

01672

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
División de Estudios de Posgrado

**Actividad de Metaloproteasas MMP-2 Y MMP-9 en la
Película Lagrimal Precorneal de Perros Normales
y Perros Afectados con Procesos Inflamatorios e
Infecciosos de la Superficie Anterior del Globo Ocular.**

T E S I S

**Que para obtener el grado académico de
MAESTRO EN CIENCIAS (OFTALMOLOGIA)**

P r e s e n t a

FRED PINEDA BOLIVAR

Tutor Principal: Gustavo Adolfo García Sánchez
Comité Tutorial: Dra. Rebeca Franco y Bourland
MC. Dr. Felix Gil Carrasco
DVM. Ph. D. Dennis Brooks
MVZ. Ph. D. Hector Sumano Lopez



México, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

División de Estudios de Posgrado

**Actividad de Metaloproteasas MMP-2 Y MMP-9 en la Película Lagrimal
Precorneal de Perros Normales y Perros Afectados con Procesos
Inflamatorios e Infecciosos de la Superficie Anterior del Globo Ocular.**

T E S I S

Que para obtener el grado académico de
MAESTRO EN CIENCIAS (OFTALMOLOGÍA)

P r e s e n t a

FRED PINEDA BOLIVAR

Tutor Principal: Gustavo Adolfo García Sánchez.

Comité Tutorial: Dra. Rebeca Franco y Bourland.
MC. Dr. Felix Gil Carrasco
DVM. Ph. D. Dennis Brooks
MVZ. Ph. D. Hector Sumano Lopez.

México, D. F.

2001

Declaración:

Por medio de la presente, manifiesto mi total y absoluta conformidad y autorización para que el contenido parcial o total de esta tesis sea ampliamente utilizado para los fines que convengan a la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dedicatoria:

Es difícil recordar a todos aquellos que han sido un motivo, una inspiración o un punto de apoyo para llevar a una buena culminación un proyecto tan importante como este.

A mi padre Armando, por todo lo que representó, representa y representará en mi vida.

A mi madre Graciela, por su ejemplo de esfuerzo, tenacidad y dedicación.

A mi hermano mayor Fabio, por ser un amigo y un gran apoyo en momentos difíciles.

A mi hermano menor Boris, por haberme permitido ser un ejemplo para su superación personal.

A mis hijas Michelle, Camila y Gala, por ser la razón más importante para seguir adelante con mi trabajo y estudio. Por que son lo más valioso en mi vida.

A Jacqueline, por que a pesar que la vida nos ha mostrado caminos diferentes, fue un gran apoyo.

A mi gran amigo Ovidio Cardona y su esposa Rosy, por su gran ayuda.

A mi gran amigo Isidro, generador de inquietudes para tomar la vida de manera diferente.

A mi tutor principal, Dr. Gustavo Adolfo, por haber sido un gran ejemplo de lo bueno y malo que un maestro debe tener, y por haberme inculcado y enseñado a querer la oftalmología con verdadera pasión.

A mi asesora, Dra. Rebeca Franco, por su valiosa ayuda y amistad.

Agradezco Especialmente a la Maestra en Ciencias Maria de los Remedios Vazquez, por su ayuda inigualable y especialmente por su gran paciencia y dedicación al mostrarme el manejo del laboratorio.

Agradezco a la Dra. Anny Pardo Semo, jefa del laboratorio de Bioquímica de la facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México, el haber permitido llevar a cabo este experimento.

Agradezco al M.V.Z. Jaime Navarro por su colaboración en la realización de la evaluación estadística de esta investigación.

El Médico Veterinario Fred Pineda Bolivar, fue egresado de la Universidad Social Católica de La Salle en la ciudad de Santa Fé de Bogota, Colombia, en el año 1986, realizó estudios de Internado, Residencia y Especialidad en Medicina y Cirugía en Perros y Gatos, en el Hospital Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México y además de la práctica privada, está a cargo de la sección de oftalmología del Hospital Veterinario de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma del estado de México, en la ciudad de Toluca, estado de México.

Contenido	página
Abreviaturas	7
Resumen	8
Abstract	9
1 Introducción	10
1.1 Anatomía de la cornea	11
1.2 Matriz extracelular (MEC)	11
Figura 1. Anatomía de la cornea del perro y tipos de colágeno	13
1.3 Proteolisis de tejido conectivo	13
Cuadro 1. Proteasas que degradan la MEC	14
1.4 Proteolisis extracelular-proteasas neutras	16
2 Material y métodos	17
2.1 Selección de pacientes	17
2.2 Recolección de muestras	19
Cuadro 2. Origen de las muestras de lágrima para zimografía	20
2.3 Medición de la concentración de proteínas	20
Cuadro 3. Medición de la concentración de proteína	21
2.4 Electroforesis	22
2.4.1 Preparación de gel para electroforesis	23
2.4.2 Preparación de gel concentrador	23
2.5 Procedimiento	23
3 Resultados	25
3.1 Zimogramas	26
Figura n°2 Zimogramas	27
Figura n°3 Zimogramas	28
4. Estadística	29

Abreviaturas:

Matriz extracelular	MEC
Metaloproteasas	MMP
Dodesil sulfato de sodio	DSS
Microlitro	uL
Persulfato de amonio	PSA
Punto isoeléctrico	pI
Kilodalton	kD
Queratoconjuntivitis seca	QSC
Hospital veterinario de especialidades	H.vet.esp.
Clínica de especialidades veterinarias	Clin.esp.vet.
Nanómetros	nm
Potencial de hidrógeno	pH
Ojo derecho	O.D.
Ojo izquierdo	O.I.
Hembra	H
Macho	M

