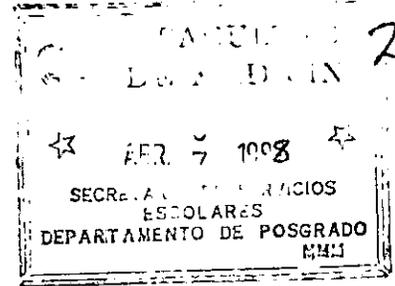


11234

88

29-



TESIS PARA DIPLOMACION DE CIRUJANO OFTALMÓLOGO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

METABOLISMO DE COLAGENA EN VITREORRETINOPATIA DEL
PREMATURO

DR. MATTHEW SCOTT/SORSBY NADEL

266056

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

RESUMEN

Este protocolo aborda el estudio del metabolismo de colágena en el microambiente del espacio vitreoretiniano de pacientes afectados con retinopatía del prematuro grado V. Se estudia el humor vítreo de neonatos con esta enfermedad sometidos a vitrectomía a cielo abierto y muestras controles derivadas de sujetos correspondientes. Se analiza la capacidad para modificar la biosíntesis de colágena de ambos grupos en una línea de células de fibroblastos fetales humanos MRC-5 utilizando marcadores radioactivos en el cultivo.

PALABRAS CLAVE Proliferación Vitreo-Retiniana (P.V.R), Metabolismo de Colágena (M.C.), Retinopatía del Prematuro (R.P.)

INTRODUCCION

La proliferación vitreoretiniana del prematuro (PVR) es una complicación frecuentemente observada en los neonatos pretérmino de bajo peso al nacimiento que presentaron insuficiencia respiratoria y que por ello recibieron terapia ventilatoria prolongada con altas concentraciones de oxígeno. La (PVR) se caracteriza por un desprendimiento de retina en los neonatos pretérmino debido a una proliferación neovascular de esta misma y la formación de membranas en el espacio vitreoretiniano después del nacimiento. La retina termina su vascularización normal durante el último trimestre del embarazo ya que inicia en la papila y termina en la periferia. La región nasal termina su vascularización a los ocho meses, pero la región temporal hasta los nueve.(1) Al ser prematuro un neonato, y estar expuesto a altas concentraciones de oxígeno por largos periodos de tiempo provoca que las áreas de la retina no vascularizadas comiencen a formar vasos. Estos neovasos invaden el espacio vitreoretiniano y provocan la formación de membranas transvitreas y epirretinianas que ocasionan tracción y posteriormente desprendimiento de retina. Hay ocasiones que aún sin estar totalmente desarrollada la vascularización de la retina y con exposición a los factores predisponentes ya mencionados, el neonato no desarrolla ningún tipo de alteración. (2)

El peso al nacimiento (menor a 1300 kgs.) y la concentración de oxígeno al que está sometido un neonato durante las primeras semanas de vida se correlaciona con el grado de afección de la (R.P.) Otro factor importante de valor pronóstico de esta enfermedad es la localización de las áreas afectadas. Cuando la

neovascularización se inicia anterior al ecuador, el desprendimiento de la retina será rara. Si se inicia en el ecuador, es común que se desarrolle cierta tracción. En cambio, si se inicia posterior al ecuador, es muy probable que se desarrolle un desprendimiento importante. (2)

OBJETIVO

Identificar la presencia de factores que modifican la duplicación de fibroblastos en humor vítreo de niños con retinopatía del prematuro comparándolo con un grupo control. Nosotros pensamos que el humor vítreo de casos con (P.V.R.) contiene mediadores que promueven el depósito anormal de colágena, ya sea por un aumento en la producción o una disminución de su degradación.

CLASIFICACION DEL ESTUDIO

Original, Experimental, Prospectivo, Analítico y Básico

MATERIAL Y METODOS

Toma de productos biológicos.

