



11234
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA
"FUNDACION CONDE DE VALENCIANA"

40

METABOLISMO DE LA COLAGENA EN EL LIQUIDO
SUBRETINIANO DE PACIENTES CON
DESPRENDIMIENTO DE RETINA REGMATOGENO

TESIS DE POSTGRADO
QUE PRESENTA
DR. DAVID MENDEZ NOBLE
PARA OBTENER EL TITULO DE:
MEDICO CIRUJANO OFTALMOLOGO

ASESOR DE TESIS: DR. DAVID LOZANO RECHY

JEFE DE ENSEÑANZA: DR. RENE CANO HIDALGO

300254

MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



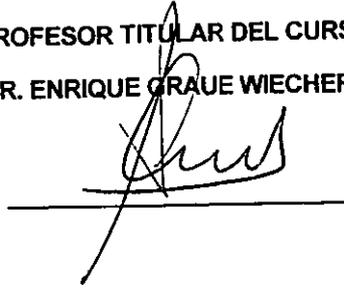
UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

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).

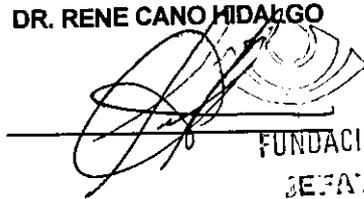
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PROFESOR TITULAR DEL CURSO
DR. ENRIQUE GRAUE WIECHERS



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Graue', is written over a horizontal line.

JEFE DE ENSEÑANZA
DR. RENE CANO HIDALGO

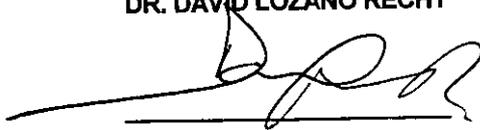


A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Cano', is written over a horizontal line.

INSTITUTO DE
OFTALMOLOGIA

FUNDACION CONDE DE VALENCIANA
DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA
Chimalpopoca 14 México 8, D. F.
Col. Obrera

ASESOR DE TESIS
DR. DAVID LOZANO RECHY



A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Lozano', is written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

A mis maestros

A la Dra. Rita Yee Chan

Por su incansable e incondicional apoyo.

TITULO

**METABOLISMO DE LA COLAGENA EN EL LIQUIDO
SUBRETINIANO DE PACIENTES CON DESPRENDIMIENTO
DE RETINA REGMATOGENO**

INDICE

INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	3
RESULTADOS	5
DISCUSION	6
CONCLUSION	8
BIBLIOGRAFIA	9
TABLA 1	12
TABLA 2	13
GRAFICA 1	14
GRAFICA 2	15
FIGURA 1	16
FIGURA 2	17

INTRODUCCION

La vitreorretinopatía proliferativa (VRP) es la principal causa de fracaso en el tratamiento quirúrgico del desprendimiento de retina.(1) Se caracteriza por proliferación celular en el vítreo y formación de membranas por ambas superficies de la retina. Estudios histológicos y ultraestructurales de membranas removidas al tiempo quirúrgico de ojos con vitreorretinopatía proliferativa indican que, además de elementos celulares, incluyendo células del epitelio pigmentario, células gliales, de Müller, fibroblastos y macrófagos, hay gran cantidad de componentes de matriz extracelular principalmente colágena tipo I y glicosaminoglicanos.(2,3) In vitro las células del epitelio pigmentario bajo condiciones apropiadas sintetizan colagenasa intersticial y su inhibidor TIMP-1, estromalisina, gelatinasas de 72kDa y 92kDa.(4) Factores de riesgo descritos para la VRP incluyen desprendimiento de retina de larga evolución, desgarro gigante, afaquia, hemorragia vítrea, desprendimiento coroideo y vitrectomía previa.(5,6,7) Al romperse la barrera hemato-retiniana pueden migrar componentes sanguíneos al espacio subretiniano y vítreo involucrados en proliferación celular y metabolismo de colágena, como es el caso del factor derivado de plaquetas (PDGF) y fibronectina (FN).(8,9) Sin embargo no todos los casos evolucionan a VRP a pesar de que exista lesión del EPR y ruptura de la barrera hemato-retiniana.(10,11)