RESUMEN

MVZ. PINEDA BOLÍVAR FRED, ACTIVIDAD DE LAS METALOPROTEASAS MMP-2 Y MMP-9 EN LA PELÍCULA LAGRIMAL CORNEAL EN PERROS SANOS Y PERROS AFECTADOS CON PROCESOS INFLAMATORIOS E INFECCIOSOS DE LA SUPERFICIE ANTERIOR DEL GLOBO OCULAR. Las afecciones que normalmente afectan la superficie anterior de globo ocular, sin importar si son de naturaleza infecciosa o no, conllevan a una secuencia de eventos que pueden actuar sobre el tejido de manera similar, teniendo como resultado en la perforación ocular y la pérdida de la visión. El mantenimiento de la transparencia corneal, depende altamente de la integridad de las proteínas corneales, y de las proteínas que forman la matriz extracelular (MEC). Las proteasas normalmente están presentes en la cornea, su actividad regula la renovación constante de las proteínas, mediante su liberación bajo ciertas condiciones patológicas. En esta investigación se demostró la actividad incrementada de las Metaloproteasas (MMP), en la lágrima de perros afectados con procesos inflamatorios e infecciosos de la superficie anterior del globo ocular, mediante el uso de zimografías, técnica que emplea la electroforesis en gel de dodesil sulfato de sodio (DSS), en condiciones desnaturalizantes. Mediante esta técnica, se observó que la actividad enzimática en las muestras de lágrima de los pacientes afectados, fue visiblemente mayor, con lo cual estadísticamente, mediante la prueba de exactitud de Fisher, el resultado de la investigación fue altamente significativa. Los hallazgos obtenidos son similares a los obtenidos en trabajos realizados en otras especies, logrando esto una base para realizar investigaciones posteriores, que podrían incluir al humano.

Palabras clave: Metaloproteasas, dodesil sulfato de sodio, proteasas, zimografía.

ABSTRACT:

DVM. PINEDA FRED. ACTIVITY OF METALLOPROTEASES MMP-2 AND MMP-9, IN THE TEAR FILM OF NORMAL DOGS AND DOGS AFFECTED BY INFLAMMATORY OR INFECTIVE PROCESSES ON THE ANTERIOR SURFACE OF THE OUTER OCULAR GLOBE.

Despite of the nature of the corneal insult, the sequence of events leading to ulcer formation in the different infectious or non-infectious conditions are remarkably similar. The maintenance of corneal transparency is dependent upon the integrity of corneal proteins, especially the extracellular matrix proteins. Proteases are present in the cornea and catalyse the normal turnover of proteins releasing them under certain pathological conditions. The purpose of this investigation was to determine by zimography the increasing activity of metalloproteinases (MMP2 and MMP-9) in lacrimal samples of ophthalmologically affected eyes of dogs with inflammatory or infectious diseases of the outer surface of the ocular globe, in comparison to healthy and normal eyes of control dogs. Collecting tear samples is not as easy as it seems especially in eyes affected by KCS. Statistically results were similar to previously described research carry out in other species.

Key words: Metalloproteinases, proteases, zimography, polyacrilamye.

INTRODUCCION

Las proteasas son una serie de enzimas que se han evaluado en diferentes tejidos corporales y hay evidencia que demuestra, que intervienen de manera radical para mantener un balance entre los procesos de regeneración y degeneración del tejido conectivo. En algunas enfermedades como la arterioesclerosis, la diabetes mellitus y las úlceras corneales, especialmente contaminadas, el balance entre los procesos de degeneración y regeneración se pierde conllevando a una destrucción de tejido. La actividad, presencia, evaluación, medición de los niveles de las proteasas, especialmente las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, es importante, ya que se sabe que actúan en casi todos los tejidos del cuerpo tanto de los animales como del humano. Es así que se cree que al evaluar la forma como actúan y qué puede causar su incremento o disminución, podría servir de apoyo para establecer métodos que sirvan para modificarlas y buscar los elementos necesarios que contribuyan a predecir el curso que pueden seguir estas sustancias bajo ciertas condiciones patológicas.

Los procesos inflamatorios e infecciosos de la cornea del perro, se asocian a múltiples factores predisponentes como: traumatismos, virus (herpes), resequedad de la superficie corneal (queratitis seca), enfermedades sistémicas (hipotiroidismo), bacterias (*Pseudomona* sp) entre otros ¹, los cuales asociados a factores como la acción de las metaloproteasas (MMP-2 y MMP-9), pueden originar la pérdida de la transparencia e integridad corneal, progresando incluso hasta una verdadera perforación ocular con la consecuente pérdida de la visión. Se puede decir, que existen innumerables

desordenes que pueden afectar la cornea, ya que ésta posee una estructura anatómica relativamente sencilla, lo cual trae como consecuencia una capacidad limitada de respuesta y por lo tanto mayor vulnerabilidad.

1.1 ANATOMIA DE LA CORNEA

La cornea del perro, cuyas características la hacen un tejido altamente especializado, es la porción más anterior del globo ocular y ocupa una quinta parte de la túnica fibrosa externa del mismo. Es transparente ya que carece de vasos sanguíneos y de pigmento. La cornea está constituida por un epitelio estratificado plano no queratinizado, que es la capa más externa, una capa intermedia o estroma (capa de mayor tamaño y conformado especialmente por una matriz de colágeno), una tercera capa elástica o membrana de descemet y más internamente por un endotelio. Este último utiliza una bomba fisiológica para remover los líquidos del interior de la cornea, manteniendo su transparencia. ¹

1.2 MATRIZ EXTRACELULAR (MEC)

Las sustancias que forman parte o integran la matriz extracelular (MEC), proveen el armazón dentro de los cuales se forman los tejidos. La cornea del perro está constituida por una MEC, y especialmente por colágeno.^{2,3} El colágeno es una proteína que se encuentra en gran cantidad en el estroma corneal, especialmente en forma de fibras, diseñadas y arregladas finamente, que permiten la transparencia, característica primordial de la

cornea. ¹ El colágeno es una proteína fibrosa, en forma de varilla, sintetizada por una serie de células especializadas, entre las que se encuentran los fibroblastos. Es la proteína más abundante de la MEC, y sus características se asocian a una labor de tipo estructural, mas que funcional en los mamíferos. Esta sustancia se encuentra en cantidades significativas en todos los tejidos y órganos, ya que se considera aproximadamente el 25% del total de la masa de las proteínas corporales, a las cuales proporciona un armazón para su forma y fuerza estructural. ^{2, 3, 4.} Existen aproximadamente 19 tipos diferentes de colágeno y algunos de los tipos recientemente descubiertos se han logrado mediante clonación y secuenciación. Cerca de 12 han sido encontrados en el ojo, la mayoría de estos en la cornea. ⁷

El epitelio corneal está constituido por colágeno tipos IV, VI y VII. El estroma anterior de la cornea por colágeno tipos I, III, V y VI. El estroma propiamente por colágeno tipos I, III, V, VI y XII y la membrana de descemet por colágeno tipos I, III, V, VI y VIII. ^{1, 3, 5.} (Fig. 1).

