

# ESTRÉS OXIDATIVO EN UN MODELO DE RETINOPATÍA DIABÉTICA EXPERIMENTAL II: UTILIDAD DE AGENTES SECUESTRANTES DE PEROXINITRITOS

## OXIDATIVE STRESS IN A MODEL OF EXPERIMENTAL DIABETIC RETINOPATHY: THE UTILITY OF PEROXYNITRITE SCAVENGERS

MIRANDA M<sup>1</sup>, MURIACH M<sup>2</sup>, ROMA J<sup>3</sup>, BOSCH-MORELL F<sup>1</sup>, GENOVÉS JM<sup>4</sup>, BARCIA J<sup>3</sup>, ARAIZ J<sup>5</sup>, DÍAZ-LLOPIS M<sup>5</sup>, ROMERO FJ<sup>5</sup>

### RESUMEN

**Propósito:** La retina es el tejido neurosensorial del ojo y es extremadamente rica en membranas con lípidos poliinsaturados. Esta característica la hace especialmente sensible a los radicales libres derivados de oxígeno o nitrógeno y a la peroxidación lipídica. Diversos autores postulan la importancia de la producción de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) y peroxinitrito en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes. En este trabajo hemos empleado dos antioxidantes, ebselen y luteína, que presentan la característica común de ser secuestrantes de peroxinitrito, para evitar el estrés oxidativo que la hiperglucemia induce en la retina.

**Métodos:** La hiperglucemia se consiguió mediante la inyección de Aloxana. Se determinaron la concentración de malondialdehído (MDA) y de glutatión (GSH) en homogenado de ojo. También se realizaron electroretinogramas (ERG) de todos los animales y se midió el tiempo de latencia y de culminación.

### ABSTRACT

**Purpose:** The retina is the neurosensorial tissue of the eye and is extremely rich in polyunsaturated lipid membranes. This feature makes it especially sensitive to oxygen and/or nitrogen activated species and lipid peroxidation. Several authors have postulated the importance of superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) and peroxynitrite production in the development of diabetic complications. In the present study, we have used two different antioxidants, ebselen and lutein, that present as a common feature their peroxynitrite scavenging capacity, to ameliorate the oxidative stress that exists in the retina in diabetic patients.

**Methods:** Hyperglycemia was accomplished by the intraperitoneal injection of Alloxan in a mouse model of diabetic retinopathy. Malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) concentrations in eye homogenates (without the lens) were determined. We also recorded serial electroretinograms (ERG) and measured latency and implicit times.

Recibido: 23/3/05. Aceptado: 10/1/06.

Universidad Cardenal Herrera-CEU y Fundación Oftalmológica del Mediterráneo.

<sup>1</sup> Doctor en Farmacia.

<sup>2</sup> Licenciada en Ciencia y Tecnología de los Alimentos.

<sup>3</sup> Doctor en Biología.

<sup>4</sup> Licenciado en Medicina.

<sup>5</sup> Doctor en Medicina.

Proyecto subvencionado: PI031710 Fondo de Investigación Sanitaria, PRUCH03/01 (Universidad Cardenal Herrera-CEU).

Correspondencia:

Francisco Javier Romero Gómez

Universidad Cardenal Herrera-CEU

Avda. Seminario, s/n

46113 Moncada (Valencia)

España

E-mail: jromero@uch.ceu.es

**Resultados:** La concentración de MDA aumentó y la de GSH disminuyó en los animales diabéticos. Los tratamientos con ebselen y luteína corrigieron las concentraciones de MDA y de GSH. El tiempo de latencia y de culminación del ERG no se ve afectado por la diabetes.

**Conclusión:** Se requieren nuevos estudios para confirmar el mecanismo protector del ebselén y la luteína en este modelo de diabetes experimental.

**Palabras clave:** Diabetes, ebselen, luteína, estrés oxidativo, electroretinograma, antioxidantes, peroxinitrito.

**Results:** The MDA concentration increased and the GSH concentration decreased in the eyes of the diabetic animals. Treatment with ebselen and lutein restored the MDA and GSH concentrations to control values. Latency and implicit times were not affected by the diabetes.

