



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA
FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

**Cuantificación de Neovascularización en Modelo
Animal tratado con VEGF mediante
Inmunohistoquímica.**

TESIS DE POSGRADO
Para obtener el diplomado de especialidad en

OFTALMOLOGÍA

Presenta

Dr. Jorge Alberto Flores Hernández

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Rene Cano Hidalgo





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.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: a mi madre por darme la oportunidad de existir , a mi padre por enseñarme a tomar y a darle a las cosas su justo valor.

A mis hermanos: Irma por su cariño y comprensión en los momentos en los que mi madre faltó, Juan Carlos por su ejemplo de superación y por su ayuda, Lauro por ser un apoyo total y un ejemplo durante mi infancia: gracias a los tres por ser como mis padres.

A la Dra Rosa Evagelina Garnica Hayashi por ser un ejemplo, un apoyo, un tutor en mi formación como Oftalmologo y en mi maduración como ser humano; a la Dra Lilia Garnica Hayashi por su comprensión, por sus enseñanzas y sobre todo a las 2: por su amistad.

Al Dr. Gerardo Valdes y a la Dra. Anaika Concepción Novoa por sus enseñanzas y su paciencia.

INDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCION	6
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	11
CONCLUSIONES	17
BIBLIOGRAFIA	18

RESUMEN

La neovascularización es un proceso común en diversas patologías retinianas; el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) está implicado en la regulación de angiogenesis.

Objetivo: Cuantificar y valorar el grado de neovascularización mediante inmunohistoquímica en un modelo de neovascularización retiniana utilizando VEGF recombinante humano (rhVEGF₁₆₅) en conejos.

Previo estudio piloto para establecer la dosis de rhVEGF₁₆₅ a utilizar; se conformaron 2 grupos de 3 conejos chinchilla cada uno, administrándose en ojo derecho al primer grupo rhVEGF₍₁₆₅₎ intravítreo vía pars plana a dosis de 1.25µg cada tercer día por 27 días y vehículo en el segundo grupo, bajo el mismo esquema. Para evaluar el efecto se realizó fundoscopia, fotografías de fondo a color y angiografía retiniana con fluoresceína. Los cambios estudiados fueron dilatación de vasos, tortuosidad, exudación, microaneurismas, arrosamiento venoso y neovascularización, posterior a dicho estudio se realizó enucleación y se realizaron cortes histológicos así como inmunohistoquímica con anticuerpos monoclonales contra Factor de Von Willebrand.

Resultados: Con un total de nueve dosis, se constató la presencia de dilatación de vasos, tortuosidad, microaneurismas, arrosamiento venoso y formación de neovasos en todos los casos del grupo 1, no registrándose cambio alguno en los casos del grupo control, se observó la presencia de neovasos en muestras histológicas que fueron positivas a fVW en todos los casos.

Conclusiones: El VEGF es suficiente para producir anomalías vasculares comunes en las retinopatías isquémicas. Una vez cesado el estímulo angiogénico existe una autorregulación negativa con involución de la neovascularización, la inmunohistoquímica es un método objetivo para determinar la existencia o no de neovascularización.

Palabras clave: rhVEGF₁₆₅, modelo de neovascularización, angiogenesis.

INTRODUCCIÓN:

La neovascularización se define como el crecimiento anormal de vasos; la cual se encuentra en una variedad importante de enfermedades como el cáncer, en algunas enfermedades oculares como el retinoblastoma, la degeneración macular, la retinopatía del prematuro, la retinopatía diabética; entre otras.

Muchas han sido las moléculas implicadas con propiedades reguladoras de angiogenesis como el factor de crecimiento de fibroblastos, el factor de crecimiento transformante α y β , factor de crecimiento derivado de hepatocitos, el factor de necrosis tumoral α , la angiogenina, la interleucina 8 y algunas eritropoyetinas¹.

En los últimos años, se ha puesto mayor atención al factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF; también conocido como factor de permeabilidad vascular - VPF) o como VEGF-A, una glicoproteína dimérica miembro de la superfamilia de factores de crecimiento al cual pertenece el factor de crecimiento derivado de plaquetas, localizado en el cromosoma 6 en el brazo corto, dicho gen posee 8 exones y 7 intrones^{2,3}.