Al igual que el colágeno, existen otros componentes de la MEC, que también son afectados por la acción de las proteasas. Entre ellos se encuentran algunas sustancias que participan en la adhesión intercelular, como es el caso de los aminoglicanos: fibronectina, laminina e hialuronan, a nivel del epitelio corneal (Fig. 1), heparan sulfato en la membrana basal o estroma anterior, condroitin 6 y 4 sulfato, dermatan sulfato en el estroma propiamente dicho y laminina, fibronectina y heparan sulfato, en la membrana de descemet. ^{1, 13, 17, 22}

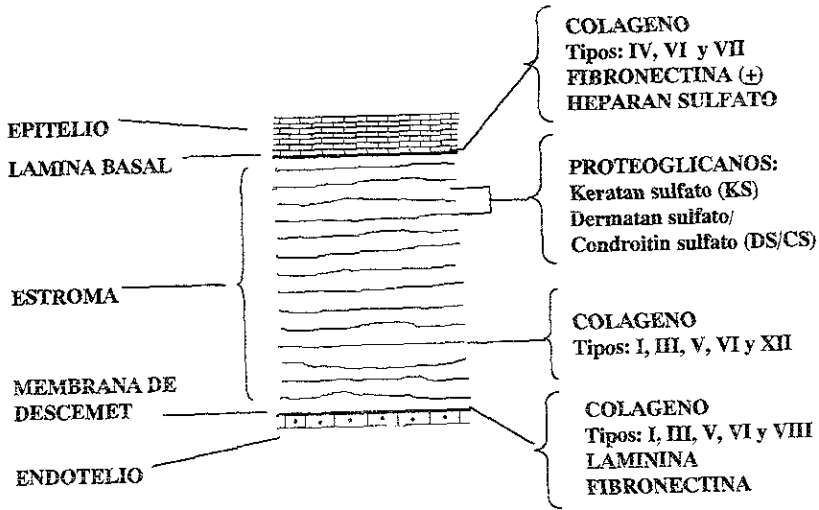


Fig. 1 Anatomía de la cornea del perro doméstico y los tipos de colágeno en las diferentes capas que la forman. (3).

1.3 PROTEOLISIS DE TEJIDO CONECTIVO

Diferentes vías de proteólisis son responsables por la degradación de los componentes de la MEC. Existen cuatro grupos principales de proteasas (Cuadro 1), las cuales se han clasificado de acuerdo al amino ácido o grupo central catalítico de la enzima. Los grupos cisteína proteasas y aspartato proteasas que actúan intracelularmente y a pH bajo, y las sérina y las Metaloproteasas, que actúan extracelularmente y a pH neutro. 6

Intracelular		Extracelular	
Aspartato	Cisteina	Metalo	Serina
Proteasas	proteasas	proteasas	proteasas
Bajo pH		pH Neutro	
Catepsina D	Catepsina B	Colagenasas	Elastasas
	Catepsina H	MMP-1-8-13	Catepsina G
	Catepsina K	Estromelisin	Plasmina
	Catepsina L	MMP-3-10-11	Activador Plasminogeno
	Catepsina S	Gelatinasas	
		MMP-2-9	
		MMP de membrana	
		MMP 14-15-16-17	
		ADAMs.	

Cuadro 1. Proteasas que degradan la matriz de tejido conectivo. (13).

Está establecido que muchas lesiones superficiales que afectan la cornea, pueden cicatrizar espontáneamente. Sin embargo, se ha observado que

lesiones especialmente contaminadas con agentes patógenos como es el caso de la *Pseudomona*, dañan rápidamente el tejido corneal y pueden llegar a perforar la cornea en tan solo 24 horas. Este proceso de deterioro se conoce como queratomalacia, en donde las principales células mediadoras de la degeneración de las capas de la cornea, especialmente el epitelio, la membrana basal, el estroma y la MEC, son los leucocitos, algunos microorganismos y las metaloproteasas derivadas por algunas células corneales, las células del estroma y las células de la película precorneal. 7,8,9,20

Es un hecho que los componentes de la MEC y del estroma corneal se mantienen en un constante balance entre los procesos de degeneración y regeneración normal del tejido. Es así de igual manera que en afecciones tales como la artritis reumatoide, la arterioesclerosis, y la epidermolisis bullosa resesiva del humano, el control sobre la actividad degenerativa aparentemente se pierde, lo cual trae como consecuencia la destrucción patológica del tejido. En el caso del perro, algunas lesiones inflamatorias e infecciosas de la cornea son consideradas como un desorden en el mantenimiento del tejido y su manifestación física se caracteriza por la destrucción tisular proveniente de la pérdida de los componentes estructurales del epitelio, el estroma de la cornea y de la MEC. Esta situación está íntimamente relacionada con la acción de las metaloproteasas, de quienes se ha demostrado que al incrementarse colaboran directamente en los procesos de deterioro del tejido corneal. 8,10

1.4 PROTEOLISIS EXTRACELULAR – PROTEASAS NEUTRAS

Las proteasas, son un grupo de enzimas que han sido implicadas en muchos procesos fisiológicos y patológicos que incluyen el desarrollo embriológico, angiogenesis y la cicatrización tisular. ^{11,24} Esta familia (existen al menos 17 enzimas distintas) puede colectivamente degradar los componentes de la matriz extracelular. Estas enzimas se pueden clasificar en cuatro grupos: las estromelisin, las colagenasas, las gelatinasas (o metaloproteasas de la matriz propiamente dichas) y las proteasas asociadas a la membrana celular (mmT). ⁶

La acción incrementada de las proteasas en la película lagrimal corneal ha sido evaluada, y se ha informado que el grupo que involucra a la familia de las metaloproteasas de la matriz (MMP), las cuales son una serie de enzimas dependientes del cinc (ya que poseen un átomo de cinc en su centro catalítico), son liberadas como proenzimas inactivas, que requieren de su activación para ejercer su acción degenerativa sobre la MEC, y se ha encontrado que sustancias tales como la plasmina, mediante el activador del plasminógeno, desencadenan una serie de eventos que llevan a efecto la acción degradativa del las metaloproteasas de la MEC. ^{5,6,14,15,19,21}

En forma general, los miembros de la tercer subfamilia, las gelatinasas, tienen actividad sobre las moléculas del colágeno desnaturalizado y el colágeno natural de los tipos IV, V y VII. Dos especies diferentes de gelatinasas han sido bien caracterizadas. La variedad de menor peso

molecular; 72 kilodalton (Kda), también conocida como colagenasa tipo IV o MMP-2, la cual es producida por amplio número de células y se expresa particularmente en las células epiteliales alteradas o transformadas, así como por células tumorales. Además de la anterior, una nueva forma molecular de peso cercano a 92 Kda o MMP-9, originalmente reconocida por ser el producto de leucocitos polimorfonucleares, monocitos y macrófagos, también llamada colagenasa tipo V.