La matriz extracelular (MEC) juega un papel importante en el mantenimiento de la integridad estructural y procesos celulares básicos como proliferación, diferenciación,

migración y adhesión.(12) Las metaloproteinasas (MMP) son una familia de enzimas que degradan las proteínas de la MEC y componentes de la membrana basal, durante la remodelación de los tejidos conectivos.(13) Se caracterizan por: a) ser proteinasas que degradan al menos un componente de la MEC, b) contienen unión de zinc y son inhibidos por agentes quelantes, c) son secretados en una forma latente y requieren de activación, d) son inhibidos por tejidos inhibidores específicos de metaloproteinasas, y e) comparten aminoácidos similares. (14,15)

Se han clasificado las MMP en 3 subclases principales: (16,17)

A-.Colagenasas (MMP-1 y MMP-8) que degradan colágena tipo I, II y III.

B-.Gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) de 72 kDa y de 92 kDa respectivamente, degradan colágena tipo I, II, III , IV, V , VII y fibronectina.

C-.Estromalisinas (MMP-3) degradan colágena tipo II, IV y V, proteoglicanos, caseína, laminina y fibronectina.

Nuestro propósito es investigar la participación del líquido subretiniano en el metabolismo de la colágena en pacientes con desprendimiento de retina regmatógeno y su posible influencia en el desarrollo de VRP.

MATERIAL Y METODOS

Realizamos un estudio prospectivo, transversal y observacional desde marzo 1995 hasta marzo 1997, se recolectaron muestras de LSR de pacientes con DRRP, del drenaje de la esclerotomía durante la reaplicación quirúrgica de la retina. Se dividieron en: grupo 1 = Diálisis retiniana, grupo 2 = Desgarros retinianos, grupo 3 = Agujeros Retinianos y grupo 4 = DRR Recidivantes. Como grupo control se utilizaron fibroblastos sin estimular con LSR para el ensayo de biosíntesis de colágena.

Las muestras de LSR se almacenaron a -70° hasta su procesamiento. A todas se les realizó concentración de proteína, determinación protéica y síntesis de colágena.

Concentración de Proteína

Se llevó a cabo mediante la técnica descrita por Bradford (18), la cual emplea como reactivo de color Azul de Coomassie G-250 disuelto en una mezcla de ácido fosfórico al 50% y etanol absoluto al 25%. Se utilizó una solución patrón de proteínas o albúmina bovina (Sigma Chemical Co.) disuelta en solución amortiguadora Tris 7.8, a una concentración de 1mg/ml; la curva patrón se realizó con 0, 20, 40, 60, 80 y 100 ug de proteína; se adicionaron 100 ul de la muestra y se lleva a un volumen final de 800 ul de Tris 7.8, agregándole posteriormente 5 ml del reactivo de color (Reactivo de Bradford) diluido en agua 1:5 y dejándose reaccionar por 20 min para luego leer la absorvancia obtenida a 595 nm.

Determinación proteica:

Los zimogramas se realizaron mediante electroforesis de 5 μ g de proteína de las muestras de LSR en geles de poliacrilamida al 8% en presencia de SDS y gelatina de piel de cerdo al 0.1%.**(19)**. Se colocaron 5 μ g de proteína de cada muestra en condiciones no desnaturalizantes y a corriente constante (10 mA). Posteriormente los geles se lavaron con Tritón X 100 al 2.5% y se incubaron a 37 °C por 24 hrs, en buffer de Tris-HCl 50mM, NaCl 0.5 mM, CaCl₂ 20 mM y azida de sodio al 0.02% a un pH de 7.4 (Buffer TNC). Los zimogramas se hicieron en presencia y ausencia de EDTA. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie R-250. Se incluyeron marcadores de peso molecular pre-tesados en cada gel. La presencia de enzimas gelatinolíticas se evaluaron por la presencia de bandas sobre el fondo oscuro del gel.

