



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Susceptibilidad de los ratones et/et a la formación
de cataratas inducidas; por la administración de
selenito de sodio**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

LÓPEZ ROSAS FERNANDO

Director: Dr. Rubén Marroquín Segura
Asesor: MC. Maurilio Flores Pimentel

MÉXICO, D.F.

2010



Este trabajo recibió el apoyo del proyecto PAPIME PE 200310



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Dedicatorias

A Dios, por guiar mi camino en cada momento, por darme la fuerza cuando más lo necesitaba y por que ha dejado que llegue hasta este momento en compañía de mi familia.

A mi madre, la señora Salustia Rosas Santiago por su inmenso amor, comprensión, paciencia y sobre todo por ser una bendición en mi vida.

A mi hermano Antonio López Rosas por todo su apoyo y por que en cada momento de mi vida ha sido para mí un amigo, un hermano y un padre.

A mis hermanos Octavio y Jessica López Rosas por su gran cariño y por ser parte de mi vida.

A Felipe Trujillo Hernández por ser como un hermano y por crecer conmigo desde siempre.

Al señor Octavio López López por ser parte de mi familia.

A mis amigos(a), Cesar, Paula, Erika y Rosa por todos los momentos vividos, por acompañarme en esta aventura y por sus palabras de aliento cuando lo necesitaba.

Agradecimientos

A la Universidad Nacional Autónoma de México, UNAM, por permitirme ser parte de la máxima casa de estudios.

A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por albergar mi formación académica y por ser mi segunda casa durante los últimos años.

A mi director de tesis Dr. Rubén Marroquín Segura por guiar este trabajo, por su paciencia, por uno que otro regaño y por su buen humor.

A mi asesor M.C. Mauricio Flores Pimentel por el tiempo dado en el desarrollo de este trabajo.

A los profesores Q.F.B. Irma Alejandre Razo, Mtra. Yolanda Flores Cabrera y Dr. Arturo Valle Mendiola por su valioso tiempo dado para la revisión y corrección de este trabajo.

Al profesor Luis A. Mora Guevara por su disposición para resolver dudas.

A mis compañeros de carrera: Tatis, Angy, Wuicha, Itzel, Ara, Lucy, Lupe, Canela, Darío, Sergio, Roger, Amigon y a todos mis compañeros del laboratorio de inmunología que hicieron de mi estancia en la facultad una muy buena experiencia.

"El ojo, que es la ventana del alma, es el órgano principal por el que el entendimiento puede tener la más completa y magnífica visión de las infinitas obras de la naturaleza. El ojo es la ventana del cuerpo humano a través del cual descubre su camino y disfruta de la belleza del mundo. Gracias al ojo, el alma permanece contenta en la prisión corporal, porque sin él, una prisión así sería una tortura."

Leonardo da Vinci

CONTENIDO

1. Resumen	1
2. Introducción.....	2
3. Fundamentación teórica.....	3
3.1. Anatomía y fisiología del aparato ocular.....	3
3.1.1 Túnica externa	3
3.1.2. Túnica media	3
3.1.3. Túnica interna.....	4
3.2. Inmunidad.....	5
3.2.1 Inmunología de la superficie ocular	6
3.3. Cristalino	8
3.4 Catarata.....	9
3.4.1. Catarata nuclear	9
3.4.2. Catarata cortical.....	10
3.4.3. Catarata Sub capsular	10
3.4.4. Catarata y estrés oxidativo.....	11
3.5. Radicales libres.....	11
3.6. Estudios en animales	12
3.7. Ratón et/et.....	12

3.8. Métodos experimentales de inducción de cataratas.....	13
3.8.1. Cataratas inducidas por selenito de sodio.....	13
3.8.2. Cataratas inducidas por dosis repetidas con tacrolimus	15
3.8.3. Cataratas inducidas con galactosa	15
3.8.4. Cataratas inducidas con radiación	15
3.9. Oxido nítrico.....	15
3.10. Ceruloplasmina.....	17
3.11. Peroxidación lipídica	18
3.12. ELISA.....	20
4. Planteamiento del problema	22
5. Objetivos.....	23
6. Hipótesis	24
7. Diseño de investigación.....	24
8. Material, reactivos y equipo	26
9. Método.....	29
10. Resultados.....	37
11. Análisis de resultados	66
12. Conclusiones.....	68
13. Anexos	69

14. Referencias	72
-----------------------	----

1. RESUMEN

La catarata es una enfermedad multifactorial asociada a diferentes factores; los cuales afectan directamente al cristalino causando la opacidad del mismo; actualmente en nuestro país se calcula que cada año 100 mil pacientes se les diagnostica esta enfermedad. En el presente trabajo se determinó la susceptibilidad de los ratones *et/et* a la formación de cataratas usando selenito de sodio. Se determinaron los niveles de nitritos mediante el método de Griess, ceruloplasmina por el método de Mancini y peroxidación lipídica siguiendo el método del ácido tiobarbitúrico; así como la presencia de anticuerpos contra antígenos de retina con el método de ELISA. Resultados, se observó que el 11.1 % desarrollo cataratas, el 14.8% leucoma, el 14.8% inflamación, el 3.7% perdió el ojo y el 56% no presentó alteración ocular alguna, los ratones *et/+* y *+/+* no mostraron ninguna alteración. Con respecto a los niveles de nitritos se observó que los animales *et/et* mostraron mayor cantidad de nitritos que las otras cepas, resultando los niveles mayores en el grupo de ratones jóvenes, en comparación con los animales viejos y con respecto a la ceruloplasmina los niveles mayores se encontraron con la cepa *et/et*. En base a los resultados obtenidos el presente trabajo se puede ocupar como método de inducción de cataratas en ratones *et/et* para evaluar diversos compuestos orgánicos con propiedades anticataratogénicas.

2. INTRODUCCIÓN

La catarata es una opacificación del cristalino y es una enfermedad multifactorial asociada a varios factores de riesgo tales como el envejecimiento, diabetes, desnutrición, la luz solar, el tabaquismo y la hipertensión, entre otras. Las cataratas son una enfermedad degenerativa la cual se puede presentar nublando la visión nocturna, disminuyendo tono y brillo de colores, manifestando halos de luz, en resumen reduciendo la función visual lo cual interfiere con las actividades de la vida diaria y por consecuencia reduce la calidad de vida. Los radicales libres inducidos por el estrés oxidativo se postulan como el principal factor que conduce a la catarata senil esta hipótesis se apoya por el efecto de diversos nutrientes anticataratogénicos.¹

La organización mundial de la salud estima que en más del 82% de los casos de ceguera se produce en personas mayores de 50 años y que las cataratas representan el 47.8% de un total aproximado de 37 millones de personas ciegas en el mundo.² En nuestro país las cataratas son responsables de 40% a 50% de los casos de ceguera la más común es la senil, y se estima una prevalencia de alrededor de 200 mil casos, de los cuales se operan 100 mil al año. Se calcula que cada año a 100 mil mexicanas y mexicanos se les diagnostica esta enfermedad.³

Actualmente no hay un agente farmacológico universalmente aceptado que prevenga o reduzca la opacidad del cristalino en los seres humanos, la extirpación quirúrgica es el único tratamiento aceptado para tratar la catarata humana; sin embargo el costo de la cirugía puede estar lejos del alcance de las personas de bajos recursos económicos. Por lo tanto existe una necesidad urgente de tratamientos no quirúrgicos de bajo costo para el tratamiento de las cataratas.¹ En los recientes años ha surgido gran interés por las terapias alternativas y el uso de productos naturales, especialmente los derivados de plantas. Los productos naturales en general, y las plantas medicinales en particular son una importante fuente de nuevas sustancias químicas con un potencial terapéutico aplicable. Por esta razón las plantas medicinales pueden ser una alternativa terapéutica⁴ para lo cual se necesitan diferentes modelos de inducción de cataratas que permitan desarrollar experimentos con plantas que posean la propiedad anticataratogénica.

3. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA

3.1 ANATOMÍA Y FISIOLOGÍA DEL APARATO OCULAR

El ojo adulto mide alrededor de 24 mm de diámetro. Sin embargo, el término “adulto” es en realidad erróneo, puesto que el ojo obtiene ese tamaño hacia los 2 o 3 años de edad; al nacer el ojo mide ya casi 20 mm de diámetro.⁵

De forma irregularmente esferoidal, está formado por tres capas concéntricas (Figura 1):

3.1.1 Túnica externa. Es la de mayor consistencia, le da al globo su forma constante y contribuye al mantenimiento de la presión intraocular

- **Cornea.** Es una estructura transparente que proporciona gran parte del poder refractivo necesario para enfocar la luz en la retina. También funciona como estructura de protección de tejidos y humores intraoculares.
- **Esclerótica.** Membrana fibrosa muy resistente que protege los tejidos intraoculares, soporta la tensión de los músculos intraoculares y contribuye a mantener la forma y tono ocular. Su cara externa, de aspecto blanquecino, presenta en su porción media la inserción de los músculos oculomotores.

3.1.2 Túnica media o vascular. Denominada úvea, consta de tres porciones bien diferenciadas:

- **Iris.** Porción anterior de la úvea presenta la forma de un disco perforado en su centro por un orificio circular, la pupila, constituye un orificio de tamaño variable, cuyo diámetro normal se considera comprendido entre 2 y 4 mm, controla la cantidad de luz que penetra al ojo, actuando a modo de un diafragma.
- **Cuerpo ciliar.** Desempeña un papel importante en la acomodación, la nutrición del segmento anterior y la secreción de humor acuoso; se encuentra intercalado entre la

base del iris y limbo por delante, la coroides y retina por detrás, y rodeado por la esclerótida. Sobre su base anterior se inserta el iris.

- **Coroides.** Constituye la úvea posterior, su riqueza en células pigmentarias le confiere un papel de pantalla a la luz y su naturaleza vascular la hace membrana nutricia del ojo. Situada entre la esclerótica por fuera y retina por dentro.

3.1.3 Túnica interna o neurosensorial:

- **Retina.** Es la capa más interna del globo ocular, de estirpe neurosensorial, es donde se inicia el proceso de visión, siendo la parte especializada del sistema nervioso destinada a recoger, elaborar y transmitir las sensaciones visuales.
- **Vítreo.** Gel transparente que ocupa la totalidad del espacio comprendido entre la superficie interna de la retina, cara posterior del cristalino y cuerpo ciliar. Representa las 4/5 partes del volumen ocular, es avascular, compuesta en un 99% por agua, colágeno y ácido hialurónico.
- **Cristalino.** Es avascular y no posee inervación; las proteínas que lo integran, solubles en niños y jóvenes, se van transformando en insolubles en el adulto, lo que le resta elasticidad y transparencia; el cristalino forma nuevas fibras a lo largo de toda la vida, en los seres humanos las fibras viejas se comprimen centralmente para formar un núcleo cristalino inelástico cada vez mayor⁶

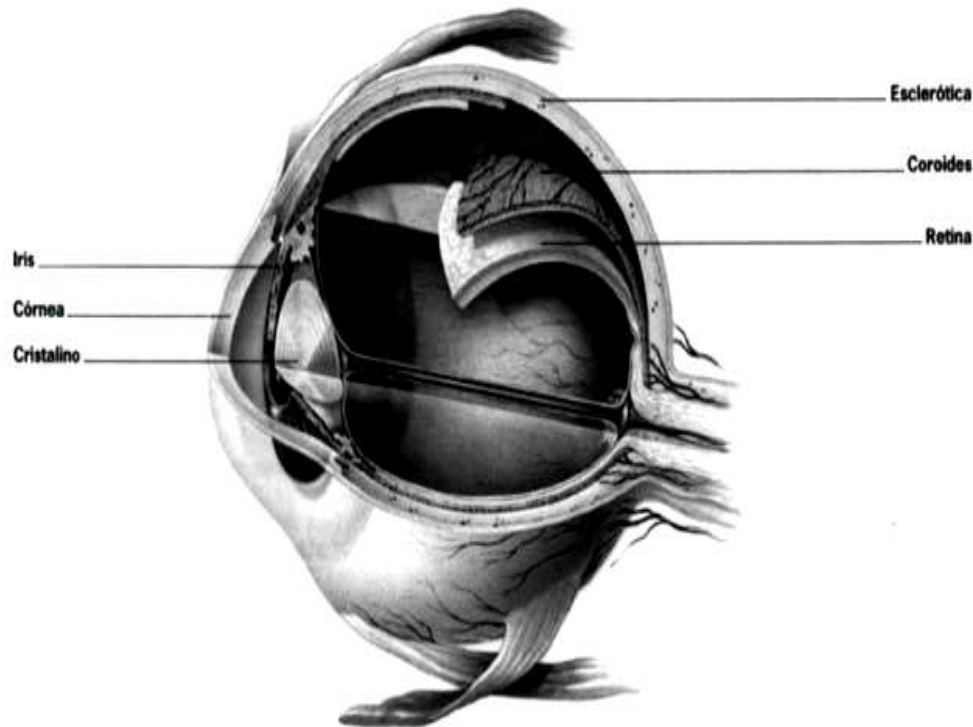


Fig. 1 Sección transversal del globo ocular⁶

3.2 INMUNIDAD

El termino inmunidad deriva de la palabra latina inmunitas, en un sentido histórico inmunidad significa protección contra la enfermedad y más en concreto, contra una enfermedad infecciosa. Las células y moléculas responsables de su ejecución constituyen el sistema inmunitario y su reacción conjunta y coordinada frente a la entrada de sustancias ajenas se denomina respuesta inmunitaria. Una definición más global de la respuesta inmunitaria señala que es una reacción desplegada tanto frente a los componentes de los microorganismos como a macromoléculas, del tipo de las proteínas y los polisacáridos, y a pequeños compuestos químicos que sean reconocidos como ajenos con independencia de las consecuencias fisiológicas o patológicas que pueda acarrear una reacción de esta clase.⁷

3.2.1 INMUNOLOGÍA DE LA SUPERFICIE OCULAR

El estroma se sella desde el entorno externo por uniones lamínales y forman una barrera física contra antígenos externos. Esto se complementa con una barrera físico-química en los epitelios derivadas de la capa de mucina, que protege contra la entrada y adherencia de los antígenos por efecto del lavado mecánico del líquido lagrimal y el párpado de limpieza combinado con la acción de las proteínas de protección.

La película lagrimal es un componente funcional importante de la defensa inmune en la superficie de la mucosa ocular; además de un efecto de limpieza inducida por el párpado de limpiado el cual contiene los anticuerpos específicos IgA que son secretados por la glándula lagrimal y por las mucosas oculares en la superficie; también se ha elevado el número de reportes de péptidos y proteínas del sistema inmune unos de ellos tienen un efecto antimicrobiano directo, mientras que otros (por ejemplo, quimiocinas y citocinas) reclutan y activan a los leucocitos incluyendo las células linfoides. Históricamente, y debido a su concentración relativa, tres antimicrobianos secretados son los más importantes. La lisozima destruye a la pared celular bacteriana, la lactoferrina se une al hierro, y la prealbúmina (lipocalina) específica lagrimal actúa como un barretero de productos bacterianos, el complemento se produce como un trasudado desde el suero. La angiogenina es una nueva proteína encontrada en altas concentraciones en prácticamente todas las muestras lagrimales. Al parecer tiene principalmente un efecto de agente antimicrobiano dentro de la película lagrimal.⁸

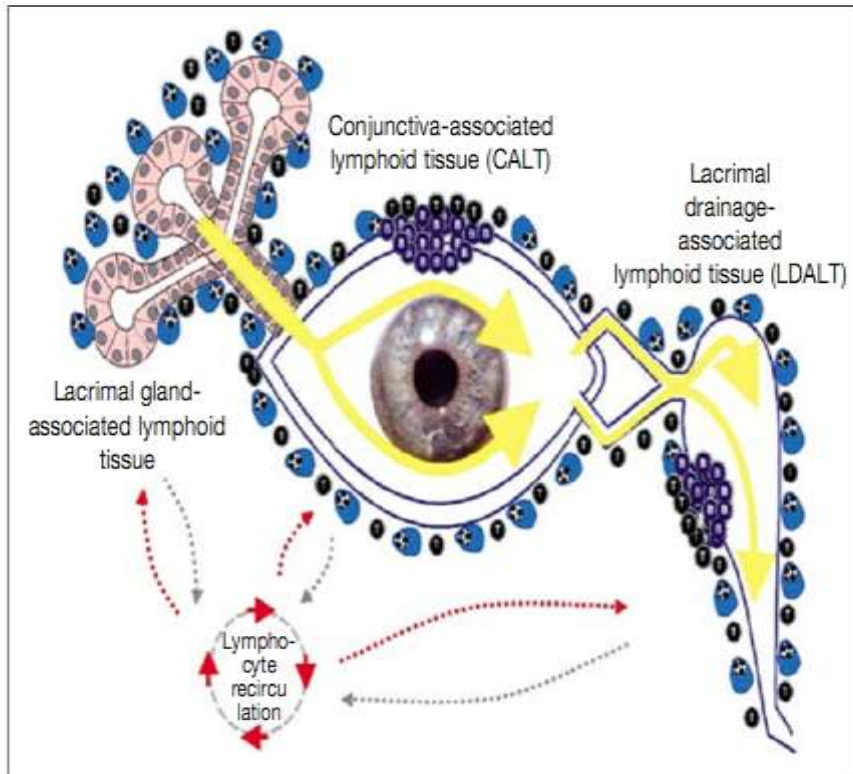


Fig. 2 El tejido linfoide asociado a el ojo (EALT) es el tejido linfoide asociado a mucosa para protección inmune de la superficie ocular y sus anexos a mucosas, es anatómicamente de drenaje continuo de la lamina lagrimal a toda la conjuntiva y al tejido linfoide asociado (CALT y LDALT respectivamente). Este consiste de un tejido linfoide difuso de linfocitos T y de células plasmáticas secretoras de IgA, incluyendo poblaciones leucocitarias accesorias en todos los órganos y de folículos linfoides en la conjuntiva – y drenaje lacrimal- tejido linfoide asociado (En el dibujo la línea azul representa a las células plasmáticas, las células azules pequeñas representas las células B y las células pequeñas negras representan las células T). Da protección así como los factores agresivos dentro de la película lagrimal que conecta las diferentes partes de la superficie ocular y la protege desde el exterior del medio ambiente, son un componente importante de la inmunidad en la superficie ocular. Los órganos están también conectados por la recirculación de linfocitos a través de buques especializados entre sí y con el resto del sistema inmunológico.⁸

3.3 EL CRISTALINO

El cristalino (lente) humano consta de tres zonas metabólicamente diferentes en el lente: el epitelio, la corteza y el núcleo o núcleo del cristalino; las células epiteliales se encuentran justo debajo en la mayor parte de la cápsula del colágeno que rodea al lente, estas son las células más activas metabólicamente; algunas de estas células se dividen, emigran hacia el ecuador del objetivo, a medida que se alargan hasta mil veces para formar las fibras del cristalino.

La hipótesis es que la opacidad en estas tres zonas tiene diferentes etiologías y por lo tanto la mayoría de los estudios, al menos los epidemiológicos, deben tratarse por separado.

La edad es el factor de riesgo más común en las cataratas; las cataratas nucleares relacionadas con la edad se asocian con una pérdida de glutatión en el centro de la lente y una amplia modificación de las proteínas nucleares las cuales incluyen: coloración, oxidación e insolubilización

Color. El sistema de clasificación más utilizado es el Pirie que clasifica al lente en cuatro grupos según el grado de color del núcleo la cual es la característica física más notable al extraer las cataratas nucleares relacionadas con la edad en humanos, en los lentes se puede observar una variedad de colores, amarillo, marrón y negro el color es principalmente en el núcleo y se encuentra sólo en los lentes de los primates; la pigmentación es casi exclusivamente ligada a proteínas.