Estudios de secuenciación han establecido que las dos especies de gelatinasas son resultado de diferentes genes. ⁵ E igualmente ha sido descrito, que la identificación y caracterización de las gelatinasas de la familia de las MMP puede ser sintetizada y caracterizada por las células corneales en órganos y tejidos primarios. Las células epiteliales producen predominantemente la forma de procolagenasa de mayor peso molecular (92 Kda), que también puede ser estimulada por el cultivo de tejidos o por cultivo celular, mientras que la forma de 72 Kda de procolagenasa puede ser extraída del estroma sin cultivo.

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 SELECCIÓN DE LOS PACIENTES

Las muestras de lágrima de 7 ojos de perros como cantidad total, fueron recolectadas asépticamente, empleando tubos de microhematocrito, en cantidad de 15 a 30 microlitros (μ L).

Las muestras se dividieron en dos grupos, 4 fueron clasificadas como patológicas y 3 provenían de animales sanos o grupo control. Los pacientes que fueron empleados para la evaluación de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, se seleccionaron una vez efectuado un examen clínico oftalmológico, partiendo de la evaluación de sus reflejos oculares, así como la observación mediante el oftalmoscópio directo (Welch allyn 72200), la lámpara de hendidura (Kowa 2000) y el empleo del oftalmoscópio indirecto (Keller). Finalmente a los pacientes afectados y a los ojos del grupo control les fue teñida la cornea, con tinción de fluoresceína. ¹

Los ejemplares seleccionados fueron considerados para el grupo en investigación, una vez diagnosticados como afectados por algún proceso inflamatorio o infeccioso de la superficie anterior del globo ocular. Los signos que se tomaron en cuenta para llegar a un diagnóstico, fueron entre otros; secreción ocular serosa, sanguinolenta o purulenta. Los cambios de coloración de las mucosas oculares; enrojecimiento o palidez, especialmente, así como el hallazgo de cualquier tipo de lesión que involucrara la arquitectura normal de la cornea, (edema, vascularización, pérdida del epitelio, pérdida del estroma, etc.), teniendo en cuenta enfermedades tales como; úlceras superficiales, úlceras profundas o del estroma, úlceras colágeno asociadas, úlceras indolentes y querato conjuntivitis seca. ^{1,12}

Los perros seleccionados como grupo control, fueron tomados en cuenta para el experimento partiendo de la base que eran pacientes sanos y

que no estaban siendo tratados bajo ninguna circunstancia con medicamentos que tuvieran algún efecto ocular.

Todos los pacientes eran adultos, mayores de un año, hasta siete años, teniendo en cuenta que no era posible seleccionar a un grupo específico de acuerdo a la edad, ya que las patologías no necesariamente se relacionan con un estado de salud o edad particular del paciente. Finalmente, los ojos empleados como grupo control, se seleccionaron entre aquellos animales que presentaban abundante producción de lágrima, en condiciones normales.(cuadro 2)

2.2 RECOLECCION DE MUESTRAS DE LAGRIMA

Las muestras se obtuvieron del fondo de saco palpebral inferior, teniendo en cuenta no hacer contacto con la conjuntiva o el párpado, empleando microtúbos (tubos para muestras de sangre para hematocrito), en cantidad de 15 a 30 uL (promedio = 22.5). Posteriormente, las muestras se mantuvieron refrigeradas, para luego ser puestas en tubos de Eppendorf y finalmente marcadas para su procesamiento. Posteriormente se estandarizaron a un volumen de 7.5 microlitos (uL), al final se completaron 15 mL, agregando solución amortiguadora conocida SDS 3%.

Núm	Origen	Sexo	Raza	Edad	Afectado Volumen	Lesión
I	H.V.de Esp	M	Poodle	2 Años	O.I. 25 uL	Ulcera
13	H.V.de Esp	H	Poodle	2 Años	O.I. 25 uL	No
14	H.V.de Esp	M	Bóxer	5 Años	O.D. 27 uL	No
J	H.V.de Esp	M	Bóxer	5 Años	O.D. 30 uL	Ulcera
15	Clin E.V.	M	Pinsher	1 Año	O.D. 20 uL	No
W	H.V.de Esp	M	Cocker	4 Años	O.I. 20 uL	Ulcera
Z	H.V. P.Esp	H	Cocker	3 Años	O.D. 15uL	QCS.

O.I. : Ojo izquierdo

O.D : Ojo derecho

H.V. de Esp: Hospital Veterinario de especialidades

Clin. E.V: Clínica de especialidades veterinarias

QCS: Querato conjuntivitis seca

Cuadro 2: Origen de las muestras de lágrima para la zimografía.

2.3 MEDICION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINA.

La medición de la concentración de proteína, es un procedimiento que involucra el uso de un espectrofotómetro (Beckman-Du-64), que tiene como fin medir concentraciones proteicas en muestras de diferentes orígenes, como

puede ser en este caso, las muestras de lágrima (cuadro 3). En esta evaluación el espectrofotómetro realiza un análisis colorimétrico con base en un marcador conocido o blanco, el cual tiene una densidad óptica. La prueba consiste en hacer diluciones seriadas de una muestra, con el fin de hallar la máxima concentración de proteína de dicha muestra. En este caso se empleó un espectrofotómetro, utilizando las siguientes diluciones:

Patrón	Agua destilada	Colorante	Resultado
0	800uL	200uL	0000
2	798uL	200uL	0.27
4	796uL	200uL	0.39
6	794uL	200uL	0.51
8	792uL	200uL	0.55
10	790uL	200uL	0.68

Cuadro 3: Medición de concentración de proteína en muestras de lágrima de perros sanos y perros afectados por procesos inflamatorios e infecciosos.