El VEGF posee diversas funciones como incrementar la permeabilidad microvascular por diversos mecanismos como por vasodilatación observada *in*

vitro y que es resultado del incremento del óxido nítrico ⁴, otro mecanismo descrito es el incremento en la conducción hidráulica en los vasos debido a un incremento del calcio en las células ⁵, además de inducir división y migración celular en el endotelio, promover el crecimiento de células del endotelio vascular *in vitro* de arterias, venas y linfáticos ⁶, promover la supervivencia y apoptosis mediante la expresión de proteínas antiapoptóticas como el bcl-2 y bcl-A1 en células endoteliales ⁷, recientes estudios demuestran que el VEGF estimula la producción de factor surfactante en las células alveolares ⁸. Además de ser un importante regulador de la angiogénesis durante el desarrollo embrionario, de tener funciones a nivel del crecimiento esquelético y del sistema reproductor principalmente a nivel del ovario⁹, está implicado en la angiogénesis patológica en tumores y enfermedades oculares; tales son los casos de Diabetes mellitus, oclusión de la vena central de la retina o retinopatía del prematuro las cuales tienen como común denominador isquemia retiniana. Así como de promover en modelos animales neovascularización ^{5, 10} y linfangiogénesis en ratones ¹¹. Se mencionan 4 isoformas mayores (VEGF_{121, 165, 189, 206})⁶. Dentro de estas la VEGF 165 es la isoforma dominante.

La expresión del VEGF está regulada por ciertos factores, dentro de los principales la tensión del oxígeno juega un papel importante en la regulación de su expresión, una baja tensión de oxígeno induce un incremento en la expresión de RNA mensajero de VEGF ². Las funciones del VEGF están mediadas por receptores presentes en la superficie celular transmembranales y que pertenecen al tipo de tirosin cinasa (RTKs) los cuales son: VEGFR-1 (Flt-1), VEGFR-2 (KDR / Flk-1) estos dos expresados únicamente en las células del endotelio vascular y los cuales difieren en las propiedades al ser activados.

Otros tipos de receptores han sido descritos como el VEGFR -3 (Flt-4) el cual es expresado en el endotelio de los vasos linfáticos y del endotelio vascular y el receptor de neuropilina (NRP – 1) el cual es expresado en el endotelio vascular y en las neuronas¹². Estos dos últimos a pesar de interactuar con el VEGF son considerados como correceptores. La activación de dichos receptores se da mediante la unión del VEGF a su receptor con lo que se provoca la dimerización y la autofosforilación en la parte intracelular del receptor y la activación de las proteínas. Dentro de las acciones de los diferentes receptores se ha postulado que el principal involucrado en el efecto de angiogenesis es el VEGFR- 2, mientras que el VEGFR- 1 es utilizado por macrófagos y monocitos dentro de funciones normales del sistema inmune¹³⁻¹⁵. Se han descrito modelos de neovascularización retiniana como el uso de estreptozotocina intraperitoneal para producir daño en las células β del páncreas resultando en una diabetes secundaria, hiperoxia-normoxia simulando un modelo de retinopatía del prematuro, el uso de un adenovirus recombinante binario asociado con VEGF bajo el control de un promotor humano del citomegalovirus y el uso de VEGF intravítreo para estimular angiogenesis, entre otros⁽¹⁶⁻¹⁹⁾.

El presente estudio tiene como objetivo el determinar si la administración intravítrea de VEGF₁₆₅ recombinante humano (rhVEGF165) en conejos, es capaz de producir neovascularización retiniana y de desencadenar la ruptura de la barrera hematorretiniana. Además de estandarizar el número e intervalo de inyecciones intravítreas requeridas de VEGF₁₆₅ recombinante humano, para la generación del mismo. Cuantificar y verificar mediante inmunohistoquímica la presencia de neovascularización.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio:

- ◆ Prospectivo, experimental.

Variables:

- ◆ Neovascularización retiniana.
- ◆ Positividad a inmunohistoquímica

Criterios de Inclusión.

- ◆ Conejos sin alteraciones oculares.

Criterios de exclusión.

- ◆ Presencia de alteraciones oculares en conejos.

Análisis estadístico.