Oxidación. Con respecto a todo el lente, la pérdida de glutatión en la región nuclear es probablemente la característica fundamental que precede a la formación de cataratas nucleares relacionadas con la edad; el glutatión es el antioxidante esencial y primordial lenticular la pérdida de este se produce en casi todas las cataratas experimentales y es interesante observar que la mayoría de la reducción del GSH se produce en la región nuclear, mientras que la GSH cortical sigue siendo normal.

Barrera del lente. Con respecto a los cambios físicos, el desarrollo de una barrera interna a la difusión de pequeñas moléculas, puede ser importante en el desarrollo de cataratas relacionadas con la edad esta barrera impide el flujo de moléculas antioxidantes y por lo tanto descarta al centro de la lente a la oxidación. También moléculas pro-oxidantes

inestables pueden tener un tiempo de residencia en el lente. Las modificaciones de las proteínas también podrían ser aceleradas por la aparición de la barrera.^{9,10}

3.4 CATARATA

La catarata es una nubosidad de los lentes del ojo lo cual impide el paso de la luz. Aunque más casos de cataratas se relacionan con el proceso de envejecimiento, ocasionalmente niños pueden nacer con esta condición, o la catarata puede desarrollarse en el ojo después de una lesión, inflamación o alguna otra enfermedad ocular¹¹

En el 2002 el número de personas con deficiencia visual en todo el mundo supero los 161 millones, y de ellos 37 millones sufrían ceguera, la carga de deficiencia visual no se distribuye uniformemente en todo el mundo, pues las regiones menos desarrolladas son las más afectadas, la deficiencia visual se distribuye también de forma dispar entre los grupos de edad, pues la padecen sobre todo adultos de más de 50 años. Se observa también un desequilibrio en lo referente al género a nivel mundial; el riesgo de deficiencia visual es significativamente mayor en las mujeres que en los hombres. A pesar de los progresos de la cirugía logrados en muchos países durante los últimos decenios, la catarata sigue siendo la principal causa de deficiencia visual en todas las regiones del mundo, exceptuando los países más desarrollados, otras causas importantes de deficiencia visual son, en orden de importancia, el glaucoma, la degeneración macular relacionada con la edad, la retinopatía diabética y el tracoma.¹²

La etiología de los cambios relacionados con la edad en el cristalino no está totalmente entendido y probablemente sea multifactorial hay tres tipos principales de cataratas relacionadas con la edad las cuales se definen por su aspecto clínico en: nucleares, corticales y subcapsulares posteriores; estas pueden presentar solas o en combinación. (Figura 3)

3.4.1 Nuclear. Con la edad de los lentes, nuevas capas de fibras se agregan al núcleo del lente volviéndose más comprimido (catarata por esclerosis nuclear), con coloración amarillenta asociada al lente la esclerosis nuclear progresa lentamente durante años. En algunos casos no afecta significativamente la visión o sólo causa un cambio en la refracción (miopía); también llamada en algunas ocasiones segunda vista. Con una mayor progresión puede haber pérdida en la discriminación del color y también pérdida de la visión.

3.4.2 Cortical. La corteza del lente está hecha de las fibras más recientes del lente, las fibras se pierden con el envejecimiento y las fibras nuevas se agregan en el exterior del lente, bajo la cubierta exterior o en la cápsula del lente. Con el envejecimiento las opacidades discretas (radios corticales) se pueden desarrollar dentro de la corteza de la lente que normalmente no causa síntomas visuales a menos que impliquen el eje visual o toda la corteza, en cuyo caso el lente llega a ser blanco y se dice que está maduro.

3.4.3 Sub capsular posterior. Estas cataratas son opacidades granulares que se producen principalmente en la corteza posterior central, justo debajo de la cápsula posterior se puede presentar en pacientes jóvenes y son comúnmente asociados con una queja de deslumbramiento, como cuando se conduce de noche, y tienden a reducir la visión de cerca más que la agudeza visual a distancia.¹³

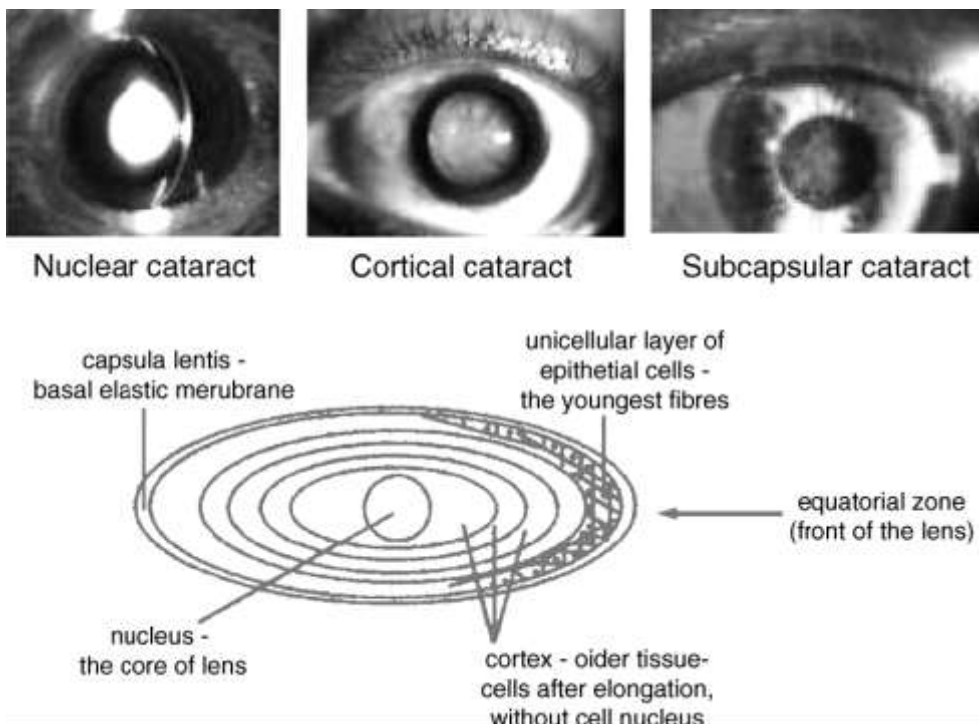


Fig 3. Ilustración de los tipos de cataratas y lesiones en la anatomía ocular⁹

3.4.4 CATARATAS ESTRÉS OXIDATIVO

El cristalino se encuentra en un ambiente que es rico en fuentes endógenas de especies reactivas de oxígeno (ERO), que se producen por la elevada concentración del oxígeno local, la exposición crónica a la luz y la actividad patogénica de las células epiteliales del cristalino. El mantenimiento de su transparencia depende de un adecuado balance del estado redox. Aunque existen múltiples defensas fisiológicas para proteger el cristalino de los efectos tóxicos de la luz y el daño oxidativo, la evidencia sugiere que la exposición crónica a la oxidación a largo plazo puede dañar el cristalino y predisponerlo al desarrollo de las cataratas.¹⁴

3.5 RADICALES LIBRES (RL)

Se consideran radicales libres (RL) aquellas moléculas que en su estructura atómica presentan un electrón desapareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una elevada inestabilidad. Es una entidad química que contrario a la tendencia espontánea de los electrones localizados en los átomos y moléculas a la formación de parejas, es desapareado. Esto lo hace muy inestable, extraordinariamente reactivo y de vida efímera, con una enorme capacidad para combinarse inespecíficamente en la mayoría de los casos, así como con la diversidad de moléculas integrantes de estructura celular: carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos y derivados de cada uno de ellos.

Los RL son elaborados continuamente como un producto del metabolismo de cada célula e inactivados por un conjunto de mecanismos (unos enzimáticos y otros de atrapamiento). Son componentes normales de células y tejidos, existiendo un depósito de RL particular en cada estirpe celular y en algunos tipos celulares permiten la mejor adaptación a su hábitat. Al elevarse o disminuir las concentraciones fisiológicas de las especies reactivas de oxígeno (EROS) puede acarrear importantes alteraciones funcionales.

El oxígeno molecular (O_2) es fundamentalmente birradical ya que tiene 2 electrones no apareados en su orbital externo, ambos con el mismo giro paralelo, impidiendo que capte 2 electrones simultáneamente en las reacciones que interviene.

La sangre, fluido biológico compuesto por eritrocitos, leucocitos y plaquetas como elementos celulares, cumple entre otras funciones la de transportar el oxígeno desde los pulmones hasta los tejidos, y es aquí donde este actúa como sustrato en diversas reacciones bioquímicas intracelulares y como resultado se desencadena una producción de H₂O₂ y superóxido, entre otras EROS.

En 1954 una investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por primera vez que los RL eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades.¹⁵

3.6 LOS ESTUDIOS EN ANIMALES

Más de 5000 artículos sobre catarata en animales han sido publicados, sin embargo, hay diferencias significativas entre los lentes de los humanos y animales, que incluyen: los filtros UV en animales es inexistente, la relación en la oxidación de las proteínas es menor en los seres humanos, los niveles de proteínas en el cristalino humano son menores que en la mayoría de los animales, en el cristalino del ratón y la rata es mucho mayor el isómero gamma, en el centro de los lentes los niveles de proteínas aumentan con la edad en los animales, pero no en los seres humanos; sólo los humanos, murciélagos de la fruta, conejillos de indias producen escorbuto, el ascorbato en los lentes del humano es mili molar mientras que en las ratas es micro molar y el glutatión en relación con las enzimas es insignificante en la lente de los animales.⁹

3.7 RATÓN et/et

El ratón desnudo et/et fue observado en 1985 en una cepa cerrada no consanguínea de ratones albinos CD1 en el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la Universidad Nacional Autónoma de México; una de sus características es la alopecia, que es el resultado de un gen recesivo autosómico simple. El término “et” se adoptó para nombrar a la forma mutante, además los ratones presentan una fertilidad baja, mortalidad elevada, lesiones en los ojos y muestran mayor cantidad de células CD3⁺ y CD8⁺, comparados con los ratones et/+ y +/+, y no muestran mayor susceptibilidad a la infección de gérmenes intracelulares como el *Mycobacterium lepraemurium*.¹⁶

3.8 METODOS EXPERIMENTALES DE INDUCCIÓN DE CATARATAS

En el 2006 Malmstrom y Kroger demostraron que roedores y primates de laboratorio tienen características anatómicas similares en el ojo y así muchos de los modelos para el desarrollo de cataratas se basan sobre estudios experimentales en estos animales.¹⁷ Los modelos son métodos necesarios para evaluar la efectividad de los compuestos orgánicos e inorgánicos que poseen propiedades anticataratogénicas. A continuación se describen brevemente algunos de los modelos más comunes.

3.8.1 Cataratas inducidas por selenito de sodio

La sobredosis de selenito de sodio es extremadamente rápida y conveniente en el modelo de cataratas nucleares. Las cataratas se producen en ratas pups por una sobredosis del mineral esencial de selenio. La capacidad del selenito para producir cataratas fue descrita por primera vez en 1977.

Las cataratas por selenito se producen generalmente por una sola inyección subcutánea de 19-30 Micromoles/Kg de peso corporal de selenito de sodio (Na_2SeO_3) en ratas lactantes de entre 10-14 días de edad. Por otra parte, las inyecciones repetidas de pequeñas dosis de selenito o de la administración oral también son cataratogénicas. El selenito es sólo cataratogénico cuando se administra a ratas jóvenes antes de que concluyan en periodo de maduración crítica del lente (aproximadamente 16 días de edad). Las cataratas nucleares bilaterales se producen dentro de 4 a 6 días; estadios previos incluyen: catarata posterior subcapsular (día 1), fibras hinchadas (día 2-3) y el anillo refráctil perinuclear (día 3). Aunque el modelo ha sido utilizado ampliamente como un modelo para la catarata nuclear, la catarata cortical transitoria también se forma entre 15-30 días después de la inyección (esta se desvanecerá después de unos meses pero la catarata nuclear es permanente).

Un número importante de cambios en el metabolismo del lente epitelial durante la formación de cataratas por el selenito han sido documentados. Usualmente antes de una opacidad visible. Estas incluyen supresión de la mitosis y la entrada de células epiteliales en la profase, fragmentación nuclear, decremento en la tasa de diferenciación en las células epiteliales, disminución en la síntesis e incremento en el daño del ADN, y pérdida de la homeostasis del calcio. La hipótesis de estos cambios tempranos en el epitelio del lente puede resultar del daño oxidativo causado por el selenito

La acumulación de calcio se observa en la mayoría de las cataratas, con un incremento de calcio en el lente. Las cataratas por selenito son especialmente interesantes debido a la absorción de calcio durante la formación de cataratas nucleares por el contrario, el sodio, el potasio y el agua no aumentan indicando nulos cambios apreciables en la permeabilidad generalizada de todo el lente.

Proteólisis. Una importante consecuencia de la elevación de calcio en la lente de los roedores es la activación de la proteasa activada de calcio la m-calpaina. Estudios experimentales han demostrado que la inducción de proteólisis por la calpaina es un mecanismo común en una amplia variedad de cataratas en ratas y ratones; así el factor cataratogénico inicia con la entrada de calcio, y la proteólisis por la calpaina como mecanismo de formación de cataratas es muy activa en la lente de los roedores.¹⁸ (Figura 4)

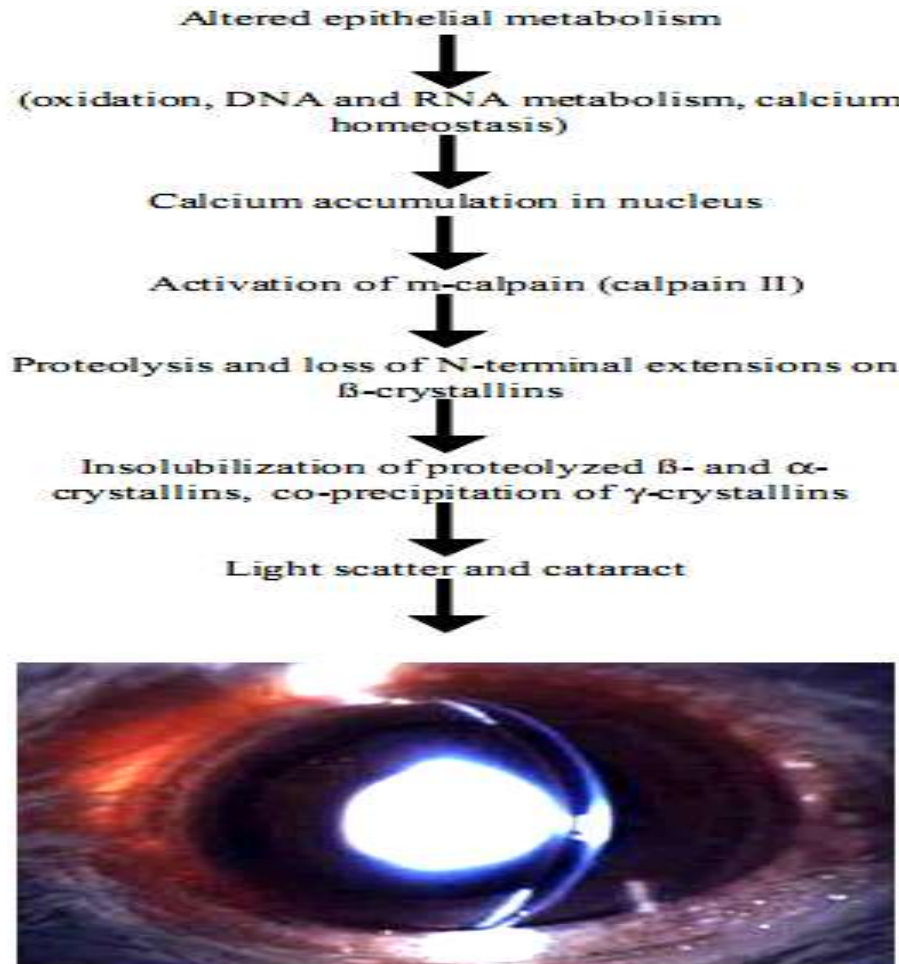


Fig 4. Formación de la catarata nuclear por la administración de selenito de sodio¹⁸

3.8.2 Cataratas inducidas por dosis repetidas con tacrolimus (FK506)

Tacrolimus es un potente inmunosupresor es usado para inhibir el rechazo de aloinjertos en los órganos trasplantados, un estudio preclínico de toxicidad de tacrolimus en ratas se encontró que induce toxicidad; incluyendo lesiones renales y pancreáticas; una de esas alteraciones toxicas encontradas fue la aparición de cataratas, las cuales se desarrollan en las ratas con dosis orales diarias de 5mg de tacrolimus/Kg de peso durante un periodo de 13 semanas.¹⁹

3.8.3 Cataratas inducidas con galactosa

En este método se utilizan ratas albino Wistar de 21 días de edad, teniendo un promedio de peso de 30 g las cuales se les alimenta con una dieta por encima del 30% de galactosa por un periodo de tiempo aproximado a las 4 semanas²⁰

3.8.4 Cataratas inducidas con radiación

Este estudio está dirigido a evaluar el daño en el ADN y la respuesta de reparación del ADN a los rayos x; los cambios posteriores en el lente de las células epiteliales in vivo lleva un periodo de retraso largo, pero luego rápidamente se desarrollan las cataratas. Se utilizan ratones hembras C57BL los cuales reciben 11 Grays (Gy) de rayos x suaves, en la cabeza solamente. Los ojos de los animales son examinados para el estado de cataratas en intervalos de 30 días con una lámpara de hendidura por un período de 11 meses después de la irradiación.²¹

3.9 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

El óxido nítrico es un gas hidrofóbico de vida corta, producido endógenamente y que posee una estructura química relativamente sencilla, el NO se sintetiza a partir de L-arginina, oxígeno molecular y la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), según aparece en las reacciones siguientes mediadas por las enzimas óxido nítrico sintasas (ONSs) (Figura 5)

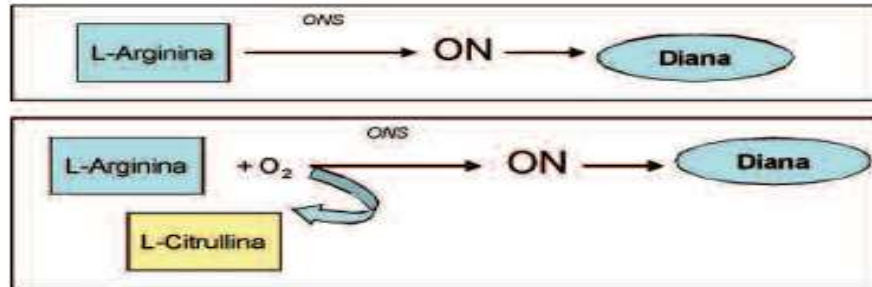


Fig 5. Producción de NO ²²

El NO se considera un mensajero fundamental para los sistemas de transducción de señales en el cerebro y aparato cardiovascular. Aunque se identificaron las enzimas sintetizadoras en el cerebro (NOS1), y posteriormente en macrófagos (NOS2) y en el endotelio (NOS3), estas enzimas se han encontrado también en otras células del organismo, participando en diversos procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo las enfermedades oculares, entre las que se ha descrito su implicación en las cataratas, uveítis y glaucoma²².

Actualmente se sabe que el NO se produce en el cuerpo humano en una gran variedad de tipos celulares como las células endoteliales, macrófagos y neuronas cerebrales específicas. Participa en procesos que permiten la supervivencia de los organismos, tal como la regulación de la presión sanguínea, el desarrollo del sistema nervioso central, facilitar la transmisión nerviosa en los procesos de aprendizaje y memoria, y la activación de la respuesta inmune.