Utilizando un medidor (Biorad laboratories – Prot assay), se realizó una curva de concentración, para hallar el punto medio de nivel de proteína por muestra, así como el volumen equivalente para esa concentración. Con base en lo anterior, se estableció, que la cantidad óptima en volumen de muestra debía ser 2.2 uL. Las pruebas se efectuaron en dos ensayos, el primero de ellos tomando las muestras de dos ojos afectados y de dos ojos sanos como control y en el segundo ensayo, se tomaron dos muestras de lágrima de ojos afectados

y una muestra de un ojo sano como control. En cada ocasión, las pruebas se corrieron junto con los pesos moleculares, así como las proteasas conocidas (92 y 72 kD).

2.4 ELECTROFORESIS

El proceso por medio del cual se coloca un anfólito (proteína, péptido o aminoácido), en una solución amortiguadora a un pH determinado dentro de un campo eléctrico, se conoce como electroforesis * Con base en la relación entre el pH de la solución amortiguadora y el punto iso-eléctrico (pI) de la molécula, esta se debe mover hacia el cátodo (-), hacia el ánodo (+), o permanecer estacionaria (pH = pI).

En la forma más simple, el aparato para electroforesis consiste en un tubo en forma de "U" en el que se coloca la solución de proteína, a la cual se añade una solución amortiguadora, sobre la solución que contiene la proteína. El desplazamiento de la proteína se observa con un sistema óptico que mide los cambios en el índice de refracción de la solución a medida que la proteína se desplaza hacia el ánodo. La electroforesis ha evolucionado, y emplea métodos más perfeccionados en los que se utilizan poliméricos, almidón o papel como soporte. Los soportes inertes se saturan con una solución amortiguadora, se aplica una muestra de las proteínas a examinar, se establece un campo eléctrico a través del soporte amortiguado y las proteínas se desplazan hacia el polo cargado. 2,3

(Leammler U.K, Nature 227, 680)

2.4.1 PREPARACION DEL GEL PARA ELECTROFORESIS.

Ingredientes	8%
Agua destilada	3.64 ml
Gelatina Congelada 1%	1.00 ml
Tris HCl 1.5 M Ph: 8.8	2.50 ml
SDS 10%	0.1 ml
Acrilamida BIS 7.5%	2.66 ml
PSA (persulfato de amonio) 10%	0.05 ml
TEMED (N,N,N,N'-tetra-methyl-ethylenediamine)	0.01 ml

2.4.2 PREPARACION DE GEL CONCENTRADOR

Ingredientes	4%
Agua destilada	3.0 ml
Tris 0.5 M Ph: 6.8	1.24ml
SDS 10%	0.10ml
Acrilamida BIS	0.66ml
PSA 10%	0.02ml
TEMED	0.01ml

2.5 PROCEDIMIENTO

Una vez preparado el gel de electroforesis y previamente a su solidificación, fue vertido por encima de este en la cámara para electroforesis el gel concentrador. A este se colocó un peine (peine de plástico), el cual se

utilizo para formar los pozos en donde se agrego cada una de las muestras seleccionadas.

Las pruebas se manejaron colocando siempre muestras de pesos moleculares conocidos, como referencia, con el fin de poder relacionar los resultados una vez corrida la prueba y además se colocaron dos muestras correspondientes a los pesos de 92 kd y 72 kd, correspondientes a las metaloproteasas MMP-9 y MMP-2, respectivamente, estos igualmente como patrones de referencia.

El gel ya preparado con las muestras se sometió a una corriente eléctrica de aproximadamente 200 voltios, durante una hora. Una vez logrado lo anterior, se desmontó la cámara, se extrajo el gel y se agregó solución Tritón X – 100 al 2.5%, y durante 20 minutos se puso en una cámara de agitación. Inmediatamente se extrajo la sustancia, y se agregaron 94 ml de solución amortiguadora substrato (Cloruro de sodio + glicina) y 6 ml de cloruro de cinc (ZnCl₂). El gel finalmente se puso a incubar a 37° C durante 24 horas.

Al día siguiente, se extrajo la solución amortiguadora substrato y se agregó colorante de azul de Coomase (Bio-Rad laboratories 12-250), con el fin de hacer más visibles las líneas de actividad enzimática en el gel y así poder hacer la evaluación con relación a los pesos moleculares conocidos o controles de referencia. Esta fase durò aproximadamente entre 30 minutos y 1 hora, luego se eliminó el colorante y se agregó solución desteñidora, la cual se dejó alrededor de 30 minutos. Por ultimo, se leyó el resultado sobre una pantalla resaltadora y finalmente se tomó una fotografía que fue impresa en papel. 7

La fase experimental de la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, se desarrolló en diferentes etapas, tomando en cuenta el proceso de aprendizaje, tanto de la elaboración de los geles, así como del montaje de los mismos en las cámaras para correr las pruebas de electroforesis. Con base en lo anterior, una vez realizados los primeros ensayos sobre montaje y corrido de pruebas, se llevó a efecto el experimento en dos fases. En la primera parte, se emplearon dos muestras de pacientes afectados, y dos muestras de ejemplares sanos como control. En la segunda fase, se pusieron a prueba dos muestras de ojos afectados y una muestra de ojo sano como control.

3 RESULTADOS

La fase experimental de esta investigación involucró siete perros domésticos, con un número igual de ojos empleados para recolección de muestras. Del total de animales empleados, machos (n=5) y hembras (n=2). Ojos afectados 4/7, ojos normales 3/7. La edad promedio de los animales empleados fue de 2.5 años (rango de 1 a 5 años). Las razas empleadas en este estudio, incluyeron Bóxer (n=2), Cocker Sp (n=2), Poodle miniatura (n=2) y Pinsher miniatura (n=1). Del total de ojos afectados, se observó, úlcera corneal (n=3), querato conjuntivitis seca (QCS), (n=1), y ojos normales (n=3). El número de ojos afectados con úlcera corneal 3/ 4 (75%), sexo de los animales afectado con úlcera; machos 3/3 (100%), ojo derecho afectado en 1/3 (33.3%), ojo izquierdo en 2/3 (66.6%). Número de ojos con QCS de los afectados 1/ 4 (25%).

