



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO I.A.P. HOSPITAL "DR.
LUIS SÁNCHEZ BULNES"

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE RB-35 EN VIABILIDAD Y
CRECIMIENTO EN UNA LINEA CELULAR DE EPITELIO CORNEAL**

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE:

ESPECIALISTA EN OFTALMOLOGIA

PRESENTA:

DRA. BLANCA ELIZABETH MARTINEZ BAEZ

ASESOR:

DRA. ROSARIO GULIAS CAÑIZO

CIUDAD DE MÉXICO, 2017



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.

**EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE RB-35 EN
VIABILIDAD Y CRECIMIENTO EN UNA LINEA
CELULAR DE EPITELIO CORNEAL**

Dra. Blanca Elizabeth Martínez Báez, Residente de 3º año

Email: elizabeth_mzbz@hotmail.com

Esta revisión fue hecha en la Asociación para Evitar la Ceguera en México, hospital “Dr. Luis Sánchez Bulnes”. Ubicado en calle Vicente García Torres No. 46, colonia Barrio San Lucas Coyoacán, CP 04030, ciudad de México; con número telefónico 1084-1400.

ÍNDICE

	Pág.
Introducción.....	4
Objetivo.....	7
Materiales y métodos.....	8
Resultados.....	9
Discusión.....	12
Conclusión.....	12
Bibliografía.....	13

Introducción

La córnea es un tejido que forma la porción anterior de la capa más externa del globo ocular. Está constituida por 5 capas: epitelio, capa de Bowman, estroma, membrana de Descemet y endotelio; siendo el epitelio la capa más externa y el endotelio la más interna [1].

Entre sus múltiples funciones destacan sus propiedades ópticas de refracción de la luz, para lo cual se requiere de la transparencia del tejido así como de una adecuada curvatura corneal. Otra función de suma importancia es la de barrera mecánica, aislando el contenido intraocular del exterior [1].

Para el adecuado funcionamiento corneal se requiere mantener un adecuado balance oxido-reducción, manteniendo de esta forma la homeostasis celular. El daño oxidativo es producto de un desbalance entre las especies reactivas de oxígeno y los diversos mecanismos que actúan contrarrestando a éstas [2]. Las especies reactivas de oxígeno son generadas tanto a nivel intracelular durante procesos metabólicos, especialmente en la cadena transportadora de electrones [3,4] así como obtenidas a partir de fuentes exógenas incluyendo luz UV, luz visible, radiación ionizante, quimioterapéuticos y toxinas ambientales. Entre los mecanismos que contrarrestan a las especies reactivas de oxígeno se encuentran antioxidantes primarios y chaperonas, agentes reductores, enzimas antioxidantes y sistemas de reparación proteica [5]; los cuales utilizan

donadores de electrones como el glutatión, NADPH, NADH, FADH₂ entre otros. Siendo el sistema de glutatión el más importante a nivel ocular [5,6]. .

Existen enfermedades oculares en las que el estrés oxidativo juega un papel importante. Algunas de las más comunes incluyen ojo seco, rosácea y quemaduras corneales.

El ojo seco es una enfermedad multifactorial de las lágrimas y de la superficie ocular que provoca síntomas de incomodidad, alteración de la agudeza visual, e inestabilidad de la película lagrimal con daño potencial a la superficie ocular. Se acompaña de incremento de osmolaridad de la lágrima e inflamación de la superficie ocular [7]. El síndrome de ojo seco es una condición común en el mundo los reportes indican que el 10 a 20% de la población se encuentra afectada [8]. En un centro oftalmológico de referencia en México se reportó que existen síntomas de ojo seco en el 43% de las personas que acuden a consulta oftalmológica general, valorado por el índice de enfermedad de superficie ocular (OSDI) [9]. Los factores de riesgo asociados a ojo seco incluyen edad avanzada, sexo masculino, enfermedades reumatológicas, alteraciones hormonales y uso de medicamentos [9]. En los últimos años los síntomas de ojo seco se han exacerbado en la población general por los cambios climáticos, el incremento en el uso de aire acondicionado, así como el uso prolongado de pantallas electrónicas, aumentando la dificultad en el manejo y menor respuesta al tratamiento convencional con lubricantes. [10]