- ◆ Calculo de Riesgo relativo
- ◆ Tamaño de la muestra: 6 conejos divididos en 2 grupos.
 1. Tratados con VEGF recombinante
 2. Tratados con Solución balanceada

METODOLOGIA

Estudios iniciales y de seguimiento

- Biomicroscopía
- Fundoscopía
- Fotos clínicas
- FAG



Inyección los días:

- 0-3-6-9-12-15-18-21-24-27

10



6 conejos

- OD: VEGF 1.25 μ g/100 μ l *
- OI: solución salina balanceada



- Estudios los días:

Basal	10 dosis	1a semana Sin VEGF	2a Semana Sin VEGF
-------	----------	-----------------------	-----------------------

Enucleación

- Cortes histológicos (*hematoxilina y eosina*)
- Inmunohistoquímica (*anticuerpo policlonal anti WVF*)

RESULTADOS

Se estudiaron 6 conejos machos a los cuales se les inyectó intravítrea vía pars plana en el ojo derecho VEGF a una dosis de 1.25 mg/100ml y en el ojo izquierdo 1.25 de solución salina balanceada. Se realizó exploración mediante Fluorangiografía al cumplir 10 dosis a la 1era semana y a la 2da semanas, Posterior a esto se enuclearon ambos ojos: y se realizaron cortes histológicos con tinción de hematoxilina y eosina e inmunohistoquímica con anticuerpo policlonal anti-factor de Von Willebrand.

DISTRIBUCIÓN POR GRUPO

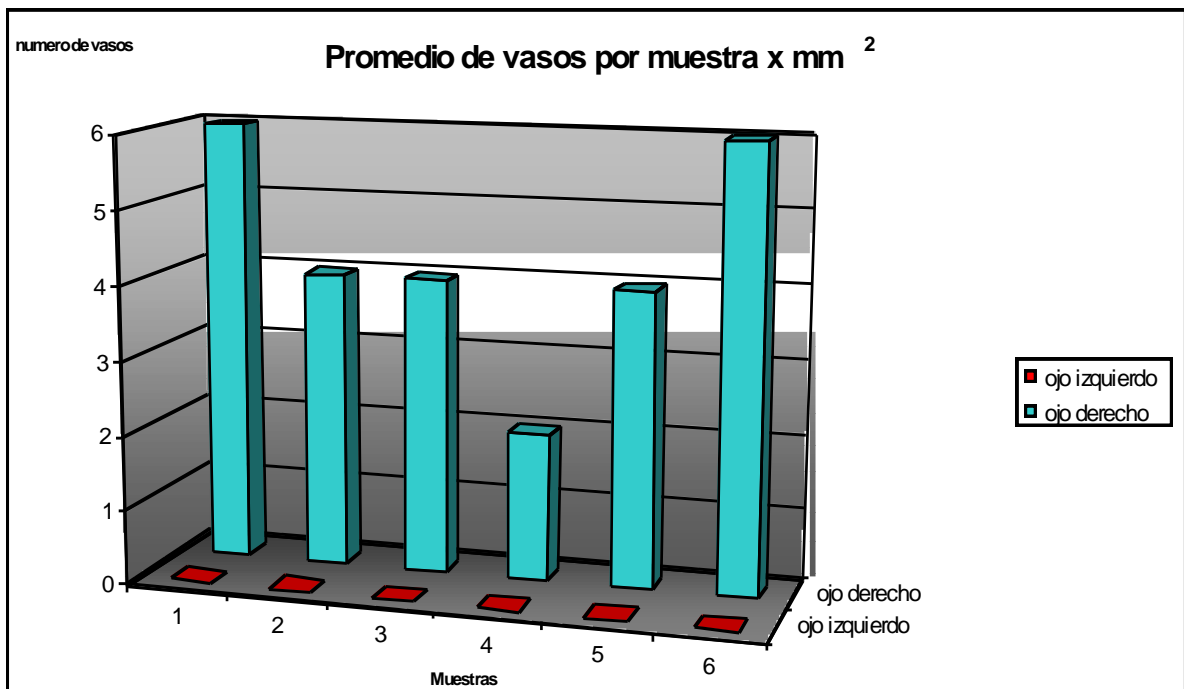


Figura 1. Promedio de vasos mm² en los conejos tratados con VEGF y los conejos tratados con solución balanceada.

Analisis Estadistico

Se obtuvo un riesgo relativo de 280 % más de desarrollar neovascularización en los conejos que fueron tratados con VEGF(165) que los tratados con solución salina balanceada.

