



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DEL SELENITO DE SODIO EN LA MADURACIÓN DEL
CRISTALINO EN RATONES ET/ET QUE DESARROLLAN
EXOOCRINOPATÍA.**

TESIS

**QUE PARA OBTENER
EL TÍTULO DE:**

QUÍMICA FARMACEUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

HERNÁNDEZ ORTEGA MARYCRUZ

DIRECTOR DE TESIS: Dr. Rubén Marroquín Segura

ASESOR DE TESIS: M.C. Maurilio Flores Pimentel

MÉXICO, D.F.

FEBRERO, 2014





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.

AGRADECIMIENTOS

A mi madre por su comprensión, paciencia y apoyo incondicional en todo momento.
Por hacer de mi la mujer que soy y sobre todo por el amor infinito que me da día con día.

A mi padre por que a pesar de ya no estar aquí, con su amor e historias ayudo a forjar a la
mujer que soy ahora.

A mis hermanos por sus platicas diarias y hacer esta vida divertida. Tere, Raúl muchas gracias
por ser las personas que son conmigo y por representar para mi la mejor familia del mundo.

A la Sra. Luzvina, Sr. Eduardo, Ximena, Diego, Mariana por ser una segunda familia para mi,
por su apoyo incondicional y convertirse en una parte fundamental de mi vida.

A Elisa Garduño y Norma Angélica Vargas por ser las mejores amigas que alguien pueda tener,
por formar parte de mi vida, por su calidad humana, sencillez y apoyo incondicional en todo
momento.

A Lalo por ser el complice de todos mis sueños y apoyo fundamental para llevarlos a cabo, por
su perseverancia, paciencia y por el amor que me tiene.

A Sebastián por ser el motor de mis días, por sus sonrisas, por sus interminables platicas
inintendibles, por ser mi hijo.

AGRADECIMIENTOS

A la Mtra. Araceli García del Valle por su dedicación en la revisión y corrección de esta tesis.

Al Dr. Maurilio Flores Pimentel por compartir sus conocimientos en el manejo de animales, y ayudar a la búsqueda de información de esta tesis.

Al Dr. José Luis Alfredo Mora Guevara por compartir sus conocimientos en estadística que fueron fundamentales en el análisis de resultados de esta tesis.

Al Dr. Rubén Marroquín Segura por creer en mí, por su paciencia interminable, apoyo incondicional y sobre todo por todos los buenos momentos pasados en el laboratorio.

A mi casa la FES Zaragoza y a la UNAM.

Hay un único lugar donde ayer y hoy se encuentran y se reconocen y se abrazan.
Ese lugar es mañana.

Eduardo Galeano

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
INTRODUCCIÓN.....	3
MARCO TEÓRICO.....	4
EMBRIOLOGÍA.....	6
RATON ET/ET.....	23
FUNDAMENTOS DE TÉCNICAS.....	23
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
OBJETIVOS.....	28
HIPÓTESIS.....	29
DIAGRAMA DE FLUJO.....	30
MÉTODO.....	31
RESULTADOS.....	35
CONCLUSIONES.....	48
ANEXOS.....	49
REFERENCIAS.....	50

1. RESUMEN.

En el presente trabajo se determinó el efecto del selenito de sodio en la maduración del cristalino en ratones et/et que desarrollan exocrinopatía. Se determinaron los niveles de nitritos mediante el método de Griess, ceruloplasmina por el método de inmunodifusión radial y PCR por el método de inmunoprecipitación y pesaron el riñón, hígado y bazo. Observando como resultado que el 16.70% de los ratones et/et desarrolla cataratas, el 23% leucoma, el 20% inflamación, el 3.30% perdió el ojo y el 36.7% no presentó alteración ocular alguna, los ratones et/+ y CD1 no mostraron ninguna alteración. Al analizar los resultados se muestra que los niveles de nitritos no mostraron diferencia significativa entre las cepas y los de ceruloplasmina en los ratones et/et mostraron la menor cantidad logrando determinar que las cataratas inducidas fueron corticales y que a temprana edad el cristalino tiene la capacidad para restaurar el daño oxidativo así como restablecer las alteraciones fisiológicas, además el peso de los órganos sugiere que el daño oxidativo no solo se puede restaurar a nivel ocular si no a nivel organismo ya que la cantidad de antioxidantes es alta a edades tempranas y el selenito puede ser reducido a selenio elemental y tener actividad biológica a través de GSH-Px. Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo se concluye que el selenito de sodio tiene un efecto caratogénico poco eficaz en ratones et/et a edades tempranas por lo cual no se podría ocupar como método de inducción de cataratas para evaluar diversos compuestos orgánicos con propiedades anticaratogénicas.

2. INTRODUCCIÓN.

El término cataratas hace referencia a la opacificación del cristalino, la cual representa un serio problema en el anciano, con una incidencia aproximada del 25 % en la población mayor de 65 años y alrededor del 50% en los mayores de 80 años. Esta situación es particularmente seria en los países en desarrollo, donde 17 millones de personas están ciegas por esa causa, un problema que crece a medida que la población envejece¹. En nuestro país las cataratas son responsables del 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 100 mil mexicanos se les diagnostica esta enfermedad². Se han identificado varios factores predisponentes para explicar la génesis de las cataratas seniles. Mientras es quizás un proceso multifactorial, en años recientes se ha sugerido que los radicales libres están incluidos en este proceso. Las cataratas se originan por modificaciones en la uniformidad de la densidad proteica del cristalino que producen cambios en su índice de refracción y que se manifiesta por opacidad. Los eventos bioquímicos que llevan a estas modificaciones no se entienden bien todavía, pero varios investigadores han encontrado que en este trastorno se incrementan las proteínas insolubles y que el proceso de insolubilización se acelera. Parece ser que la insolubilidad es producida por la formación de enlaces covalentes como resultado de la oxidación de las proteínas³. En el presente, el único remedio para las cataratas es la remoción quirúrgica y su sustitución con un cristalino claro hecho de un polímero sintético. Sin embargo, la mitad de los pacientes en lista de espera para esta operación muere antes de llevarse a cabo la cirugía. En los Estados Unidos se realizan cerca de 1.2 millones operaciones de cataratas al año con un costo de 3.4 billones de dólares. En los países en vías de desarrollo simplemente no hay un número suficiente de cirugías de cataratas. Además de los significantes costos de operación y las posibles complicaciones, un cristalino artificial no tiene las mismas cualidades ópticas que uno normal⁴.

Esta es la razón por lo cual se requiere urgentemente soluciones bioquímicas o la intervención farmacológica para poder mantener la transparencia del cristalino; se estima que un retraso de cerca de 10 años en la formación de las cataratas, puede reducir la prevalencia de las cataratas discapacitantes de la visión en un 45%. Un retraso puede mejorar la calidad de vida para la población anciana y diabética y sustancialmente disminuir la carga económica y deshabilitar la cirugía de catarata⁵.

3. MARCO TEÓRICO.

3.1 Catarata.

La catarata es una afección que consiste en la opacificación del cristalino, una "lente natural" del ojo que permite enfocar los objetos próximos y lejanos. Cuando el cristalino pierde su transparencia, impide el correcto paso de los rayos de luz al interior del ojo dando lugar a una imagen borrosa.⁶



Fig. 1. En la imagen se muestra la vista sin cataratas y con cataratas.

Existen 3 tipos de cataratas; Nuclear, Cortical, Subcapsular.

3.2 Nuclear.

Opacificación central del cristalino con cambios en su coloración, dando un aspecto opalescente o brunecente según el grado de evolución de la misma. Con la edad, los cambios químicos de las proteínas del cristalino y la alteración de sus fibras, endurecen el cristalino (esclerosis nuclear), reducen su transparencia y cambian su coloración (de amarillento a marrón) y también su índice de refracción (el ojo se "miopiza", por lo que se puede ver mejor de cerca que de lejos).

Este tipo de catarata tiende a progresar lentamente y afecta más la visión a distancia que la de cerca.

3.3 Cortical.

Es causada por cambios en la hidratación y la composición iónica de las fibras de la corteza del cristalino.

La opacidad cortical puede ser central o periférica, por lo que las personas que tienen este tipo de cataratas suelen quejarse de deslumbramiento. Su avance puede llegar a convertirla en una catarata blanca total y opaca.

3.4 Subcapsular posterior.

Este tipo de catarata está asociado a la migración de células epiteliales del cristalino hacia su cápsula posterior. Esta migración de células dificultará más la visión cuanto más central sea su ubicación en la cápsula.



Fig. 2. Imagen donde se muestran los tres tipos de cataratas.

3.5 Embriología del Cristalino

La formación del cristalino humano se inicia muy pronto en la vida embrionaria. Hacia los 25 días de gestación, dos evaginaciones laterales, llamadas vesículas ópticas, surgen del prosencéfalo o diencéfalo. Conforme aumentan de tamaño y se extienden hacia los lados, las vesículas ópticas acaban por entablar contacto íntimo y adherencia con el ectodermo superficial, una capa única de células cuboidales, creando dos placas a cada lado de la cabeza⁷.

3.5.1 Placoda del cristalino

Las células ectodérmicas que cubren las vesículas ópticas se vuelven cilíndricas hacia los 27 días de la gestación. Esta zona de células más gruesas se llama placoda del cristalino. Se necesitan factores de crecimiento de la familia de la proteína morfogenética ósea (BMP) para que se forme la placoda del cristalino y para su aparición posterior⁷.

3.5.2 Fosita cristaliniana

La fosita cristaliniana aparece a los 29 días de la gestación como indentación (invaginación) de la placoda del cristalino. Esta fosita aumenta de tamaño para dar la vesícula cristalina⁷.

3.5.3 Vesícula cristaliniana

Según se va invaginando la fosita del cristalino, el tallo de células que lo conecta al ectodermo superficial degenera por muerte programada (apoptosis), lo que separa así las células lenticulares del ectodermo superficial. La esfera resultante, una sola capa de células cuboidales rodeada de una membrana basal (la cápsula del cristalino), se denomina vesícula del cristalino. En el momento de su formación a los 30 días de la gestación, la vesícula del cristalino posee un diámetro aproximado de 0.2mm.

Como la vesícula del cristalino se forma por invaginación del ectodermo superficial, los vértices de la capa singular de células se orientan hacia la luz de la vesícula y la base de cada célula se inserta en la cápsula,

alrededor de la periferia vesicular. Al mismo tiempo que se forma la vesícula del cristalino, la vesícula óptica se invagina para dar la cúpula óptica biestratificada⁷.

3.5.4 Fibras primarias del cristalino y núcleo embrionario

Las células de la capa posterior de la vesícula del cristalino dejan de dividirse y empiezan a alargarse. Durante su elongación, van rellenando la luz de la vesícula del cristalino. Hacia los 40 días de la gestación, la luz de la vesícula del cristalino se cierra. Las células elongadas se denominan fibras primarias del cristalino y cuando maduran, sus núcleos y otros orgánulos asociados a la membrana se degradan en un proceso que reduce la dispersión de la luz. Las fibras primarias lenticulares componen el núcleo embrionario que acaba ocupando la porción central del cristalino en la vida adulta.

Las células de la parte anterior de la vesícula cristaliniana permanecen como una monocapa de células cuboidales, el epitelio cristaliniano. El crecimiento ulterior del cristalino se debe a la proliferación intraepitelial.