La rosácea es una enfermedad que afecta de forma primaria los vasos sanguíneos y unidades pilosebáceas de la cara (incluidos los párpados), ocasionando signos persistentes que incluyen eritema, pápulas, pústulas, telangiectásias y cambios fimatosos generados por hiperplasia de glándulas sebáceas [11,12]. Aunque la rosácea se considera una enfermedad dermatológica, se presenta con alteraciones oculares en el 58-72% de los pacientes causando sensación de cuerpo extraño, prurito, disfunción de glándulas de meibomio, fibrosis conjuntival, simblefaron, fotofobia y disminución de agudeza visual [12]. El 30% de los casos tienen afección corneal que inicia como vascularización periférica asociada a infiltrados que de no ser tratada adecuadamente puede evolucionar a ulceración e incluso perforación corneal [12].

Las quemaduras representan un trauma ocular por agente químico. Las quemaduras químicas oculares afectan con mayor frecuencia el grupo de edad entre 20 y 40 años, con mayor riesgo para el sexo masculino. El 61% ocurre como accidentes industriales y el 37% en el hogar [13]. Las lesiones químicas oculares pueden ser originadas por dos tipos de agentes: ácidos o álcalis. Las lesiones por ácidos afectan la superficie ocular por coagulación de proteínas y generalmente su daño es limitado. Los álcalis provocan saponificación de ácidos grasos, tienen mayor potencial de penetración en los tejidos, por lo que el daño que ocasionan es mayor. Las alteraciones oculares que se pueden encontrar en las quemaduras químicas incluyen erosión conjuntival, defectos corneales, opacidad corneal, uveítis, glaucoma y perforación del globo ocular [13].

Estas patologías tienen una elevada incidencia en la población y en la mayoría de los casos la sintomatología se presenta de forma crónica y persistente que en muchas ocasiones requieren de un manejo terapéutico complejo. Un porcentaje importante presenta complicaciones graves y secuelas que comprometen la función visual de los pacientes, es por eso que nos parece valioso estudiar el efecto que tienen nuevas sustancias en el crecimiento de líneas celulares corneales y su potencial rol terapéutico en estas patologías.

Dada la importancia que tienen los agentes antioxidantes, existen varios estudios buscando fuentes ricas en antioxidantes de origen natural. RB-35 se ha utilizado en la medicina tradicional de varios países con diversos propósitos. Se extrae de las hojas secas de especies distintas de plantas, incluyendo la uva ursi (*Arctostaphylos uva-ursi*). [14]. Existen estudios que evidencian su capacidad de neutralizar radicales libres, su efecto protector en contra de la peroxidación lipídica [15], así como efectos antibacterianos. Estudios in vitro de melanocitos humanos expuestos a concentraciones de RB-35 menores a 200 μM no mostraron evidencia de citotoxicidad [16]. Sin embargo RB-35 no ha sido estudiado en el epitelio corneal.

Objetivo

RB-35 ha mostrado tener propiedades antioxidantes; por un lado contribuyendo a la eliminación de radicales libres y por otro contrarrestando la peroxidación lipídica. Dado que el daño oxidativo juega un rol importante en varias enfermedades de la superficie ocular, se propone evaluar los efectos de RB-35 en

una línea celular de epitelio corneal como evidencia preliminar de su potencial terapéutico.

Material y métodos

Se utilizó una línea celular de epitelio corneal de conejo, RCE-1(5T5), el cual produce in vitro los procesos de diferenciación y proliferación normalmente presentes en cultivos primarios de epitelio corneal.