**Conclusion:** New studies are required to better understand the protective mechanism of ebselen and lutein in this model of experimental diabetic retinopathy (*Arch Soc Esp Oftalmol* 2006; 81: 27-32).

**Key words:** Diabetes, mouse, ebselen, lutein, oxidative stress, electroretinogram, antioxidants, peroxynitrite.

## INTRODUCCIÓN

La retina es el tejido neurosensorial del ojo y es extremadamente rica en membranas con lípidos poliinsaturados (1). 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, la retinopatía del prematuro y la retinopatía diabética.

Existen diversos estudios en la bibliografía que indican que el metabolismo retiniano está alterado en la diabetes. Kowluru et al (2) estudiaron ratas en las que se indujo una diabetes mediante la inyección de aloxana y demostraron que en la retina había un aumento en la concentración de sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), un aumento en la actividad de la proteinkinasa C, y un aumento de óxido nítrico (ON). También encuentran que en la retina diabética la concentración de GSH está disminuida. Otros trabajos publicados demuestran que el metabolismo retiniano en la diabetes está afectado (3,4). Pero hay pocos estudios que demuestren que la administración de antioxidantes disminuye la retinopatía diabética.

Diversos autores postulan la importancia de la producción de superóxido ( $O_2^-$ ) en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes (5). También se ha comprobado recientemente que los niveles de nitrotirosina en el plasma de los pacientes diabéticos están aumentados, lo que sugiere la posible

implicación del peroxinitrito en el desarrollo de las complicaciones de la diabetes (6). El incremento en ON y  $O_2^-$  es perjudicial porque reaccionan para producir peroxinitrito, un potente oxidante con una vida media muy larga. El anión peroxinitrito es citotóxico porque inhibe la cadena de transporte electrónico mitocondrial, oxida grupos sulfidrilo de proteínas, inicia la peroxidación lipídica sin el requerimiento de metales de transición y nitrosila aminoácidos como la tirosina, lo que afecta a numerosas vías de transducción de señales (7).

Diversos estudios han utilizado antioxidantes, como la vitamina E, para intentar prevenir las complicaciones de la diabetes y han obtenido resultados contradictorios (8). Podría pensarse que el tratamiento con vitamina E, sería más un tratamiento sintomático que un tratamiento causal, puesto que sólo actúa contra los radicales libres ya formados. Otra alternativa en el tratamiento con antioxidantes sería intentar interrumpir la formación del anión superóxido o del peroxinitrito.

En este trabajo hemos empleado dos antioxidantes, ebselén y luteína, muy distintos en cuanto a su origen pero que sin embargo presentan la característica común de ser secuestrantes de peroxinitrito. El objetivo de este estudio fue añadir nuevos datos a los trabajos realizados en nuestro laboratorio (9) que demuestran que tanto el ebselén como la luteína pueden evitar el estrés oxidativo que existe en la retinopatía diabética y que además mejoran propiedades funcionales en la retina de los animales diabéticos.

## SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Se usaron 25 ratones albino machos, en los que se indujo una diabetes experimental con una dosis de aloxana de 200 mg aloxana/kg peso (66 mg/ml en buffer citrato-fosfato 0,1 M, pH 4,5). A los ratones control se les inyectó el mismo volumen de tampón. Se consideran diabéticos a los ratones cuyos niveles de glucemia son mayores que 16 mM, 4 días después del tratamiento con aloxana. Un grupo de ratones diabéticos fue tratado con insulina los días 4, 5 y 6. El tratamiento con ebselen (100 mg/kg) se administró por vía oral los tres últimos días del experimento. Los animales se mantuvieron en condiciones de luz/oscuridad (12/12 h) con alimento y agua «ad libitum» y se sacrificaron a los 7 días del inicio del experimento. Inmediatamente después del sacrificio se enuclearon ambos ojos y se extrajo el cristalino. Ambos ojos se homogenizaron en tampón fosfato potásico 0,2 M pH 7. Para la determinación de la glucemia y de la hemoglobina glicosilada (HbA1c) se utilizaron dos test disponibles comercialmente de Boehringer Mannheim y Biosystems. El mismo modelo experimental se utilizó para el tratamiento con luteína.

