

Artículo de revisión

Modelos animales de retinopatía diabética: comprensión de la patogénesis y potencial utilización en el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos

(Animal models of diabetic retinopathy: understanding the pathogenesis and potential use in the development of new therapeutic agents)

Por Paula V. Subirada Caldarone (estudiante de Bioquímica), Biól. Valeria E. Lorenc y Dra. María Cecilia Sánchez

csanchez@fcq.unc.edu.ar

Integrantes del CIBICI-CONICET, Departamento de Bioquímica Clínica, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

Resumen:

La retinopatía diabética (RD) es la complicación microvascular más común de la diabetes y una de las principales causas de ceguera en todo el mundo. Varios modelos animales, generados por inducción farmacológica, dietas hipocalóricas y de forma espontánea por endogamia selectiva o modificación genética, han sido utilizados para investigar la patogénesis de la RD. Entre ellos, los roedores han sido los más estudiados debido a su corto tiempo de generación, a la hiperglucemia heredada y/o a la obesidad que afecta a ciertas cepas. En particular, los ratones han demostrado ser útiles para el estudio de las etapas iniciales de la RD. Sin embargo, actualmente ningún modelo animal es capaz de reproducir las complicaciones vasculares y no vasculares asociadas con las etapas más avanzadas, encontradas en humanos. En esta revisión, intentamos destacar las ventajas y desventajas de estos modelos y brindar información para la planificación de estudios que apunten al mejor entendimiento de la RD así como al desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas útiles para su prevención y tratamiento.

Abstract:

Diabetic retinopathy (DR) is the most common microvascular complications of diabetes and one of the leading causes of blindness worldwide. Several animal models have been generated by pharmacological induction, feeding a galactose diet and spontaneously by selective inbreeding or genetic modification. Among them, rodents have been the most studied because of their short generation time, and the inherited to hyperglycemia and / or obesity that affects certain strains. Particularly, mice have shown to be a useful tool for the study of early, non-proliferative stage of the DR. However, at this time no animal model has yet been found to reproduce the vascular and non-vascular complications associated with advanced stages of the disease. In this review, we show the advantages and disadvantages of these models and we also provide information for planning experimental studies of DR that will lead to new strategies for its prevention and treatment.

Palabras clave

Diabetes Mellitus, Modelos Animales, Retinopatía, Vasos, Glia, Neuronas.

Resumen Gráfico

Retinopatía Diabética (RD)



La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica crónica que está adquiriendo en los últimos años proporciones de auténtica epidemia. Se clasifica en tipo 1 y tipo 2, siendo esta última la más frecuente (95%). Una de las principales complicaciones es la retinopatía diabética (RD) que genera un deterioro en los vasos sanguíneos de la retina. En la actualidad, la RD es una de las causas más frecuentes de déficit visual y ceguera que afecta a adultos entre 24 y 74 años de edad. Desde el punto de vista clínico, la RD tiene dos etapas principales: la no proliferativa que presenta microaneurismas, hemorragias intrarretinianas y exudados; y la proliferativa, con neovasos, obliteración de capilares, hemorragias y edemas intensos. Según estadísticas mundiales, se estima que cerca del 25% de la población diabética presenta algún grado de retinopatía, el 5% la padece en grado moderado y el 1,2% en grado avanzado con pérdida de visión inevitable. Sin embargo, la incidencia puede ser reducida mediante un óptimo control de la glucemia y de la presión arterial, entre otros (1-3). En la actualidad los tratamientos existentes (fotocoagulación, vitrectomía, inyección intraocular de anticuerpos monoclonales) intentan detenerla pero sólo en casos muy puntuales logran mejorar la pérdida de la visión (2).

Desde sus comienzos, la RD siempre ha sido considerada una enfermedad vascular. Sin embargo, una variedad de técnicas oftalmológicas altamente sensibles como el electroretinograma (ERG) y la tomografía de coherencia óptica (OCT), sugieren que mucho antes de las lesiones vasculares aparecen alteraciones en células neuronales y gliales de la retina. Estas incluyen modificaciones en la amplitud y latencia del ERG, apoptosis de neuronas retinales, así como incrementada expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en la retina (4).

Es por ello que un mayor entendimiento de los mecanismos bioquímicos, celulares y moleculares involucrados en la progresión de la RD es esencial para el desarrollo de nuevos fármacos y el uso de modelos animales proporciona una herramienta indispensable para ello. Al presente, en la mayoría de los modelos animales estudiados solo

ha sido posible observar el desarrollo de las etapas iniciales, pero no la progresión hacia lesiones más avanzadas como la neovascularización proliferativa, observada en humanos. Además, la mayoría de los estudios de RD han sido realizados en modelos animales que reproducen características de la diabetes tipo 1, a diferencia de los modelos de resistencia a la insulina (diabetes tipo 2) (5), siendo que esta es la presentación más frecuente en humanos. Dado que cada modelo animal tiene sus propias ventajas y desventajas, la elección del mismo dependerá de los objetivos y alcances particulares de cada estudio.