La estrategia experimental incluyó un ensayo de formación de colonias para valorar el crecimiento celular, citometría de flujo para evaluar la viabilidad celular e inmunofluorescencia para evaluar el fenotipo celular. Todos los procedimientos se realizaron por triplicado.

En el ensayo de formación de colonias, las células son sembradas con una densidad estándar para una placa de Petri de 35mm (3×10^4) en el día cero; en el día uno, las células corneales recibieron medio corneal + factor de crecimiento epitelial (EGF) y las células tratadas recibieron medio corneal + EGF + RB-35 a diferentes concentraciones (10 μ M, 20 μ M, 30 μ M, 50 μ M y 100 μ M). En el día 3, las células son cosechadas y resembradas dentro de una densidad de sembrado de 500 células x 60mm de placa, y el crecimiento fue evaluado de manera diaria hasta que el cultivo forme colonias. En este punto, las colonias son teñidas con rodamina.

Para evaluar viabilidad celular se utilizó 7-aminoactinomicina D, un fluorocromo con gran afinidad al ADN que tiñe células no viables. Estos experimentos fueron analizados por citometría de flujo.

También se realizó el ensayo de tinción de inmunofluorescencia para queratina 3, un marcador de diferenciación terminal específico de células epiteliales corneales, pudiendo evaluar de esta forma las características celulares.

Resultados

Se demostró una formación de colonias con eficacia similar entre el grupo control y el grupo con adición de RB-35, lo cual excluye un efecto antiproliferativo en el crecimiento celular. Los porcentajes de eficacia de formación de colonias entre los dos grupos no mostraron diferencias estadísticamente significativas.

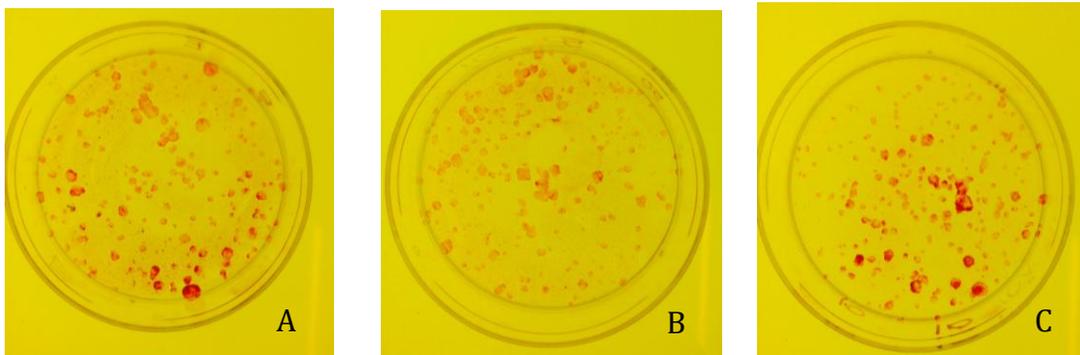


FIG 1. Imágenes representativas del ensayo de formación de colonias. A. Control con EFG; B. RB-35 10 μ M; C. RB-35 50 μ M

Condición	Número de colonias	Eficiencia de formación de colonias
Control negativo (sin EGF)	173	34%
Control positivo (con EGF)	212	42%
RB-35 10 μM	176	35%
RB-35 20 μM	190	38%
RB-35 30 μM	186	37%
RB-35 50 μM	201	40%
RB-35100 μM	199	41%

Fig 2. Ensayo de eficiencia de formación de colonias a distintas concentraciones de RB-35. Para su cálculo se utilizó la fórmula :

$$\text{Eficiencia de formación de colonias o clonación (\%)} = \frac{\text{número de colonias observadas}}{\text{número de células sembradas}} \times 100$$

Por otro lado en el ensayo de viabilidad celular se observó una diferencia estadísticamente significativa a favor del grupo tratado con RB-35.

