

Cambios en la expresión de proteínas apoptóticas en retina de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina

Mayor M.C. Roberto **Padilla-Barrales**,* Mayor M.C. Jaime **Pares-Hipólito**,**

Mayor M.C. Claudia E. **Rodríguez-Montes*****

Hospital Central Militar. Escuela Médico Militar.

RESUMEN

Objetivo. Determinar la expresión de proteínas apoptóticas en retina de ratas diabéticas inducidas con estreptozotocina mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica.

Métodos. Se utilizaron ratas Long-Evans de seis semanas de edad y se formaron dos grupos de 10 ratas cada uno a las que se les indujo diabetes mellitus experimental mediante inyección de estreptozotocina intraperitoneal, posteriormente se les realizó enucleación de ambos ojos para su posterior procesamiento y análisis inmunohistoquímico por citometría de flujo, para determinar los niveles de expresión de Fas y FasL.

Resultados. Se detectó la presencia de Fas y FasL en células del EPR donde los niveles de expresión estaban altos al inicio del experimento, a diferencia de los niveles de expresión en células del EPR en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina, detectando que los niveles de expresión en este caso se invirtieron con un aumento importante en los niveles de Fas y disminución considerable en los niveles de FasL ($P < 0.0001$). Así también, se observaron depósitos de hemosiderina a nivel de la capa de células ganglionares en el estudio histopatológico.

Conclusiones. En fases tempranas, existe aumento en la expresión de Fas y disminución importante en la expresión de FasL, la cual se correlaciona con cambios en la expresión de proteínas apoptóticas en la diabetes inducida experimentalmente. La expresión de FasL describe la influencia, por una parte, en la protección inmunológica del ojo y por otro lado, probablemente conteniendo el desarrollo de la neovascularización en la retinopatía diabética experimental en ratas.

Palabras clave: Apoptosis, diabetes mellitus, Fas/FasL, proteínas apoptóticas, retinopatía diabética.

Changes in the expression of apoptotic proteins in retina of diabetic rats induced with streptozotocin

SUMMARY

Purpose. To determine the expression of the apoptotic proteins in the retina of diabetic rats induced with streptozotocin, through flow cytometry and immunohistochemical technique.

Method. Six weeks old Long-Evans mice were used and were formed two groups of 10 rats each, one of those were Diabetes-induced experimentally through intraperitoneal injection of streptozotocin, posteriorly both eyes were enucleated for its subsequent flow cytometry and immunohistochemical analysis, to determine the levels of Fas and FasL expression.

Results. It was detected the presence Fas and FasL in EPR cells, where the expression levels were high at the beginning of the experiment; as opposed to the expression levels in EPR cells of diabetes-induced rats with streptozotocin, detecting that the expression levels in this case were invested with an important increase in the levels of Fas and considerable decrease in the levels of FasL ($P < 0.0001$). Thus also we observe hemosiderin deposits at Ganglion cell layer in the histopathology study.

Conclusions. In early phases, exist increase in the expression of Fas and important decrease in the expression of FasL, the one which is interrelated with changes in the apoptotic proteins expression in the Diabetes-induced experimentally. The expression of FasL tell us about the role that plays, in one side through immunologic protection of the eye and on the other hand probably containing the development of the neovascularization in rats diabetic retinopathy induced experimentally.

Key words: Apoptosis, diabetes mellitus, Fas/FasL, apoptotic proteins, diabetic retinopathy.

* Tercer año del curso de Residencia y Especialidad en Oftalmología, Escuela Militar de Graduados de Sanidad. ** Área de Farmacología, Escuela Médico Militar. *** Servicio de Patología Quirúrgica, Hospital Central Militar.

Correspondencia:

Mayor M.C. Roberto Padilla-Barrales

Maracaibo No. 105, Fracc. Las Américas, Naucalpan, Estado de México. C.P. 53040.

Correo electrónico: robopadillamx@yahoo.com.mx

Recibido: Febrero 10, 2010.

Aceptado: Octubre 4, 2010.

Introducción

La diabetes mellitus (DM) es un problema de salud pública, ya que más de 10% de la población adulta del país la presenta. La DM y sus complicaciones son actualmente la tercera causa más importante de mortalidad y una de las principales causas de ceguera irreversible en adultos. A nivel ocular se ha reportado que después de 20 años de iniciada esta enfermedad, 90% de los pacientes con DM tipo 1 y 60% de los pacientes con DM tipo 2 presentan retinopatía diabética (RD) lo que constituye la primera causa de ceguera irreversible en personas en edad productiva. La fisiopatogenia de la RD aún no es bien conocida, aunque se sabe que existe una ruptura de la barrera hemato-retineana interna que incrementa la permeabilidad vascular.¹⁻⁴

El epitelio pigmentario de la retina (EPR) es una capa situada externa a la capa de fotorreceptores de la retina e interna a la membrana de Bruch. La función del EPR es la de mantenimiento y soporte de los fotorreceptores mediante la fagocitosis y degradación de desechos de segmentos retinianos externos; por lo que, el daño al EPR resulta en degeneración de la retina sensorial y puede contribuir a la patogénesis de la retinopatía diabética.⁵⁻⁷

El mecanismo molecular para el daño de células del EPR no se entiende en forma clara. La apoptosis es una forma de muerte celular caracterizada por condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y externalización de la fosfatidil serina. En la Retinopatía Diabética Proliferativa (RDP), que es altamente vascularizada, se ha observado una apoptosis extensa en las células del EPR; sugiriendo que la apoptosis de células del EPR está involucrada en la patogénesis de la RDP.⁸