Síntesis de Colágena:

Se utilizan fibroblastos normales de pulmón (MRC 5) de la American Type Culture Collection. Los fibroblastos se cultivaron en presencia de medio EMEM en cajas de 24 pozos hasta llegar a confluencia. Se sustituyó el medio por uno con 1% suero fetal y se agregó 100 mcg de proteína de cada muestra de LSR por triplicado. Como controles se utilizaron pozos con solo medio al 1% de suero fetal. Al cabo de 20 hrs se sustituyó el medio por EMEM con 10 μ g/ml de beta aminopropionitrilo, 50 μ g/ml de ácido L-ascórbico y 10 μ Ci de 3H-prolina. Este medio se dejó por 4 horas. Al final se agregó a cada pozo

N-ethylmaleimida 20 mM, phenylmethyisuphonyl fluoride 1 mM y EDTA 80mM y Tritón X-100 al 1%. Se colocaron las muestras a 4 °C por una hora al cabo de la cual se colectaron y se midió la síntesis de colágena por el método convencional.(20) Los resultados se expresan como cpm/mg de proteína de LSR incubada.

ANALISIS ESTADISTICO

Los ensayos de síntesis de colágena fueron analizados por la prueba estadística de la "U" de Mann-Whitney tomando valores de $p \leq 0.05$ como significativos.

RESULTADOS

Se analizaron 25 muestras de LSR de 25 pacientes, 14 masculinos y 11 femeninos, con rango de edad de 7 a 92 años, promedio de 41.54 años. Se incluyeron en el grupo 1 : 6 diálisis, en el grupo 2 : 9 desgarros, en el grupo 3 : 5 agujeros y en el grupo 4: 5 DR recidivantes. La concentración proteica se describe en la **tabla 1**; el promedio de todos los grupos se representa en la **gráfica 1**; no hubo diferencia estadísticamente significativa.

Se determinó la presencia de enzimas colagenolíticas en todas las muestras de LSR. La MMP-2 se encontró en todos los grupos en fases latente y activa. Las MMP-9 y MMP-1 se manifestaron en todas las muestras pero solo en fase latente. (**Figuras 1 y 2**).

N-ethylmaleimida 20 mM, phenylmethyisulphonyl fluoride 1 mM y EDTA 80mM y Tritón X-100 al 1%. Se colocaron las muestras a 4 °C por una hora al cabo de la cual se colectaron y se midió la síntesis de colágena por el método convencional.(20) Los resultados se expresan como cpm/mg de proteína de LSR incubada.

ANALISIS ESTADISTICO

Los ensayos de síntesis de colágena fueron analizados por la prueba estadística de la "U" de Mann-Whitney tomando valores de $p \leq 0.05$ como significativos.

RESULTADOS

Se analizaron 25 muestras de LSR de 25 pacientes, 14 masculinos y 11 femeninos, con rango de edad de 7 a 92 años, promedio de 41.54 años. Se incluyeron en el grupo 1 : 6 diálisis, en el grupo 2 : 9 desgarros, en el grupo 3 : 5 agujeros y en el grupo 4: 5 DR recidivantes. La concentración proteica se describe en la **tabla 1**; el promedio de todos los grupos se representa en la **gráfica 1**; no hubo diferencia estadísticamente significativa.

Se determinó la presencia de enzimas colagenolíticas en todas las muestras de LSR. La MMP-2 se encontró en todos los grupos en fases latente y activa. Las MMP-9 y MMP-1 se manifestaron en todas las muestras pero solo en fase latente. (**Figuras 1 y 2**).

Los resultados en la síntesis de colágena se describen en la **tabla 2**. Los fibroblastos estimulados con LSR demostraron una síntesis de colágena francamente aumentada en todos los grupos a comparación del grupo control, con una alta significancia estadística en todos los grupos (**gráfica 2**). La síntesis promedio del grupo 1: diálisis es de 49,770 cpm/mg de proteína incubada ($p=0.0062$), en el grupo 2: desgarros es de 39,069 cpm/mg de proteína incubada ($p=0.0051$), en el grupo 3: agujeros es de 43,222 cpm/mg de proteína incubada ($p=0.0090$), en el grupo 4: DRR recidivantes es de 74,669 cpm/mg de proteína incubada ($p<0.0090$) y en el grupo control: fibroblastos no estimulados con LSR fue de 14,915 cpm/mg de proteína incubada.