Por otro lado, el NO reacciona rápidamente con el oxígeno molecular (O₂) y con diferentes formas del O₂ que son altamente reactivas, como los radicales superóxido (O₂⁻) e hidroxilo (OH), los cuales son sumamente tóxicos. La interacción del NO con el O₂⁻ genera peroxinitrito y otras formas reactivas del N que también son tóxicas, por lo tanto, la combinación del NO con las formas reactivas del O₂ constituye el principal mecanismo mediante el cual el NO daña a las células. (Figura 6) ^{23, 24}

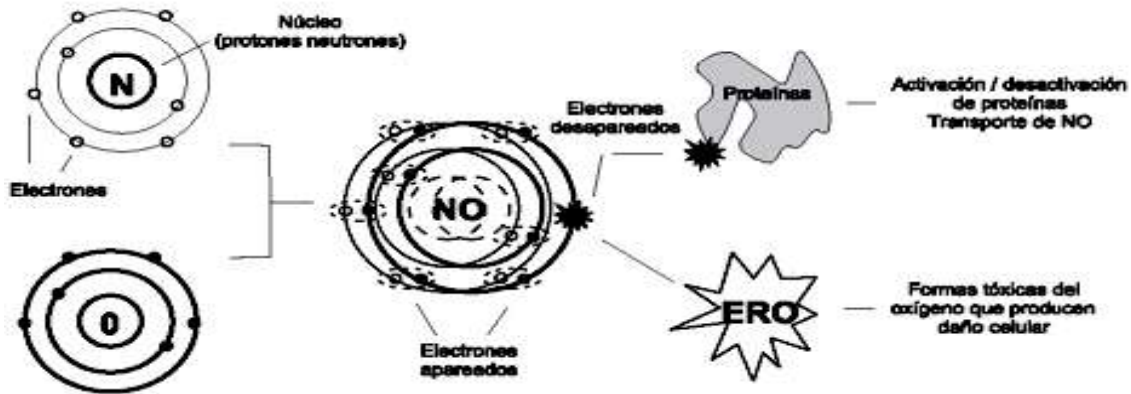


Fig 6. Formación del óxido nítrico. Una molécula de óxido nítrico (NO) se forma por la combinación de un átomo de nitrógeno (N) y uno de oxígeno (O). La molécula de NO posee un electrón desapareado, el cual interactúa rápidamente con otras moléculas que también tienen electrones desapareados, tales como las proteínas o las especies reactivas del oxígeno (ERO).²⁴

3.10 CERULOPLASMINA (CP)

El hierro es necesario para la producción de energía a través de una transferencia de electrones, pero también es un poderoso generador de daño oxidativo. Muchos de sus chaperonas moleculares han sido identificados, y sus niveles están estrictamente controlados por el hierro en sí. Un número de proteínas de manipulación del hierro se han encontrado en la retina, incluyendo la transferrina, receptor de la transferrina, la ferritina, ferroportina, ceruloplasmina y hefaestina. Varios estudios recientes sugieren que el metabolismo anormal del hierro en la retina puede promover una variedad de trastornos; estos incluyen: siderosis ocular ya sea de cuerpos extraños intraoculares o de una hemorragia intraocular; recientemente la evidencia sugiere que la sobrecarga de hierro también pueden jugar un papel en la patogénesis de la degeneración macular relacionada con la edad (DMAE).

La siderosis ocular es una condición peligrosa para la vista como resultado de depósito de hierro intraocular. La etiología más común es un cuerpo extraño metálico retenido. Los hallazgos clínicos incluyen heterocromía del iris, midriasis pupilar, formación de cataratas (subcapsular anterior), decoloración de la lente, desprendimiento de retina, estrechamiento de las arteriolas de la retina y epitelio pigmentario de la retina y la atrofia aglutinación.

La CP es una oxidasa múltiple de cobre con actividad ferroxidasa. La ceruloplasmina puede funcionar como un antioxidante, ya que Fe^{2+} cataliza la generación de radicales

libres. Además, mediante la oxidación del hierro de la forma Fe^{2+} a su forma Fe^{3+} la ceruloplasmina facilita la exportación de hierro, ya que se sabe que sólo el hierro ferroso es transportado a través de la membrana plasmática, pero sólo el hierro férrico puede tomarse hasta en el espacio extracelular por la transferrina; se cree que las ferroxidasas extracelulares incluyendo la ceruloplasmina son importantes en la ferroxidación que es necesaria para que la exportación eficiente pueda ocurrir, probablemente a través de la generación de un gradiente de iones.

La CP se encuentra difusa en la retina, también está presente en el humor acuoso, humor vítreo y la retina de un ojo humano normal.²⁵ El papel fisiológico de la ceruloplasmina no está bien definido pero pueden incluir la actividad antioxidante extracelular mediante la promoción de la movilización de Fe y evitar así que el metal sea catalizado por radicales libres en los tejidos. Alternativamente, varios estudios sugieren que la CP también puede presentar actividad prooxidante potente. A pesar de la función desconocida de la actividad de CP como prooxidante, es probable que la proteína esté implicada en la defensa del huésped y los procesos de reparación mediada por el sistema inmunológico, es decir, durante la inflamación y la hiperoxia.

De hecho, la CP es un reactante de fase aguda, con un incremento en su concentración sérica durante el embarazo, las lesiones, infección de los tejidos, y algunas enfermedades malignas.^{26, 27}

3.11 PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

Los peróxidos lipídicos pueden causar catarata, producir daño a la membrana celular y regiones del citosol de las células del cristalino. Los hidroperóxidos lipídicos inducen cambios en la permeabilidad de la membrana, reforman la microviscosidad y el orden estructural de su ambiente lípido-proteína.²⁸

Estos lipoperóxidos causan un desacoplamiento de la enzima ATPasa $\text{Na}^+\text{-K}^+$ de la membrana y la inhibición oxidante de la ATPasa dependiente de Ca^{2+} en varios tejidos, que incluyen el cristalino. Dentro de la célula, los peróxidos lipídicos pueden dañar el ADN e inducir una disminución en las concentraciones de glutatión total (GSH) y un cambio drástico en la proporción redox de GSH oxidado y reducido.

Los productos de la peroxidación lipídica (POL), por ejemplo: hidroperóxidos lipídicos y sus indicadores *in vivo*, dienos conjugados, representan el mayor cambio en la composición del humor acuoso durante la formación de la catarata. En la fase de catarata madura, los productos finales de la POL (fluorescentes) están distintivamente perceptibles. Desde el momento en que se tienen evidencias de que la POL es clínicamente importante en eventos patológicos, las modalidades terapéuticas deben tratar constantemente el daño a las biomoléculas, en este caso el que causan a las células del cristalino los peróxidos lipídicos reactivos, las ERO y además se debe evaluar la afectación en la reformación de las membranas del cristalino en la falta de detoxificación metabólica de peróxidos fosfolipídicos. La L-carnosina y sus profármacos oftálmicos son uno de estos grupos de productos; estos compuestos actúan como antioxidantes universales con una capacidad establecida para proteger contra la POL en la fase lipídica de las membranas celulares y en el ambiente acuoso (protege proteínas, ADN y azúcares del daño oxidativo).²⁹

La peroxidación lipídica es un mecanismo bien conocido de daño celular en animales, siendo por ello utilizado en ocasiones como indicador del estrés oxidativo. Tras la descomposición de los ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) de las membranas biológicas se generan, entre otros, malonildialdehído (MDA) y 4-hidroxiacetalqueno (4-HNE), como productos finales de reacción. Gracias a su determinación se puede cuantificar la peroxidación lipídica y, por tanto, el estrés oxidativo en los organismos.³⁰ (Figura 7)

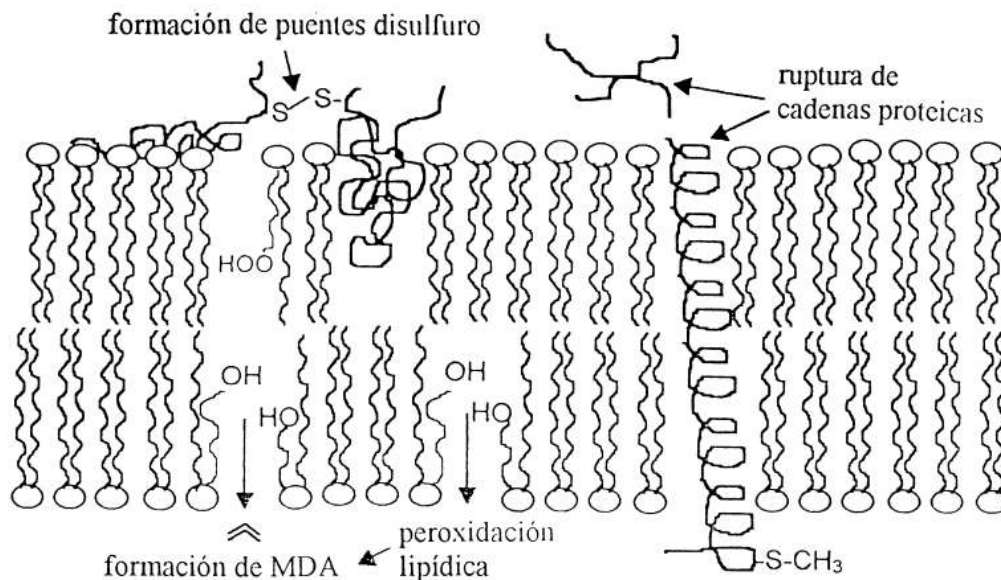


Fig 7. Resultados del daño oxidativo provocado por las especies reactivas de oxígeno (EROs) sobre las membranas.³⁰

3.12 ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)

El inmunoensayo enzimático es una técnica en la cual uno de los reactantes, el anticuerpo o el antígeno, se fija a un soporte sólido previamente a su interacción con el reactante complementario. Debido a esta característica de la técnica y al uso de anticuerpos acoplados a enzimas, la técnica se denomina como ELISA. La técnica es muy versátil y por esto hay diversas variantes de la misma dentro de las cuales las más comunes son el ELISA directo, el ELISA indirecto y el ELISA “en sándwich” o de captura.

En los ELISAs directo e indirecto, el antígeno se adsorbe a la fase sólida (placas de un plástico especial de 96 pozos o módulos de 8, 12 o 16 pozos), en el ELISA en sándwich las placas se sensibilizan con anticuerpos dirigidos contra el antígeno problema. El ELISA directo comúnmente se utiliza para cuantificar antígenos conocidos, el indirecto para buscar y cuantificar anticuerpos contra antígenos conocidos, el ELISA en sándwich o de captura se utiliza para la búsqueda y cuantificación de antígenos.

Las soluciones para dilución de los reactantes y lavado de los pozos son variadas, la más utilizada es el regulador de fosfatos 0.01M en solución salina 0.15 a pH 7.4 (PBS). Algunos recomiendan adicionar Tween 20 al 0.01-0.05% a la solución de trabajo (PBST), otros lo evitan, sobre todo cuando los antígenos son de naturaleza lipídica. Un paso que no se debe obviar en las técnicas de ELISA es el bloqueo de los pozos con soluciones de proteína inertes al sistema Ag-Ac en estudio. Los bloqueadores más utilizados son albumina, gelatina, caseína y la leche descremada, todos ellos a la concentración del 2 al 3% en PBS. El bloqueador satura los sitios no ocupados por el reactante inmunológico usado para forrar la superficie de los pozos y evita la adsorción inespecífica de reactantes en los pasos subsecuentes.³¹

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente existen modelos de inducción de cataratas con diversos métodos, utilizando principalmente como animales de experimentación a las ratas; estos modelos permiten evaluar la actividad anticataratogénica de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos; aunque la mayoría de estos métodos en comparación con el modelo usando al selenito de sodio como inductor de cataratas son costosos y necesitan de un tiempo prolongado para desarrollar las cataratas. Establecer un método que elimine las desventajas de los modelos alternativos es de suma importancia ya que existe una necesidad urgente de obtener un fármaco aceptable para el tratamiento de las cataratas, esto debido a que en la actualidad no existe uno adecuado para este padecimiento y el único tratamiento es la extirpación quirúrgica el cual puede estar fuera del alcance de pacientes con bajos recursos económicos. Cabe resaltar que aunque este padecimiento se presenta a nivel mundial, datos estadísticos indican que hay un mayor número de casos en países subdesarrollados.

Un modelo alternativo utilizando como animales de experimentación a los ratones *et/et* permitirá evaluar la etiopatogenia de la enfermedad; así como, la actividad anticataratogénica de diversas plantas derivadas de la inmensa flora de nuestro país; de las cuales se sabe empíricamente que poseen propiedades para tratar la nubosidad (catarata) en los ojos. Utilizar un modelo alternativo de inducción de cataratas permitirá diseñar experimentos que arrojen reportes científicos que respalden el uso tradicional de dichas plantas.

5. OBJETIVOS

Objetivo general

- Evaluar un método de inducción de cataratas con selenito de sodio en ratones et/et que desarrollan espontáneamente exocrinopatía y establecer la participación de los radicales libres.

Objetivos específicos

- Determinar los niveles de peroxidación lipídica y nitritos como marcadores de estrés oxidativo
- Determinar los niveles de ceruloplasmina como marcador de procesos inflamatorios
- Buscar la presencia de anticuerpos anti proteínas uveitogénicas (proteína S) mediante la técnica de ELISA.

6. HIPÓTESIS

El selenito de sodio es un agente cataratogénico en ratas lactantes cuando se administra antes de que concluyan el periodo de maduración crítica del lente que es aproximadamente de 16 días de edad. El ratón et/et presenta espontáneamente uveítis, debida a su exocrinopatía por lo tanto esperamos que estos ratones sean más susceptibles a desarrollar cataratas inducidas con selenito de sodio

7. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

TIPO DE ESTUDIO

Experimental, prospectivo, longitudinal

POBLACIÓN DE ESTUDIO.

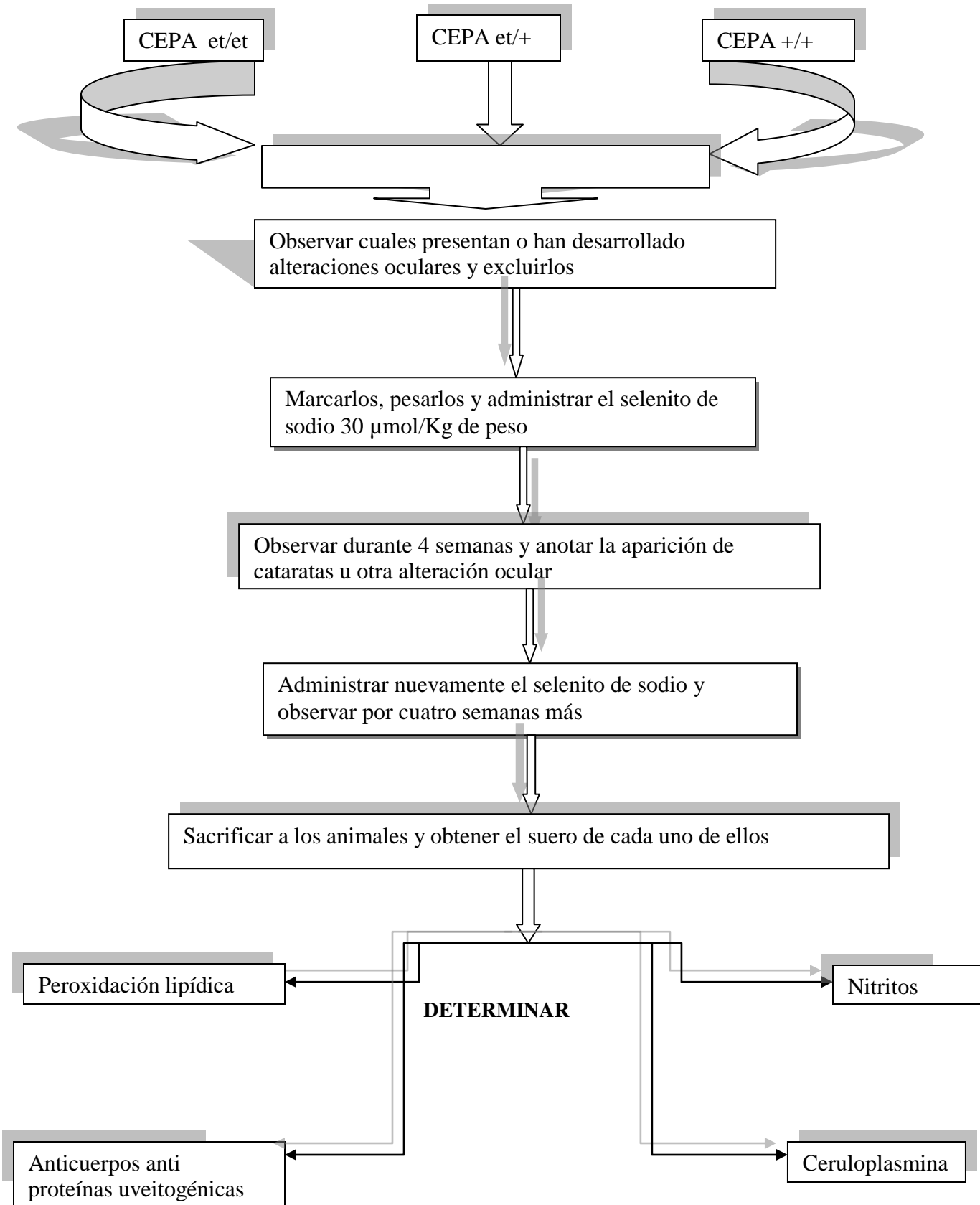
Ratones et/et, et/+ y +/+ machos y hembras. Divididos en grupos con base a edad, sexo y cepa.

Criterios de inclusión: Ratones et/et, et/+ y +/+ de 12 semanas de edad y ratones et/et de 5 semanas de edad

Criterios de exclusión: Ratones que no cumplan con la edad establecida

Criterios de eliminación: Ratones que presenten tumores e infecciones.

DIAGRAMA DE FLUJO



8. MATERIAL, REACTIVOS Y EQUIPO

8.1 Material biológico

- Ratonos et/et, et/+ y +/+
- Suero de ratón
- Anticuerpos de conejo anti-ceruloplasmina de ratón

8.2 Material

Material	Marca
Bisturí	Weldon
Cámara de éter	
Celdas	Kartell
Gradilla	
Homogenizador Potter	Thomas
Matraz aforado 100 mL, 250 mL	Pyrex
Matraz Erlenmeyer 125 mL, 1000 mL	Kimax
Mechero Fisher	
Papel parafilm	ANC
Pinzas	ATCO
Pipeta graduada 1 mL, 2 mL, 5 mL 10 mL	Pyrex
Pipeta Pasteur	Corning
Placas de Falcon	Falcon
Placas de poliestireno para ELISA	Costar
Portaobjetos	Corning
Probeta 10 mL, 100 mL, 1000 mL	Pyrex
Tijeras de disección	Weldon
Tubos con tapón de rosca	Pyrex
Tubos de ensayo 13X100	Pyrex
Tubos Eppendorf	Fisher Brand
Vaso de precipitado 50 mL, 100 mL, 500 mL	Pyrex

8.3 Reactivos

Nombre	Proveedor
N ₂ (1-naftil)-etilendiaminodihlorhidrato (NED)	Merck
1,1,3,3-Tetrametoxipropano (TMP)	Aldrich
Acido clorhídrico	J.T Baker, S.A. de C.V.
Acido ortofosfórico	
Acido sulfúrico	J.T Baker, S.A. de C.V.
Ácido tiobarbitúrico (TBA)	Sintetizado en el laboratorio de orgánica por el M. en C. Rodolfo Carreón Sánchez. FES Zaragoza
Agar- Agar	Bioxon
Agarosa	Bioxon
Agua destilada	Theissier
Albumina	Merck
Azida de sodio	J.T Baker, S.A. de C.V.
Bicarbonato de sodio	J.T Baker, S.A. de C.V.
Borato de Amonio	Mallinckrodt
Butiril-hidroxitolueno (BHT)	Monterrey S.A. de C.V.
Cadmio metálico	Técnica Química S.A
Carbonato de sodio	J.T Baker, S.A. de C.V.
Cloruro de Amonio	J.T Baker, S.A. de C.V.
Cloruro de potasio	Técnica Química S.A
Cloruro de sodio	Hycel de México S.A. de C.V.
Cloruro de sodio	J.T Baker, S.A. de C.V.
Formaldehído 37%	J.T Baker, S.A. de C.V.
Fosfato de potasio monobásico	Técnica Química S.A.
Fosfato de sodio dibásico dodecahidratado	J.T Baker, S.A. de C.V.