La cápsula lenticular es una membrana basal elaborada por el epitelio cristaliniano en la cara anterior y por las fibras lenticulares en la posterior⁷.

3.5.5 Fibras lenticulares secundarias.

Después de su proliferación, las células epiteliales próximas al ecuador del cristalino se alargan para dar las fibras lenticulares secundarias. La cara posterior de cada fibra en desarrollo se extiende hacia adelante por debajo del epitelio del cristalino, en dirección al polo anterior. La cara posterior de cada fibra en desarrollo se extiende hacia atrás a lo largo de la cápsula, en dirección al polo posterior. De esta manera se van formando, capa a capa, nuevas fibras lenticulares⁷.

A medida que cada célula de la fibra secundaria se despegga de la cápsula, pierde su núcleo y las organelos asociados a membranas. Las fibras

lenticulares secundarias que se forman entre los 2 y los 8 meses de gestación componen el núcleo fetal.

3.5.6 Suturas y núcleo del cristalino.

A medida que se expanden las fibras del cristalino en dirección anterior y posterior, surge un patrón por el que se reúnen los extremos de las fibras y se interdigitan con las terminaciones de las fibras nacidas en la cara opuesta del cristalino, cerca de los polos anterior y posterior. Estos patrones de asociación celular se conocen como suturas. Las suturas con forma de Y se ven hacia las 8 semanas de gestación, con una sutura de Y erecta que aparece en la cara anterior y otra invertida en la posterior. Conforme se van formando fibras lenticulares y el cristalino prosigue su crecimiento, este patrón de suturas se torna cada vez más complejo y da lugar a 12 o más ramificaciones de las suturas en el ojo adulto. Sigue resultando un misterio qué factores influyen en la formación concreta y en la organización cambiante de este patrón de suturas.

El cristalino humano pesa unos 90 mg al nacer y su masa aumenta a razón de 2mg al año según van apareciendo nuevas fibras a lo largo de la vida⁷.

3.6 Proteínas del cristalino.

El cristalino humano posee una concentración de proteínas del 33% de su peso húmedo que representa, como mínimo, el doble de la mayoría de los demás tejidos. Las proteínas lenticulares suelen agruparse en dos categorías según su solubilidad en agua. La fracción hidrosoluble del cristalino joven da cuenta del 80% de las proteínas lenticulares y se compone sobre todo de un grupo de proteínas llamadas cristalinas. Las cristalinas se han subdividido en tres grandes grupos: α -, β - y γ -cristalinas. Entre estos, la α - y β -cristalinas existen como oligómeros, mientras las γ -cristalina es un monómero. Su estructura, estabilidad e interacciones de corto alcance se cree contribuyen a la transparencia del cristalino⁴.

El cristalino humano es también susceptible a los cambios degenerativos relacionados con la edad tales como la acumulación de proteínas

insolubles, daño oxidativo y cataratas seniles siendo las formas más comunes de cataratas.

Los complejos de cristalina alfa se unen a proteínas parcialmente desnaturalizadas que impiden su agregación. Su función principal dentro de las fibras del cristalino parece ser evitar la desnaturalización completa y la insolubilización de las otras cristalinas⁷.

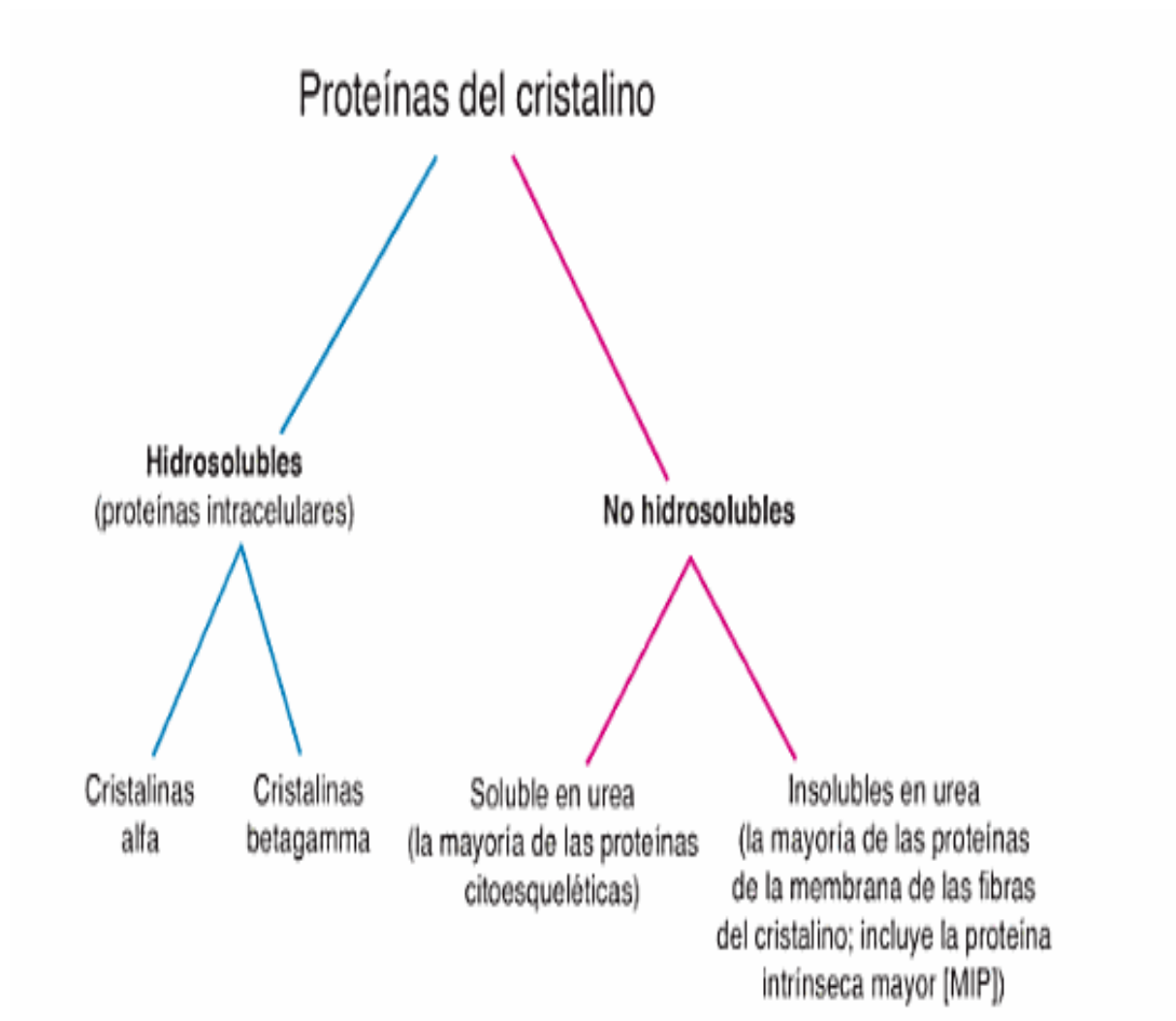


Fig. 3. Clasificación de las proteínas del cristalino.

3.7 Proteínas estructurales de la membrana y proteínas citoesqueléticas.

La fracción hidrosoluble de las proteínas del cristalino se puede subdividir en dos fracciones, una soluble en urea 8M y otra insoluble. La fracción soluble en urea del cristalino joven contiene proteínas citoesqueléticas que proporcionan el armazón estructural a las células del cristalino. Los microfilamentos y los microtúbulos hallados en las células lenticulares se asemejan a los de otros tipos de células, si bien el cristalino contiene dos tipos de filamentos intermedios inusuales: una categoría consta de la proteína vimentina, que no suele encontrarse en células epiteliales, y la otra, los filamentos arrosariados, la constituyen las proteínas faquinina y filensina, específicas del cristalino. La deestructuración genética de los filamentos arrosariados determina una alteración en la estructura de las células fibrosas y la formación de cataratas⁷.

La fracción insoluble en urea del cristalino joven contiene las membranas citoplasmáticas de las células (fibras) del cristalino. Varias proteínas se asocian a estas membranas citoplasmáticas de las células fibrosas. Una de ellas compone casi la mitad de las proteínas membranas y se han denominado proteínas intrínseca mayor (MIP). La MIP aparece primero en el cristalino, en el momento en que las fibras empiezan a elongarse⁷.

La MIP es un miembro fundamental de una categoría de proteínas llamadas acuaporinas; su otro nombre es el de acuaporina 0. En el organismo existen otros miembros de la familia acuaporinica que actúan fundamentalmente como canales para el agua. Dentro del cristalino, se desconoce aún si la MIP opera sobre todo como canal de agua, como molécula adhesiva que minimiza el espacio celular entre las fibras o si bien realiza ambas funciones. Minimizar el espacio extracelular entre las fibras parece fundamental para reducir la dispersión de la luz a su paso por el cristalino⁷.

3.8 Incremento de las proteínas no hidrosolubles con el envejecimiento.

Con el paso del tiempo, las proteínas del cristalino se agregan formando partículas grandísimas que acaban por no resultar solubles en el agua y que dispersan la luz, aumentando de este modo la opacidad del cristalino. Sin embargo, hay que advertir que la fracción proteínica no hidrosoluble se eleva con el tiempo, aun cuando el cristalino conserve una transparencia relativa.

Al parecer, la transformación de las proteínas hidrosolubles en proteínas no hidrosolubles es un proceso natural de maduración de las fibras del cristalino que podría ocurrir en exceso en las cataratas⁷.

El incremento en la cantidad de proteínas no hidrosolubles en las cataratas con un color pardo notable del núcleo del cristalino (cataratas brunecentes) se correlaciona bien con el grado de opacificación. Hasta el 90% de las proteínas nucleares pueden encontrarse en la fracción insoluble en las cataratas muy brunecentes. Se observan alteraciones oxidativas asociadas como la formación de puentes disulfuro entre unas proteínas y otras o entre las proteínas y el glutatión. Estas modificaciones hacen que disminuya la forma reducida del glutatión y aumenten los valores del disulfuro de glutatión (glutatión oxidado) en el citoplasma de las células de las fibras nucleares. Se tiene la impresión general de que el glutatión es fundamental para mantener un entorno reductor en el citoplasma del cristalino. Al disminuir la forma reducida de glutatión, se acelera el entrecruzamiento entre las proteínas, la agregación entre ellas y la dispersión de la luz.

Con el paso del tiempo y en particular con la formación de cataratas nucleares brunecentes, las proteínas nucleares se tornan cada vez menos solubles en la urea. Además del mayor número de puentes disulfuro, estas proteínas nucleares presentan muchos entrecruzamientos por otro tipo de puentes. Esta fracción proteínica insoluble contiene pigmentos de color entre marrón y pardo, cuya concentración aumenta en las cataratas

nucleares. La mayor fluorescencia se debe a puentes, no constituidos por disulfuro, que aparecen en las cataratas nucleares brunescientes⁷.

3.9 Factores implicados en las cataratas

La vida media de muchas de las proteínas del cristalino se puede medir en décadas. La luz del sol y el oxígeno a los que el cristalino es expuesto están asociados con daño extenso que sufren las proteínas y otros constituyentes del cristalino a lo largo de su vida.