**Determinación de proteínas.** Según el procedimiento descrito por Lowry et al con las modificaciones de Peterson (10).

**Medición del MDA.** Se utilizó una modificación del método de Richard et al (11), desarrollada en nuestro laboratorio (12), empleando un equipo de cromatografía de alta resolución (Kontron Instruments).

**Medición de GSH.** Se determinó por el procedimiento descrito por Reed (13).

**Realización del ERG.** Se realizó a ratones anestesiados con ketamina (100 mg/kg peso) y azepromazina (2,5 mg/kg peso), adaptados a la oscuridad. Se administró colirio anestésico y midriático. Se utilizó un electrodo activo de tipo lente corneal, un electrodo de referencia en la frente y un electrodo de masa en la cola del ratón. Los estímulos empleados fueron flashes con una duración máxima de 5 ms [media 4; rango 100 intensidad 1 (0,06 x 22 lumen sec/ft<sup>2</sup>)]. Se colocó delante del flash blanco estándar un filtro de 2,5 unidades logarítmicas de densidad óptica. Entre los disparos de flash había un intervalo de 2 segundos. La banda pasante del amplificador y preamplificador se estableció en 3-50 Hz. Los registros se recogieron en un equipo informático MacLab (Castle Hill, Australia).

**Análisis estadístico.** Los datos se expresan como media  $\pm$  desviación estándar. Se usó el análisis de la varianza (ANOVA) y la t-Student para datos no pareados.

## RESULTADOS

Después de una semana de la inducción de la diabetes, se observa un aumento significativo de los niveles de glucosa en sangre. El tratamiento con ebselen o con luteína no afecta significativamente a los valores de glucemia plasmática tanto en los animales control como en los diabéticos (los datos no se muestran).

Los valores de MDA en homogenado de ojo sin cristalino aumentan de forma significativa en los ratones diabéticos respecto al grupo control. La administración de insulina disminuyó la concentración de MDA en homogenado de ojo sin cristalino. El tratamiento con cualquiera de los dos antioxidantes, ebselen o luteína, consigue disminuir el MDA ocular (figs. 1 y 2).

La concentración de GSH disminuye en retina de animales diabéticos. El tratamiento de los animales diabéticos con luteína o ebselen, aumentó la concentración de GSH hasta igualarla a los valores control (figs. 3 y 4). El tratamiento con insulina aumenta también la concentración de GSH.

Todo electroretinograma se caracteriza por su morfología, amplitud, tiempos de latencia y culminación y duración. El tiempo de latencia es el tiempo transcurrido desde la estimulación hasta que empieza a mostrarse la onda. El tiempo de culminación

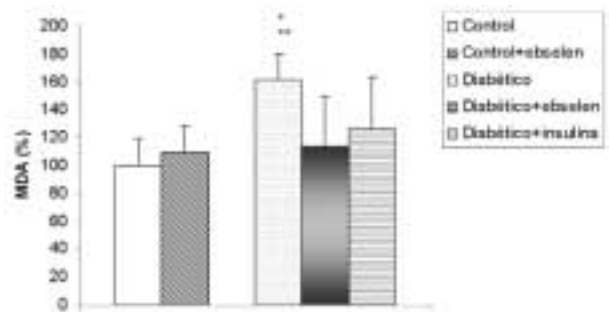


Fig. 1: Estudio de las concentraciones de MDA en homogenado de ojos sin cristalino en los distintos grupos de ratones, en el experimento con el antioxidante ebselen. \*  $p < 0,05$  vs control, \*\*  $p < 0,05$  vs control+ebselen.