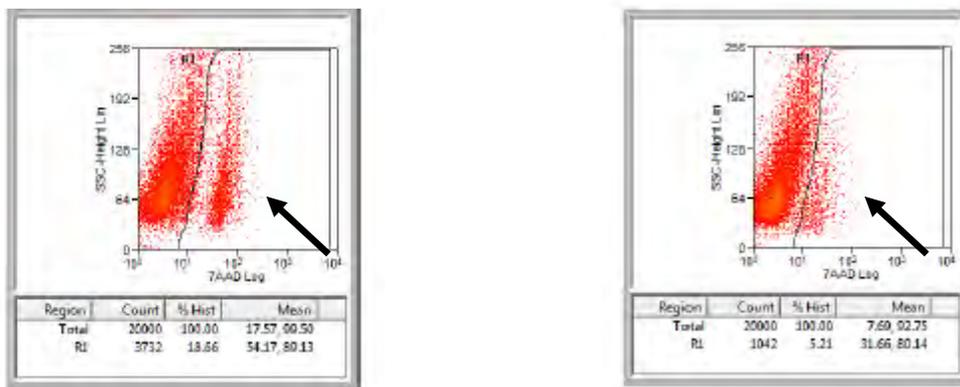


Figura 3. Grafica representativa de la citometría de flujo muestran una disminución en las células que sufrieron apoptosis (flechas) en el grupo tratado. A la derecha se encuentra el grupo control y a la izquierda se encuentra el grupo tratado con RB-35

Condición	Viabilidad (%)
Control	81.34*
RB-35 10 μ M	91.57*
RB-35 20 μ M	91.45*
RB-35 30 μ M	94.79*
RB-35 50 μ M	94.66*
RB-35 100 μ M	89.97*

*p < 0.05

Figura 4. Resultados de viabilidad celular mostrando en todos los grupos significancia estadística

En el análisis de inmunofluorescencia para queratina 3 se demostró un fenotipo normal en las células tratadas con RB-35.

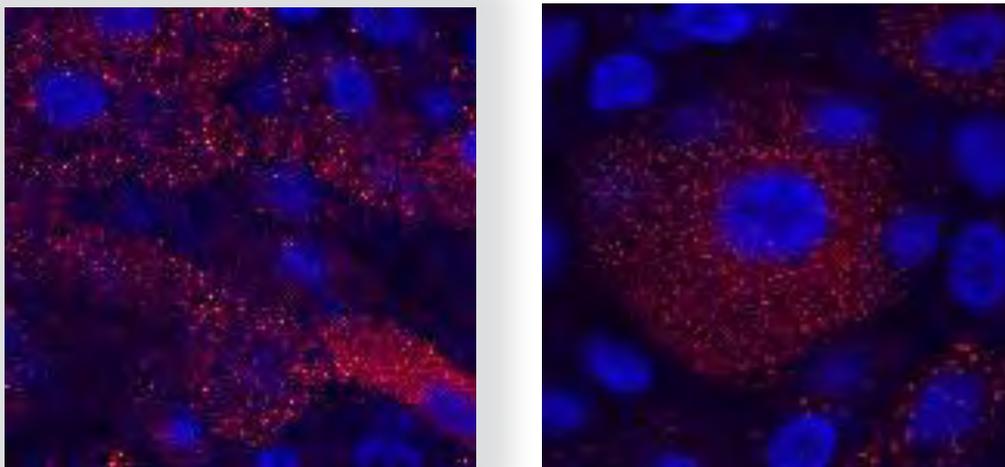


Figura 5. Inmunofluorescencia con tinción para queratina 3 (anticuerpos primarios conjugados con Alexa Fluor® 594; núcleos teñidos con DAPI).

Discusión

El crecimiento y viabilidad celular se ve modificado por múltiples factores tanto en el epitelio corneal como en el resto del organismo. Existen pocos estudios que determinen la magnitud de la influencia que ejerce el estrés oxidativo en el crecimiento celular y, a su vez, qué tan benéfico resulta mejorar el balance oxido-reducción cuando existen patologías asociadas a alteraciones en el crecimiento y viabilidad celular. Es por eso que consideramos valioso el estudio de agentes antioxidantes y su posible beneficio patologías del epitelio corneal.

