valores de absorbancia de los distintos estándares obtenemos la recta patrón y por intrapolación obtenemos las concentraciones de proteínas que queríamos conocer.

5.4. DETERMINACION DE GLUTATIONPEROXIDASA

- Fundamento del método

La actividad glutatión peroxidasa (GSHPx; E.C.1.1.1.1.9.) se determinó según el método propuesto por Lawrence frente a peróxido de hidrógeno (Lawrence et al, 1978). Está basado en las siguientes reacciones:



La formación del glutatión disulfuro está catalizada por la actividad glutatión peroxidasa de la muestra, que es, a su vez, reducido de forma continua por un exceso de la actividad glutatión disulfuro reductasa presente en el medio. Esta reducción requiere la oxidación de NADPH, cuya desaparición se registra espectrofotométricamente utilizando una longitud de onda de 340 nm.

- Soluciones

Solución A. Tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.0, que contiene

EDTA 1 mM y azida sódica 1 mM.

Solución B. Glutatión Disulfuro reductasa 2.4 U/mL

Solución C. GSH 10 mM

Solución D. NADPH 1.5 mM disuelto en NaHCO₃ al 0.1%

Solución E. Peróxido de hidrógeno 1.5 mM

- Procedimiento

El procedimiento analítico consiste en la adición de forma sucesiva a una microcubeta de las siguientes cantidades de las distintas soluciones:

1. 500 μL de la solución A (tampón fosfato potásico).
2. 25, 50 ó 75 μL de muestra.
3. 75, 50 ó 25 μL de agua bidestilada.
4. 100 μL de la solución de glutathion reductasa (solución B).
5. 100 μL de la solución C.

Se preincuba esta muestra durante 5 min a 37 °C, tras lo cual se añaden 100 μL de la solución D. Se monitoriza durante 3 min el consumo de NADPH no dependiente de hidroperóxidos.

Por último se añaden 100 μL de la solución E precalentada, y se registra de nuevo la disminución de la absorbancia a 340 nm durante 5 min, que es resultado del consumo de NADPH.

El cálculo se realiza por la diferencia entre el consumo de NADPH antes y después de la adición de hidroperóxido.

$$c = \frac{V_f}{\epsilon \times d \times V_m} \times \frac{\Delta A}{\Delta t} \quad (\text{mmol} \times \text{L}^{-1} \times \text{min}^{-1})$$

Donde:

V_f = volumen final en mL

V_m = volumen de muestra en mL

ϵ = coeficiente de extinción molar (para el NADPH en estas condiciones es de 6.22 mM⁻¹ x cm⁻¹)

d = paso de luz de la cubeta (1 cm en nuestro caso)

ΔA = disminución de la absorbancia a 340 nm

Δt = intervalo de tiempo considerado.

Los valores se expresan como nmol de NADPH consumidos por minuto y por mg de proteína.

5.5. DETERMINACION DE MALONDIALDEHIDO

- Fundamento del método.

Para la cuantificación del malondialdehído de las distintas muestras se ha utilizado una modificación del método de Richard (Richard et al, 1992), en el cual se determina el nivel del complejo formado entre el malondialdehído (MDA) con el ácido tiobarbitúrico (TBA), en base a la siguiente reacción de dos moléculas de TBA con una de MDA:

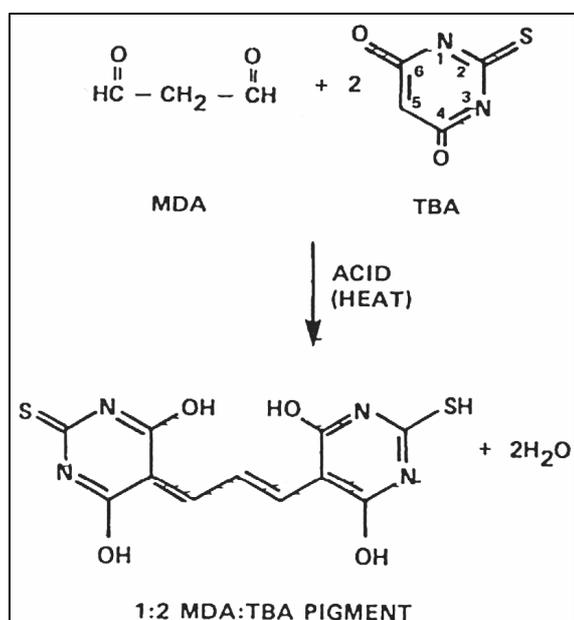


Figura 9. Reacción del malondialdehído con el ácido tiobarbitúrico (Janero, 1990).

- Equipo y soluciones utilizadas

Se ha utilizado un equipo de HPLC (Kontron Instruments) que consta de los siguientes componentes:

- Bomba cromatográfica: HPLC PUMP 422 MASTER.
- Detector de fluorescencia SFM-25.
- Inyector: Rheodyne modelo 7125 con *loop* de 50 μ l.
- Mezclador dinámico modelo M-491.
- Controlador Multiport modelo RS-232.
- Ordenador 486/50 Hz.
- Software: Data System MT2.

La columna cromatográfica de separación empleada es una Spheryc-5, ODS 5 μ m de 250 x 4,6 mm (Brownlee-Columns). El flujo de la fase móvil es de 1.0 ml/min. La longitud de onda de excitación utilizada es de 532 nm y la de emisión 553. El voltaje del detector de fluorescencia empleado es de 600 y la respuesta de 2 seg. La inyección de cada muestra se hace con una jeringuilla de 100 μ l tipo Hamilton (Reno, Nevada).

La fase móvil se prepara con tampón fosfato 50 mM a pH 6.0 y metanol (580 ml de tampón y 420 ml de metanol). Posteriormente, se filtra a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45 μ m de poro y 47 mm de diámetro. Dicha mezcla se gasea correctamente con helio desde media hora antes de realizar el experimento y durante el mismo.

La solución madre de calibración se prepara diariamente y se conserva en nevera a 4°C. Dicha solución madre consiste en una concentración 20 mM de 1,1,3,3-tetraetoxipropano en etanol.

La solución de trabajo consiste en una preparación de ácido tiobarbitúrico (0,37%) y ácido perclórico (6,4%), 2:1 v/v respectivamente. La solución de trabajo también se prepara de forma diaria.

- Procedimiento analítico para la determinación de MDA.

En tubos eppendorf de 2 ml se pipetea 0.1 ml de la muestra y 0,75 ml de la solución de trabajo. A continuación se mezclan bien y se mantienen 60 min en un baño de agua a 95°C. Pasado este tiempo se enfrían los tubos en baño de agua-hielo (4°C) durante 10 min con objeto de detener la reacción. Posteriormente se centrifugan 10 min a 12.000 rpm.

Hasta su inyección en el equipo HPLC los tubos se mantienen a una temperatura constante de 4°C.

Puesto que el aducto MDA-TBA es inestable a pH neutro cada muestra se neutraliza 10 min antes de la inyección en el equipo de HPLC. Se añaden aproximadamente 0.1 ml de hidróxido potásico 0.7 M a 0.2 ml de la mezcla que acabamos de centrifugar hasta obtener un pH de 6,0. Inmediatamente después de

neutralizar centrifugamos durante 1 min para ayudar a precipitar sales insolubles que podrían interferir en la determinación y se procede, previo filtrado con filtros de jeringa no-estériles (3 mm, 20 micras, membrana de teflón, suministrados por Corning Laboratory Sciences Company), a inyectar en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra inyectada fue de 100 μl para tener la seguridad de llenar el *loop* de 50 μl .

En cada experimento se preparó un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 0,2; 0,4; 0,5; 1; 1,5 y 2 μM). Un ejemplo de estas curvas se muestra en la figura X. El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de MDA en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

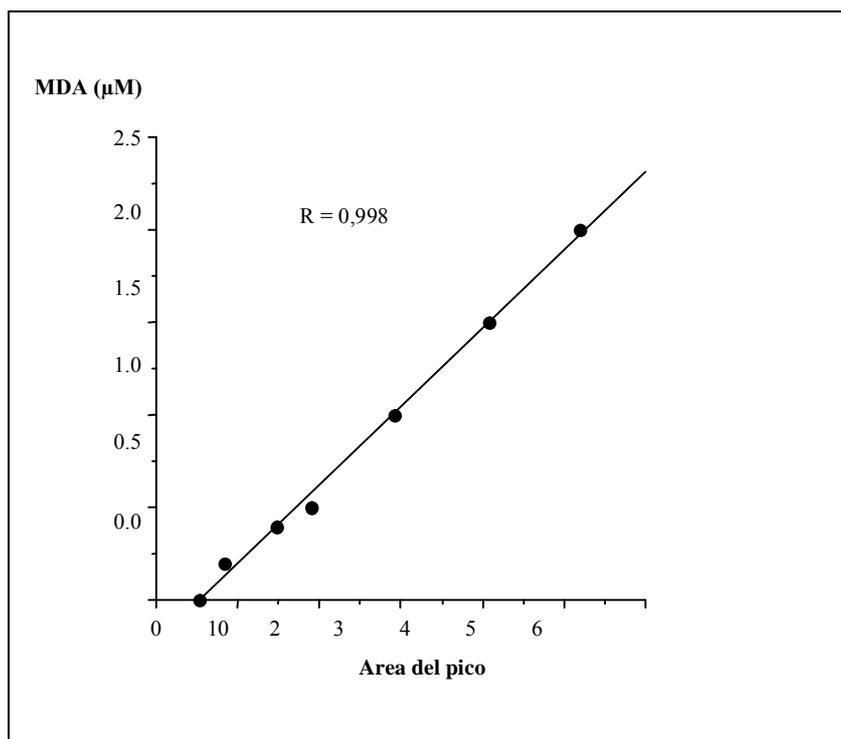


Figura 10. Curva patrón de MDA obtenida por HPLC.

5.6. DETERMINACION DE GLUTATION.

- Fundamento del método.

La concentración de GSH en las distintas muestras se determinó por el procedimiento descrito por Reed (Reed et al., 1980). El método se basa en la reacción del ácido iodoacético con los grupos tioles para formar derivados carboximetilos seguido de una derivatización cromófora de los grupos amino con el reactivo de Sanger (1-fluoro-2,4-dinitrobencono) dando lugar a derivados N-DNP. Estos derivados son rápidamente separados por HPLC lo que permite la cuantificación de niveles nanomolares de GSH, GSSG y aminoácidos relacionados.

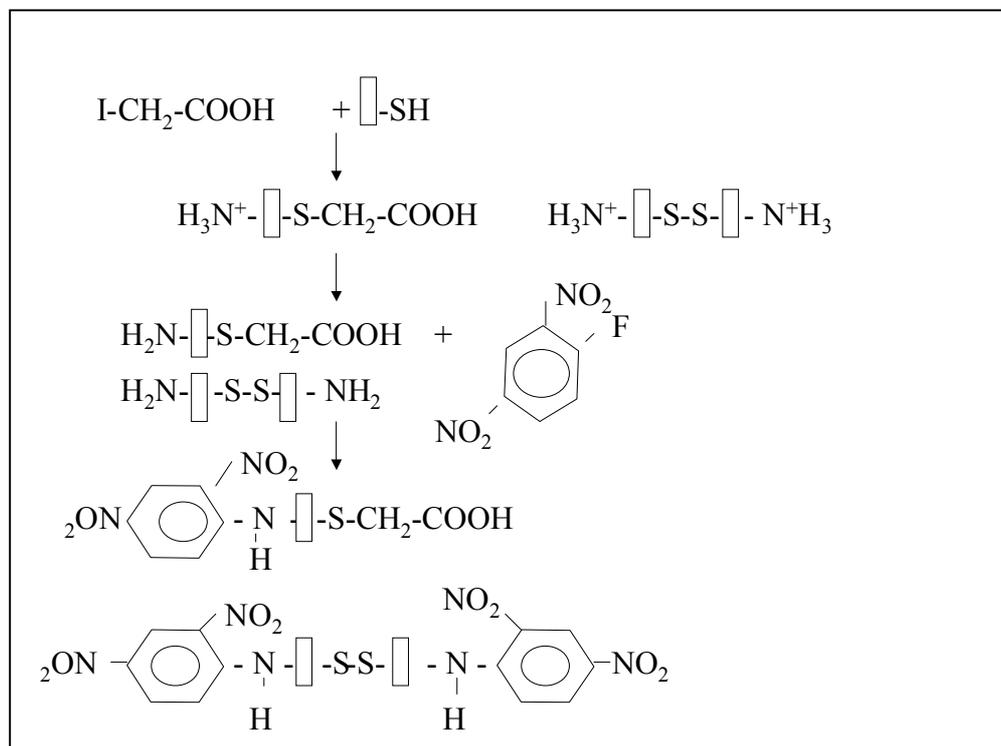


Figura 11. Reacción del glutatión con el ácido iodoacético y el reactivo de Sanger.

- Obtención de las muestras

La determinación de la concentración de glutatión se realiza en homogenado crudo, utilizando como tampón de homogenización 1 ml de tampón fosfato potásico 0,1 M, pH 7,0. Inmediatamente tras la homogenización, se acidifican 360 µL de este homogenado con 40 µL de ácido perclórico al 20%, se centrifuga a 12.000 rpm durante 15 minutos y se recoge el sobrenadante, que se conserva a - 20 °C hasta su utilización.

- Equipo y soluciones utilizadas

Hemos trabajado con un equipo de HPLC de la marca Kontron Instruments que consta de los siguientes componentes:

- Bombas cromatográficas: HPLC PUMP 422 MASTER.
- Detector: de ultravioleta 430
- Autoinyector: Kontron Instruments 7125 con *loop* de 50 µl.
- Mezclador dinámico modelo M-491.
- Controlador Multiport modelo RS-232. -
- Ordenador 486/50 Hz.
- Software: Data System MT2.

La columna cromatográfica de separación empleada es una 3-Spherisorb NH₂ 5µm, de la casa Waters, de 250 x 4,6 mm. Las condiciones iniciales del flujo son de 1.0 ml/min, 80% de la fase móvil A y 20% de la fase móvil B. Estas condiciones iniciales son mantenidas durante 10 minutos seguidas de un gradiente lineal hasta el 95% de la

fase móvil B durante 40 minutos y reequilibrado con las condiciones iniciales durante 10 minutos antes del análisis de la siguiente muestra. La longitud de onda utilizada es de 365 nm. El rango del detector ultravioleta empleado es 0.005 y el tiempo de respuesta de 5 seg. La inyección de cada muestra se realiza automáticamente con un autoinyector con capacidad de 45 muestras.

La fase móvil A se prepara con metanol al 80% (800 ml de agua calidad HPLC + 3.2 l de metanol) y la fase móvil B se prepara con acetato sódico 5M en metanol al 80% (800 ml de acetato sódico + 3.2 l de metanol). Posteriormente se filtran a través de un filtro-membrana (Scheicher und Schuell) de 0,45 µm de poro y 47 mm de diámetro. Dichas mezclas han sido correctamente gaseadas con helio desde media hora antes de realizar el experimento y durante el mismo. La solución madre de calibración se prepara diariamente y se conserva en nevera a 4° C. Dicha solución madre consiste en una concentración 10 mM de glutation reducido en agua.

La solución 1 es una preparación de ácido iodoacético (100mM) y m-cresol 0.2 mM . La solución 2 es una preparación de DNFB (1-fluoro-2,4-dinitrobenceno) 1.5% v/v etanol puro. Se prepara fresco cada día y se conserva a 4° C protegido de la luz.

- Procedimiento analítico para la determinación de GSH.

En tubos eppendorf de 2 ml pipeteamos 0,2 ml de la muestra y 0.04 ml de ácido iodoacético 100 mM en 0.2 mM de m-cresol . Cada solución se ajusta a un pH de 8,5-9 por adición de KHCO₃ 2,4 M en KOH 2M. Incubamos durante 1 hora a temperatura

ambiente antes de la adición de 1-fluoro-2,4-dinitrobenceno para formar los derivados N-DNP los cuales requieren 4 horas en oscuridad a temperatura ambiente para su formación. Posteriormente se centrifugan 10 minutos a 13.000 rpm y el sobrenadante se utiliza para el análisis en el equipo de HPLC. La cantidad de muestra mínima inyectada es de 50 μl para tener la seguridad de llenar el loop de 20 μl .

En cada experimento se prepara un blanco y una curva de calibración de estándares (0; 20; 40; 50; 60; 80 y 100 μM), un ejemplo de estas curvas se muestra en la figura XII. El área del pico obtenido es directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra, que se calcula por intrapolación en la recta de regresión obtenida con los estándares.

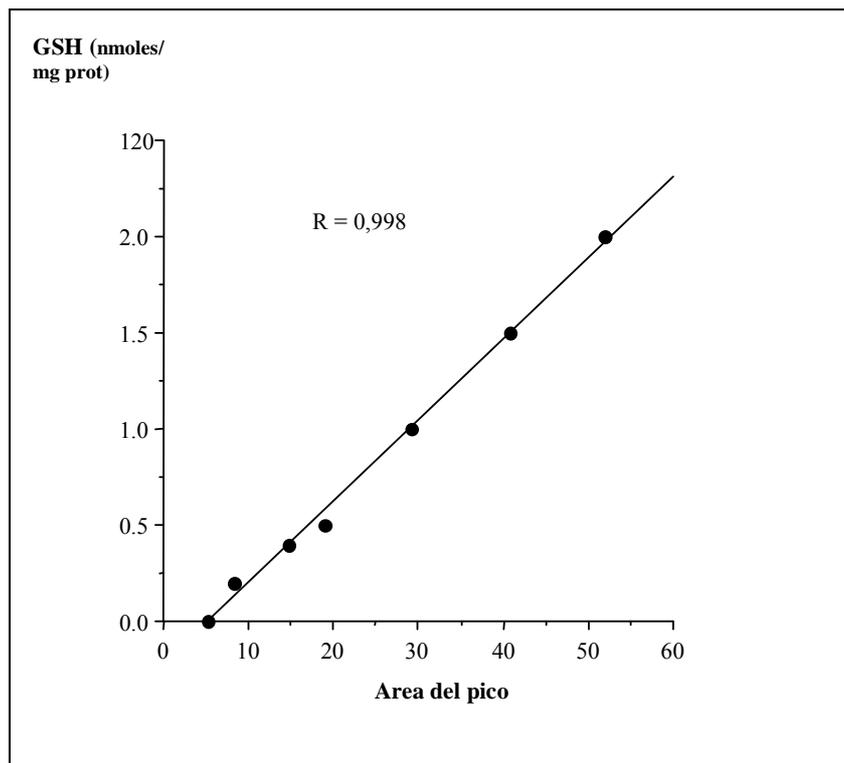


Figura 12. Curva patrón de GSH obtenida mediante HPLC.

6. PROCEDIMIENTOS ELECTROFISIOLÓGICOS.

6.1. ELECTRORRETINOGRAMA

El electrórretinograma se realiza a ratones que son anestesiados con ketamina (100 mg/ kg peso) y azepromazina (2,5 mg/ kg peso) y que previamente se habían adaptado a la oscuridad (un mínimo de 12 h previas a la anestesia). La prueba se realiza en condiciones escotópicas. Una vez anestesiados los animales se colocan en un inmovilizador y se les administra colirio anestésico y midriático. Los electrodos y la piel se limpian con alcohol y se añade suero fisiológico para disminuir la resistencia. Se tapa el ojo contralateral. El electrodo de medida es una lámina de oro en forma de gancho que se coloca en contacto con la córnea del ratón. El electrodo de tierra se coloca en la cola del ratón y el electrodo de referencia en la piel del animal a la altura del cuello.

Esperamos 2 ó 3 minutos para realizar el electrórretinograma del ojo contralateral.

Los estímulos empleados son pulsos monocromáticos de 4 segundos de duración (average 4; range 100 intensidad 1 (0,06 x 22 lumen sec/ft²). Se utiliza un filtro azul. El tiempo de registro es de 100 ms. Se dan un promedio de 4 estímulos. El ancho de banda del preamplificador se establece en 3-50 Hz con un rango de 100µV y los registros se recogen automáticamente en un equipo informático MacLab (Castle Hill, Australia)

- Pulsos monocromáticos de 3mS
- Tiempo de registro de 20ms
- Promedio de 2 estímulos
- Ancho de banda del preamplificador 0'3-1Hz

7. ESTUDIOS HISTOQUÍMICOS.

7.1. FIJACIÓN Y CORTE DE LOS OJOS.

Los ojos se fijan y se cortan mediante criostato tal y como se explica en el apartado 4.2.

7.2. TINCIÓN DE LOS CORTES.

7.2.1. Tinción con Hematoxilina-Eosina.

La tinción con hematoxilina-eosina se realiza de la siguiente forma:

1. Hematoxilina de Harris (15 min)
2. 2 lavados con agua corriente (5 min)
3. Alcohol Clorhídrico (3 seg)
4. 2 baños con agua corriente (5 min)
5. Eosina-Floxina (3 min)
6. Alcohol de 96° (lavar) (3 seg)
7. Alcohol de 96° (2 min)
8. Alcohol de 100° (2 min)
9. 2 baños con Xilol (3 seg)
10. Montaje con medio sintético ("Eukit", Entellan").

7.2.2. Tinción Bcl-2.

Se realiza como detallamos a continuación:

- 1) Lavar 10 min con PBS (hidratación). Secado de las laminillas al aire.
- 2) Fijar las secciones con acetona y transferir al buffer.
- 3) Procedimiento de tinción.

Utilizamos el kit *VECTOR*. Las secciones de tejidos se someten a los siguientes tratamientos:

- Bloqueo de la peroxidasa endógena. Se procede a tratar el tejido en un baño de una solución de 3% peróxido de hidrógeno en 10% de metanol durante 10-30 min. Lavar 5 min con PBS y colocarlas en un baño con tampón fresco.
- Lavar con PBS durante 5 minutos.
- El anticuerpo *bcl-2* (DAKO, Denmark) se utiliza a una dilución de 1:10, incubar durante 20 minutos (aplicar suficiente anticuerpo primario o control negativo para cubrir la muestra). Como diluyente de anticuerpo utilizamos PBS t (PBS + 0,05% tween 20 que evita las reacciones inespecíficas antígeno-anticuerpo).
- Lavar 5 minutos con PBS y colocarlas en un baño de tampón fresco.
- Incubar las secciones de tejido con Inmunoglobulina anti-ratón biotinilada durante 20-60 minutos. Aplicar suficientes gotas para cubrir la muestra. Lavar 5 minutos con PBS y colocarlas en un baño de tampón fresco.

- ❑ Incubar con el complejo Avidina-biotina durante 20 min. Aplicar suficientes gotas para cubrir la muestra. Lavar 10 min con PBS y colocarlas en un baño de tampón fresco.
- ❑ La reacción se visualiza con 0,05% diaminobenzidina y 0,01% de peróxido de hidrógeno. Aplicar suficiente preparado de la solución cromógena para cubrir la muestra e incubar durante 10 min. Lavar 10 min con PBS y colocarlas en un baño de tampón fresco. Algunas secciones son incubadas sin el anticuerpo primario y así utilizadas como control negativo.
- ❑ Colocar sobre la muestra una gota de glicerol (realizar una dilución 1/2) cubrir con cubreobjetos y presionar.
- ❑ Analizar al microscopio (máximo aumento).

7.2.3. Protocolo de valoración de anatomía patológica.

El análisis de microscopia óptica de las muestras se efectuó con un microscopio Leika CTR-5000. Las fotografías se tomaron con una cámara fotográfica digital Olympus OM101 acoplada al microscopio.

7.2.4. Tinción TUNEL.

La muerte celular programada se conoce como apoptosis y consiste en la condensación del citoplasma, pérdida de la membrana plasmática y condensación y fragmentación del núcleo, con la consecuente degradación del DNA cromosómico en oligómeros de 180bp.

El método TUNEL (TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling) fue desarrollado por Gavrieli. Este método permite la visualización in situ del DNA celular fragmentado y es más sensible que las técnicas morfológicas convencionales (Gavrieli et al, 1992).

Para realizar esta técnica se ha utilizado el kit de detección directa de apoptosis MEBSTAIN. Su principal ventaja es que se trata de un método rápido y sencillo que utiliza una molécula fluorescente de dUTP para unirse al DNA fragmentado.

- BASE DEL MÉTODO

En las células apoptóticas la cromatina del DNA es cortada mediante endonucleasas en las zonas de unión del DNA entre nucleosomas, dando lugar a fragmentos de DNA multímeros de unidades nucleosomales.

El segmento final 3'-OH DNA generado por la fragmentación se une a la molécula dUTP fluorescente, por medio del terminal deoxinucleotidil transferasa (TdT). Este método permite una tinción específica.

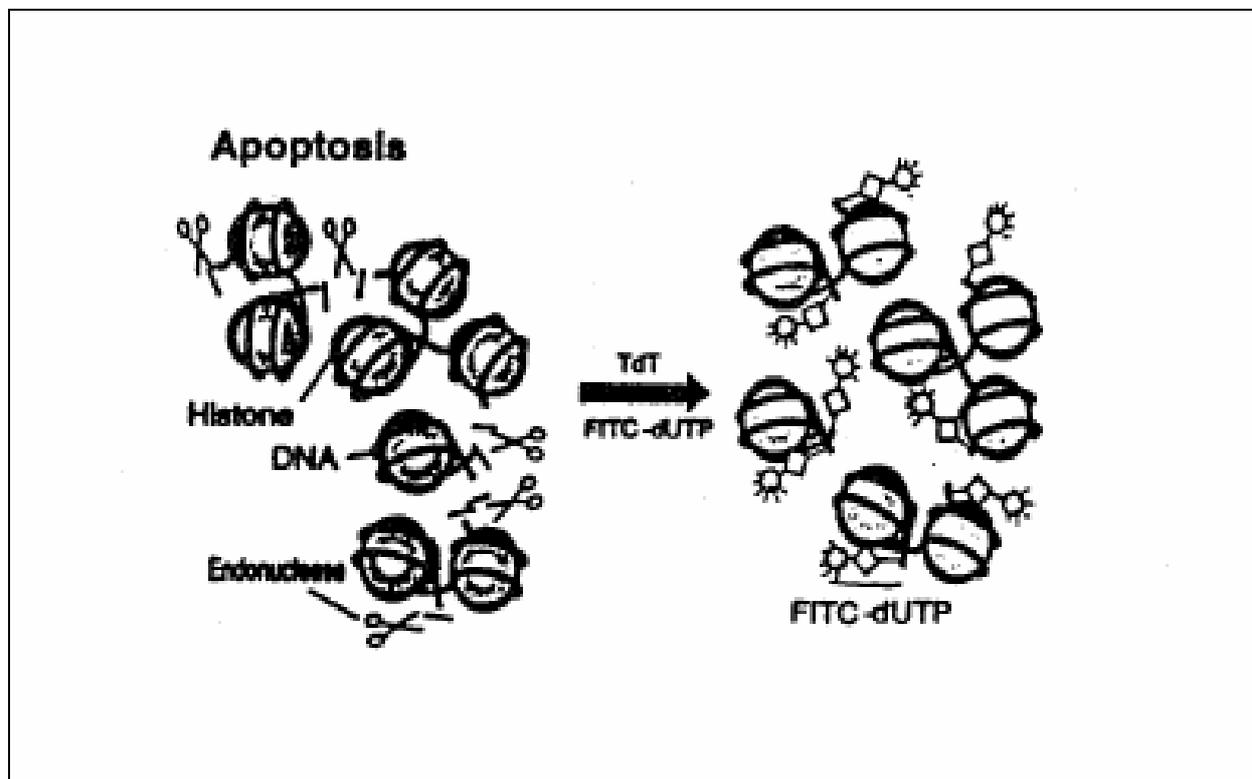


Figura 13. Método TUNEL de detección de apoptosis.

o MATERIAL

Cada kit contiene:

Materiales	Cantidad
Proteinasa K (PK)	0'4 ml x vial
TdT	0'1 ml x vial
TdT buffer II	2 ml x 3 viales
FITC-dUTP	0'1 ml x vial
TB buffer (x10)	50 ml x vial

Otros materiales:

- xileno
- etanol 100%, 90% y 80%
- PBS
- medio de montaje : glicerina 90%, PBS 10%
- agua destilada
- cámara húmeda
- propidium iodide (0'5micrg/ml)
- paraformaldehido buffer

○ ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

Los componentes de cada kit deben ser almacenados a -20°C. Tras descongelar el buffer TB, se almacena a 4°C.