Con el daño progresivo, las proteínas alteradas se acumulan, agregan y precipitan en opacidades, ó cataratas. El cristalino joven tiene reservas sustanciales de antioxidantes (e.g. vitaminas C y E, carotenoides y glutatión (GSH) y enzimas antioxidantes (e.g. superóxido dismutasa (SOD), catalasa (CAT), y glutatión reductasa/peroxidasa (GSR/GPx)) que pueden prevenir el daño. Enzimas proteolíticas, llamadas proteasas, pueden remover selectivamente proteínas obsoletas y proveer un segundo nivel de defensa.

Los compromisos de la función del cristalino en el envejecimiento están asociados y relacionados al decaimiento o disminución de las reservas primarias de antioxidantes, capacidad de las enzimas antioxidantes y disminución de las defensas secundarias como las proteasas.

El estrés ambiental como el fumar y la exposición excesiva a luz UV, parecen proporcionar un daño oxidativo adicional asociado con la reducción de antioxidantes, así como un riesgo mayor de generar cataratas. Otros factores de riesgo para la formación de cataratas incluyen, diabetes, galactosemia, radiación electromagnética, daño renal, algunas drogas.⁴

3.10 Radicales Libres (RL)

Se considera un Radical Libre es un átomo o un grupo de átomos que contienen por lo menos un electrón no apareado o impar en el orbital externo, dándole una configuración espacial que genera una elevada inestabilidad. Los electrones son partículas cargados negativamente, se

suelen presentar en pares y tienen una organización química estable. Cuando un electrón carece de pareja, otro átomo o molécula se une fácilmente a él, lo que produce una reacción química. Debido a que se unen con tanta facilidad a otros compuestos, los radicales libres pueden producir cambios impresionantes en el organismo y hacer mucho daño. Aunque la vida de un radical libre dura solamente una pequeña fracción de segundo, el daño que puede causar puede ser irreversible.

Los Radicales libres se suelen encontrar en el organismo en pequeñas cantidades. Los procesos bioquímicos conducen de modo natural a la formación de radicales libres, y en circunstancias normales el organismo los mantiene bajo control. De hecho, no todos los radicales libres son malos. Los que produce el sistema inmunológico destruyen virus y bacterias. Otros radicales libres participan en la generación de hormonas vitales y en la activación de enzimas necesarias para la vida. Todos necesitamos a los radicales libres para la producción de energía y de diversas sustancias que nuestro organismo requiere. Sin embargo, la proliferación de radicales libres es nociva para las células y los tejidos. Una producción muy elevada de radicales libres estimula la producción de más radicales libres, lo que le causa aún más daño al organismo.

La presencia de una cantidad peligrosamente alta de radicales libres afecta a la manera en que las células codifican el material genético. Por ejemplo se pueden presentar cambios en la estructura de las proteínas como resultado de errores en su síntesis. El sistema inmunológico podría identificar equivocadamente a esas proteínas alteradas como sustancias ajenas al organismo y, en consecuencia, podría tratar de destruirlas. La formación de proteínas que han sufrido un proceso de mutación puede afectar eventualmente el sistema inmunológico y producir muchas enfermedades.

Además de causarle daño al material genético, los radicales libres pueden destruir las membranas que protegen las células. La formación de radicales libres también puede producir retención de fluidos en las

células lo cual se asocia con el proceso de envejecimiento. Además de lo anterior, los niveles de calcio del organismo pueden resultar afectados.

Son muchos los factores que pueden llevar a la producción de radicales libres. La exposición de radiación, bien sea del sol o de los rayos X, activa la formación de radicales libres, al igual que la exposición a contaminantes ambientales, como el humo del tabaco y los escapes de los automóviles. La dieta también puede contribuir al desarrollo de radicales libres. Cuando el organismo obtiene nutrientes a través de la dieta, utiliza el oxígeno (O₂) y esos nutrientes para crear energía. Durante ese proceso de oxidación se liberan moléculas de oxígeno que contienen electrones no apareados. Esos radicales libres de oxígeno pueden ser nocivos para el organismo si se producen en cantidades excesivamente grandes. Las dietas altas en grasa intensifican la actividad de los radicales libres, por que el proceso de oxidación se realiza más fácilmente en las moléculas de grasa que en las de carbohidratos o proteínas.⁸

En 1954 una investigadora argentina, Rebeca Gerschman, sugirió por vez primera que los RL eran agentes tóxicos y generadores de enfermedades.⁹

Las sustancias conocidas como antioxidantes neutralizan a los radicales libres uniéndose a sus electrones libres.

3.11 Metabolismo de los carbohidratos.

El objetivo del metabolismo lenticular es preservar la transparencia. La producción energética del cristalino depende principalmente del metabolismo de la glucosa, que entra en el cristalino a partir del humor acuoso, tanto mediante difusión simple como a través de una transferencia denominada difusión facilitada. La mayor parte de la glucosa transportada al cristalino se fosforila hacia glucosa-6-fosfato (G6P) por la enzima hexocinasa. Esta reacción es 70-1000 veces más lenta que la de otras enzimas implicadas en la glucólisis del cristalino y representa un paso que limita la producción de G6P. Una vez formada, la G6P sigue una de estas dos vías metabólicas, glucólisis anaerobia o la de los monofosfatos de hexosa (HMP)¹.

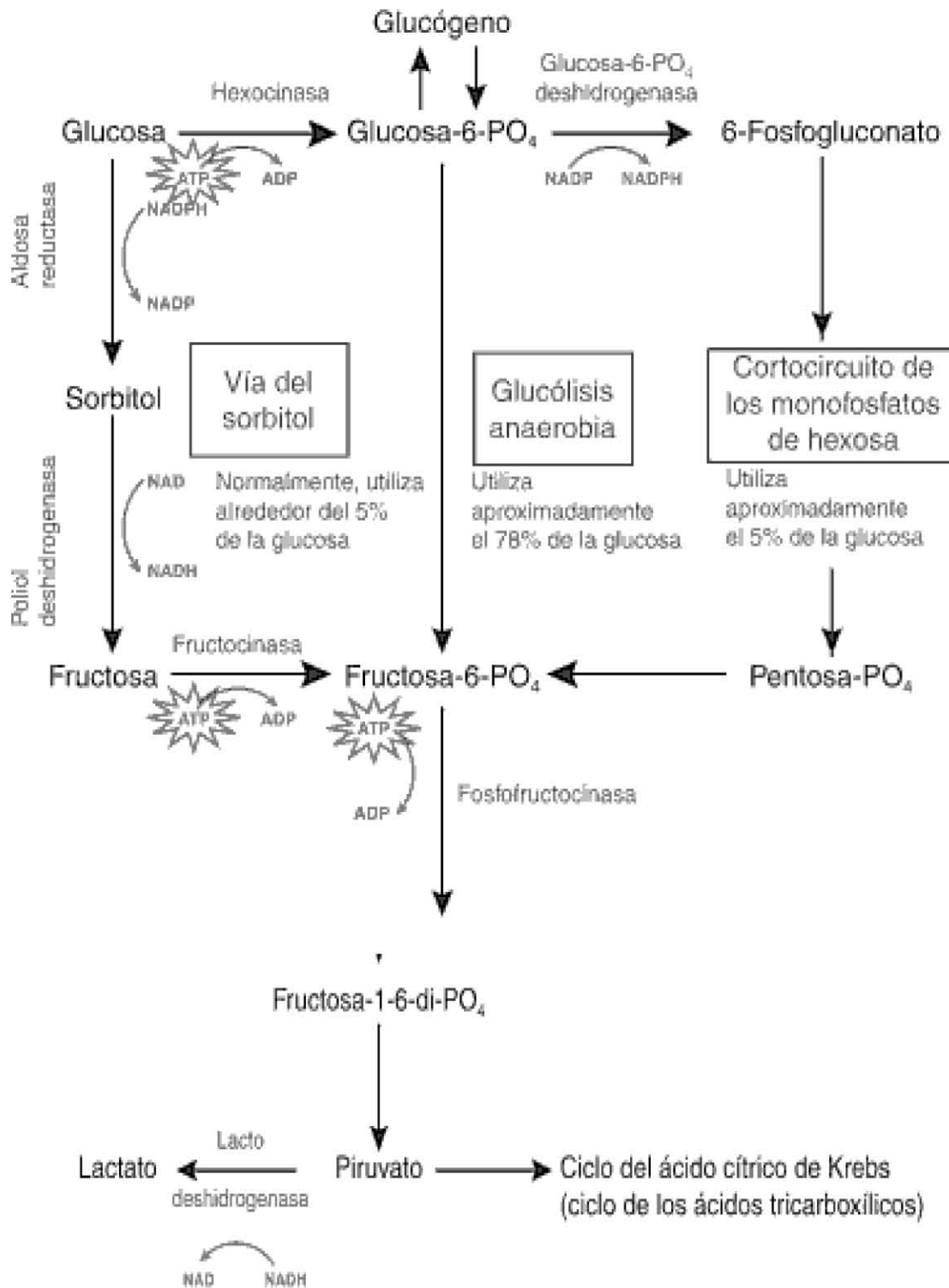


Fig.4. Vías metabólicas utilizadas por el cristalino.

La glucólisis anaerobia es la más activa de las dos rutas y proporciona casi todos los enlaces fosfato de alta energía necesarios para el metabolismo del cristalino. La fosforilación de ADP a ATP ligada a los sustratos tiene lugar en dos pasos de la vía que culmina en el lactato. El paso que limita la velocidad de la glucólisis es el de la enzima fosfofructocinasa, regulada a través de retroalimentación de los productos metabólicos de la vía glucolítica. Esta ruta resulta bastante menos eficiente, porque solo se producen dos moléculas netas de ATP por cada molécula de glucosa utilizada, mientras que la glucólisis aerobia produce 36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa metabolizada en el ciclo del ácido cítrico (metabolismo oxidativo). Dada la reducida tensión de oxígeno en el cristalino, sólo aproximadamente el 3% de la glucosa lenticular pasa por el ciclo de Krebs para dar ATP. No obstante, aún este reducido metabolismo aerobio genera casi el 25% del ATP del cristalino.⁷

Que el cristalino no depende del oxígeno lo prueba su capacidad para sostener el metabolismo normal en un entorno nitrogenado. Si se suministra glucosa con generosidad, el cristalino anóxico in vitro preserva su transparencia, cuenta con cifras normales de ATP y mantiene las actividades de sus bombas de iones y aminoácidos. Sin embargo, si se le priva de glucosa, el cristalino ya no puede cumplir estas funciones y se enturbia al cabo de unas horas, incluso en presencia de oxígeno.⁷

La vía menos activa para la utilización de G6P en el cristalino es la de las hexosas, también denominado vía de la pentosa fosfato. Aproximadamente el 5% de la glucosa del cristalino es metabolizada por esta vía, si bien la ruta se estimula en presencia de cifras elevadas de glucosa. La actividad de la vía es mayor en el cristalino que en la mayoría de los tejidos, pero su importancia aún no se ha aclarado. Como ocurre en otros tejidos, la vía de los monofosfatos de hexosa puede aportar NADPH (forma reducida del fosfato dinucleótido de nicotinamida y adenina [NADP]) para la biosíntesis de ácidos grasos y ribosa para la de los nucleótidos. Proporciona el NADPH necesario para las actividades de la glutatión reductasa y la aldosa reductasa del cristalino. Los carbohidratos

derivados de la vía de las hexosas se incorporan a la glucólisis y se metabolizan hacia lactato.⁷

La aldosa reductasa es la enzima clave de otra vía adicional para el metabolismo de la glucosa en el cristalino, la vía del sorbitol. Esta enzima desempeña una misión capital en la aparición de las cataratas “por azúcar”. La constante de Michaelis (K_m) de la aldosa reductasa es unas 700 veces mayor para la glucosa que para la Hexocinasa. Como la afinidad representa, en realidad, el valor recíproco de K_m , la aldosa reductasa posee una afinidad bajísima por la glucosa en comparación con la hexocinasa. Menos del 4% de la glucosa del cristalino se convierte en sorbitol.

