

# Angiogénesis retiniana inducida por oxígeno en ratón: un modelo económico

Dra. Paola de la Parra-Colín<sup>1</sup>, Dra. Francisca Domínguez-Dueñas<sup>1</sup>, MC Maria Isabel Gracia-Mora<sup>2</sup>,  
Dr. Abelardo Rodríguez-Reyes<sup>1</sup>, Dr. Hugo Quiroz-Mercado<sup>1</sup>

## RESUMEN

**Objetivo:** Reproducir un modelo económico de retinopatía inducida por oxígeno en el ratón, en el que la neovascularización retiniana pueda ser reproducible y cuantificable, para estudiar la patogénesis y terapéutica intervencional de las retinopatías proliferativas.

**Método:** Ratones neonatos C57BL/6:Hsd del centro UNAM-Harlan, fueron expuestos a los 7 días de nacidos a 75% de oxígeno durante 5 días. A los 12 días de nacidos se colocaron en condiciones de normoxia y fueron sacrificados 8 días después. Los ojos enucleados fueron analizados histológicamente para conteo de células endoteliales en la retina.

**Resultados:** En los ratones sometidos a hiperoxia el promedio de núcleos de células endoteliales en cortes histológicos fue de  $175.3 \pm 15.9$  comparado con el grupo control en donde obtuvimos un promedio de  $58.2 \pm 7.5$ . Se realizó una prueba no paramétrica de Mann-Whitney con un valor de  $p=0.002$ .

**Conclusiones:** Se logró reproducir un modelo de retinopatía inducida por oxígeno mediante la implementación de recursos económicos, accesibles a nuestro medio.

**Palabras clave:** Angiogénesis retiniana, retinopatía del prematuro, modelo experimental, ratón.

## SUMMARY

**Purpose:** To reproduce a cheap model of oxygen-induced retinopathy in mouse in which the retinal neovascularization could be reproducible and quantifiable to further study the pathogenesis and interventional therapy of proliferative retinopathies.

**Methods:** Neonatal mice C57BL/6:Hsd from UNAM-Harlan Centre were exposed at 7 days postnatal to 75% oxygen during 5 days. At day 12 postnatal they were returned to normoxic conditions and were killed 8 days later. After enucleation, the eyes were histologically analyzed and the endothelial cells in the retina were counted.

**Results:** In the mice exposed to hyperoxia the average endothelial cell nuclei were  $175.3 \pm 15.9$  SD, compared to the non-exposed with an average of  $58.2 \pm 7.5$ . We used the Mann-Whitney non-parametric statistical test with a  $p=0.002$ .

**Conclusions:** We achieved to reproduce an oxygen-induced retinopathy model using less expensive resources.

**Key words:** Retinal angiogenesis, retinopathy of prematurity, experimental model, mouse.

## INTRODUCCIÓN

La neovascularización retiniana es una de las principales causas de ceguera en el mundo (1). En estas enfermedades, colectivamente denominadas retinopatías proliferativas, que incluyen a la retinopatía diabética, retinopatía por oclusión de rama venosa y retinopatía del prematuro, la hipoxia aparece como el precursor principal de la neovascularización mediante la liberación de factores vasoactivos como el FCVE – factor de crecimiento vascular endotelial (2-5).

A pesar de la prevalencia de estas enfermedades, los eventos bioquímicos responsables de la neovascularización retiniana no se han comprendido en su totalidad. Es de esperarse que un mejor entendimiento de las bases fundamentales de la angiogénesis retiniana pueda mejorar el tratamiento y la prevención de estas patologías.

Con base en esto, surge la idea de desarrollar un modelo animal de angiogénesis retiniana inducida por hipoxia (6-9). El fundamento de este modelo se basa en la fisiopatología de la retinopatía del prematuro, en la cual la hiperoxia o hiperoxia

<sup>1</sup>Asociación para Evitar la Ceguera en México, Hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes

<sup>2</sup>Unidad de Experimentación Animal, Centro UNAM-Harlan, Facultad de Química, UNAM.