○ PROTOCOLO PARA INMUNOHISTOQUÍMIA

a. Preparación de los reactantes:

1. Solución de proteinasa K. Se diluye la solución de PK 1:24 con PBS y mantener a 37°C.

2. Solución de TdT. Se mezcla el buffer TdT II, FITC-dUTP y TdT a la proporción 18:1:1 en el hielo, de la siguiente forma:

45 µl TdT buffer II + 2.5 µl FITC-dUTP + 2.5 µl TdT

3. Solución de TB. Se diluye el buffer TB (x10) con agua destilada a la proporción 9:1.

4. Buffer de paraformaldehído. Se prepara 4% de paraformaldehído en 0'1M NaH_2PO_4 , a pH 7.4 (4% PFA).

5. Propidium iodide. Se diluye con PBS hasta conseguir una concentración de 0'5 $\mu\text{g/ml}$.

b. Preparación de las secciones de tejido:

1. Lavar los cristales con PBS durante 5 minutos. No dejar que se sequen y pasar directamente a marcar el DNA.

2. Marcación del DNA.

- se pipetea 50 μl del buffer TdT II y se colocan sobre el tejido. Se incuba durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.

- se elimina el buffer TdT II, se pipetea 50 μl de la solución TdT y se incuba a 37° durante 60 min.

- eliminar la solución TdT y sumergir el cristal en la solución TB en un vaso de Coplin. Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente.

- lavar el cristal con PBS durante 5 minutos, 3 veces.

- se contrasta con yodo propidio al 0'5 μml

3. Montaje y microscopia.

- montar sobre el medio de montaje
- ver bajo microscopia de fluorescencia

7.2.5. Tinción TUNEL con biotina (técnica de peroxidasa).

Para realizar la tinción TUNEL con biotina se utiliza el kit de detección de apoptosis in situ ApopTag® comercializado por Chemicon Internacional, Alemania. Las roturas en la cadena de DNA se detectan mediante la unión enzimática a los terminales 3'-OH de los nucleótidos modificados. Estas terminaciones de DNA generadas a partir de su fragmentación se identifican morfológicamente en los núcleos y cuerpos celulares apoptóticos. El kit ApopTag® permite detectar roturas de las cadenas simples y dobles asociadas con la apoptosis. Además, permite detectar estadios precoces de la apoptosis, con cromatina condensada y pocas roturas en las cadenas del DNA, incluso antes de que el núcleo sufra cambios morfológicos mayores. Las células apoptóticas positivas para la tinción con ApopTag® son más sencillas de detectar y su identificación es más fiable en comparación con la tinción histoquímica simple.

○ BASE DEL MÉTODO.

Los reactivos que proporciona el kit ApopTag® peroxidasa están diseñados para unirse in situ a las terminaciones 3'OH libres del DNA unido o no químicamente a los nucleótidos. Los nucleótidos que provienen en el kit se unen enzimáticamente al DNA a través de la deoxinucleotidil transferasa Terminal (TdT). Los nucleótidos incorporados

forman un oligomero compuesto por un nucleótido conjugado con digoxigenina y un nucleótido no conjugado en una secuencia randomizada. Los fragmentos de DNA que se han unido al nucleótido-digoxigenina son capaces de unirse a un anticuerpo anti-digoxigenina que se conjuga mediante una molécula de peroxidasa. La unión de este anticuerpo conjugado con peroxidasa genera una tinción permanente, intensa y localizada de los sustratos derivados de la cromatina, que permite una detección muy sensible tanto inmnohistoquímica como inmunocitoquímicamente.

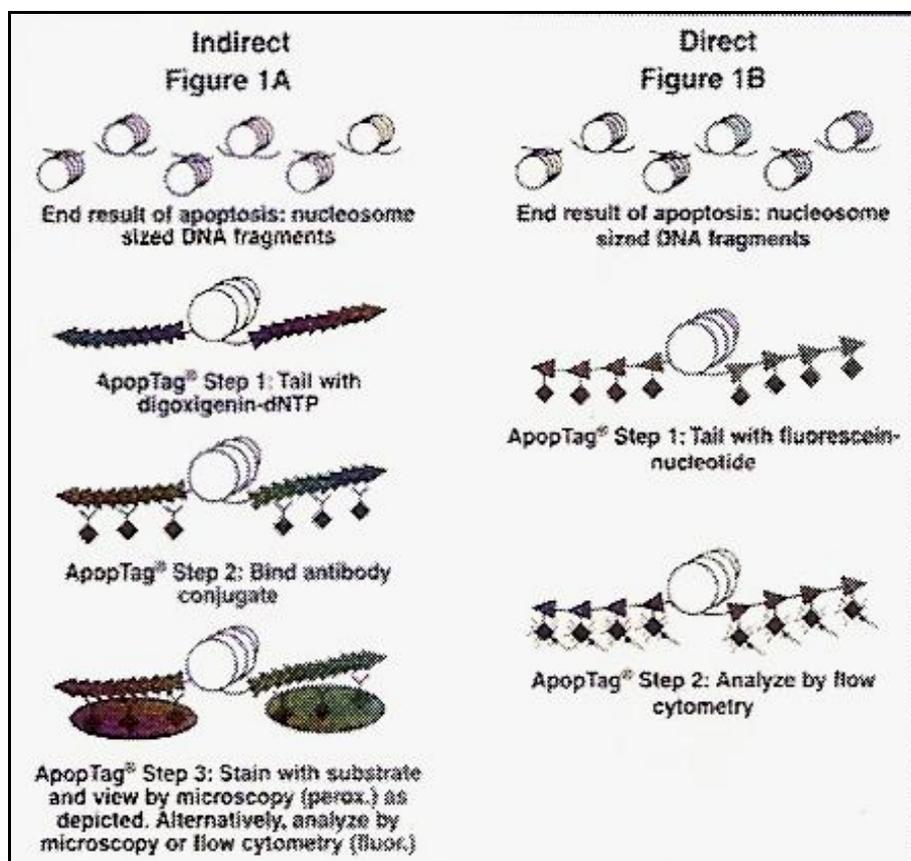


Figura 14. Método de detección de apoptosis mediante el kit ApopTag® peroxidasa.

El sistema digoxigenina/anti-digoxigenina ha demostrado ser igual de sensible a los sistemas de determinación avidina/biotina. La única fuente natural de digoxigenina son las plantas con tallo. En los tejidos animales los ligandos inmunohistoquímicamente similares aptos para unirse a los anticuerpos anti-digoxigenina son insignificantes, por lo tanto la tinción con esta técnica es muy sensible.

- MATERIAL

Contenido del kit:

- Cacodilato posbásico (ácido dimetil-larsínico) como buffer
- Sustrato DAB (3,3' diaminobenzidina)
- Anticuerpos conjugados
- Enzima TdT con glicerol

- ALMACENAJE Y ESTABILIDAD

Almacenar el kit a una temperatura de -15 a -25°C.

- PROTOCOLO PARA INMUNOHISTOQUIMIA

a. Preparación de las muestras de tejido obtenidas mediante crio-sección.

1. Lavar en PBS durante 5 minutos dos veces

b. Incluir la peroxidasa endógena

1. Incluir en peróxido de hidrógeno al 3% y PBS durante 5 minutos a temperatura ambiente

2. Lavar dos veces con PBS durante 5 minutos cada vez.

c. Aplicar el buffer de equilibrio

1. Eliminar el exceso de líquido

2. Aplicar 75 $\mu\text{l}/5\text{cm}^2$ de buffer en la muestra

3. Incubar 10 segundos a temperatura ambiente

d. Aplicar la enzima TdT

1. Eliminar el exceso de líquido

2. Añadir sobre la muestra 55 $\mu\text{l}/5\text{cm}^2$ del enzima TdT

3. Incubar en cámara húmeda a 37°C durante 1 hora.

e. Añadir el buffer "stop/wash"

1. Aplicar a la muestra el buffer "stop/wash", agitar durante 15 segundos e incubar durante 10 minutos a temperatura ambiente.

f. Añadir el conjugado anti-digoxigenina.

1. Lavar la muestra con PBS 3 veces durante 1 minuto cada vez

2. Aplicar el conjugado anti-digoxigenina a temperatura ambiente sobre la muestra cubriendo toda su superficie

3. Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente durante 30 minutos

g. Desarrollar el color mediante el sustrato de peroxidasa

1. Lavar las muestras en PBS 4 veces durante 2 minutos cada vez
2. Añadir el sustrato de peroxidasa de forma que cubra la muestra
3. Teñir durante 3-6 minutos a temperatura ambiente sin cámara húmeda
4. Para controlar el color de la tinción, monitorizar bajo microscopio

h. Contrarrestar la tinción del tejido

1. Lavar la muestra con dH₂O 3 veces durante 1 minuto cada vez
2. Incubar en dH₂O durante 5 minutos a temperatura ambiente
3. Contrarrestar la tinción mediante hematoxilina durante 30 segundos.
4. Lavar la muestra con dH₂O 3 veces, durante 10 minutos los dos primeros lavados, y durante 30 segundos en el tercero. Agitar a continuación.

5. Lavar la muestra 3 veces en N-butanol al 10%, de la misma forma que en el lavado previo.

i. Montaje de las muestras y visión al microscopio

1. Deshidratar las muestras mediante Xileno
2. Drenar el exceso de líquido sin dejar que se seque
3. Montar en un medio de montaje (p.e permount)
4. Ver al microscopio

7.2.6. Tinción con AVIDINA.

- BASE DEL MÉTODO.

La 8-oxoguanina es un marcador sensible del daño en el DNA causado por los radicales libres de oxígeno. Esta molécula presenta una capacidad mutagénica y carcinogénica demostradas, pero además está implicada en otras patologías en las que el estrés oxidativo tiene un papel destacado. Los métodos de detección de la 8-oxoguanina mediante el análisis de su deoxinucleósido, 8-oxo-deoxiguanosina, en el DNA, son múltiples y presentan ciertas discrepancias en cuanto a resultados finales.

La avidina es un factor natural presente en la clara del huevo y que presenta una alta afinidad por la vitamina biotina, que es incluso mayor que la de los anticuerpos y sus epitopos. La avidina es una molécula ampliamente utilizada tanto en la investigación como en la tecnología primaria como un método de detección y amplificación. Por ejemplo, en el inmunoanálisis se utiliza como marcador de moléculas biotinadas previamente. Además, se ha demostrado su capacidad para unirse a las células en fase de necrosis.

La avidina y sus conjugados son capaces de unirse directamente y de forma específica a los núcleos dañados como consecuencia del estrés oxidativo, ya que los nucleósidos 8-deoxiguanina y 8-deoxiguanosina formados como consecuencia del daño oxidativo sobre el DNA presentan una estructura muy similar a la biotina (Struthers L et al, 1998).

○ PROTOCOLO DE INMUNOHISTOQUIMIA

1. Lavado de las muestras durante 5 minutos con PBS.
2. Se incuban las muestras con 20µg/ml de proteinkinasa k y PBS durante 20 minutos
3. Lavar las muestras con PBS e incubar durante toda la noche con el anticuerpo primario a 4°C. (1:200)
4. Lavado de las muestras con PBS
5. Incubar las muestras a temperatura ambiente durante 45 minutos con el anticuerpo anti-goat IgG conjugado con FTIC (1:200) (Sigma-Aldrich Inc., St Louis, USA) y con avidina conjugada con rojo texas (1:200) (Molecular Probes Inc, Eugene, USA)

8. ESTUDIO ESTADISTICO

8.1. ANÁLISIS DESCRIPTIVO

El **Análisis Descriptivo** (Tablas) inicial contiene los estadísticos básicos de las variables continuas y ordinales: media, desviación estándar, mínimo, máximo y mediana; así como frecuencias y porcentajes para las categóricas (sólo el grupo). Las tablas se desagregan por el factor de clasificación de las unidades experimentales, esto es, el grupo.

La medida de tendencia central utilizada fue la media aritmética, que se define como la suma de los datos dividida por el número de casos.

$$\bar{0} = \frac{\sum X}{N}$$

x = valor obtenido

N = número de casos

La medida de dispersión de los datos utilizada fue el error estándar de la muestra, definido como:

$$DE = \frac{\sqrt{\frac{\sum (x - 0)^2}{N - 1}}}{N}$$

x = valor obtenido

0 = media

N = número de casos

8.2. ANÁLISIS BIVARIANTE.

El **Análisis Bivariante** engloba todos los contrastes estadísticos necesarios para evaluar la efectividad del ácido lipoico comparando los resultados entre todos los grupos definidos. Dichos contrastes se realizan mediante técnicas estadísticas no paramétricas de acuerdo al tamaño muestral del que se dispone en los distintos niveles de la variable grupo.

- **Prueba de Kruskal-Wallis:** Para determinar si las variables de análisis se ajustan o no a una distribución normal.

- **Prueba de Wilcoxon:** Se ha utilizado para contrastar la homogeneidad de distribuciones en dos muestras relacionadas. En concreto, para contrastar si la distribución del peso o la glucemia es la misma al principio y final del experimento.

- **Prueba de Kruskal-Wallis para varias muestras independientes:** Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en más de dos muestras independientes. Por ejemplo, para analizar si el GSH difiere según el grupo al que pertenece el animal.

- **Prueba de Mann-Whitney para dos muestras independientes:** Se utiliza para contrastar si la distribución de un parámetro, cuando menos ordinal, es o no la misma en dos muestras independientes. Por ejemplo, para contrastar si el GSH difiere entre dos grupos concretos.

El *nivel de significatividad* empleado en todos los análisis bivariantes ha sido el 5% ($p=0.05$)¹. Las relaciones estadísticamente significativas se visualizan en los gráficos más adecuados para su interpretación.

¹Cualquier p-valor menor a 0.05 es indicativo de una relación estadísticamente significativa. Por contra, un p-valor mayor o igual a 0.05 indica ausencia de relación.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LAS VARIABLES DESCRIPTIVAS.

1.1. ESTUDIO DEL PESO.

Tras 13 días de diabetes vemos una tendencia a mantener el peso de los ratones diabéticos sin tratamiento respecto a los ratones control, que se mantiene a lo largo de todo el experimento. Se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la variación de peso entre el grupo de ratones diabéticos y el resto de grupos, tanto controles como diabéticos con tratamiento, así como en el peso final de los ratones diabéticos no tratados respecto al resto de grupos.

El grupo de ratones diabéticos tratados con insulina, AL o ambos, muestran un aumento de peso progresivo durante todo el experimento hasta llegar a valores similares o incluso superiores a los controles. La subida media de peso en los ratones control fue del 5'5% mientras que en los grupos de ratones diabéticos tratados el aumento medio de peso fue de entre el 18'5 y el 26'7%, siendo el grupo tratado con ácido lipoico el que sufrió el mayor aumento de peso. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el peso final entre estos grupos y el grupo control.

Tabla 5. Valores medios de pesos de los diferentes grupos estudiados durante el experimento.

		Día 1	Día 13	Día 21
Grupo	n	Media ± DE	Media ± DE	Media ± DE
Control	13	32,1±2	33,6±2,1	33,6±2,1
Control+AL	13	33,20±2,40	34,63±3'8	35±3,80
Diabetes	13	27,52±2,3	27,59±2,60	27,5±3,3
Diabetes+Insulina	13	26,64±2,31	31,13±2,3	32,43±2,7
Diabetes+AL	13	27,60±2,3	34,20±3,54	34,50±3,14
Diabetes+Insulina+AL	13	30±2,91	34,9±1,23	35,22±1,84

Tabla 6. Variación del peso final-inicial (%) según grupo.

Grupo	Media±DE
Control	5'4±7'7
Control+AL	5±8'3
Diabetes	-0'2±9
Diabetes+Insulina	23'4±13
Diabetes+AL	26'7±16'1
Diabetes+Insulina+AL	18'5±13'5

Figura 15. Diagrama de barras de los valores medios de pesos de los diferentes grupos en cada momento del estudio.

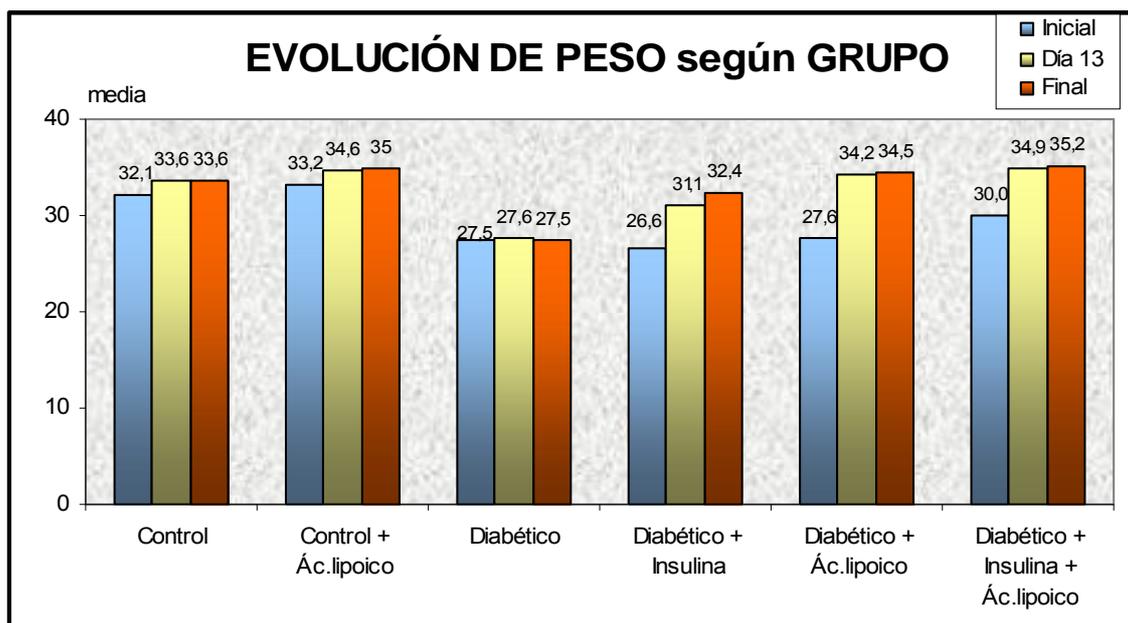


Figura 16. Gráfico de promedio de variación de peso de los distintos grupos.

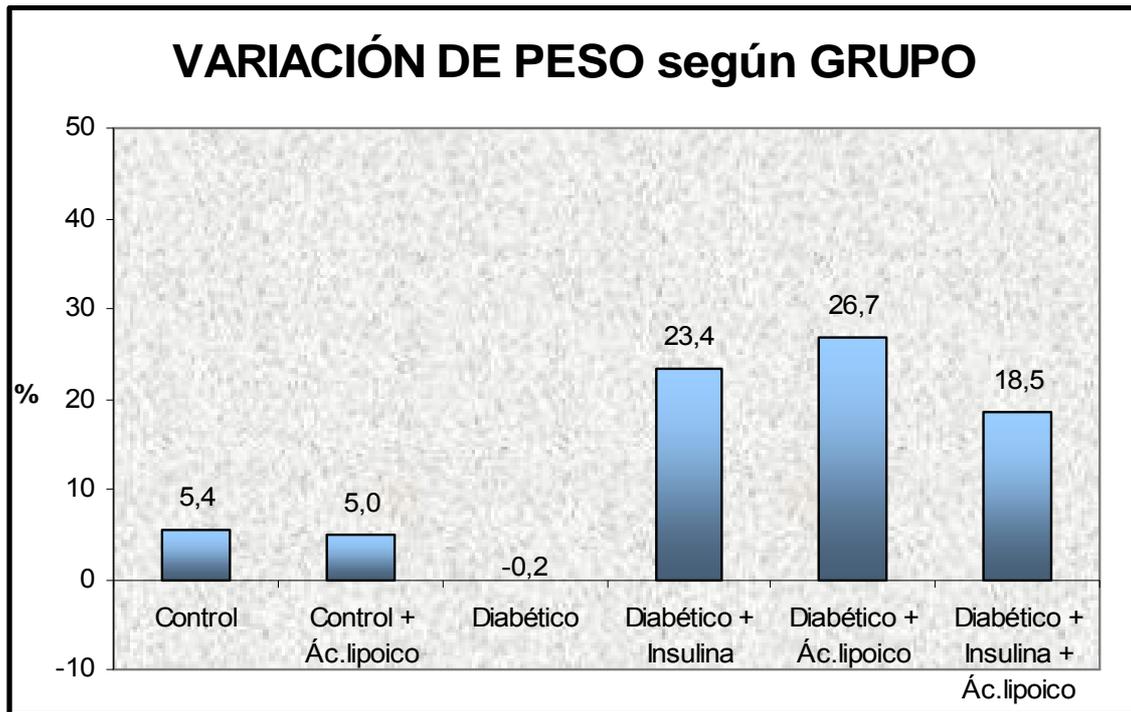


Tabla 7. Estudio estadístico de la distribución de variación de peso según grupo.

	Control	Control+ ác.lipoico	Diabético	Diabético + insulina	Diabético + ác.lipoico	Diabético + insulina + ác.lipoico
Control		0,97 (MW)	0,301(MW)	0,001(MW)	0,004(MW)	0,02(MW)
Control+ ác.lipoico			0,247(MW)	<0,001(MW)	0,001 (MW)	0,002(MW)
Diabético				<0,001(MW)	<0,001(MW)	<0,001(MW)
Diabético+ insulina					0,582 (MW)	0,152 (MW)
Diabético+ ác.lipoico						0,186 (MW)
Diabético + insulina + ác.lipoico						

Tabla 8. Estudio estadístico del peso al final del experimento según grupo.

	Control	Control+ ác.lipoico	Diabético	Diabético + insulina	Diabético + ác.lipoico	Diabético + insulina + ác.lipoico
Control		0,153 (MW)	<0,001(MW)	0,243(MW)	0,113(MW)	0,223(MW)
Control+ ác.lipoico			<0,001(MW)	0,014(MW)	0,614 (MW)	0,999(MW)
Diabético				0,001(MW)	<0,001(MW)	<0,001(MW)
Diabético + insulina					0,113 (MW)	0,001(MW)
Diabético + ác.lipoico						0,724 (MW)
Diabético + insulina + ác.lipoico						

2. ESTUDIO DEL PLASMA.

2.1. ESTUDIO DEL % DE HEMOGLOBINA GLICOSILADA EN SANGRE.

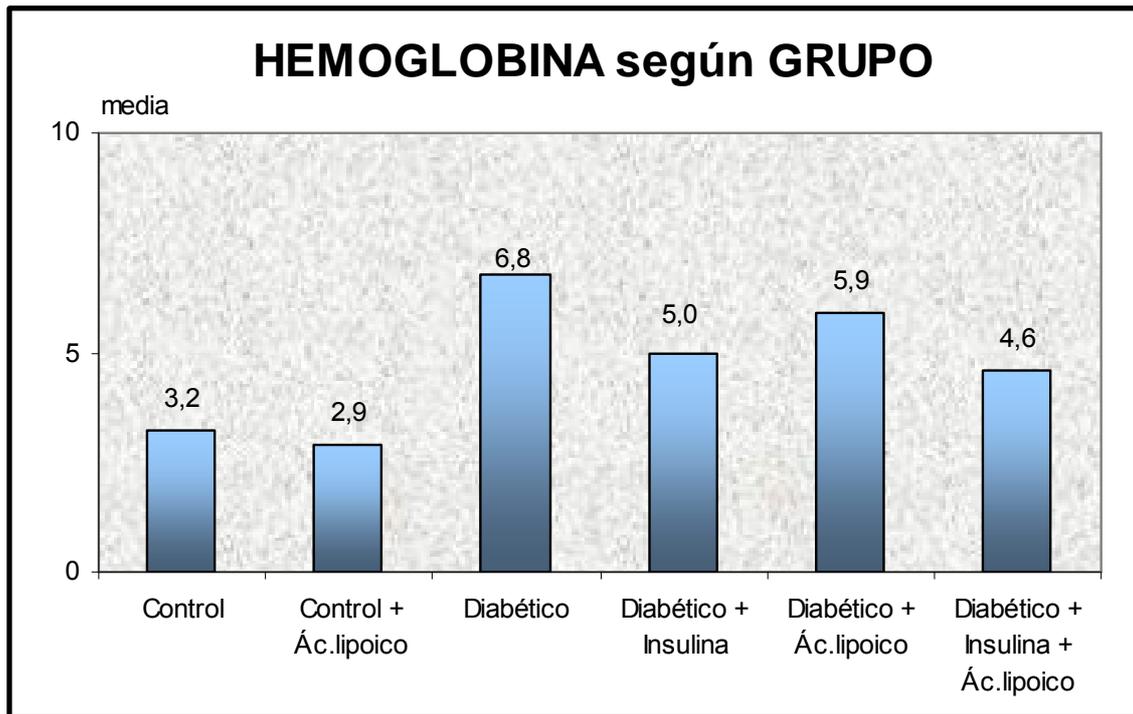
El valor de la HbA1c en el grupo de ratones diabéticos, independientemente del tratamiento o no, fue significativamente mayor que en el grupo de ratones control. El tratamiento con ácido lipoico no afectó de manera significativa a los niveles de HbA1c en los ratones diabéticos, siendo ésta estadísticamente significativa respecto a la de los animales control.