Se obtuvieron 32 membranas de pacientes sometidos a vitrectomía a cielo abierto del servicio de retina en el Hospital Asociación Para Evitar la Ceguera en México "Dr. Luis Sánchez Bulnes" con diagnóstico de R.P. Grado V. Como controles normales se utilizaron (HV) de neonatos fallecidos en el Instituto Nacional de Pediatría con menos de 6 hrs. postmortem. Se obtuvo esta muestra mediante la extracción de un mililitro de humor vítreo vía pars plana con una jeringa de Insulina y aguja de 20 mm. Se almacenaron estas muestras en una temperatura entre 2 y 4 grados C. El lapso de tiempo en el que se llevó a cabo este estudio fue desde enero de 1992 hasta diciembre del mismo año.

CRITERIOS DE INCLUSION:

(GRUPO PATOLOGICO)

- Niños menores de 2 años
- Niños con peso no mayor de 1.300 kgs al nacimiento.
- Niños con menos de 33 semanas de gestación al momento del nacimiento.
- Niños sometidos a incubadoras por periodos mayores de 6 semanas.

- Niños a los que son sometidos a una vitrectomía a cielo abierto como procedimiento quirúrgico terapéutico.
- Ausencia de patología ocular previa o agregada de la ya mencionada.

(GRUPO CONTROL)

- Niños menores de 2 años
- Niños con mas de 37 semanas de gestación al momento del nacimiento.
- Niños que no hayan estado sometidos a altas concentraciones de oxígeno por un periodo no mayor a una semana en ningun momento de su vida.
- Niños con peso mayor a 1.300 Kgs. al nacimiento.
- Autorización para la realizár la autopsia para la obtención de la muestra.
- Obtener la muestra con menos de 6 hrs. posterior al fallecimiento.
- No exista ninguna patología ocular previa o agregada.

CRITERIOS DE EXCLUSION

(GRUPO PATOLOGICO)

- Niños mayores de 2 años
- Niños con peso mayor de 1.300 Kgs al nacimiento
- Niños con mas de 32 semanas de gestación al momento del nacimiento.
- Niños sin la presencia del desprendimiento total de la retina.
- Niños que no sean sometidos a una vitrectomía a cielo abierto.
- Niños sometidos a incubadoras por un periodo menor a 6 semanas.
- Niños con cualquier otra patología ocular prévia o actual.

(GRUPO CONTROL)

- Niños mayores de 2 años
- Niños con menos de 37 semanas de gestación al nacimiento.
 - Niños que hayan estado expuestos a altas concentraciones de oxígeno por mas de una semana en algun momento de su vida.
- Ausencia de la autorización para realizár la autopsia.
- Obtener la muestra posterior a las 6 hrs. del fallecimiento del niño.
- Patología ocular prévia o actual.

Cultivo de fibroblastos.

Contamos con una línea de fibroblastos humanos cepa MRC-5 adquirida de la American Type Culture Collection. Las células fueron sembradas en frascos de cultivo de 25 cm² (Costar, USA) en Medio de Eagle Modificado por Earle (Biofluids, Rockville, MD) adicionado con 10% de suero fetal de ternera, 50 ug/ml

de Penicilina y Estreptomina y 50 mg de L-glutamina. Las células se mantuvieron en una atmósfera de 5% de CO₂, 95% aire con humedad a saturación (9).

Proliferación de fibroblastos.

Con objeto de identificar la presencia de factores que modifican la duplicación de los fibroblastos en cultivo, se cosecharon fibroblastos a confluencia y se sembraron en placas de cultivo de 24 pozos a una concentración de 1×10^3 células; manteniéndose en cultivos por 24 hrs y se eliminaron las que no se adherieron a la superficie de plástico con reemplazo del medio de cultivo. Inmediatamente después, se adicionó cada uno de los HV cuidando que la dilución introducida al medio de cultivo no supere el 10%.