Como ya se ha señalado, la reacción de fosforilación de la glucosa por la hexocinasa en el cristalino es limitada y está inhibida por mecanismos de retroalimentación por los productos de la glucólisis. Por eso, cuando la glucosa aumenta en el cristalino, como ocurre en los estados de hiperglucemia, se activa relativamente más la vía del sorbitol que la glucólisis y se acumula una cantidad considerable de sorbitol antes de continuar metabolizándose. Esta característica, unida a la escasa permeabilidad del cristalino al sorbitol, hace que se acumule sorbitol en el cristalino.

La elevada relación entre NADPH Y NADH impulsa la reacción en dirección anterógrada. La acumulación de NADP que ocurre al activarse la vía del sorbitol puede hacer que se estimule la vía de la pentosa fosfato como sucede cuando la glucosa se eleva en el cristalino. Además del sorbitol, las cifras de fructuosa del cristalino aumentan si se incuba este en un entorno rico en glucosa. En conjunto, estos dos glúcidos incrementan la presión osmótica del cristalino y atraen el agua. Al principio, las bombas del cristalino, dependientes de la energía, lo compensan, pero, al final, se ven desbordadas con el resultado de la tumefacción de las fibras, desestructuración de la arquitectura citoesquelética normal y opacificación del cristalino.

La galactosa constituye también un sustrato de la aldosa reductasa que produce el alcohol galactitol (dulcitol). Sin embargo, el galactitol no es sustrato del alcohol deshidrogenasa y, por eso, se acumula con rapidez y ejerce los mismos efectos osmóticos –y las mismas consecuencias- que el sorbitol. La producción excesiva de galactitol se da entre pacientes con errores congénitos en el metabolismo de la galactosa. Los pacientes con errores congénitos en el metabolismo de la galactosa no pueden utilizar correctamente ésta y acumulan galactitol y otros metabolitos de la galactosa. Los animales sujetos a dietas excesivamente ricas en galactosa experimentan cataratas por galactosa.

La misión cardinal de la aldosa reductasa en la formación de cataratas en los animales se ha descrito en estudios sobre el desarrollo de cataratas inducidas por glúcidos en distintas especies. Las especies con gran actividad de aldosa reductasa representan opacidades del cristalino, no así aquellas que carecen de la enzima. Además, los inhibidores específicos de esta actividad enzimática, aplicados de manera sistémica o tópica sobre uno de los ojos, disminuyen la velocidad de comienzo y la intensidad de las cataratas por glúcidos en los estudios experimentales.⁷

3.12 Tratamientos para inducir cataratas

En muchos estudios realizados a los lentes de animales y humanos se han encontrado diferencias significativas las cuales incluyen filtros de luz UV que son inexistentes en los animales, la oxidación de las proteínas relacionada con la edad es menor en los humanos; en el cristalino de los ratones y ratas es mayor el isómero gamma; los niveles de proteínas aumentan con la edad en el centro de los lentes de los animales, pero no así en los humanos; sólo los humanos, murciélagos de fruta y cobayos pueden generar escorbuto; el ascorbato en los lentes es milimolar mientras que en las ratas es micromolar; y el glutatión relacionado con las enzimas es insignificante en los lentes de los animales.¹⁰

A pesar de estas dificultades, muchos animales son utilizados, como los perros y los conejos, aunque todavía los roedores son los más comúnmente utilizados para estudiar los mecanismos de formación de

cataratas⁴. Muchos tratamientos experimentales enfocados a inducir cataratas en ratas que incluyen: la diabetes inducida por estreptozotocina¹¹, alimentación de galactosa¹², radiación ¹³, sobredosis de selenito de sodio entre otros.

3.12.1 Diabetes inducida por estreptozotocina

La Diabetes puede ser inducida por la destrucción selectiva de las células β insulino-productoras del páncreas con una sola inyección de estreptozotocina (STZ). El método se lleva a cabo en un ratón Wistar macho de 8 semanas de edad, utilizando una inyección rápida de estreptozotocina (STZ; 65 mg/Kg) en la vena femoral, para la inducción de diabetes, no se utiliza ningún insulínico y se sigue el progreso durante las siguientes 24 semanas. ¹⁴

3.12.2 Cataratas inducidas con alimentación a base de galactosa

Este método utiliza ratas albino Wistar de 21 días de edad, teniendo en cuenta un promedio de peso de 30g las cuales se alimentan con una dieta por encima del 30% de galactosa por un periodo de tiempo aproximado a las 4 semanas.¹⁵

3.12.3 Cataratas inducidas con radiación

En este estudio 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 con una lámpara de hendidura cada 30 días por un periodo de 11 meses después de ser irradiados.¹⁶

3.12.4 Cataratas inducidas por selenito de sodio

Para comenzar vemos que el selenito de sodio es una sal incolora y comúnmente soluble en agua. Sus fórmulas son Na_2SO_3 y $\text{Na}_2\text{SO}_3(\text{H}_2\text{O})_5$, sal anhidra y pentahidratada respectivamente.

Desde que se descubrió que el selenito de sodio induce cataratas en ratas jóvenes, se ha convertido en un modelo extremadamente conveniente para la producción de las mismas.

El modelo del selenito de sodio para la formación de cataratas es el más comúnmente utilizado como una manera de acercamiento parcial a las cataratas nucleares en humanos. La sobredosis de Selenito de sodio es un modelo extremadamente rápido y conveniente para la inducción de cataratas nucleares en ratas "in vivo".

Este modelo se viene utilizando en estudios experimentales desde 1978.⁴ Las cataratas por selenito son usualmente producidas por una inyección subcutánea de 19-30µM/Kg de peso de selenito de sodio (Na_2SeO_3), las ratas lactantes están en un rango de los 10 – 14 días de edad, definitivamente antes del periodo de maduración crítica de los lentes que es aproximadamente a los 16 días de edad.¹⁷ Inyecciones repetidas de pequeñas dosis de selenito o la administración oral también son caratogénicas.

Las cataratas nucleares bilaterales son producidas dentro de los primeros 4-6 días. Los estados precursores incluyen: catarata subcapsular posterior (día 1), inflamación de la fibras (día 2), anillo refractil perinuclear (día 3). Aunque el modelo puede ser utilizado extensivamente como un modelo de catarata nuclear, transitoriamente también se puede formar una catarata cortical de los 15 – 30 días después de la inyección y se aclaran dentro de pocos meses.¹⁸

La catarata cortical inducida por el selenito aparentemente surge cerca del daño epitelial con interrupción de la fibrogénesis normal e intervienen con el control normal de iones, resultando en una influencia del agua la destrucción celular y la opacidad del lente. Remarcablemente la catarata cortical de selenito desaparece espontáneamente en unos pocos meses, restaurando esencialmente las células normales del epitelio dentro y fuera de la corteza.¹⁶

El principal mecanismo de acción para la desaparición de la catarata cortical de selenito probablemente involucre:

1. La remoción de las proteínas dañadas de los lentes por medio una extensiva proteólisis.
2. Reemplazamiento de las fibras por una reanudación de una normal fibrogénesis.

Estos datos enfatizan el potencial de reparación que tienen los lentes para poder aclararse después de un severo daño.

El mecanismo de acción que maneja el selenito de sodio para la inducción de cataratas está todavía en debate pero se tiene la hipótesis que la formación de la catarata nuclear inducida por selenito es el resultado de la pérdida de la GSH de los lentes. A partir de entonces, la capacidad de la GSH como buffer oxido/reducción disminuye en el metabolismo de los lentes y la sensibilidad de los lentes de las ratas al estrés oxidativo es mayor. Como consecuencia del tratamiento de selenito el perfil metabólico de los lentes en las ratas es dramáticamente cambiado.

En la formación de las cataratas nucleares inducidas por selenito, contribuyen varios mecanismos que se encuentran ilustrados en la siguiente imagen:

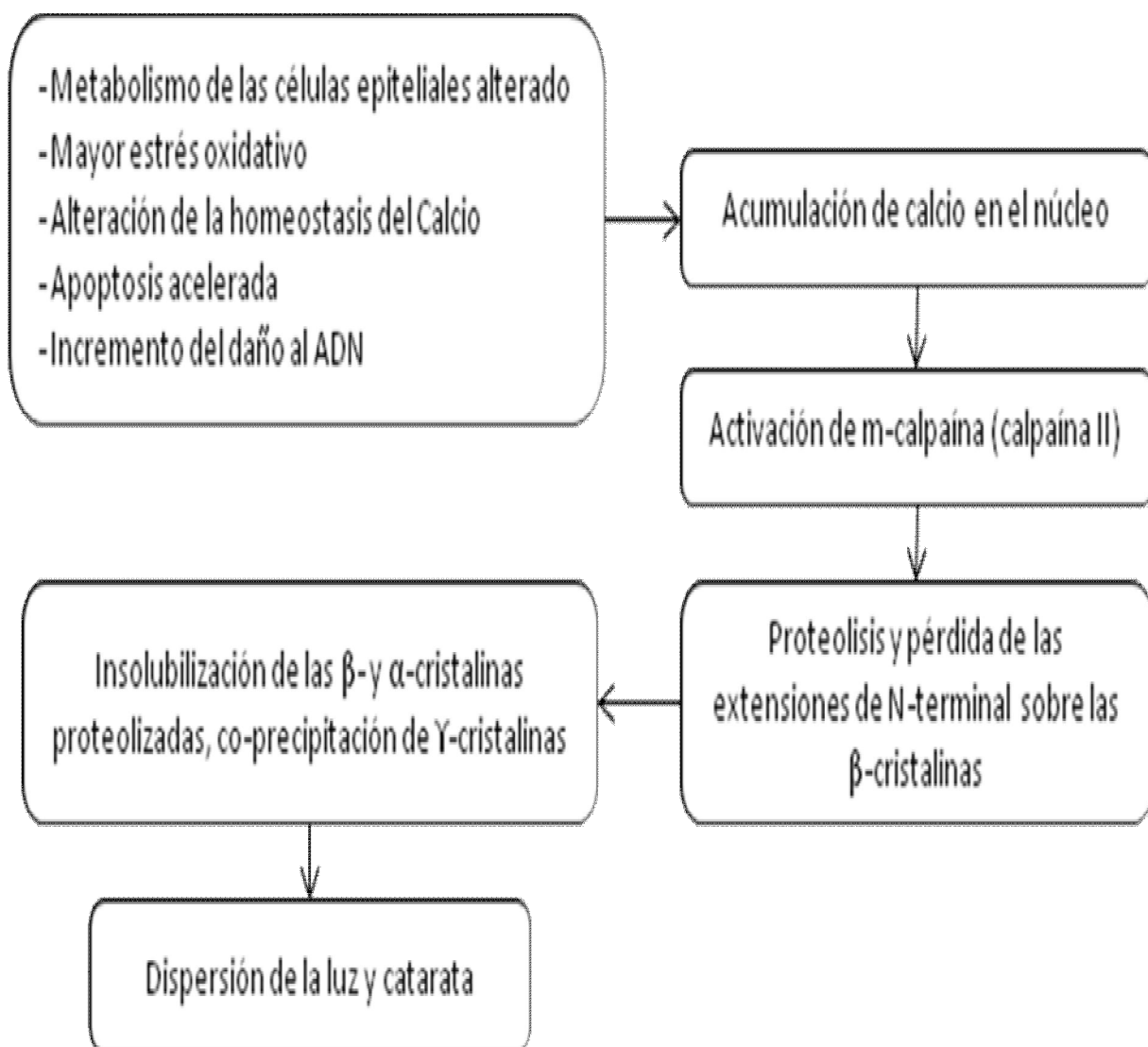


Fig. 5. Mecanismos de la formación de cataratas nucleares inducidas por selenito.