No se observan diferencias estadísticamente entre los grupos de ratones diabéticos tratados independientemente del tipo de tratamiento recibido, insulina y/o ácido lipoico.

Tabla 9. Niveles medios de HbA1c de los ratones de todos los grupos al finalizar el estudio.

Grupo	n	Media±DE
Control	18	3'2±0'5
Control+AL	18	2'9±0'4
Diabetes	16	6'8±1'7
Diabetes+Insulina	20	5±1'3
Diabetes+AL	17	5'9±0'6
Diabetes+Insulina+AL	20	4'6±1'2

Figura 17. Valores medios de la Hb1Ac según grupo al final del experimento.



2.2. ESTUDIO DE LAS GLUCEMIAS.

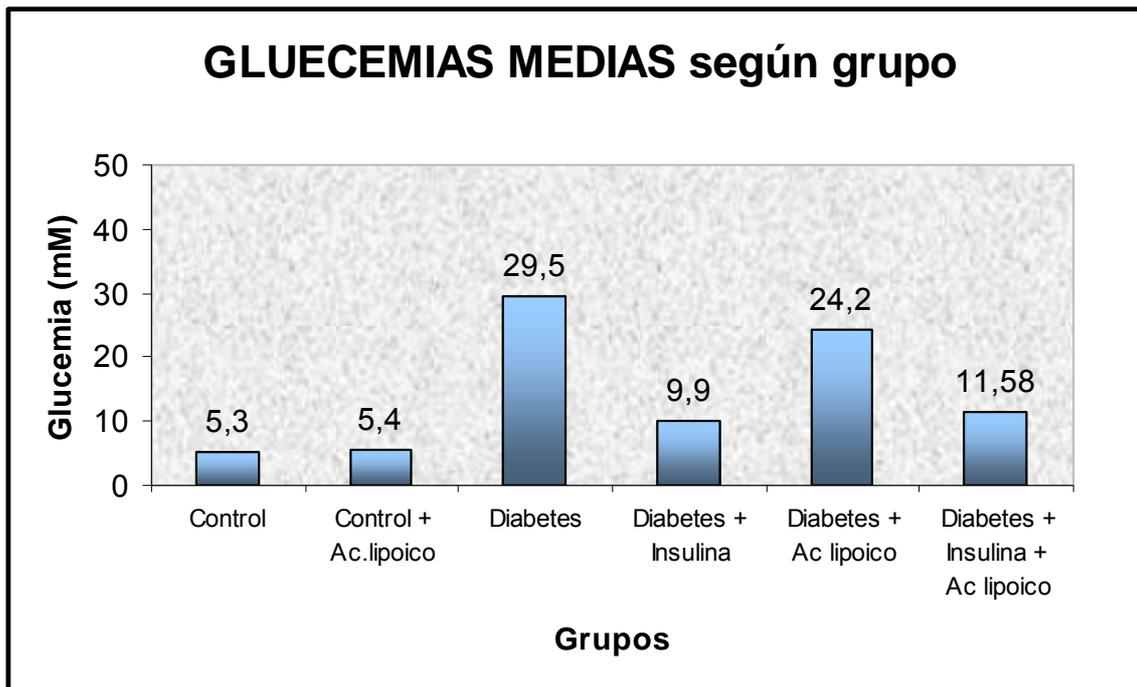
En el estudio de las glucemias medias se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratones diabéticos, independientemente del tipo de tratamiento aplicado, respecto al grupo control.

Se observa una disminución de la glucemia media de los grupos diabéticos tratados con insulina y/o ácido lipoico sin llegar a los niveles de los grupos control. El tratamiento con ácido lipoico produce un descenso en los niveles medios de glucemia mucho menor que el tratamiento con insulina.

Tabla 10. Valores medios de las glucemias tras 21 días de experimento en los seis grupos de estudio.

		Glucemia media (mM)
Grupo	n	Media \pm DE
Control	13	5.3 \pm 0.4
Control+AL	13	5.4 \pm 0.5
Diabetes	13	29.5 \pm 1.3 *
Diabetes+Insulina	13	9.9 \pm 1.2*
Diabetes+AL	13	24.2 \pm 1.3*
Diabetes+Insulina+AL	13	11.58 \pm 0.8*

Figura 18. Diagrama de barras de la glucemia media en cada grupo estudiado.



3. ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA RETINA.

3.1. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE MALONDIALDEHÍDO EN HOMOGENADO DE OJO.

El estudio de la concentración de MDA en el homogenado de ojo sin cristalino de los diferentes grupos estudiados, mostró diferencias estadísticamente significativas entre los ratones diabéticos sin tratamiento y los grupos control y diabéticos tratados con insulina y con insulina y ácido lipoico. No se observan diferencias estadísticamente significativas pero sí una tendencia a la significación en el grupo de ratones diabéticos tratados con ácido lipoico, debido al tamaño de la muestra (n). Por lo tanto, si aumentamos el tamaño muestral en este grupo posiblemente también existirían diferencias respecto a los diabéticos sin tratamiento.

Los niveles medios de MDA en los ratones diabéticos fueron muy superiores a los del grupo control, control + ácido lipoico, diabéticos tratados con / sin insulina \pm ácido lipoico, siendo entre estos grupos los niveles medios de MDA muy similares.

No se observan diferencias estadísticamente significativas en los valores de MDA entre los diferentes grupos de diabéticos independientemente del tipo de tratamiento.

Tabla 11. Niveles medios de concentración de MDA (nmol/mg proteínas) en los diferentes grupos estudiados.

Grupo	n	Media±DE
Control	8	0'51±0'17
Control+AL	9	0'35±0,2
Diabetes	9	1'33±0'72
Diabetes+Insulina	11	0'59±0'29
Diabetes+AL	5	0'62±0,34
Diabetes+Insulina+AL	10	0'59±0'32

Figura 19. Concentración media de MDA (nmol/mg proteínas) en el homogenado de ojo de todos los grupos estudiados.

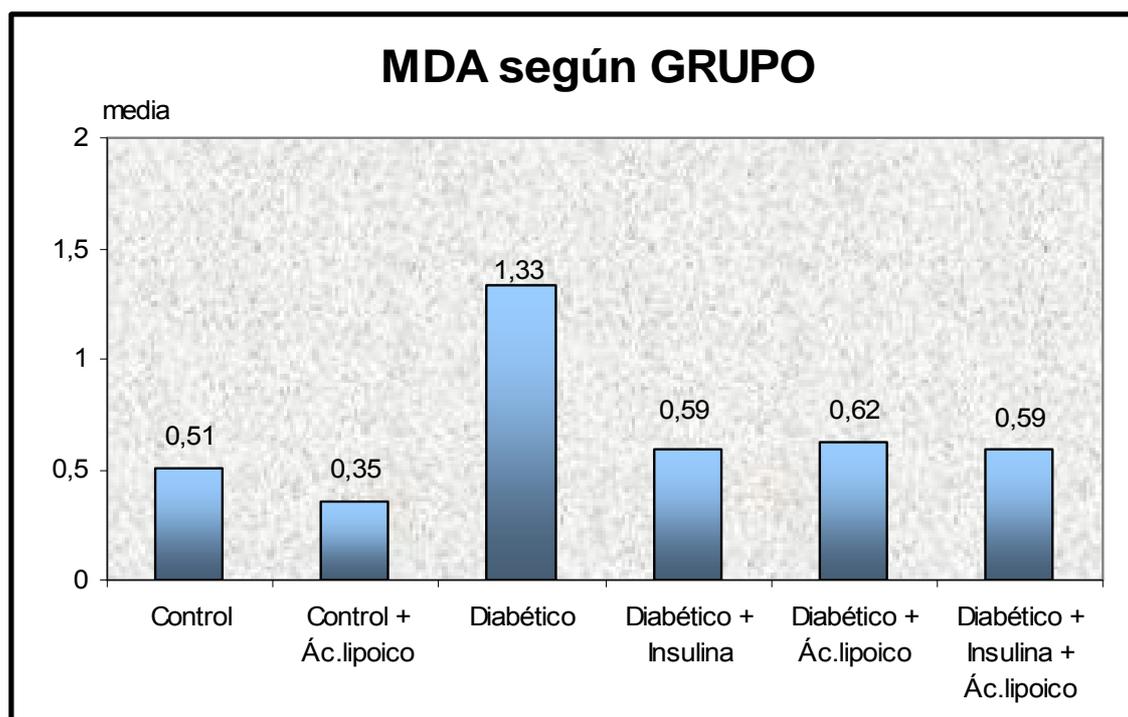


Tabla 12. Estudio estadístico de la concentración media de MDA (nmol/mg) en el homogenado de ojo en los diferentes grupos estudiados.

	Control	Control+ ác.lipoico	Diabético	Diabético+ insulina	Diabético+ ác.lipoico	Diabético+ insulina+ ác.lipoico
Control		0,093 (MW)	0,004(MW)	0,442(MW)	0,724(MW)	0,897(MW)
Control+ ác.lipoico			<0,001(MW)	0,056(MW)	0,147(MW)	0,211(MW)
Diabético				0,025(MW)	0,083(MW)	0,013(MW)
Diabético + insulina					0,913 (MW)	0,808 (MW)
Diabético+ ác.lipoico						0,859(MW)
Diabético +insulina+ ác.lipoico						

3.2. ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE GLUTATION EN EL HOMOGENADO DE OJO.

Se observa un descenso en los niveles de glutathione en el grupo de ratones diabéticos frente al grupo control tras tres semanas de experimento estadísticamente significativo. Así mismo, observamos cómo los niveles de glutathione se recuperan de forma significativa en los grupos diabetes + ácido lipoico, diabetes + inulina y diabetes + insulina + ácido lipoico respecto al grupo diabético sin tratamiento alguno.

No existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de glutathione de los grupos de diabéticos tratados frente a los grupos control.

Así mismo, no se existen diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos de diabéticos independientemente del tipo de tratamiento.

Tabla 16. Concentración media de los niveles de glutatión (nmol/mg proteínas) de todos los grupos estudiados.

Grupo	n	Media±DE
Control	8	20'57±5'49
Control+AL	11	18'3±5'29
Diabetes	10	13'43±4'82
Diabetes+Insulina	9	24,36±10'31
Diabetes+AL	7	24,58±8'84
Diabetes+Insulina+AL	5	24'66±10'48

Figura 20. Concentración media de GSH (nmol/mg proteínas) en el homogenado de ojo de todos los grupos estudiados.

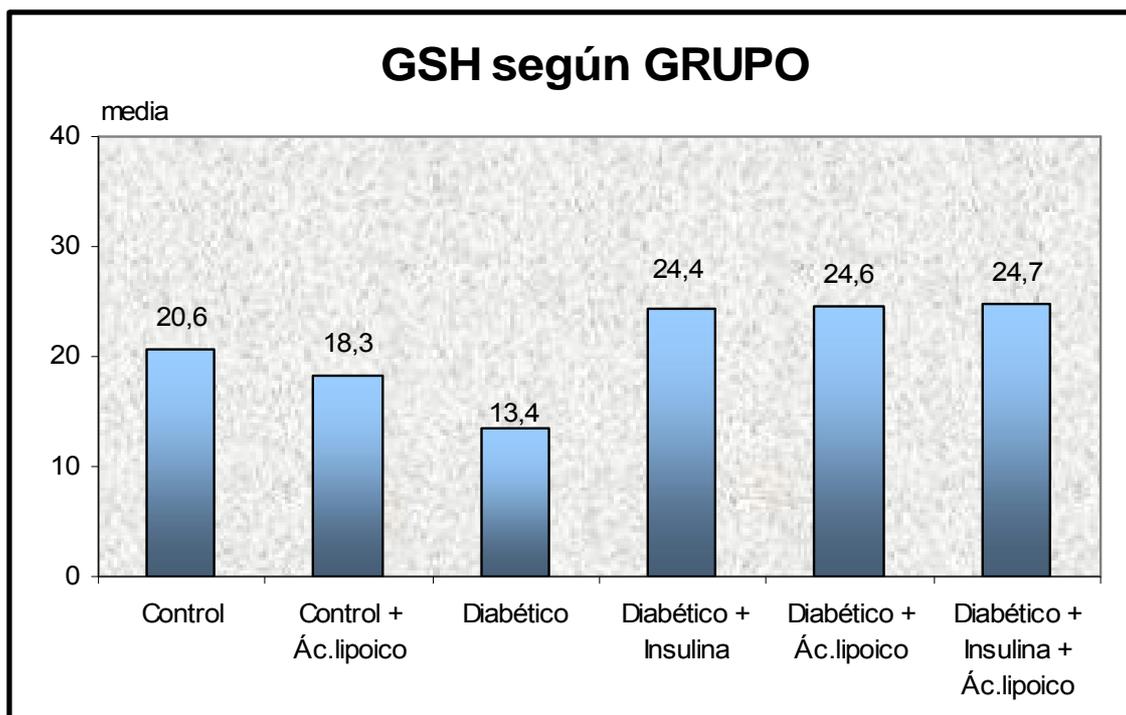


Tabla 14. Estudio estadístico de la concentración de GSH en los diferentes grupos.

	Control	Control+ ác.lipoico	Diabético	Diabético + insulina	Diabético + ác.lipoico	Diabético + insulina +ác.lipoico
Control		0,109 (MW)	0,003(MW)	0,743(MW)	0,463(MW)	0,833(MW)
Control+ ác.lipoico			0,043(MW)	0,231(MW)	0,151(MW)	0,145(MW)
Diabético				0,017(MW)	0,014(MW)	0,019(MW)
Diabético + insulina					0,837 (MW)	0,999 (MW)
Diabético + ác.lipoico						0,878(MW)
Diabético + insulina + ác.lipoico						

3.3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION PEROXIDASA EN EL HOMOGENADO DE OJO.

La determinación de la actividad de la glutatión peroxidasa (GPx), sistema de defensa frente a la peroxidación lipídica, mostró diferencias estadísticamente significativas entre el grupo diabético frente a los grupos control y diabetes tratados con insulina e insulina+ácido lipoico. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los ratones diabéticos y los ratones diabéticos tratados con ácido lipoico exclusivamente, aunque sí que los niveles medios de GPx en este grupo aumentan a niveles similares al resto de grupos tratados. Posiblemente sea el tamaño muestral el que influya en el resultado.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los grupos de diabetes independientemente del tipo de tratamiento, normalizándose la concentración media de glutatión peroxidasa en los grupos que reciben tratamiento.

Tabla 15. Valores medios de la actividad de la glutatión peroxidasa en el homogenado de ojo de los seis grupos estudiados.

Grupo	n	Media±DE
Control	5	126'08±33'4
Control+AL	4	126'19±33'96
Diabetes	4	76'08±16'48
Diabetes+Insulina	4	132'78±30'96
Diabetes+AL	4	111'59±33'39
Diabetes+Insulina+AL	4	106'07±16'2

Figura 21. Concentración media de la actividad de la GPx (nml/nmg proteínas/min) en los seis grupos estudiados.

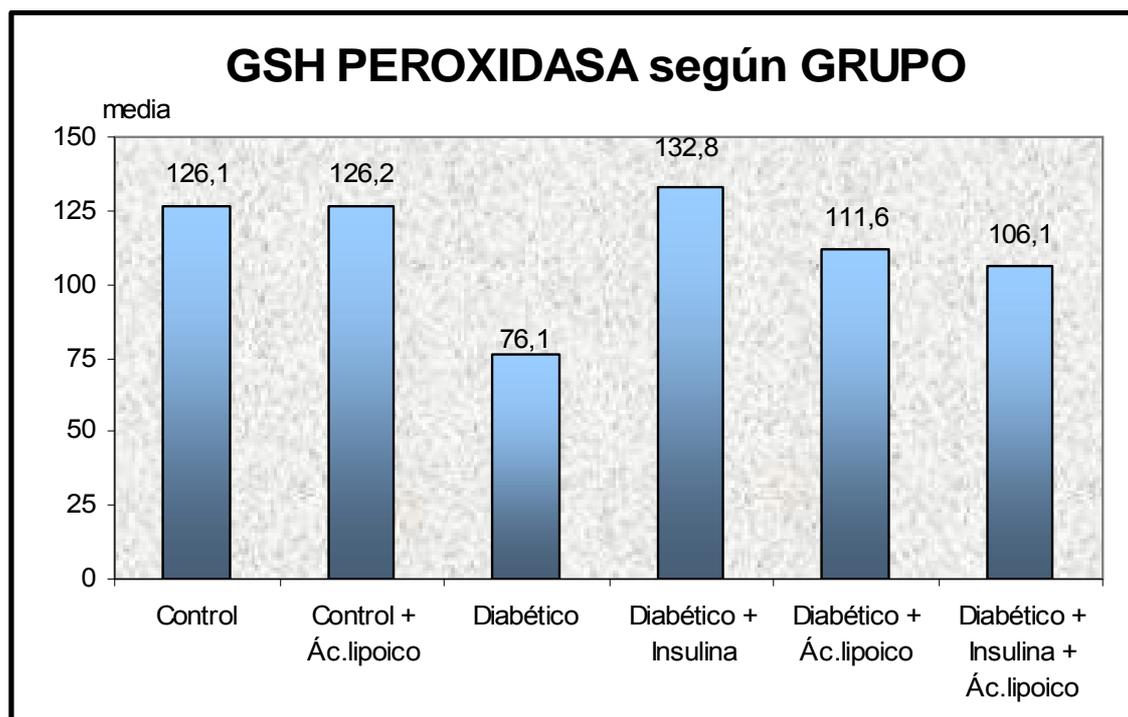


Tabla 16. Estudio estadístico de la actividad de la GSH peroxidasa en el homogenado de ojo en lo grupos estudiados.

	Control	Control+ ác.lipoico	Diabético	Diabético+ insulina	Diabético+ ác.lipoico	Diabético+ insulina+ ác.lipoico
Control		0,905 (MW)	0,016(MW)	0,905(MW)	0,413(MW)	0,413(MW)
Control+ ác.lipoico			0,029(MW)	0,886(MW)	0,486(MW)	0,686(MW)
Diabético				0,029(MW)	0,343(MW)	0,029(MW)
Diabético + insulina					0,343(MW)	0,114(MW)
Diabético + ác.lipoico						0,999(MW)
Diabético + insulina + ác.lipoico						

4. ESTUDIO ELECTROFISIOLÓGICO DE LA RETINA: EL ELECTORRETINOGRAMA.

La amplitud de la onda b del electrorretinograma se muestra disminuida en el grupo diabético versus el grupo control con y sin tratamiento y frente a los grupos diabéticos tratados con insulina y/o ácido lipoico de forma estadísticamente significativa.

El tratamiento con insulina, así como el tratamiento con ácido lipoico recupera los valores de la onda b hasta casi los niveles control, siendo estadísticamente significativos frente al grupo diabético. No existen diferencias estadísticamente significativas entre los ratones diabéticos independientemente del tipo de tratamiento que reciben.

En la tabla 17 se muestran las amplitudes de la onda b del electrorretinograma en cada grupo estudiado, así como su desviación media.

Tabla 17. Amplitud de la onda b del electroretinograma (mv) de los ratones de los seis grupos estudiados.

Grupo	n	Media±DE
Control	21	93'7±20
Control+AL	13	88'7±28'6
Diabetes	13	35'4±20
Diabetes+Insulina	26	83'2±24
Diabetes+AL	13	72'6±23
Diabetes+Insulina+AL	20	81'2±22'6

Figura 22. Valores medios de la amplitud de la onda b (mv) en los seis grupos estudiados.

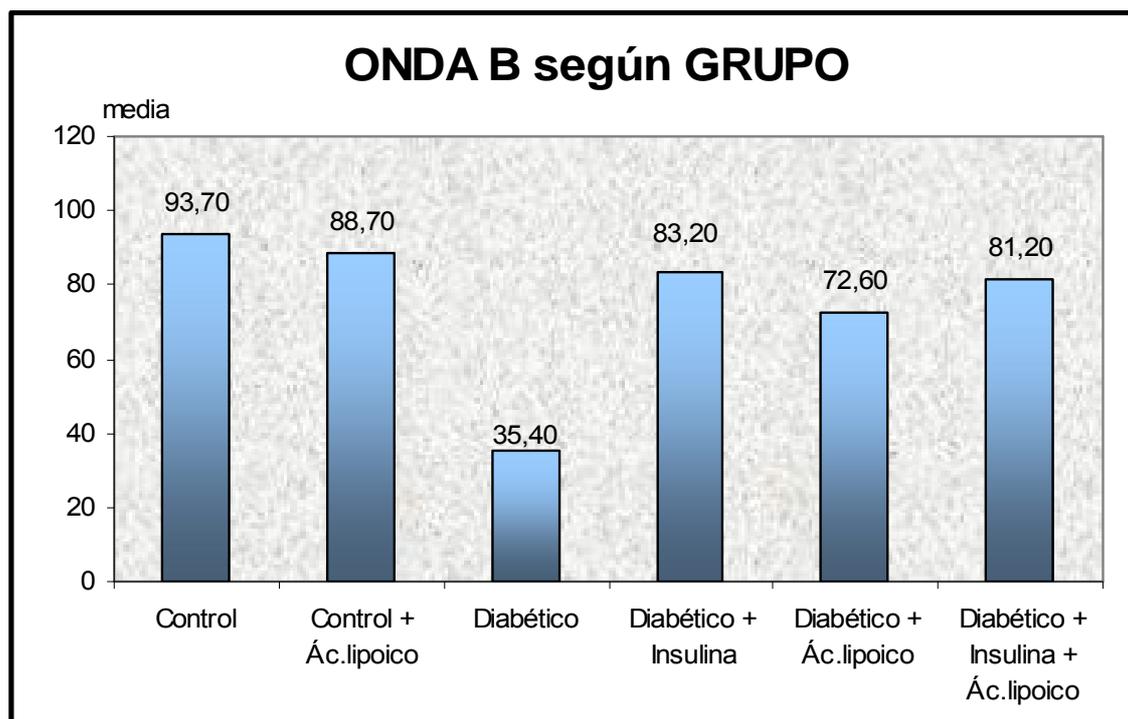


Tabla 18. Estudio estadístico de la amplitud de la onda b en los seis grupos estudiados.

	Control	Control+ ác.lipoico	Diabético	Diabético + insulina	Diabético + ác.lipoico	Diabético + insulina + ác.lipoico
Control		0,441 (MW)	<0,001(MW)	0,369(MW)	0,008(MW)	0,072(MW)
Control+ ác.lipoico			<0,001(MW)	0,566(MW)	0,169(MW)	0,456(MW)
Diabético				<0,001(MW)	<0,001(MW)	<0,001(MW)
Diabético+ insulina					0,187 (MW)	0,731 (MW)
Diabético + ác.lipoico						0,298(MW)
Diabético + insulina + ác.lipoico						

5. ESTUDIO HISTOLÓGICO E INMUNOHISTOQUÍMICO DE LA RETINA.

5.1. ESTUDIO HISTOLÓGICO.

Se realiza un estudio histológico de la retina mediante la tinción con hematoxilina-eosina al final del experimento en el que se mide el espesor medio de la retina como de sus diferentes capas y el número de células ganglionares de la capa ganglionar.

No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes grupos estudiados en cuanto al espesor total de la retina ni entre los espesores de las diferentes capas. Sí que existe un mayor espesor de la retina en los ratones diabéticos respecto a los controles y éste es menor en los diabéticos tratados con insulina y/o ácido lipoico. El aumento de espesor retiniano en los ratones diabéticos se produce a costa principalmente de un aumento en la capa nuclear externa.

Tabla 19. Tabla de espesor (μm) de las diferentes capas de la retina y de toda la retina en todos los grupos estudiados.

Grupo	ONL *	INL *	CGL *	Retina
Control	55,39	31,49	17,1	186,67
Control+AL	53,1	36,16	21,84	210,17
Diabético	84,22	47,48	19,38	251,68
Diabético+Insulina	63,16	45,7	18,53	243,13
Diabético+AL	63,16	38,28	13,6	205,17
Diabético+Insulina+AL	68,34	43,52	15,38	223,04

* ONL: capa nuclear externa, INL: capa nuclear interna, CGL: capa de células ganglionares.