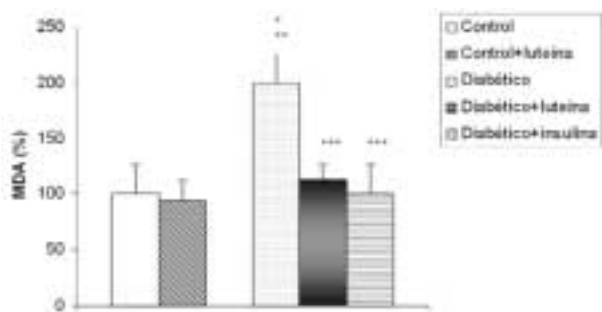


Fig. 2: Estudio de las concentraciones de MDA en homogenado de ojos sin cristalino en los distintos grupos de ratones, en el experimento con el antioxidante luteína. \*  $p < 0,05$  vs control, \*\*  $p < 0,05$  vs control+ebselen, \*\*\*  $p < 0,05$  vs diabético.

ción (*implicit time*) comienza también, en el momento en que se inicia la estimulación y finaliza cuando la onda alcanza su máxima amplitud. Estudiamos el tiempo de latencia y tiempo de culminación en los distintos grupos de animales objeto de estudio y no se observaron diferencias significativas (los datos no se muestran).

## DISCUSIÓN

En los estudios realizados por nuestro laboratorio (9) ya habíamos demostrado la importancia del estrés oxidativo en este modelo de retinopatía diabética experimental. Este hecho queda de nuevo confirmado por los resultados presentados en este trabajo, como lo demuestra el aumento en la concentración de MDA o la disminución de la concentración de GSH en los

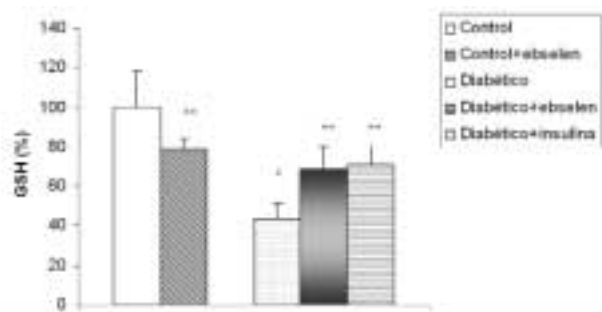


Fig. 3: Estudio de las concentraciones de GSH en homogenado de ojos sin cristalino en los distintos grupos de ratones, en el experimento con el antioxidante ebselen. \*  $p < 0,05$  vs control, \*\*  $p < 0,05$  vs diabético.

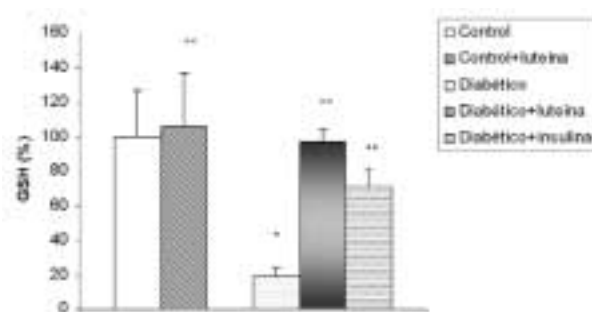


Fig. 4: Estudio de las concentraciones de GSH en homogenado de ojos sin cristalino en los distintos grupos de ratones, en el experimento con el antioxidante luteína. \*  $p < 0,05$  vs control, \*\*  $p < 0,05$  vs diabético.

homogenados de ojo sin cristalino de ratones diabéticos. Es un hecho bien contrastado en la bibliografía que en el homogenado de ojo sin cristalino, un 97% corresponde a la retina (14). Las elevadas concentraciones de MDA confirman la importancia de la peroxidación lipídica en la diabetes. Hay un consenso general, acerca de que las medidas de MDA por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) son marcadores efectivos de la implicación del estrés oxidativo en una condición patológica determinada y también son útiles para evaluar los efectos de los tratamientos antioxidantes (15). Los datos de la literatura en cuanto a los niveles de GSH en la retina de rata diabética son contradictorios. Nuestros resultados concuerdan con los presentados por Kern, Kowluru y Engerman (16), quienes observaron una disminución de los niveles de GSH en la retina de ratas con una duración de la diabetes de dos meses. Sin embargo, otros (17) no han podido demostrar estas variaciones. Los niveles de GSH también están disminuidos en otros tejidos que sufren las complicaciones de la diabetes, tales como el cristalino (16), el nervio periférico (18) y el riñón (19).