Glicina	Merck
Glutaraldehído	Sigma Chemical Company
Leche descremada	Sveltes de Nestle
N-butanol	J.T Baker, S.A. de C.V.
Nitrito de sodio	Mellinckrodot
Ortofenilendiamina	Sigma Chemical Company
Selenito de sodio	Sigma Chemical Company
Sulfanilamida	Merck
Sulfato de cobre	Técnica Clínica
Sulfato de Zinc	Hycel de México
Tween 20	Sigma de México, S.A. de C.V.

8.4 Equipo

Equipo	Marca
Agitador Rocker	Rocker Platform Bellco Glass
Agitador Vortex	Scientific Industries
Balanza Analítica	OHAUS
Bascula mecánica automática	TECNOCOR 100-S
Centrífuga	Hamilton BelVan Guard V 6500
Centrífuga para Eppendorf	HERMLE Z 233 M-2
Congelador	Revco
Espectrofotómetro	JENWAY 6305 UV/VIS
Estufa	SHEL LAB
Lámpara UV	Blak Ray
Lector de ELISA	Awareness Technology Inc
Micropipeta 100-1000 µL	BIOHIT
Micropipeta 10-100 µL	Labpette- Labnet
Micropipeta 5- 40 µL	Finnpipette- Labsystems
Refrigerador	Twist aire- MABE

9. MÉTODO

Se estudiaron 57 Ratones machos y hembras de 5 a 12 semanas de edad, de las cepas +/+, et/+ y et/et. La atención de los animales y el proceso experimental se llevo de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio, de la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999).

Los ratones et/et se obtuvieron cruzando machos et/et con hembras et/+; los críos et/et se separaron de sus hermanos con pelo de los cuales se diferencian al nacer por la ausencia de vibrisias (vibrissae). Los animales son identificados, según su genotipo y antecedentes de crianza, en animales normales +/+, ratones desnudos hipotimicos et/et y los heterocigotos o portadores et/+. Se organizaron en grupos de 8 ratones cada uno con base a su sexo y edad. Para cada ratón se registro cepa, sexo, edad, peso corporal y lesiones visibles en ojos, como inflamación, leucoma, cataratas y ojos perdidos.

Antes de administrar el selenito de sodio se realizo una inspección a cada ratón para descartar que presentaran alteraciones visibles en los ojos. Las cataratas se indujeron por dos inyecciones subcutáneas de 30 Micro moles de selenito de sodio (Na_2SeO_3) /Kg de peso corporal.

Los ratones se mantuvieron en observación por un periodo de 8 semanas durante el cual se anoto la aparición y en su caso el progreso de las lesiones en los ojos. Una vez transcurrido el tiempo los ratones se pesaron y se anestesiaron en una cámara de éter, se sangraron por incisión capilar y se obtuvo el suero de cada animal.

Se realizaron los ensayos siguientes:

9.1 NITRITOS

En este análisis se reduce los nitratos a nitritos mediante reducción con cadmio metálico.

- Activación del cadmio.

1. Se colocaron en tubos de 13x100 limpios, 0.500 g de cadmio metálico en la campana de extracción. El cadmio se plateo con una solución acuosa de CuSO_4 (sulfato de cobre) al 5% (2mL), se agito hasta que el cadmio se plateo,

aproximadamente 10 minutos en un rocker, se lavo exhaustivamente con agua destilada para eliminar el cobre, tres lavados con el tubo lleno

2. después se la lavo con HCl (ácido clorhídrico) 0.1N para remover todo el Cd(OH)₂ (hidróxido de cadmio), aproximadamente dos volúmenes con el tubo lleno.
3. Después se lavo el cadmio con el NH₄Cl (cloruro de amonio en solución acuosa al 5% ajustado a pH 9 con borato de sodio, con un volumen.

- **Procesamiento de la muestra.**

1. A 100 µL de plasma se le adicionaron 300 µL de agua bidestilada (la dilución fue 1:4) se eliminaron 20 µL y se adicionaron 20 µL de la solución de sulfato de zinc, se mezclo bien y el precipitado se separo por centrifugación a 10000 rpm por 5 minutos.
2. Se tomo el tubo con el cadmio activado y se elimino el cloruro de amonio escurriéndolo bien, se adiciono al tubo todo el sobrenadante de la muestra y se dejo en agitación, tapado con parafilm en un rocker durante 15 minutos, se centrifugaron los tubos a 3500 rpm durante 5 minutos y se tomaron 200 µL del sobrenadante para el ensayo.
3. Se preparo una solución de 2 µg /mL de estándar de nitritos (nitrito de sodio)

Curva estándar		
Tubo	Estándar (µL)	Agua destilada (µL)
1	0	900
2	100	800
3	200	700
4	300	600
5	400	500
6	500	200
Muestra	200(sobrenadante)	700

Cuadro 1. Curva estándar de nitritos

4. Se adicionaron a todos los tubos 50 μ L de sulfanilamida. Se incubo por 10 minutos a temperatura ambiente.
5. Se adicionaron 50 μ L del reactivo de NED, se mezclo e incubo por 30 minutos. Se realizo la lectura a 540 nm.

9.2 CERULOPLASMINA

- Obtención del suero anti-ceruloplasmina

1. Se inmunizo a 2 conejos New Zealand White (NZW) con la proteína (ceruloplasmina) siguiendo el esquema de inmunización para proteínas.

Esquema para la inmunización con ceruloplasmina

Día 0	1mg del antígeno en 1 mL de solución salina mas 1 mL de adyuvante completo de Freund, se aplico en sitios múltiples vía subcutánea
Día 14	1 mg del antígeno en 1 mL de solución salina mas 1 mL de adyuvante incompleto de Freund, se aplico en sitios múltiples vía subcutánea
Día 35	0.5 mg del antígeno en 1 mL de solución salina, se aplico en sitios múltiples
Día 40	0.5 mg del antígeno en 1 mL de solución salina, se aplico en sitios múltiples
Día 45	Se sangro a los animales y se obtuvo el suero

Cuadro 2. Esquema de inmunización con proteínas

2. Se determino la pureza del suero anti-ceruloplasmina obtenido, para ello se realizó lo siguiente:
 - Se realizaron placas de agarosa al 1% en un portaobjetos
 - A estas placas se le realizaron dos perforaciones y se marco un canal central sin quitar el agar. En las dos perforaciones se coloco suero fresco de ratón y sólo en una de estas se coloco azul de bromofenol como indicador de corrimiento de la proteína.

- La placa se colocó en cámara de electroforesis y se le aplicó 30 mili amperes de corriente hasta que el colorante se desplazó aproximadamente a $\frac{3}{4}$ partes del portaobjetos
 - Se desconectó la corriente y se retiró del canal central el agar y se adicionó el suero anti-ceruloplasmina obtenido
 - Se dejó la placa en cámara húmeda por 24 horas y se observó las bandas de precipitación (ver anexo II)
3. Se realizó la purificación del anticuerpo mediante el uso de un inmunoabsorbente, (Glutaraldehído-gamma Globulina) para esto se realizó lo siguiente:
- Se obtuvo suero de ratón fresco, este se precipitó para obtener gammaglobulina agregando gota a gota sulfato de amonio al 45%, se dejó reposar por 10 minutos agitando en intervalos de tiempo.
 - Se centrifugó a 3500 rpm por 20 minutos y se eliminó el sobrenadante.
 - Se resuspendió el precipitado con la mitad del volumen inicial del suero obtenido.
 - Se realizó otra precipitación ahora con sulfato de amonio al 33%
 - La sal se removió por diálisis contra solución salina (PBS)
 - La γ globulina de ratón obtenida se disolvió en 16 mL de solución reguladora de fosfatos.
 - A la solución anterior se le agregó gota a gota 2 mL glutaraldehído al 2.5 % en agua.
 - La solución se dejó 24 horas en refrigeración y en reposo para evitar que la gelificación fuera completa.
 - Al gel obtenido se le agregó un volumen pequeño de solución reguladora de fosfatos y se fraccionó el gel con la ayuda de un homogeneizador Potter.
 - Se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y se eliminó el sobrenadante.
 - Se repitió una vez más los dos pasos anteriores.
 - Se resuspendió la proteína insoluble en aproximadamente 80 mL de solución reguladora de glicina-HCl

- Se centrifugo a 3500 rpm durante 15 minutos y se determino la densidad óptica del sobrenadante a 280 nm. Los dos pasos anteriores se repitieron hasta que la densidad óptica fue de cero.
- El precipitado obtenido se agrego al suero de ratón anti-ceruloplasmina poco a poco y con agitación constante. Se dejo en agitación por aproximadamente 30 minutos.
- Se centrifugo a 7000 rpm durante 30 minutos, se separo el suero del inmunoabsorbente (precipitado).
- El precipitado se lavo tres veces con solución reguladora de fosfatos y una vez con solución reguladora glicina-HCl
- Los tres pasos anteriores se repitieron 4 veces.
- A el suero obtenido se le determino la pureza siguiendo todo el procedimiento del paso 2 (ver anexo II)

- **Preparación de las placas**

1. Se Pesaron 0.3 g de agarosa en la balanza analítica, se transfirieron a un matraz Erlenmeyer de 125 mL, adicionando 30 mL de PBS, se coloco el matraz en el microondas y se le dieron ciclos de 10 segundos hasta que se observo totalmente disuelto.
2. Se colocaron 6 tubos de ensayo 13x100 en un baño a 45⁰ C, se adicionaron 2 mL de agarosa al 1% en cada tubo 13x100, Se adiciono a cada tubo 150 µL de suero de conejo anticerculoplasmina de ratón y se agito con ayuda de un vortex.
3. Cada uno de los tubos fue vaciado en un pozo de las placas de Falcon de 35 mm se evito la formación de burbujas, la placa se dejo reposar hasta alcanzar la solidificación.
4. Se realizaron 4 perforaciones en cada pozo de la placa Falcon con agarosa.

- **Procesamiento de la muestra**

1. Se colocaron 10 µL de cada muestra problema en cada orificio de los pozos; esto se realizo de acuerdo a la numeración que se le asigno a cada muestra.

2. La placa se refrigero por 48 horas, pasado este tiempo se medio el diámetro del halo de precipitación.
3. Se calculo la concentración de ceruloplasmina.

9.3 DETERMINACIÓN DE PEROXIDACIÓN LIPÍDICA (MDA). MÉTODO DE TBA (ÁCIDO TIOBARBITÚRICO)

- Procesamiento de la muestra

1. Se colecto la muestra en un tubo heparinizado, se Centrifugo a 3000 rpm / 5 min, se separo el plasma y se adicionaron 10 µL de BHT 2mM
2. Se diluyo el plasma 1:5 con PBS (100 µL de suero con 400 µL de PBS)
3. Se colocaron 400 µL del plasma con 50 µL de BHT 12.6 mM y 400 µL de ácido ortofosfórico 0.2 M, Se mezclaron en un vortex 10 seg.
4. Se adicionaron 50 µL de TBA 0.11 M y se mezclo con un vortex, se coloco la mezcla de reacción en un baño de agua a 90° C, con los tubos tapados por 15 min.
5. Se enfrió en hielo, se agregaron 1000 µL de n-butanol y 100 µL de NaCl solución saturada. Se agito vigorosamente por 30 segundos, se centrifugo a 5000 rpm / 1min.
6. Se transfirieron 500 µL de la fase de butanol a una celda, se realizo la lectura a 535 nm y a 572 nm para corregir la absorción.
7. Se realizó la curva estándar (Estándar: Tetrametoxipropano; TMP)

Tubo	MDA (µM/L)	TMP (µL)	H ₃ PO ₄ (µL)	TBA (µL)	H ₂ O (µL)
Blanco	0	0	600	200	200
1	0.2	5	600	200	200
2	0.4	10	600	200	198
3	0.8	20	600	200	196
4	1.2	30	600	200	194
5	2.0	50	600	200	190

Cuadro 3. Curva estándar (Estándar: Tetrametoxipropano; TMP). Datos para construir la curva estándar para peroxidación lipídica.

9.4 ELISA

- **Obtención del antígeno de retina**

La obtención de la proteína S de retina se realizó siguiendo la metodología de Wacker et al³² para ello

1. se obtuvieron ojos frescos de bovinos en las mejores condiciones de asepsia posible y se colocaron en solución salina.
2. La porción anterior del globo ocular se removió por una incisión circuncorneal, se extrajo el cristalino, se eliminó el humor vítreo de la capa del ojo, la copa se enjuago suavemente con amortiguador de salina fosfato pH 7.2 (PBS), varias veces, se separo la retina de la coroides y del epitelio pigmentado, con la ayuda de unas pinzas y se corto la conexión con el nervio óptico.
3. Las retinas se disgregaron con un homogeneizador de tejidos, usando primero un embolo flojo y después uno justo.
4. Los sobrenadantes se centrifugaron a 15000 rpm a 5° C durante una hora y se precipitaron con una solución de sulfato de amonio saturada volumen a volumen (80% de saturación), se centrifugo a 5000 rpm a 5° C por 10 minutos, se repitió el procedimiento dos veces más y al final el precipitado se resuspendió en PBS.
5. se dializo contra PBS hasta la eliminación del sulfato de amonio. Las proteínas se cuantificaron mediante el método de Lowry³³.

- **Obtención de sueros (sangrado de animales)**

1. Se anestesiaron previamente en una cámara con éter. Se realizó un corte de plexo axilar, se recolecto la mayor cantidad de sangre.
2. Se decapito al ratón identificándolo con el número asignado (siguiendo un orden progresivo) para fines de conservación se utilizo formalina al 10%. Una vez coagulada la sangre se centrifugo a 3000 rpm por 5 minutos, se extrajeron los sueros y se congelaron a -20° C hasta su uso.

- **Procesamiento de la muestra.**

1. se irradiaron placas de poliestireno de alta unión (COSTAR) con luz UV durante 30 minutos para aumentar su adhesividad según el método descrito por Boudet et al³⁴.
2. Se adicionaron a cada pozo 100 μ L de antígeno diluido en buffer de carbonato-bicarbonato (50 mM, pH 9.6). Se incubo a 37° C durante una hora transcurrido el tiempo se elimino el sobrenadante.
3. Se bloqueo la placa con 300 μ L de solución de albúmina sérica al 1% y leche descremada al 5% en PBS, se incubo una hora a 37° C, se lavo con PBS-Tween 4 veces.
4. A cada pozo se le agregaron 100 μ L del suero de ratón a determinar con una dilución 1:20 en PBS. Las placas se incubaron a 37° C durante una hora, se lavo con PBS-Tween 4 veces.
5. Se adicionaron 100 μ L del conjugado de peroxidasa IgG e IgM de ratón hecho en cabra a cada placa respectivamente con una dilución 1:500 se incubo a 37 °C durante una hora, se lavo con PBS-Tween 4 veces
6. Se adicionaron en cada pozo 100 μ L del sustrato de peroxidasa con el cromógeno y se incubo durante 20 minutos a 37° C.
7. Se realizaron las lecturas de las absorbancias de las placas en un lector de ELISA a 490 nm.

9.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizo el programa estadístico SPSS versión 11.5. Se realizó una ANOVA de un factor y para comparar dos grupos se realizó una *t* de Student. (Para dos muestras independientes). Se considero una significancia al 0.05.

10. RESULTADOS

ALTERACIONES OCULARES PRESENTADAS EN LOS RATONES DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO



Figura 8. Ratón de la cepa $+/+$ sin alteración visible



Figura 9. Ratón de la cepa et/et sin alteración visible



Figura 10. Ratón de la cepa et/et presentando inflamación ocular



Figura 11. Ratón de la cepa et/et presentando leucoma

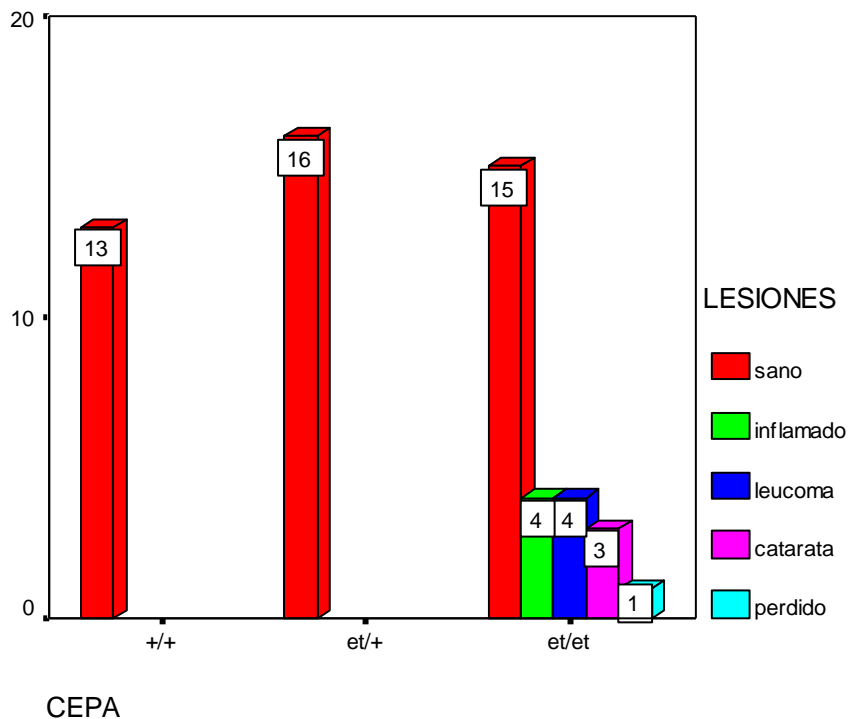


Figura 12. Ratón de la cepa et/et presentando catarata; nótese que a diferencia del leucoma la opacidad se extiende en todo el cristalino



