



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO

HOSPITAL “ Dr. Luis Sánchez Bulnes ”



TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL DIPLOMA

DE LA ESPECIALIDAD EN OFTALMOLOGIA

“EFECTO DE LA RAPAMICINA Y BEVACIZUMAB

INTRAVITREOS SOBRE EL FACTOR DE

CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR EN UN

MODELO PORCINO DE NEOVASCULARIZACION

COROIDEA”



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.

AUTOR

Dr. Daniel Moreno Páramo

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Virgilio Morales Canton

JURADO

DR. DANIEL OCHOA CONTRERAS
PRESIDENTE

DR. VIRGILIO MORALES CANTON
SECRETARIO

DR. GERARDO GARCIA AGUIRRE
VOCAL

DRA. ABELARDO RODRIGUEZ REYES
VOCAL

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores de la Asociación Para Evitar La Ceguera en México, de la Universidad Autónoma de Guadalajara y CEA.

A la Asociación para Evitar la Ceguera en México “Hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes” por brindarme los conocimientos y las herramientas necesarias para desempeñarme en forma ética y humana con mis pacientes.

A mis compañeros residentes con quien he trabajado de forma coordinada y adecuada.

A mis Abuelos y Abuelas porque siempre nos han impulsado hacia el frente y son un gran ejemplo.

A mis padres por haberme brindado la oportunidad de estudiar y siempre estar conmigo en los mejores y peores momentos de mi vida incondicionalmente.

A mis hermanos por siempre haber estado impulsándome hacia el frente y escucharme en todo el camino.

Finalmente quiero agradecer a mi hijo Daniel y mi esposa Ivette por ser el motor de mi vida

DEDICATORIA

Mi tesis la dedico con todo mi cariño a mi hijo Daniel,
Ivette, mis padres y mis hermanos Uriel , Edel .

INDICE

INTRODUCCIÓN	1-3
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	4
SINTESIS	5
ANTECEDENTES	6
OBJETIVOS	7
HIPÓTESIS	8
JUSTIFICACIÓN	9
MATERIAL Y METODOS	10-11
RESULTADOS	12-13
DISCUSIÓN	14-15
CONCLUSIONES	16
BIBLIOGRAFIA	17-19

Palabras clave: retina, angiogenesis, bevacizumab, rapamicina.

INTRODUCCIÓN

Los padecimientos oftalmológicos como degeneración macular relacionada con la edad (DMRE), retinopatía diabética y retinopatía del prematuro son caracterizadas por la formación anormal de nuevos vasos de capilares preexistentes, causando la pérdida de la visión por la formación de una membrana fibrovascular, hemorragia vítrea y desprendimiento de retina o de células del epitelio pigmentado (1). En la patogénesis de neovascularización (NVC) se han identificado varios factores de crecimiento angiogénicos y antiangiogénicos (PRL 16 Kd, PEDF, integrinas NF-kB) distribuidos en las diferentes capas celulares de la corio-retina y en humor vítreo (2-6). El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es la molécula angiogénica mas importante porque es la principal formadora de NVC. Este factor es una proteína mitogena de 46 kDa cuyo gen es procesado alternativamente formando variantes de la proteína codificada, se ha visto expresada en diferentes tipos de células endoteliales (5).

Aunado a lo anterior se han descrito modelos donde la inyección subretiniana de vectores que codifican para VEGF inducen una neovascularización coroidea (7-8).

El bevacizumab es un anticuerpo monoclonal que bloquea todas las isoformas del VEGF (9).

Bevacizumab ha sido utilizado previamente para otros procesos de neovascularización en nuestra institución como en membranas neovasculares, degeneración macular relacionada a la edad húmeda, retinopatía diabética entre otros mostrando eficacia y seguridad en los pacientes (9-12).

La rapamicina es un macrólido con potente actividad antimicrobiana, antitumoral y antiangiogénica (13-14). Sus propiedades antiangiogénicas se deben a la regulación a la baja del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (13-14).

Este es el primer estudio experimental donde se compara la asociación de rapamicina y bevacizumab intravítreos contra solo bevacizumab cuantificando y comparando su efecto sobre los niveles de expresión del VEGF.

Por lo que es importante utilizar nuevas terapias farmacológicas que demuestren la inhibición de factores angiogénicos (VEGF) como lo es el bevacizumab y la rapamicina.

Resumen

Objetivo: Valorar la seguridad y eficacia de la rapamicina intravítrea. Comparar el efecto de la rapamicina intravítrea con el bevacizumab sobre los niveles de expresión del VEGF.

Métodos: Doce ojos de cerdos fueron incluidos. Se les indujo neovascularización mediante láser de argón. Los ojos se dividieron en 4 grupos. En el grupo A se le inyectó de forma intravítrea solución salina balanceada, en el B se inyectó rapamicina, en el C bevacizumab y en el D tanto rapamicina como bevacizumab combinados.

