

NEUROPATÍA ÓPTICA INDUCIDA POR EXPOSICIÓN PRENATAL A DROGAS O ALCOHOL

OPTIC NEUROPATHY INDUCED BY PRENATAL DRUG OR ALCOHOL EXPOSURE

PONS S¹, ZANÓN-MORENO V¹, MELO P¹, VILA V², GALLEGO-PINAZO R³, PINAZO-DURÁN MD²

RESUMEN

Objetivo: Nos proponemos analizar los mecanismos celulares y moleculares implicados en el desarrollo de la retina y el nervio óptico, y las consecuencias de un consumo abusivo de metanfetamina (MA) o alcohol (EtOH) durante la gestación sobre el sistema visual en desarrollo.

Material y métodos: Ratas Wistar fueron expuestas a MA o EtOH durante la gestación y lactancia para obtener su descendencia. Los globos oculares y nervios ópticos de neonatos (días 7, 14, 21 postnatales) fueron procesados para técnicas morfológicas, morfométricas y Western Blot, utilizando anticuerpos frente a la proteína fibrilar ácida de la glía (GFAP) y proteína básica de la mielina (MBP) y proteína de los neurofilamentos (NFP).

Resultados: Observamos diferencias estadísticamente significativas entre el grupo expuesto a MA y expuesto a EtOH frente a los controles. El tamaño de la sección transversal del nervio óptico fue inferior en relación a la exposición a drogas o alcohol. La expresión de GFAP y MBP está alterada en

ABSTRACT

Purpose: The main aim of this work was to analyse the cellular and molecular mechanisms involved in retinal and optic nerve development, and the consequences of methamphetamine «ice» (MA) or alcohol (EtOH) abuse during pregnancy on the developing visual system.

Material and methods: Wistar rats were exposed to MA or EtOH during gestation and lactation and their offspring studied. Control isocaloric rats were maintained in parallel. The eyes and optic nerves from pups (at 7, 14 and 21 postnatal days) were processed using morphologic, morphometric and western blot approaches using antibodies against glial fibrillary acidic protein (GFAP), myelin basic protein (MBP) and neurofilament protein (NFP).

Results: Statistically significant differences were observed between the methamphetamine-exposed and the alcohol-exposed rats, as compared to the controls. The optic nerve cross-sectional area was smaller in the drug or alcohol-exposed animals. The expression of developmental protein markers

Recibido: 5/4/06. Aceptado: 17/1/07.

Unidad de Investigación Oftalmológica «Santiago Grisolfá» (Valencia, España) y Departamento de Oftalmología, Hospital Universitario Punta de Europa (Algeciras, España).

¹ Licenciado en Biología.

² Doctor en Medicina.

³ Licenciado en Medicina.

Comunicación presentada en el LXXXI Congreso de la S.E.O. (Zaragoza 2005).

Estudio colaborativo europeo, financiado por el Fondo de Investigaciones Sanitarias FIS/FEDER [Proyecto P1020191-Investigador principal Dra. Pinazo-Durán, becarios asociados a proyecto S. Pons (España) y P. Melo (Portugal)].

Correspondencia:

M.D. Pinazo-Durán

Unidad de Investigación Oftalmológica «Santiago Grisolfá»

Edificio de Consultas externas. 1.ª planta. Hospital Universitario Dr. Peset

Avenida Gaspar Aguilar, 90

46017 Valencia

España

E-mail: pinazoduran@yahoo.es

los animales expuestos a drogas o alcohol, respecto a los controles.

Conclusiones: La exposición prenatal a psicoestimulantes o alcohol altera el desarrollo de la retina y nervio óptico.

Palabras clave: Neuropatía óptica, metanfetamina, psicoestimulantes, alcohol, síndrome tóxico gestacional.

(GFAP and MBP) in the retina and optic nerve displayed striking alterations related to drug or alcohol abuse during gestation and lactation.

Conclusions: Psychostimulant and alcohol exposure alters the development of the retina and optic nerve (*Arch Soc Esp Oftalmol* 2007; 82: 21-26).

Key words: Optic neuropathy, methamphetamine, psychostimulants, alcohol, gestational toxic syndrome.

INTRODUCCIÓN

El sistema visual es vulnerable a la acción de xenobióticos, incluidos diversos tóxicos como el alcohol, y los psicoestimulantes. Esto implica una mayor vulnerabilidad en el caso del consumo abusivo durante la gestación, causando un síndrome caracterizado por la triada patognomónica: malformaciones, retraso en el crecimiento y desarrollo ponderal, alteraciones del sistema nervioso (central y periférico) y retraso mental. Estas manifestaciones que denominamos síndrome tóxico gestacional (1) (STG) son comunes a diversos agentes, como los descritos para el abuso de alcohol (2) y la cocaína (3).