El tratamiento con los dos antioxidantes consigue normalizar estos parámetros. Este efecto se podría explicar por la característica común que presentan el ebselen y la luteína de ser secuestrantes de peroxinitritos.

La importancia del ON y el peroxinitrito en las complicaciones de la diabetes, y en particular en la retinopatía diabética, queda reflejada en numerosos estudios.

Quizás, el cambio más dramático que se produce de manera precoz en la retina neurosensorial de

ratas diabéticas es el aumento en diez veces de la frecuencia de la apoptosis. Este cambio se observa sólo un mes después de la inducción de la diabetes y continúa con la misma frecuencia al menos 12 meses. La gran mayoría de células apoptóticas no se encontraron en células vasculares sino en células ganglionares (20). También hay apoptosis en la retina en otras enfermedades degenerativas como la retinitis pigmentaria, la neuropatía óptica isquémica anterior y glaucoma.

La apoptosis de células nerviosas se ha relacionado con la formación de peroxinitrito (21). El ON se sintetiza en las células a través de la conversión de L-arginina en L-citrulina, mediante la acción de la enzima óxido nítrico sintetasa (ONS). Existen tres isoformas de la ONS: neuronal, endotelial e inducible. Las isoformas neuronal y endotelial se expresan constitutivamente y generan pequeñas cantidades de ON cuando son activadas por el complejo calcio/calmodulina. Por el contrario, la isoforma inducible no se expresa constitutivamente. Se expresa en muchos tipos de células después de ser activada por estímulos inmunológicos o inflamatorios y actúa independientemente del calcio, generando grandes cantidades de ON durante largos períodos de tiempo.

En el ojo, se cree que la ONS neuronal es la responsable de producir ON en los fotorreceptores y en las células bipolares, mientras que la ONS endotelial está presente en las células vasculares endoteliales. Sin embargo, la ONS inducible, que está presente en las células de Müller y en el epitelio pigmentario de la retina, puede estar implicada en la fagocitosis del segmento externo del fotorreceptor, en procesos infecciosos, inflamatorios e isquémicos, así como en la patogenia de la retinopatía diabética (22).

Varios estudios demuestran un aumento de la actividad ONS en las retinas de ratas diabéticas cuando se las compara con controles (23,24) en las primeras etapas de la diabetes. Este aumento podría estar relacionado con las alteraciones clínicas propias de la retinopatía diabética. Por el contrario Roufail et al (25), encontraron que el número de células que contienen ONS neuronal había descendido un 32% una semana después de la inducción de la diabetes en ratas y que permanece disminuida hasta ocho meses después. Este estudio no confirmó si el menor número de células nONS+ era debido a una menor síntesis de la proteína o a la muerte de dichas células.

Nuestro grupo ya había demostrado que la amplitud de la onda b del ERG era menor en los animales diabéticos (9), en el presente trabajo estudiamos el tiempo de latencia y el tiempo de culminación en la onda b del ERG de los distintos grupos de animales, no observándose diferencias significativas, pese a que algunos autores encuentran que hay un incremento significativo de la latencia de la onda b en los ratones diabéticos (26).