En este se incluye hidrólisis inducida por calpaínas y precipitación lenticular de proteínas. Las calpaínas son una familia de proteasas cisteínas no lisosomales con un pH neutro y un requerimiento de calcio para su activación. Por lo tanto observamos en la cataratas nucleares inducidas por selenito que una consecuencia en la elevación del calcio en los lentes es la activación de las calpaínas. Estudios sobre cataratas experimentales han demostrado que la proteólisis de β -cristalina inducida por calpaínas es el mayor mecanismo en la maduración de los lentes así como también en la caratogenesis.¹⁹

Entonces el estrés oxidativo inducido por el selenito y la subsecuente pérdida de la homeostasis del Ca^{2+} son responsables de la activación de las calpaínas, que resultan en la precipitación proteolítica y agregación de proteínas solubles e insolubles.

3.13 Ratón 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 símbolo "et" se adopto para nombrar a la forma mutante, además estos ratones presentan una fertilidad baja, mortalidad alta, 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*.²⁰

4. Fundamento de técnicas

4.1 Ceruloplasmina

La ceruloplasmina (Cp) o ferroxidasa constituye la principal proteína plasmática transportadora de cobre en la sangre perteneciendo a la familia de las multicuprooxidases. Sintetizada en el hígado como una cadena polipeptídica simple, la ceruloplasmina se secreta como una α -2-glicoproteína a nivel plasmático. Si bien, puede ser igualmente sintetizada

por células integrantes de otros tejidos como los monocitos, astrocitos y células Sertoli. Desde un punto de vista funcional, interviene transportando el 90% del cobre existente en el plasma sanguíneo ya que el otro 10% lo transportará la albúmina.

La ceruloplasmina posee una actividad oxidasa inespecífica, participando en reacciones de oxidación de múltiples sustratos orgánicos e inorgánicos, como el ión Fe^{2+} , benzidina, p-fenilendiamina, N y N-dimetilfenilendiamina entre otros. No obstante, únicamente el ión Fe^{2+} se considera un sustrato biológico para esta enzima.

Por otra parte se ha descrito una acción moduladora en procesos como la coagulación, la angiogénesis, así como una capacidad inactivadora de aminas biogénicas y de defensa frente al estrés oxidativo.²¹

La determinación de esta proteína se puede realizar por las técnicas Inmunodifusión radial y nefelometría.

La inmunodifusión radial consiste en una inmunoprecipitación en agarosa entre la ceruloplasmina (antígeno) y su anticuerpo homólogo que se encuentra presente en el gel de agarosa. El antígeno difunde radialmente en la mezcla gel-anticuerpo y se forma un disco o anillo visible en un punto que depende de la relación estequiométrica antígeno-anticuerpo.²²

4.2 Óxido Nítrico

El Óxido Nítrico es un gas simple que se libera por la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina. Para la síntesis de NO, además de la L-arginina como sustrato, se requiere de la presencia de calmodulina (CaM) y de 4 cofactores: flavin mononucleótido (FMN), flavin adenina dinucleótido (FAD), tetrahidrobiopterina (TBH) y de nicotinamida adenina dinucleotidofosfato (NADPH). Esta reacción es catalizada por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS) y puede ser inhibida por derivados

estructurales la N-mono-metil-L-arginina (LNMMA), la N-nitro-L-arginina metiléster (LNAME) y otros.²³

Después que se forma el óxido nítrico, se difunde a través del endotelio y principalmente se une al grupo Hemo de la guanilato ciclasa, favoreciendo la conversión de guanosintrifosfato (GTP) a guanosinmonofosfato cíclico (GMPc) que finalmente favorece la relajación vascular.

La síntesis de óxido nítrico y su efecto vasodilatador se basa en la generación de GMPc, y se hace en respuesta, principalmente, de la existencia de bradicininas o acetilcolina o, bien, como respuesta a diferentes citocinas.

Además de la regulación en la vasodilatación que ocasiona el óxido nítrico, tiene otro tipo de funciones: regula la expresión de células musculares lisas vasculares, tiene un efecto antiagregante plaquetario y evita la adhesión leucocitaria local.

Como ya se menciona el sustrato básico de la NOS es la arginina, el metabolismo de la arginina toma dos principales caminos, dependiendo de las concentraciones que se encuentren (esto es muy importante cuando la arginina se convierte en un aminoácido condicionalmente esencial). Las concentraciones de arginina y los requerimientos tienen una función bimodal. Con concentraciones de arginina adecuadas para las necesidades de la NOS se produce sin problema óxido nítrico con todos los efectos mencionados. Sin embargo si las concentraciones son menores o, bien, la necesidad de sustrato se incrementa de tal manera que no puede hacerse frente a esta situación, entonces el metabolismo de la arginina no termina produciendo óxido nítrico sino peroxinitrilo, explicado esto último por el incremento importante en la generación de radicales libres en prácticamente todas las enfermedades que cursan con disfunción endotelial.²⁴

La posible actividad adversa o de citotoxicidad del NO, puede explicarse a través de procesos químicos como la reacción con intermediarios reactivos del oxígeno (ROI) y la formación de peroxinitritos (ONOO⁻).

En las enfermedades inflamatorias los macrófagos activados secretan ROI y NO, lo cual puede resultar en la producción de peroxinitritos y/o radicales OH. En esta reacción de NO con el grupo hemo en sitios catalíticos de las mitocondrias, enzimas citoplasmáticas y nucleares, pueden formar uniones covalentes irreversibles. En la artritis reumatoide la producción aumentada de óxido nítrico se evidencia por el incremento de los niveles de nitritos en el líquido sinovial de dichos pacientes.²³

En la síntesis de óxido nítrico pueden participar otros aminoácidos, además de la arginina, como el glutamato que activa la función de la NOS en las neuronas, o la glutamina que inhibe la síntesis de óxido nítrico endotelial.²⁴

4.3 Proteína C Reactiva

La proteína C reactiva (PCR) es una proteína pentamérica sintetizada principalmente por los hepatocitos en respuesta a procesos infecciosos, inflamatorios y de injuria tisular. Los responsables de su inducción son la interleuquina-6, la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral- α 4. Además de ser un indicador de inflamación, esta proteína se encuentra involucrada en diversas funciones inmunomoduladoras como la amplificación de la capacidad del complemento, opsonización de bacterias y estimulación de células fagocíticas. A diferencia de la velocidad de eritrosedimentación, la PCR se eleva más rápidamente en respuesta a los estímulos y sus niveles séricos disminuyen velozmente con el cese de los mismos. No presenta diferencias por género ni sus valores se ven afectados por otras condiciones como anemia, policitemia o morfología eritrocitaria.

5. Planteamiento del Problema

En la actualidad se conocen varios métodos experimentales para la inducción de cataratas, utilizando como modelos de experimentación diferentes animales entre ellos las ratas como el principal; éstos se utilizan para evaluar la actividad anticataratogénica de diversos compuestos orgánicos e inorgánicos.

La mayoría de los métodos pueden ser muy costosos y prolongados en comparación con el modelo de selenito, es por eso que se busca un modelo que elimine las desventajas y provea las condiciones convenientes para el desarrollo de la enfermedad, y poder encontrar un fármaco con las propiedades necesarias para eliminar las cataratas sin la necesidad de recurrir a la extirpación quirúrgica, que es la única forma de eliminarlas hasta el momento.

Se sabe que este es un problema que aqueja a la población mundial, pero es aún más grave en los países en vías de desarrollo ya que no se cuenta con el poder económico que tienen países como EEUU para poder pagar una cirugía; lo cual lleva a que el paciente permanezca ciego como única alternativa.

6. Objetivos

6.1 General

- Determinar el efecto del selenito de sodio al ser administrado en ratones et/et que desarrollan espontáneamente exocrinopatía.

6.2 Particulares

- Determinar los niveles de ceruloplasmina y proteína C reactiva como marcadores de procesos inflamatorios.
- Determinar los niveles de nitritos como marcador de estrés oxidativo.
- Comparar los pesos de riñones; bazo; hígado; glándulas lagrimales y maxilares de los ratones et/et, et/+ y +/+.

7. Hipótesis

Al tener los ratones et/et una edad en la que todavía no se concluye la maduración crítica del lente y tomando en cuenta que generan uveítis espontánea debido a su exocrinopatía, se cree que se verá facilitada la inducción de cataratas por el método de selenito de sodio.

8. Diseño de investigación

8.1 Tipo de estudio

- Experimental

8.2 Población de estudio

- Ratones et/et, et/+, y +/+ machos, divididos según su cepa.

8.3 Criterios de inclusión

- Ratones et/et, et/+ y +/+ de 10 - 11 días de edad.

