

Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado

Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz, I.A.P.

Centro de Investigación Biomédica

“Expresión del receptor de Factor de Necrosis Tumoral en
cataratas seniles, traumáticas y diabéticas”

Tesis de posgrado para optar por el grado de:

Cirujano Oftalmólogo

Presenta:

Dr. Eduardo Sebastián Arellano Arias

Asesora:

M. en C. Atzín Robles Contreras

Ciudad de México, julio 2016



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.

Este trabajo se llevó a cabo en el Centro de Investigación Biomédica, con apoyo del departamento clínico de Microcirugía de Catarata y Segmento Anterior de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I. A. P. Se llevó a cabo bajo la dirección y supervisión de la M. en C. Atzín Robles Contreras, investigadora titular del Centro de Investigación Biomédica. Así mismo, se contó con la participación de los pasantes de la carrera Químico Farmacéutico Biotecnólogo Nora Leticia López Araujo y Rogelio Rubén Centeno Hernández, estudiantes del Centro de Investigación Biomédica de la Fundación.

Agradezco a mis padres, quienes desde el inicio de mis días me han guiado y acompañado con fe y entusiasmo.

Dedicatoria

A mi madre, por estar siempre a mi lado, por luchar por mi y por mi educación. Por enseñarme que no existen límites. Gracias por tu amor incondicional.

A mi padre, por estar siempre presente, por enseñarme a ver el mundo de otra forma. Gracias por confiar siempre en mi, gracias por todo tu amor.

A mi tía, mi segunda madre, quién me enseñó todo lo que se de alegría, quién siempre me impulsó y guió. Espero llenarte siempre de orgullo.

A Rodrigo, mi enano, porque día a día me esfuerzo por ser un buen ejemplo para ti.

Gracias Atzin por todo lo que me enseñaste, por morir en la raya, pero sobre todo por tu amistad.

Índice

I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	3
III. Planteamiento del problema.....	8
IV. Justificación.....	8
V. Pregunta de investigación.....	9
VI. Objetivo.....	9
VII. Recursos financieros y de factibilidad.....	11
VIII. Material y métodos.....	12
IX. Bioseguridad y consideraciones éticas.....	15
X. Resultados.....	17
XI. Discusión.....	20
XII. Conclusiones.....	24
XIII. Referencias.....	25

Resumen

Objetivo: Comparar la presencia del receptor de Factor de Necrosis Tumoral (TNFR) en cristalinos con catarata senil, traumática y diabética.

Material y métodos: Se recolectaron cristalinos de pacientes operados por diagnóstico clínico de catarata senil, traumática y diabética. Se procesaron las muestras para cuantificar las proteínas presentes y de ellas se identificó la cantidad de TNFRSF1A mediante ELISA. Para analizar el tipo de distribución de los datos se utilizó la prueba de D'Agostino & Pearson y para la comparación de los grupos se utilizó la prueba de Kruskal Wallis.

Resultados: Se encontró en el grupo de cataratas seniles una concentración media de TNFR de 172.7 ± 124.5 pg/ml. En las cataratas traumáticas la media de TNFR fue de

409.8±124.5pg/ml y en las cataratas diabéticas de 457.9±212.1 pg/ml. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre catarata senil y traumática (p=0.0051) y senil y diabética (p=0.0067). No hubo diferencia estadísticamente significativa entre catarata traumática y diabética (p=0.454).

Conclusiones: Se demostró una expresión diferencial en los niveles de TNFR en cataratas traumáticas y diabéticas con respecto a las cataratas seniles. Este aumento pudiera estar relacionado con la sobreexpresión de TNF que a su vez representaría un mecanismo inflamatorio en el desarrollo de las cataratas traumáticas y diabéticas. También permite suponer que la apoptosis está implicada en las alteraciones que sufren los cristalinos con esta patología.

Introducción

La catarata senil es la principal causa de ceguera reversible en población adulta a nivel mundial. A pesar de que se han descrito diversos mecanismos que contribuyen a su desarrollo, no se conoce el mecanismo fisiopatológico exacto que desencadena la cascada de acontecimientos que conducen a su desarrollo. Algunos modelos proponen que procesos inflamatorios son los responsables de iniciar dichos cambios. El Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) es un importante mediador metabólico, inmunológico e inflamatorio, por lo que podría tener algún papel en esta patología.