Modelos experimentales de RD

Grandes animales

Se ha logrado establecer modelos de RD en perros, gatos, cerdos y monos los cuales principalmente han sido inducidos en forma experimental por suministro de aloxano, estreptozotocina (STZ), hormona de crecimiento o pancreatectomía. En estos mamíferos los cambios observados en los vasos sanguíneos retinales asociados con los diferentes estadios de la retinopatía son similares a los observados en humanos diabéticos. Sin embargo, presentan múltiples desventajas como el elevado costo de mantenimiento, la falta de anticuerpos específicos, el desarrollo lento de la patología, y técnicas de manipulación genética menos precisas, entre otros (6).

Pequeños animales

Las ratas son generalmente más grandes y más fáciles de manejar que los ratones. Sin embargo, no son tan fáciles de manipular genéticamente como los ratones que tienen un historial y líneas genéticamente definidas, además de cientos de mutaciones y rearrreglos cromosómicos disponibles.

La inducción química de diabetes en ratas con estreptozotocina o aloxano, ha sido el principal modelo para la investigación de retinopatía en diabetes tipo 1 (7). Anormalidades no vasculares (neuronales y gliales), medibles por ERG que preceden a los cambios vasculares, han sido

observadas en este modelo. Además, presenta pérdida de pericitos, engrosamiento de la membrana basal y aumento de permeabilidad vascular similar a lo observado en ratas Biobreeding (BB), que generan espontáneamente diabetes tipo 1 (8).

Respecto a modelos espontáneos de diabetes tipo 2 en ratas obesas, la cepa Zucker (9), presenta cambios cuantificables en la vasculatura, por lo cual constituye un excelente modelo para el desarrollo de nuevos agentes farmacológicos. Otro modelo es la rata WBN/Kob (10), que manifiesta cambios proliferativos intraretinales sin presencia de neovasos. Interesantemente, la rata Otsuka Long-Evans Tokushima (11), presenta manifestaciones clínico-patológicas que se asemejan bastante a las de la diabetes tipo 2 humana, con significativa disminución del espesor de las capas celulares.

Analizando modelos de ratas no obesas con diabetes tipo 2, las Goto-Kakizaki (12) son de gran ayuda para el estudio de cambios en la microcirculación retinal durante largos períodos de tiempo, debido al mantenimiento de su estado diabético. Otra cepa, las ratas Torii (13), desarrollan neovascularización en ausencia de isquemia, lo cual no ocurre en individuos diabéticos. Por lo tanto, se necesitan estudios adicionales antes de que puedan ser consideradas como un modelo de RD.

En cuanto a diabetes espontánea en ratones contamos con animales no obesos que desarrollan diabetes tipo 1 por destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas; los ratones obesos diabéticos tipo 2 db/db deficientes en el receptor de leptina; y los ratones Akita que presentan una mutación dominante en el gen de la insulina 2. Estos animales muestran además de alteraciones vasculares, alteraciones morfológicas en astrocitos y microglia así como pérdida de células ganglionares (CGR) (14). Este modelo es útil para analizar drogas neuroprotectoras en un periodo de tiempo relativamente corto (4-5 meses) además de permitir estudiar la iniciación y progresión precoz de la RD.

Cabe destacar que la diabetes inducida por STZ en el ratón tiene menos éxito que en la rata y

los ratones solo desarrollan alteraciones vasculares de la RD temprana (15).

Un modelo de ratón transgénico denominado "Akimba" ha mostrado las características claves de las cepas que le dieron origen: sobreexpresión de VEGF (Kimba) y la diabetes tipo 1 espontánea (Akita) (16). Estos ratones presentan cambios neovasculares debidos no a la hiperglucemia sino a la sobreexpresión de VEGF.

Finalmente, si bien los roedores alimentados con dietas ricas en galactosa carecen de anomalías metabólicas características de la diabetes, desarrollan complicaciones retinianas por lo cual pueden ser considerados como una valiosa herramienta para el estudio de la patogénesis de la RD (6).

Otros nuevos modelos

El *Psammomys obesus* habitualmente vegetariano, debido a cambios en la dieta en el laboratorio se hace obeso, resistente a insulina e hiperglucémico. Estos animales muestran, además de alteraciones vasculares y no vasculares características de la RD, una reducida expresión de opsinas en los conos, lo cual también se observa en la retinopatía, en humanos. Esta última característica sugiere el uso de este modelo para analizar terapias neuronales específicas, las cuales son difíciles de estudiar experimentalmente en humanos.

El Pez cebra posee una retina similar a la humana. La inmersión del mismo en una solución de glucosa al 2 % aumenta significativamente la glucemia y produce en la retina, lesiones neurodegenerativas y vasculares parecidas a las de la RD no proliferativa humana (18).