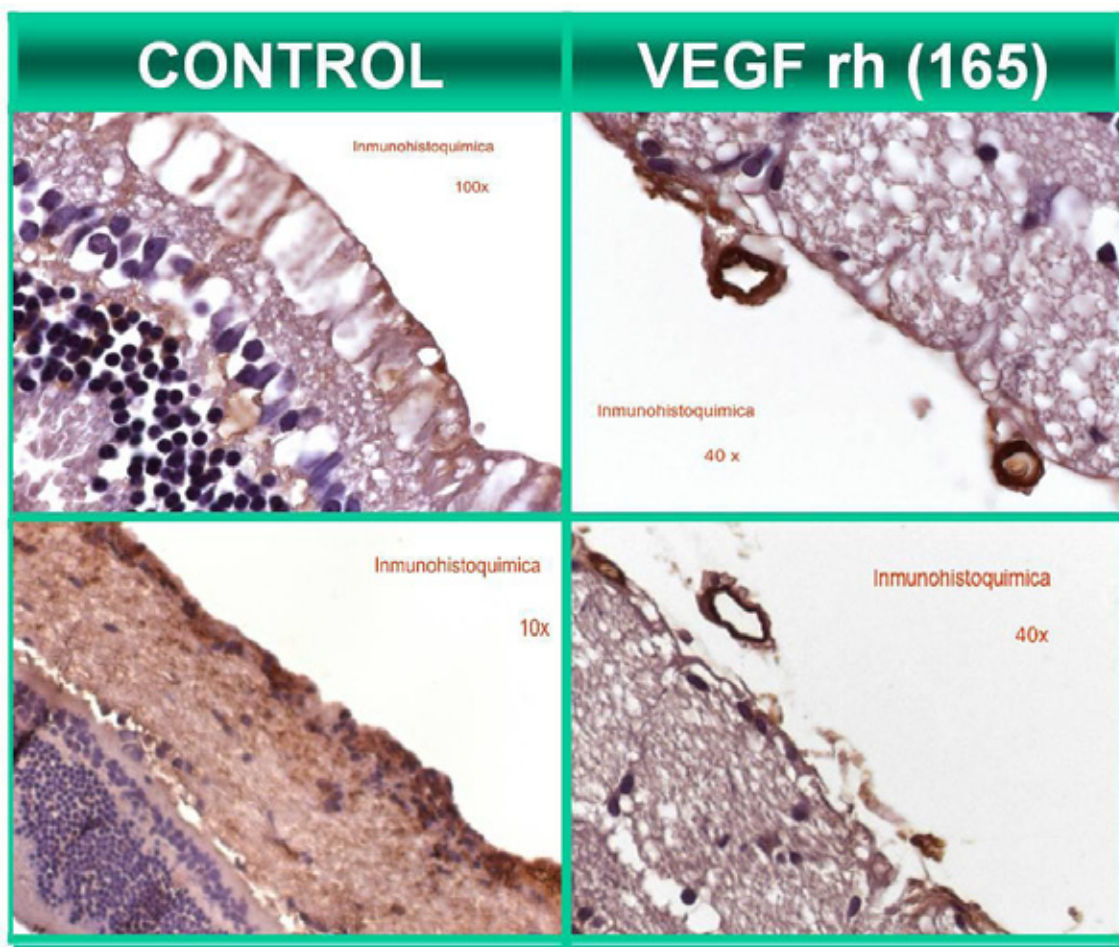


Figura 1. Cortes Histologicos con aumento 100x y 10 x en muestras negativas y positivas a Inmunohistoquímica.

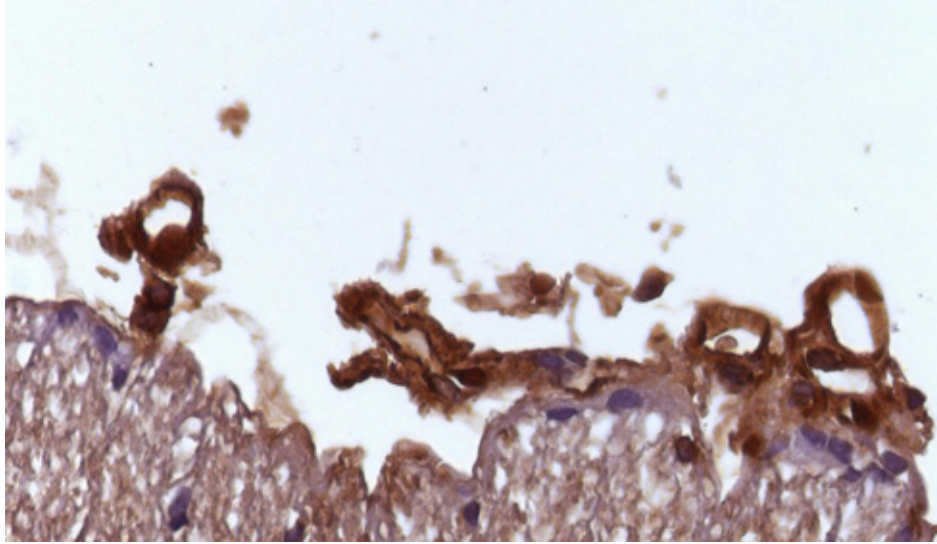


Figura 2. Corte Histologico con aumento 100x en muestras positivas a la Inmunohistiquimica contra Factor de VW.