El TNF- α originalmente se describió como una citocina implicada en la supresión tumoral, de ahí su nombre. Sin embargo, a lo largo del tiempo se han identificado funciones de diversa naturaleza en relación a

esta proteína. Entre estas, se ha caracterizado como modulador inmunológico y metabólico.¹⁻⁶ También se ha descrito un papel como pirógeno endógeno, estimulante de producción de interleucinas, prostaglandinas y liberación de tromboxano. Igualmente, estimula la fagocitosis, la adhesión leucocitaria y participa en la degranulación y liberación de especies reactivas de oxígeno de las células inflamatorias.^{1,6,7}

Sin embargo, una de sus funciones más importantes es la modulación de la apoptosis, ya que la presencia de TNF- α puede estimular la muerte celular programada en células que han sufrido daño traumático o que se encuentran bajo estrés fisiológico. En algunos estudios se ha intentado utilizar al TNF- α como marcador pronóstico en pacientes que sufrieron traumatismo. Una más de las funciones propuestas para el TNF- α es el

estímulo para la diferenciación y mitosis de los fibroblastos.^{2,8}

El TNF- α cuenta con dos tipos de receptores transmembranales (TNFR), el receptor tipo I y el tipo II, con pesos moleculares de 55kDa y 75kDa respectivamente. De estos, el que posee mayor afinidad para el TNF- α sérico es el receptor tipo I, sin embargo, se ha reportado actividad biológica en ambos tipos de receptores. Existe una tercera variante del receptor para TNF- α que corresponde al TNFR dimérico que, aunque no se cuenta con mucha información, se sabe está presente en algunos fluidos humanos.²

En el 2013, Robles-Contreras y colaboradores realizaron un estudio sobre el proteoma apoptótico de la catarata senil. El objetivo de este trabajo fue asociar la apoptosis con la fisiopatología de la enfermedad. Se

estudiaron grupos de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas relacionadas con esta patología, realizando una comparación con cristalinos sanos. En sus resultados encontraron incrementadas ambos grupos de proteínas, las proapoptóticas y las antiapoptóticas, destacando un aumento significativo de TNFR. Este último es el único receptor relacionado con la apoptosis que mostró un aumento significativo en su expresión.⁹

Por otra parte, García y colaboradores realizaron un análisis de citocinas en el material cristalino de cataratas diabéticas y seniles, encontrando en ambos grupos citocinas inflamatorias. Reportó en la catarata diabética un incremento de IL-6 en comparación con la catarata senil. En su trabajo, no encontró diferencia significativa en el TNF- α entre ambos grupos.¹⁰

A partir de estos estudios es que surge la pregunta con respecto al papel que pudieran tener los mediadores de la apoptosis en el desarrollo de los diferentes tipos de catarata. Particularmente, si el TNF- α y su receptor pudieran estar implicados en las distintas modalidades de este padecimiento.

Planteamiento del problema

Actualmente no se conoce el mecanismo fisiopatológico exacto de las cataratas, por lo que buscamos determinar si existe relación entre el desarrollo de los diferentes tipos de catarata y un mecanismo inflamatorio subyacente.

Justificación

Sabemos que en los diferentes tipos de cataratas existe una expresión aumentada de mediadores inflamatorios, entre ellos el Factor de Necrosis Tumoral. Sin embargo, no conocemos la expresión diferencial entre la catarata senil, traumática y diabética. Es por ello que, a través de la medición de su receptor (TNFR), buscamos plantear nuevas interrogantes para que, en futuros estudios, se intente aclarar su rol en las variantes de esta patología.

Pregunta de investigación

¿Existe expresión diferencial del receptor de Factor de Necrosis Tumoral en cristalinios de catarata senil, traumática y diabética?

Hipótesis

Existe una expresión diferencial del receptor de Factor de Necrosis Tumoral en los cristalinios de catarata senil, traumática y diabética.

Objetivo general

Cuantificar la presencia de receptor de Factor de Necrosis Tumoral Tipo I (TNFRSF1A) en cristalinios con catarata senil, traumática y diabética.