La disfunción o daño endotelial puede ser resultado de apoptosis de células endoteliales, por lo tanto, los marcadores de apoptosis en plasma pueden proveer variables para identificar daño endotelial grave; se han analizado recientemente algunos marcadores de apoptosis; entre ellos citocinas como FNTa, Fas ligando (FasL), glucocorticoides y otras enzimas que pueden inducir apoptosis en algunas poblaciones celulares.⁹⁻¹¹

En muchos sistemas la apoptosis está mediada por la interacción entre Fas ligando (Fas-L) y Fas. La unión del Fas-L al Fas inicia una señal de transducción hacia la apoptosis en células susceptibles y están expresados en un rango amplio de tejidos. El sistema Fas provee un mecanismo importante para la regulación de la respuesta inmune. Una expresión sustanciosa de Fas-L ha sido encontrada en la retina; por lo que ha sido propuesto que Fas-L participa en el mantenimiento de la inmunidad ocular induciendo la apoptosis mediante la activación de linfocitos.^{12,13}

El ojo es el prototipo de un sitio inmune privilegiado. En algunos estudios se ha comprobado que la expresión de FasL controla la difusión de la inflamación mediante la muerte (apoptosis) de células linfoides que invaden el tejido y como regulador negativo de la angiogénesis, ya que induce apoptosis de leucocitos los cuales proveen factores de crecimiento angiogénico que dañan al ojo y afectan la visión.¹⁴

El modelo que se ha empleado para reproducir las complicaciones de la diabetes humana es la administración de la estreptozotocina (SZ) en ratas, un antibiótico de amplio espectro con actividad antitumoral, oncogénica y diabetogénica, esta última acción mediada por destrucción de células beta del páncreas.¹⁵

El sistema de Fas/FasL es parte de un complejo sistema encargado del control de la formación de vasos sanguíneos, evitando en condiciones basales la neoformación de vasos en la retina que interfieran con la visión, sugiriendo que la baja expresión de FasL en ratas diabéticas, como resultó en el experimento, se correlaciona con los estudios reportados en la literatura donde no se conserva el privilegio inmune del ojo; todo esto a través de limitar los mecanismos de muerte celular programada (apoptosis), ocasionando la activación celular mediante factores de crecimiento como el endotelio vascular (FCEV), que es un mediador importante en la neovascularización ocular secundaria a isquemia retiniana.^{16,17}

Valorar los niveles del sistema de receptores Fas/Fas ligando (FasL) sirvió para determinar el grado de apoptosis y por consiguiente el daño en el endotelio vascular y epitelio pigmentado de la retina. El conocimiento de las moléculas que inducen neovascularización y apoptosis para controlar la angiogénesis es importante para desarrollar terapias racionales en el tratamiento de este tipo de enfermedades.¹⁸⁻²⁰

Métodos

Sujetos de experimentación

Se utilizaron ratas Long-Evans de seis semanas de edad alimentadas con alimento Harlan Teklad para roedores de laboratorio LM-485 con 4.05 Kcal/g y agua *ad libitum*; las que se mantuvieron en el laboratorio de Farmacología en la Escuela Militar de Graduados de Sanidad, fueron sometidas a ciclos de luz-oscuridad de 12 x 12 hrs y temperatura ambiente entre 18 y 22° C.

Material para la inducción de la diabetes experimental en ratas

1. Fármacos: Estreptozotocina.
2. Instrumental de microcirugía.
3. Equipo para procesamiento de histopatología.
4. Tinción de hematoxilina y eosina.
5. Tinción de ácido peryódico de Schiff.
6. Equipo para procesamiento de tejido para microscopia electrónica.
7. Glucómetro. Precisión Q-I-D Medisense.
8. Tiras reactivas para glucómetro Precisión Q-I-D Medisense.

Material utilizado en la inmunohistoquímica

1. PGN amortiguador salino de fosfatos pH 7.2, 20 mM de glucosa y 5% de suero normal de ratón.
2. PGB amortiguador salino de fosfatos 7.2, 20 mM de glucosa y 0.5 de albúmina sérica bovina.

3. PF amortiguador salino de fosfatos pH-7.2, 2% de formaldehído.
4. PBS amortiguador salino de fosfatos pH 7.2.
5. Anticuerpo policlonal Fas A-20 (sc-1023) purificado de conejo en contra del extremo amino terminal de Fas que reacciona contra el Fas de rata. Santa Cruz Biotechnology, Inc.
6. Anticuerpo policlonal FasL C-178 (sc-6237) purificado de conejo en contra del extremo carboxilo de FasL de rata. Santa Cruz Biotechnology, Inc.

Equipo para análisis mediante citometría de flujo FACS-CALIBUR (Becton Dickinson) con el software CellQuest

Metodología

1. Se formaron dos grupos de 10 ratas cada uno, a las que se les indujo diabetes mellitus experimental mediante inyección de estreptozotocina intraperitoneal en dosis única de 50 mg/kg de peso disuelto en 1 mL de amortiguador de citratos con pH de 4.5.
2. Se registró el peso y la glicemia inicial, previo a la inducción de la diabetes y a las 48 hrs después de la inducción farmacológica de diabetes y posteriormente cada semana.
3. Fue establecido un grupo control con 10 ratas, a los que se les administró amortiguador de citratos, se mantuvo en observación bajo las mismas condiciones de aislamiento e ingesta de agua y alimento desde las seis semanas de edad sin inducción de diabetes experimental y sin recibir ningún tipo de tratamiento farmacológico. Cada uno de los grupos se estudió de la siguiente forma: a partir de la segunda semana de inicio del experimento y hasta la cuarta semana fueron sacrificadas cinco ratas de cada grupo, cada dos semanas, se realizó la enucleación de ambos ojos para incluirlos en glutaraldehído, para su posterior procesamiento y análisis inmunohistoquímico y por citometría de flujo.