Correspondencia: Dra. Paola de la Parra Colín. Asociación para Evitar la Ceguera en México, Hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes. Vicente García Torres 46, San Lucas Coyoacacán, 04030, México DF. Tel. 10841400, E-mail: paola1903@yahoo.com

relativa a la que se exponen los neonatos prematuros da lugar a hipoxia tisular una vez que se reestablecen las condiciones normóxicas (10).

Se han intentado desarrollar diversos modelos de retinopatía inducida por oxígeno, sin embargo, la respuesta neovascular a la hiperoxia había sido inconsistente y poco cuantificable (11-16). Smith y cols. logran establecer las condiciones hiperóxicas y la cepa animal en el que la angiogénesis puede ser cuantificable y reproducible (17).

El objetivo de nuestro trabajo es reproducir este modelo creado por Smith de manera más económica y con recursos menos sofisticados, accesibles a nuestro medio.

### MATERIAL Y MÉTODOS

Este estudio cumplió con los lineamientos establecidos por la NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y la edición en español más reciente del cuidado y uso de los animales de laboratorio (18, 19). Se utilizaron ratones neonatos de la cepa C57BL/6:Hsd (figura 1) del centro UNAM-Harlan. A los 7 días de nacidos se sometieron a una concentración de oxígeno de 75% dentro de una cámara cerrada (figura 2) con un flujo de oxígeno de 1.5 litros por minuto durante 5 días. Permanecieron dentro de la cámara de hiperoxia con madres nodrizas de la cepa ICR (figura 3) con agua y comida *ad libitum*. Las condiciones de temperatura fueron de  $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  y ciclos de luz- oscuridad de 12 horas. A los 12 días de nacidos se abrió la cámara reestableciéndose condiciones de normoxia. Fueron sacrificados 8 días después para enucleación.

#### Cuantificación de células endoteliales

Los ratones fueron sacrificados con 0.1 ml de pentobarbital sódico intraperitoneal, para someterlos a enucleación inmediatamente. Los ojos enucleados se fijaron en formol fosfatado al 10% durante 24 horas. Posteriormente se embebieron en parafina, para realizar cortes histológicos sagitales a través de la córnea y paralelos al nervio óptico, de 6  $\mu\text{m}$  de espesor. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina, la



Fig. 1. Cepa de ratón isogénica C57BL/6:Hsd.



Fig. 2. Caja de acrílico, cerrada herméticamente, con una vía para flujo de entrada donde se conecta el tanque que contiene una mezcla certificada del 75% de oxígeno y 25% de nitrógeno. Al lado opuesto se encuentra la válvula de salida, estableciendo así un microambiente controlado.



Fig. 3. Madre nodriza de la cepa de ratón ICR.

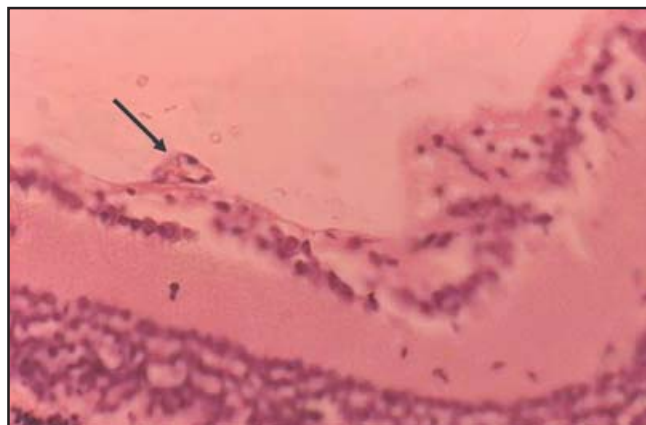
cual permite identificar fácilmente los núcleos de las células endoteliales. Se realizaron aproximadamente 150 cortes seriados de cada ojo y seleccionamos en la mitad central del globo ocular dos cortes a cada lado del nervio óptico con una separación de 30 a 90  $\mu\text{m}$  entre sí. Mediante microscopía de luz se cuantificaron los núcleos de las células endoteliales en 10 campos de gran aumento (figura 4), a partir de la parte anterior de la capa de células ganglionares y hasta el vítreo.