Se requieren nuevos estudios para confirmar el mecanismo de acción del ebselén y la luteína en este modelo de retinopatía diabética experimental.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Kagan VE, Shvedova AA, Novikov KN, Kozlov YP. Light-induced free radical oxidation of membrane lipids in photoreceptors of frog retina. *Biochim Biophys Acta* 1973; 330: 76-79.
2. Kowluru RA. Effect of reinstitution of good glycemic control on retinal oxidative stress and nitrate stress in diabetic rats. *Diabetes* 2003; 52: 818-823.
3. 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.
4. Grattagliano I, Vendemiale G, Boscia F, Micelli-Ferrari T, Cardia L, Altomare E. Oxidative retinal products and ocular damages in diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 369-372.
5. Ceriello A. New insights on oxidative stress and diabetic complications may lead to a «causal» antioxidant therapy. *Diabetes Care* 2003; 26: 1589-1596.
6. Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz, E, Tonutti L, et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001; 44: 834-838.
7. Ceriello A, Quagliaro L, Catone B, Pascon R, Piazzola M, Bais B et al. Role of hyperglycemia in nitrotyrosine postprandial generation. *Diabetes Care* 2002; 25: 1439-1443.
8. 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-S63.
9. Miranda M, Muriach M, Johnsen S, Bosch-Morell F, Araiya JJ, Romá J, et al. Estrés oxidativo en un modelo de retinopatía diabética experimental: tratamiento con antioxidantes. *Arch Soc Esp Oftalmol* 2004; 79: 289-294.
10. Peterson GL. A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Anal Biochem* 1977; 83: 346-356.
11. 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.
12. Romero MJ, Bosch-Morell F, Romero B, Rodrigo JM, Serra MA, Romero FJ. Serum malondialdehyde: possible

- use of the clinical management of chronic hepatitis C patients. *Free Radic Biol Med* 1998; 25: 993-997.
13. 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.
  14. Doly M, Droy-Lefaix MT, Braquet P. Oxidative stress in diabetic retina. *EXS* 1992; 62: 299-307.
  15. Halliwell B. Oxidative stress markers in human disease: application to diabetes and to evaluation of the effects of antioxidants. In: Packer L, Rosen P, Tritschler HJ, King GL, Azzi A. *Antioxidants in Diabetes Management*. New York: Marcel Dekker; 2000; 33-52.
  16. Kern TS, Kowluru RA, Engerman RL. Abnormalities of retinal metabolism in diabetes or galactosemia: ATPases and glutathione. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35: 2962-2967.
  17. Obrosova IG, Fathallah L, Greene DA. Early changes in lipid peroxidation and antioxidative defense in diabetic rat retina: effect of DL-alpha-lipoic acid. *Eur J Pharmacol* 2000; 398: 139-146.
  18. Mitton KP, Dzialoszynski T, Sanford SE, Trevithick JR. Cysteine and ascorbate loss in the diabetic rat lens prior to hydration changes. *Curr Eye Res* 1997; 564-571.
  19. Aragno M, Tamagno E, Gatto V, Brignardello E, Parola S, Danni O et al. Dehydroepiandrosterone protects tissues of streptozotocin-treated rats against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 1999; 26: 1467-1474.
  20. Barber AJ, Lieth E, Khin SA, Antonetti DA, Buchanan AG, Gardner TW. Neural apoptosis in the retina during experimental and human diabetes. Early onset and effect of insulin. *J Clin Invest* 1998; 102: 783-791.
  21. Guo Q, Fu W, Holtsberg FW, Steiner SM, Mattson MP. Superoxide mediates the cell-death-enhancing action of presenilin-1 mutations. *J Neurosci Res* 1999; 56: 457-470.
  22. Yilmaz G, Esser P, Kociok N, Aydin P, Heimann K. Elevated vitreous nitric oxide levels in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol* 2000; 130: 87-90.
  23. do Carmo A, Lopes C, Santos M, Proenca R, Cunha-Vaz J, Carvalho AP. Nitric oxide synthase activity and L-arginine metabolism in the retinas from streptozotocin-induced diabetic rats. *Gen Pharmacol* 1998; 30: 319-324.
  24. Takeda M, Mori F, Yohida A, Takamiya A, Nakagomi S, Sato E et al. Constitutive nitric oxide synthase is associated with retinal vascular permeability in early diabetic rats. *Diabetologia* 2001; 44: 1043-1050.
  25. Roufail E, Soulis T, Boel E, Cooper ME, Rees S. Depletion of nitric oxide synthase-containing neurons in the diabetic retina: reversal by aminoguanidine. *Diabetologia* 1998; 41: 1419-1425.
  26. Hotta N, Koh N, Sakakibara F, Nakamura J, Hamada Y, Naruse K, et al. Effect of an aldose reductase inhibitor, SNK-860, on deficits in the electroretinogram of diabetic rats. *Exp Physiol* 1995; 80: 981-989.