Método de inmunohistoquímica

1. Procedimiento.

1.1. Método de inmunoperoxidasa

- a) Se obtienen las laminillas con el tejido fijado a estudiar, en este caso, cortes histológicos de ojos de las ratas.
- b) Se colocan los portaobjetos en un horno de vacío a 60° por 45 min.
- c) Se desparafina en el orden siguiente: se sumergen los portaobjetos con Xilol 10 min a 60° C, verificando su posición en el horno y después otros 10 min a la misma temperatura; después se sacan de dicho horno y se sumergen en Xilol a 25° C durante 20 min, luego en una dilución 1:1 de Xilol y etanol, se espera por 3 min, después se pasan los portaobjetos sucesivamente por etanol a concentración de 100, 96, 70, 50,

30 y 10% por el mismo periodo entre cada cambio.

- d) Se hidrata en agua destilada durante 3 min a temperatura ambiente.
- e) Bloqueo de peroxidasa endógena: Al sumergir los portaobjetos en alcohol metílico 80% (4 min) y de peróxido a 3% que serían 20.
- f) Se rehidratan las preparaciones con inmersión de éstas en las siguientes soluciones de etanol: 100, 95, 70, 25 y 10% durante 5 min en cada una de las concentraciones de etanol.
- g) Se lavan los portaobjetos en una solución de suero dos veces durante 5 min cada uno.
- h) Se aplica el anticuerpo (Fas o FasL) y se incuba en una cámara húmeda durante 18 hrs a 37° C.
- i) Después se quita el exceso y se aplica el segundo anticuerpo, que es un complejo de avidina y biotina y se incuba durante 30 min.
- j) Lavar las preparaciones en suero (TBS) durante 3 min.
- k) Se aplica la diaminobencidina a temperatura ambiente durante 5 a 10 min.
- l) Detener la reacción poniendo los portaobjetos en suero fisiológico.
- m) Se contratiñen las preparaciones sumergiéndolas durante 1 o 2 min en hematoxilina.
- n) Se deshidratan nuevamente las preparaciones sumergiéndolas en concentraciones progresivas ascendentes de etanol.
- o) Se limpian los portaobjetos sumergiéndolos en xilol y se les retira el exceso, se les aplica resina para cubrirlos con el portaobjetos.

Como parámetro para calificar dicha expresión de manera cualitativa se revisaron por los miembros del equipo de tesis las laminillas calificándolas como: 1 (+) cuando la expresión era apenas patente tanto en su distribución como en su intensidad; 2 (++) cuando dicha tinción era patente tanto a la observación macro 10x como a la de 40x, 3 (+++) cuando se presentaba evidente y definida la expresión del anticuerpo en la capa del epitelio pigmentado de la retina. Para verificar que dicha calificación era congruente con la edad, se hace patente la necesidad de valorar tanto la escala como la observación al microscopio de la preparación retiniana de rata por parte del equipo de observadores en conjunto y se dispuso que cada integrante las calificara por separado.

1.2 Método de tinción de Pearl's.

- a) Se obtienen las laminillas con el tejido fijado a estudiar, en este caso, cortes histológicos de ojos de las ratas.
- b) Se colocan los portaobjetos en un horno de vacío a 60° por 45 min.
- c) Se desparafina en el orden siguiente: se sumergen los portaobjetos con Xilol 10 min a 60° C, verificando su posición en el horno y después otros 10 min a la misma temperatura; después se sacan de dicho horno y se sumergen en Xilol a 25° C durante 20 min, luego en una dilución 1:1

de Xilol y etanol, se espera por 3 min, después se pasan los portaobjetos sucesivamente por etanol a concentración de 100, 96, 70, 50, 30 y 10%, por el mismo periodo entre cada cambio.

- d) Se lavan los portaobjetos en una solución de suero dos veces durante 5 min cada uno.
- e) Se tiñen las preparaciones sumergiéndolas durante 1 o 2 min en tinción de Pearl's.
- f) Se deshidratan nuevamente las preparaciones sumergiéndolas en concentraciones progresivas ascendentes de etanol.
- g) Se limpian los portaobjetos sumergiéndolos en Xilol, se les retira el exceso y se les aplica resina para cubrirlos con el portaobjetos.

Método para citometría de flujo

El segmento anterior del ojo se elimina y la porción posterior del globo ocular se incuba con tripsina 0.1% en EDTA 5 mM por 20-30 min a 37° C para crear una suspensión de células individuales. Se lavan las células en un Buffer de fosfatos (PBS) y se distribuyen en tres tubos; dos de los cuales se marcan con anticuerpos Fas/FasL, respectivamente y un tubo de ajuste sin tratamiento. Se mantienen por 24 hrs a 4° C y posteriormente se lavan con PBS y se resuspenden en 500 µL de PBS para realizar el análisis mediante citometría de flujo.

Análisis estadístico

Muestra

Se realizó un muestreo sin reemplazos a partir de una población finita de 10 ratas experimentales (dos grupos separados únicamente en el tiempo de experimentación) y 10 ratas control negativo (pues no se les realiza ningún tipo de intervención).

Método estadístico

Se trata de un estudio experimental, prospectivo, transversal, comparativo en el que se pretendió establecer una relación de causalidad, a saber: que la expresión del sistema Fas/FasL está o no disminuido en la retinopatía diabética experimental en ratas y si dicha asociación muestra una secuencia en el tiempo, en este caso, que conforme se instala la retinopatía diabética hay una diferencia temporal en la expresión del sistema Fas/FasL. En este caso a través de una t de Student se analizó la evolución del peso en gramos y la glicemia en miligramos por decilitro, contra el tiempo y un análisis con la prueba de U de Mann-Whitney que es el equivalente de la t de Student para valores no paramétricos (calificación de distribución e intensidad de la expresión inmunohistoquímica de Fas o FasL).