En 1985, Strömland describe la presencia de hipoplasia del nervio óptico y aumento de la tortuosidad vascular en el fondo de ojo de niños nacidos de madres alcohólicas crónicas (4). Los modelos animales han reproducido la afectación ocular en ratas expuestas prenatalmente al EtOH (5), puntualizando que los animales afectados nunca recuperaban las lesiones, incluso tras la privación del tóxico (6). Los modelos animales permiten controlar muchas de las variables que no pueden controlarse en el ser humano y realizar experimentos encaminados a esclarecer las bases celulares y moleculares de la acción de los tóxicos sobre los organismos en desarrollo.

Con este trabajo pretendemos analizar los mecanismos etiopatogénicos que intervienen en las anomalías del desarrollo de la retina y nervio óptico en dos modelos experimentales de exposición a psicoestimulantes o alcohol en la rata.

SUJETOS, MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño de los modelos experimentales y distribución de los animales

Hemos utilizado ratas Wistar en edad juvenil (2 meses de edad, y peso corporal 200-230 g), mante-

nidas en el Laboratorio de Patología Celular del Centro de Investigación Príncipe Felipe (Valencia), y el Instituto de Investigación de Biología Molecular y Celular de Oporto (Portugal), bajo condiciones de laboratorio y para destinarlas a éste y trabajos similares (utilizando el mismo animal en diferentes estudios). Se obtuvieron los permisos de los comités correspondientes y todos los experimentos se adecuaron a los criterios de la Comunidad Europea para trabajos de experimentación animal (86/609).

La distribución de las ratas para el estudio puede observarse en la tabla I. En total, hemos utilizado 36 crías, a las que se les extrajeron el globo ocular y nervio óptico.

En el grupo de experimentación con MA, la administración fue por inyección subcutánea. Se les administraron 5 mg/kg peso y día, disuelto en 3 ml de suero salino (0,9%), dividido en tres dosis diarias de 1 ml con 1,6 mg de clorhidrato de metanfetamina, por dosis. La administración comienza el día 8 de gestación, hasta el 22. La determinación de los días de gestación se realiza mediante lavado del flujo vaginal. Al grupo control se les inyecta subcutáneamente suero salino. La razón de administrar esta última sustancia por vía subcutánea ha sido la dificultad en administrarlo por vía digestiva o por absorción de mucosas. El grupo control del modelo metanfetamina es isopair-fed respecto del grupo tratado. Para explicar esto, hay que concretar que el

Tabla I. Descripción del número y distribución de las ratas para cada modelo

Grupos	Ratas madre	Crías 7 P	Crías 14 P	Crías 21 P
Grupo control	9	4	4	4
Grupo MA	9	4	4	4
Grupo EtOH	9	4	4	4

MA: metanfetamina; EtOH: alcohol; 7P, 14P y 21P corresponden a los días 7, 14 y 21 postnatales.

consumo de esta sustancia provoca una alteración en el hábito alimenticio, disminuyendo la ingesta de alimentos por los animales experimentales. Por ello, a los animales del grupo control se les suministra la misma cantidad de alimento que a los experimentales, con el fin de evitar diferencias entre ambos grupos debidas a un distinto aporte energético que dificulte o facilite los distintos procesos fisiológicos que tienen lugar durante el período de desarrollo.

En el grupo experimental tratado con EtOH, se administró a las ratas madres una dieta líquida que contiene el 5% de etanol (peso/volumen) de forma que este constituya el 35% de las calorías diarias. Esta dieta se administra durante 6 semanas para lograr que los animales sean alcohol-dependientes. A partir de aquí se unen a machos Wistar, y se determinan los días de gestación mediante lavado del flujo vaginal. Después del nacimiento de la descendencia se les sigue administrando, tanto a madres como a crías, la dieta líquida con alcohol hasta el día de sacrificio. En cuanto al grupo control del modelo alcohol, debemos decir que es isocalórico respecto al grupo tratado. De esta forma evitamos que las diferencias que se puedan observar entre ambos grupos se puedan ver influidas por un distinto aporte energético que dificulte o facilite los distintos procesos fisiológicos que tienen lugar durante el período de desarrollo.