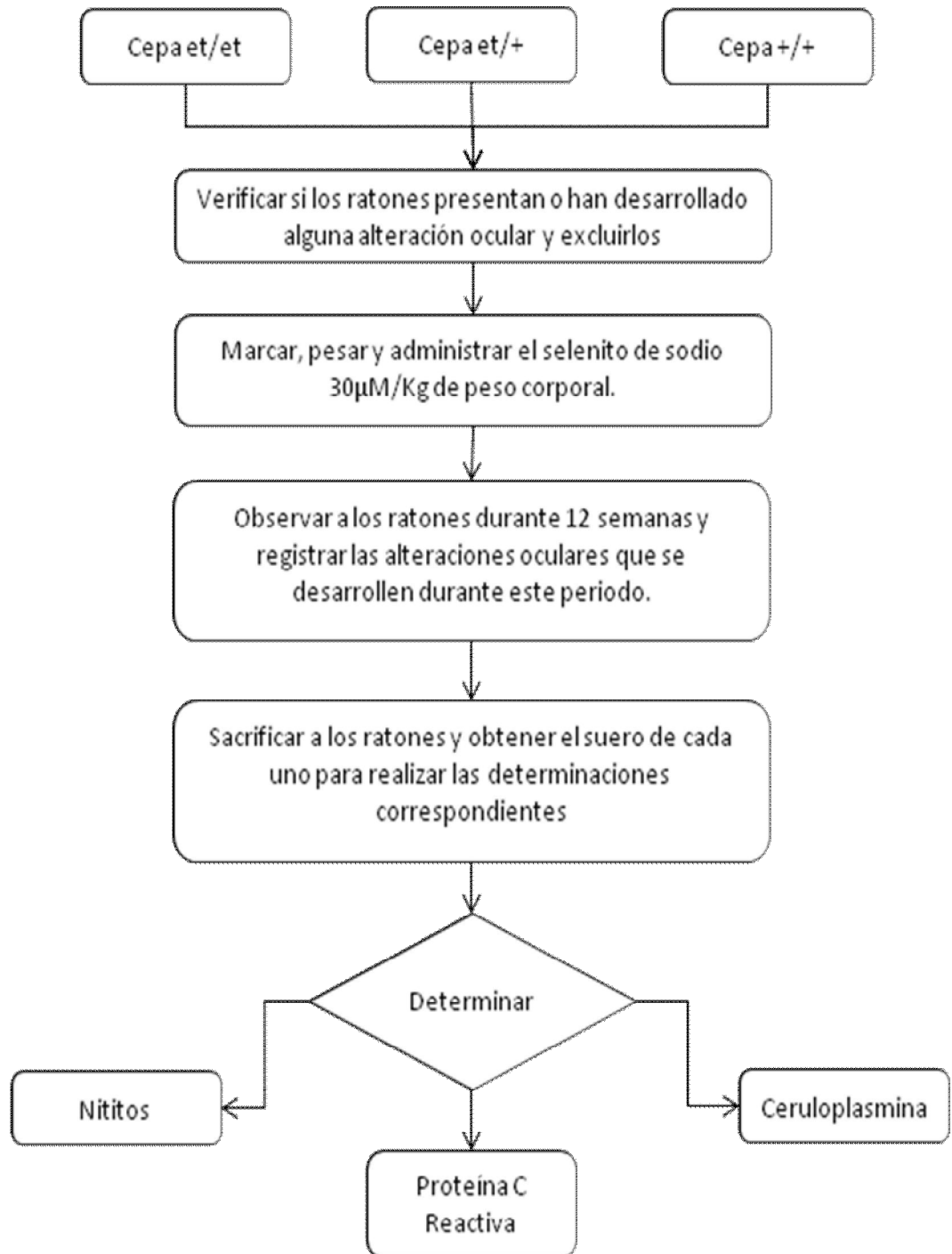
8.4 Criterios de exclusión

- Ratones que no cumplan con el rango de edad establecido.

8.5 Criterios de eliminación

- Ratones con algún problema que afecte los parámetros a medir.

8.6 DIAGRAMA DE FLUJO



9. Método

Se estudiaron 54 ratones machos de las cepas et/et, et/+, +/+ entre 10 y 11 días de nacidos, mantenidos en condiciones de bioterio, el manejo de los animales se realizó según 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 ratones et/et se separaron de sus hermanos con pelo, los cuales se diferenciaron al nacer. Los animales fueron identificados como: CD1 +/+, ratones desnudos hipotímicos et/et y heterocigotos o portadores et/+. Se separaron según su cepa, para cada ratón se registró cepa, edad, peso corporal y lesiones visibles en los ojos como inflamación, leucoma, cataratas y ojos perdidos.

Cuando se administró el selenito de sodio se inspeccionó cada ratón para verificar que éstos no contaran con lesiones visibles en los ojos. Las cataratas se indujeron por una inyección subcutánea de selenito de sodio (Na_2SeO_3) 30 μM /Kg de peso corporal.

Los ratones se mantuvieron en observación por un periodo de 12 semanas donde se fue registrando la progresión de las lesiones en caso de que éstas se fueran desarrollando.

Una vez que se terminó el tiempo de observación los ratones se anestesiaron en una cámara de éter, se pesaron, se sangraron por incisión capilar y se obtuvo el suero, para realizar las determinaciones convenientes.

9.1 Ceruloplasmina

- **Preparación de las placas**
- Pesar 0.3 g de agarosa en balanza analítica.
- Transferir 0.3 g de agarosa en un matraz Erlenmeyer de 125 mL y adicionar 30 mL de PBS.

- Calentar el matraz en un horno de microondas cada 10 segundos hasta observar el agar completamente disuelto, cuidando que no se derrame producto del calentamiento.
- Colocar 6 tubos de ensayo de 13 x 100 en un baño María a 45° C.
- Adicionar 2 mL de agarosa al 1% en cada tubo, conservándolos en baño María a 45° C.
- Verter 150 µL de suero de conejo anti-ceruloplasmina y agitar con un vortex.
- Vaciar cada uno de los tubos en cada uno de los pozos de las placas Falcon de 35 mm, evitar la formación de burbujas.
- Permitir la solidificación de las placas a temperatura ambiente.
- Realizar 4 perforaciones en cada pozo de la placa Falcon con agarosa.

- **Procesamiento de las muestra**

- Colocar 5 µL de cada muestra problema en cada orificio de los pozos.
- Refrigerar durante 48 hs.
- Leer los halos de inhibición y calcular la concentración de ceruloplasmina.

9.2 Nitritos

- **Plateado del cadmio**

- Colocar en tubos de 13 X 100, 0.5g de cadmio metálico en la campana de extracción.
- Agregar 2 mL sulfato de cobre al 5% y agitar por 10 minutos en una plataforma de agitación (rocker platform).
- Realizar 3 lavados con agua destilada para eliminar el cobre.
- Hacer un último lavado con HCl 0.1N para remover el hidróxido de cadmio, aproximadamente a 2 volúmenes con el tubo lleno.
- Lavar el cadmio con cloruro de amonio al 5% a un pH de 9.

- **Preparación de la muestra**

- A 100 μL de suero, adicionar 300 μL de agua destilada (para obtener una dilución 1:4), eliminar 20 μL de esta dilución.
- Adicionar 20 μL de la solución de ZnSO_4 , agitar perfectamente (esta solución forma un precipitado de proteínas).
- Centrifugar a 10 000 rpm durante 5 min, para separar el precipitado.
- Eliminar el NH_4Cl a los tubos con el cadmio activado, escurriéndolos bien, adicionar al tubo todo el sobrenadante de la muestra y dejar en agitación.
- Tapar con el parafilm colocar en una plancha de agitación horizontal por 15 minutos.
- Centrifugar los tubos a 3500 rpm por 5 minutos, tomar 200 μL del sobrenadante del ensayo.
- Realizar la curva de calibración con el patrón. (ANEXO)
- Curva patrón, concentración estándar de 230 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de nitrito de sodio y procesamiento de la muestra.
- Determinar la concentración de nitritos en suero problema y reportar los resultados con la utilización de la curva patrón de nitrito de sodio.

9.3 Proteína C reactiva

- **Pegado del carbohidrato al eritrocito**

- Lavar los eritrocitos de carnero con solución salina, colocar en un tubo aproximadamente 3mL de solución salina y centrifugar a 3500rpm durante 5 minutos.
- Realizar una dilución del carbohidrato que tiene una concentración de 270.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ tomando 0.5 mL del carbohidrato y 1.5 mL de solución salina, para obtener una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

- Tomar del tubo de eritrocitos de carnero 0.2mL del paquete celular y colocarlos en un tubo, adicionar 2mL del carbohidrato diluido.
- Incubar en un baño metabólico a 37°C/1hr.
- Lavar los eritrocitos con solución salina, centrifugando durante 5 minutos a 3500rpm.
- Ajustar el volumen a 20mL con PBS.
- Una vez que ya se tiene el carbohidrato C pegado al eritrocito, realizar la prueba de aglutinación en placa para saber si se tiene PCR en el suero problema.
- Agregar 50µL de suero problema al pozo número 1
- Tomar del pozo número 1; 50µL y depositarlos en el número 2, continuar hasta el pozo número 12 y posteriormente desecharlos.
- Agregar a cada pozo de reacción 50µL de carbohidrato pegado al eritrocito.
- Agregar a cada pozo 50µL de PBS.
- Incubar 37°C/hr.
- Realizar la lectura bajo la fuente de luz directa.
- Si los pozos son positivos se les realizara diferentes diluciones 1:4, 1:8.

10. Análisis estadístico.

Se utilizó el programa estadístico SPSS versión 15.0. Se realizó una ANOVA de un factor, se considero una significancia de 0.05.

11. RESULTADOS.

11.1 Alteraciones oculares en los ratones de las diferentes cepas después de la administración de selenito de sodio



Fig. A Ratón CD1 sin formación de lesiones aparentes en los ojos después de la administración de selenito de sodio.



Fig. B Ratón et/et con formación de catarata se puede observar toda la periferia del ojo completamente blanco.

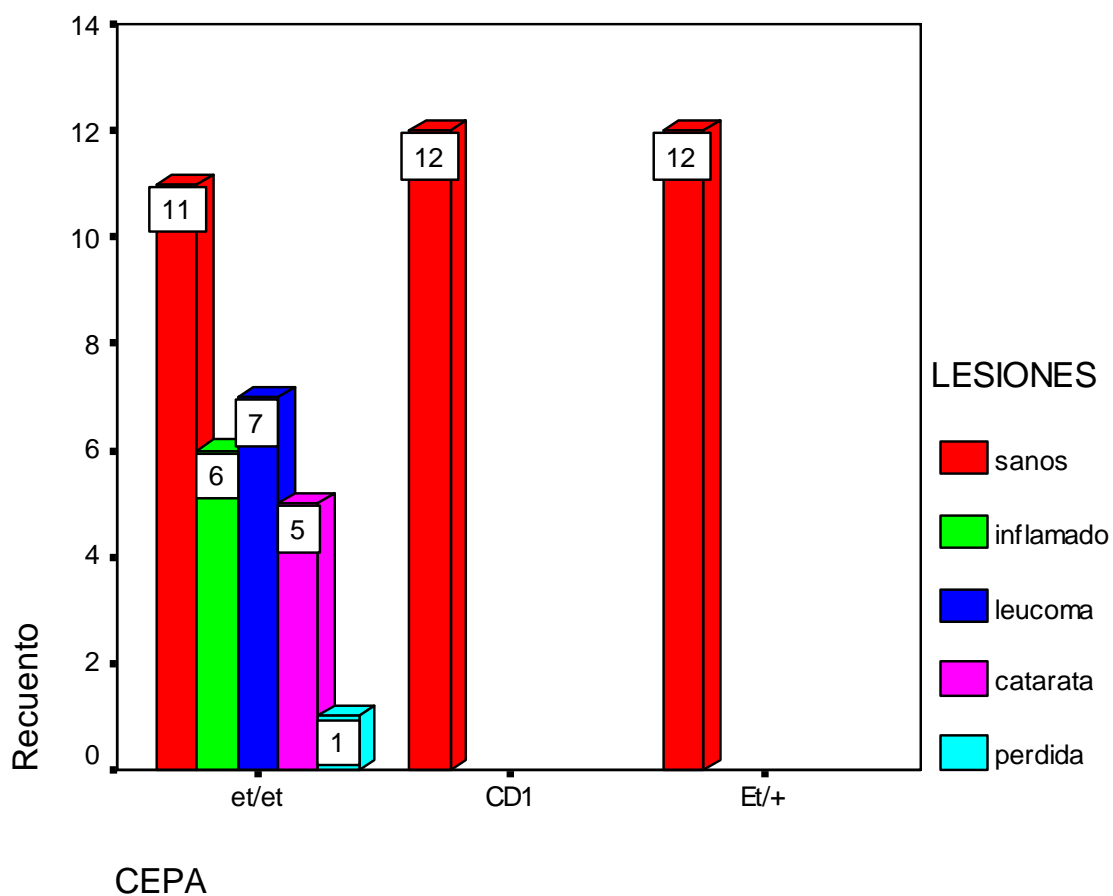


Fig. C Ratón et/et con pérdida de ojo y formación de catarata.