Figura 13. Ratón de la cepa et/et que presenta ojo perdido

RECUENTO DE LAS ALTERACIONES OCULARES EN LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

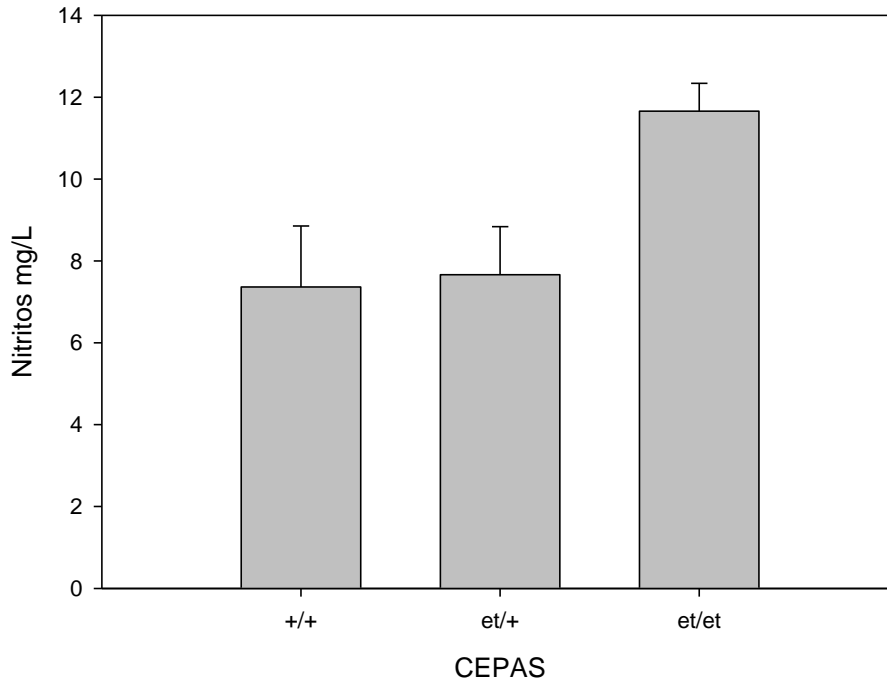


Gráfica 1. Recuento de alteraciones oculares

CEPA	SANO (%)	INFLAMADO (%)	LEUCOMA (%)	CATARATA (%)	PERDIDO (%)
et/et	55.6	14.8	14.8	11.1	3.7
et/+	100	0	0	0	0
+/+	100	0	0	0	0

Cuadro 4. Recuento de alteraciones oculares en cada una de las cepas después de la administración de selenito de sodio; expresado en porcentaje.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE NITRITOS EN EL SUERO
DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS, DESPUÉS DE LA
ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

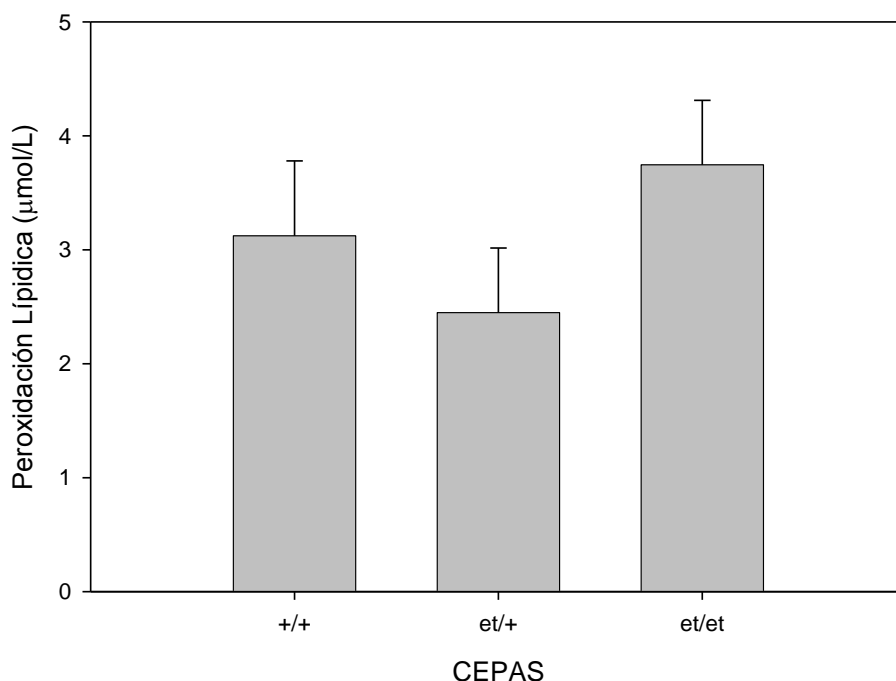


Gráfica 2. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio P= 0.002 (ANOVA)

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	11.6592	0.6781
et/+	7.6625	1.0174
+/+	7.3630	1.4912

Cuadro 5. Comparación de medias de las concentraciones de Nitritos con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante ANOVA con diferencia significativa ($p < 0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN
LIPÍDICA EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS,
DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

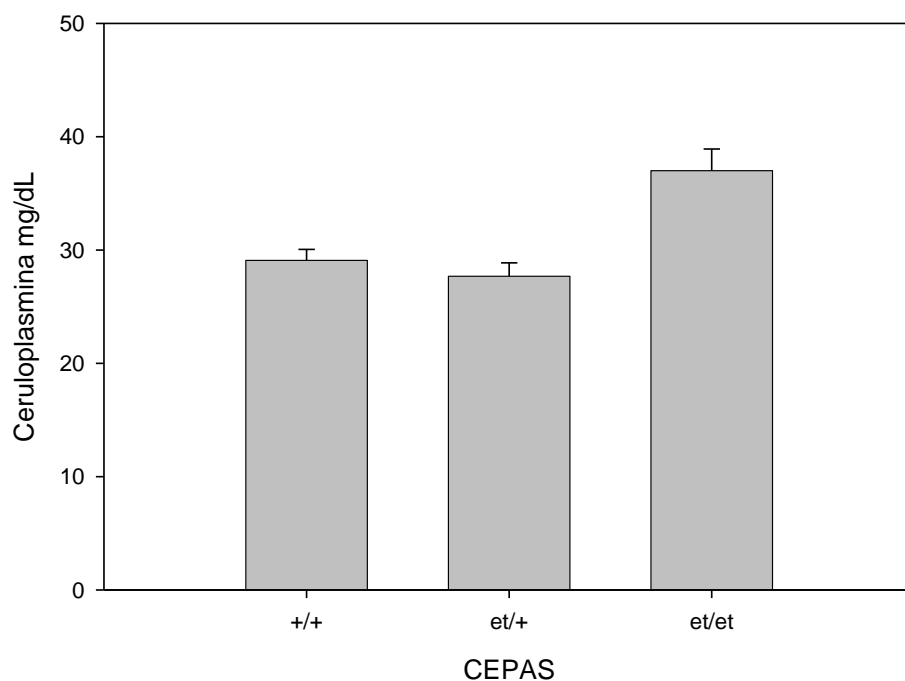


Gráfica 3. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio P= 0.301 (ANOVA)

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	3.7448	0.5656
et/+	2.4475	0.5681
+/+	3.1223	0.6567

Cuadro 6. Comparación de medias de las concentraciones de Peroxidación lipídica con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante ANOVA sin diferencia significativa ($p > 0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE CERULOPLASMINA EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS, DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

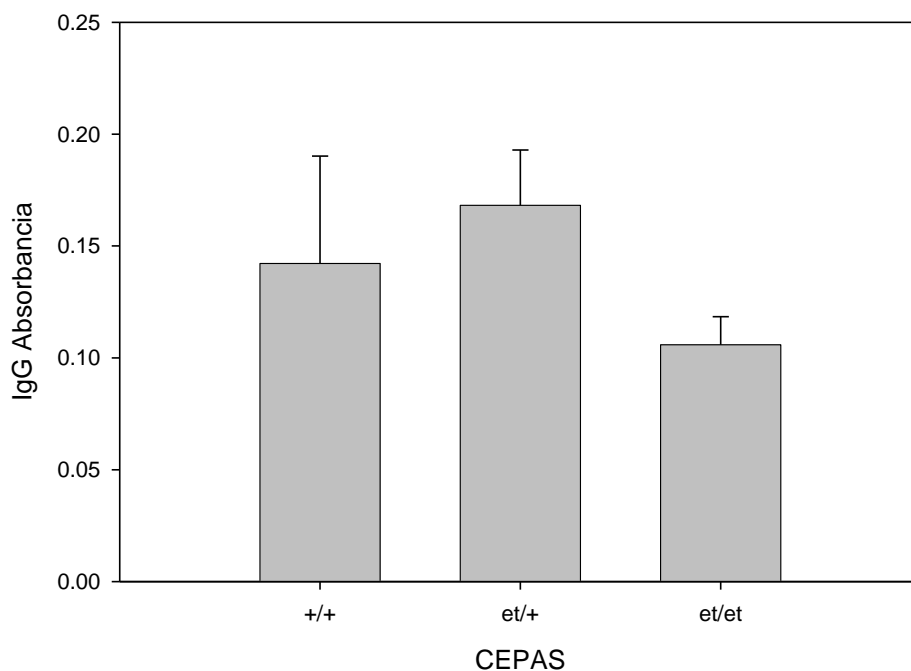


Gráfica 4. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio P= 0.000 (ANOVA)

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	37.00	0.9741
et/+	27.6750	1.1948
+/+	29.0769	0.9741

Cuadro 7. Comparación de medias de las concentraciones de Ceruloplasmina con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante ANOVA con diferencia significativa ($p < 0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgG
EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS, DESPUÉS DE
LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

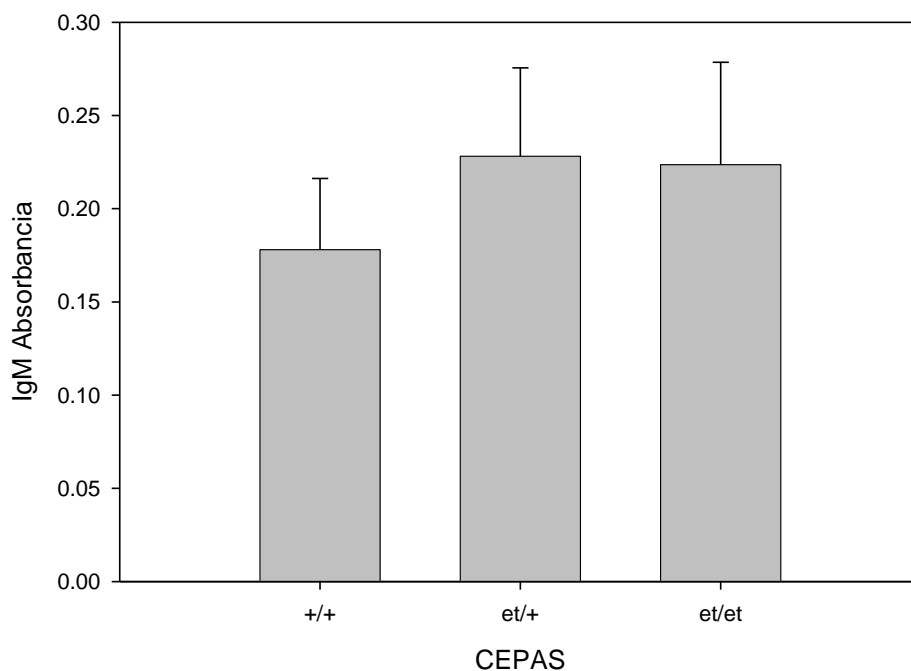


Gráfica 5. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio P= 0.184 (ANOVA)

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	0.1058	0.0126
et/+	0.1682	0.0247
+/+	0.1422	0.0480

Cuadro 8. Comparación de medias de las absorbancias de IgG con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante ANOVA sin diferencia significativa ($p > 0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgM
EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS, DESPUÉS DE
LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

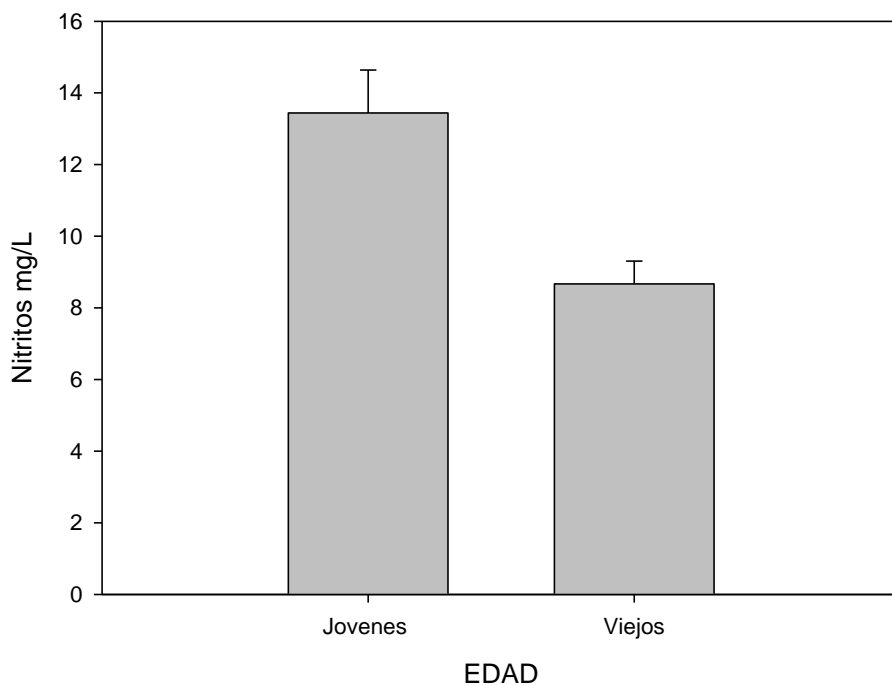


Gráfica 6. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.747$ (ANOVA)

CEPA	MEDIA	ERROR
et/et	0.2236	0.0549
et/+	0.2281	0.0474
+/+	0.1780	0.0382

Cuadro 9. Comparación de medias de las absorbancias de IgM con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante ANOVA sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE NITRITOS EN EL SUERO
DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS CON BASE A SU EDAD;
DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

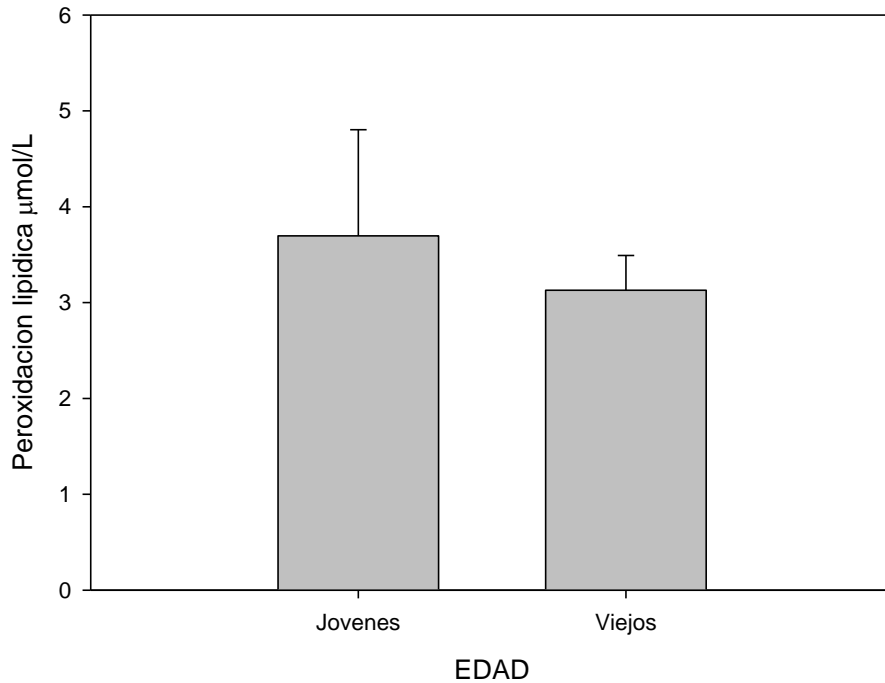


Gráfica 7. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.002$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	13.44	1.1962
Viejos	8.6678	0.6376

Cuadro 10. Comparación de medias de las concentraciones de Nitritos con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student con diferencia significativa ($p<0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN
LIPÍDICA EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS
CON BASE A SU EDAD; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO
DE SODIO**

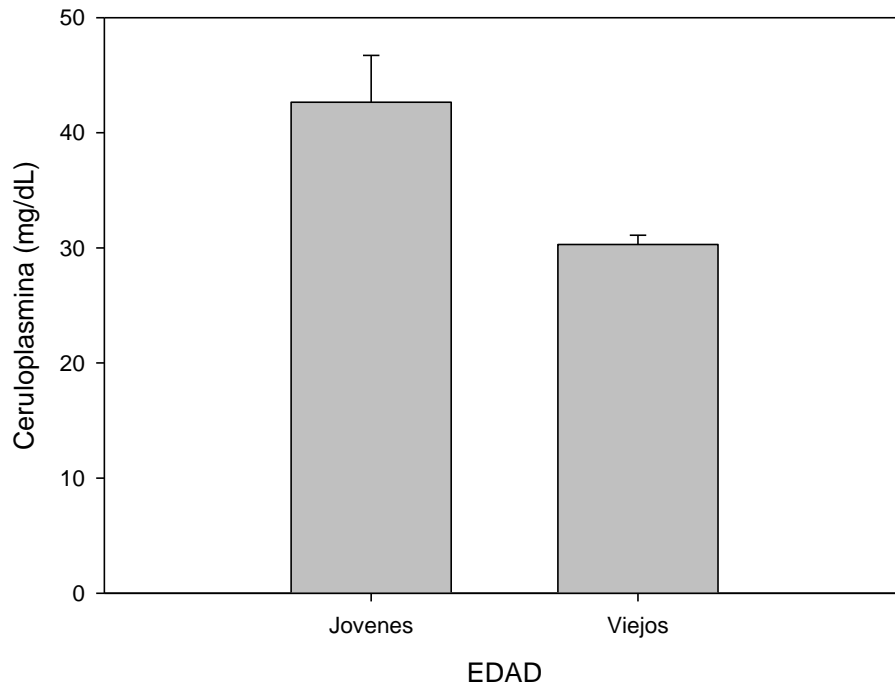


Gráfica 8. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.544$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	3.6960	1.1081
Viejos	3.1282	0.3633

Cuadro 11. Comparación de medias de las concentraciones de Peroxidación lipídica con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE CERULOPLASMINA EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS CON BASE A SU EDAD; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

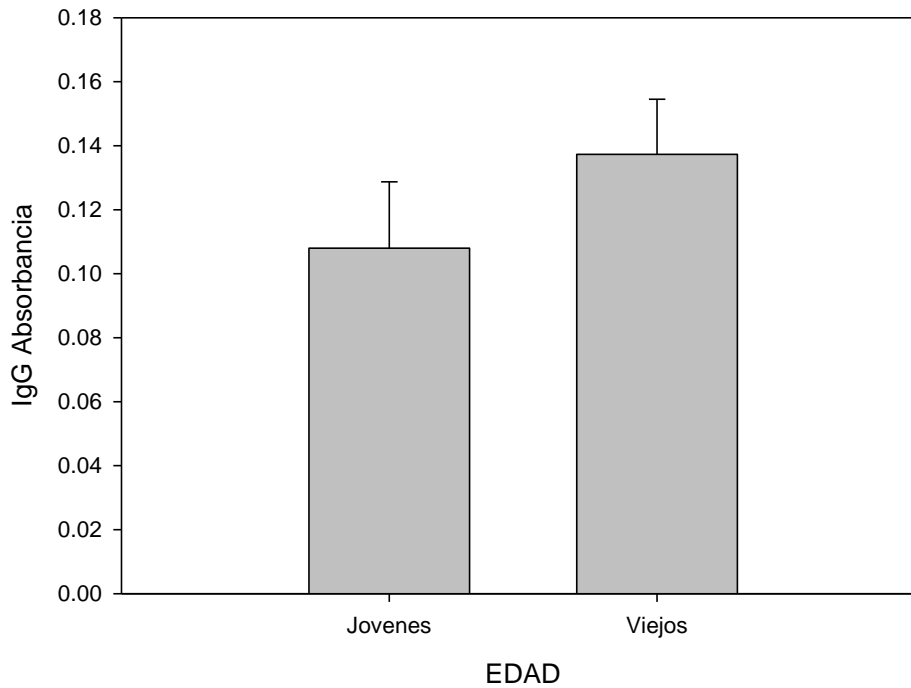


Gráfica 9. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.000$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	42.6600	4.0609
Viejos	30.2870	0.8133