Se realizó un muestreo sin reemplazos a partir de una población finita de 10 ratas experimentales (dos grupos separados únicamente en el tiempo de experimentación) y 10 ratas control negativo (pues no se les realiza ningún tipo de intervención).

Resultados

Como parte de la verificación en la evolución de la enfermedad diabética se utilizó la glicemia y el control de peso; así, los niveles de glucosa y peso al inicio del experimento eran: para el grupo control (a las seis semanas de vida) un promedio de 92.6 mg/dL $\pm$ 20.80 y de peso de 160 mg $\pm$ 22.5 mg; para las ratas del grupo experimental (diabéticas) la glicemia inicial fue de 95.1 mg/dL $\pm$ 19.3 mg/dL y peso de 172 mg $\pm$ 18.5 g. Sin mostrar una diferencia significativa ($P = 0.936$) para la glicemia y el peso de ambos grupos al inicio del estudio (*Cuadro 1*). A la semana de iniciado el experimento, el promedio de glucosa para las ratas control fue de 95.2 mg/dL $\pm$ 18 mg/dL y para las ratas experimentales fue de 598 mg/dL $\pm$ 16.00 mg/dL ($P < 0.001$) siendo estadísticamente significativo entre las glicemias, estableciéndose a las ratas del grupo experimental como diabéticas, permaneciendo con los niveles de glucosa similares durante todo el experimento (*Figura 1*); sin embargo, en este momento no hay diferencia estadística entre los pesos de ambos grupos con una $P = 0.204$ (*Figura 2*). Presentando un valor estadísticamente significativo entre las glicemias ($P < 0.001$), estableciéndose a las ratas del grupo experimental como diabéticas, permaneciendo con los niveles de glucosa similares durante todo el experimento.

Citometría de flujo

Para determinar la expresión de FasL y Fas en la superficie celular del EPR, se trabajó con células intactas y anticuerpos para FasL y Fas, respectivamente; se analizaron las muestras por citometría de flujo, detectando la presencia de FasL en células del EPR donde los niveles de expresión estaban altos a diferencia de los niveles de expresión para las células tratadas con anticuerpos para Fas que se encontraban en menor cantidad (*Figura 3*).

Al analizar las muestras de células del EPR en ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina, se detectó que los niveles de expresión en este caso se invirtieron, detectando un aumento importante en los niveles de Fas y disminución considerable en los niveles de FasL ($P < 0.0001$) (*Figura 4*).

Cuadro 1. Niveles de glucosa y peso en el grupo control y experimental.

		INICIAL	SEMANA 1	SEMANA 2
Grupo control	Peso	160 mg $\pm$ 22.5	178 mg $\pm$ 22.5	188 mg $\pm$ 22.5
	Glicemia	92.6 mg/dL $\pm$ 20.8	95.2 mg/dL $\pm$ 18	98.6 mg/dL $\pm$ 18.8
Grupo experimental	Peso	172 mg $\pm$ 18.5	178 mg $\pm$ 16.5	184 mg $\pm$ 5.5
	Glicemia	95.1 mg/dL $\pm$ 19.3	598 mg/dL $\pm$ 16	592 mg/dL $\pm$ 19.3

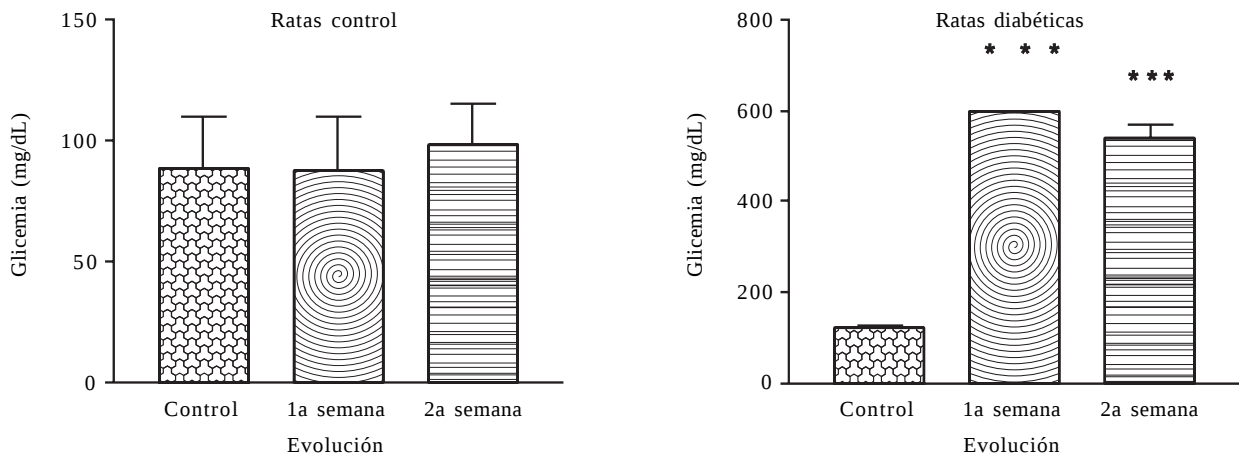


Figura 1. Niveles de glucosa al inicio, primera y segunda semana del estudio en ratas control y ratas experimentales.