3.1 ZIMOGRAMAS

Las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, presentes en las muestras de lágrima fueron identificadas por comparación de su actividad enzimática, así como su movilidad a través de geles de gelatina al 1% para zimogramas.¹⁵ Los geles fueron preparados en la forma descrita previamente, con el objeto de evaluar la movilidad y actividad enzimática de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, tomando como base muestras de enzimas, con pesos moleculares y concentraciones de proteína conocidos. Los estándares se lograron tomando como base los hallazgos obtenidos de experimentos similares y resultados de estudios previos. Una vez llevada a cabo la electroforesis, los geles fueron revelados, teñidos con colorante de azul de coomase rápido y finalmente fotografiados sobre una pantalla realzadora, empleando una cámara Polaroid con un filtro amarillo número 15, película polaroid a una velocidad de 1/30 de exposición.^{15,16} (Fig. 2 y 3)

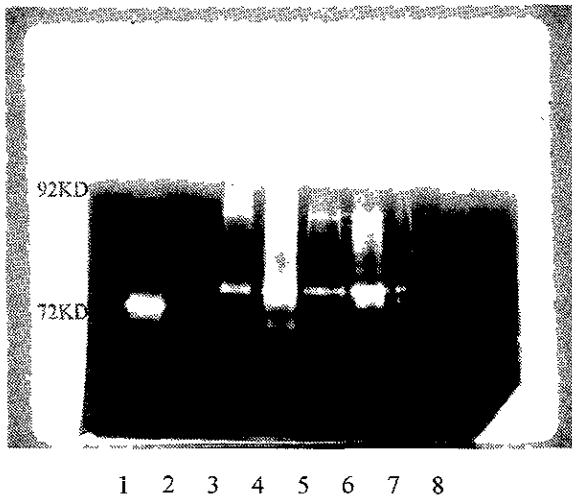


Figura 2. Zimograma número 1 de la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en la película lagrimal del perro. MMP-2 conocida (carril 1), muestra J patológica (carril 3), muestra I patológica (carril 4), muestra 14 de lágrima de ojo normal (carril 5), muestra 13 de lágrima de ojo normal (carril 6), pesos moleculares conocidos (carril 7), MMP-9 conocida (carril 8). Se aprecia mayor actividad enzimática en las muestras de lágrima patológicas en comparación con las muestras control.

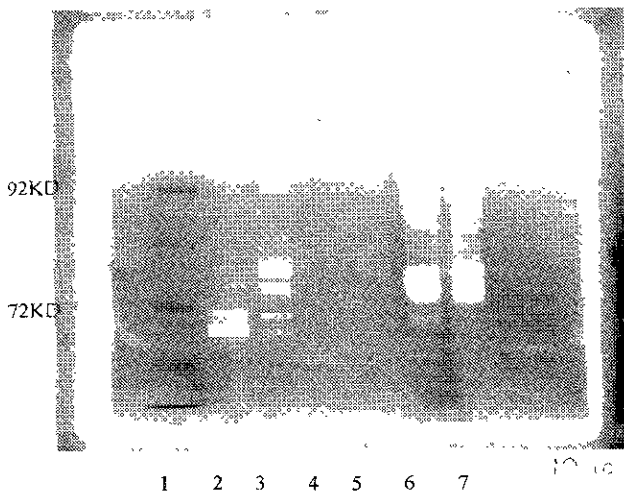


Figura 3. Zimograma número 2 de la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en la película lagrimal del perro. Pesos moleculares (carril 1), MMP-2 conocida (carril 2), MMP-9 conocida (carril 3), muestra 15 de lágrima de ojo normal (carril 5), muestra W patológica (carril 6), Muestra Z patológica (carril 7). Visualmente se aprecia mayor actividad enzimática en las muestras patológicas, con una banda de digestión más notoria y extensa.

4 ESTADISTICA.

La comparación de la actividad de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, entre las muestras de lágrima de ojos afectados con procesos inflamatorios e infecciosos de la superficie anterior del globo ocular en comparación con muestras de lágrima de ojos no afectados, fue realizada empleando una prueba de Chi cuadrada y una prueba doble de Fisher. (Cuadro 4).

La evaluación estadística mostró un resultado altamente significativo, con un índice de confiabilidad del 95%, ($p = 0.0286$).

	Afectados Columna 1	Sanos Columna 2	FILAS Total
Positivos fila 1	4	0	4
Porcentaje total	57.143%	0.000%	57.143%
Negativos fila 2	0	3	3
Porcentaje total	0.000%	42.857%	42.857%
Columnas total	4	3	7
Porcentaje total	57.143%	42.857%	
Chi-cuadrado(df=1)	7.00	p= .0082	
Prueba de Fisher sencillo		p= .0286	
Prueba de Fisher doble		p= .0286	

Cuadro 4: Prueba de Fisher y Chi cuadrado en la actividad de las Metaloproteasas MMP-2 y MMP-9 en muestras de lágrima de perros sanos y de perros afectados con procesos inflamatorios e infecciosos de la superficie anterior del globo ocular (Jmp versión 3.1.6.2)

5 DISCUSION Y CONCLUSIONES

La evaluación de las proteasas en la lágrima de los perros afectados con procesos inflamatorios e infecciosos de la superficie anterior del globo ocular, revierte una gran importancia, debido a que muchas de las patologías que afectan al perro, se desarrollan de la misma manera en el humano. Esto, puede servir de base para la continuación de experimentos empleando esas enzimas, y tratando de apoyar dichos experimentos con los resultados aquí presentados. La actividad incrementada de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, fue visible y cualitativamente demostrada ⁷, como se ha visto en otras investigaciones similares. Con base en estos resultados, puede ser posible iniciar trabajos más específicos, apoyados en los existentes con el objeto de ampliar el campo de acción hacia otro tipo de enzimas que ejerzan su acción sobre la matriz extra celular corneal.