Después de una hora de incubación en presencia de las muestras, se agregó un pulso de 1 uCi de 3H-Metil-Timidina (Amersham, UK) a cada pozo y se continuo la incubación por espacio de 23 hrs adicionales (10). Al final, las células se cosecharon con auxilio de una cosechadora automática, la Timidina asociada a DNA se separó y utilizamos un contador de centelleo liquido, de acuerdo al procedimiento de Selman y cols.(11) Debido que las membranas eran muy pequeñas se realizó esta metodología utilizando pulls (union de membranas en un mismo experimento para su procesamiento). Por tal motivo hubo 4 pulls de 8 membranas para cada experimento del grupo patológico. Las muestras control se procesaron en forma individual.

Como controles negativos se utilizaron pozos en los que no se agrego (HV) y como control positivo pozos en los que se agrego factor de crecimiento derivado de plaquetas a una concentración final de 1ng/ml. Estos dos controles se utilizaron en los ensayos de proliferación de fibroblastos puesto que el control positivo es un factor que se conoce estimula la duplicación.(12)

RESULTADOS

Las muestras control tuvieron una duplicación importante de fibroblastos en comparación con las muestras patologicas y los pozos basales. En la muestra control #1 se obtuvieron 133.38 cuentas por minuto/ microgramo de proteina (CPM), control #2, 168.96 (CPM) y control #3, se obtuvieron 120.95 (CPM). Los 4 pulls de muestras patologicas registraron 0 CPM/ microgramo de proteina. Es decir, fue nula la duplicación de fibroblastos de estas membranas cultivadas.

DISCUSION

El estudio de los mecanismos fisiopatogénicos en la P.V.R. ha mostrado que a un fenómeno hipoxico inicial sigue el depósito de tejido conectivo en el espacio vitreoretiniano como una característica distintiva en este proceso. El comportamiento de la P.V.R. en lo que se refiere al depósito anormal de elementos de matriz extracelular permite caracterizarla como una fibrosis y operativamente su estudio se ha delineado en el contexto del estudio general de las fibrosis.(3) La fibrosis en terminos bioquímicos puede ser definida como el depósito anormal de colágena, la proteina mas abundante del tejido conectivo; de este modo, el estudio de los factores que modifican la sintesis y/o degradación de colágena en el espacio vitreo-retiniano, podrían explicar en parte los eventos asociados en la fisiopatogenia de la (P.V.R.) En los tejidos parenquimatosos, la fase destructiva del proceso inflamatorio es seguida de regeneración tisular coordinada por una compleja red de comunicaciones intercelulares que modulan la respuesta reparativa.(4) En este evento, se conjugan funciones de elementos del sistema inmune y de células locales; las primeras incluyen al menos a linfocitos y macrófagos, dentro de las segundas se incluyen a los fibroblastos.(5) El fenómeno reparativo consiste en una mezcla de regeneración celular y depósito de tejido conectivo, colágena en su mayor parte, de manera que los procesos se suman para lograr la restitución anatómica. En este sentido, la cavidad vitreo-retiniana es un caso especial ya que el fenómeno de cicatrización es la única opción, y así, el espacio virtual se ve ocupado por fibras de tejido conectivo que se fijan en diferentes superficies tisulares y complican la morfología y función locales. Bajo estas circunstancias el fenómeno de cicatrización se transforma en un problema más que en una solución. En condiciones normales cualquier tejido mantiene un equilibrio entre producción de colágena y su degradación; en este padecimiento, se piensa que de alguna manera este equilibrio se pierde en favor del depósito, lo que podrá obedecer a un aumento de síntesis de colágena, a una disminucion de su degradación o una combinación de ambos factores.(6)

En otros tejidos, el estudio de los mecanismos moleculares que median la fibrosis ha demostrado que la depresión de la actividad enzimática que degrada a la colágena es una alteración temprana y que este solo podría explicar su acumulación progresiva por una disminucion en su degradación ante la síntesis no afectada (7). En 1988, Taylor estudió gatos recién nacidos los cuales dividió en dos grupos. Un grupo los sometió a altas concentraciones de oxígeno hasta producir una retinopatía y el segundo fue el grupo control. El reporta la presencia de una procologenasa de bajo peso molecular que aumenta de manera no

determinada la fracción angiogenica especifica en el grupo sometido a oxígeno.(8)