### RESULTADOS

La cuantificación histológica se expresó como número de células endoteliales por corte, por ojo. En los ratones de 20 días de nacidos normales, se encontró un promedio de  $58.2 \pm 7.5$  DE comparado con el grupo sometido a hiperoxia/normoxia en donde obtuvimos un promedio de  $175.3 \pm 15.9$  DE (figura 5, gráfica 1). Se realizó una prueba no paramétrica de



**Fig. 4.** Ejemplo de corte histológico donde se muestran los 10 campos que se tomaron para contar las células endoteliales de la parte anterior de la capa de células ganglionares al vítreo.



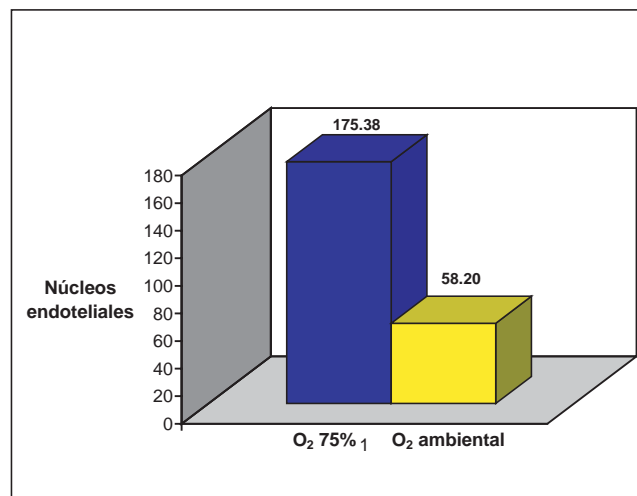
**Fig. 5.** Corte histológico donde se observa con claridad un penacho de neovascularización retiniana (flecha), por encima de la membrana limitante interna.

Mann-Whitney obteniendo un valor de  $p=0.002$  con lo que se demuestra una diferencia estadísticamente significativa.

## DISCUSIÓN

En este modelo de retinopatía proliferativa la hiperoxia causa el cese en el desarrollo normal de la vasculatura retiniana y una vaso-obliteración similar a la observada en la retinopatía del prematuro. Al regresar a condiciones de normoxia, la retina periférica no perfundida se vuelve hipóxica lo que ocasiona una neovascularización patológica.

**Gráfica 1.** Promedio del conteo de células endoteliales en grupo de ratones sometidos a hiperoxia/normoxia, comparado con el grupo de ratones control.



De acuerdo con los hallazgos de Smith y cols., en el desarrollo de la vasculatura retiniana en el ratón, a los 7 días de nacido, se observa una máxima regresión de la vasculatura hialoidea y un mínimo desarrollo de la vasculatura retiniana, por lo que al ser sometidos a condiciones de hipoxia relativa se puede observar una neovascularización retiniana patológica, independiente de la vasculatura hialoidea, lo que permite una mejor cuantificación de la angiogénesis y una consistencia en los hallazgos.

En nuestro trabajo hemos cuantificado los núcleos de las células endoteliales en la retina a partir de la parte anterior de la capa de células ganglionares, a diferencia de lo reportado por Smith en donde cuantifica únicamente a partir de la membrana limitante interna. Esto explica la diferencia en los resultados, ya que los nuestros fueron más elevados en ambos grupos. La justificación de esto es que los neovasos se desarrollan a partir de las capas internas de la retina y técnicamente resulta más sencillo.

Las madres de la cepa C57BL/6:Hsd responden ante situaciones de estrés, como la manipulación y las condiciones de hiperoxia, mediante la canibalización de sus crías debido a que es una cepa muy agresiva. Después de un primer intento fallido en el cual observamos lo anterior, utilizamos madres nodrizas de la cepa ICR las cuales responden con menor agresividad ante situaciones de estrés.