La forma como se recolectaron las muestras, posiblemente requiera una técnica diferente, ya que generalmente los perros están expuestos a un factor ambiental que puede ser decisivo para los resultados de este tipo de análisis, ya que en muchas ocasiones las muestras pueden estar contaminadas y esto a la vez puede traer como consecuencia resultados de actividad enzimática erráticos. ⁷

La fase experimental se vio afectada, debido a las condiciones propias del laboratorio, teniendo en cuenta el factor de tiempo disponible para desarrollar las pruebas, así como las limitaciones del presupuesto para la consecución y manejo de los materiales para preparar el gel para la electroforesis.

El factor humano es importante, teniendo en cuenta que en muchas ocasiones el personal que labora en un laboratorio de bioquímica, desarrolla la habilidad que generalmente un médico veterinario no posee, lo cual tiene un efecto importante en el desarrollo y la consecución de resultados que sean reales y apegados a las condiciones de los pacientes que son considerados como patológicos.

Es así que de igual manera se explica el por qué se utilizó una cantidad tan pequeña de muestras de lágrima, tanto normales como anormales. Esto debido a la poca destreza que se tenía al principio de la fase experimental en cuanto al manejo tanto de los geles, como de la cantidad de muestra y método a emplear para el uso de las mismas, lo cual trajo como resultado el que en un principio se perdiera una gran cantidad de muestras, así como un gran número de las mismas, montando la técnica y desarrollando la habilidad que se requiere para poder llevar a efecto el experimento.

Finalmente estos resultados se pueden considerar como la primera experiencia en el campo de la evaluación de metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, en el ojo del perro, ya que existen informes de algunos primeros experimentos realizados en equinos, ratones de laboratorio y conejos, en donde los resultados obtenidos fueron similares. 7

El resultado se cataloga como cualitativo y no cuantitativo, ya que la interpretación de los resultados se basa en la observación física del investigador, mas que en el empleo de algún método desarrollado para tal fin.

La investigación muestra claramente que los resultados obtenidos hacen evidente la hipótesis verdadera planteada desde su inicio. Se demostró plenamente, tomando en cuenta que la actividad de las enzimas MMP-2 y MMP-9, fue mayor en las muestras de lágrima provenientes de ojos afectados con algún proceso patológico. (úlcera y QCS), lo cual de igual manera fue evaluado estadísticamente mediante la prueba de exactitud de Fisher, así como una prueba de Chi cuadrado

De la investigación realizada se tienen como conclusiones:

1. Se aprendió a preparar geles para electroforesis y zimogramas del tipo SDS y poliacrilamida, toda vez que se realizaron diferentes ensayos, hasta lograr una experiencia necesaria para finalmente llevar a efecto la fase experimental, con los consecuentes resultados que dieron como valida la hipótesis verdadera planteada al inicio de la investigación.
2. Se aprendió a realizar curvas de medición para niveles de concentración de proteína, empleando un espectrofotómetro, lo cual permitió establecer que cantidad de muestra debía emplearse, con miras a obtener una actividad enzimática clara y relevante para el propósito de la investigación, con base obviamente en los resultados arrojados por la misma.
3. El procedimiento que se debe observar para llevar a efecto cada experimento, hizo necesario aprender el montaje de las cámaras que se emplean para electroforesis, así como los cuidados que se les deben proveer; lavado, limpieza, mantenimiento, guardado, etc.

4. Se aprendió la manera de obtener y manejar muestras de lágrima para zimogramas en gel de SDS y Poliacrilamida, desde su recolección, conservación, medición de concentración de proteína, dilución con solución amortiguadora, para finalmente ser llevadas a las cámaras para electroforesis y por último la interpretación de los resultados.

5. Se practicaron en total 5 ensayos de electroforesis y zimografías, completos, hasta su interpretación final.

6. Se prepararon más de 10 geles para zimografías, del tipo de SDS y Poliacrilamida, empleando la gelatina como sustrato, en condiciones desnaturalizantes.

7. Se demostró la actividad incrementada de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, al medir su actividad en geles de poliacrilamida y dodesilsulfato, en condiciones desnaturalizantes.

6 ANEXO 1.

ZIMOGRAMAS

Las proteasas presentes en las muestras de lágrima se identifican comparando su movilidad en geles para zimografía, los cuales emplean la gelatina como sustrato predigerido, con relación a geles empleados para muestras como grupo control. Técnicamente, cada muestra es descongelada en un baño a 37^a grados, y 15 uL de la misma son llevados a un tubo de

4. Se aprendió la manera de obtener y manejar muestras de lágrima para zimogramas en gel de SDS y Poliacrilamida, desde su recolección, conservación, medición de concentración de proteína, dilución con solución amortiguadora, para finalmente ser llevadas a las cámaras para electroforesis y por último la interpretación de los resultados.
5. Se practicaron en total 5 ensayos de electroforesis y zimografías, completos, hasta su interpretación final.
6. Se prepararon más de 10 geles para zimografías, del tipo de SDS y Poliacrilamida, empleando la gelatina como sustrato, en condiciones desnaturalizantes.
7. Se demostró la actividad incrementada de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9, al medir su actividad en geles de poliacrilamida y dodesilsulfato, en condiciones desnaturalizantes.

6 ANEXO 1.

ZIMOGRAMAS

Las proteasas presentes en las muestras de lágrima se identifican comparando su movilidad en geles para zimografía, los cuales emplean la gelatina como sustrato predigerido, con relación a geles empleados para muestras como grupo control. Técnicamente, cada muestra es descongelada en un baño a 37^a grados, y 15 uL de la misma son llevados a un tubo de

eppendorf. Cada muestra es posteriormente diluida con solución amortiguadora SDS tris- glicina. Las muestras diluidas son brevemente agitadas, centrifugadas por 10 segundos y luego incubadas a temperatura ambiente por 10 minutos. Los controles para las metaloproteasas MMP-9 y MMP-2, se preparan de la misma forma ya descrita. Cada uno de los controles será brevemente centrifugado, antes de colocar las cantidades de muestra, según la medición de la concentración de proteína, de cada uno de los tubos de eppendorf, marcados individualmente y finalmente diluidos con una cantidad similar de solución amortiguadora para electroforesis. El procedimiento es el mismo para cada control.