11.2 Alteraciones oculares en los ratones de las diferentes cepas después de la administración de selenito de sodio.

CEPA	SANO	INFLAMADO	LEUCOMA	CATARATA	PERDIDO
et/et	36.7%	20%	23%	16.70%	3.30%
CD1	100%	0%	0%	0%	0%
Et/+	100%	0%	0%	0%	0%

TABLA 1. Porcentaje de incidencia de alteraciones presentes en los ojos de las diferentes cepas de ratones tratados con Selenito de Sodio.



GRÁFICA 1. Se muestra el recuento de las lesiones de cada cepa, expresado por número de ratones.

11.3 Comparación de medias entre los pesos glandulares, órganos examinados de las diferentes cepas; después de la administración de selenito de sodio.

ORGANO	CEPA	MEDIA(g)	ERROR
	et/et	0.102503	0.0047207
BAZO	CD1	0.166483	0.0065981
	Et/+	0.142792	0.0377687
	et/et	0.026363	0.0083625
GLÁNDULAS MAX	CD1	0.023917	0.0012724
	Et/+	0.017667	0.0010334
	et/et	0.037690	0.0017464
GLÁNDULAS LAG	CD1	0.017592	0.0017761
	Et/+	0.046675	0.0036898
	et/et	1.909103	0.0827537
HÍGADO	CD1	1.800208	0.1031401
	Et/+	2.359117	0.0650351

TABLA 2. Comparación de las medias del peso de los órganos después de la administración de Selenito de Sodio, analizados mediante ANOVA con diferencia significativa $p < 0.05$, y una confianza del 95%

11.4 Comparación múltiple de medias entre los pesos de órganos; pesos glandulares y los niveles de las pruebas realizadas de las diferentes cepas después de la administración de selenito de sodio

Variable dependiente	(I) CEPA	(J) CEPA	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
						Límite superior	Límite inferior
BAZO	et/et	CD1	-.063980(*)	.0090743	.000	-.085885	-.042075
		Et/+	-.040288(*)	.0090743	.000	-.062194	-.018383
	CD1	et/et	.063980(*)	.0090743	.000	.042075	.085885
		Et/+	.023692	.0108459	.084	-.002490	.049873
	Et/+	et/et	.040288(*)	.0090743	.000	.018383	.062194
		CD1	-.023692	.0108459	.084	-.049873	.002490
GLÁNDULAS MAXILARES	et/et	CD1	.002447	.0023347	.550	-.003189	.008082
		Et/+	.008697(*)	.0023347	.001	.003061	.014332
	CD1	et/et	-.002447	.0023347	.550	-.008082	.003189
		Et/+	.006250	.0027904	.074	-.000486	.012986
	Et/+	et/et	-.008697(*)	.0023347	.001	-.014332	-.003061
		CD1	-.006250	.0027904	.074	-.012986	.000486
GLÁNDULAS LAGRIMALES	et/et	CD1	.020098(*)	.0033367	.000	.012044	.028153
		Et/+	-.008985(*)	.0033367	.025	-.017040	-.000930
	CD1	et/et	-.020098(*)	.0033367	.000	-.028153	-.012044
		Et/+	-.029083(*)	.0039881	.000	-.038711	-.019456
	Et/+	et/et	.008985(*)	.0033367	.025	.000930	.017040
		CD1	.029083(*)	.0039881	.000	.019456	.038711
HÍGADO	et/et	CD1	.108895	.1500546	.749	-.253334	.471124
		Et/+	-.450013(*)	.1500546	.011	-.812242	-.087785
	CD1	et/et	-.108895	.1500546	.749	-.471124	.253334
		Et/+	-.558908(*)	.1793496	.008	-.991855	-.125962
	Et/+	et/et	.450013(*)	.1500546	.011	.087785	.812242
		CD1	.558908(*)	.1793496	.008	.125962	.991855
CERULOPLASMINA	et/et	CD1	-5.940(*)	1.7444	.004	-10.151	-1.729
		Et/+	-5.490(*)	1.7444	.008	-9.701	-1.279
	CD1	et/et	5.940(*)	1.7444	.004	1.729	10.151
		Et/+	.450	2.0849	.975	-4.583	5.483
	Et/+	et/et	5.490(*)	1.7444	.008	1.279	9.701
		CD1	-.450	2.0849	.975	-5.483	4.583

NITRITOS	et/et	CD1	-21.6792	22.57979	.605	-76.1864	32.8279
		Et/+	14.2853	22.57979	.803	-40.2219	68.7924
	CD1	et/et	21.6792	22.57979	.605	-32.8279	76.1864
		Et/+	35.9645	26.98801	.384	-29.1840	101.1130
	Et/+	et/et	-14.2853	22.57979	.803	-68.7924	40.2219
		CD1	-35.9645	26.98801	.384	-101.1130	29.1840
RIÑONES	et/et	CD1	.210225(*)	.0471339	.000	.096445	.324005
		Et/+	-.118942(*)	.0471339	.039	-.232722	-.005161
	CD1	et/et	-.210225(*)	.0471339	.000	-.324005	-.096445
		Et/+	-.329167(*)	.0563358	.000	-.465160	-.193173
	Et/+	et/et	.118942(*)	.0471339	.039	.005161	.232722
		CD1	.329167(*)	.0563358	.000	.193173	.465160

* La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

TABLA 3. Comparación de las diferencias de medias de los pesos de los órganos, analizados mediante ANOVA con diferencia significativa ($p < 0.05$) y una confianza del 95%

11.5 SUBCONJUNTOS HOMOGENEOS.

11.5.1 BAZO

HSD de Tukey

CEPA	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
et/et	30	.102503		
Et/+	12		.142792	
CD1	12			.166483
Sig.		1.000	1.000	1.000

TABLA 4. Comparación de las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos del Bazo.

El análisis de varianza de un factor aplicado a los pesos de bazo entre los grupos de cepa mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3) y cuando se aplicó la prueba de tukey el grupo CD1 presentó un mayor peso que los ratones de la cepa et/+ y estos a su vez que los et/et (Tabla 4).

11.5.2 GLÁNDULAS MAXILARES

HSD de Tukey

CEPA	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
Et/+	12	.017667	
CD1	12		.023917
et/et	30		.026363
Sig.		1.000	.593

TABLA 5. Comparación de las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos de las glándulas maxilares.

El análisis de varianza de un factor aplicado a los pesos glandulares maxilares entre los grupos de cepa mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3), y cuando se aplicó la prueba de tukey se observó que el grupo et/et presentó el mayor peso glandular maxilar comparado con los Et/+ y que no tiene diferencia significativa con el grupo CD1 ($p > 0.05$) (Tabla 5).

11.5.3 GLÁNDULAS LAGRIMALES

HSD de Tukey

CEPA	N	Subconjunto para alfa = .05		
		2	3	1
CD1	12	.017592		
et/et	30		.037690	
Et/+	12			.046675
Sig.		1.000	1.000	1.000

TABLA 6. Comparación de las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos de las glándulas lagrimales.

El análisis de varianza de un factor aplicado a los datos de los pesos glandulares lagrimales entre los grupos de cepa mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3) y cuando se aplicó la prueba de tukey el grupo Et/+ presentó mayor peso glandular lagrimal comparado con los ratones et/et y estos a su vez que los ratones CD1 (Tabla 6).

11.5.4 HÍGADO

HSD de Tukey

CEPA	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
CD1	12	1.800208	2.359117 1.000
et/et	30	1.909103	
Et/+	12		
Sig.		.777	

TABLA 7. Comparación de las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos del Hígado.

El análisis de varianza de un factor aplicado a los pesos de hígado entre los grupos de cepas mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3) y cuando se aplicó la prueba de tukey el grupo et/+ presentó un peso mayor que el grupo et/et y CD1 mientras tanto estas dos últimas no tienen diferencia significativa (Tabla 7).

11.5.5 CERULOPLASMINA

HSD de Tukey

CEPA	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
et/et	30	31.860	37.350 37.800
Et/+	12		
CD1	12		
Sig.		1.000	.968

TABLA 8. Comparación de las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos de Ceruloplasmina.

El análisis de varianza de un factor aplicado a los niveles de ceruloplasmina entre los grupos de cepa mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3) y cuando se aplicó la prueba de tukey el grupo CD1 presento el mayor nivel, y el grupo et/et el menor observando que entre el grupo et/+ y CD1 no se presenta diferencia significativa ($p > 0.05$) (Tabla 8).

11.5.6 NITRITOS

HSD de Tukey

CEPA	N	Subconjunto para alfa = .05
		1
Et/+	12	33.3332
et/et	30	47.6184
CD1	12	69.2977
Sig.		.304

TABLA 9. Comparación de las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos de Nitritos.

El análisis de varianza de un factor aplicado a los niveles de nitritos entre los grupos de cepa no mostró diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3) y cuando se aplicó la prueba de tukey se observa que no existe diferencia significativa.

11.5.7 RIÑONES

HSD de Tukey

CEPA	N	Subconjunto para alfa = .05	
		2	1
CD1	12	.357375	
et/et	30		.567600
Et/+	12		.686542
Sig.		1.000	.057

TABLA 10. Comparación de las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos de los Riñones.

El análisis de varianza de un factor aplicado a los pesos de los riñones entre los grupos de cepa mostró una diferencia significativa ($p < 0.05$) (Tabla 3) y cuando se aplicó la prueba de tukey el grupo et/+ presentó mayor peso comparado con los ratones et/et y CD1 que no presentaron diferencia significativa (Tabla 10).

12. ANÁLISIS DE RESULTADOS.

De acuerdo a la hipótesis planteada, se logró comprobar que el selenito de sodio indujo cataratas visibles sólo en el 16.70 % de los ratones et/et tal y como se puede observar en la gráfica 1; el 20% presentó inflamación; 23% presentó leucoma etapas que podrían ser previas a la aparición de cataratas; ya que esta puede desarrollarse en el ojo después de una lesión; inflamación o alguna otra enfermedad ocular. 3.30% perdieron el ojo; con respecto a la cepa Et/+ y CD1 el 100% no presentó alteración ocular visible. (Tabla 1).

Se sabe que los compuestos de selenio, especialmente el selenito de sodio puede mostrar propiedades tóxicas. En animales la dosis mínima letal por administración intravenosa de selenito de sodio es entre 1.5 y 3mg/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.²⁵

Con los datos obtenidos con base a la comparación de las diferentes cepas se obtuvo que la cepa et/et presentó diferencia significativa en los niveles de ceruloplasmina (Tabla 8), esto debido a que es una proteína de fase aguda que se incrementa durante procesos inflamatorios e infección en los tejidos²⁶, con lo ya mencionado se establece que al administrar el selenito de sodio se produjo un proceso inflamatorio que al momento del estudio ya no estaba presente, aunado a que con la edad disminuyen los antioxidantes y la ceruloplasmina tiene una actividad antioxidante muy importante.

En la determinación de los niveles de Nitritos entre las diferentes cepas no se encontró alguna diferencia significativa esto aporta información interesante en los resultados de esta tesis ya que se comprueba que el daño causado a los ratones de la cepa et/et; por la administración del selenito de sodio fue restaurado y la capacidad antioxidante del organismo ante el daño oxidativo puede ser regenerada.

Probablemente la pérdida del GSH de los lentes y su capacidad oxido/reducción fue reparada gracias a que estos no habían concluido su periodo de maduración (16 días de edad¹⁷), aunado que al nacer los ratones et/et tienen un timo normal²⁰, al ser administrado el selenito de sodio tenía suficientes reservas de antioxidantes entre ellos GSH y ceruloplasmina y una inmunidad normal.