La cuantificación de los núcleos de células endoteliales en la retina es una técnica muy confiable pero requiere de mucho tiempo. Existe la posibilidad de utilizar una técnica más rápida para observar la neovascularización, esto mediante la perfusión de dextrán-fluoresceína y montar las retinas en plano, sin embargo esta técnica es más costosa e implica el uso de infraestructura especializada.

## CONCLUSIONES

Por primera vez en México se logró desarrollar un modelo reproducible y cuantificable de retinopatía proliferativa inducida por oxígeno, mediante la implementación de infraestructura económica, para el estudio de la patogénesis y terapéutica intervencional de diversas patologías de neovascularización retiniana.

## REFERENCIAS

1. Lee O, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: an epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998; 43:245-69.
2. Michaelson IC. The mode of development of the vascular system of the retina, with some observation in its significance for certain retinal diseases. *Eye* 1948; 68:137-180.
3. Aiello LP, Northrup JM, Keit BA, Takagi H, Iwamoto MA. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch Ophthalmol* 1995; 113:1538-1544.
4. Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 1987; 235:442-447.
5. Aiello LP, Avery RL, Arrigg PG y cols. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid of patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N Engl J Med* 1994; 331:1480-7.
6. Michaelson IC, Herz N, Lewkowitz E, Kertesz D. Effect of increased oxygen on the development of the retinal vessels. *Br J Ophthalmol* 1954; 38:577-587.
7. Patz A, Eastham A, Higgenbotham DH, Klek T. Oxygen studies in retrolental fibroplasia: II: The production of the microscopic changes of retrolental fibroplasia in experimental animals. *Am J Ophthalmol* 1953; 36:1511-1522.
8. Ashton N, Ward B, Serpell G. Effect of oxygen on developing retinal vessels with particular reference to the problem of retrolental fibroplasia. *Br J Ophthalmol* 1954; 38:397-432.
9. Gyllenstein LJ, Hellstrom BE. Experimental approach to the pathogenesis of retrolental fibroplasia: II: The influence of the developmental maturity in oxygen-induced changes in the mouse eye. *Am J Pathol* 1955; 39:475-488.
10. Hunter DG, Mukai S. Retinopathy of prematurity: pathogenesis, diagnosis and treatment. *Int Ophthalmol* 1996; 62:412-435.
11. Gole GA, Browning J, Elts SM. The mouse model of oxygen-induced retinopathy: A suitable animal model for angiogenesis research. *Doc Ophthalmol* 1990; 74:163-169.
12. Penn JS, Tolman BL, Lowery LA. Variable oxygen exposure causes preretinal neovascularization in the newborn rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 34:576-585.
13. Patz A. Clinical and experimental studies on retinal neovascularization. *Am J Ophthalmol* 1982; 94:715-743.
14. Pierce EA, Avery RL, Foley ED, Aiello LP, Smith LE. Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in a mouse model of retinal neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:905-909.
15. Chang-Ling T, Tout S, Hollander H, Stone J. Vascular changes and their mechanism in the feline model of retinopathy of prematurity. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1992; 33:2128-2147.
16. Pen Js, Tolman BL, Henty MM. Oxygen-induced retinopathy in the rat: relationship of retinal non-perfusion to subsequent neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:3429-3435.
17. Smith LEH, Wesolowsky E, McLellan A y cols. Oxygen-induced retinopathy in the mouse. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:101-111.
18. DOF.NOM-062-Z00-1999. Especificaciones para la producción y uso de animales de laboratorio. 22 Agosto 1999. 20-74.
19. Institute for Laboratory animal research. Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio. 7a. edición en español. 2002.

### *Cita histórica:*

**Aristófanes** (Atenas 444 a.C. - 385 a.C.) describe el uso de botellas con agua dentro para magnificar la imagen y como lentes para quemar.