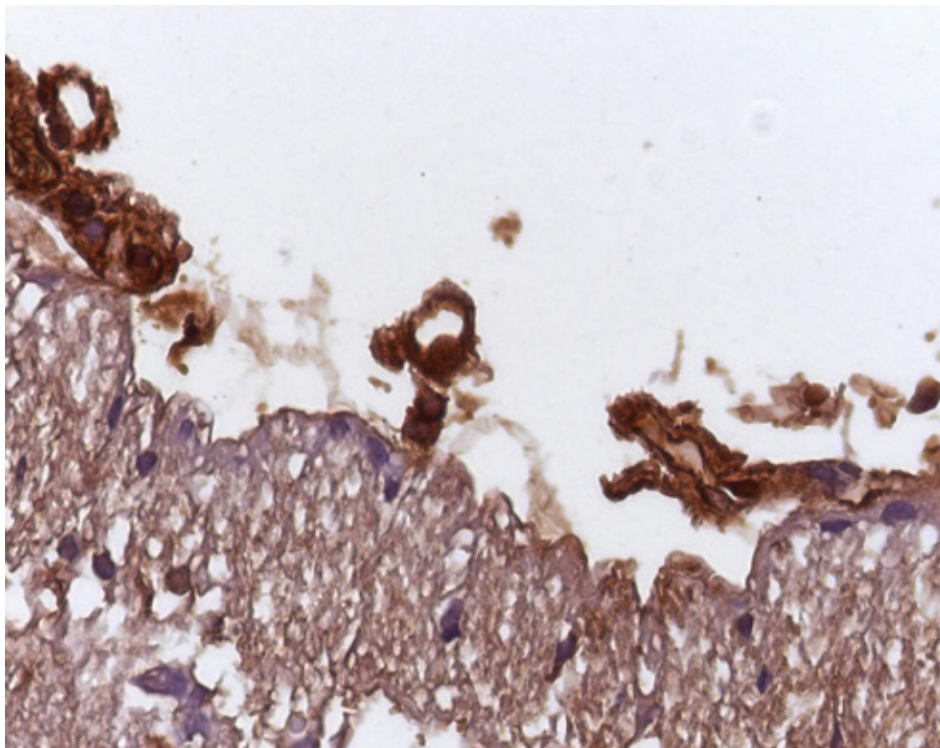


Figura 3 . Corte Histologico con aumento 100x en muestras positivas a la Inmunohistiquimica contra Factor de VW.