Resultados: Una disminución en el VEGF fue observada en el grupo B, C y D. La reducción mayor fue observada en el grupo D. No se encontró daño histológico en todos los grupos.

Conclusiones: La rapamicina es segura y no causa alteraciones estructurales en la retina. El bevacizumab supera la acción de la rapamicina sobre los niveles de expresión del VEGF. La combinación de rapamicina y bevacizumab superan a la acción del bevacizumab.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El bevacizumab intravítreo y la rapamicina son medicamentos relativamente nuevos para uso ocular. Actúa contra el VEGF inhibiendo su acción, sin embargo no sabemos con exactitud el efecto de este factor (VEGF) en la fisiología del ojo y si al ser el bevacizumab no selectivo pudieramos estar causando mayor daño histológico en la retina.

La retinopatía diabética tiene una alta prevalencia en México (10,2 de la población) y constituye la principal causa de ceguera en pacientes de 20 – 74 años. La diabetes causa un ambiente de hipoxia y en pacientes con retinopatía diabética proliferativa se han demostrado niveles elevados de factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Es por esta razón que intentamos evaluar el efecto que tiene la rapamicina y el bevacizumab sobre el VEGF.

MARCO TEÓRICO

SÍNTESIS DEL PROYECTO

El objetivo del estudio consiste en evaluar los efectos que tienen la rapamicina y el bevacizumab intravítreos sobre los niveles de expresión del VEGF en un modelo porcino de neovascularización coroidea y valorar además si existen o no daños a nivel estructural para la retina.

ANTECEDENTES

El bevacizumab intravítreo es un anticuerpo monoclonal que actúa contra el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) evitando su unión a los receptores (1 y 2) que se encuentran en la superficie de las células endoteliales, inhibiendo de esta manera la acción del VEGF y disminuyendo o neutralizando la neovascularización. No es selectivo, y actúa contra todas las isoformas del VEGF.

La eficacia del bevacizumab ha sido comprobada en diversos estudios tanto experimentales como clínicos (9-12).

La rapamicina es un macrólido con potente actividad antimicrobiana, antitumoral y antiangiogénica. Sus propiedades antiangiogénicas se deben a la regulación a la baja del factor de crecimiento endotelial vascular (13).

Guba y colaboradores demostraron que la rapamicina inhibe el crecimiento de tumores primarios y metastáticos mediante la reducción de la acción del VEGF (14).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar el efecto que tiene sobre la expresión del VEGF la rapamicina y el bevacizumab.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- 1- Crear una membrana neovascular en porcinos mediante la aplicación de láser de argón.
- 2- Comparar los niveles de expresión de VEGF posteriores a la aplicación intravítrea de bevacizumab y rapamicina en un modelo porcino de neovascularización coroidea.
- 3- Evaluar si existen o no cambios histológicos en la retina con aplicación de bevacizumab y rapamicina intravítreas.

HIPOTESIS

Mediante el uso de láser de argón es posible crear una membrana neovascular en un modelo porcino en la cual se pueden realizar mediciones de los niveles de expresión de VEGF posteriores a la inyección intravítrea de bevacizumab y rapamicina.

JUSTIFICACIÓN

8

La retinopatía diabética tiene una alta prevalencia en México (10,2 de la población) y constituye la principal causa de ceguera en pacientes de 20 – 74 años. La diabetes causa un ambiente de hipoxia y en pacientes con retinopatía diabética proliferativa se han demostrado niveles elevados de VEGF.

El bevacizumab intravítreo es un medicamento relativamente nuevo para uso ocular. Actúa contra el VEGF inhibiendo su acción, sin embargo no sabemos con exactitud el efecto de este factor (VEGF) en la fisiología del ojo.

La rapamicina es un macrólido que no se ha utilizado previamente de forma intravítrea. No existen reportes previos en la literatura entre la relación de rapamicina y VEGF en el ojo.

MATERIAL Y METODOS

Animales

Se utilizaron doce ojos de doce cerdos raza Landras de 10 kilogramos.

Se formaron 4 grupos (A,B,C,D). A todos los grupos se les colocaron 3 gotas de tropicamida mas fenilefrina (una cada 10 minutos).

Ulteriormente en midriasis todos los grupos se les indujo neovascularización en el ojo derecho mediante la aplicación de láser de argón (ALCON R) utilizando 30 disparos de 1.5 W con un diámetro del spot de 55 micras y duración de 0.300 mseg superiores a la arcada temporal superior; todo lo anterior con lente de amplificación (Transecuator VOLK R). Las membranas fueron observadas 5 días posteriores a la aplicación del láser además de documentadas mediante fotos clínicas y angiografía con fluoresceína.