El motivo por el que las membranas no presentaron una duplicación de fibroblastos es probablemente por el estadio en el cual se tomaron las muestras. Es decir, el estadio V de la retinopatía del prematuro es la ultima etapa de la enfermedad. Al tener esto en cuenta, pensamos que ya no existe un sustrato activo en las membranas para poder realizar algun tipo de biosíntesis de colágena. La membrana estudiada es material fibroso el cual representa la fase terminal del desequilibrio entre producción y degradación de colágena. En cambio, las muestras control mostraron una biosíntesis de colágena importante, el cual fue similar en las tres muestras. El numero de muestras en este grupo fue muy limitado debido a la dificultad para la autorización de las autopsias. Probablemente sí la obtención de humor vítreo en niños con retinopatía del prematuro fuera en estadios mas tempranos podriamos encontrar un aumento en la biosíntesis de colágena en relación a las muestras control. Debido a razones éticas obviamente esto no es posible llevarse a cabo. Unicamente tenemos los estudios de modelo experimental que se han realizado en animales para poder corroborar la fisiopatología de esta enfermedad. Al analizar estos resultados, decidimos estudiar el liquido subretiniano de estos niños y crear un nuevo protocolo de investigación buscando intencionadamente metaloproteasas en este mismo liquido, trabajo que posteriormente se reportará. Este trabajo también fue llevado a cabo en el laboratorio de biología molecular del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

REFERENCIAS

- 1.- Tasman L.V., Jaeger E., Duane's Clinical Ophthalmology. (3) 1-15. Lippincott Company, Maryland 1992.
- 2.- Michels, R., Wilkinson, C., Rice, T., Retinal Detachment 730-737. Mosby Company, Baltimore. 1990.
- 3.- González-Avila, G., Vadillo-Ortega, F., Pérez-Tamayo, R., Experimental diffuse interstitial renal fibrosis. A biochemical approach. Lab Invest 59 ,245, 1988.
- 4.- Pérez Tamayo, R., Montfort, I., González, E., Alvizouri, A., Collagenolytic activity in cirrhosis of the liver in, Collagen degradation and mammalian collagenase, Tsuchiya, M., Pérez-Tamayo, R., Okazaki, I., Maruyama, K., Excerpta Medica, Amsterdam, 1982, 135.
- 5.- Postlethwaite, A.E., Smith, G.N., Mainardi, C.I., Seyer, J.M., Kang, A.H., Lymphocyte modulation of fibroblast function in vitro: Stimulation and inhibition of collagen production by different effector molecules, J. Immunol, 132, 2470, 1984
- 6.- Werb, Z., Degradation of collagen mechanisms, in, Collagen in health and disease, Weiss, J., and Jayson, M., Churchill-Livingstone, London, 1982, 121.
- 7.- Selman, M., Montaña, M., Ramos, C., Chapela, R., Concentration, biosynthesis and degradation of collagen in idiopathic pulmonary fibrosis, Thorax 41, 355, 1986.
- 8.- Taylor, C.M. Increased Procollagenase activating angiogenic factor present in the retinae of kittens with oxygen induced retinopathy. Br. Jour. of Ophthalmol. 72,1 1988.
- 9.- Miller, E.: Preparation and characterization of the different types of collagen. Meth Enzym 82:33 1982.
- 10.- Peterkofski B, Chojkier M, Bateman J: Determination of collagen synthesis in tissue and cell culture systems. In Immunochemistry of the extracellular matrix Vol II. Edited by Furthmayr H. Boca Raton Florida, CRC Press 182, p 20.
- 11.- Selman M, López S, González G, Montaña M, Ramos C, Vadillo-Ortega F: Interaction between a line of fibroblasts with T-lymphocytes extracted from human lung with idiopathic interstitial fibrosis. Thorax (En prensa)
- 12.- Clark RAF, Folkvord JM, Hart C, Murray MJ, McPherson JM: Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. J. Clin Invest 84:1036, 1989.