Cuadro 12. Comparación de medias de las concentraciones de Ceruloplasmina con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student con diferencia significativa ($p<0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgG
EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS CON BASE A
SU EDAD; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

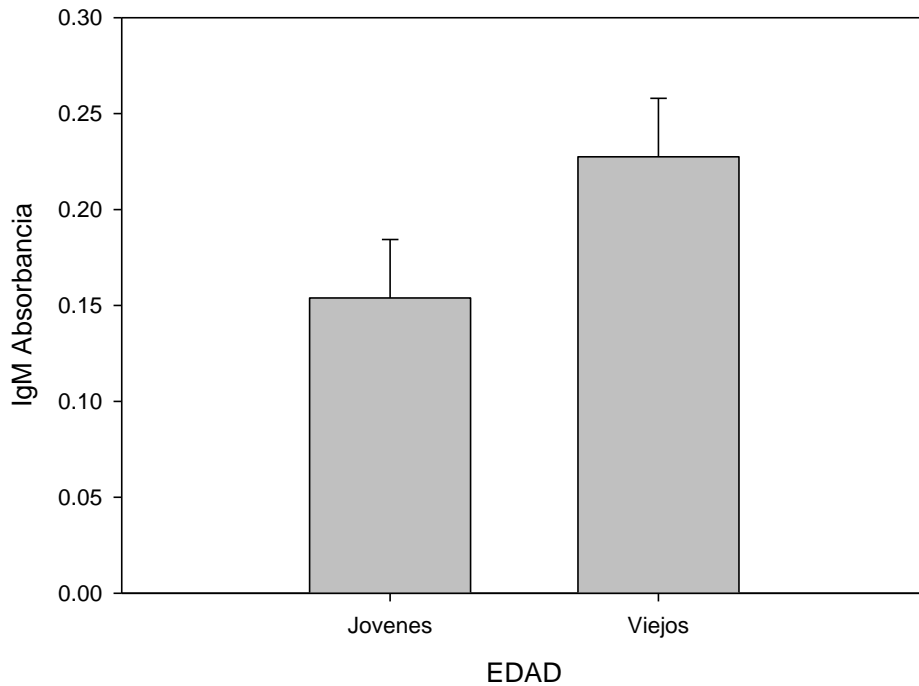


Gráfica 10. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.448$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	0.1080	0.0207
Viejos	0.1373	0.0172

Cuadro 13. Comparación de medias de las absorbancias de IgG con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgM EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS CON BASE A SU EDAD; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

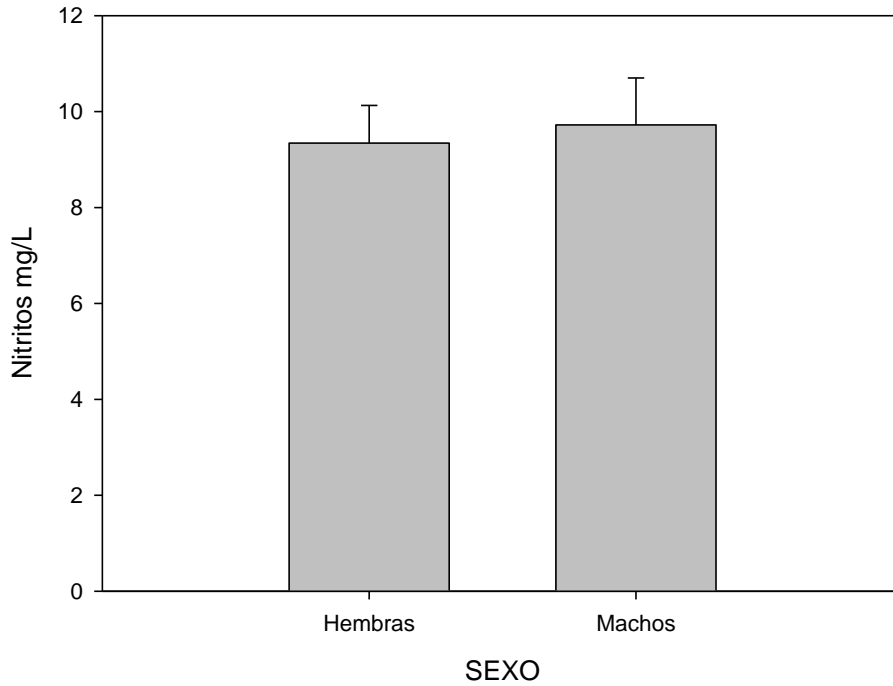


Gráfica 11. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.280$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	0.1539	0.0305
Viejos	0.2275	0.0304

Cuadro 14. Comparación de medias de las absorbancias de IgG con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE NITRITOS EN EL SUERO
DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS CON BASE A SU SEXO;
DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

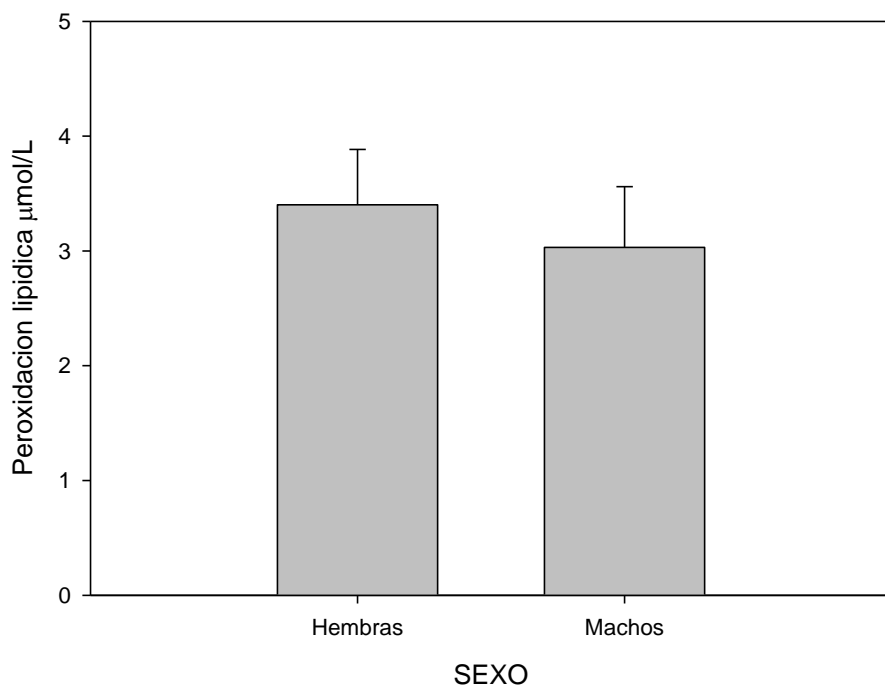


Gráfica 12. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.760$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	9.3433	0.7851
Machos	9.7238	0.9759

Cuadro 15. Comparación de medias de las concentraciones de Nitritos con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACION DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN
LIPÍDICA EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS
CON BASE A SU SEXO; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO
DE SODIO**

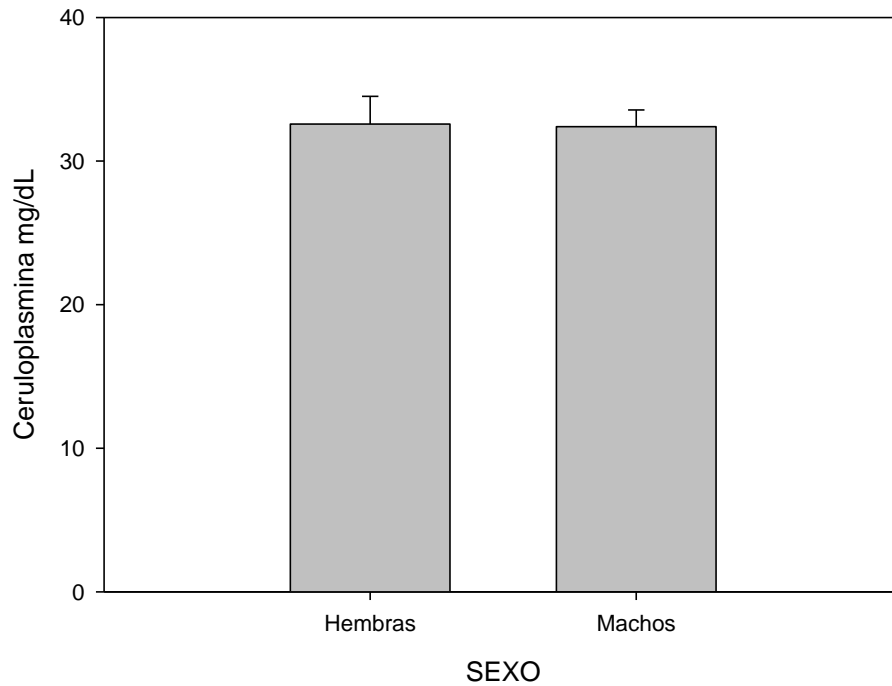


Gráfica 13. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.606$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	3.4016	0.4826
Machos	3.0311	0.5290

Cuadro 16. Comparación de medias de las concentraciones de Peroxidación lipídica con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE CERULOPLASMINA EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS CON BASE A SU SEXO; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

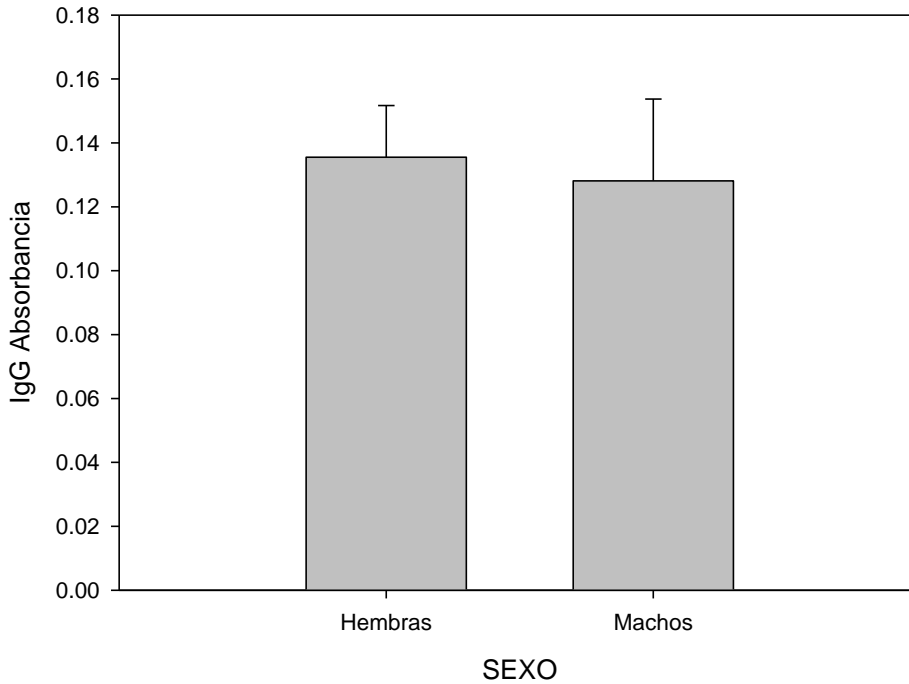


Gráfica 14. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.939$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	32.5800	1.9285
Machos	32.4000	1.1601

Cuadro 17. Comparación de medias de las concentraciones de Ceruloplasmina con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgG EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS CON BASE A SU SEXO; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

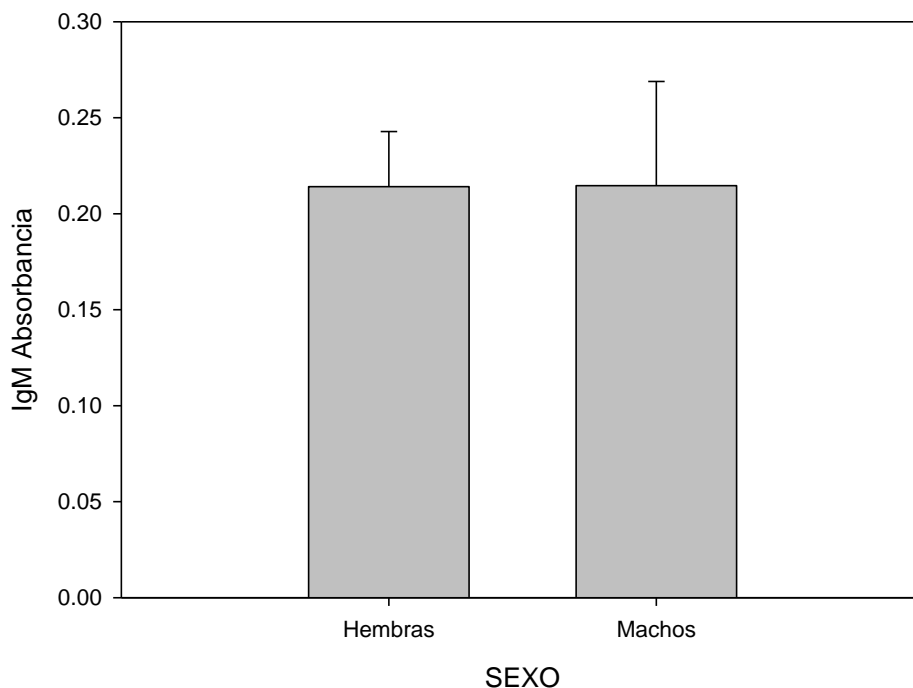


Gráfica 15. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.802$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	0.1355	0.0162
Machos	0.1281	0.0256

Cuadro 18. Comparación de medias de las absorbancias de IgG con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgM EN EL SUERO DE LOS RATONES DE LAS DIFERENTES CEPAS CON BASE A SU SEXO; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

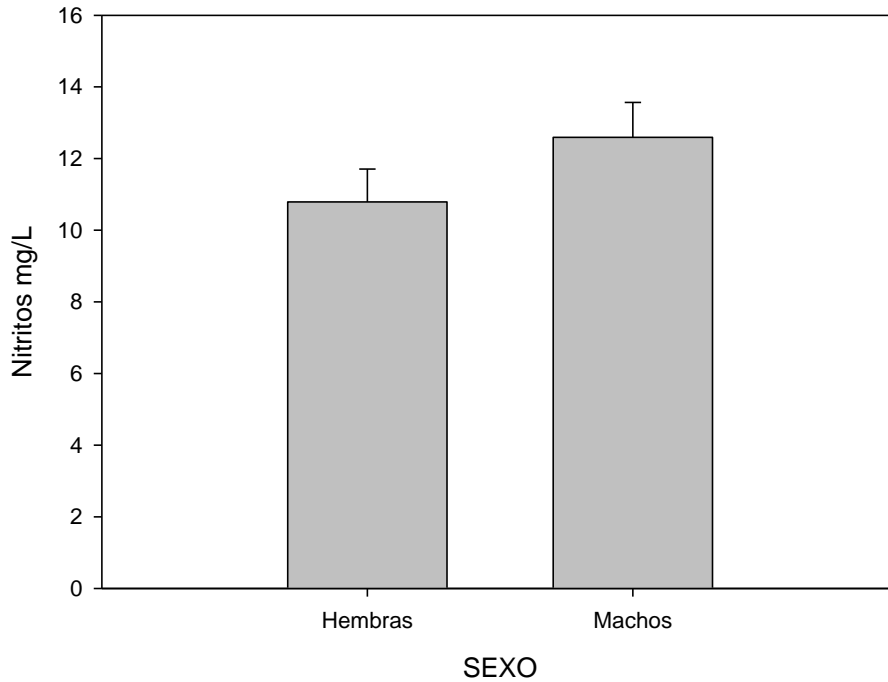


Gráfica 16. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.993$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	0.2141	0.0287
Machos	0.2146	0.0453

Cuadro 19. Comparación de medias de las absorbancias de IgM con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE NITRITOS EN EL SUERO
DE LOS RATONES et/et CON BASE A SU SEXO; DESPUÉS DE LA
ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

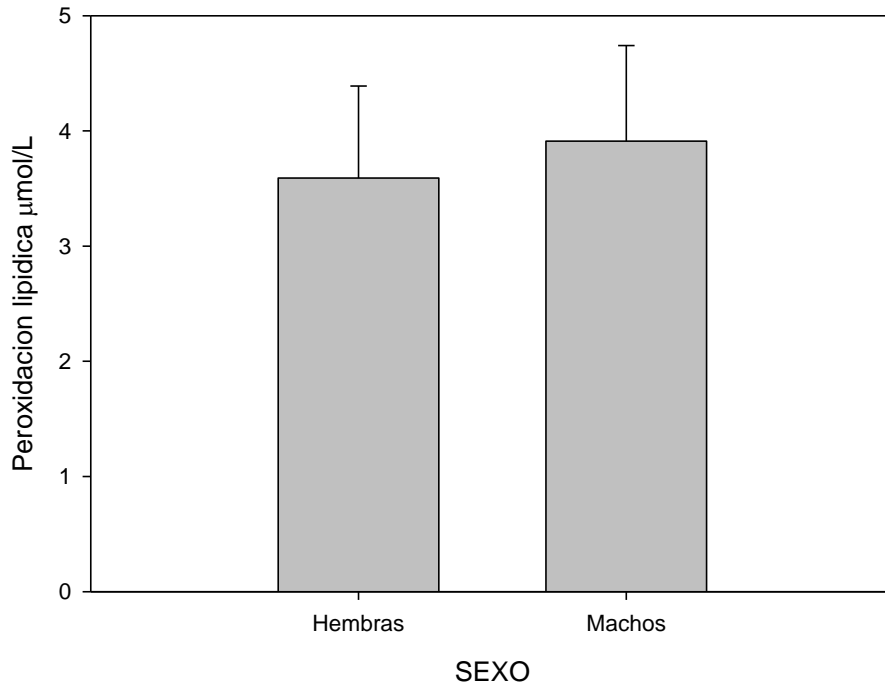


Gráfica 17. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.190$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	10.7929	0.9163
Machos	12.5923	0.9745

Cuadro 20. Comparación de medias de las concentraciones de Nitritos con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACION DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN
LIPIDICA EN EL SUERO DE LOS RATONES et/et CON BASE A SU SEXO;
DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

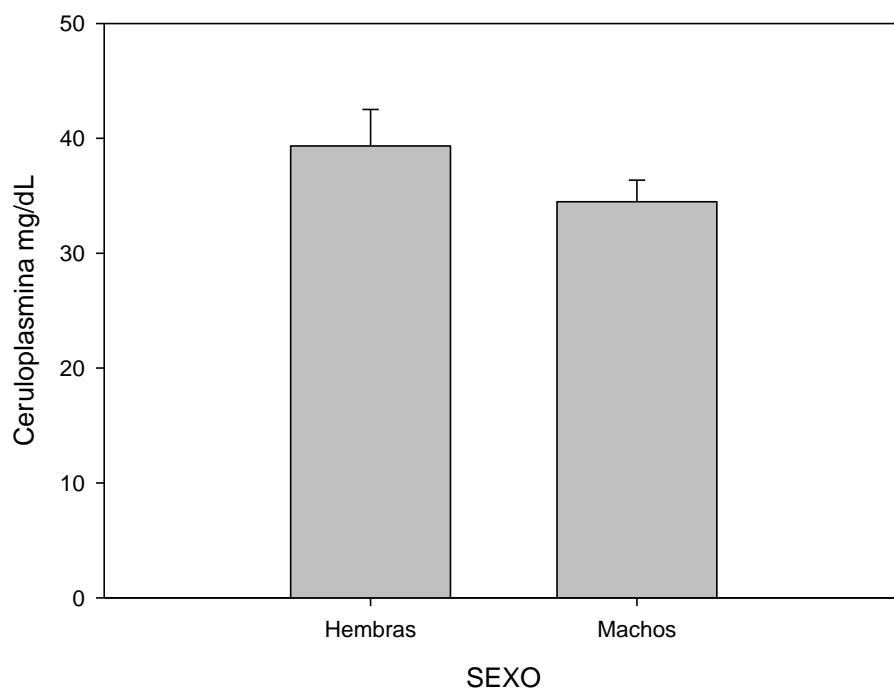


Gráfica 18. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.784$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	3.5907	0.7993
Machos	3.9108	0.8306