Inyecciones

Posterior a la realización de la membrana neovascular los porcinos fueron anestesiados mediante la aplicación de ketamina al 0.1% a la dosis de 1 mcg/kg.

Anestesiados los cerdos se procedió a inyectar el grupo A (n=3) previa asepsia y antisepsia con yodopovidona al 10% un volumen de 0.1 ml de solución salina balanceada de forma intravítrea, al grupo B se le aplicó 0.1ml de rapamicina (concentración 1mg/ml).

En el grupo C 0.1 ml de bevacizumab intravítreo (concentración 2.25mg/ml).

Finalmente al grupo D se le aplicaron el bevacizumab y la rapamicina a las dosis previamente descritas.

10

Enucleación

Se enuclearon los ojos de cada grupo al día 21 respectivamente y el vítreo fue congelado a -70 grados centígrados para la realización de estudios moleculares. Las retinas se fijaron en formaldehído para su posterior análisis histopatológico y evaluar toxicidad.

Niveles de VEGF en tejido

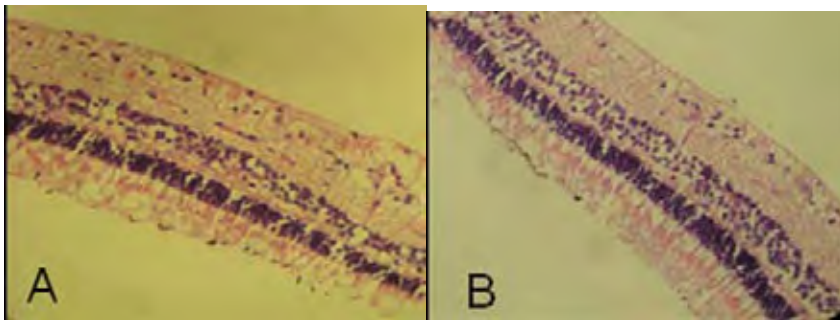
Los niveles de VEGF fueron cuantificados mediante el estudio RT-PCR previa fijación en un estabilizador de RNA y congelados a -70 grados centígrados. Los niveles de expresión de VEGF se determinaron mediante regresión lineal.

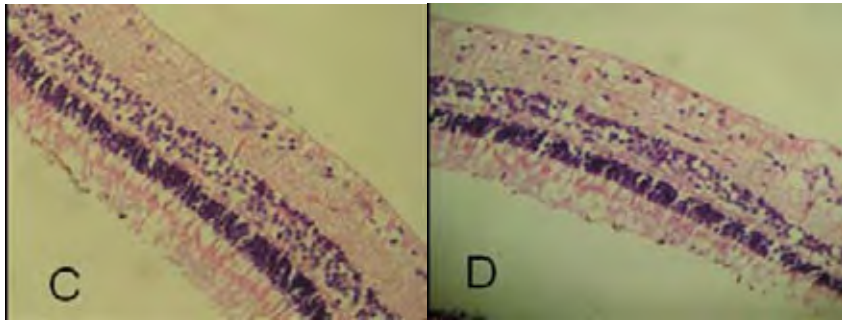
Patología

Posterior a la enucleación las retinas fueron fijadas en paraformaldehído al 4%, posteriormente conservadas en parafina y se realizaron secciones de 10 micras, posteriormente se les colocó en Triton X 0.05% y PBS por 40 minutos para su posterior realización de tinciones con hematoxilina y eosina.

RESULTADOS

Una vez realizado el estudio histológico no se observó ninguna alteración estructural en las retinas de los porcinos inyectados con solución salina (grupo A), rapamicina (grupo C), bevacizumab (grupo D) o la combinación de ambos fármacos (grupo D).





En cuanto a los niveles de expresión del VEGF los cuales podemos observar en la gráfica de barras observamos el nivel más alto de expresión en el grupo control (240 pm/ml). El grupo inyectado con bevacizumab (grupo C 100 pm/ml) superó al grupo inyectado con rapamicina (grupo B 186 pm/ml)). Los niveles inferiores de expresión del VEGF fueron encontrados en los porcinos inyectados con rapamicina y bevacizumab (grupo D 70 pm/ml).

DISCUSION

En el presente estudio se demuestra por primera vez como los niveles de expresión de VEGF son afectados mediante la combinación de rapamicina y bevacizumab intravítreos. Además comprobamos de una forma objetiva que la rapamicina no es tóxica de forma estructural para la retina mediante cortes con tinciones de hematoxilina y eosina.

Diversos tratamientos han sido sugeridos para el manejo de la neovascularización coroidea. Recientemente los anticuerpos contra el VEGF han adquirido importancia significativa en los procesos que interfieren en la angiogénesis (9). La eficacia del bevacizumab ha sido comprobada en diversos estudios tanto experimentales como clínicos (9-12).