El gel para zimogramas es lavado, preparado rutinariamente y puesto en una cámara para electroforesis mini-celular y llenado con una solución 1 x tris- glicina SDS. Posteriormente se pondrá un peine de plástico, para hacer los pozos donde se colocan las muestras. Al primer pozo se le agregará una cantidad conocida de marcador Biorad (laboratories), el segundo y tercer pozos, serán llenados con las muestras control. Los pozos restantes serán llenados con las muestras de lágrima que se van a evaluar. La cámara es llenada con solución amortiguadora, y luego sometida a una corriente de 200 voltios, hasta que el colorante azul de bromofenol alcance el fondo del gel, aproximadamente una hora.

Una vez realizada la electroforesis, el gel será cuidadosamente removido de las cámaras evitando que se rompa o se rasgue. En este punto, las bandas que se originan de los pozos donde fueron aplicadas las muestras, serán identificadas. Ocasionalmente serán marcadas con tinta india para su mejor visualización. Finalmente los geles serán enjuagados con agua

desionizada y puestos en un agitador con solución renaturalizante tritón x – 100 al 2.5%, durante 20 a 30 minutos. Posteriormente se incubarán a 37^a centígrados durante 24 horas, en una solución reveladora (solución amortiguadora para la reacción enzimática) compuesta por 94 ml de cloruro de calcio y glicina y 6 ml cloruro de Cinc ($ZnCl_2$), luego se extraerá la solución reveladora y se agregarán al gel 100 ml de ácido tricloroacético al 12.5%. El gel será incubado por 10 minutos, lavado nuevamente y teñido con colorante azul de coomase rápido. Al final se agregará, 100 ml de metanol al 7.5% y solución para decolorar de ácido acético Al 5%. El gel será incubado por 12 horas, el colorante será removido, el gel lavado, y se agregarán 100 ml de solución amortiguadora descolorante, junto con limpiador de Kim, para eliminar el exceso de colorante. El gel se incubará por 10 minutos, la solución amortiguadora removida y suficiente agua nanopura se agregará para cubrir el gel. Al final se tomaran fotografías con una cámara Polaroid, empleando un filtro amarillo.

7 REFERENCIAS:

1. Gellat K. Ocular manifestations of systemic disease, part 1, the dog, veterinary ophthalmology, 3rd edition, Lea y Febiger, Philadelphia, 1998.
2. Devlin T. Bioquímica, segunda edición, Editorial Reverté Colombiana S.A., Barcelona (Esp), 1998
3. Berman E. Biochemistry of the eye, Plenum press, New York, 1991.
4. Sakay L. The extracellular matrix, scientific American Science and Medicine, mayo/junio, 1995.
5. Matsumoto K, Shams N, Hanninen L, Kenyon K. Cleavage and activation of corneal matrix metalloproteases by *Pseudomonas aeruginosa* proteases, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992; 34:6
6. Cawston T, Rowan D, Mechanisms of cartilage breakdown and repair, arthritis research campaign, ARC Reports on rheumatic disease series, 1998; 15: 3
7. Strubbe D, Brooks D, Schulz G, Willis-Goulet H, Gellat K, Andrew S. Evaluation of tear film proteases in horses with ulcerative keratitis. (publicación; brooks@mail.vetmed.ufl.edu)
8. Twining S, Fukuchi T, Yue B, Wilson P, Zhou X, Loushin G. Alfa 2-macroglobulin is present and synthesized by the cornea, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994; 35: 8
9. Kenakcki K, Barret R, Hazlett L. Evidence for TIMP-1 protection against *P. Aeruginosa*- induced corneal ulceration and perforation, Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999; 40:13

10. Fini M, Girard M. Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteases by normal cornea, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1990; 31:9
11. Di Girolamo N, McCluskey P, Lloyd A, Coroneo M, Wakefields D. Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2000; 41: 671-679
12. Bistner S. Clinical diagnosis and treatment of infectious keratitis, continuing education, 1981; 3:12
13. Intramural wound healing laboratory, NINR, Internet, www.nih.gov/ninr/woundlab.htm, 16.06.99
14. Price E, Elliot E, Denisson C. Localization of proteases in resting and chemotactically activated polymorphonuclear leucocytes (PMNs), internet, www.unp.ac.za/UNPDepartments/Biochemistry/confbrend.html, 16.06.99
15. Alexander J, Samples J, Van Buskirk E, Acott T. Expression of matrix metalloproteases and inhibitor by human trabecular meshwork, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1991; 32:1
16. Brush M. Prepare to cast off, A profile of pricast acrilamide gel, *The Scientist*, 1998; 12:15
17. Willeford K, Miller W, Abrams K, Vaughns B. Modulation of proteolytic activity associated with persistent corneal ulcers in dogs, *Veterinary ophthalmology*, 1998; 1: 1
18. Panjwani N. Cornea and sclera, chapter two, *Biochemistry of the eye*, Chapman and hall, London, 1997

19. Paterson C, Wells J, Koklitis P, Higgs G, Docherty A. Recombinant tissue inhibitor of metalloproteases type 1 suppresses Alkali-burn-induced corneal ulceration in rabbits, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1994; 35:2
20. Mathews A. Medical management of corneal ulceration in the horse, Internet, 31.08.00
21. Berman M, Leary R, Gage J. Evidence for a role of the plasminogen activator-plasmin system in corneal ulceration, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1980; 19:10
22. Miller W. Using polysulfated glycosaminoglycan to treat persistent corneal erosions in dogs, *Pet practice*, 1996; 10: 916-922
23. Tervo T, Salonen E, Vahnen A, Immonen I, Stten G, Himberg J, Tarkkanen A. Elevación de la plasmina lagrimal en la enfermedad corneal, *Acta oftalmológica*, 1988; 68: 393-399
24. Moses M. ¿Are matrix metalloproteases positive or negative regulators of angiogenesis? (abstrac), Internet :[///A!/Untitled Document international sympuium on proteases.htm](http://A!/Untitled Document international sympuium on proteases.htm), 06.09.00
25. Rada J, Perry Ch, Slover M, Achen V, Gelatinase A and TIMP-2 expression in the fibrous sclera of myopic and recovering chick eyes, *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 1999; 40:13
26. Ramirez M° de, tesis de maestría, Expresión de colagenasas tipo IV por fibroblastos de pulmon normal y con fibrosis idiopática, 1998, México.