La prueba de proteína C reactiva no se analizó estadísticamente ya que no hubo suficientes casos positivos obteniendo solo 5 casos positivos de los 54 ratones analizados. (No se toma en cuenta esta prueba para el análisis de resultados).

Con respecto a las glándulas maxilares se observó que el peso obtenido es mayor en los ratones et/et que los ratones et/+ (Tabla 5), sugiriendo daño en estos últimos por la influencia del gen mutado, esto pudiera explicarse debido a que se cree que la catarata inducida en los ratones et/et fue cortical y desaparece espontáneamente en unos pocos meses, restaurando esencialmente las células normales del epitelio dentro y fuera de la corteza¹⁶.

Las glándulas lagrimales juegan un rol fundamental ya que gracias a estas es que mantiene lubricado el ojo pero debido al proceso inflamatorio y a la reducción de la secreción de esta glándula se provoca una mala lubricación y como consecuencia opacidad de la cornea; presencia de catarata y evolucionando a pérdida del ojo²⁰, de tal suerte que los ratones con mayor pérdida de ojos fueron los ratones et/et con un peso menor de las glándulas lagrimales que los ratones et/+, pero mayor que los ratones CD1 (Tabla 6), al no encontrar niveles altos de ceruloplasmina en los ratones et/et podemos decir que el proceso inflamatorio había terminado al momento del estudio, lo cual nos ayuda a confirmar la teoría que las cataratas inducidas fueron corticales y que el daño oxidativo causado por la administración de selenito de sodio puede ser regenerado. Por otro lado los ratones et/+, obtuvieron el mayor peso de las glándulas lagrimales probablemente a que estaban cursando un proceso inflamatorio y que empezó después que en los ratones et/et por ende se

puede decir que la presencia del gen influye para que el daño se lleve a cabo por un proceso más lento.

El selenito es llevado por la corriente sanguínea al hígado, y al bazo en donde es reducido a Selenio elemental, por la glucosa. El Selenio elemental no es tóxico. Cuando el organismo no puede reducir el selenito por deficiencia de glucosa o exceso de él, se produce el ataque a las células destruyéndolas. El Se está ligado a las proteínas principalmente globulinas. El Se encuentra distribuido por todo el cuerpo, pero hay algunos órganos en los que se deposita en la mayor proporción y son: hígado, riñones, bazo, y corazón²⁷. Sabiendo esto se observa que los ratones et/et obtuvieron un peso menor de los órganos en comparación con los ratones et/+, probablemente debido a que se generó un proceso inflamatorio antes en los ratones et/et que en los ratones et/+, esto se puede deber a la homocigocidad de la cepa y que en el momento del estudio los ratones et/et ya no estaban cursando por dicho proceso, ya que probablemente el selenito de sodio que se pudo haber acumulado en dichos órganos pudo ser reducido Se elemental por la acción de la glucosa, ayudando a que este tuviera actividad biológica a través de la enzima Glutathion Peroxidasa (GSH-Px), con lo cual fue capaz de reducir los efectos destructivos sobre células vivas de reacciones peroxidativas, además como se ha comentado la cantidad de antioxidantes es mayor a edades tempranas. Los ratones CD1 mostraron el mayor peso del bazo, con lo cual podemos decir que presentaban inflamación ya que los niveles de ceruloplasmina en esta cepa se encontraban elevados, probablemente debido a la administración del selenito de sodio.

13. CONCLUSIONES:

- Se concluye, que posterior a la administración de Selenito de Sodio los ratones de la cepa et/et presentaron alteraciones oculares visibles y no así los ratones de las cepas Et/+ y CD1.
- Se logró determinar que la cepa et/et presenta menores niveles de ceruloplasmina, con lo cual se logra establecer que el efecto del selenito de sodio al ser administrado fue la inducción de cataratas corticales; también se establece que los niveles de este antioxidante son mayores en edades tempranas.
- Se estableció que no existe diferencia significativa entre cepas del nivel de nitritos; después de la administración de selenito de sodio.
- Se logró determinar que los pesos de los órganos (bazo; hígado y riñón) fueron menores en los ratones et/et ya que la acción antioxidante de SGH, ceruloplasmina y demás antioxidantes por la edad temprana de la administración no permitieron la acumulación en los órganos y por ende daño a los mismos.
- Se propone utilizar ratones de edad mayor a 20 semanas de vida para evaluar el efecto del selenito de sodio, según lo planteado en este trabajo habrá mayor daño oxidativo debido a que el nivel de antioxidantes no es tan elevado y la hipotimia estará desarrollada.

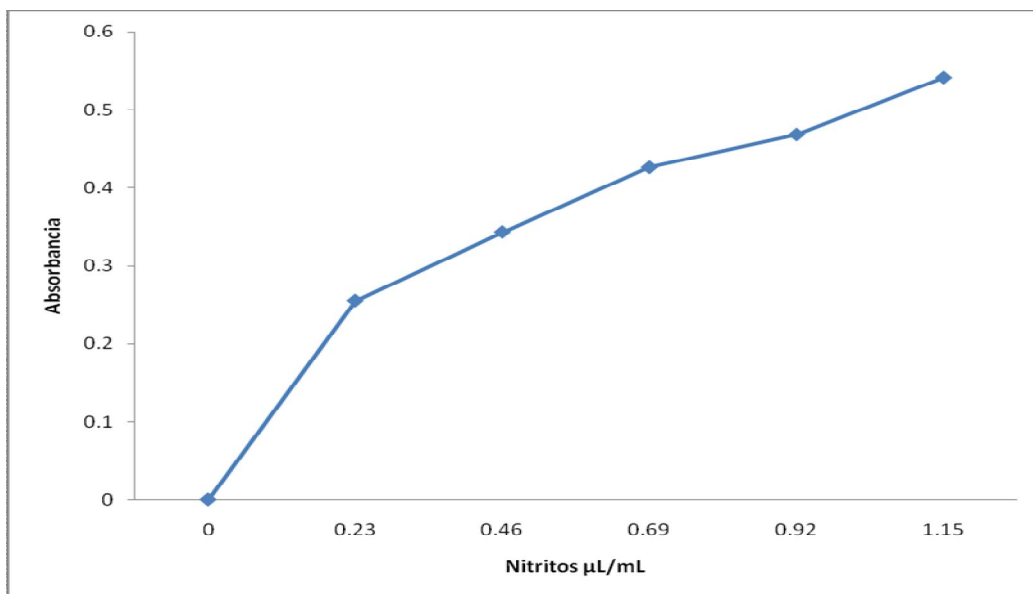
1. ANEXOS

TABLA Y GRÁFICA DE CURVA ESTÁNDAR

Determinación de nitritos por el método de Griess

Tubo	Estándar (μL)	Agua destilada (μL)	Absorbancia	Concentración (μg/mL)
1	0	900	0	0
2	100	800	0.255	0.23
3	200	700	0.343	0.46
4	300	600	0.426	0.69
5	400	500	0.468	0.92
6	500	400	0.541	1.15

Tabla 11. Curva estándar para la determinación de nitritos. Concentración del estándar 230 μg/mL de Nitrito de Sodio.



Gráfica 2. Curva estándar de Nitritos.

2. REFERENCIAS

1. Congdon NG, Friedman DS, Liefman T. Important causes of visual impairment in the world today. JAMA. 2003;290(15):2057-60.
2. Gaceta de Comunicación Interna de la Secretaría de Salud. Atenderá el Seguro Popular las enfermedades visuales que más afectan a los mexicanos. D.F. [México]: Salud, 2005;34:3
3. Sichi H. Cataract formation and prevention. Expert Opin Investig Drugs. 2004;13(6):691-701.
4. Kyselova Z. Different experimental approaches in modelling cataractogenesis: An overview of selenite-induced nuclear cataract in rats. Toxicology 2010;3:3-14
5. Hui-Ping Q, Shu-Qin W, Xiang-Chun G, et al. Ursodeoxycholic acid prevents selenite-induced oxidative stress and alleviates cataract formation: In vitro and in vivo studies. Molecular Vision. 2012; 18:151-160.
6. Cirugías de Cataratas. 2012. Disponible en URL:http://www.dr-simon.net/contenido_cataratas.htm Consultado en Julio 25, 2012
7. Bobrow JC. Cristalino y Cataratas. 1ª Edición. Barcelona: Editorial Elsevier; 2009

8. Phyllis A. Prescription for nutritional healing. 2ª Edición. USA: Editorial Penguin Group; 2000
9. Rodríguez J, Menéndez J, Trujillo Y. Radicales libres en la biomedicina y estrés oxidativo. Rev Cubana Med Milit 2001; 30
10. Vinson JA Review Oxidative stress in cataracts. Pathophysiology 2006;13:151-162.
11. Kyselova Z, García SJ, Gajdosik A, et al. Temporal relationship between lens protein oxidation and cataract development in streptozotocin-induced diabetic rats. Physiol Res 54:49-56.
12. Huang LL, Hess JL, et al. DNA Damage, repair and replication in selenite induced cataract in rats lens. Curr Eye Res. 1990;9:1041-1050.
13. Worgul BV, Medvedovsky C, Huang Y, et al. Quantitative assessment of the cataractogenic potential of very low doses of neutrons. Radiat Res. 1996 145:343-349.
14. Wei Michael, Ong Leslie, Smith MT, et al. The streptozotocin-diabetic rat as model of chronic complications of human diabetes. J Diab Complications; 15: 4-9.

15. Ajani E, Salako A, Sharlie P, 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
16. 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; 14:274-285.
17. Shearer TR, Ma H, Fukiage C, Azuma M. Selenite nuclear cataract: review of the model. *Molecular Vision*. 1997; 3:8-15.
18. Shearer TR, David LL, Anderson RS, Azuma M. Review of selenite cataract. *Curr Eye Res*.1992; 11:357-69
19. David LL, Azuma M. Cataract and the acceleration of calpain-induced β -crystallin insolubilization occurring during normal maturation of rat lens. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1994; 35:785-793.
20. Marroquín R, Lara MA, Calvillo R, García 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.

21. Yapur V, Bustos MF, González AS, Negri GA. Ceruloplasmina: Determinación de su actividad ferroxidasa. Acta Bioquímica Latinoamericana. 2007; 41(3):347-351.
22. Ferrer D, Jorge C, García RE, Martínez PF. Óxido Nítrico: Importancia biológica y participación en algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. MEDISAN. 1998;2(3):45-53.
23. Duarte MJ, Espinosa LRF, Díaz MS, Sánchez RG, et al. Óxido Nítrico: metabolismo e implicaciones clínicas. Med Int Mex. 2008; 24(6):397-406.
24. Prieto FM, Pezzotto S, Kilstein J, Bagilet D. Proteína C reactiva como factor pronóstico de mortalidad en terapia intensiva. MEDICRIT. 2008; 5(1): 13-22.
25. Viant F, Fonseca CJ, García R, Martínez P. Óxido nítrico, importancia biológica y participación e algunas funciones cardiovasculares y hematológicas. Medisan 1998;2:45-53.
26. Banha J, Marques L, Oliveira R, Martins M, Paixao 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. Revista Acovez 2013; [En línea]. DÍPONIBLE en URL:http://www.encolombia.com/veterinaria/acovez24284_alg_unas14.htm