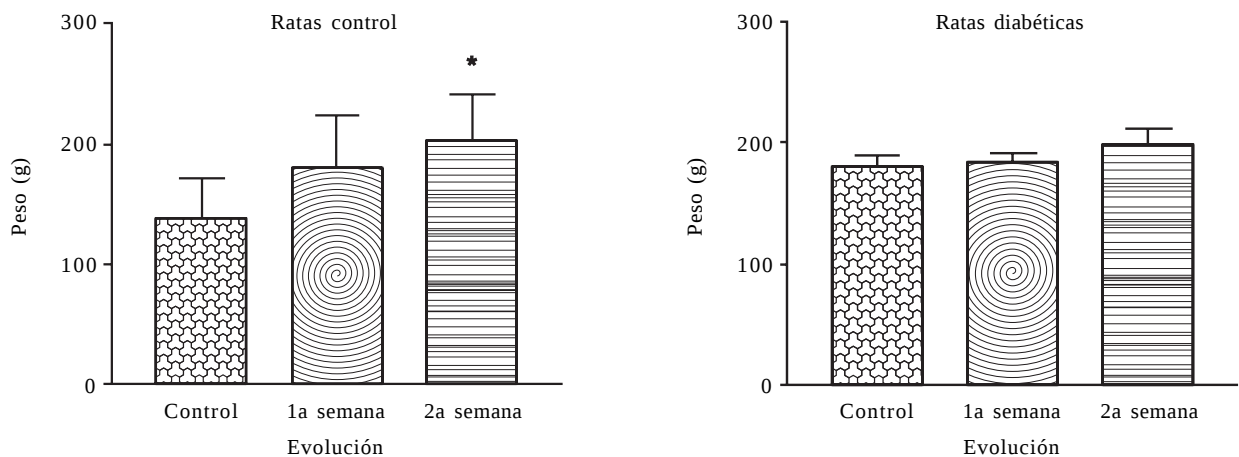


Figura 2. Valoración del peso al inicio, primera y segunda semana del estudio en ratas control y ratas experimentales.

Inmunohistoquímica

Se realizó el estudio de inmunohistoquímica tanto en las 10 ratas experimentales como en las 10 ratas del grupo control para determinar la intensidad y localizar la distribución de las proteínas FasL y Fas en la retina; detectando la presencia de la proteína FasL en una mayor distribución sobre el epitelio pigmentado de la retina y un patrón definido en la periferia de la retina al inicio de la investigación (Figura 5A). Posteriormente al evaluar las muestras de dos semanas de evolución se demostró una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.009$) para el sistema de evaluación ya que la expresión de la proteína FasL se encontraba disminuida en forma importante (Figura 5B). La tinción de la proteína Fas estaba aumentada en su expresión encontrándose variación conforme a la evolución de la retinopatía (Figura 6A) y ofrecía bastante diferenciación cualitativa entre las preparaciones del grupo experimental y el de control valiéndose una clasificación de (+++) cruces durante todas las semanas, con una $P < 0.005$, que es muy signi-

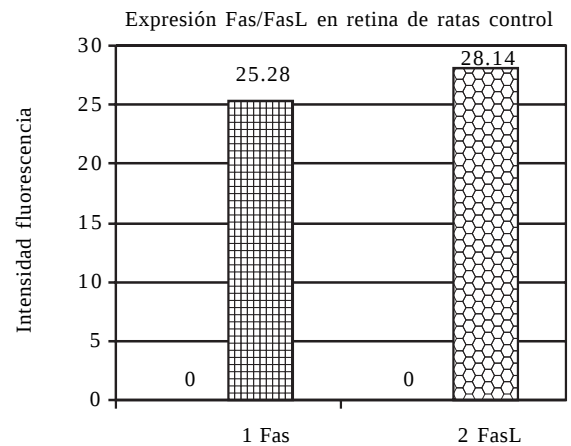


Figura 3. Niveles basales de expresión de anticuerpos para Fas y FasL, respectivamente, en la superficie celular del EPR en ratas control.

ficativa ($p = 0.0056$ para la primera semana, $p = 0.0005$ para la segunda) (Figura 6B).

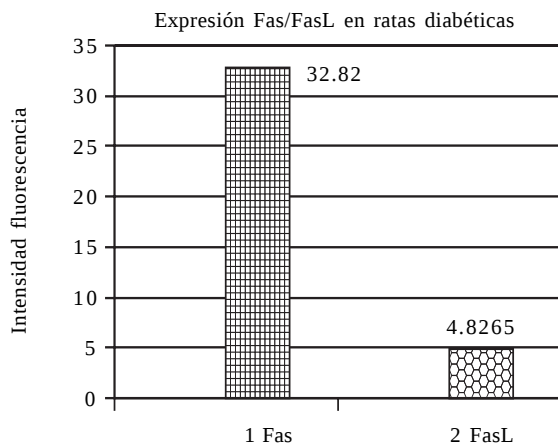


Figura 4. Niveles de expresión en células del EPR de ratas diabéticas, donde se observa un aumento importante en los niveles de expresión de Fas y los niveles de FasL disminuyen considerablemente ($P < 0.001$).

Histopatología

Se realizó el estudio histopatológico de cortes del globo ocular de rata con la tinción de Pearl's, con la finalidad de conocer el avance de la retinopatía diabética experimental y el daño subsiguiente a nivel vascular, observando que conforme evolucionaba la diabetes experimental se presentaban en mayor cantidad gránulos de hemoderina a nivel de la capa de células ganglionares en la retina (*Figura 7*).

Primera semana:

1. Grupo experimental: Sin alteraciones patológicas en la retina, con presencia de escasos gránulos de hemoderina con la tinción de Pearl's, a nivel de la capa de células ganglionares en la retina (*Figura 7A*).