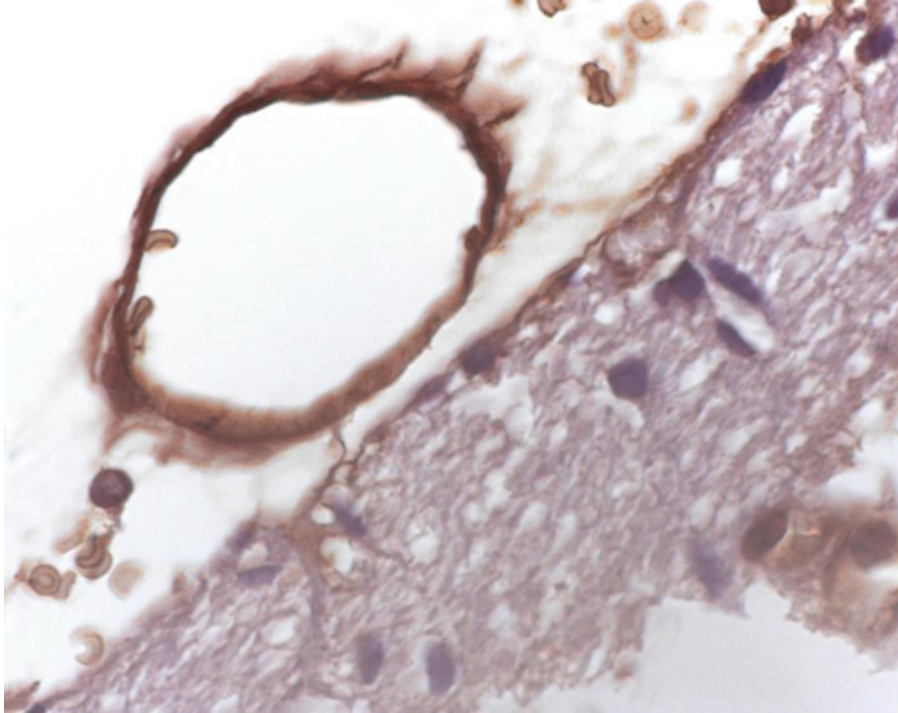


Figura 4 . Corte Histologico con aumento 100x con inmersión en muestra positiva a la Inmunohistiquimica contra Factor de VW, donde podemos apreciar neovascularización retiniana.

Se observaron cambios vasculares en todos los conejos tratados con VEGF (165), mediante Fluorangiografia y Funduscopia.

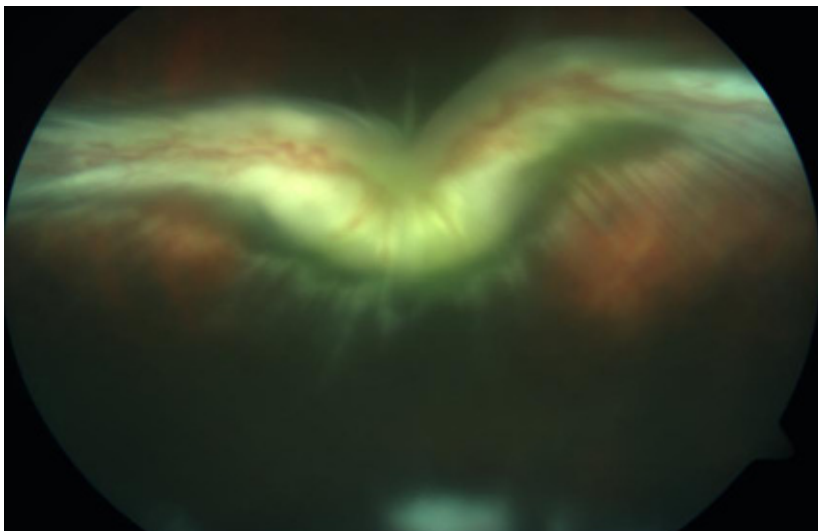


Figura 5. Funduscopia de conejo control en el cual se aprecian las estructuras normales.

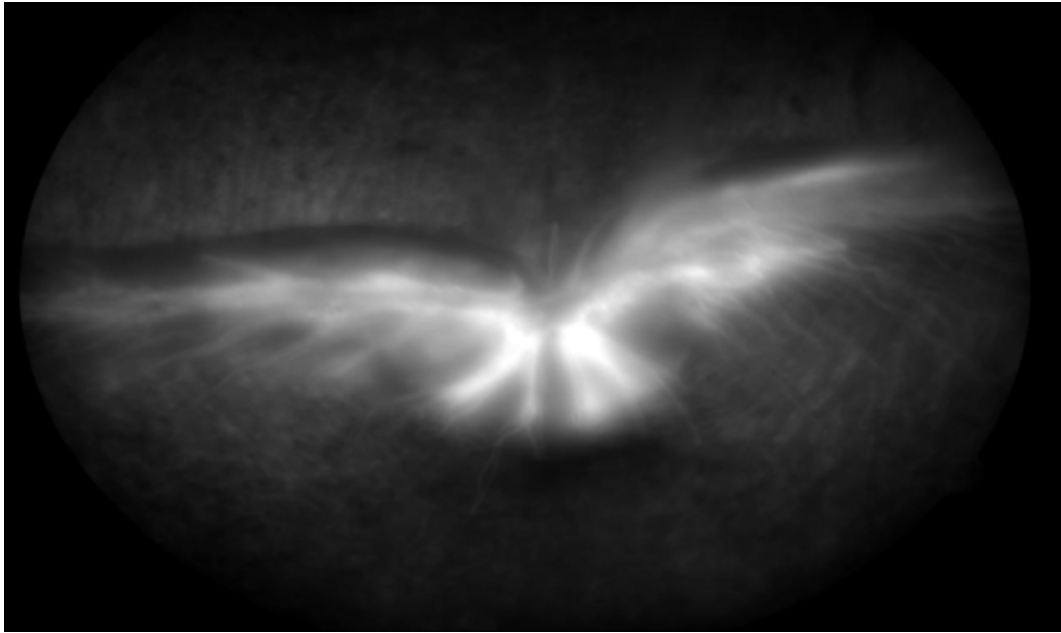


Figura 6. Fluorangiografía de conejo tratado con VEGF en el cual se aprecian datos de Fuga y formación de asas vasculares.