Obtención y procesamiento de muestras oculares

Una vez finalizada la experimentación con los animales de los dos modelos procedemos a la obtención de las muestras. Los animales se sacrificaron tras perfundir con suero salino 0,9% caliente y realizando perfijación con formol. Posteriormente se extrae el globo ocular y el nervio óptico del animal. Según el procedimiento a seguir unas muestras se destinaron a métodos de fijación-inclusión y se clasificaron hasta su utilización, y otras muestras se congelaron y almacenaron a -85°C .

En el primer caso, mediante técnicas de microcirugía se separan la retina y el nervio óptico y se fijan en una solución de glutaraldehído 2% y formaldehído 3% en tampón cacodilato, 0,1 Molar y pH 7,4, realizando deshidrataciones en concentraciones crecientes de etanol para finalmente incluirlas en resina EPON y realizar cortes semifinos y

ultrafinos que se examinarán mediante las tinciones específicas para microscopía óptica y electrónica de transmisión, según descripciones previas (7) para estudiar la morfometría del nervio óptico.

En el segundo caso, cada muestra se mezcla con 5 volúmenes de tampón de lisis para facilitar la ruptura celular, y homogeneizar el material. Con este proceso lo que obtenemos es una suspensión uniforme, de la cual necesitamos conocer la cantidad de proteína utilizando el ensayo de proteínas del ácido bicinchonínico (BCA Sigma Aldrich), para así poder pasar a realizar la técnica de Western Blot, que nos permitirá determinar las proteínas implicadas en el desarrollo neural. Este ensayo nos sirve para medir la cantidad de proteína en general que tiene una determinada solución.

Una vez determinada la concentración proteica de las muestras ya podemos calcular el volumen adecuado que tenemos que usar para poder realizar la técnica Western Blot.

Las proteínas que hemos estudiado mediante el Western Blot, implicadas en el desarrollo neural, son:

— GFAP (Glial Fibrillar Acidic Protein 45-50KD) que marca las células gliales en el nervio óptico, y en la retina los astrocitos, oligodendrocitos y células de Müller.

— NFP (Neurofilament Protein 200KD) que marca los axones en el nervio óptico y en la retina.

— MBP (Myelin Basic Protein 33KD) que señala la vaina de mielina que recubre las fibras ópticas que forman el nervio óptico.

RESULTADOS

Con los grupos de animales tratados y controles, y aplicando la metodología que hemos explicado anteriormente, hemos obtenido los siguientes resultados.

Modelo de exposición prenatal a EtOH

Mediante el estudio de la proteína GFAP hemos observado el desarrollo de los astrocitos. En el nervio óptico observamos en todos los días del estudio (p7, p14, p21) una disminución de la astroglía en el grupo tratado con el alcohol, pero sólo es estadísticamente significativa en el día 14, mientras que en el día 21 casi llega a igualarse al correspondiente

control. También, en el estudio de esta proteína, hemos observado que en la retina es altamente significativa la disminución de la actividad glial en los días 7 y 14. En el día 21 ambos grupos se igualan (fig. 1).

En el caso de la proteína NFP en el nervio óptico, hemos apreciado una expresión creciente a lo

largo del desarrollo, pero con una disminución en el grupo EtOH respecto al control en todos los días del estudio. De forma similar, existe una disminución ostensible de la expresión de la proteína en el grupo tratado frente al control en la retina (fig. 2).

La expresión de la proteína MBP en el nervio óptico aumentó durante el desarrollo postnatal, sin