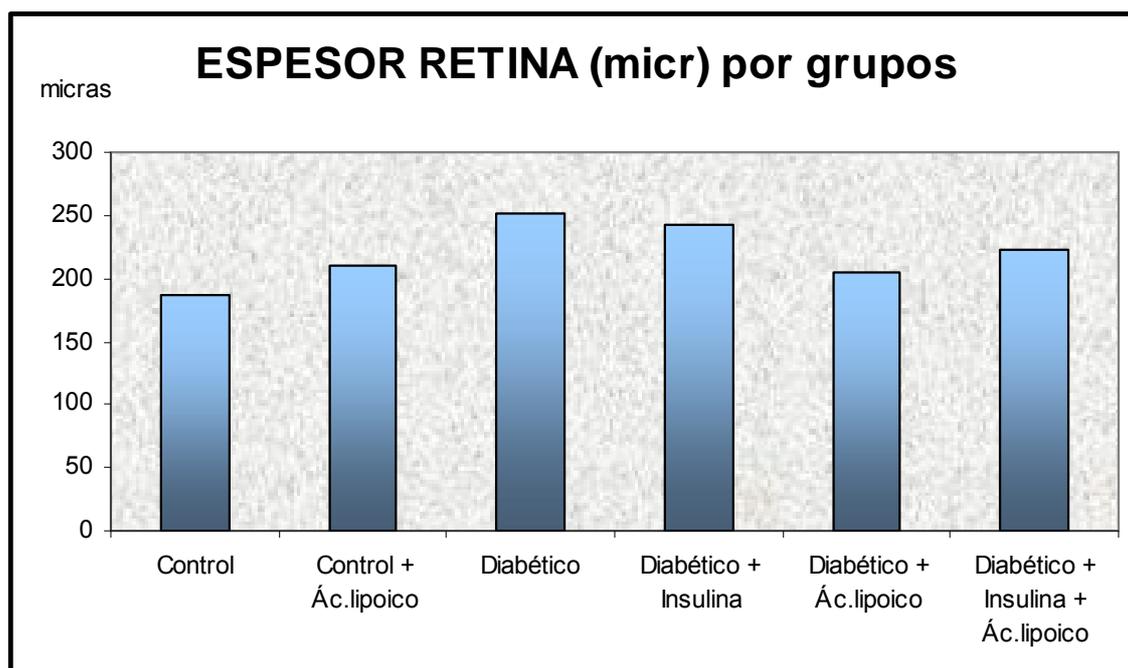
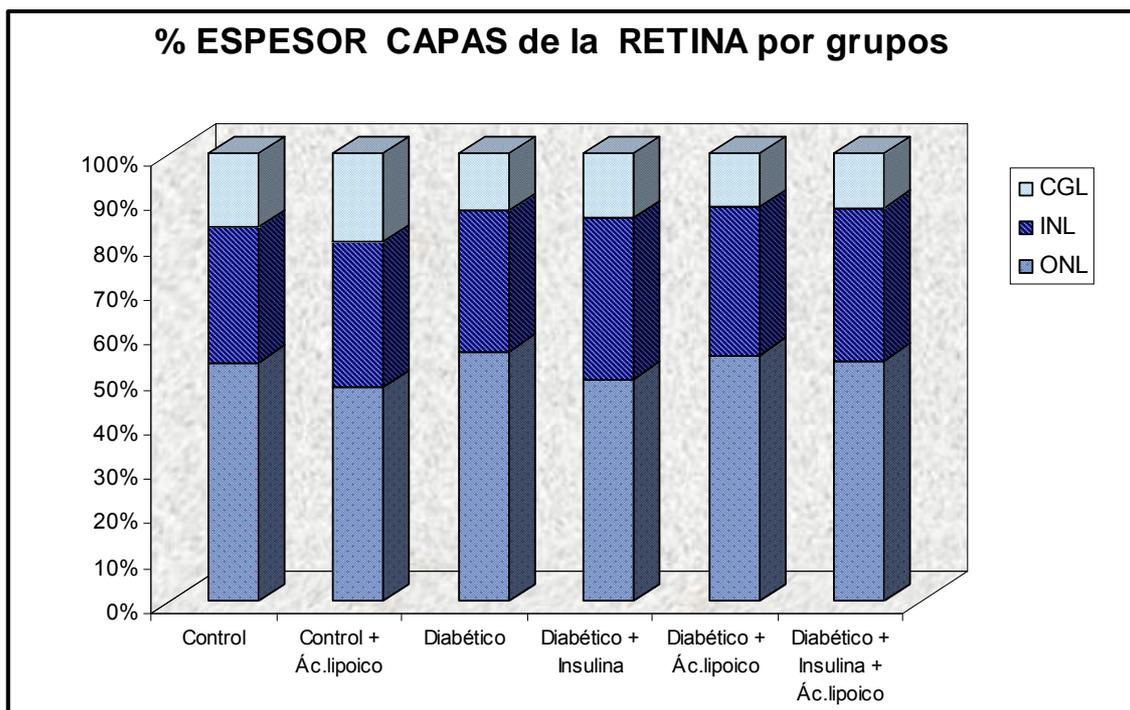
Figura 23. Espesor de toda la retina (μm) según los grupos estudiados.

Figura 24. Espesor de las diferentes capas de la retina (% μm) según los grupos estudiados.



*CGL: capa de células ganglionares, INL: capa nuclear interna, ONL: capa nuclear externa.

Figura 25. Tinción hematoxilina-eosina de la retina de un ratón control y un ratón diabético.

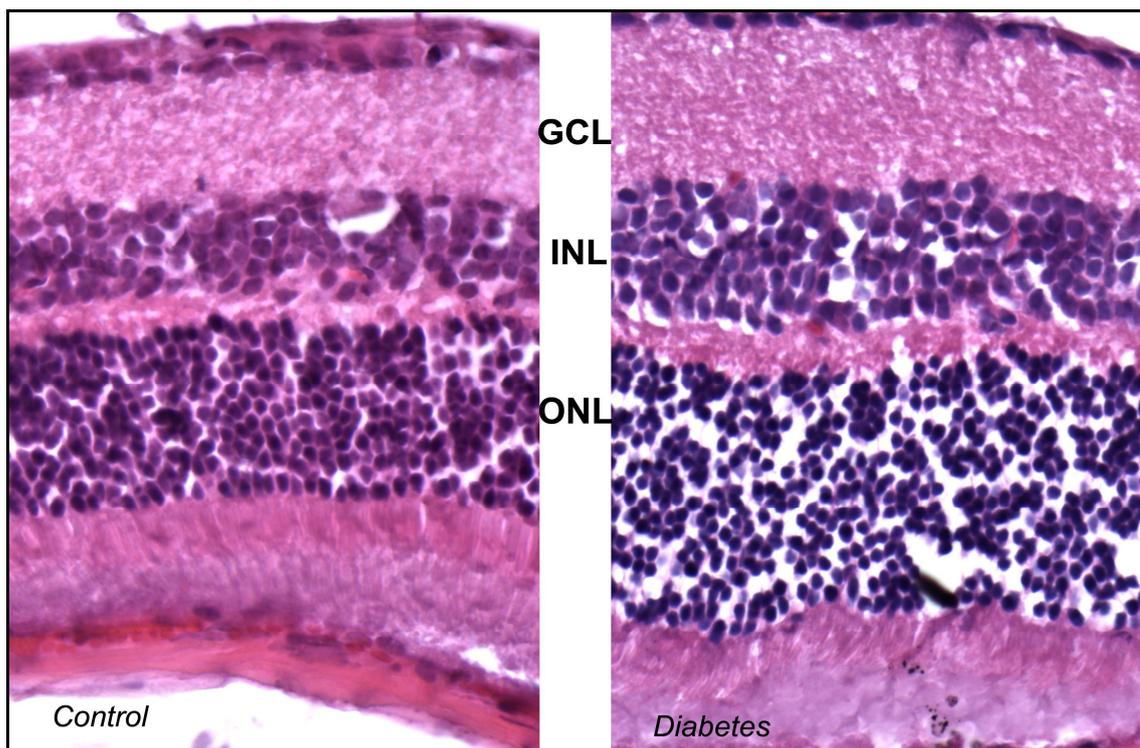
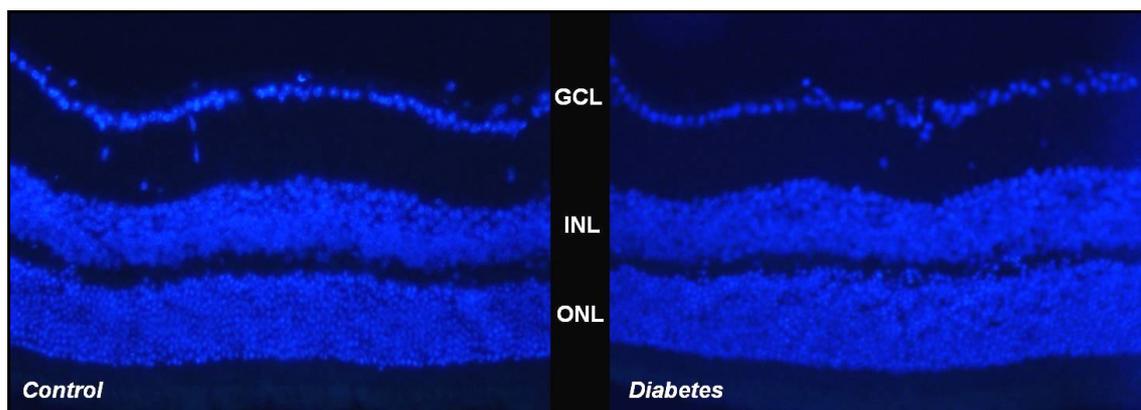


Figura 26. Tinción DAPI de la retina de un ratón control y un ratón diabético para estudio del espesor de las capas de la retina.



5.2. ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO: Expresión de la proteína Bcl-2.

El estudio inmunohistoquímico de la retina pone de manifiesto una expresión basal de la proteína Bcl-2 en los ratones control, principalmente en las células de Müller, pero no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a los ratones diabéticos independientemente de que lleven tratamiento o no.

Tabla 20. Expresión de la proteína Bcl-2 ($\text{cel}/\mu\text{m}^2$) en los diferentes grupos estudiados.

Grupo	Media \pm DE
Control	$1.21 \times 10^{-6} \pm 7.39 \times 10^{-7}$
Control + ácido lipoico	$5.57 \times 10^{-6} \pm 1.85 \times 10^{-7}$
Diabetes	$1.86 \times 10^{-6} \pm 1.06 \times 10^{-7}$
Diabetes + ácido lipoico	$5.60 \times 10^{-6} \pm 8.67 \times 10^{-7}$
Diabetes+ Insulina	$1.37 \times 10^{-6} \pm 2.50 \times 10^{-7}$
Diabetes + Insulina+ Ácdio lipoico	$1.99 \times 10^{-6} \pm 6.64 \times 10^{-7}$

Figura 27. Concentración media de la expresión de la proteína Bcl-2 (cel/ μm^2) en los seis grupos estudiados.

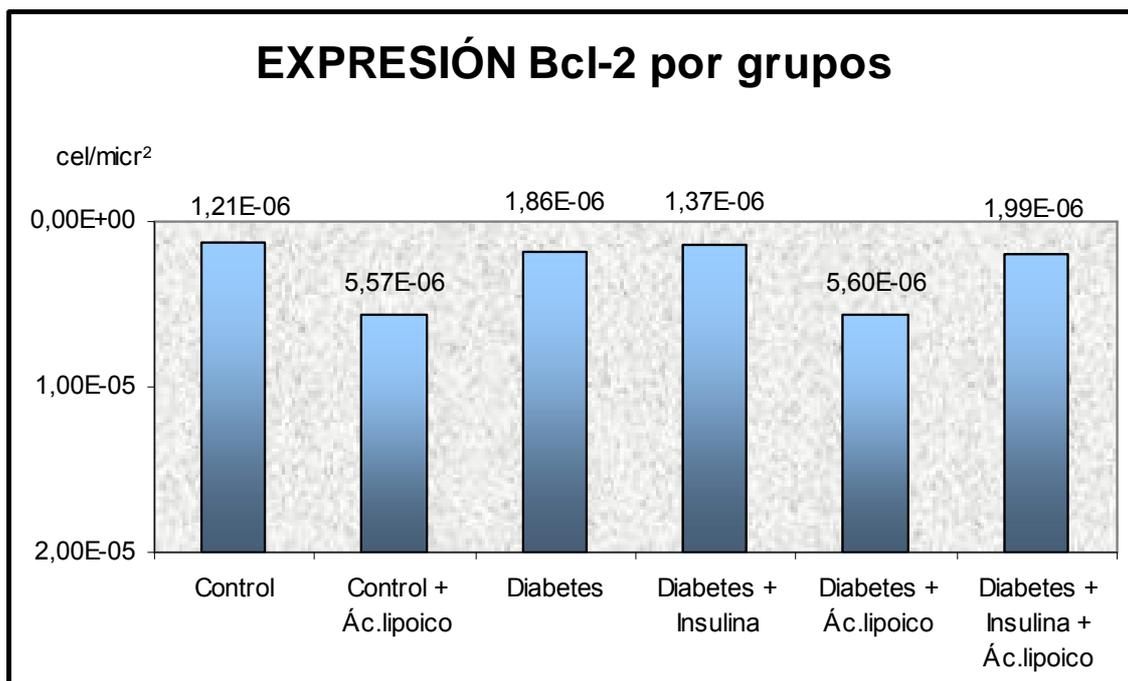
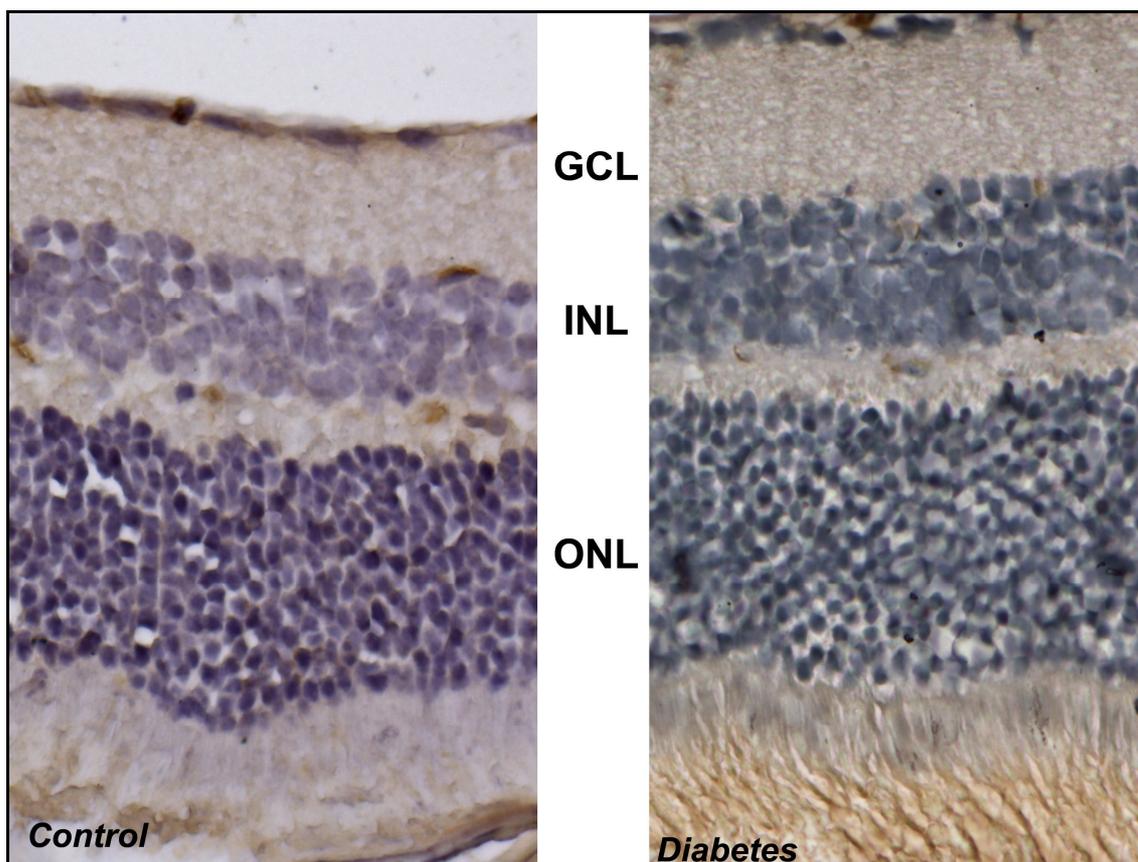


Figura 28. Imagen de la tinción Bcl-2 en un ratón control y un ratón diabético.



6. ESTUDIO DEL DAÑO OXIDATIVO A NIVEL NUCLEAR MEDIANTE LA TINCIÓN CON AVIDINA.

La tinción mediante la técnica de avidina demuestra que existe un daño oxidativo a nivel nuclear tanto en los grupos control como en los grupos diabéticos. No se observan diferencias estadísticamente significativas entre los grupos diabéticos independientemente del tipo de tratamiento que lleven respecto los grupos control.

Figura 29. Concentración media del número de células positivas para avidina por unidad de área en los seis grupos estudiados.

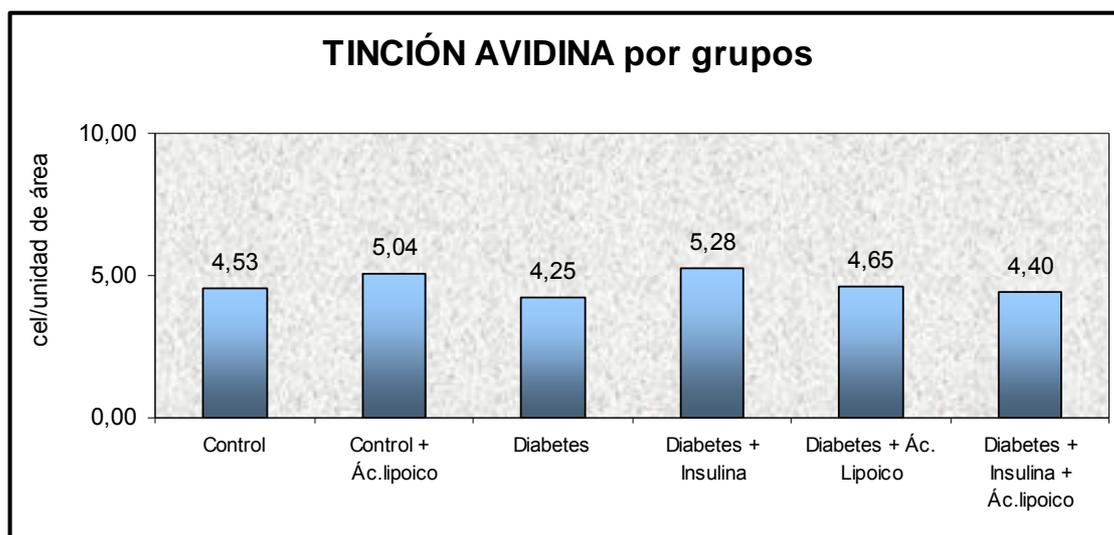
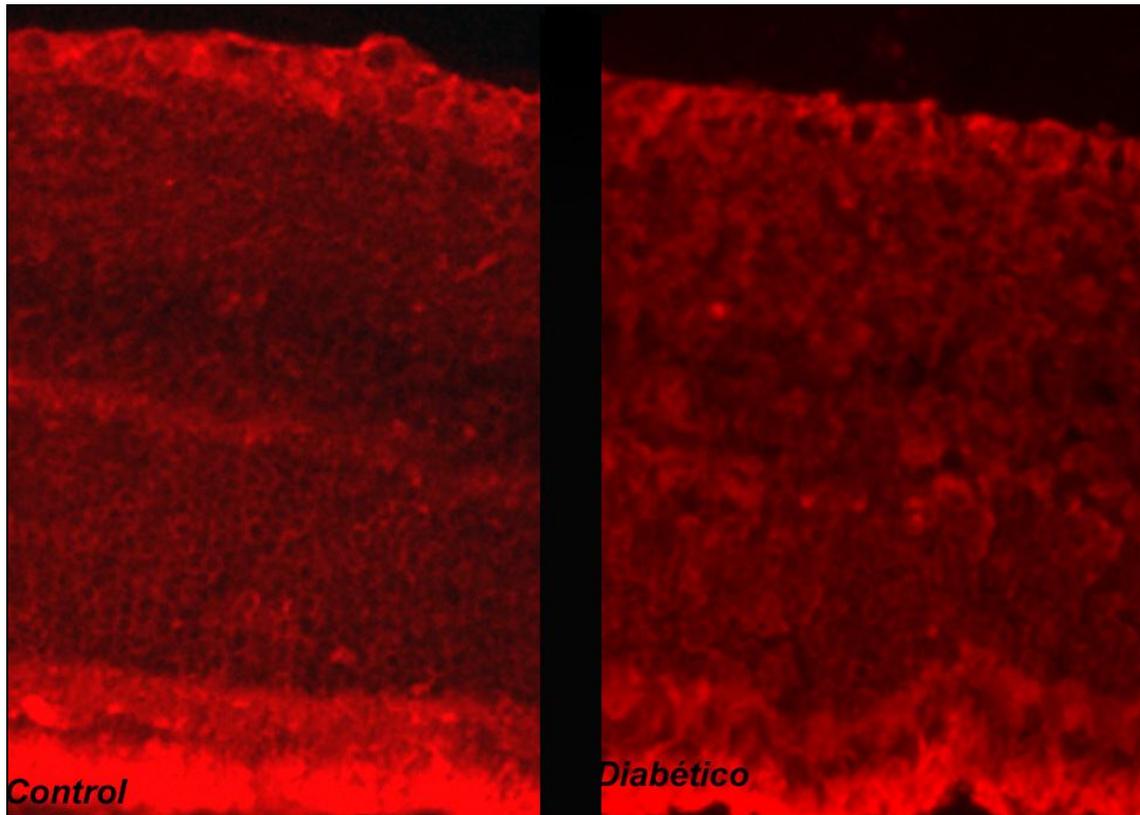


Figura 30. Imagen de la tinción con avidina de un ratón control y un ratón diabético.



7. ESTUDIO DE LA APOPTOSIS CELULAR MEDIANTE TÉCNICA TUNEL EN LA RETINA.

Tras realizar la tinción TUNEL que mide la apoptosis celular mediante la detección de núcleos picnóticos, observamos una tendencia al aumento del número de células apoptóticas en la retina de los ratones diabéticos que no es estadísticamente significativa respecto a los grupos control ni a los grupos diabéticos con tratamiento. Se observa además, que el número de células apoptóticas en los ratones diabéticos independientemente del tipo de tratamiento disminuye respecto a los ratones diabéticos sin tratamiento, llegando a valores similares a los grupos control.

Tabla 21. Concentración media del número de células apoptóticas por unidad de área en la retina de los seis grupos estudiados.

Grupo	Media
Control	9,17±7,3
Control+AL	7,26±5,64
Diabetes	12,68±5,07
Diabetes+Insulina	4,73±,21
Diabetes+AL	6,91±2,14
Diabetes+Insulina+AL	4,92±2,98

Figura 31. Número de células apoptóticas por unidad de área en los diferentes grupos estudiados.

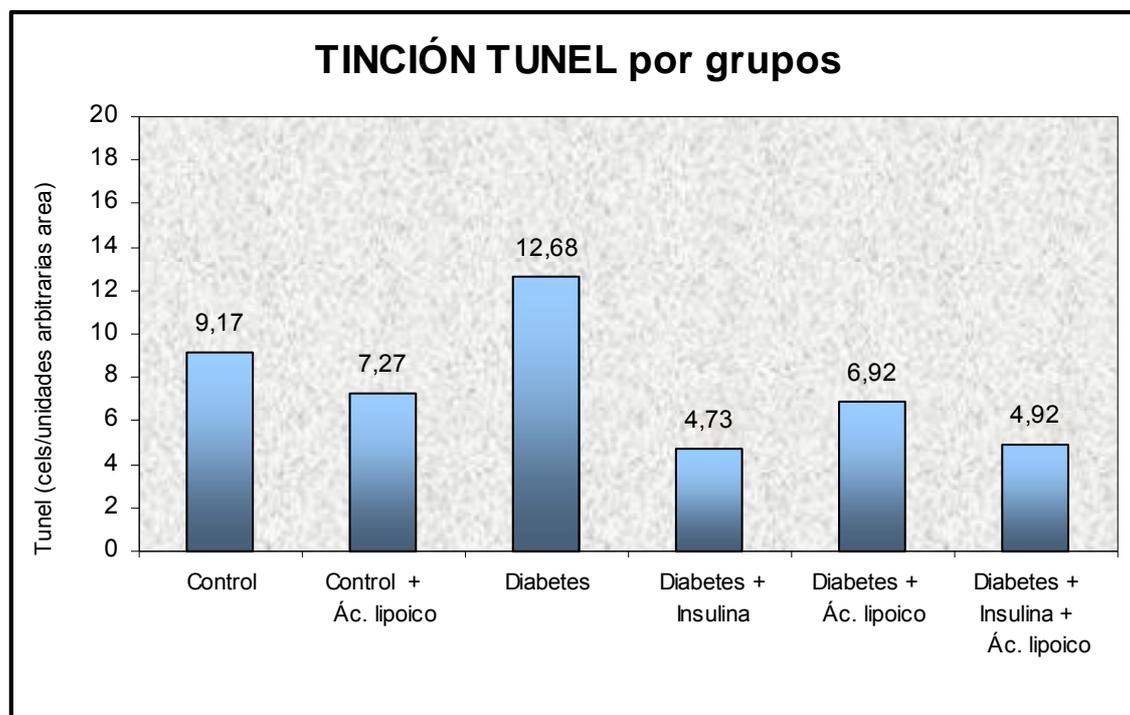
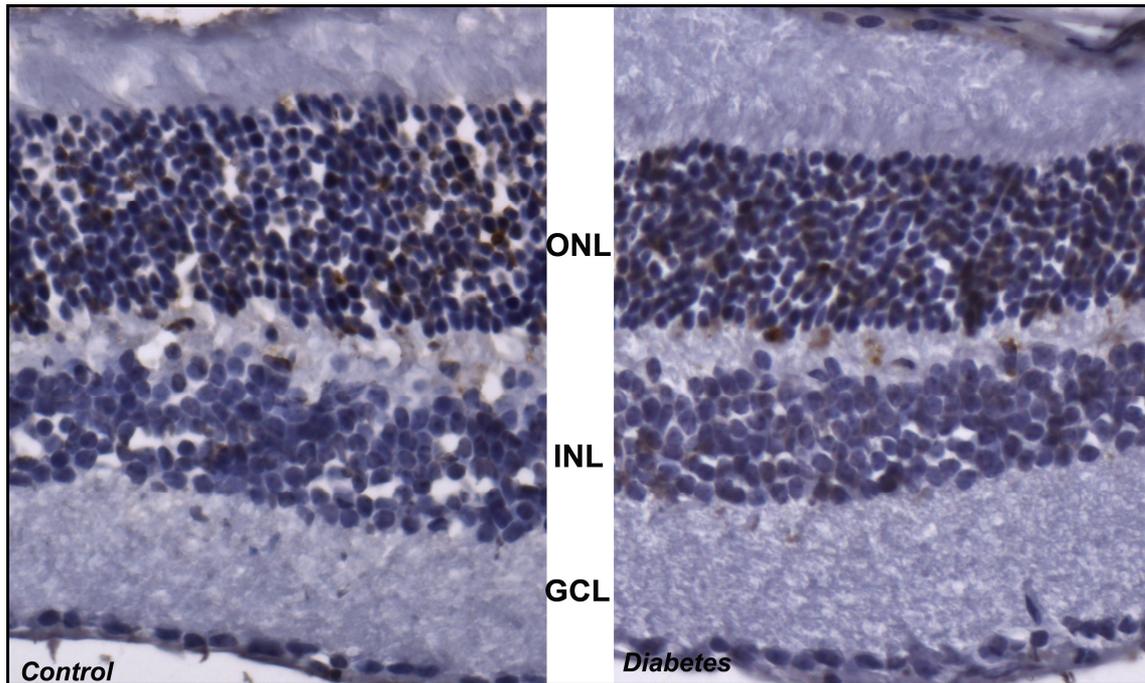


Figura 32. Tinción TUNEL con peroxidasa de un ratón control y de un diabético como marcador de apoptosis celular.