2. Grupo control: Sin alteraciones patológicas en retina.

Segunda semana:

1. Grupo experimental: Sin alteraciones patológicas en la retina, con presencia de cúmulos granulares de hemoderina de mayor tamaño con la tinción de Pearl's, a nivel de la capa de células ganglionares (*Figura 7B*).
2. Grupo control: Sin alteraciones patológicas en retina.

Discusión

Entre los modelos que más se han empleado para reproducir la diabetes mellitus humana se encuentra el de la administración de estreptozotocina en la rata.²⁰ Se sabe que este modelo reproduce también las complicaciones del padecimiento durante las primeras semanas de haber inducido la diabetes mellitus.¹⁵

El ojo es el prototipo de un sitio inmune privilegiado. En diversos estudios se ha comprobado que la expresión de FasL controla la difusión de la inflamación mediante la muerte (apoptosis) de células linfoides que invaden el tejido. Por lo que FasL no solo controla la invasión de los linfocitos al ojo, sino que también bloquea el crecimiento excesivo de vasos sanguíneos los cuales pueden dañar el ojo y afectar la visión.¹⁴

En procesos inflamatorios, la angiogénesis facilita el reclutamiento de leucocitos en el sitio de inflamación. Los leucocitos, por lo tanto, pueden estimular la formación de vasos mediante la producción de citocinas y factores de crecimiento endotelial. FasL a nivel endotelial puede considerarse como un regulador negativo de la angiogénesis; ya que induce apoptosis de leucocitos los cuales proveen factores de crecimiento angiogénico.^{15,18-20}

En este estudio valoramos los cambios de expresión de Fas/FasL en la retina de ratas con diabetes mellitus inducida

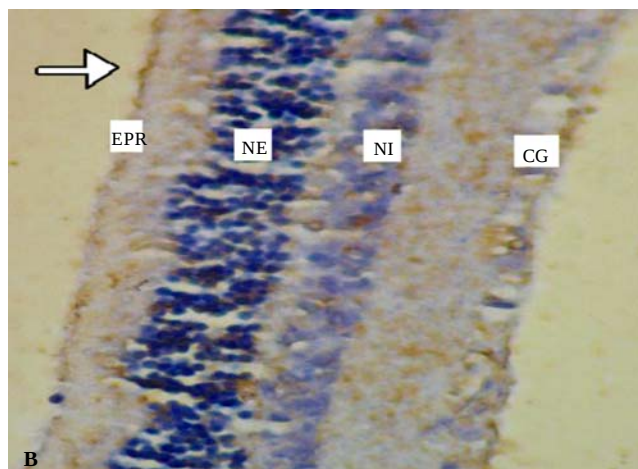
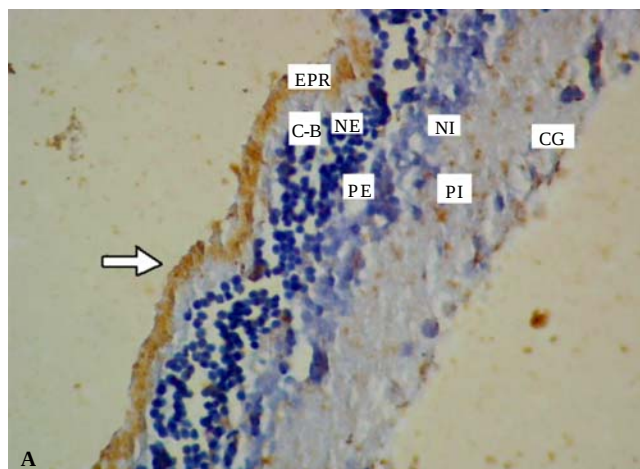


Figura 5. **A)** En el estudio de inmunohistoquímica, con una magnificación de 40x, se observa una mayor presencia de la proteína FasL (flecha) en una distribución uniforme sobre el epitelio pigmentado de la retina (EPR) al inicio del experimento. **B)** Después de inducir diabetes mellitus a las dos semanas, se observa una disminución importante en los niveles de FasL. C-B: Capa conos y bastones. NE: Capa nuclear externa. PE: Plexiforme externa. NI: Nuclear interna. PI: Plexiforme interna. CG: Capa células ganglionares.