DISCUSION

En éste estudio se analizó el metabolismo de colágena encontrando aumento en la biosíntesis de colágena y presencia de enzimas gelatinolíticas MMP-2 en forma activa en todos los grupos, así como las MMP-9 y MMP-1 pero en forma latente. Estas condiciones pueden favorecer el balance hacia el acúmulo de colágena en el espacio vitreoretiniano. Estudios previos han demostrado de igual manera la presencia de MMP-2 y MMP-9 (21); sin embargo la MMP-1 es una observación diferente, teniendo así, una nueva aportación al estudio de MMP en el LSR.

Los resultados en la síntesis de colágena se describen en la **tabla 2**. Los fibroblastos estimulados con LSR demostraron una síntesis de colágena francamente aumentada en todos los grupos a comparación del grupo control, con una alta significancia estadística en todos los grupos (**gráfica 2**). La síntesis promedio del grupo 1: diálisis es de 49,770 cpm/mg de proteína incubada ($p=0.0062$), en el grupo 2: desgarros es de 39,069 cpm/mg de proteína incubada ($p=0.0051$), en el grupo 3: agujeros es de 43,222 cpm/mg de proteína incubada ($p=0.0090$), en el grupo 4: DRR recidivantes es de 74,669 cpm/mg de proteína incubada ($p<0.0090$) y en el grupo control: fibroblastos no estimulados con LSR fue de 14,915 cpm/mg de proteína incubada.

DISCUSION

En éste estudio se analizó el metabolismo de colágena encontrando aumento en la biosíntesis de colágena y presencia de enzimas gelatinolíticas MMP-2 en forma activa en todos los grupos, así como las MMP-9 y MMP-1 pero en forma latente. Estas condiciones pueden favorecer el balance hacia el acúmulo de colágena en el espacio vitreoretiniano. Estudios previos han demostrado de igual manera la presencia de MMP-2 y MMP-9 (21); sin embargo la MMP-1 es una observación diferente, teniendo así, una nueva aportación al estudio de MMP en el LSR.

La MMP-2 o 72kDa en forma activa es secretada por fibroblastos, células epiteliales, endoteliales y macrófagos; degrada colágena tipo IV, V, VII. La gelatinasa MMP-9 o 92kDa es derivada de gránulos de células neutrófilos, además es secretada por células epiteliales, macrófagos y fibroblastos; degrada colágena tipo IV y V. La colagenasa MMP-1 o 52kDa principalmente es secretada por fibroblastos y degrada colágena tipo I, II y III. (22)

Hay múltiples niveles en los cuales la expresión y actividad de MMP son reguladas. Solo la colagenasa MMP-1 y la colagenasa de neutrófilo MMP-8 pueden degradar colágenas desnaturalizadas "intersticiales" (tipos I, II, III y X) a un pH neutro.(23)

Estudios previos afirman que las membranas de la VRR se componen de componentes de cicatrización y colágena tipo I, ésta colágena es desorganizada y es degradada principalmente por MMP-1 y MMP-8. (3)

Hay evidencia considerable que las MMP tienen un rol en la reabsorción fisiológica de colágena y otras macromoléculas en el desarrollo y en reabsorción patológica asociada a tumores invasivos, estructuras periodontales y articulaciones como en artritis reumatoide. (23).

Las células del EPR in vitro han demostrado producir colagenasas intersticiales y sus inhibidores TIMP-1, 72 kDa y 92 kDa gelatinasas y estromalinas. El LSR contiene células EPR viables y macrófagos posiblemente capaces de secretar estas proteasas (18).

Todos los grupos de DRR mostraron un aumento estadísticamente significativo de biosíntesis de colágena. Esto podría significar un desbalance en el metabolismo de la colágena en favor a su síntesis, considerando de ésta manera, un mayor riesgo en la formación de membranas epirretinianas y desprendimiento traccional de retina.

CONCLUSIÓN

Hay un desequilibrio en el metabolismo de la colágena en el LSR de pacientes con DRR, en el cual se ve aumentada la síntesis y presencia de actividad colagenolítica en forma activa y latente. Esto podría significar un mayor riesgo para la formación de membranas y VRP en los pacientes con DRR especialmente cuando son recidivantes.

Todos los grupos de DRR mostraron un aumento estadísticamente significativo de biosíntesis de colágena. Esto podría significar un desbalance en el metabolismo de la colágena en favor a su síntesis, considerando de ésta manera, un mayor riesgo en la formación de membranas epirretinianas y desprendimiento traccional de retina.