DISCUSIÓN

La DM, como ya se ha mencionado anteriormente, conduce a una hiperglucemia crónica ya sea por un déficit en la secreción de insulina, ya sea por resistencia a su mecanismo de acción. En cualquier caso, la hiperglucemia crónica, se ha demostrado por el DCCT, que es la causante de las complicaciones de la DM a largo plazo. Existen varias hipótesis de cómo la hiperglucemia afecta a los diferentes órganos produciendo las complicaciones crónicas, pero una de las más válidas es la del estrés oxidativo (Baynes JW 1999). En este estudio se intenta valorar el papel del estrés oxidativo en el desarrollo de una de las complicaciones de la DM experimental como es la retinopatía diabética (RD) y estudiar el efecto del tratamiento con un potente antioxidante, el ácido lipoico, para evitar o disminuir el efecto del estrés oxidativo sobre la retina y las complicaciones que éste pueda conllevar.

Efecto de la diabetes mellitus sobre el peso corporal.

Al inicio del experimento todos los ratones tenían un peso inicial similar entorno a 30 gr. Los ratones diabéticos muestran una tendencia a mantener su peso inicial a lo largo del experimento, mientras que los grupos control sufren un aumento de peso entorno al 5'5%. En los ratones diabéticos tratados con insulina y/o ácido lipoico se produce una tendencia a aumentar su peso a lo largo del experimento que es significativa respecto a los grupos control y diabéticos sin tratamiento. Se produce un aumento de peso que oscila entre el 18'5 y el 26'7%, sin observarse diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tipos de tratamiento aplicado.

La DM tipo 1 se asocia a una poliuria y polidipsia con una pérdida de peso marcada previo al diagnóstico de esta enfermedad.

En la mayoría de estudios con ratas DM se instauro un tratamiento suplementario con insulina para evitar la pérdida de peso asociada a la DM.

En nuestro estudio los ratones DM sin tratamiento muestran un peso mantenido a lo largo del experimento con una tendencia a la pérdida de peso que no es significativa posiblemente por el poco tiempo de duración de la DM. Los ratones tratados con insulina muestran un aumento de peso significativo. Múltiples estudios en humanos avalan que el tratamiento intensivo con insulina tanto de la DM tipo 1 como tipo 2 se acompaña de una serie de efectos secundarios, siendo los más importantes la hipoglucemia severa y el aumento de peso (Hauner H, 1999; Purnell JQ y Weyer C, 2003; The DCCT Research Group, 1988). La causa de este aumento de peso asociado al tratamiento no está del todo clara. Según Carlson y Campbell (Carlson MG y Campbell PJ, 1993) el 70% del aumento de peso se debe a la ausencia de glucosuria y el 30% restante a un descenso del 5% en el uso diario de energía. Larger (Larger E, 2005) propone que los pacientes con mayor ganancia de peso son aquellos que tenían un peor control metabólico previo al inicio del tratamiento intensivo, aquellos que habían perdido más peso previamente y aquellos pacientes DM tipo 1 con familiares DM tipo 2. Por lo tanto, la mayor parte del peso ganado era consecuencia de una recuperación del peso perdido antes de iniciar tratamiento con insulina. Jacob et al (Jacob et al, 2006) realizan un estudio de 6 meses de duración en el que concluyen que el aumento de peso se debe

principalmente al efecto lipogénico de la insulina y no a un aumento en la ingesta calórica.

En nuestro estudio los ratones empiezan el tratamiento con insulina a partir del tercer día tras la inyección de aloxana. En este momento la pérdida de peso es poco significativa por lo que el aumento de peso no se debe a una recuperación del peso perdido por la instauración de la DM. Durante todo el experimento los ratones tienen acceso a la comida ad libitum, tanto en los grupos control como en los diabéticos. Sin embargo, los ratones control no aumentan tanto de peso como los ratones diabéticos tratados, a pesar de tener acceso a la comida igual que los ratones DM. Por lo tanto, el aumento de peso en los ratones DM tratados con insulina se debe principalmente al efecto lipogénico de ésta, aunque no podemos descartar un aumento en la ingesta de alimentos ya que no se contabiliza el alimento ingerido diariamente durante el experimento.

En los ratones tratados con ácido lipoico también se produce un aumento de peso significativo respecto al grupo control. El AL favorece la utilización de glucosa tanto en el músculo esquelético como en los adipocitos mediante dos mecanismos: 1) estimula la translocación de proteínas transportadoras de glucosa presentes en estos tejidos y dependientes de la insulina (GLUT4) hacia la membrana plasmática (Shepherd PR y Kahn BB, 1999), favoreciendo la transformación de glucosa en ácidos grasos en el tejido adiposo, y 2) favorece el uso glucosa independientemente de la presencia de insulina o no (Packer L, 1995; Henriksen et al, 1994). En la DM se produce un

aumento de ácidos grasos circulantes por la acción lipolítica de las hormonas contrarreguladoras, como el glucagon. Estos ácidos grasos son captados por el hígado y transformados en cuerpos cetónicos, causando acidosis y cetonuria. La administración de insulina corrige estas alteraciones metabólicas al inhibir la lipasa específica que moviliza los ácidos grasos. El AL, además de incrementar el uso de glucosa en los adipocitos, tendría una actividad inhibidora de la lipólisis similar a la insulina, aunque no sabemos si actuando sobre los mismos mecanismos que ésta.

En conclusión, el tratamiento con suplementos de AL produce como efecto secundario un aumento de peso similar al tratamiento con insulina en el modelo de diabetes experimental en ratones. Los mecanismos implicados en el aumento de peso son dos: el AL favorece la utilización de glucosa en el músculo esquelético y adipocitos independientemente o no de la insulina, y además el AL parece que posee una actividad lipolítica similar a la insulina.

Efecto de la diabetes mellitus en los parámetros estudiados en suero: glucemia y hemoglobina glicosilada.

La hemoglobina glicosilada (HbA1c) refleja la cifra de glucemia media en un período aproximado de 4-8 semanas previas a su determinación. Ésta se forma por la reacción de la hemoglobina con la glucosa circulante y es proporcional a la glucosa presente en el medio (Figuerola D y Reynolds E,

1998). En nuestro estudio la inyección de aloxana condujo al aumento de los niveles de glucemia y de HbA1c en sangre.

En el estudio realizado se observan diferencias estadísticamente significativas en cuanto al valor medio de la glucemia entre ratones del grupo control y los grupos diabéticos. La glucemia es un valor puntual que se mide al inicio del experimento, a los tres días de la inyección de aloxana para clasificar a los ratones en diabéticos o no y posteriormente, se mide al menos una vez a la semana para confirmar que los ratones continúan siendo diabéticos y el efecto de la aloxana no se ha revertido. El tratamiento con insulina disminuye los valores de la glucemia media en los grupos diabéticos pero sin llegar al valor de los grupos control, mientras que el tratamiento con ácido lipoico modifica de forma muy leve las glucemias medias en los grupos diabéticos, como se confirma mediante el estudio de la HbA1C.

Los valores de HbA1C en sangre muestran diferencias estadísticamente significativas entre los grupos control y los grupos de ratones diabéticos. El tratamiento con insulina y/o ácido lipoico disminuye los niveles de HbA1c en sangre en los ratones diabéticos pero sin llegar al nivel de los valores de los grupos control. El ácido lipoico disminuye los valores de HbA1c de los ratones diabéticos en menor medida que la insulina. Estos hallazgos se corresponden con los ya descritos en la literatura, ya que el ácido lipoico presenta cierto efecto hipoglucemiante al aumentar la utilización de glucosa en el músculo esquelético independientemente de la insulina (Packer L, 1995; Henriksen et al, 1994; Jacob et al, 1996). El tratamiento combinado de insulina con AL

disminuye los valores de HbA1c respecto a los grupos tratados solamente con AL, pero no con insulina, de forma estadísticamente significativa pero sin llegar a los valores del grupo control. Se supone un efecto sinérgico de la insulina, que favorece el uso de la glucosa en todos los órganos dependientes de esta hormona, y del AL que favorece el uso de la glucosa en órganos dependientes e independientes de la insulina como lo es el músculo esquelético o el nervio periférico (Yutaka K et al, 1999).

Cambios histológicos en la retina como consecuencia de la diabetes mellitus.

Tras tres semanas de diabetes mellitus experimental se detecta un aumento en el espesor de la retina en los ratones diabéticos respecto al grupo control. Este aumento de espesor se corrige parcialmente con el tratamiento tanto con insulina como con ácido lipoico. Park et al (Park et al, 2003) estudian los cambios neurodegenerativos en ratas diabéticas y detectan un aumento en el espesor de las capas retinianas, principalmente a nivel de las capas internas, ya en la primera semana tras la instauración de la diabetes con un descenso posterior progresivo a lo largo del experimento que afecta a todas las capas. Se supone que el aumento de espesor retiniano se debe a una rotura de la barrera hemoretiniana que conlleva un aumento en la permeabilidad vascular con el consiguiente edema retiniano (Rungger-Brändle E, 2000). Se ha demostrado que el aumento de la permeabilidad vascular se debe principalmente a una alteración en las uniones adherentes que forman la barrera hematorretiniana (Lorenzi M, 2001). El grupo de Martin et al (Martin et al, 2004) no detectan

alteraciones en la morfología ni en el espesor retiniano hasta las 10 semanas de diabetes, momento en el que se observa un adelgazamiento retiniano que afecta a las capas nuclear externa e interna de los ratones diabéticos inducidos mediante streptozotocina. Este estudio se diferencia del nuestro en el tipo de ratones utilizados y en la forma de inducir la diabetes.

1. ESTUDIO DE LOS PARÁMETROS INDICADORES DE ESTRÉS OXIDATIVO EN EL HOMOGENADO DE OJO.

La diabetes mellitus conduce a un estado de hiperglucemia que es la causa principal de todas las complicaciones de la diabetes, como se ha demostrado en varios estudios. La hiperglucemia conduce a un estrés oxidativo y formación de ROS a través de varios mecanismos como son la autooxidación de la glucosa, la activación de la PKC, la vía del sorbitol o la fosforilación oxidativa (Robertson RP, 2004). Todo esto conduce a una alteración en la expresión de los genes de la insulina, alterando su secreción, a un aumento de la lipotoxicidad y alteración de los sistemas de defensa antioxidantes.

1.1. ESTUDIO DEL MDA.

En la retina de los ratones diabéticos se produce un aumento en la concentración de MDA como consecuencia de la lipoperoxidación que se produce en las células retinianas ricas en ácidos grasos. Observamos un aumento de MDA en el homogenado de ojos de ratones diabéticos respecto a los grupos control y diabéticos tratados con insulina y/o ácido lipoico. El

tratamiento con insulina y/o ácido lipoico consigue disminuir los niveles de MDA en el homogenado de ojo a valores control.

En un estudio reciente publicado por el grupo de Muriach M (Muriach M et al, 2006) se demuestra que los niveles de MDA tanto en suero como en la retina de ratones diabéticos están aumentados ya en la primera semana de instauración de la diabetes, por lo que se presupone que es el estrés oxidativo el causante de las complicaciones de la diabetes a nivel retiniano, y no al contrario. Sin embargo, otros grupos (Obrosova I et al, 2000) publican que los niveles de MDA en la retinopatía diabética precoz en ratas no están aumentados y que el marcador de peroxidación lipídica más precoz es el aumento de los lípidos insaturados α - β -aldehídos (4-hidroxiálquenos), capaces de generar en última instancia genotoxicidad y apoptosis. Esto se debe a que el MDA también se forma como consecuencia del metabolismo del ácido araquidónico y en la diabetes mellitus el metabolismo del ácido araquidónico a través de la vía de la ciclooxigenasa está disminuido. Sin embargo, en nuestro estudio a las 3 semanas de instauración de la diabetes, un periodo relativamente corto, los niveles de MDA ya están aumentados. Estos resultados coinciden con los presentados por Kowrulu, en los que demuestra que en la RD experimental en un modelo de ratón se produce un aumento de productos de la peroxidación lipídica en la retina del homogenado de ojo, siendo comparable con los niveles de peroxidación encontrados en modelos de ratas (Kowrulu RA, 2002).

1.2. ESTUDIO DEL SISTEMA GLUTATION.

El sistema glutathione es un sistema de defensa antioxidante propio de nuestro organismo formado por el glutathione y los enzimas relacionados con su metabolismo, como la glutathione peroxidase, principal mecanismo de defensa frente a la peroxidación lipídica. Durante la diabetes y como consecuencia del estrés oxidativo se produce un descenso importante de la concentración de GSH y GSH peroxidase en la retina y en sus pericitos en un intento de neutralizar los radicales libres que actuarían sobre las membranas celulares en la peroxidación lipídica (Agardh CD et al, 1998; Manea A et al, 2004).

Tras tres semanas de experimento y en el estudio del homogenado de ojo se observa un descenso significativo en la concentración de GSH en los ratones diabéticos. Los ratones tratados con insulina y/o con ácido lipoico muestran una recuperación de los valores de GSH hasta valores similares, incluso superiores, a los ratones control, aunque no se observan diferencias entre los tipos de tratamiento aplicados en los ratones diabéticos.

Por lo tanto, el ácido lipoico ayuda a mantener los niveles de GSH dentro de la normalidad, como se ha demostrado en otros estudios en ratas (Kowluru R.A et al, 2004). La disminución de GSH es un indicador de que los sistemas de defensa antioxidante están afectados en la diabetes, aunque no está claro cuál es el mecanismo por el que hay una pérdida de glutathione en la retina diabética. Existen varias hipótesis, como la que propone Agardh et al en la que se produce una menor actividad en la enzima glutathione reductase,

enzima regeneradora del glutathion oxidado (Agardh et al,1998). Sin embargo, Kern et al dan mayor importancia al aumento de la actividad de la enzima aldosa reductasa y la depleción de NADPH (Kern et al, 1994).

La insulina actúa principalmente regulando los niveles de glucemia. Al disminuir la hiperglucemia también disminuirán los niveles de estrés oxidativo y, por lo tanto, los mecanismos antioxidantes se mantienen en niveles de normalidad. El ácido lipoico tiene un leve efecto sobre los niveles de glucemia, por lo que su mecanismo de acción principal es un mecanismo antioxidante tejido específico, ya que además de capturar radicales libres y regenerar los niveles de glutathion intracelular por su acción sinérgica con otros antioxidantes (Maritim AC et al, 2003; Packer L, 1995), es capaz de facilitar la translocación de transportadores de glucosa a través de la membrana plasmática y aumentar los depósitos de glucosa y de intermediarios de la vía del sorbitol en la retina diabética (Obrosova et al,2000). Así pues, más que favorecer la neutralización de productos de la peroxidación lipídica, como los 4-hidroxi-alquenos y el MDA, el AL impide su formación sin afectar a los sistemas de defensa antioxidante, en concreto al sistema glutathion.

En cuanto a la glutathion peroxidasa (GPx), es la enzima más común con actividad peroxidasa en mamíferos y se presenta como un importante sistema protector frente a la peroxidación de lípidos. Su función es proteger a las membranas celulares del daño oxidativo. En nuestro estudio se observa un descenso significativo de los niveles de GPx en los ratones diabéticos respecto a los grupos control y a los grupos diabéticos con tratamiento en el

homogenado de ojo. Sin embargo, en un estudio reciente en ratones diabéticos se observa un aumento de la GPx en la retina con una disminución de la catalasa y la concentración de MDA similar a la de los ratones control (Obrosova IG, 2006). Este estudio se diferencia de nuestro experimento en el tipo de ratón utilizado, la forma de inducir la DM (mediante estreptozotocina en vez de aloxana) y en el tiempo de duración del experimento que es el doble de tiempo que el nuestro. Estudios previos con el mismo modelo experimental sí que se demuestra la disminución de la actividad de la GPx con aumento de la concentración de MDA (Muriach M et al, 2006; Miranda M et al, 2004). Además, se ha demostrado que la actividad GPx está disminuida en el suero de pacientes diabéticos (Hartnett ME et al, 2000). Sin embargo no se ha podido establecer ninguna correlación significativa entre los niveles séricos de MDA o actividad de la GPx, y la retinopatía diabética.

Así pues, el AL es capaz de mantener en niveles normales los sistemas de defensa antioxidante (glutathion y glutathion peroxidasa) presentes en las células retinianas así como de evitar la peroxidación lipídica de las membranas de las células retinianas como consecuencia del estrés oxidativo generado tras la inducción de la DM en este modelo de RD experimental en ratones.

2. ESTUDIO DE LAS ALTERACIONES EN EL ELECTORRETINOGRAMA.

El ERG es un método objetivo que nos permite evaluar la función de la retina. En la retinopatía diabética se han descrito alteraciones en el ERG de forma precoz sin que se observen en el fondo de ojo alteraciones retinianas (Tzekov R y Arden GB, 1999). Además, se ha demostrado, mediante estudios fluorométricos, un aumento en el tiempo implícito de los potenciales oscilatorios en el ERG de pacientes diabéticos antes de que se instaure una alteración en la barrera-hematorretiniana (Yoshida A et al, 1991).

Los potenciales oscilatorios son pequeñas ondas positivas de alta frecuencia que aparecen en la fase ascendente de la onda b y que se corresponden a la interacción de las células amacrinas con las células bipolares y/o ganglionares de las capas internas de la retina. Es el parámetro del ERG más sensible a los cambios circulatorios de la retina (Tzekov R y Arden GB, 1991). Por lo tanto, el primer parámetro afecto en la RD son los potenciales oscilatorios tanto en su amplitud como en su tiempo implícito (Holopigian K et al, 1992; Hancock HA y Kraft TW, 2004). Simonsen demostró en un estudio prospectivo con pacientes diabéticos juveniles durante 13-15 años de seguimiento, el valor predictivo de los potenciales oscilatorios en la evolución de la RD hacia la RD proliferativa (Simonsen SE, 1980).

Los potenciales oscilatorios no solo están afectados de forma precoz en la RD, sino que además los fotorreceptores también están afectados

observándose una alteración en tanto en la amplitud como en el tiempo implícito de la onda b en condiciones fotópicas y escotópicas (Holopigian K et al, 1992). La onda b refleja los cambios de potencial en las células de Müller, dependiendo de impulsos de los fotorreceptores. Si tenemos en cuenta que los fotorreceptores retinianos son células con un alto consumo en oxígeno, es de suponer que las alteraciones vasculares de la RD afectarán de forma precoz e importante a la función de estas células, reflejándose esto en el ERG (Holopigian K et al, 1997).

Sin embargo, en algunos estudios no se detectan alteraciones en el electroretinograma hasta las 12 semanas de experimento y éstas las correlacionan principalmente con alteraciones en la microglia y no con alteraciones de la macroglia (Gaucher D et al, 2007).

A medida que la retinopatía diabética avanza en el ERG observamos además de un descenso importante o ausencia de potenciales oscilatorios, una afectación de las ondas a y b tanto en condiciones fotópicas como escotópicas, alteración del flicker, etc.

En nuestro experimento se realiza el ERG con el fin de valorar los efectos de la diabetes sobre la onda b del ERG en un modelo de RD experimental en ratones. El ERG se realiza a los 21 días post-inyección de aloxana a los ratones en las condiciones anteriormente comentadas. Para valorar el funcionamiento de la retina utilizamos como parámetro la amplitud de la onda b por dos razones: los ratones albinos presentan un sistema escotópico

casi puro, por lo que la onda b es muy sencilla de interpretar y de medir, y además, como hemos visto anteriormente, es igual de sensible que los potenciales oscilatorios para evaluar el funcionamiento retiniano en la RD.

En el estudio observamos un descenso significativo de la amplitud de la onda b en los ratones diabéticos respecto a los grupos control, y por lo tanto una afectación a nivel de las células de Müller. Estas alteraciones en el electroretinograma concuerdan con estudios previos que demuestran la afectación a nivel de la glia retiniana tanto en fases precoces de la RD como en fases tardías de la misma. (Muriach M, 2006; Miranda M, 2004; Li Q et al 2002; Sakai H et al, 1995).

Las células de Müller poseen características que las hacen ser potenciales diana de la diabetes:

- son las células que primero absorben la glucosa y la fosforilan a nivel retiniano, ya que poseen GLUT 1, y por lo tanto les permite un transporte no regulado de glucosa (Poitry-Yamate CL et al, 1995).

- metabolizan la glucosa intensamente a través de la glicólisis para producir lactatos, que son el combustible del metabolismo neuronal

- constituyen el almacén primario de glucógeno y por lo tanto, del metabolismo de la retina

- contienen además, aldosa reductasa por lo que la consecuencias de la activación de la vía del poliol también las afecta

- están relacionadas con la regulación del flujo sanguíneo retiniano (Lorenzi M y Gerhardinger C, 2001).

Además queremos valorar el efecto del tratamiento de los ratones diabéticos con insulina y/o ácido lipoico sobre el desarrollo de la RD y sus alteraciones en el electroretinograma. Tanto el tratamiento con insulina como con ácido lipoico devuelven la amplitud de la onda b a valores muy similares a los grupos control, no observándose diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de ratones diabéticos independientemente del tipo de tratamiento que se les haya aplicado. Como se ha comentado anteriormente, el control exhaustivo de la glucemia es el mejor tratamiento para evitar las complicaciones crónicas de la DM. En los ratones tratados con ácido lipoico el valor de la onda b se recupera a valores normales independientemente de la hiperglucemia. El ácido lipoico es el antioxidante universal por excelencia, ya que además de proteger a los sistemas de defensa antioxidante como el glutatión, es capaz de regenerarlos, y evitar así los efectos de la peroxidación lipídica. El tratamiento combinado de insulina y ácido lipoico no muestra diferencias significativas respecto al tratamiento sólo con insulina o con ácido lipoico. Sin embargo el tratamiento sólo con ácido lipoico consigue recuperar los valores de la onda b, quedando demostrado así el efecto antioxidante del ácido lipoico a nivel retiniano independientemente del tratamiento con insulina.

Por lo tanto, el AL es capaz de prevenir las alteraciones de la onda b en el ERG que se producen en la RD experimental en ratones en la misma medida que la insulina.

3. ESTUDIOS INMUNOHISTOQUÍMICOS SOBRE LA RETINA: DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA ANIT-APOPTÓTICA BCL-2.

Recientes estudios han demostrado que la neurodegeneración retiniana es uno de los fenómenos más tempranos de la diabetes (Barber AJ et al, 1998; Lieth E et al, 2000). En fases iniciales de la diabetes se ha detectado la presencia de un porcentaje de apoptosis en la retina neurosensorial diez veces superior al normal. Este hecho se detecta ya en el primer mes de instauración de la diabetes y se mantiene con la misma frecuencia al menos durante 12 meses. La apoptosis afecta principalmente a las células no vasculares, es decir, a las células ganglionares (Barber et al, 1998).

Los estudios que, como el de Barber, han demostrado que existe apoptosis vascular y neural en la retina diabética, nos sugirerem que puede existir una menor disponibilidad de señales de supervivencia en la RD. Esta es la razón por la que realizamos en nuestro estudio la determinación de la proteína bcl-2 en el homogenado de ojo, proteína conocida por todos por sus funciones antiapoptóticas.

La retina de los mamíferos contiene dos tipos de células macrogliales: las células de Müller, que son específicas de la retina, y los astrocitos, que migran a la retina desde el nervio óptico. Ambos tipos de células envuelven a las neuronas, segmentos iniciales de las células ganglionares y los vasos. Las células de Müller extienden sus procesos radiales a lo largo de todo el espesor

de la retina, mientras que los astrocitos quedan confinados a la capa de fibras nerviosas.

Las células de Müller representan la glia principal de la retina con importantes funciones estructurales y metabólicas, ya que contienen la enzima glutamina sintetasa (GS) que transforma el glutamato en glutamina, sustrato energético de los fotorreceptores. En condiciones normales, la proteína bcl-2 está presente en las células de Müller principalmente en sus terminaciones y sus extensiones radiales hacia la capa plexiforme externa (Shin DH et al, 1999). En la capa nuclear externa y en los vasos retinianos no se detecta bcl-2. La distribución de la GS es similar a la proteína bcl-2, excepto que también está presente en los fotorreceptores de acuerdo con su función de transaminación del glutamato (Mizutani M et al, 1998).

Se ha demostrado que en múltiples insultos retinianos, entre ellos la diabetes, existen una serie de anomalías que afectan a las células de Müller que se manifiestan principalmente con un aumento en la expresión de la proteína ácida fibrilosa glial (GFAP) que produce como consecuencia un descenso en la capacidad de transformar glutamato en glutamina, aumentando así la toxicidad neuronal del glutamato (Lorenzi M y Gerhandinger C, 2001). La hiperexpresión de la GFAP indica una hipertrofia de las células de Müller, y no un aumento en su número ya que no se acompaña de un aumento en la expresión de bcl-2 (Mizutani et al, 1998).

Sin embargo existen estudios que ponen de manifiesto un aumento en la expresión de la proteína bcl-2 en retinas diabéticas (Abu-el-Asrar AM et al, 2004), a la vez que otros grupos muestran la situación contraria (Cacicedo M et al, 2005).

En el presente estudio se detecta la expresión de la proteína bcl-2 en las células de Müller de la retina tanto en los ratones control como en los diabéticos, sin encontrarse diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Estos resultados concuerdan con los presentados por Mizutani et al, 1998 en pacientes afectos de microangiopatía diabética. Gaucher et al (Gaucher D et al, 2007) determinan que no existen cambios en la macroglia en la retina de ratones diabéticos tras tres meses de experimento ya que no detectan un aumento en la expresión de la GFAP. Nuestros resultados también concuerdan con los de este estudio. El tratamiento con AL y/o insulina no modifican la expresión de esta proteína.

Por lo tanto, en el modelo de RD en ratones que presentamos no se detecta un aumento de la proteína antiapoptótica bcl-2 en la retina de los ratones diabéticos ni el tratamiento con AL modifica su expresión. El tiempo de duración de este experimento es de 3 semanas, tiempo insuficiente para detectar los cambios que se producen en la macroglía de la retina como consecuencia de la DM. A partir de las 4 semanas de inducción de la DM se detecta una hiperplasia de las células de Müller en la retina de ratas diabéticas (Lorenzi M y Gerhandinger C, 2001) mientras que en modelos de ratones estas alteraciones no aparecen en estudios de 10 semanas de duración (Asnaghi V

et al, 2003). En cualquier caso no está claro cuando se producen alteraciones en las células de Müller en la RD experimental y si esto conlleva una alteración en la expresión de la proteína bcl-2.

4. ESTUDIOS DE LA APOPTOSIS Y DAÑO OXIDATIVO EN EL HOMOGENADO DE OJO.

Actualmente múltiples estudios proponen la teoría de la neurodegeneración como uno de los primeros fenómenos que ocurren en la RD incluso antes de la aparición de cambios vasculares (Barber et al, 1998; Lieth et al, 2000; Park et al, 2003; Feit-Leichman et al, 2005).