Finalmente, monos Titi alimentados con una dieta rica en galactosa muestran capilares acelulares, microaneurismas, edema retinal leve y pérdida vascular retinal, característicos de la RD (19). Este modelo presenta la ventaja de ser genética y fisiológicamente cercano a los humanos, pero la divergencia filogenética entre los grupos de primates no humanos es un tema que debe ser considerado.

Si bien los modelos animales de RD son una herramienta fundamental para el estudio de la patogénesis y posibles tratamientos paliativos, cada uno de ellos nos permite indagar sobre uno o un conjunto particular de aspectos de la patología. Es por ello que serán necesarias nuevas investigaciones que apunten al desarrollo de modelos animales que reproduzcan la progresión de la RD en un corto periodo de tiempo (no mayor a 2 años), y sean además capaces de reproducir las alteraciones funcionales (no vasculares) de la etapa pre-clínica. Al respecto, cada vez hay más evidencias que indican que los cambios neuronales y gliales preceden a los cambios estructurales vasculares pudiendo contribuir a la patogenicidad de los mismos y de allí la importancia de realizar análisis electro fisiológicos como el ERG. Además, un aspecto muy importante a tener en cuenta es que los estudios en modelos animales son considerados desde el punto de vista ético, un pre-requisito para posteriores ensayos clínicos en humanos.

Por todo lo anteriormente expuesto consideramos invaluable el aporte que estos modelos animales han realizado durante años, y lo seguirán haciendo, a las investigaciones de RD en pos de disminuir la tasa de ceguera y asegurar a la población la detección temprana de la patología y un tratamiento eficiente que mejore su calidad de vida.

Referencias Bibliográficas

1. Zimmet, P., et al. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* (2001) 414, 782-7.
2. Antonetti, D.A., et al. Diabetic retinopathy. *N Engl J Med.* (2012) 366, 1227-39.
3. Grosso, A., et al. Similarities and differences in early retinal phenotypes in hypertension and diabetes. *J. Hypertens.* (2011) 29, 1667-1675.
4. The International Retinal Research Foundation. *Diabetic Retinopathy: Where We Are and A Path to Progress.* Ashburn, Virginia (USA), 2011.
5. Kern, T.S. and Mohr, S. Nonproliferative Stages of DR: Animal Models and Pathogenesis (2007) In: *Retinal vascular Disease* Gardner, Kirchhof, Ryan, eds. Springer-Verlag Berlin Heidelberg: 303.
6. Robinson, R., et al. Update on animal models of DR: from molecular approaches to mice and higher mammals. *Dis Model Mech.* (2012) 4, 444-456.
7. Kern, T.S., and Engerman, R.L. Comparison of retinal lesions in alloxan-diabetic rats and galactose-fed rats. *Curr Eye Res* (1994)13, 863-867.
8. Mordes, J.P., et al. Rat models of type 1 diabetes: genetics, environment, and autoimmunity. *Illar Journal* (2004) 45, 278-291.
9. Zucker, L.M. and Zucker, T.F. Fatty, a new mutation in rat. *J. Hered.* (1961) 52, 275-278.
10. Tsuji, N., et al. DR and choroidalangiopathy in diabetic rats (WBN/Kob). *Exp. Anim.* (2009) 58, 481-487.
11. Kawano, K., et al. Spontaneous long-term hyperglycemic rat with diabetic complications. Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF) strain. *Diabetes* (1992) 41, 1422-1428.
12. Goto, Y., et al. Development of diabetes in the non-obese NIDDM rat (GK rat). *Adv. Exp. Med. Biol.* (1988) 246, 29-31.
13. Yamada, H., et al. Retinal neovascularization without ischemia in the spontaneously diabetic Torii rat. *Diabetologia* (2005) 48, 1663-1668.
14. Gastinger, M.J., et al. Dendrite remodeling and other abnormalities in the retinal ganglion cells of Ins2Akita diabetic mice. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* (2008) 49, 2635-2642.
15. Kern, T.S., et al. Validation of structural and functional lesions of DR in mice. *Mol. Vis.* (2010) 16, 2121-2131.
16. Rakoczy, E.P., et al. Characterization of a mouse model of hyperglycemia and retinal neovascularization. *Am. J. Pathol.* (2010) 177, 2659-2670.
17. Saidi, T., et al. The sand rat, *psammomys obesus*, develops type 2 DR similar to humans. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2011) 52, 8993-9004.
18. Gleeson, M., et al. Induction of hyperglycaemia in zebrafish (*danio rerio*) leads to morphological changes in the retina. *Acta Diabetol.* (2007) 44, 157-163.
19. Chronopoulos, A. et al. Development of a nonhuman primate model of DR. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* (2011) Abstract #5961.