Objetivos específicos

- Cuantificar la presencia de TNFRSF1A en cristalinos con catarata senil.
- Cuantificar la presencia de TNFRSF1A en cristalinos con catarata traumática.
- Cuantificar la presencia de TNFRSF1A en cristalinos con catarata diabética.
- Comparar la expresión de TNFRSF1A entre los diferentes tipos de catarata.

Recursos financieros y de factibilidad

Este estudio fue llevado a cabo en el Centro de Investigación Biomédica de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz que cuenta con la infraestructura necesaria para realizar los procedimientos que ameritó este trabajo de investigación. Los reactivos e insumos ocupados fueron adquiridos con recursos de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz destinados para dicho propósito.

Material y métodos

Es un estudio transversal, observacional y analítico, que se llevó a cabo en el Centro de Investigación Biomédica de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz en la Ciudad de México, México en el periodo comprendido de marzo a noviembre de 2015.

Muestras

Se utilizaron cristalinicos de pacientes que fueron operados por diagnóstico clínico de catarata senil, catarata traumática o catarata diabética. Dichas muestras se tomaron una vez que se concluyó el procedimiento quirúrgico, sin realizar modificaciones a la técnica quirúrgica planeada para cada paciente. Se incluyeron pacientes operados mediante extracción extracapsular de

catarata y facoemulsificación, independientemente del grado de opacidad del cristalino.

Se excluyeron pacientes con diagnóstico de catarata congénita, así como aquellos paciente operados mediante cirugía de catarata asistida por láser de femtosegundos.

Se eliminaron los pacientes que no contaron con una muestra suficiente de tejido cristalino para llevar a cabo la cuantificación de proteínas.

Una vez recolectadas las muestras se colocaron en tubos con solución reguladora de lisis y se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Procesamiento de las muestras

Para analizar las muestras, se retiraron de congelación y se machacó el tejido para homogenizarlo. Una vez realizado este procedimiento, se centrifugó a 10,000 revoluciones por minuto durante cinco minutos y se retiró el sobrenadante del material, quedando en esta fase las proteínas totales. Las proteínas totales se cuantificaron mediante espectrofotometría con ayuda del Nanodrop®.

Una vez cuantificada la cantidad de proteína se ajustó la cantidad de proteína a 1mg/ml en un volumen de 50 microlitros.

Posteriormente se procedió a realizar el ELISA para la cuantificación de TNFRSF1A (R&D Systems®, MN, USA) siguiendo la metodología propuesta por el fabricante.

Análisis estadístico

Para analizar el tipo de distribución de los datos se utilizó la prueba de D'Agostino & Pearson y para la comparación de los tres grupos se utilizó una prueba de Kruskall Wallis, en donde un valor de $p < 0.05$ se consideró una diferencia estadísticamente significativa.

Bioseguridad y consideraciones éticas

Esta investigación no representó ningún riesgo para los pacientes incluidos en el estudio, ya que como parte habitual del proceso quirúrgico al que se vieron sometidos (cirugía de catarata) se pierde humor acuoso. Por lo tanto, la toma de especímenes no requirió de modificaciones de la técnica quirúrgica habitual ni representó riesgo para la continuación de la cirugía.

El protocolo de investigación fue autorizado por el Comité de Investigación y el Comité de Ética de la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz y los pacientes incluidos en el mismo firmaron el consentimiento informado.

Resultados

Se corrieron un total de 40 muestras (30 cataratas seniles, 5 cataratas traumáticas y 5 cataratas diabéticas). Una vez realizadas las pruebas se encontraron las siguientes cuantificaciones: en las cataratas seniles se encontró una concentración media de TNFR de 172.7 ± 124.5 pg/ml, en cataratas traumáticas fue de 409.8 ± 183.6 pg/ml y en las cataratas diabéticas de 457.9 ± 212.1 pg/ml (Tabla I).

Tipo de catarata	TNFR pg/ml	Desviación estándar
Senil	172.7	± 124.5
Traumática	409.8	± 183.6
Diabética	457.9	± 212.1

Tabla I. Valores promedio de TNFR en pg/ml y desviación estándar en cataratas seniles, traumáticas y diabéticas.