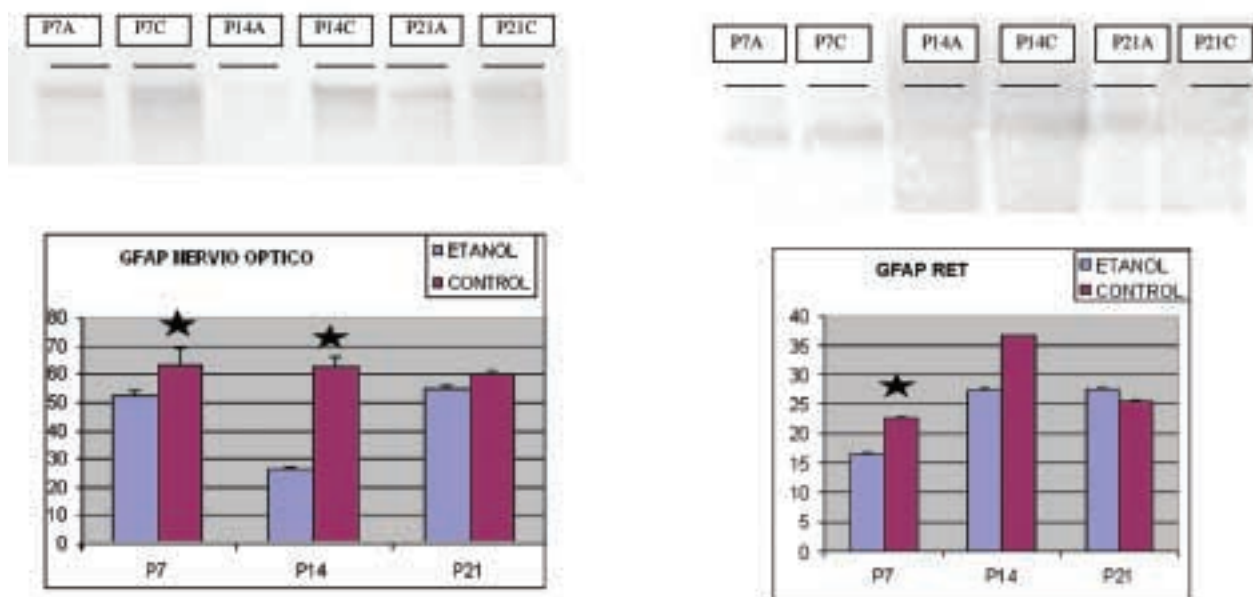


Fig. 1: Expresión de la proteína GFAP en nervio óptico y retina de rata en grupos alcohol y control.

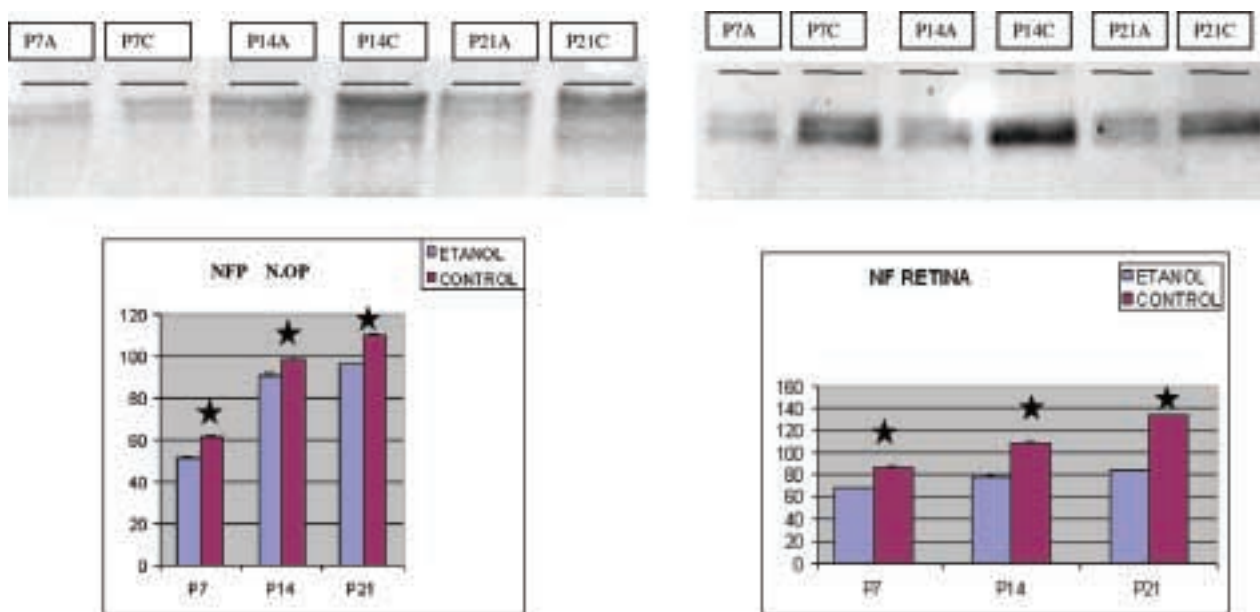


Fig. 2: Expresión de la proteína NFP en nervio óptico y retina de rata en grupos alcohol y control.

embargo en el grupo etanol se mantuvo constante y no sufrió aumento a lo largo del tiempo estudiado. Además, se apreció que el patrón de expresión de la mielina en el grupo alcohol es distinto al del grupo control (fig. 3).