Este primer trabajo y sus resultados han demostrado mejoría en la viabilidad de una línea celular de epitelio corneal cultivado. Sin embargo, hasta el momento no es posible saber si estos resultados se verán reflejados en un beneficio clínicamente significativo en pacientes con alteraciones de la superficie ocular, por lo que consideramos necesarios más estudios al respecto en un futuro.

Conclusiones

RB-35 no induce efectos citotóxicos en concentraciones de 10 a 100 μM , y muestra un efecto protector evidenciado por una disminución de la apoptosis sin inducir cambios en el fenotipo celular. Estos resultados dan la primera evidencia positiva para continuar evaluando RB-35 como potencial terapéutico para enfermedades de la cornea y superficie ocular.

Bibliografía

1. Mannis, Holland. Cornea. 4th edition 2017
2. Babizhayev M. Generation of reactive oxygen species in the anterior eye segment. Synergistic codrugs of N-acetylcarnosine lubricant eye drops and mitochondria-targeted antioxidant act as a powerful therapeutic platform for the treatment of cataracts and primary open-angle glaucoma. April 2016, doi: 10.1016/j.bbacli.2016.04.004
3. Kinsey V.E., Reddy D.V. Studies on the crystalline lens. XI. The relative role of the epithelium and capsule in transport. *Investig. Ophthalmol.* 1965;34:104–116.
4. Goodenough D.A., Dick J.S., 2nd, Lyons J.E. Lens metabolic cooperation: a study of mouse lens transport and permeability visualized with freeze-substitution autoradiography and electron microscopy. *J. Cell Biol.* 1980;86:576–589.
5. Brennan L.A., Kantorow M. Mitochondrial function and redox control in the aging eye: role of MsrA and other repair systems in cataract and macular degenerations. *Exp. Eye Res.* Feb 2009;88(2):195–203. (Epub 2008 Jun 7)
6. Ganea E., Harding J.J. Glutathione-related enzymes and the eye. *Curr. Eye Res.* 2006 Jan;31(1):1–11.
7. The Definition and Classification of Dry Eye Disease: report of the definition and classification subcommittee of international dry eye workshop 2007. *Ecul. Surf.* 2007;5: 179-193.
8. Lee A; Prevalence and risk factors associated with dry eye symptoms *Br J Ophthalmol* 2007; 86: 1347-51.
9. Martinez JD; Frequency and risk factors associated with dry eye in patients attending a tertiary care ophthalmology center in Mexico City. *Clin Ophthalmol.* 2016 Jul 21;10:1335-42
10. Abordaje Diagnostico y Terapéutico Del Paciente Con Síndrome De Ojo Seco. México: Secretaria De Salud, 2010.
11. M.J. Gil; Rosácea; revisión y nuevas alternativas terapéuticas. SEMERGEN Elsevier España 2010 doi:10.1016/j.semereg.2010.08.004

12. Cabreira Viera; Ocular Rosácea: a Review. Arq. Bras. Oftalmol. vol.75 no.5 Sao Paulo Sept./Oct. 2012
13. Lima G. Manejo inicial de las quemaduras químicas oculares. TRAUMA, Vol. 5, Núm. 1, pp 20-23 • Enero-Abril, 2002
14. Parejo et al. A single extraction step in the quantitative analysis of arbutin in bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) leaves by high-performance liquid chromatography. *Phytochem Anal.* 2001 Sep-Oct;12(5):336-9.
15. Khalilpour et al. Evaluation of Antioxidant Stability of Arbutin and *Pyrus boissieriana* Buhse Leaf Extract. *Int J Mol Cell Med.* 2013 Spring; 2(2): 86–92.
16. Chakraborty et al. Effect of Arbutin on Melanogenic Proteins in Human Melanocytes. DOI: 10.1111/j.1600-0749.1998.tb00731.x