Cuadro 21. Comparación de medias de las concentraciones de Peroxidación lipídica con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE CERULOLASMINA EN EL
SUERO DE LOS RATONES *et/et* CON BASE A SU SEXO; DESPUÉS DE LA
ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

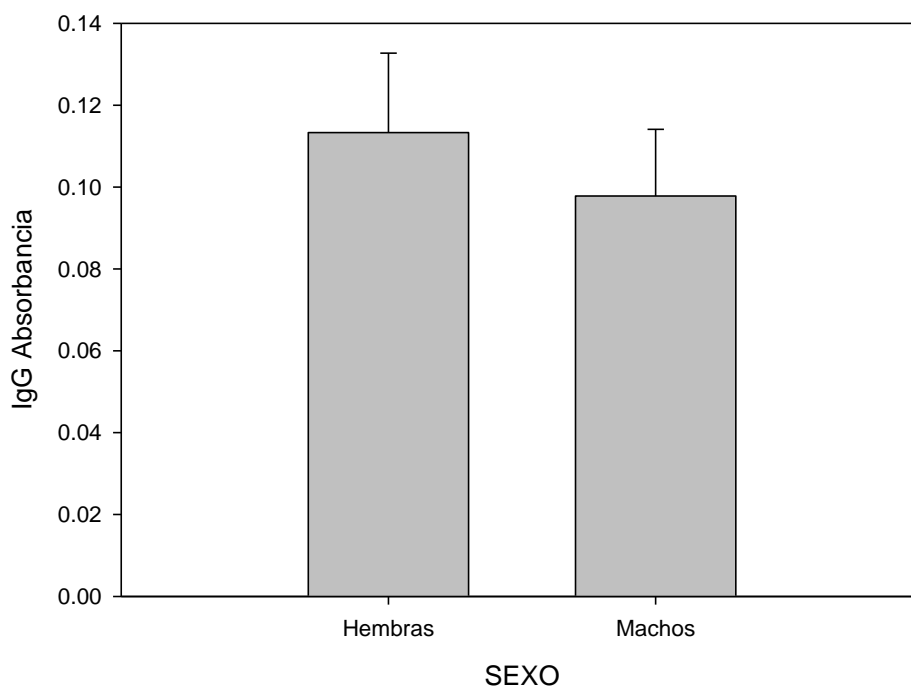


Gráfica 19. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.208$ (*t* de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	39.3429	3.1734
Machos	34.4769	1.8883

Cuadro 22. Comparación de medias de las concentraciones de Ceruloplasmina con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante *t* de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgG
EN EL SUERO DE LOS RATONES et/et CON BASE A SU SEXO; DESPUÉS DE
LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

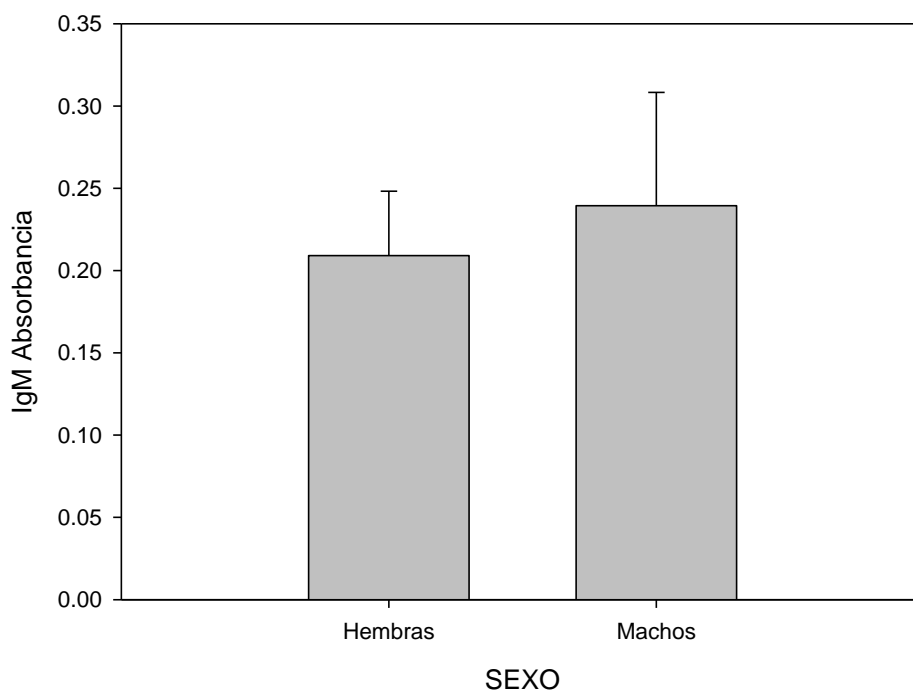


Gráfica 20. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.550$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	0.1133	0.0194
Machos	0.0978	0.0163

Cuadro 23. Comparación de medias de las absorbancias de IgG con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgM
EN EL SUERO DE LOS RATONES et/et CON BASE A SU SEXO; DESPUÉS DE
LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

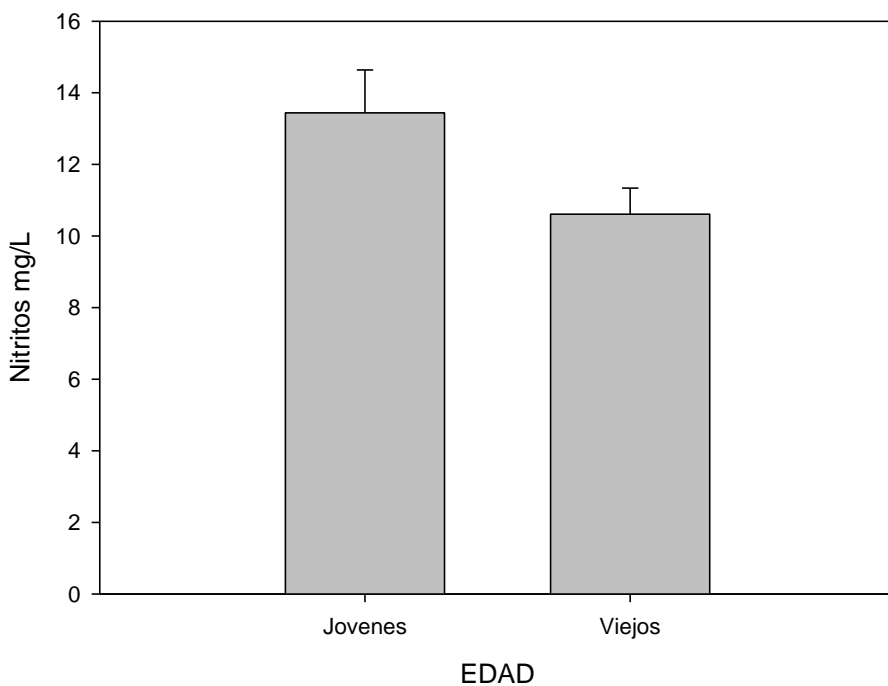


Gráfica 21. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.700$ (t de Student)

SEXO	MEDIA	ERROR
Hembras	0.2091	0.0391
Machos	0.2394	0.0689

Cuadro 24. Comparación de medias de las absorbancias de IgM con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE NITRITOS EN EL SUERO
DE LOS RATONES et/et CON BASE A SU EDAD; DESPUÉS DE LA
ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

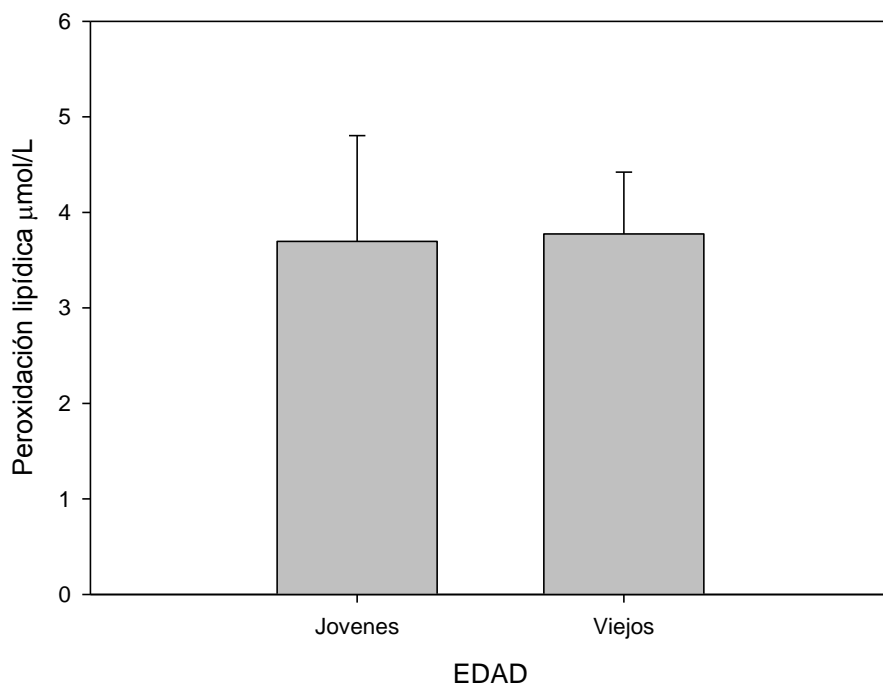


Gráfica 22. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.041$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	13.4400	1.1962
Viejos	10.6118	0.7267

Cuadro 25. Comparación de medias de las concentraciones de Nitritos con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student con diferencia significativa ($p<0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE PEROXIDACIÓN
LIPÍDICA EN EL SUERO DE LOS RATONES et/et CON BASE A SU EDAD;
DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**

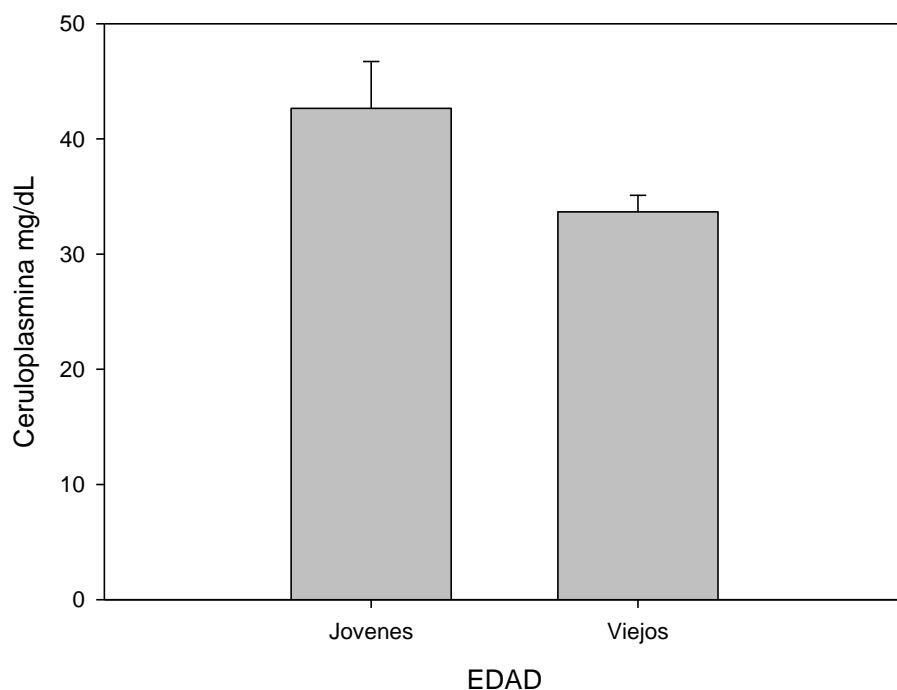


Gráfica 23. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.949$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	3.6960	1.1084
Viejos	3.7735	0.6473

Cuadro 26. Comparación de medias de las concentraciones de Peroxidación lipídica con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LOS NIVELES DE CERULOPLASMINA EN EL SUERO DE LOS RATONES *et/et* CON BASE A SU EDAD; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

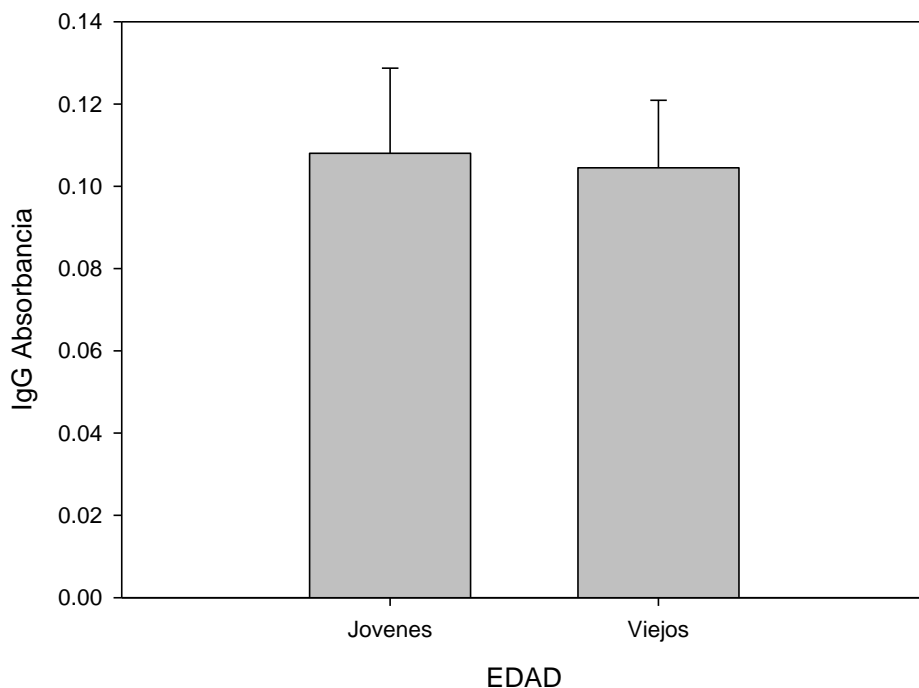


Gráfica 24. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.019$ (*t* de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	42.6600	4.0609
Viejos	33.6706	1.4294

Cuadro 27. Comparación de medias de las concentraciones de Ceruloplasmina con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante *t* de Student con diferencia significativa ($p<0.05$), con una confianza del 95%.

COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgG EN EL SUERO DE LOS RATONES et/et CON BASE A SU EDAD; DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO

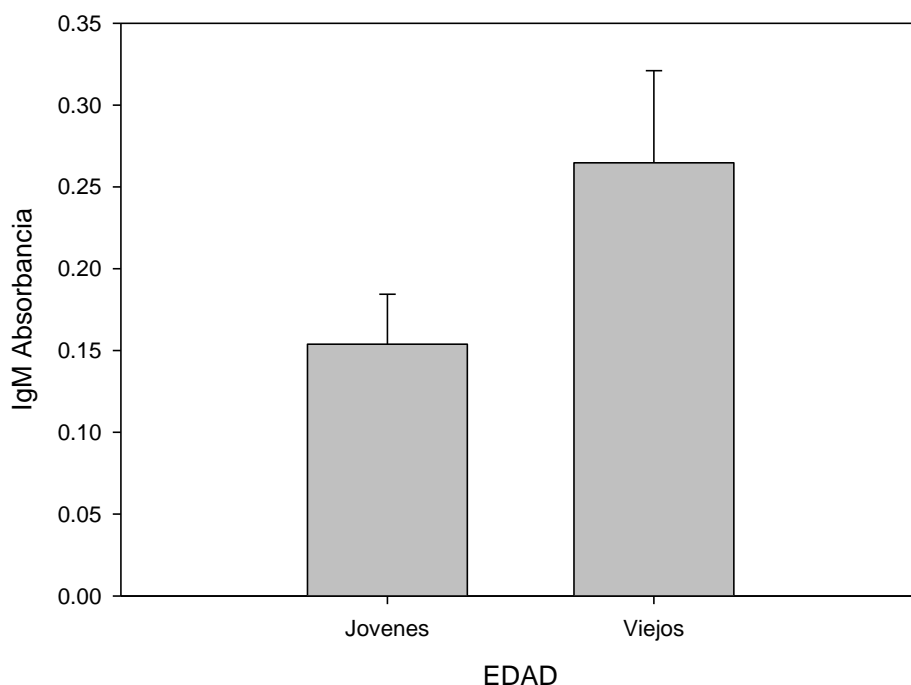


Gráfica 25. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.897$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	0.1080	0.0207
Viejos	0.1045	0.0164

Cuadro 28. Comparación de medias de las absorbancias de IgG con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

**COMPARACIÓN DE MEDIAS DE LAS ABSORBANCIAS OBTENIDAS DE IgM
EN EL SUERO DE LOS RATONES et/et CON BASE A SU EDAD; DESPUÉS DE
LA ADMINISTRACIÓN DE SELENITO DE SODIO**



Gráfica 26. Medias \pm error estándar. Administración de selenito de sodio $P= 0.166$ (t de Student)

EDAD	MEDIA	ERROR
Jóvenes	0.1539	0.0305
Viejos	0.2647	0.0563

Cuadro 29. Comparación de medias de las absorbancias de IgG con respecto a la administración de selenito de sodio, analizados mediante t de Student sin diferencia significativa ($p>0.05$), con una confianza del 95%.

11. ANÁLISIS DE RESULTADOS

De acuerdo a la hipótesis planteada, se logro comprobar que el selenito de sodio indujo cataratas visibles en sólo el 11.1 % de los ratones et/et tal y como se puede observar en la figura 12; el 14.8% presento inflamación, (figura 10) 14.8% leucoma (figura 11) etapas que podrían ser previas a la aparición de las cataratas; ya que esta puede desarrollarse en el ojo después de una lesión, inflamación o alguna otra enfermedad ocular.¹¹ 3.7% perdieron el ojo (figura 13); con respecto a la cepa et/+ y +/+ el 100% no presento alteración ocular visible (Figura 8). Todos estos datos se pueden observar representados en la gráfica 1.

Se sabe que los compuestos de selenio, especialmente el selenito de sodio puede mostrar propiedades toxicas. En animales la dosis mínima letal por administración intravenosa de selenito de sodio es de entre 1.5 y 3 mg/Kg; en los humanos la dosis mínima letal parece ser similar a la de los animales. La toxicidad de los compuestos de selenio en especial del selenito de sodio se considera que está relacionado con sus propiedades pro-oxidantes esto quiere decir la capacidad que tiene esta sustancia de producir subproductos del oxígeno que pueden dañar a las células.³⁵

Con los datos obtenidos con base en la comparación de las diferentes cepas se obtuvo que la cepa et/et presento diferencia significativa en los niveles de nitritos; (Grafica 2) con lo cual podemos deducir que al administrar el selenito de sodio se elevaron las concentraciones de este compuesto en un mayor nivel en la cepa et/et comparándolo con la cepa et/t y t/t según lo planteado en la hipótesis. Esto como respuesta a algún daño oxidativo ya que se sabe que el oxido nítrico (NO) participa en diferentes procesos fisiológicos y patológicos, incluyendo las enfermedades oculares; entre las que se ha descrito su implicación en las cataratas.²² La posible actividad adversa o de citotoxicidad del NO se explican a través de procesos químicos como la reacción con intermediarios reactivos del oxígeno y la formación de peroxinitritos.³⁶

También se obtuvieron datos significativos cuando se compararon los niveles de nitritos con base en su edad tanto entre cepas como entre la cepa et/et, (gráfica 7 y 22

respectivamente) con lo cual se puede observar que a menor edad mayor daño oxidativo causado a través de la reacción del óxido nítrico con las especies reactivas de oxígeno.