Modelo de exposición a drogas psicoestimulantes, MA («ice»)

Los resultados de las medidas realizadas del área de la sección transversal del nervio óptico muestran que en el grupo metanfetamina el área de la sección transversal del nervio óptico es menor que en el grupo control, pero la diferencia no fue estadísticamente significativa.

El número de núcleos de las células gliales por sección fue menor en el grupo control, pero las diferencias encontradas no fueron estadísticamente significativas.

La densidad volumétrica de los paquetes de las fibras nerviosas fue significativamente menor en el grupo control (fig. 4).

DISCUSIÓN

La comparación de resultados entre los dos modelos experimentales de exposición a tóxicos, nos permite estudiar los mecanismos de acción de

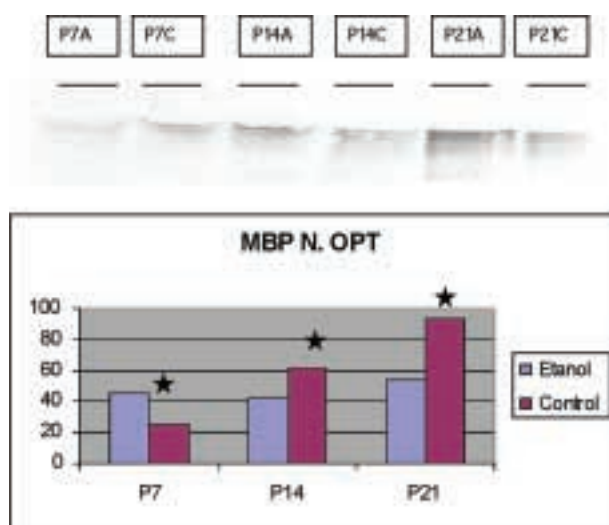


Fig. 3: Expresión de la proteína MBP en nervio óptico de rata en grupos alcohol y control.

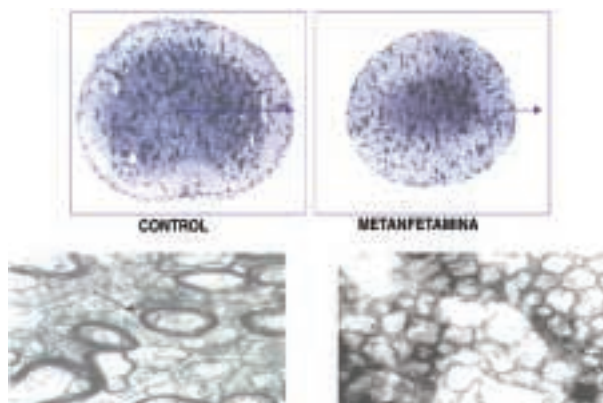


Fig. 4: Microfotografías del nervio óptico de rata grupo control y metanfetamina. Las imágenes de la parte superior muestran la diferencia en el radio del nervio óptico entre el grupo control y metanfetamina. En las imágenes de la parte inferior se observa la diferencia en la mielinización del nervio óptico entre ambos grupos.

las sustancias y las variaciones entre ambos tóxicos al repercutir sobre los tejidos oculares.

El alcohol se administró por vía oral, en dieta líquida, siguiendo el modelo descrito por Lieber (8) y que ha demostrado que provoca los mismos síntomas de alcoholismo crónico en las ratas, extrapolable a los humanos. Diversos trabajos han corroborado esta forma de administración tanto en animales (9,10) como en humanos (2-11). Aunque la vía de administración de la MA difiere del humano, la concentración que alcanza en sangre y tejidos fetales de la rata en este modelo experimental, es extrapolable a la que alcanza la droga en el hombre, salvando la escala filogenética. Estos datos han demostrado que la MA por vía subcutánea induce anomalías comparables a las alteraciones del comportamiento y lesiones en el desarrollo del Sistema Nervioso en niños con el Síndrome Tóxico Gestacional (12).

Los resultados obtenidos por la intoxicación mediante alcohol con la proteína GFAP deben dar lugar a un nuevo estudio para conocer por qué en el último día de estudio los niveles se igualan con el grupo control, tanto en la retina como en el nervio óptico. Si centramos nuestra atención con la proteína NFP los resultados son muy aclaratorios de que realmente en el grupo alcohol se sufre una disminución del número de fibras ópticas, tanto en la retina como en el nervio óptico, mermando así gravemente el sistema visual (13). En la última proteína a estudio, MBP, se observa que el abuso de alcohol

provoca un cambio en el patrón de expresión de la proteína durante el período postnatal. Esta proteína es la mielina, que recubre las fibras ópticas y es necesaria para el buen funcionamiento de estas. Entonces, la disminución de la cantidad de mielina también puede ser debida al menor número de fibras ópticas (14).