Al comparar los valores de catarata senil y traumática se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0051$). Del mismo modo, la diferencia fue significativa entre los grupos de catarata senil y diabética ($p=0.0067$). En ambos casos, la expresión de TNFR fue menor en las cataratas seniles (Figura I).

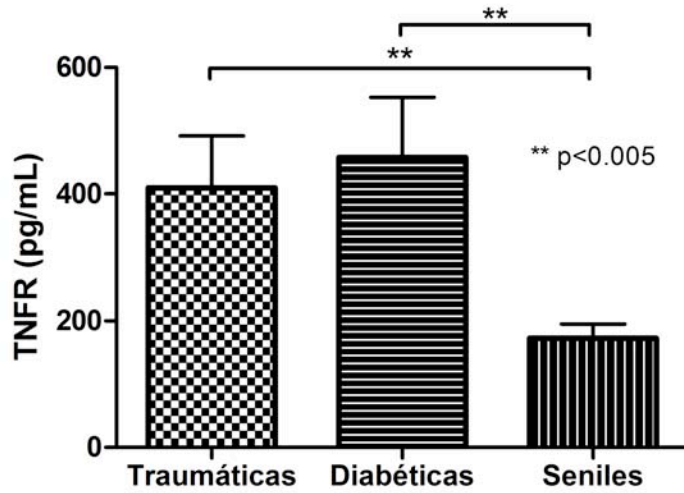


Figura I. Valores de TNFR en pg/ml por tipo de catarata (traumática, diabética y senil). **Diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.05$.

Al evaluar la presencia de TNFR en cataratas traumáticas y compararlas con las cataratas diabéticas, no se encontró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.454$).

Discusión

En nuestros resultados encontramos que existe expresión diferencial del TNFR en las cataratas seniles con respecto a las traumáticas y diabéticas. Este hecho permite proponer que la fisiopatología que conduce al desarrollo de catarata es diferente entre los grupos de estudio.

Es de destacar que entre las cataratas traumáticas y las diabéticas no existió diferencia estadísticamente significativa de TNFR.

Existen reportes que demuestran que en los pacientes con diabetes mellitus existe un estado inflamatorio generalizado, mismo que podemos corroborar por el aumento en las citocinas inflamatorias encontrado en el estudio de García y colaboradores¹⁰. Con nuestros resultados podemos sugerir que el aumento de TNFR es

proporcional a la concentración de Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α) en el microambiente que circunda al cristalino cataratoso. Este aumento en el TNF- α es propio de un estado proinflamatorio.^{11,12}

Por otra parte, cuando el cuerpo humano se ve sometido a estados traumáticos también se desencadenan estados inflamatorios que, sin la regulación adecuada, se pueden volver crónicos y el cristalino no es la excepción. Nuevamente, los datos obtenidos corresponden con un estado inflamatorio propio de esta patología, corroborado por los niveles incrementados de TNRF con respecto a la catarata senil.¹³

Además de la participación en la cascada inflamatoria que tiene el TNF- α , el incremento en sus niveles conduce a la activación de diferentes mediadores

intracelulares que culminan con la activación enzimática propia de la muerte celular programada o apoptosis. Los dos procesos, inflamación y apoptosis, pueden ser los responsables del desarrollo de las cataratas diabéticas y traumáticas.^{2,8}

En el otro grupo de estudio, las cataratas seniles mostraron una menor expresión del TNFR. Esto nos plantea la posibilidad que su desarrollo sea causado por mediadores químicos distintos al TNF- α . Esto sugiere que, a pesar de manifestarse clínicamente con baja visual, cataratas seniles, traumáticas y diabéticas tienen una inmunofisiopatología distinta.

Los resultados obtenidos permiten plantear nuevas líneas de investigación. Por un lado, se pueden buscar los factores que desencadenan y modulan químicamente la formación de cataratas seniles y, por otra parte, confirmar

si la cascada inflamatoria y/o apoptótica es responsable de la formación de cataratas diabéticas y traumáticas.