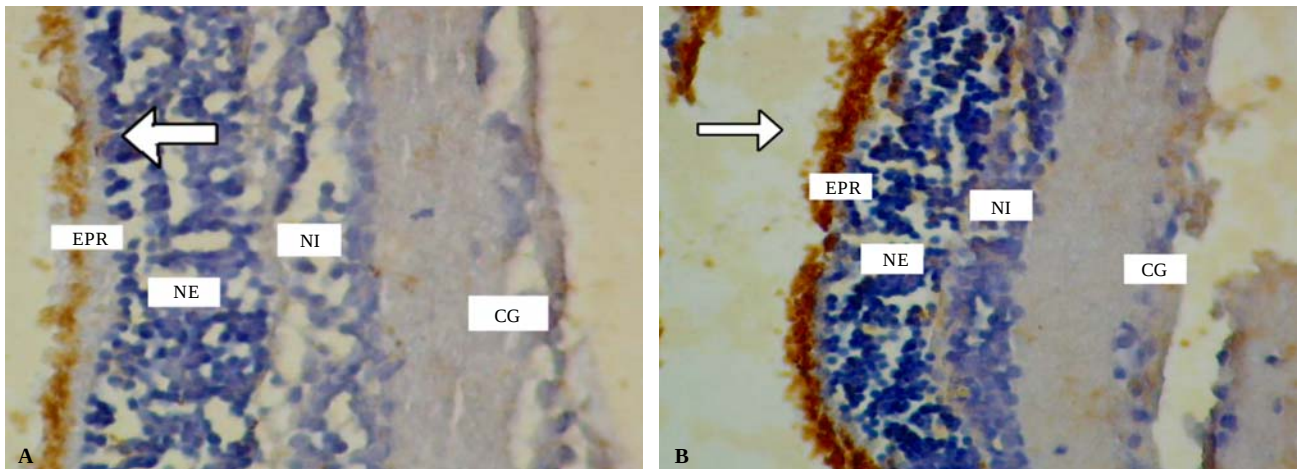


Figura 6. A) En el estudio de inmunohistoquímica, con una magnificación de 40x, se observa una presencia de la proteína Fas (flecha) en una distribución uniforme sobre el epitelio pigmentado de la retina (EPR) al inicio del experimento. **B)** Después de inducir la diabetes mellitus a las dos semanas, se observa un aumento importante en los niveles de Fas. NE: Capa nuclear externa. PE: Plexiforme externa. NI: Nuclear interna. PI: Plexiforme interna. CG: Capa células ganglionares.

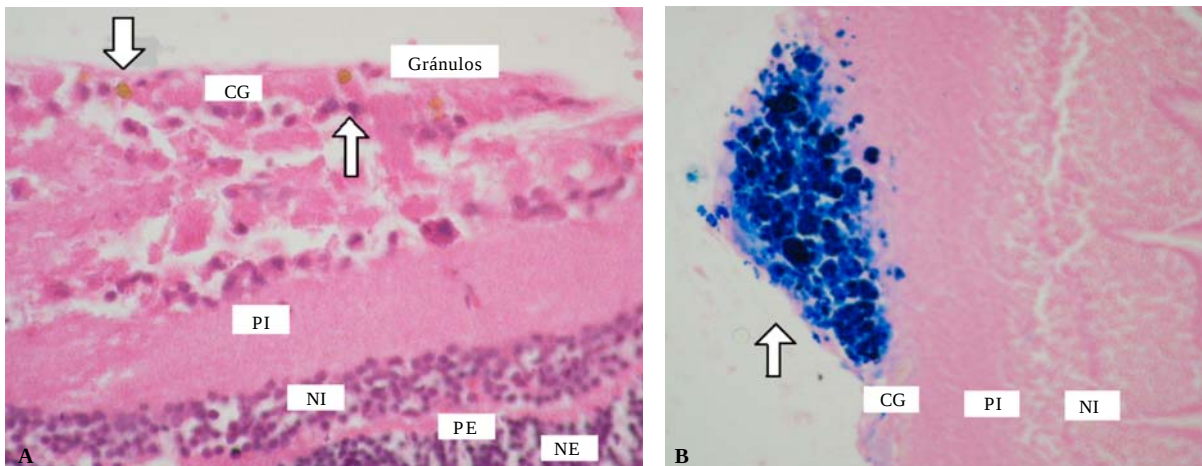


Figura 7. A) En el estudio histológico con la tinción de Pearl's, se observan escasos gránulos de hemosiderina a nivel de la capa de células ganglionares en la retina al inicio del experimento (flechas). **B)** A las dos semanas existen cúmulos granulares de hemosiderina de mayor tamaño (flecha). NE: Capa nuclear externa. PE: Plexiforme externa. NI: Nuclear interna. PI: Plexiforme interna. CG: Capa células ganglionares.

con estreptozotocina mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica y se demuestra la relación entre la expresión de Fas /FasL y la presencia de alteraciones vasculares en la retina de ratas con diabetes mellitus inducida de manera experimental. En el estudio de inmunohistoquímica se detectó que en las ratas diabéticas, la inmunoreactividad para Fas se observa en una mayor proporción a nivel del epitelio pigmentado de la retina y que disminuyen considerablemente los niveles para FasL.

El sistema de Fas /FasL es parte de un complejo sistema encargado del control de la formación de vasos sanguíneos, evitando en condiciones basales la neoformación de vasos en la retina que interfieran con la visión, sugiriendo que la baja expresión de FasL en ratas diabéticas –como resultó en el experimento realizado– se correlaciona con los estudios reportados en la literatura donde no se conserva el privilegio

inmune del ojo; todo esto a través de limitar los mecanismos de muerte celular programada (apoptosis), ocasionando la activación celular mediante factores de crecimiento como el endotelio vascular (FCEV), que es un mediador importante en la neovascularización ocular secundaria a isquemia retiniana. Valorar los niveles del sistema de receptores Fas/ Fas ligando (FasL) sirvió para determinar el grado de apoptosis y por consiguiente el daño en el endotelio vascular y epitelio pigmentado de la retina.

Desde un punto de vista clínico, los leucocitos que se han acumulado en la retina dañan el tejido directamente a través de reacciones inflamatorias ya que se adhieren al endotelio, causan daño celular endotelial, alteración en la barrera hemato-retiniana y oclusión capilar; lo cual conduce a sangrado, permeabilidad vascular elevada y formación de áreas no perfundidas. Éstas son manifestaciones tempranas

de la retinopatía diabética; lo cual se pudo valorar mediante el estudio histopatológico con la tinción de Pearl's; donde se observó en las ratas diabéticas presencia de cúmulos granulares de hemosiderina de mayor tamaño a nivel de la capa de células ganglionares principalmente, demostrando la presencia de hemorragia antigua y por lo tanto daño al endotelio vascular y lesión a la barrera hemato-retiniana. Los factores que regulan el crecimiento anómalo de los vasos sanguíneos se conocen cada vez más. El conocimiento de las moléculas que inducen neovascularización y apoptosis para controlar la angiogénesis, son importantes para desarrollar terapias racionales en el tratamiento de este tipo de enfermedades, por lo cual es importante conocer los mecanismos involucrados en el desarrollo de la retinopatía debido a que maneja una enfermedad común causante de pérdida de la visión de tipo irreversible.¹⁵