En lo que se refiere a los datos obtenidos de ceruloplasmina se encontró diferencia significativa en la cepa et/et (gráfica 4) esto debido a que la ceruloplasmina es una proteína de fase aguda que se incrementa durante procesos inflamatorios e infección en los tejidos.

²⁶ Con lo ya mencionado se establece que al administrar el selenito de sodio se presentó mayor proceso inflamatorio en la cepa et/et con el consecuente aumento en la concentración de la ceruloplasmina. En donde también se observó diferencia significativa en la concentración de ceruloplasmina fue al comparar las diferentes cepas y la cepa et/et en base a su edad (Gráfica 9 y 24 respectivamente) con lo cual se observa que los niveles de esta proteína se ven aumentados en edades tempranas y que decrecen con el aumento de la edad, Esto probablemente sea debido a que se ha reportado que con la edad disminuyen los antioxidantes y la ceruloplasmina tiene actividad antioxidante muy importante.

En las determinaciones de peroxidación lipídica y anticuerpos (IgG e IgM) en ninguno de los casos se encontró alguna diferencia significativa. Cabe mencionar que al no encontrar niveles significativos de peroxidación lipídica entre la cepa et/et y las demás; así como en comparación con la edad puede deberse a que la ceruloplasmina es una proteína multifuncional. La función que la misma cumpla dependerá de los cambios en las condiciones fisiológicas y patológicas presentes en el organismo frente a una situación determinada. Aunque su aumento después de procesos inflamatorios y traumáticos se usó para clasificarla como proteína de fase aguda, su función fisiológica puede ser amplia y variada. Además de participar en la homeostasis del hierro, se le reconocen propiedades antioxidantes contra la peroxidación lipídica.³⁷ Por lo cual al aumentar los niveles de ceruloplasmina en los grupos antes mencionados se pudo inhibir la peroxidación lipídica en los mismos.

12. CONCLUSIONES

- Por lo tanto, se concluye, que al administrar selenito de sodio la cepa et/et presenta mayor susceptibilidad de presentar alteraciones oculares (entre ellas cataratas) en comparación con las cepas et/+ y +/+
- Se logro determinar que la cepa et/et presenta mayor concentración de nitritos después de administrar el selenito de sodio y se establece con esto la presencia de mayor estrés oxidativo en dicha cepa; también se logro identificar con los datos obtenidos que a menor edad mayor daño oxidativo
- Se logro determinar que la cepa et/et presenta mayores niveles de ceruloplasmina, con lo cual se logra establecer la participación de un proceso inflamatorio después de la administración de selenito de sodio; también se establece que los niveles de este antioxidante aumentan en edades tempranas y decrecen a mayor edad.
- Se logro establecer que no hay diferencia significativa entre cepas en la identificación de anticuerpos anti proteínas uveitogénicas; así como en los niveles de peroxidación lipídica, después de la administración de selenito de sodio.

13. ANEXOS

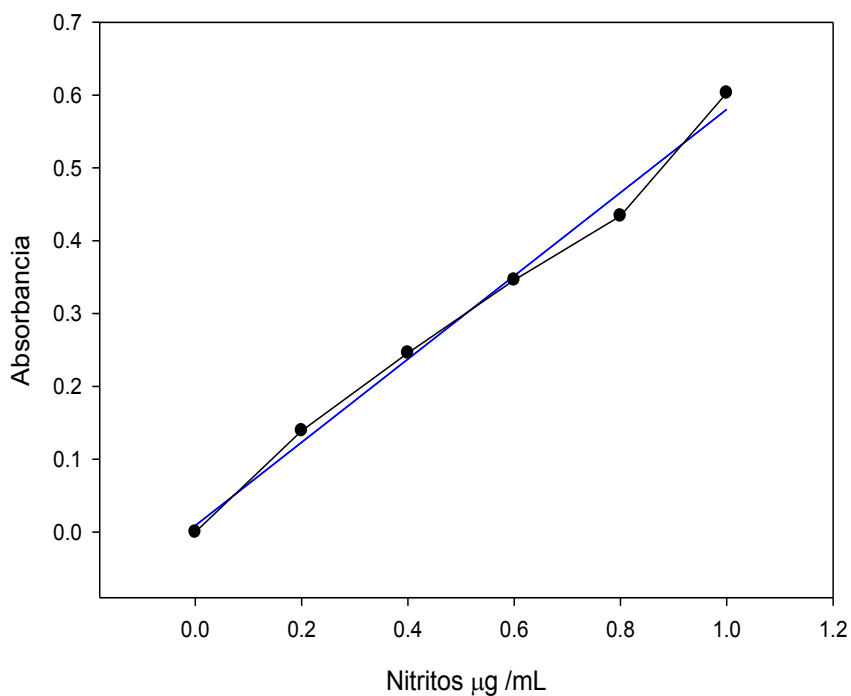
ANEXO I

CUADROS Y GRAFICAS DE CURVAS ESTANDAR

Determinación de nitritos por el método de Griess

Tubo	Estándar (μL)	Agua destilada (μL)	Absorbancia	Concentración ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
1	0	900	0	0.0
2	100	800	0.139	0.2
3	200	700	0.246	0.4
4	300	600	0.346	0.6
5	400	500	0.434	0.8
6	500	200	0.603	1

Cuadro 30. Curva estándar para la determinación de nitritos. Concentración del estándar $200 \mu\text{g}/\text{mL}$ de Nitrito de sodio

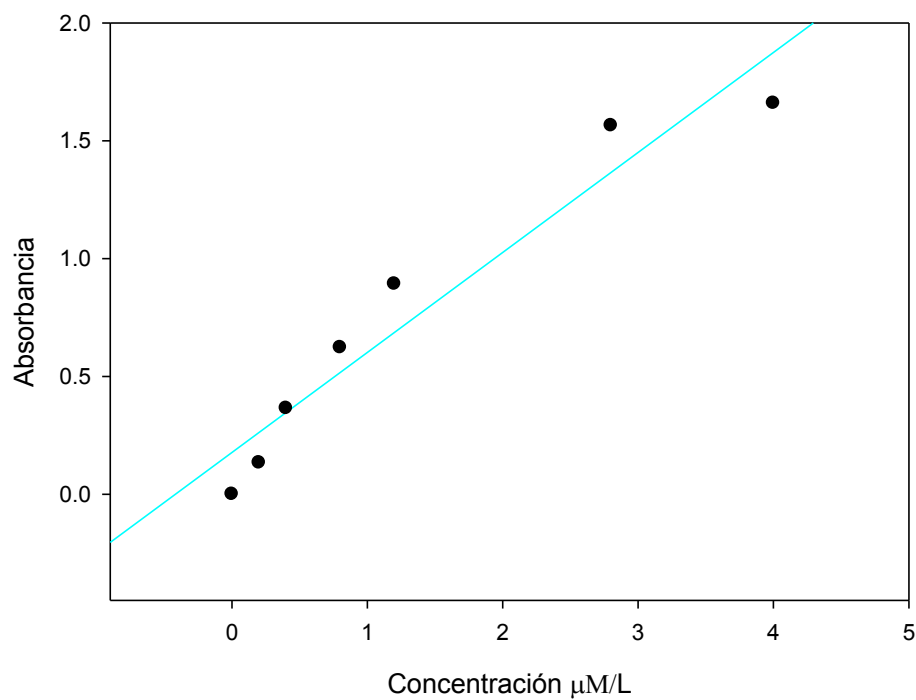


Gráfica 27. Curva estándar de nitritos

Determinación de peroxidación lipídica (MDA). Método de TBA (ácido tiobarbitúrico)

Tubo	TMP (μL)	H ₃ PO ₄ (μL)	TBA (μL)	H ₂ O (μL)	Abs.	MDA ($\mu\text{M/L}$)
1	0	600	200	200	0	0
2	5	600	200	200	0.133	0.2
3	10	600	200	198	0.364	0.4
4	20	600	200	196	0.622	0.8
5	30	600	200	194	0.892	1.2
6	70	600	200	186	1.564	2.8
7	100	600	200	180	1.659	4.0

Cuadro 31. Concentraciones para la curva estándar de MDA para peroxidación lipídica

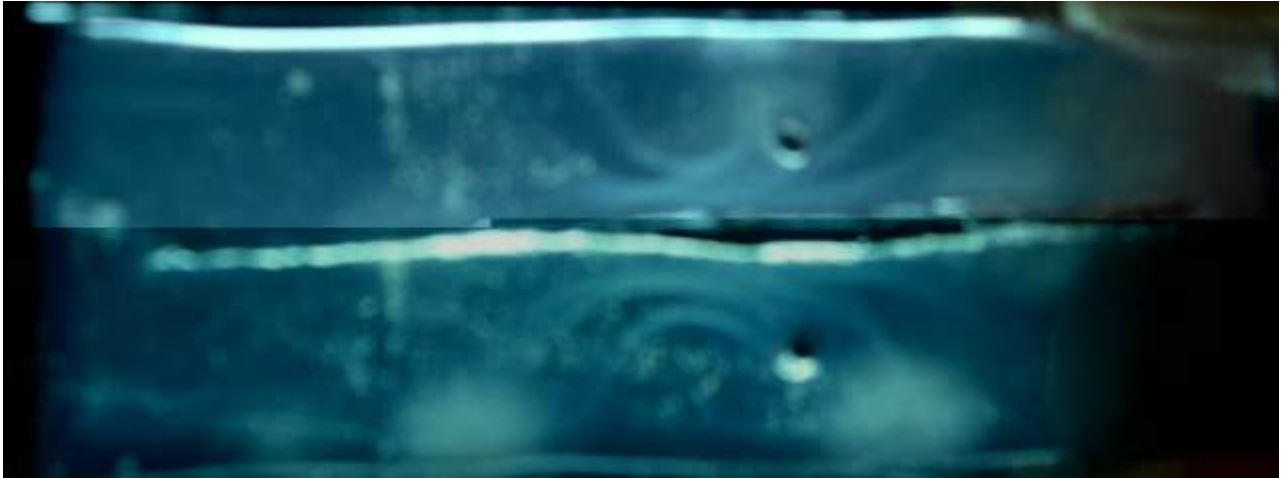


Gráfica 28. Curva estándar de peroxidación lipídica (MDA)

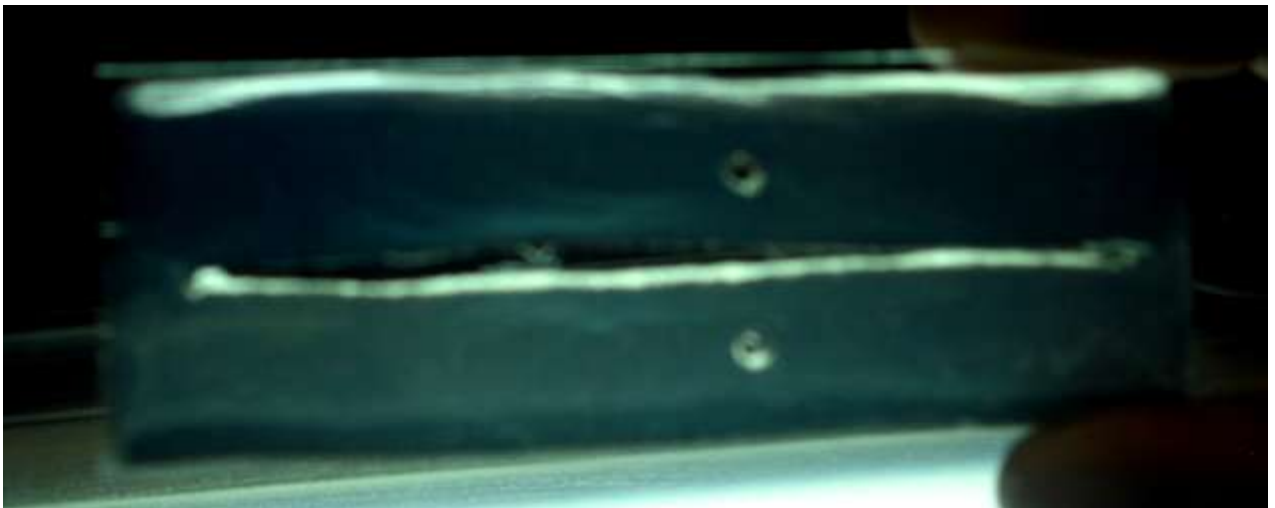
ANEXO II

PURIFICACIÓN DEL SUERO ANTI-CERULOPLASMINA DE RATÓN

- Placa de la inmunoelectroforesis antes de la inmunoadsorción (purificación)



- Placa de la inmunoelectroforesis después de la inmunoadsorción (purificación)



14. REFERENCIAS

1. Sakthivel M, Elanchezhian R, Ramesh E, Isai M, Jesudasan CN, Thomas PA, et al. Prevention of selenite-induced cataractogenesis in Wistar rats by the polyphenol, ellagic acid. *Exp Eye Res* 2008;86:251–9
2. Abraham A, Condon N, Gower E. The New Epidemiology of Cataract. *Ophthalmol Clin* 2006;19:415–425
3. Gaceta de Comunicación Interna de la Secretaria de Salud. Atenderá el Seguro Popular las enfermedades visuales que más afectan a los mexicanos. D.F. [México]: Salud, 2005;34: 3
4. Meléndez MA, Buendía M, Ramos D, Cardona P, Eugenia MA. Study of the Anti-Inflammatory Effect of *Sedum praealtum* (Siempreviva) in the Rat: Dose-Dependent Response. *Proc. West. Pharmacol. Soc* 2002;45:29-130
5. Smith M, et al. Ciencias básicas, refracción y anatomía patológica. Barcelona: Editorial Elsevier Science, 2003:21-22
6. Fernández J, Alañon FJ, Ferreiro S. Oftalmología en Atención Primaria. Alcala la Real: Editorial Formación Alcala, 2003: 11-28
7. Abbas A, Litchman A, Pillai S. Inmunología Celular y Molecular. 6ª edición. Barcelona: Editorial Elsevier, 2008:3-5
8. Niederkorn JY, Kaplan HJ. Immune Response and the Eye. *Chem Immunol Allergy*. Basel 2007;92:36–49
9. Vinson JA Review Oxidative stress in cataracts. *Pathophysiology* 2006;13:151–162
10. Pirie A. Color and solubility of the proteins of human cataracts. *Investigative Ophthalmology* 1968;7: 634-50
11. World Health Organization. 2009; [En línea]. Disponible en URL:<http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index1.html> Consultado Septiembre 22, 2009
12. Resnikoff S, Pascolini D, Etya'ale D, Kocur I, Pararajasegaram R, Pokharel GP, et al. Global data on visual impairment in the year 2002. *Bulletin of the World Health Organization* 2004;82:844-51
13. Asbell P, Duelan L, Mindel J, Brocks D, Ahmad M, Epstein S. Age-related cataract. *Lancet* 2005;365:599–609

14. Ferrer Y, Martínez G, Leroy D, Thndiwe N. El estrés oxidativo y su impacto en las cataratas. *Revista Cubana de Farmacia* 2009;43:1-11
15. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. *Rev Cubana Med Milit* 2001;30:36-44
16. Marroquín R, Lara MA, Calvillo R, Garcia MM, Castro ME, Mora JL, et al. Exocrinopatía mostrada en el ratón hipotímico *cd1 et/et* que semeja el síndrome de Sjögren. *Vet. Mex.* 2003;34:129-41
17. Ainsbury E, Bouffler S, Doerr W, Graw J, Muirhead C, Edwards A, et al. Radiation Cataractogenesis: A Review of Recent Studies. *Radiation Research* 2009;172:1-9
18. Shearer TR, Ma H, Fukiage C, Azuma M. Selenite nuclear cataract: review of the model. *Mol Vis.* 1997;3:8
19. Ishida H, Mitamura T, Takahashi Y, Hisotomi A, Fukuhara Y, Murato K, et al. Cataract development induced by repeated oral dosing with FK 506 (Tacrolimus) in adult rats. *Toxicology* 1997;123:167-75
20. Ajani E, Salako A, Sharlie P, Akinleye W, Adeoye A, Salau B, et al. Chemopreventive and remediation effect of *Hydrocotyl bonariensis* Comm. Ex Lam (Apiaceae) leave extract in galactose-induced cataract. *Journal of Ethnopharmacology* 2009;123:134-42
21. Wolf N, Pendergrass W, Singh N, Swisshelm K, Schwartz J. Radiation cataracts: mechanisms involved in their long delayed occurrence but then rapid progression. *Molecular Vision* 2007;14:274-85
22. Zanon M, Gallego P, García M, Pinazo D. Involvement of nitric oxide and other molecule with redox potential in primary open angle glaucoma *Arch Soc Esp Oftalmol* 2008;83:365-372
23. Pérez CG. Evaluación de la actividad fagocítica y radicales libres de dos extractos de Barreta (*Helietta parvifolia*) en un modelo de ratas. Tesis experimental. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.; 2009: 21- 23, 35-38.
24. Lira V., Arredondo R. Óxido nítrico: un héroe disfrazado de villano. *Revista elemento, ciencia y cultura* 2004;11:11-17
25. Xining E, Hahn P, Jared I, Wong R, Rey C, et al. Iron homeostasis and toxicity in retinal degeneration *Prog Retin Eye Res.* 2007;26:649-673

26. Banha J, Marques L, Oliveira R, Martins M, Paixão E, Pereira D, et al. Ceruloplasmin expression by human peripheral blood lymphocytes: A new link between immunity and iron metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008;44:483-492
27. Teijón JM., Garrido A. *Fundamentos de bioquímica estructural*. Madrid: Editorial Tébar; 2006:169.
28. Borchman D. Giblin FJ, Leverenz VR, Reddy VN, Lin LR, Yappert MC, et al. Impact of aging and hyperbaric oxygen in vivo on guinea pig lens lipids and nuclear light scatter. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci*. 2000;41: 3061-73
29. Babizhayev MA. Analysis of Lipid Peroxidation and Electron Microscopic Survey of Maturation Stages during Human Cataractogenesis. *Pharmacokinetic Assay of Can-C N-Acetylcarnosine Prodrug Lubricant Eye Drops for Cataract Prevention*. *Drugs R D*. 2005;6: 345-69
30. Montero MF. Análisis de la composición bioquímica y de posibles biomarcadores de contaminación en el erizo de mar, *Paracentrotus lividus*, Lmk. Tesis de doctorado. Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela; 2000:57, 58.
31. Rojas –Espinosa. *Inmunología de memoria*. 3ª edición .Distrito Federal. Editorial panamericana, 2006:228-230
32. Wacker B, Donoso L, Kalsonw C, Yankeelov J, Organisciak D. Experimental allergic uveítis: isolation, characterization and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J. Immunol*. 1977;119:1949
33. Lowry O. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem*. 1951;193:265-275
34. Boudet F, Theze J, Zovali M. UV-treated polystyrene microtitre plates for use in an ELISA to measure antibodies against synthetic peptides. *J. Immunol Methods*.1991;142:73-82
35. Forceville X, Laviolle B, Annane D, Vitoux D, Bleichner G, et al. Effects of high doses of selenium, as sodium selenite, in septic shock: a placebo-controlled, randomized, double-blind, phase II study. *Critical Care*; 2007;11:1-10

36. Viant F, Fonseca CJ, García R, Martínez P. Óxido nítrico. importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. *Medisan* 1998;2:45-53
37. Yapur V, Bustos M, González A, Negri G. Ceruloplasmin: measurement of serum ferroxidase activity. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2007;41: 347-51