A las 4 semanas de inducción de la diabetes ya se detectan células apoptóticas en la retina de ratas diabéticas. Estas células apoptóticas son principalmente células ganglionares y la tasa de apoptosis se mantiene a lo largo de al menos 12 meses (Lorenzi M y Gerhardinger C, 2001). La apoptosis en la retina no se debe a un fenómeno de isquemia, ya que los fenómenos oclusivos aparecen más tardíamente, a los 7-8 meses de instaurar la diabetes en ratas (Lorenzi M y Gerhardinger C, 2001) y a los 6 meses en modelos en ratones (Feit-Leichman et al 2005).

Sin embargo, los resultados sobre apoptosis en la retinopatía diabética experimental en ratones son muy variables. Algunos autores no detectan apoptosis en las células neuronales tras 10-12 semanas de diabetes

(Asnaghi V et al, 2003; Gaucher D et al, 2006). Sin embargo, en otros se demuestra la presencia de apoptosis en la RD precoz (Martin PM et al, 2004; Ning X et al 2004, Park et al, 2003)

En nuestro estudio detectamos la presencia de células TUNEL positivas tanto en los ratones control como en los diabéticos. Se observa un aumento de la apoptosis en los ratones diabéticos que no llega a ser estadísticamente significativo respecto a los controles. El tratamiento con insulina y/o ácido lipoico disminuye el número de células apoptóticas a valores similares a los controles. Estos resultados concuerdan con los resultados presentados por Feit-Leichman en ratones diabéticos, en los que se produce un aumento del número de células TUNEL + significativo respecto a los controles a las dos semanas de experimento (Feit-Leichman et al, 2005). Sin embargo, a partir de las 4 semanas el número de células apoptóticas en los ratones diabéticos disminuye aunque persiste cierto aumento respecto a los controles. En nuestro experimento los ratones fueron sacrificados a las 3 semanas y por lo tanto, es de esperar un mayor número de células apoptóticas en los ratones diabéticos respecto a los controles pero sin observarse diferencias estadísticamente significativas.

El tratamiento con insulina ha demostrado reducir el número de células apoptóticas en la retina (Barber et al 1998), como se demuestra en nuestro estudio. La insulina actúa controlando la hiperglucemia y sus efectos nocivos, como un factor trófico de supervivencia a nivel del sistema nervioso central (Voll CL y Auer RN, 1991) y además, regula una serie de factores asociados

con la apoptosis como son los canales de calcio intracelular en las neuronas (Jonas EA et al, 1997). Por lo tanto, se supone que la apoptosis se puede deber a otros factores tóxicos además de la hiperglucemia y la falta de insulina. Como hemos visto anteriormente, la alteración precoz de las células de Müller altera el metabolismo del glutamato por disfunción de la enzima GS, con el consiguiente aumento de su concentración que favorece la apoptosis. El tratamiento con ácido lipoico presenta el mismo efecto sobre la apoptosis que el tratamiento con insulina, es decir, disminuye la apoptosis en la retina de los ratones diabéticos. Este efecto se puede explicar parcialmente por el efecto del ácido lipoico sobre la hiperglucemia, pero posiblemente actúen otros mecanismos sobre la apoptosis además de la glucemia y la alteración del glutamato.

Tras realizar la tinción con avidina sobre las muestras obtenidas se ha observado la presencia de marcadores de estrés oxidativo a nivel nuclear en los ratones diabéticos, que podrían estar implicados en los mecanismos de apoptosis celular. Sanz MM et al (Sanz MM et al, 2007) presentan un estudio en un modelo de ratón con retinosis pigmentaria en el que se observa la presencia de daño oxidativo en el DNA de los fotorreceptores, y que este daño se revierte parcialmente con el tratamiento mediante una combinación de antioxidantes (luteína, zeaxantina, ácido lipoico y L-glutation reducido). El daño oxidativo precede a la muerte celular por apoptosis en este estudio sobre ratones con retinosis pigmentaria, ya que el número de células apoptóticas es menor que el de células avidina positivas.

En nuestro estudio, no se observa un aumento del daño oxidativo a nivel del DNA estadísticamente significativo entre los ratones DM y los controles. El ácido lipoico podría tener efecto a nivel del daño oxidativo sobre el DNA por su capacidad como antioxidante universal, aunque en nuestro estudio esto no se demuestra posiblemente por el poco tiempo de duración del experimento (3 semanas). Además, en los ratones la vía del poliol está menos activa ya que poseen menor aldosa reductasa que las ratas. Esta vía aumenta la apoptosis celular ya que favorece el estrés oxidativo por el acúmulo de sorbitol en condiciones de hiperglucemia. La menor actividad de esta vía en los ratones hace que éstos estén más protegidos frente al estrés oxidativo y a la muerte neuronal por apoptosis, lo que justifica un menor daño oxidativo en el DNA de nuestro modelo de RD.

En conclusión, el modelo de RD experimental en ratones demuestra una tendencia a la apoptosis de las células retinianas en los ratones diabéticos que no se acompaña de un aumento en la expresión de la proteína anti-apoptótica bcl-2 ni de una mayor daño oxidativo a nivel del DNA de las células retinianas. Tanto el tratamiento con insulina como con AL previenen del aumento de la apoptosis celular que se produce en este modelo de RD presentado. Los mecanismos por los que se produce la apoptosis de las células retinianas no están definidos en este modelo de RD.

5. EPÍLOGO.

El presente estudio de RD experimental en un modelo de ratón mediante la inyección de aloxana pretende demostrar que es un modelo igualmente válido que el modelo realizado en ratas para el estudio de los efectos de la DM en la retina. Este modelo experimental es un modelo de fácil manejo y bastante reproducible, como lo avalan los diferentes estudios presentados por el grupo de Romero J y Miranda M.

El AL es un antioxidante potente que ha demostrado ser eficaz en la prevención y tratamiento de complicaciones crónicas como consecuencia de la microangiopatía de la DM, principalmente a nivel de la neuropatía periférica. En el presente estudio, se pone de manifiesto que el tratamiento con suplementos de AL en este modelo de RD experimental también tiene efectos sobre el desarrollo de la microangiopatía y las alteraciones neuronales que se producen en la retina como consecuencia de la DM. Así pues, el AL disminuye los efectos del estrés oxidativo que se producen en la retina como consecuencia de la hiperglucemia crónica, evita el deterioro de la onda b del ERG que se produce en la RD y por lo tanto, mantiene la función retiniana en valores normales al menos en fases iniciales de la RD y finalmente, reduce el número de células retinianas apoptóticas que se producen en este modelo de RD experimental. Los resultados del tratamiento con AL en ratones DM en cuanto a factores de estrés oxidativo y apoptosis son similares a los obtenidos en modelos de RD en ratas, por lo que este modelo de RD sería un modelo válido para el estudio de la RD y los efectos del AL a nivel retiniano. Los estudios

realizados a nivel funcional mediante la valoración de la onda b del ERG en ratones diabéticos y sus modificaciones con el tratamiento con AL no han sido previamente estudiados, por lo que destacamos el efecto protector del AL a nivel funcional en este modelo de RD experimental. Estudios con un mayor tiempo de duración y en otros modelos de RD experimental serían necesarios para comprobar que los efectos del AL sobre la retina se mantienen a largo plazo y además que el AL es eficaz en otros modelos de RD.

CONCLUSIONES

1. En el modelo de RD experimental en ratones mediante la inyección de aloxana se produce un descenso en los sistemas de defensa antioxidante (glutathion y glutathion peroxidasa) y un aumento de los productos de la peroxidación lipídica (MDA) a nivel de las células retinianas como consecuencia de los mecanismos de estrés oxidativo que se producen en la DM. El tratamiento mediante suplementos de AL previene la alteración de estos sistemas de defensa antioxidante y la peroxidación de lípidos a nivel de las células retinianas en este modelo de RD.

2. En el modelo de RD experimental presentado la amplitud de la onda b del electrorretinograma en ratones diabéticos está disminuida respecto a los ratones control a las tres semanas de instaurar la diabetes. El tratamiento con AL en nuestro estudio ha impedido el deterioro de la onda b del ERG.

3. La expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 no se modifica tras tres semanas de diabetes en este modelo de RD experimental en ratones. El tratamiento con AL no produce alteraciones en la expresión de esta proteína en ratones diabéticos.

4. En el modelo de RD presentado no se detecta una mayor presencia de daño oxidativo a nivel del DNA celular en la retina de los ratones diabéticos respecto a los controles. El tratamiento con AL no modifica el daño oxidativo del DNA en los ratones diabéticos.

5. El modelo de RD experimental en ratones demuestra una tendencia a la apoptosis de las células retinianas de ratones diabéticos mediante la técnica TUNEL de detección de núcleos picnóticos. Tanto el tratamiento con insulina como con AL previenen el aumento de la apoptosis celular que se produce en este modelo de RD. El diseño del estudio sólo permite detectar una tendencia y no una diferencia estadísticamente significativa.

BIBLIOGRAFIA

Abu-El-Asrar AM, Dralands L, Missoten L, Al-Jadaan IA, Geboes K. Expresión of apoptosis markers in the retinas of human subjects with diabetes. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2760-6.

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322-26.

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

Akagi Y, Kador PF, Kuwabara T, Kinoshita JH. Aldose reductase localization in human retinal mural cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1983;24:1516-1519.

Alfaro V, Gómez-Ulla F, Quiroz-Mercado H, Figueroa MS, Villalba S. *Retinopatía Diabética: tratado médico quirúrgico*, 2006. Ed : Mac Line S.L, Madrid (España). ISBN : 84-932744-5-3.

Allsopp TE, Wyatt S, Paterson HF, Davies AM. The proto-oncogene bcl-2 can selectively rescue neurotrophic factor-dependent neurons from apoptosis. *Cell* 1993;73:295-307.

American Diabetes Association : Clinical and practice recommendations. *Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus*. *Diabetes care* 2007;30:S42-S47.

Anwar M, Meki A. Oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats : effects of garlic oil and mealtonin. *Compar Biochem and Physiol Part A* 2003;135:539-47.

Asnaghi V, Gerhaidinger C, Hoehn T, Adboje A, Lorenzi M. A role of polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. *Diabetes* 2003;52:506-11.

Barbara A. Dene, Alice C. Maritim, Ruth A. Sanders, John B. Watkins III. Effects of antioxidant treatment on normal and diabetic rat retinal enzyme activities. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics* 2005;21(1):28-35.

Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW and The Penn State Research Group. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. *J Clin Inves* 1998;102:783-791.

Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidatives stress in Diabetic Complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48:1-9.

Baynes JW, Thorpe SR. The role of oxidative stress in diabetic complications. *Current opinion in endocrinology* 1996;3:277-284.

Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite : implications for endothelial injury form nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1620-24.

Bilska A, Wtodek L. Lipoic acid- the drug of the future?. Pharmacological Reports 2005;57:570-577.

Borenshtein D, Ofri R, Werman m, Stark A, Tritschler H.J, Moeller W, Madar Z. Cataract development in diabetic sand rats treated with α -lipoic acid and its γ -linoleic acid conjugate. Diabetes Metab Res Rev 2001;17:44-50.

Bosch-Morell F, Roma J, Marin N, Romero B, Rodriguez-Galietero A, Johnsen-Soriano S, Diaz-Llopis M, Romero FJ . Role of oxygen and nitrogen species in experimental uveitis: anti-inflammatory activity of the synthetic antioxidant ebselen. Free Radic Biol Med. 2002 Sep 1;33:669-75.

Bosch-Morell F, Roma J, Puertas FJ, Marin N, Díaz-Llopis M, Romero FJ. Efficacy of the antioxidant ebselen in experimental uveitis. Free Radical Biol Med 1999;27:388-391.

Bourbon A, Vionnet M, Leprince P, Copeland J, McDonagh P, Debre P, Gandjbakhch I. The effect of methylprednisolones treatment on the cardiopulmonary by- pass induced systemic inflammatory response. Eur J Cardiothorac Surg 2004;26:932-8.

Burkart V, Koike T, Brenner H, Imai Y, Kolb H. Dihydrolipoic acid proetects pancreatic islet cells from inflammatory attack. Agents and Actions 1993;38:60-65.

Bursell SE, Clermont AC, Aiello LP, Aiello LM, Schlossman DK, Feener EP, Laffel L, King GL. High-dose vitamin E supplementation normalizes retinal blood flow and creatinine clearance in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 1999;22:1245-51.

Burton GW, Joyce A, Ingold KU. Is vitamin E the only lipid-soluble, chain-breaking antioxidant in human blood plasma and erythrocyte membranes?. *Arch Biochem Biophys*. 1983;221:281-90.

Buttke TM, Sandstrom PA. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol Today* 1994;15:7-10.

Cacicedo M, Benjachareowong S, Chou E, Ruderman N, Ido Y. Palmitate-induced apoptosis in cultured bovine retinal pericytes. Roles of NAD(P)H oxidase, oxidant stress, and ceramide. *Diabetes* 2005;54:1838-1845.

Cameron NE, Cotter MA, Horrobin DH, Tritschler HJ. Effect of α -lipoic acid on neurovascular function in diabetic rats : interaction with essential fatty acids. *Diabetologia* 1998; 41:390-399.

Carlson MG, Campbell PJ. Intensive insulin therapy and weight gain in T1DM. *Diabetes* 1993;42:1700-07.

Carreau J.P. Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Meth Enzymol* 1979;62:152-158.

Carter CA, Kane CJ. Therapeutic potential of natural compounds that regulate the activity of protein kinase C. *Curr Med Chem*. 2004 ;11:2883-902.

Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ. Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. New prospect for prevention of diabetic complications? *Diabetes Care*. 1991 Jan;14(1):68-72.

Ceriello A, Motz E. Is oxidative stress the pathogenic mechanism underlying insulin resistance, diabetes, and cardiovascular disease? The common soil hypothesis revisited. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:816-23.

Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a "casual" antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003;26:1589-96.

Ceriello A. Oxidative stress and glycemic regulation. *Metabolism* 2000;49:27-29.

Craven PA, DeRubertis FR, Kagan VE, Melhem M, Studer RK. Effects of supplementation with vitamin C or E on albuminuria, glomerular TGF-beta, and glomerular size in diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:1405-14.

Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF, Downey JM. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Moll Cell Cardiol* 1985;17:145-52

Chantelau E, Volaco A, Meyer-Schwickerath R. New insights into the pathogenesis of diabetic reinopathy – hormonal rather than metabolic factors are important. *Vasa* 2004;33:205-10.

Chao DT, Korsmeyer SJ. Bcl-2 family: regulators of cell death. *Ann Rev Imm* 1998;16:395-419.

Chappey O, Dosquet C, Wautier MP, Wautier JL. Advanced glycation end products, oxidant stress and vascular lesions. *European Journal of Clinical Investigation* 1997;27:97-108.

Chartow B. Advances in diabetes for the millennium : vitamins and oxidants stress in diabetes and its complications. *Med Gen Med* 2004;6:4.

Chidlow G, Schmidt KG, Wood JP, Melena J, Osborne NN. Alpha-lipoic acid protects the retina against ischemia-reperfusion. *Neuropharmacology* 2002;43:1015-1025.

Dagnelie G, Zorge IS, McDonald TM. Lutein improves visual function in some patients with retinal degeneration: a pilot study via the Internet. *Optometry* 2000;71:147-64.

DCCT (Diabetes control and complications trial research group). The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993;329:977-986.

DiLeo MAS, Caputo S, Falsini B, Pociatti V, Greco AV, Ghirlanda G. Presence and further development of retinal dysfunction after 3-year follow-up in IDDM patients without angiographically documented vasculopathy. *Diabetologia* 1994;37:911-916.

Diplock AT. The role of vitamin E in biological membranes. *Ciba Found Symp.* 1983;101:45-55.

Doly M, Droy-Lefaix MT, Braquet P. Oxidative stress in diabetic retina. *EXS* 1992;62:299-307.

Doly M, Droy-Lefaix M-T. Lipid peroxidation in the pathology of the retina. En : L.Packer, L. Prilipko, Y.Christen (Eds). *Free radical in brain aging. Neurological and mental disorders.* 1992. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Dringen R. Glutathione metabolism and oxidative stress in neurodegeneration. *Eur J Biochem* 2000;267:4903.

Du Y, Smith MA, Miller CM, Kern TS. Diabetes-induced nitrate stress in the retina, and correction by aminoguanidine. *J Neurochem* 2002;80:771-9.

Early photocoagulation for diabetic retinopathy. ETDRS report number 9. Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Ophthalmology. 1991 May;98:766-85.

Early Treatment Diabetic Retinopathy Study Research Group. Grading diabetic retinopathy from stereoscopic color fundus photographs-an extension of the modified Airlie House classification. EDTRS Report Number 10. Ophthalmology 1991;98:786-806.

Esterbauer H, Jörg Schaur R, Zollner H. chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. Free radical biol med 1991;11:81-128.

European Diabetes Policy Group. A desktop guide to type 2 diabetes mellitus. Diabetic Med 1999;16:716-730.

Fahey RC, Buschbacher RM, Newton GL. The evolution of glutathione metabolism in phototrophic microorganisms. J Mol Evol 1987;25:81-8.

Farreras, Rozman. Medicina Interna vol. II, 1998. Ed : Harcourt Brace S.A, Madrid (España). ISBN : 84-8174-108-6.

Feit-Leichman RA, Kinouchi R, Takeda M, Fan Z, Mohr S, Kern TS, Chen DF. Vascular damage in a mouse model of diabetic retinopathy: relation to neuronal and glial changes. Invest Ophthalmol Vis Sci 2005;46:4281-7.

Figuerola D, Reynolds E. Diabetes Mellitus. En Farreras, Rozman, Medicina Interna volumen II, 1998;sección 15;1933-64. Harcourt Brace de España SA.

Fillebeen C, Pantopoulos K. Redox control of iron regulatory proteins. Redox Rep 2002;7:15-22.

Fong DS, Aiello LP, Ferris FL 3rd, Klein R. Diabetic Retinopathy. Diabetes Care 2004;27:2540-53.

Fridovich I. Superoxide radical : an endogenous toxicant. Ann Rev Pharmacol Toxicol 1983;23:239-57.

Gabig TG, Babior BM. The O₂(-) forming oxidase responsible for the respiratory burst in human neutrophils. Properties of the solubilized enzyme. J Biol Chem 1979;254:9070-974.

Gaucher D, Chiappore JA, Pâques M, Simonutti M, Boitard C, Sahel JA, Massin P, Picaud S. Microglial changes occur without neural cell death in diabetic retinopathy. Vision Res 2007;47:612-23.

Gazis A, Page S, Cockcroft J. Vitamin E and cardiovascular protection in diabetes. BMJ. 1997;314:1845-6.

Giardino I, Fard AK, Hatchell DL, Brownlee M. Aminoguanidine inhibits reactive oxygen species formation, lipid peroxidation and oxidant-induced apoptosis. *Diabetes* 1998;47:1114-1120.

Gillies MC, Sutter FK, Simpson JM, Larsson J, Ali H, Zhu M. Intravitreal triamcinolone for refractory diabetic macular edema: two-year results of a double-masked, placebo-controlled, randomized clinical trial *Ophthalmology*. 2006 Sep;113:1533-8.

Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and vascular diabetic complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-67.

Goraca A, Józefowicz-Okonkwo G. Protective effects of early treatment with lipoic acid in LPS-induced lung injury in rats. *Journal of physiology and pharmacology* 2007;58:541-549.

Grant M, Afzal A, Spoeri P, Pan H, Shaw L, Mames R. The role of growth factors in the pathogenesis of diabetic retinopathy. *Expert Opin Invest Drugs* 2004;13:1275-93.

Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309-12.

Guidry C. The role of Müller cells in fibrocontractive retinal disorders. *Prog Retin Eye Res* 2005;24:75-86.

Gupta A, Gupta Y, Thapar S, Bhansali A. Lipid-lowering drug atorvastatina as adjunct in the management of diabetic macular edema. *Am J Ophthalmol* 2004;137:675-82.

Haffner S. Clinical relevance of oxidative stress concept. *Metabolism* 2000;49:30-34.

Halliwell B, Gutteridge JM. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. *Arch Biochem Biophys*. 1986;246:501-14.

Halliwell B. Oxidative stress markers in human disease : application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. En : *Antioxidants in diabetes management*. Packer L, Rösen P, Tritschler HJ, King GL, and Azzi A. Eds., New York : Marcel Dekker, 2000, pp 33-52.

Halliwell B., Whiteman M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture : how should you do it and what do the results mean?. *British Journal of Pharmacology* 2004;142:231-255.

Hancock H.A, Kraft T.W. Oscillatory potential analysis and electrorretinogram of normal and diabetic rats. *Inves Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1002-1008.

Handelman GJ, Dratz EA, Reay CC, van Kuijk JG. Carotenoids in the human macula and whole retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1988 ;29:850-5.

Haramaki N, Packer L, Assadnazari A, Zimmer G. cardiac recovery during postischemic reperfusion is improved by combination of vitamin E with dihydrolipoic acid. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;196:1101-1107.

Hardy K, Hunt NH. Effects of a redox-active agent on lymphocyte activation and early gene expression patterns. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1550-63.

Haritoglou C, Kook D, Neubauer A, Wolf A, Priglinger S, Strauss R, Gandorfer A, Ulbig M, Kampik A. Intravitreal bevacizumab (Avastin) therapy for persistent diffuse diabetic macular edema. *Retina*. 2006 Nov-Dec;26:999-1005.

Hartnett ME, Stratton RD, Browne RW, Rosner BA, Lanham RJ, Armstrong D. Serum markers of oxidative stress and severity of diabetic retinopathy. *Diabetes care* 2000;23:234-240.

Hauner H. The impact of pharmacotherapy on weight management in type 2 diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 1999;23:S12-7.

Henriksen EJ; Jacob S; Tritscher H; Wellel K; Agustin H.J; Dietze G.j. chronic thioctic acid treatment increases insulin-stimulated glucose transport activity in skeletal muscle of obese Zucker rats. *Diabetes suppl* 1994;1:122A.

Hermenegildo C, Raya A, Romá J, Romero FJ . Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* 1993;18:893-896.

Hermenegildo C, Raya A, Romá J, Romero FJ. Decrease glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* 1993;18:893-96.

Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism: protective effects of an antioxidant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 24;100:7919-24.

Hockenbery DM, Oltavi ZN, Yin X-M, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* 1993;75:241-251.

Hohmann TC, Banis D, Basso M, Cotter MA, Cameron NE. Resistance to increased oxidative stress is decreased in experimental diabetic neuropathy. *J. Periph. Nerv. Syst.* 1997;2:272.

Holopigian k, Greenstein N.C, Seiple W, Hood D.C, Carr R.E. Evidence of photoreceptor changes in patients with diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2355-65.

Holopigian K, Seiple W, Lorenzo M, Carr R. A comparison of photopic and scotopic electroretinographic changes in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992;33:2773-2780.

Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-KL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:4386-91.

Jacob AN, Salinas K, Adams-Huet B, Raskin P. Potential causes of weight gain in type 1 diabetes mellitus. *Diabetes Obes Metab* 2006;8:404-11.

Jacob S; Henriksen EJ; Tritschler HJ; Augustin HJ; Dietze GJ. Improvement of insulin-stimulated glucose-disposal in type 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic acid. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*. 1996;104:284-8.

Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free radical biol med* 1990;9:515-540.

Jareño EJ, Romá J, Romero B, Marin N, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Marselou L, Romero FJ. Serum malondialdehyde correlates with therapeutic efficiency of high activity antiretroviral therapies (HAART) in HIV-1 infected children. *Free Radic Res* 2002;36:341-44.

Johnson EJ, Hammond BR, Yeum KJ, Qin J, Wang XD, Castaneda C, Snodderly DM, Russell RM. Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. *Am J Clin Nutr*. 2000 Jun;71(6):1555-62.

Johnson EJ, Hammond BR, Yeum KJ, Qin J, Wang XD, Castaneda C, Snodderly DM, Russell RM. Relation among serum and tissue concentrations of lutein and zeaxanthin and macular pigment density. *Am J Clin Nutr.* 2000 Jun;71:1555-62.

Jonas EA, Knox RJ, Smith TC, Wayne NL, Connor JA, Kaczmarek LK. Regulation by insulin of a unique neuronal Ca²⁺ pool and of neuropeptide secretion. *Nature* 1997;385:343-6.

Kagan VE, Shvedova AA, Novikov KN, Kozlov YP. Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retina. *Biochem Biophys Acta* 1973;330:76-9.

Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophysiology* 2000;7:153-163.

Kas J, Blattna J. Phospholipids in foodstuffs. *Acta Univ Carol (Med)* 1986;32:81-92.

Kaym A, Telci A, Abeiz I, Belce A, Atug T. Comparison of the metabolic and antioxidant effects of diazem and vitamin E on streptozotocin-diabetic rats. *J Vet Med A Physiol Pathl Clin Med* 2004;51:265-7.

Kern TS, Kowluru RA, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia: ATPases and glutathione. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994;35:2962-7.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972 Aug;26:239-57.

Kim J, Rushovich EH, Thomas TP, Ueda T, Agranoff BW, Greene DA. Diminished specific activity of cytosolic protein kinase C in sciatic nerve of streptozotocin-induced diabetics rats and its correction by dietary myo-inositol. *Diabetes* 1991;40:1545-1554.

Kishi Y, Schemelzer JD, Yao JK, Zollman PJ, Nickander KK, Tritschler J, Philip A. Low α -lipoic acid: effect on glucose uptake, sorbitol pathway, and energy metabolism in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1999;48:2045-2051.

Kosower NS, Kosower E. The glutathione status of cells. *Int Rev Cytol* 1978;54:109-160.

Kowluru RA, Kern TS, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or experimental galactosemia IV. Antioxidant defense system. *Free Radical Biol Med* 1997;22:587-92.

Kowluru RA, Koppolu P, Chakrabarti S, Chen S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free Radic Res* 2003;37(11):1169-1180.

Kowluru RA, Odenbach S. Effect of long-term administration of α -lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes* 2004;53:3233-3238.

Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. *Diabetes* 2001;50:1938-42.

Kowluru RA. Effect of advanced glycation end products on accelerated apoptosis of retinal capillary cells under in vitro conditions. *Life Sci* 2005;76:1051-1060.

Kowluru RA. Retinal metabolic abnormalities in diabetic mouse: comparison with diabetic rat. *Current Eye Research* 2002;24:123-28.

Koya D, Lee IK, Ishii H, Kanoh H, King GL. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. *J Am Soc Nephrol*. 1997;8:426-35.

Kusner LL, Sarthy VP, Mohr S. Nuclear translocation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase : a role in high glucose-induced apoptosis in retinal Muller cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:1553.61.