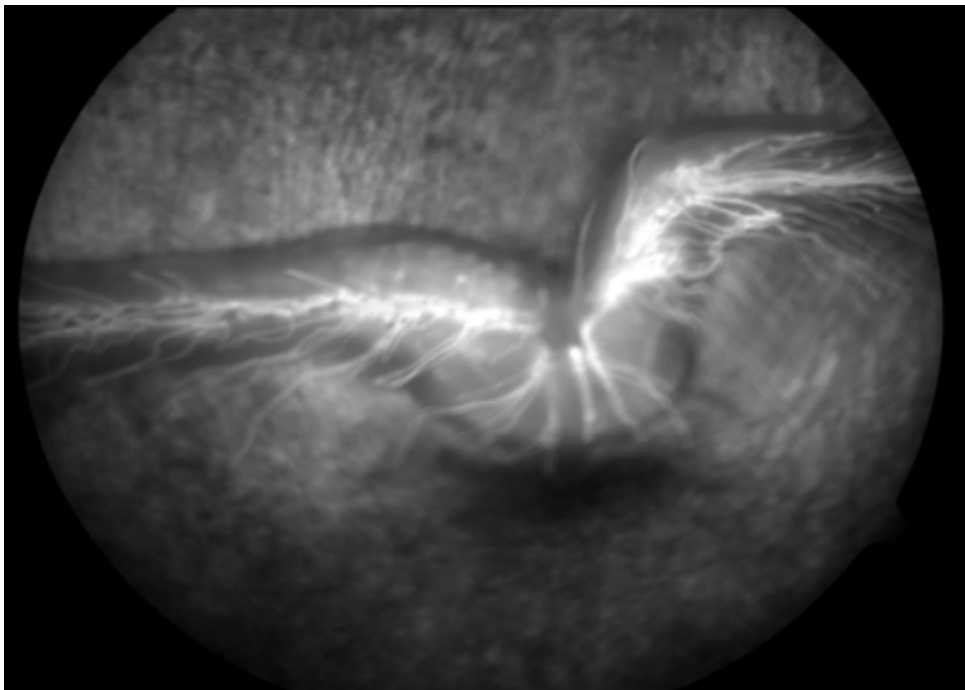


Figura 7. Fluorangiografía de conejo tratado con VEGF en el cual se aprecian datos de Fuga mínimos y formación de asas vasculares