En los resultados obtenidos en la intoxicación mediante metanfetamina se pueden observar las diferencias que existen entre el grupo control y el grupo metanfetamina, las cuales ponen de manifiesto y justifican el mayor diámetro del nervio óptico en el grupo control (15,16).

Por último, tras este estudio podemos concluir que el alcohol induce un retraso severo en el desarrollo de la retina y el nervio óptico, provocando también alteraciones ultraestructurales. Razón por la cual se puede decir que es un agente teratogénico para la retina y el nervio óptico de la rata, corroborando los resultados de Pinazo-Durán (7).

Después de estudiar la intoxicación por metanfetamina, podemos concluir que induce un retraso en el desarrollo y anomalías en la mielinización del nervio óptico de la rata, siendo una sustancia nociva para el desarrollo del sistema visual.

Ambas sustancias deben ser evitadas durante el período gestacional en evitación de efectos no deseados.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pinazo-Durán MD, Renau-Piqueras J, Guerri C. Efecto de la exposición intrauterina y postnatal al alcohol sobre el desarrollo del nervio óptico en la rata. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 1992; 63: 225-232.
2. Miller M, Israel J, Cuttone J. Fetal alcohol syndrome. *J Pediatr Ophthalmol Strabismus* 1981; 18: 6-15.
3. Silva-Araujo A, Silva MC, Abreu-Dias P, Tavares MA. Effects of prenatal cocaine exposure in the retinal ganglion cell layer of the rat. A morphometric analysis. *Mol Neurobiol* 1995; 11: 87-97.
4. Stromland K. Ocular abnormalities in the Fetal alcohol syndrome. *Acta Ophthalmol Suppl* 1985; 171: 1-50.
5. Pinazo-Durán MD, Guerri C, Stromland K, Renau-Piqueras J. Análisis comparativo de los parámetros del desarrollo del globo ocular y del nervio óptico en ratas expuestas prenatalmente al etanol. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 1996; 70: 65-72.
6. Pinazo-Durán MD, Guerri C, Renau-Piqueras J. Efectos diferidos del alcohol prenatal en el globo ocular de la rata adulta. Consideraciones sobre los mecanismos reparadores. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 1997; 72: 545-552.
7. Pinazo-Durán MD, Cervera R, Pons S, Zanón-Moreno VC, Gallego-Pinazo R, Guerri C. Mecanismos de expresión proteica en el nervio óptico de la rata. Modificaciones por exposición al alcohol. *Arch Soc Esp Ophthalmol* 2005; 80: 99-104.
8. Lieber CS, DeCarli LM. The feeding of alcohol in liquid diets: two decade of applications and 1982 update. *Alcohol Clin Exp Res* 1982; 6:523-531.
9. Cook CS, Nowotny AZ, Sulik KK. Fetal alcohol syndrome. Eye malformations in a mouse model. *Arch Ophthalmol* 1987; 105: 1576-1581.
10. Bonthius DJ, West JR. Alcohol-induced neuronal loss in developing rats: increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 1990; 14: 107-118.
11. Stromland K, Pinazo-Duran MD. Ophthalmic involvement in the fetal alcohol syndrome: clinical and animal model studies. *Alcohol Alcohol* 2002; 37: 2-8.
12. Meyer JS, Grande M, Johnson K, Ali SF. Neurotoxic effects of MDMA («ecstasy») administration to neonatal rats. *Int J Devl Neurosci* 2004; 22: 261-271.
13. Pinazo-Duran MD, Renau-Piqueras J, Guerri C. Developmental changes in the optic nerve related to ethanol consumption in pregnant rats: analysis of the ethanol-exposed optic nerve. *Teratology* 1993; 48: 305-322.
14. Lewohl JM, Wixey J, Harper CG, Dodd PR. Expression of MBP, PLP, MAG, CNP, and GFAP in the Human Alcoholic Brain. *Alcohol Clin Exp Res* 2005; 29: 1698-1705.
15. Silva-Araujo A, Salgado-Borges J, Tavares MA. Morphological changes in the optic nerve after chronic exposure of neonatal rats to cocaine and amphetamine. *Ophthalmic Res* 1991; 23: 295-302.
16. Melo P, Rodrigues LG, Pinazo-Duran MD, Tavares MA. Methamphetamine and lipid peroxidation in the rat retina. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005; 73: 455-460.