Lafuente López-Herrera M. Retinopatía diabética. Enfoque endocrinológico y sistémico. Fisiopatología. En : Retinopatía diabética. Tratado médico quirúrgico. Ed MAC LINE SL, 2005, pag 21-30. ISBN: 84-932744-5-3.

Larger E. Weight gain and insulin treatment. Diabetes Metab 2005;31:4S51-4S56.

Lattanzio R, Brancato R, Pierro L. et al. Macular thickness measured by optical coherence tomography (OCT) in diabetic patients. Eur J Ophthalmol 2002;12(6):482-7.

Lawrence RA, Parkhill LK, Buró RF. Hepatic cytosolic non-selenium dependent glutathione peroxidase activity : is nature and the effect of selenium deficiency. J Nutr 1978;108:981-987.

Lenzen S, Panten U. Alloxan: history and mechanism of action. Diabetologia 1988;31:337-342.

Lesmasters JJ, DiGuseppi J, Nieminen AL, Herman B. Blebbing, free Ca²⁺ and mitochondrial membrane potential preceding cell death in hepatocytes. Nature 1987;325:78-81.

Levine M. New concepts in the biology and biochemistry of ascorbic acid. N Engl J Med. 1986;314:892-902

Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I. Early retinal damage in experimental diabetes : electroretinographical and morphological observations. *Exp Eye Res* 2002;74:615-25.

Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA and The Penn State Retina Research Group. Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Exp Ophthalmol* 2000;28:3-8.

Lin J, Bierhaus A, Bugert P, Dietrich N, Feng Y, Hagen F, Nawroth P, Brownlee M, Hammes HP. Effect of R-(+)- α -lipoic acid on experimental diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2006;49:1089-1096.

Lorenzi M, Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia*. 2001;44:791-804.

Lowitt S, Malone J, Salem A, Kozak W, Orfalian Z. Acetyl-L-carnitine corrects electroretinographic deficits in experimental diabetes. *Diabetes* 1993;42:1115-1118.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.

Manea A, Constantinescu Elena, Popov Doina, Raicu Monica J. Changes in oxidative balance in rat pericytes exposed to diabetic conditions. *Cell. Mol. Med.* 2004;8:117-126.

Marchioli R, Schweiger C, Levantesi G, Tavazzi L, Valagussa F. Antioxidant vitamins and prevention of cardiovascular disease: epidemiological and clinical trial data. *Lipids*. 2001;36:S53-63.

Maritim AC; Sanders RA; Watkins III JB. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Nutritional Biochemistry* 2003;14:288-294.

Martin PM, Roon P, Van Ells TK, Ganapathy V, Smith SB. Death of retinal neurons in streptozotocin-induced diabetic mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004;45:3330-6.

Mayer B, Hemmens B. Biosynthesis and action of nitric oxide in the mammalian cells. *Trends Biochem Sci* 1997;22:477-81.

Meister A, Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983;52:711-60.

Miranda M, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Araiz J, Roma J, Romero FJ. Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy : treatment with antioxidants. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004;79:289-94.

Mizutani M, Gerhardinger C, Lorenzi M. Müller cell changes in human diabetic retinopathy. *Diabetes* 1998;47:445-450.

Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of reinal microvascular ceells in human and experimental diabetic reinopathy. *J Clin Invest* 1996;97:2883-2890.

Mordes JP, Rossini AA. Animal models of diabetes. *Am J Med* 1981;70:353-60.

Mullan B, Ennis C, Fee H, Young I, McCane D. Protective effects of ascorbic acid on arterial hemodynamics during acute hyperglycemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:1262-1268.

Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E,Almansa I, Romero FJ, Miranda M. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med*. 2006 Sep 15;41(6):979-84.

Nawroth PP, Borcea V, Bierhaus A, Joswig M, Shiekofer S, Tritschler HJ. In : *Antioxidants in diabetes management*. Packer L, Rösen P, Tritschler HJ, King GL, Azzi A. Eds., New York : Marcel Decker 2000:185-204.

Ning X, Baoyu Q, Yuzhen L, Shuli S, Reed E, Li QQ. Neuro-optic cell apoptosis and microangiopathy in KKAY mouse retina. *Int J Mol Med* 2004;13:87-92.

Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radical Biol Med* 1988;5:113-124.

Obrosova IG, Drel VR, Kumagai AK, Szábo C, Pacher P, Stevens MJ. Early diabetes-induced biochemical changes in the retina: comparison of rat and mouse models. *Diabetologia* 2006;49:2525-33.

Obrosova IG, Lamia Fathallah, Douglas A. Greene. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina : effect of DL- α -lipoic acid. *Eur J pharmacol* 398:139-146,2000

Okutan H, Ozcelik N, Ramazan Yilmaz H, Uz E. Effects of caffeic acid phenethyl ester on lipid peroxidation and antioxidant enzymes in diabetic rat heart. *Clin Biochem* 2005;38:191-196.

Olmedilla B, Granado F, Blanco I, Vaquero M. Lutein, but not alpha-tocopherol, supplementation improves visual function in patients with age-related cataracts: a 2-y double-blind, placebo-controlled pilot study. *Nutrition*. 2003;19:21-4.

Olmedilla B, Granado F, Gil-Martinez E, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem*. 1997;43:1066-71.

Oltvai Z, Millman C, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.

Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetic complications. *Nutrition* 2001;17:888-895.

Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1995;19(2):227-250.

Palmowski AM, Sutter EE, Bearse Jr. MA, Fung W. Mapping of retinal function in diabetic retinopathy using the multifocal electroretinogram. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2586-2596.

Parisi V, Uccioli L, Monticone G, Parisi L, Manni G, Ippoliti D, Menzinger G, Bucci MG. Electrophysiological assessment of visual function in IDDM patients. *Electroencephalography and clinical neurophysiology* 1997;104:171-179.

Park SH, Park JW, Park SK, Kim KY, Chung JW, Chun MH, Oh SJ. Apoptotic death of photoreceptors in the streptozotocin-induced diabetic rat retina. *Diabetologia* 2003;46:1260-1268.

Patel M. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress : cause and consequence of epileptic seizures. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1951-62.

Poitry-Yamate CL, Poitry S, Tsacopoulos M. Lactate released by Müller glial cells is metabolized by photoreceptors from mammalian retina. *J Neurosci* 1995;15:5179-91.

Polidori MC, Mecocci P, Stahl W, Parente B, Cecchetti R, Cherubini A, Cao P, Sies H, Senin U. Plasma levels of lipophilic antioxidants in very old patients with type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev.* 2000;16:15-9.

Prehn JH, Karkoutly C, Nuglisch J, Peruch B, Krieglstein J. Dihydrolipoate reduces neuronal injury after cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 1992;12:78-87.

Pryor A, Stanley P. A suggested mechanism for the production of malondialdehyde during the autooxidation of polyunsaturated fatty acids. Nonenzymatic production of prostaglandin endoperoxides during autooxidation. *J Org Chem* 1975;40:3615-3617.

Puertas FJ, Diaz-Llopis M, Chipont E, Roma J, Raya A, Romero FJ. Glutathione system of human retina: enzymatic conjugation of lipid peroxidation products. *Free Radical Biol Med* 1993;14:549-51.

Pulido, JS. Retinopatía diabética (2003). En *Retina, coroides y vítreo. Los requisitos en oftalmología*. Ed. Elsevier. España S.A. Madrid. ISBN : 84-8174-580-4.

Purnell JQ, Weyer C. Weight effect of current and experimental drugs for diabetes mellitus: from promotion to alleviation of obesity. *Treat Endocrinol* 2003;2:33-47.

Racine J, Joly S, Rufiange M, Rosolen S, Casanova C, Lachapelle P. The photopic ERG of the albino guinea pig (*Cavia porcellus*): a model of the human photopic ERG. *Doc Ophthalmol*. 2005 Jan;110(1):67-77.

Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. High performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Analytical Biochemistry* 1980; 106:55-62.

Reed JC. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1997;34:9-19.

Reed JC. Double identity for proteins of the Bcl-2 family. *Nature* 1997;387:773-6.

Reed L.J. The chemistry and function of lipoic acids. *Adv Enzymol* 1957;18:319-347.

Reed L.J; DeBusk B.G; Gunsalus I.C; Homberger Jr.C.S. Crystalline α -lipoic acid : a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* 1951;114:93-94.

Renard ER. Insulin Substitution: new insulins, new modes of delivery. *J Soc Biol*. 2007;201(2):141-8.

Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High performance liquid chromatography separation of malondialdehyde thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cell) using a commercially available reagent. J Chromatogr 1992;577:9-18.

Richer S, Stiles W, Statkute L, Pulido J, Rudy D. The lutein antioxidant supplementation trial (LAST). Proceedings of the association for Research in Vision and Ophthalmology. Ft Lauderdale, 2002 FI, P.B539.

Robertson JM, Donner AP, Trevithick JR. Vitamin E intake and risk of cataracts in humans. Ann N Y Acad Sci. 1989;570:372-82.

Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. The Journal Of Biological Chemistry 2004;279:42351-54.

Romero FJ, Roma J. Careful consideration of the effects induced by glutathione depletion in rat liver and heart. The involvement of cytosolic and mitochondrial glutathione pools. Chem Biol Interact 1989;70:29-37.

Roy RS, McCord JM. Superoxide and ischemia : conversion of XD to XO. En : Greenwald R; Cohen, G; eds. Oxy radical and their scavenger system (vol 2). Cellular and molecular aspects. New York 1983: Elsevier Science : 145-53.

Roy S, Packer L. Redox regulation of cell functions by α -lipoate : biochemical and molecular aspects. *BioFactors* 1998;8:17-21.

Roy S, Sen CK, Tritschler H, Packer L. Modulation of cellular reducing equivalent homeostasis by alpha-lipoic acid : mechanisms and implications for diabetes and ischemic injury. *Biochem Pharmacol* 1997;53:393-399.

Rungger-Brändle E, Dorso AA, Leuenberger PM. Glial reactivity, an early feature of diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1971-1980.

Sakai H, Tani Y, Shirasawa E, Shirao Y, Kawasaki K. Development of electroretinographic alterations in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Ophthalmic Res* 1995;27:57-63.

Sanz MM, Johnson LE, Ahuja S, Ekström PA, Romero J, van Veen T. Significant photoreceptor rescue by treatment with a combination of antioxidants in an animal model for retinal degeneration. *Neuroscience* 2007;145:1120-9.

Schendel S, Montal M, Reed JC. Bcl-2 family proteins as ion channels. *Cell Death Diff* 1998;5:372-80.

Schramm H, Robertson LW, Oesch F. Differential regulation of hepatic glutathione transferase and glutathione peroxidase activities in the rat. *Biochem Pharmacol* 1985;343:3735-39.

Schwartz SG, Flynn HW Jr. Pharmacotherapies for diabetic retinopathy: present and future. *Exp Diabetes Res.* 2007;52487.

Sen CK, Packer L. Antioxidante and redox regulation of gene transcription. *FASEB J* 1996;10:709-720.

Sen CK, Roy S, Packer L. Involvement of intracellular Ca^{2+} in oxidant-induced NF-kB activation. *FEBS Lett* 1996;385:58-62.

Serbinova E, Khwaja S, Rznickk A, Packer L. thiotic acid protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused Langendorff heart. *Free Rad Res Comms.* 1992;17:49-58.

Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbtt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med.* 2000;27:343(4):230-8.

Shepherd PR, Kahn BB. Glucose transporters and insulin action. *New Eng J Med* 1999;341:248-257.

Shin DH, Lee HY, Lee HW, Kim HJ, Lee E, Cho SS, Baik SH, Lee KH. In situ localization of p53, bcl-2 and bax mRNAs in rat ocular tissue. *NeuroReport* 1999;10:2165-7.

Sies H, Murphy ME. Role of tocopherols in the protection of biological systems against oxidative damage. *J Photochem Photobiol B*. 1991;8:211-8.

Sies H. ed. *Oxidative stress : oxidants and antioxidants*. London : Academic Press. 1991.

Silver RD. Diabetes and its microvascular complications : Basic concepts and practical solutions. *Canadian Diabetes* 1998;11,nº1.

Simonsen SE. The value of the oscillatory potential in selecting juvenile diabetics at risk of developing proliferative retinopathy. *Acta Ophthalmol* 1980;58:865-78.

Snodderly DM. Evidence for protection against age-related macular degeneration by carotenoids and antioxidant vitamins. *Am J Clin Nutr*. 1995;62:1448S-1461S.

Stall W, Sies H. Antioxidant defense : vitamins E and C and carotenoids. *Diabetes* 1997;46:S14-18.

Stitt AW, Hughes SJ, Canning P, Lynch O, Frizzell N, Thorpe SR, Curtis TM, Gardiner TA. Substrates modified by advanced glycation end-products cause dysfunction and death in retinal pericytes by reducing survival signals mediated by platelet-derived growth factor. *Diabetologia* 2004;47:1735-46.

Sujak A, Gabrielska J, Grudzinski W, Borc R, Mazurek P, Gruszecki WI. Lutein and zeaxanthin as protectors of lipid membranes against oxidative damage: the structural aspects. *Arch Biochem Biophys*. 1999 ;371:301-7.

Svensk AM, Soini Y, Paakko P, Hiravikoski P, Kinnula VL. Differential expression of superoxide dismutases in lung cancer. *Am J Clin Pathol* 2004;122:395-404.

Telfer JF, Brock JH. Proinflammatory cytokines increase iron uptake into human monocytes and synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Med Sci Monit* 2004;10:BR91-5

The DCCT Research Group. Weight gain associated with intense therapy in the Diabetes Control and Complications Trial. *Diabetes Care* 1988;11:567-73.

The Wisconsin Epidemiologic Study of Diabetic Retinopathy:XVII. The 14-year incidence and progression of diabetic retinopathy and associated risk factors in type 1 diabetes. *Ophthalmology* 1993;100:1125-1131.

Touyz RM. Reactive oxygen species, vascular oxidative stress, and redox signaling in hypertension : what is the clinical significance?. *Hypertension* 2004;44:248-52.

Traverso M, Menini S, Odetti P. Lipoperoxidation in hepatic subcellular compartments of diabetic rats. *Free Radical Biol Med* 1999;26:538-547.

Trush MA, Mimmaugh EG, Gram TE. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates. Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity. *Biochem Pharmac* 1982;31:3335.

Tzekov R, Arden G.B. The electrorretinogram in diabetic retinopathy. *Surv Ophthalmol* 1999;44:53-60.

UKPDS (The United Kingdom Prospective Diabetes Study) : tight blood pressure control and risk macorvascular and microvascular complications in type 2 diabetes. *BMJ* 1998;317:703-17.

Ursini F, Maiorino M, Valente M, Ferri L, Gregolin C. Purificatgion from pig liver of a protein which portects liposomes adn bioemembranes from peroxidative degradation and exhibits glutathione peroxidase activity on phosphatidylcholine hydroperoxides. *Biochem Biophys Acta* 1982;710:197-211.

Van Vleet JF, Boom GD, Ferrans VJ. Induction of lesions of selenium-vitamin E deficiency in ducklings fed silver, cooper, cobalt, tellurium, cadmium, or zinc : protection by selenium or vitamin E supplements. *Am J Vet Res* 1981;42:1206-17.

Voll CL, Auer RN. Insulin attenuates ischemic brain damage independent of its hypoglycemic effect. *J Cereb Blood Flow Metab* 1991;11:1006-14.

Whitten KW, Gailey KD. *Química general* (1ªed). México DF : Nueva editorial Interamericana. 1985.

Wilkinson CP, Ferris F, Klein R, Lee P, Agardh CD, Davis M, Dills D, Kampik A, Parajasegaram R, Verdaguer TJ. Proposed international clinical diabetic retinopathy and diabetic macular edema disease severity scales. *Ophthalmology* 2003;110:1667-1682.

Wilson RL. Hydroxyl radicals and biological damage in vitro : what relevance in vivo?. En : 65, C.F.S.(eds.) *Oxygen free radicals* 1979. Ed. Excerpta Medica, Amsterdam, pp:19-35.

Winyard PG, Morris CJ, Winrow VR, Zaidi M, Blake D. Free radical pathways in the inflammatory response. En Rice-Evans CA, Burdon, RH. Eds. *Free radical damage and its control*. Amsterdam : Elsevier Science 1994;BV :361-383.

Wolf M, Cautrecasas P, Sahyoun N. Interaction of protein kinase C with membranes is regulated by Ca²⁺, phorbol esters and ATP. *J Biol Chem* 1985;260:15718-81.

Wolf SP. Transition metals and oxidative stress in the complications of diabetes. In: Gries FA, Wessels K, eds. *The role of anti-oxidants in Diabetes Mellitus*. Frankfurt am Main: pmi Verlagsgrupe 1993:82-101.

Yin XM. Signal transduction mediated by Bid, a pro-death Bcl-2 family proteins, connects the death receptor and mitochondria apoptosis pathways. *Cell Res* 2000;10:161-7.

Yoshida A, Kojima M, Ogasawara H, Ishiko S. Oscillator potentials and permeability of the blood-retinal barrier in noninsulin-dependent diabetic patients without retinopathy. *Ophthalmology* 1991;98:1266–71.

Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. *Arch Biochem Biophys*. 2001;385:20-7.

Zaia JA. The status of gene vectors for the treatment of diabetes. *Cell Biochem Biophys* 2007;48:183-90.

Zimmerman MC, Lazartigues E, Lang JA, Sinnayah P, Ahmad IM, Spitz DR, Davisson RL. Superoxide mediates the actions of angiotensin II in the central nervous system. *Circ Res* 2002;91:1038-45.

PUBLICACIONES

1. PENDIENTE DE PUBLICACION EN LA REVISTA FREE RADICAL RESEARCH.

e-mail de aceptación

Dear Dr. Romero

The manuscript ID GFRR-2008-0059 entitled "**Early lipoic acid intake protects retina of diabetic mice**" which you submitted to Free Radical Research, has been reviewed. The comments of the reviewer(s) are included below.

The reviewer(s) have recommended publication, but also request some minor revision of your manuscript.

Because we are trying to facilitate timely publication of manuscripts submitted to Free Radical Research, your revised manuscript should be uploaded as soon as possible. If it is not possible for you to submit your revision within 30 days, we may have to consider your paper as a new submission.

Once again, thank you for submitting your manuscript to Free Radical Research and I look forward to receiving your revision.

Yours sincerely

Early lipoic acid intake protects retina in diabetic mice.

Siv Soriano-Johnsen †, Maria Garcia-Pous †, Emma Arnal, Maria Sancho-Tello, Salvador Garcia-Delpech, Maria Miranda, Francisco Bosch-Morell, Manuel Diaz-Llopis, Amparo Navea, Francisco Javier Romero

† both authors contributed equally to this article.

Fundación Oftalmológica del Mediterráneo

Purpose: The aim of this study was to test the effect of lipoic acid treatment on the retina after a short diabetic insult. **Method:** Diabetes was induced by alloxan and mice were divided into subgroups; control, diabetic, diabetic+insulin, all treated +/- lipoic acid (100 mg/kg body weight) for 3 weeks. GSH content, MDA concentration, GPx activity were measured and electroretinograms (ERG) were recorded. **Results:** Early administration of lipoic acid to diabetic mice prevented the statistically significant decrease in GSH content and GPx activity and normalized MDA concentration, when compared to non-treated mice. Moreover, lipoic acid restored b-wave amplitude in diabetic animals to control values. **Conclusions:** Lipoic acid has a protective effect on the retina but must be administered as early as possible in order to prevent oxidative damage.

INTRODUCTION

Diabetic eye disease is a group of eye problems that may occur as a complication of diabetes. Diabetic eye disease includes Diabetic retinopathy, Cataract and Glaucoma. All can cause severe vision loss or even blindness. Extensive research has been carried out in order to find better ways to detect, treat, and prevent vision loss in people with diabetes. In spite of all this research, diabetic retinopathy remains difficult to prevent and treat. Therapeutic approaches in patients with or at risk for diabetic retinopathy include drug therapy to reduce modifiable risk factors, laser photocoagulation, and intraocular surgery [1], but none of these therapeutic options are

fully satisfactory. Thus, the maintenance of a tight control of blood sugar levels [1] [2] and elevated blood pressure [3] [4] remains as one of the most effective options to slow the onset and progression of retinopathy.

The retina has high content of polyunsaturated fatty acids and has the highest oxygen uptake and glucose oxidation rate than any other tissue. This phenomenon makes retina highly susceptible to oxidative stress [5]. Correlation between hyperglycemia, changes in the redox homeostasis, and oxidative stress have been suggested to be key events in the pathogenesis of diabetic retinopathy [6]. Experimental [7] [8] as well as clinical studies [9,10] have demonstrated that oxidative stress contributes to the development of diabetic retinopathy. Oxidative stress has also been involved in the resistance of retinopathy to reverse once good glycemic control is recovered, known as the “metabolic memory phenomenon” [11]. This phenomenon is attributed to an accumulation of damaged molecules and reactive oxygen species (ROS) that are not easily removed, even after good glycemic control is reestablished. Therefore it would be an interesting therapeutic option to protect the diabetic patients at risk for developing retinopathy, from oxidative damage in a preventive manner. Thus, in this report we studied the effect of the antioxidant lipoic acid on early signs of diabetic retinopathy related to oxidative stress such as, diminished glutathione (GSH) levels, decreased antioxidant defence enzymes as glutathione peroxidase (GPx activity), and increased membrane lipid peroxidation.

Lipoic acid is an antioxidant capable of thiol-disulfide exchange. It is able to scavenge ROS and reduces metabolites such as GSH to maintain a healthy cellular redox state [12]. It distributes to the mitochondria and serves as a critical cofactor for mitochondrial enzyme complexes, and is regenerated via glycolytic flux. It is known that lipoic acid supplementation prevents diabetes-induced activation of NF- κ B and also

decreases the number of apoptotic capillary cells in experimental models of diabetic retinopathy [13,14]. Lipoic acid is a well studied antioxidant and has been used for over 30 years in Germany for treatment of diabetes-induced neuropathy [15].

In addition to its antioxidant capacity, lipoic acid has earlier been reported to increase tissue sensitivity to insulin and lower glycemia level [16,17], probably by increasing glucose uptake in muscle and fat cells through the insulin-signalling cascade [18] [19]. An effect of lipoic acid on metabolism of GSH has also been reported, where administration of lipoic acid in vitro increased de novo synthesis of cellular GSH [20].

However, the effects of lipoic acid on early changes of oxidative stress markers in diabetic retina have not yet been studied. Since protecting the tissue from oxidative stress has been showed to hinder apoptosis, and thereby ameliorating diabetic retinopathy [13], we decided to study the effect of this antioxidant in a preventive manner. Therefore, our aim was to assess the possible protective effect of lipoic acid on the early signs of diabetic-induced oxidative damage in mice retina.

MATERIALS AND METHODS

Experimental design

Male albino mice weighting 25-30 g (Harlan Iberica SL, Barcelona, Spain) were housed in a temperature- and humidity-controlled room with a 12-hour light/dark cycle (less than 100 cds/m² luminance during the light phase) and were provided with food and water ad libitum. All animal manipulations were done according to international regulations of European Economic Community (directive 86/608/CEE) and ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology). Mice were randomly assigned to diabetic and control groups. Baseline random blood glucose concentrations were measured with a glucometer (Precision PCx; Medisence, Cambridge, UK).

Diabetes was induced by a single subcutaneous injection of 200 mg alloxan/kg body weight (66 mg/ml) in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 and the control group received a subcutaneous injection of citrate buffer alone. Mice were considered diabetic with a blood glucose level higher than 16 mM, 4 days after alloxan treatment. Then, animals were divided into subgroups (control, control+lipoic acid, diabetic, diabetic+lipoic acid, diabetic+insulin, diabetic+insulin+lipoic acid) and maintained with their respective treatment for 3 weeks. At least 20 animals were used in each group. Lipoic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) was administered i.p. daily at a dose of 100 mg/kg body weight, and insulin at 500 mU/g body weight. Blood samples were taken daily from the tail vein to assay blood glucose levels, and glycated hemoglobin (HbA1c) was determined in blood samples obtained by heart puncture immediately before the animals were killed.

Electroretinogram (ERG)

After 3 weeks of treatment, mice adapted to darkness overnight were anesthetized with ketamine (100 mg/kg body weight) and azepromazine (2.5 mg/kg body weight). Anesthetic and midriatic colirium were administered. An active wire loop electrode was used to record responses, and needle electrodes were placed in the neck and tail of the mice, that served as the reference and ground, respectively. The stimuli were flashes with a maximum duration of 5 ms [mean 4; range 100; intensity 1 (14 cds/m²)]. In front of the white standard flash a 2.5 logarithmic unit optical density filter was placed. A 2-second interval was set between the flash shots. The filter bandpass of the amplifier and preamplifier was set to 350 Hz. Results were recorded on a MacLab computer equipment (Castle Hill, Australia).

Sacrifice and tissue sampling

Anesthetized mice were decapitated and eyes were immediately enucleated. Lenses were removed from enucleated eyes due to their high GSH concentration. Lenses-less eyes were homogenized in prechilled 0.2 M potassium phosphate buffer, pH 7.0. The homogenate was used to assay GPx activity, GSH, malondialdehyde (MDA), and protein concentrations. Samples were kept frozen (-80°C) until biochemical assays were performed.

Biochemical assays

GPx activity was assayed as reported by Lawrence et al. [21] towards hydrogen peroxide. MDA concentration was measured by liquid chromatography (HPLC) according to a modification of the method of Richard et al. [22], as previously described [23]; the GSH content was quantified by the method of Reed et al. on HPLC [24]; and proteins were measured by the Lowry's method [25].

Statistical analysis

The results are presented as mean values \pm SEM. Statistical significances were assessed by the Student's *t*-test. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

RESULTS

Confirmation of experimental diabetes

Before treatment, there was no significant difference between any group in weight or random glucose levels. Three weeks after induction of diabetes by injection of alloxan, random blood glucose concentration in the diabetic and control groups were 29.5 ± 1.3 and 5.3 ± 0.4 mM, respectively ($p \leq 0.05$) as shown in Table 1. No statistical differences in glycated hemoglobin (HbA1c) were found between the diabetic group

and the diabetic group receiving lipoic acid. As expected, weight in the diabetic animals was somewhat lower than in the control group (Table 1).

Effects of lipoic acid administration on antioxidants defence enzymes.