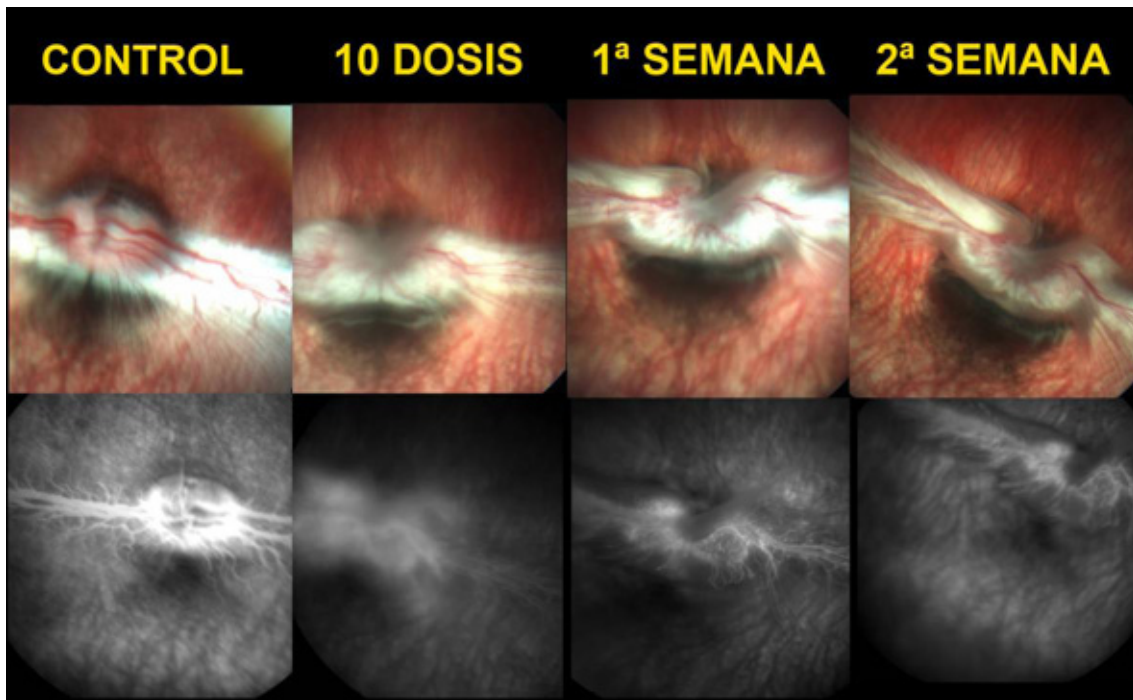


Figura 8. Comparativo de Funduscopya y Fluorangiografia en las diferentes revisiones en donde podemos ver los cambios inducidos en los conejos tratado con VEGF .

Conclusiones.

- El VEGF es suficiente y necesario para la formación de neovascularización
- Respuesta a estímulos angiogénicos no es lineal; es variable y nunca es igual y en el mismo grado.
- Una vez retirado el estímulo angiogénico los reguladores negativos endógenos son capaces de frenar la angiogénesis
- La Inmunohistoquímica nos permite cuantificar el grado de angiogénesis de una manera objetiva y su localización.

BIBLIOGRAFIA

1. Francis PJ, Stout T. Gene therapy and control of angiogenesis. *Ophthalmol Clin N Am*, 2003;16:575-582.
2. Dor Y. Vascular endothelial growth factor and vascular adjustments to perturbations in oxygen homeostasis. *Am J. Physiol*, 2001; 280: C1367-C1374.
3. Vincenti V et al. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation*, 1996;93:1493 -1495.
4. Ku DD, Zaleski JK, Liu S. & Brock TA. Vascular endothelial growth factor induces EDRF – dependent relaxation in coronary arteries. *Am J. Physiol*, 1993; 265: H586 – H592.
5. Plouet J. Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT29 cells. *EMBO J*, 1989;8: 3801 – 3808.
6. Tischer E, Mitchell R, Hartman T et al. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alterantive exon splicing. *J Biol Chem*, 1991;266:11947 – 11954.
7. Genber HP, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl – 2 and A1 in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem*, 1998; 273: 13313 – 13316.
8. Compernelle V et al. Loss of HIF – 2 α and inhibition of VEGF impair fetal lung maturation, whereas treatment with VEGF prevents fatal respiratory distress in premature mice. *Nature Medicine*, 2002;8: 702 – 710.

9. Ferrara N. The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 2003; 6: 669 – 676.
10. Leung DW. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 1989; 246: 1306 – 1309.
11. Nagy JA et al. Vascular permeability factor / vascular endothelial factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis. *J Exp. Med*, 2002; 196: 1497 – 1506.
12. Dvorak HF. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a critical cytokine in tumor angiogenesis and a potential target for diagnosis and therapy. *J Clin Oncol*, 2002; 20: 4368–4380.
13. Ferrara N & Davis – Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev*, 1997; 18 : 4- 25.
14. Bates DO. Vascular endothelial growth factor increases microvascular permeability via a Ca (2+) dependent pathway. *Am J. Physiol*, 1997; 273: H687 – H694.
15. Tischer E. The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem*, 1991; 266: 11947-11954.
16. The Eyetech Study Group. Preclinical and phase 1A clinical evaluation of an Anti-VEGF pegylated aptamer (EYE001) for the treatment of exudative Age related macular degeneration. *Retina*, 2002; 22: 143-152.
17. Tolentino MJ et al. Intravitreal injections of vascular endothelial growth factor produce retinal ischemia and microangiopathy in adult pimate. *Ophthalmology*, 1996; 103: 1820-1828

18. Tolentino MJ et al. Vascular endothelial growth factor is sufficient to produce iris neovascularization and neovascular glaucoma in a nonhuman primate. *Arch Ophthalmol*, 1996;114:964-970.
19. Leske DA et al. The role of VEGF and IGF-1 in a hypercarbic oxygen induced retinopathy rat model of ROP. *Molecular Vision*, 2004; 10:43-50.