Dentro de los tratamientos que involucran el proceso de la angiogénesis se ha descrito el uso de agentes macrólidos como la rapamicina (13).

Guba y colaboradores demostraron que la rapamicina inhibe el crecimiento de tumores primarios y metastáticos mediante la reducción de la acción del VEGF (14).

En nuestro estudio observamos que el efecto de la rapamicina a la dosis utilizada no superó el efecto del bevacizumab.

El uso de la combinación superó el efecto del bevacizumab; esto probablemente debido al mecanismo de acción de ambos fármacos, por un lado la inhibición a nivel del receptor del bevacizumab y por otro lado la inhibición a nivel intracelular a nivel del mTOR de la rapamicina.

La menor inhibición de la expresión de VEGF por la rapamicina podría ser explicada en nuestro estudio debido a una dosis insuficiente del fármaco o bien una falta de difusión del mismo hacia el tejido retiniano y coroideo.

Diversos estudios deberán ser realizados para comprobar la eficacia de la rapamicina en unidosis o en combinación con otros fármacos; no obstante nuestro estudio es el primero en compararla y combinarla con el bevacizumab.

CONCLUSIONES

El modelo porcino de neovascularización coroidea es efectivo para la medición de los niveles de VEGF.

La rapamicina no es tóxica a nivel estructural para la retina en unidosis o en combinación con el bevacizumab.

El bevacizumab en unidosis es superior a la rapamicina en la inhibición del VEGF; no obstante la combinación de estos dos fármacos logra una mayor inhibición del VEGF cuando lo comparamos con el efecto del bevacizumab.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Ferris FL 3rd, Fine SL, Hyman L. Age-related macular degeneration and blindness due to neovascular maculopathy. *Arch Ophthalmol* 1984;102:1640-2.
- 2- Wang F, Rendahl KG, Manning WC, Quiroz D, Coyne M, Miller SS. AAV-mediated expression of vascular endothelial growth factor induces choroidal neovascularization in rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 Feb;44(2):781-90.
- 3- Zulma Dueñas, José C. Rivera, Hugo Quiroz-Mercado et. al. Prolactin in eyes of patients with retinopathy of prematurity: implications for vascular regression. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2004 Jul;45(7):2049-55.
- 4- Ozaki H, Seo MS, Ozaki K, Yamada H, Yamada E, Okamoto N, Hofmann F, Wood JM, Campochiaro PA. Blockade of vascular endothelial cell growth factor receptor signaling is sufficient to completely prevent retinal neovascularization. *Am J Pathol*. 2000 Feb;156(2):697-707.
- 5- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*. 1991 Jun 25;266(18):11947-54.

6- Stellmach V, Crawford SE, Zhou W, Bouck N. Prevention of ischemia-induced retinopathy by the natural ocular antiangiogenic agent pigment epithelium-derived factor. Proc Natl Acad Sci U S A. 2001 Feb 27;98(5):2593-7.

7-.Spilsbury K, Garrett KL, Shen WY, Constable IJ, Rakoczy PE. Overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in the retinal pigment epithelium leads to the development of choroidal neovascularization. Am J Pathol 2000;157:135-44. Erratum in: Am J Pathol 2000;157:1413.

8-.Baffi J, Byrnes G, Chan CC, Csaky KG. Choroidal neovascularization in the rat induced by adenovirus mediated expression of vascular endothelial growth factor. Invest Ophthalmol Vis Sci 2000;41:3582-9.

9-Costa Ram Jorge R, Calucci D, et al. Intravitreal Bevacizumab for Choroidal Neovascularization Caused by AMD (IBeNA Study): Results of a Phase 1 Dose-Escalation Study Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006 Oct;47(10):4569-78

10- Friedlander SM, Welch RM, Vanishing disc neovascularization following intravitreal bevacizumab (avastin) injection. Arch Ophthalmol. 2006 Sep;124(9):1365.

11- Intravitreal injection of bevacizumab for choroidal neovascularization caused by pathological myopia. Br J Ophthalmol. 2006 Aug 16; rev. of print.

12- Oshima Y, Sakaguchi H, Goni F, Tano Y. Regression of iris neovascularization after intravitreal injection of bevacizumab in patients with proliferative diabetic retinopathy. *Am J Ophthalmol*. 2006 Jul;142(1):155-8

13- Sausville EA, Elsayed Y, Monga M, Kim G. Signal transduction —directed cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:199-231.

14- Guba M, von Breitenbuch P, Steinbauer M, Koehl G, Flegel S, Hornung M, Bruns CJ, Zuelke C, Farkas S, Anthuber M, Jauch KW, Geissler EK. Rapamycin inhibits primary and metastatic tumor growth by antiangiogenesis: involvement of vascular endothelial growth factor. *Nat Med* 2002;8:128-35.