Una posible aplicación de los resultados obtenidos, es la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos para prevenir, o en su caso frenar, la formación de cataratas diabéticas. Así mismo, se podría evaluar la correlación entre los niveles de TNFR en cataratas diabéticas y el tiempo de evolución de la diabetes mellitus. Esta misma correlación se podría realizar con los niveles séricos de glucosa.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos, se demuestra una expresión diferencial en los niveles de TNFR en cataratas traumáticas y diabéticas con respecto a las cataratas seniles, mostrando un incremento en el primer grupo. Este aumento puede estar relacionado con una sobreexpresión de TNF- α que a su vez representaría un mecanismo inflamatorio en el desarrollo de las cataratas traumáticas y diabéticas. De igual manera, permite suponer que la apoptosis está implicada en las alteraciones que sufren los cristalinos con esta patología.

Estos hallazgos plantean nuevos cuestionamientos acerca de los factores detonantes y promotores del desarrollo de cataratas en los diferentes grupos estudiados, lo que podría generar nuevas líneas de investigación al respecto.

Referencias

1. Fleisher, L, Ferrell, J, McGahan. OCULAR INFLAMMATORY EFFECTS OF INTRAVITREALLY INJECTED TUMOR NECROSIS FACTOR- ALPHA AND ENDOTOXIN. *Inflammation*, 1990, Vol. 13, No. 3, pp. 325-335.
2. Watts, A, Hunt, N, Madigan, M, *et al.* Soluble TNF- α receptors bind and neutralize over-expressed transmembrane TNF- α on macrophages, but do not inhibit its processing. *Journal of Leukocyte Biology*, December 1999, Vol. 66, pp. 1005-1013.
3. Pfizenmaier, K, Kronke, M, Scheurick, P, *et al.* Tumor Necrosis Factor (TNF) Alpha: Control of TNF-Sensitivity and Molecular Mechanisms of TNF-Mediated Growth Inhibition. *Blut*, 1987, Vol 55, pp. 1-10.

4. Zheng Z, Ke, Y, Jin, M . *et al.* Anti-Inflammatory Effect of the Alpha-Melanocyte Stimulating Hormone in Animal Eyes Undergoing Extracapsular Lens Extraction. *Molecular Biology*, 2011, Vol. 45, No.2, pp. 241-250.
5. Callaghan, M, Lovis, R, Rammohan, *et al.* Autocrine regulation of collagenase gene expression by TNF- α in U937 cells. *Journal of Leukocyte Biology*, January 1996, Vol. 59, pp. 125-132.
6. Shigemitsu, T, Ishiguro, K, Shimizu, *et al.* Immunocytochemical features of lens after cataract tissue- signalling molecules (growth factors, cytokines, other signalling molecules), cytoskeleton proteins, cellular and extracellular matrix proteins. *International Ophthalmology*, 2001, Vol. 23, pp.137-144.
7. Kochukov, M, McNearney, T, Yin, H, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) enhances functional

- thermal and chemical responses of TRP cation channels in human synoviocytes. *Molecular Pain* 2009, Vol. 5:49, pp. -16.
8. Sheng, W, Hu, S, Ni, H, *et al.* TNF- α induced chemokine production and apoptosis in human neural precursor cells. *Journal of Leukocyte Biology*, December 2005, Vol. 78, pp. 1233- 1241.
 9. Robles-Contreras, A, Palacio, C, Arredondo-Flores *et al.* Human apoptotic proteome of senile cataract. *IOVS* June 2013, Vol. 54, pp. 2973
 10. García-García M, Palacio-Pastrana C, Robles-Contreras A. Análisis de citocinas en material cristalino de catarata diabética y senil. Tesis especialidad UNAM. 2015.
 11. Schmidt, M, Duncan, B, Sharrett, A *et al.* Markers of inflammation and prediction of diabetes mellitus in adults (Atherosclerosis Risk in Communities

Study): a cohort study. *Lancet*, May 1999 Vol. 353 (9165), pp. 1649-1652.

12. Xu, H, Barnes, G, Yang, Q *et al.* Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest.* December 2003 Vol 112 (12), pp. 1821-1830.

13. Lenz, A, Franklin, G, Cheadle, W. Systemic inflammation after trauma. *Injury*, December 2013, Vol. 38 (12), pp. 1336-1345.