Conclusiones

- Se logró reproducir un modelo experimental de diabetes mellitus inducido por estreptozotocina en ratas.
- En fases tempranas de la diabetes inducida experimentalmente, existe aumento en la expresión de Fas y disminución en la expresión de FasL. Cuantitativamente se pudo comprobar una expresión disminuida de FasL (de manera estadísticamente significativa) por lo menos a partir de la segunda semana de desarrollo experimental en ratas diabéticas y aumento de la expresión Fas mediante citometría de flujo.
- La interacción del sistema Fas/FasL controla la extensión de la neovascularización en la retina y coroides, considerando que esta acción no es una barrera absoluta, pero sí un mecanismo para regular la extensión de la enfermedad. La expresión de FasL en el epitelio pigmentado de la retina permite acercarse a su relevancia, por una parte en la protección inmunológica del ojo (cuya evidencia aparente es más importante) y por otro lado probablemente conteniendo el desarrollo de la neovascularización en la retinopatía experimental en ratas.
- La proteína Fas es un mediador importante en la apoptosis de células del EPR y este mecanismo contribuye a la muerte celular inducida por daño oxidativo como ocurre en la patogénesis de la retinopatía diabética.
- Durante la diabetes inducida experimentalmente se presenta hemorragia retiniana en forma temprana.
- La presencia de hemorragia retiniana en la diabetes experimental, se correlaciona con cambios en la expresión de proteínas apoptóticas.
- La formación de vasos sanguíneos en el ojo es un componente importante en la retinopatía diabética. Los factores que regulan el crecimiento anómalo de los vasos sanguíneos se conocen cada vez más. El conocimiento de las moléculas que inducen neovascularización y apoptosis para controlar la angiogénesis, es importantes para desa-

rollar terapias racionales en el tratamiento de este tipo de enfermedades.

Referencias

1. The Expert Committee on The diagnosis and classification of diabetes mellitus: follow-up report on the diagnosis of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2003; 26: 3160-7.
2. McBean AM, Li S, Gilbertson DT, et al. Differences in diabetes prevalence, incidence, and mortality among the elderly of four racial/ethnic groups: Whites, Blacks, Hispanics and Asians. *Diabetes Care* 2004; 27: 2317-24.
3. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2005; 28: S37-S42.
4. Standards of Medical Care in Diabetes. *Diabetes Care* 2005; 28: S4-S36.
5. Roy MS, Klein R, O'Colmain BJ, et al. The prevalence of diabetic retinopathy among adult type 1 diabetic person in the United States. *Arch Ophthalmology* 2004; 122: 546-51.
6. West SK, Klein R, Rodríguez J, et al. Diabetes and diabetic retinopathy in a Mexican American population. *Diabetes Care* 2004; 24: 1204-9.
7. American Academy of Ophthalmology. Preferred Practice Pattern: Diabetic Retinopathy. San Francisco, Calif. American Academy of Ophthalmology; 2004.
8. Frank RN. On the pathogenesis of diabetic retinopathy. A 1990 update. *Ophthalmology* 1991; 98: 586-93.
9. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-67.
10. Xia P, Aiello LP, Ishii H, Jiang ZY, Park DJ, Robinson GS, Takagi H, et al. Characterization of vascular endothelial growth factor's effect on the activation of protein kinase C, its isoforms, and endothelial cell growth. *J Clin Invest* 1996; 98: 2018-26.
11. Hammers HP, Lin J, Bretzel RG, Brownlee M, Breier G. Up regulation of the vascular endothelial growth factor/vascular endothelial growth factor receptor system in experimental background diabetic retinopathy of the rat. *Diabetes* 1998; 47: 401-6.
12. Cai J, Wu M, Nelson KC. Oxidant-Induced apoptosis in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Invest Oph Vis Sci* 1999; 40: 959-66.
13. Hinton DR, He S, Lopez PF. Apoptosis in surgically excised choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1998; 116: 203-9.
14. Barreiro R, Schadlu R, Rendón J, et al. The role of Fas-FasL in the development and treatment of ischemic retinopathy. *Inv Oph Vis Sci* 1998; 44: 1282-6.
15. Jousen AM, Poulaki V, Mitsiades N, et al. Suppression of Fas-FasL- induced endothelial cell apoptosis prevents diabetic blood-retinal barrier breakdown in a model of streptozotocin- induced diabetes. *The FASEB Journal* 2003; 17: 76-8.
16. Aiello LP. Vascular Endothelial Growth Factor, 20th-Century Mechanisms, 21st-Century Therapies. *Inv Oph Vis Sci* 1997; 38(9): 1647-52.
17. Fong DS, Aiello LP, Ferris FL, Klein R. Diabetic Retinopathy. *Diabetes Care* 2004; 27: 2540-3.
18. Nyberg P, Xie L, Kalluri R. Endogenous inhibitors of angiogenesis. *Cancer Res* 2005; 65(10): 3967-79.
19. Jiang S, Wu MW, Sternberg P, Jones P. Fas mediates apoptosis and oxidant-induced cell death in cultured hRPE cells. *Inv Oph Vis Sci* 2000; 41: 645-55.
20. Morff RJ. Microvascular reactivity to norepinephrine at different arteriolar levels and durations of streptozotocin induced diabetes. *Diabetes* 1999; 39: 354.