Oxidative stress, as assessed by the concentration of GSH and GPx activity, was present in the retina of diabetic mice after only three weeks of diabetic insult. Thus, GSH concentration and GPx activity showed significant decreases in diabetic group with respect to controls ($p \leq 0.05$ vs. control, for both parameters, Fig. 1). Lipoic acid administration had a protective effect on retina of diabetic mice, since it prevented the decrease of GSH concentration ($p \leq 0.05$ with respect to all other groups, Fig. 1A), as well as GPx activity ($p \leq 0.05$ with respect to all other groups, Fig. 1B). No differences were observed in insulin-treated animals with respect to controls in any of the oxidative stress markers analyzed.

Effect of lipoic acid administration on lipid peroxidation.

After 3 weeks of alloxan injection, mice retina had MDA contents significantly elevated when compared to control animals ($p \leq 0.05$, Fig. 2). Lipoic acid administration reduced MDA content in the retina of diabetic mice by 30 % and was not significantly different from the control group ($p \leq 0.05$ with respect to control). No differences were observed between the insulin-treated animals and the control ones.

Effects of lipoic acid administration on electroretinogram recordings.

The retinal function was tested by means of electroretinogram recordings. ERG b-wave amplitude was significantly decreased in diabetic animals with respect to all other groups ($p \leq 0.05$, Fig. 3), suggesting an early impairment of the retinal function

due to the diabetic insult. Administration of lipoic acid restored the b-wave amplitude to 77 % of control values and was significantly different from the diabetic group. No differences were observed in insulin-treated diabetic mice with respect to controls.

DISCUSSION

Herein we report the effect of lipoic acid on the early changes of the redox status in diabetic retina. Retina is markedly sensitive to oxygen free radical damage, due to its high levels of polyunsaturated lipids. The results show that after three weeks of diabetes, MDA levels in the retina were increased, when compared to controls, and that lipoic acid was able to prevent this effect. MDA is a well accepted oxidative stress marker for pathological processes [26]. Since oxidative stress represents an imbalance between excess formation and/or impaired removal of ROS, the antioxidant defence system of the cell is a crucial part of the overall oxidative stress experienced by cells. Our data showed that diabetes induces a decrease of antioxidant defence systems (GSH content and GPx activity), and that lipoic acid prevented these effects in mice retina.

Increased oxidative stress in diabetes is considered a contributing factor in the development of diabetic complication, including retinopathy [27] [28] [7], and reactive oxygen species have been reported to act as a causal link between the elevated glucose levels and the other relevant metabolic changes implicated in the development of diabetic complications [Brownlee, 2001 #40]. Herein we report for the first time that the alterations of oxidative stress markers in the retina, that are already present after just three weeks of diabetic condition, were completely prevented when lipoic acid was administered. Other studies reported that administration of lipoic acid prevented impairment of ion demand [29], as well as retinal capillary cell death and microvascular damage [13,14], however in both of these studies the lipoic acid was administered from

the first day of the experiment and throughout 11 months or 30 weeks, respectively. Moreover, these studies postulated that apoptosis of retinal capillary cells is mediated through sequential events involving caspases and Nuclear Factor kappa B (NFkappaB) and that inhibition of superoxide accumulation prevents apoptosis. We postulate that lipoic acid prevents the development of diabetic retinopathy due to the prevention of superoxide accumulation and thereby hindering the following sequential events leading to apoptosis. In support of this theory is the reported resistance of diabetic retinopathy to reverse attributed to accumulation of damaged molecules and reactive oxygen species (ROS) {Kowluru, 2003 #33}. The results of the present study suggest that in order to protect the retina from potential apoptosis and microvascular damage, lipoic acid must be administered as early as possible.

Changes in the redox status of neuronal tissue can lead to various functional impairments, as we described previously {Johnsen-Soriano, 2007 #4}[8]. Impaired electroretinogram recordings were observed after only three weeks of diabetes, suggesting a fast acting deterioration of retinal function possibly due to oxidative stress damage. The administration of lipoic acid prevents the decrease of the b-wave amplitude in electroretinogram recordings of diabetic mice. Lipoic acid thereby provides protection to the retina as a whole, and to ganglion cells in particular. Thus, our data show that in vivo administration of lipoic acid provides functional protection to the retina, most probably by protecting the retina from oxidative damage induced by the diabetic condition. In addition to lipoic acid's antioxidant properties there exist another mechanism of action for which lipoic acid could protect from retinal damage, namely through its ability to increase de novo synthesis of cellular glutathione by improving cysteine utilization [20].

As mentioned in the introduction, good glycemic control remains as one of the most effective options to prevent or delay the worsening of diabetic retinopathy. However, good glycemic control is difficult to achieve and maintain for long periods of time for most patients. Lipoic acid is an interesting therapeutic option for diabetic patients due to its ability to increase tissue sensitivity to insulin and lower glycemia level [16,17]and thereby help to maintain glycemic control. However an understanding of the mechanism of how lipoic acid prevents diabetic retinopathy needs to be further clarified.

In summary, we postulate that lipoic acid, at least partly, protects the diabetic retina by slowing the onset and progression of retinopathy. However, lipoic acid must be administered as early as possible to the diabetic patients in order to prevent oxidative damage.

BIBLIOGRAPHY

- [1] Bloomgarden ZT. Screening for and managing diabetic retinopathy: current approaches. *Am J Health Syst Pharm* 2007;64:S8-14.
- [2] Kawasaki S, Hasegawa O, Satoh S, Saito T, Ishio H, Fukushima H, Kato S, Yamashita H, Terauchi Y, Sekihara H. Development and progression of retinopathy after inpatient management of diabetes. *Intern Med* 2006;45:1267-1271.
- [3] Tyrberg M, Melander A, Lovestam-Adrian M, Lindblad U. Retinopathy in subjects with impaired fasting glucose: the NANSY-Eye baseline report. *Diabetes Obes Metab* 2007;
- [4] Klein R, Klein BE, Moss SE, Wong TY. The relationship of retinopathy in persons without diabetes to the 15-year incidence of diabetes and hypertension: Beaver Dam Eye Study. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006;104:98-107.
- [5] Anderson RE, Rapp LM, Wiegand RD. Lipid peroxidation and retinal degeneration. *Curr Eye Res* 1984;3:223-227.
- [6] Kowluru RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res* 2007;2007:43603.
- [7] Miranda M, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Araiz J, Roma J, Romero FJ. [Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy: treatment with antioxidants]. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004;79:289-294.
- [8] Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ, Miranda M. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med* 2006;41:979-984.

- [9] Matteucci E, Giampietro O. Oxidative stress in families of type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2000;23:1182-1186.
- [10] Turk HM, Sevinc A, Camci C, Cigli A, Buyukberber S, Savli H, Bayraktar N. Plasma lipid peroxidation products and antioxidant enzyme activities in patients with type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2002;39:117-122.
- [11] Kowluru RA. Effect of reinstatement of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 2003;52:818-823.
- [12] Packer L, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid: the metabolic antioxidant. *Free Radic Biol Med* 1996;20:625-626.
- [13] Lin J, Bierhaus A, Bugert P, Dietrich N, Feng Y, Vom Hagen F, Nawroth P, Brownlee M, Hammes HP. Effect of R-(+)-alpha-lipoic acid on experimental diabetic retinopathy. *Diabetologia* 2006;49:1089-1096.
- [14] Kowluru RA, Odenbach S. Effect of long-term administration of alpha-lipoic acid on retinal capillary cell death and the development of retinopathy in diabetic rats. *Diabetes* 2004;53:3233-3238.
- [15] Ziegler D. Treatment of diabetic polyneuropathy: Update 2006. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1084:250-266.
- [16] Jacob S, Henriksen EJ, Tritschler HJ, Augustin HJ, Dietze GJ. Improvement of insulin-stimulated glucose-disposal in type 2 diabetes after repeated parenteral administration of thioctic acid. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 1996;104:284-288.
- [17] Kamenova P. Improvement of insulin sensitivity in patients with type 2 diabetes mellitus after oral administration of alpha-lipoic acid. *Hormones (Athens)* 2006;5:251-258.
- [18] Estrada DE, Ewart HS, Tsakiridis T, Volchuk A, Ramlal T, Tritschler H, Klip A. Stimulation of glucose uptake by the natural coenzyme alpha-lipoic acid/thioctic acid: participation of elements of the insulin signaling pathway. *Diabetes* 1996;45:1798-1804.
- [19] Yaworsky K, Somwar R, Ramlal T, Tritschler HJ, Klip A. Engagement of the insulin-sensitive pathway in the stimulation of glucose transport by alpha-lipoic acid in 3T3-L1 adipocytes. *Diabetologia* 2000;43:294-303.
- [20] Han D, Handelman G, Marcocci L, Sen CK, Roy S, Kobuchi H, Tritschler HJ, Flohe L, Packer L. Lipoic acid increases de novo synthesis of cellular glutathione by improving cystine utilization. *Biofactors* 1997;6:321-338.
- [21] Lawrence RA, Parkhill LK, Burk RF. Hepatic cytosolic non selenium-dependent glutathione peroxidase activity: its nature and the effect of selenium deficiency. *J Nutr* 1978;108:981-987.
- [22] Richard MJ, Guiraud P, Meo J, Favier A. High-performance liquid chromatographic separation of malondialdehyde-thiobarbituric acid adduct in biological materials (plasma and human cells) using a commercially available reagent. *J Chromatogr* 1992;577:9-18.
- [23] Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: possible use for the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998;25:993-997.
- [24] Reed DJ, Babson JR, Beatty PW, Brodie AE, Ellis WW, Potter DW. High-performance liquid chromatography analysis of nanomole levels of glutathione, glutathione disulfide, and related thiols and disulfides. *Anal Biochem* 1980;106:55-62.
- [25] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- [26] Halliwell B. Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. New York, Dekker, 2000

- [27] Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999;48:1-9.
- [28] Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. VII. Effect of long-term administration of antioxidants on the development of retinopathy. *Diabetes* 2001;50:1938-1942.
- [29] Berkowitz BA, Roberts R, Stemmler A, Luan H, Gadianu M. Impaired apparent ion demand in experimental diabetic retinopathy: correction by lipoic Acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4753-4758.

2. ARVO 2008 MEETING

Session Date: Thursday, May 1

Location: HallB/C

Program Number/Poster Board Number: 5920/A294

Abstract Title: Early Lipoic Acid Intake Protects Retina in Diabetic Mice

Presentation Time: 1:00 PM- 2:45 PM

Reviewing Code: 316 retina/RPE: oxidation, stress - RC

Author Block: *F.J. Romero*^{1,2}, *S. Johnsen-Soriano*², *M. Sancho-Tello*², *M. Garcia-Pous*², *S. Garcia-Delpech*³, *E. Arnal*¹, *M. Miranda*¹, *M. Diaz-Llopis*³, *F. Bosch-Morell*^{1,2}.

¹Physio/Pharma/Toxicology, Univ CEU-Cardenal Herrera, Moncada, Spain;

²Fundación Oftalmológica del Mediterráneo, Valencia, Spain;

³Hospital General Universitario, Valencia, Spain.

Keywords: 424 antioxidants, 499 diabetic retinopathy, 631 oxidation/oxidative or free radical damage

Purpose: The aim of this study was to confirm biochemical and functional changes in retina after a short diabetic insult and to test the effect of lipoic acid treatment on those parameters.

Methods: The investigation conformed with ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic

and Vision Research and Declaration of Helsinki. Diabetes was induced by a single subcutaneous injection of 200mg alloxan/kg body weight (66 mg/ml) in 0.1 M citrate buffer, pH 4.5 and the control group received a subcutaneous injection of citrate buffer alone. Mice were considered diabetic with a blood glucose level higher than 16 mM, 4 days after alloxan treatment. Then, animals were divided into subgroups (control, control+lipoic acid, diabetic, diabetic+lipoic acid, diabetic+insulin, diabetic+insulin+lipoic acid) and maintained with their respective treatment for 3 weeks. At least 20 animals were used in each group. Lipoic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) was administered ip daily at a dose of 100mg/kg body weight, and insulin at 500 mU/kg body weight. Blood samples were taken daily from the tail vein to assay blood glucose levels. Glutathione (GSH) and Malondialdehyde (MDA) concentrations in addition to glutathione peroxidase activity (GPx activity) were measured in eye homogenates without lens as oxidative stress markers. The last day of the experiment electroretinograms (ERG) were recorded, and b-wave amplitudes were measured.

Results: Early administration of lipoic acid prevented the statistically significant decrease of the antioxidant enzymes GSH and GPx activity and increase in MDA content observed in the retina of diabetic animals. Moreover, when functionality of the retina was tested in form of electroretinogram recordings, lipoic acid restored b-wave amplitude in diabetic animals to control values. In agreement with previous findings by other authors, no statistical significant increase in the number of TUNEL+ cells was found, though a slight increase was observed after this short diabetic insult.

Conclusions: Lipoic acid has a protective effect by slowing the onset and progression of retinopathy, but must be administered as early as possible to the diabetic patients in order to prevent oxidative damage and its consequences such as apoptosis and possible vision loss.

3. 7th INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS.

Effect of α -Lipoic Acid on Electroretinographic Changes in Early Experimental Diabetic Retinopathy

M. Garcia-Pous¹, S. Garcia-Delpech², M. Diaz-Llopis^{2,3},
F. Bosch-Morell¹, S. Soriano¹, J. Romero¹,
P. Udaondo² and D. Salom²

¹Fundación Oftalmológica del Mediterráneo, Valencia, Spain

²Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

³Universitat de Valencia, Valencia, Spain

Summary

Diabetic retinopathy (DR) is a microvascular complication of diabetes mellitus and oxidative stress is implicated in its pathogenesis. The aim of this study is to test whether α -lipoic acid, a natural antioxidant treatment, improves retinal function and prevents oxidative stress in the retina of alloxan-induced diabetic mice. Methods: Three groups of Swiss male mice were studied: non-diabetic controls, untreated diabetic controls, and diabetic mice treated with 10mg/Kg bodyweight α -lipoic acid daily ip for 3 weeks. At the end of the study, electroretinogram (ERG) findings (b-wave amplitude) and oxidative stress markers in eye homogenate were measured. Results: After 3 weeks of diabetes, α -lipoic acid supplements in diabetic mice retrieved the parameters of oxidative stress in the retina and significantly improved b-wave amplitude in the ERG. Conclusions: α -Lipoic acid avoids oxidative stress and retinal dysfunction in early DR in alloxan-induced diabetic mice; therefore DR could be prevented with this antioxidant.

Introduction

Diabetes mellitus is a chronic disease characterized by sustained hyperglycemia that attacks both microvessels and macrovessels throughout the body. It is the leading cause of acquired blindness in adults in developed countries.

Previous studies have demonstrated the contribution of chronic hyperglycaemia

to the development of DR¹. One of the important consequences of glucose toxicity in the diabetic retina is oxidative stress² and its consequences in biological macromolecules and cellular homeostasis. The retina has the high content of polyunsaturated fatty acids and has the highest oxygen uptake and glucose oxidation relative to any other tissue, so it is more susceptible to oxidative stress. Oxidative stress produces biochemical abnormalities that are present as early as 2 months after the induction of diabetes in rats³ and one week in diabetic mice⁴, but histopathological changes in the retina take over decades in humans and about a year in rats to develop.

A number of reports have shown that neurophysiological changes occur very soon after the onset of diabetes both in human and in experimental animals and they are progressive and irreversible⁵. Numerous studies have demonstrated electrophysiological changes in the retinas of human diabetic patients before onset of clinically retinopathy⁶, as a reduction in amplitude or increased delay of the b-wave oscillatory potentials⁷. Furthermore, these changes have been demonstrated in a rat model of diabetes only 2 weeks after onset of diabetes⁸ and in a mouse model 3 weeks after diabetes instauration⁹.

α -Lipoic acid, a natural molecule with a high antioxidant power¹⁰, has demonstrated to reduce lipid peroxidation and to improve antioxidative defense in experimental models of DR in rats¹¹. The aim of this study is to test whether α -lipoic acid can prevent oxidative stress and retinal dysfunction in a model of DR in mice.

Material and Methods

Male albino mice weighting 25-30 g (Harlan Iberica SL, Barcelona, Spain) were used for this study. All animal manipulations were done according to international regulations of European Economic Community. Diabetes was induced by a single subcutaneous injection of 200 mg alloxan/kg body weight and the control group received a subcutaneous injection of citrate buffer alone. Mice were considered diabetic with a blood glucose level higher than 16 mM, 4 days after alloxan treatment. Then, animals were divided into subgroups (control, control+lipoic acid, diabetic, diabetic+lipoic acid, diabetic+insulin, diabetic+insulin+lipoic acid) and maintained with their respective treatment for 3 weeks. Lipoic acid (Sigma, St. Louis, MO, USA) was administered ip daily at a dose of 10 mg/kg body weight, and insulin at 500 mU/g body weight. After 3 weeks of treatment, mice adapted to darkness overnight were anesthetized with ketamine (100 mg/kg body weight) and azepromazine (2.5 mg/kg body weight). Anesthetic and midriatic colirium were administered and electroretinogram b-wave amplitude was measured. After this, anesthetized mice were decapitated and eyes were immediately enucleated. Lenses were removed from enucleated eyes due to their high GSH concentration. Lensesless eyes were homogenized and used to assay GPx activity and GSH, malondialdehyde (MDA), and protein concentrations. The results are presented as mean values \pm SEM. Statistical significances were assessed by Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests. The level of significance was set at $p \leq 0.05$.

Results

Before treatment, there was no significant difference between any group in weight or random glucose levels. Three weeks after induction of diabetes random blood glucose concentration in the diabetic and control groups were 29.5 ± 1.3 and 5.3 ± 0.4 mM, respectively ($p \leq 0.05$), with no statistical differences in glycated haemoglobin (HbA1c) between the diabetic group and the diabetic group in treatment with lipoic acid.

After 3 weeks of diabetes onset, oxidative stress was present in the retina of diabetic mice. GSH concentration and GPx activity showed significant decreases in diabetic group with respect to controls ($p \leq 0.05$). Lipoic acid administration prevented the decrease of GSH concentration ($p \leq 0.05$), as well as GPx activity ($p \leq 0.05$). No differences were observed in insulin-treated animals with respect to controls in any of the oxidative stress markers analyzed. The MDA concentration in diabetic retina was significantly elevated when compared to control animals ($p < 0.05$). Lipoic acid reduced MDA content in diabetic mice to 30% of control group (Figure 1).

The retinal function was tested by means of electroretinogram recordings. ERG b-wave amplitude was significantly decreased in diabetic animals with respect to all other groups ($p \leq 0.05$). Administration of lipoic acid restored the b-wave amplitude to 77 % of control values and was significantly different from the diabetic group. No differences were observed in insulin-treated diabetic mice with respect to controls (Figure 2).

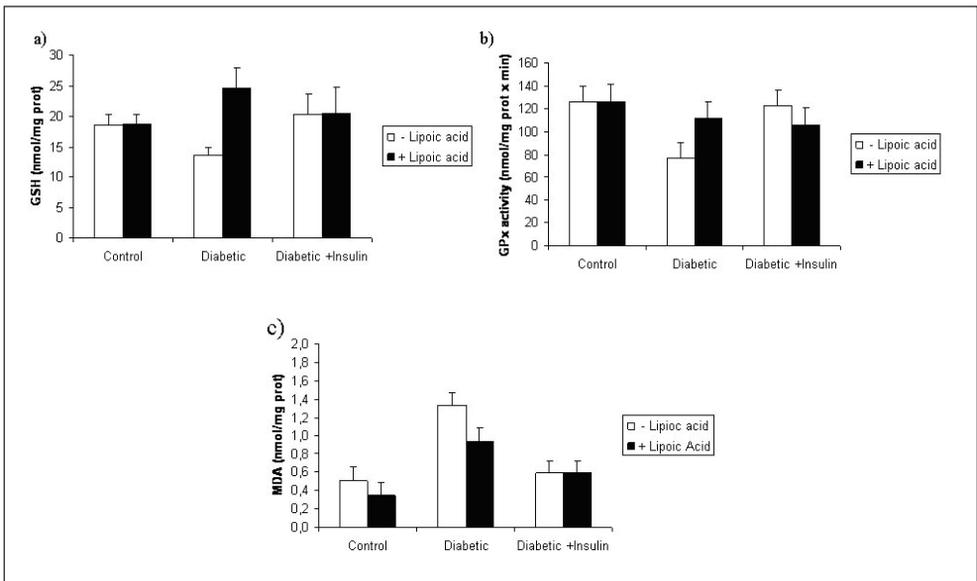


Figure 1: GSH content (A), GPx activity (B) and MDA content (C) of mouse retina in the different groups studied.

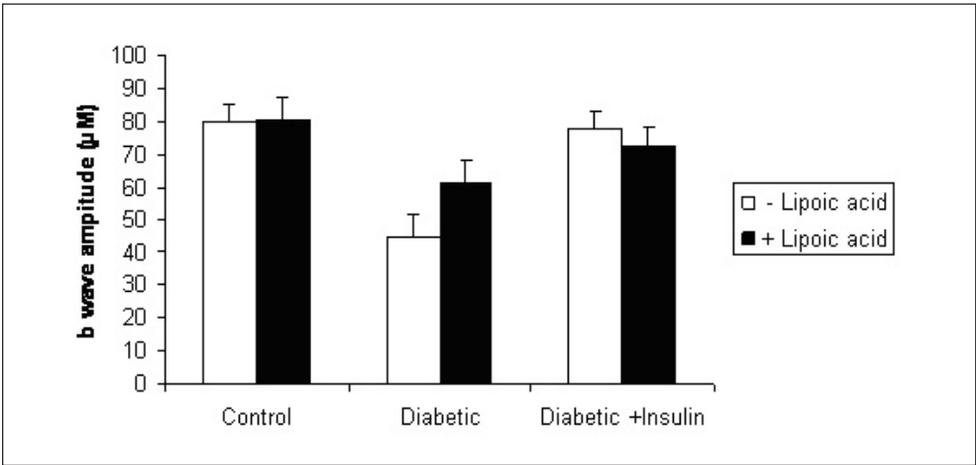


Figure 2: *b*-wave amplitude in diabetic animals in the different groups studied. Highlight that lipoic acid restores *b*-wave amplitude in diabetic mice to control values.

Conclusions

In this study lipoic acid has demonstrated to normalize the parameters of oxidative stress in the diabetic mouse retina. Previous studies using lipoic acid in rats showed inhibition of retinal lipid peroxidation products and normalization of glutathione metabolism reducing the vascular damage in the retina¹². Retina is markedly sensitive to oxygen free radical damage, due to its high levels of polyunsaturated lipids. After three weeks of diabetes, MDA levels in the retina were increased and lipoic acid was able to prevent this effect. Moreover, diabetes induces a decrease of antioxidant defence systems and lipoic acid normalized them. Increased oxidative stress in diabetes is considered a contributing factor in the development of diabetes complications, including DR^{13,14}, and it is prevented by lipoic acid due to its free radical scavenging, upregulation of superoxide dismutase and its capacity to enhance GSH levels.

It has been demonstrated here that the ERG responses of diabetic mice are reduced compared to the control group 3 weeks after induction of diabetes. The maximal amplitude of *b*-wave in the ERG is an indicator for functional integrity of the inner nuclear layer, especially reflecting the function of bipolar and Müller cells⁸. Previous studies in diabetic rats' retina showed an expression altered of GFAP (glial fibrillar protein acid) at 6 weeks after induction of diabetes. This protein is expressed by the astrocytes in normal retina and by the Müller cells in altered retinas¹⁵. The expression of this protein demonstrates an early dysfunction in Müller cells in DR, and this can explain the alterations showed in the *b*-wave amplitude in the ERG. Treatment with supplements of lipoic acid in diabetic mice avoids the changes in the *b*-wave

amplitude in the ERG. Thus, lipoic acid provides a functional protection to the retina most probably by protecting the retina from oxidative damage induced by the diabetic condition.

In summary, lipoic acid has demonstrated a protective effect slowing the onset and progression of DR, acting both reducing oxidative stress mechanisms and preventing b-wave changes in the ERG.

References

- 1 The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med*,329:977-986, 1993.
- 2 Kowrulu RA, Chan PS. Oxidative stress and diabetic retinopathy. *Exp Diabetes Res*, 2007;43603,2007
- 3 Mizutani M, Kern TS, Lorenzi M. Accelerated death of reinal microvascular ceells in human and experimental diabetic reinopathy. *J Clin Invest*,97:2883-2890,1996.
- 4 Muriach M, Bosch-Morell F, Alexander G, Blomhoff R, Barcia J, Arnal E, Almansa I, Romero FJ, Miranda M. Lutein effect on retina and hippocampus of diabetic mice. *Free Radic Biol Med*,41:979-84,2006.
- 5 Lieth E, Gardner TW, Barber AJ, Antonetti DA and The Penn State Retina Research Group. Retinal neurodegeneration: early pathology in diabetes. *Clin Exp Ophthalmol*,28:3-8,2000.
- 6 Caputo S, Di Leo MA, Falsini B, Ghirlanda G, Porciatti V, Minella A, Greco AV. Evidence for early impairment of macular function with pattern ERG in type I diabetic patients. *Diabetes Care*,13:412-8,1990.
- 7 Holopigian K, Seiple W, Lorenzo M, Carr R. A comparison of photopic and scotopic electroretinographic changes in early diabetic retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*,33:2773-2780,1992.
- 8 Li Q, Zemel E, Miller B, Perlman I. Early retinal damage in experimental diabetes : elecroretinographical and morphological observations. *Exp Eye Res*,74:615-25,2002.
- 9 Miranda M, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Araiz J, Roma J, Romero FJ. Oxidative stress in a model for experimental diabetic retinopathy : treatment with antioxidants. *Arch Soc Esp Oftalmol*,79:289-94,2004.
- 10 Packer L, Witt EH, Tritschler HJ. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic Biol Med*,19:227-250,1995.
- 11 Obrosova IG, Lamia Fathallah, Douglas A. Greene. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina : effect of DL- α -lipoic acid. *Eur J pharmacol*,398:139-146,2000.
- 12 Lin J, Bierhaus A, Bugert P, Dietrich N, Feng Y, Hagen F, Nawroth P, Brownlee M, Hammes HP. Effect of R-(+)- α -lipoic acid on experimental diabetic retinopathy. *Diabetologia*,49:1089-1096,2006.
- 13 Baynes JW, Thorpe SR. Role of oxidatives stress in Diabetic Complications. A new perspective on an old paradigm. *Diabetes*,48:1-9,1999.
- 14 Kowluru RA, Tang J, Kern TS. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes and experimental galactosemia. *Diabetes*,50:1938-42,2001.
- 15 Lorenzi M, Gerhardinger C. Early cellular and molecular changes induced by diabetes in the retina. *Diabetologia*,44:791-804,2001.