CONCLUSIÓN

Hay un desequilibrio en el metabolismo de la colágena en el LSR de pacientes con DRR, en el cual se ve aumentada la síntesis y presencia de actividad colagenolítica en forma activa y latente. Esto podría significar un mayor riesgo para la formación de membranas y VRP en los pacientes con DRR especialmente cuando son recidivantes.

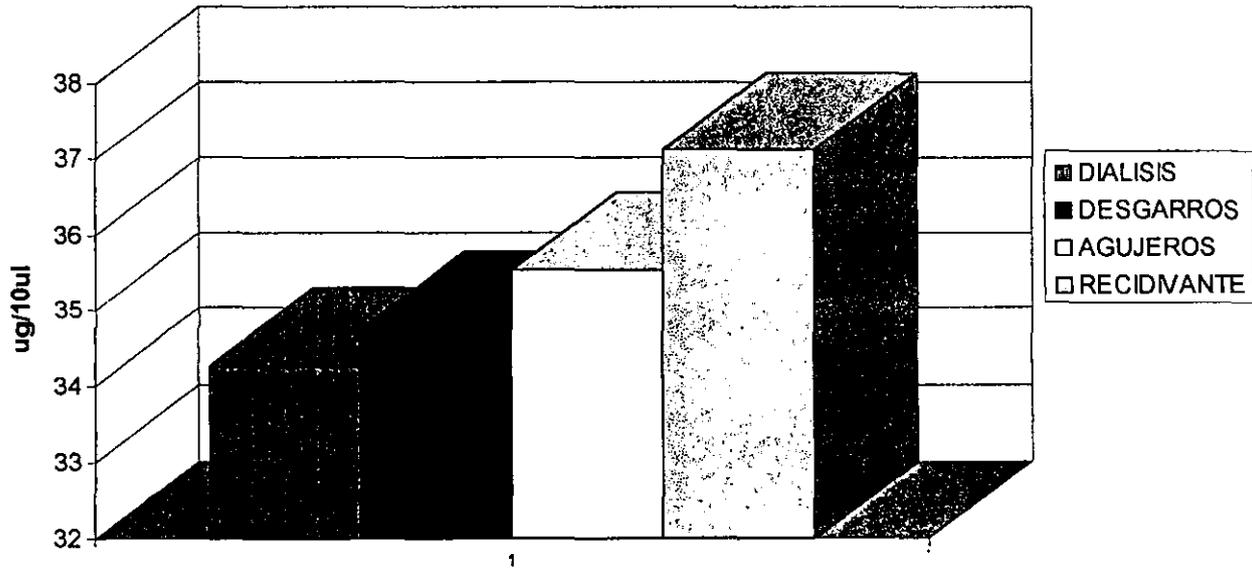
TABLA 1. CONCENTRACION DE PROTEINA (ug/10ul). METODO DE BRADFORD

n	Grupo 1 : Diálisis	Grupo 2 : Desgarros	Grupo 3 : Agujeros	Grupo 4 : Recidivante
1	34.95	44.91	42.92	34.31
2	35.52	30.24	44.49	40.78
3	37.40	29.27	33.77	41.59
4	32.03	20.87	42.25	35.04
5	33.40	34.60	34.07	40.36
6	30.41	38.27		
7		41.45		
8		35.49		
9		37.27		
X	34.27	34.75	35.54	37.13

TABLA 2. BIOSINTESIS DE COLAGENA (cpm/mg de proteina incubada)

n	Grupo 1: Diálisis	Grupo 2: Desgarro	Grupo 3: Agujero	Grupo 4: Recidivante
1	45,439	61,360	28,005	75,205
2	57,263	48,459	51,920	81,869
3	65,135	32,096	64,507	75,520
4	45,312	44,839	44,368	52,864
5	33,984	29,264	30,208	72,688
6	28,300	16,992		
7		42,473		
8		36,816		
9		24,544		
X	49,770	39,069	43,222	74,669
±	16,529	15,006	19,426	16,320

GRAFICA 1. PROMEDIO DE CONCENTRACION PROTEICA



GRAFICA 2. BIOSINTESIS DE COLAGENA

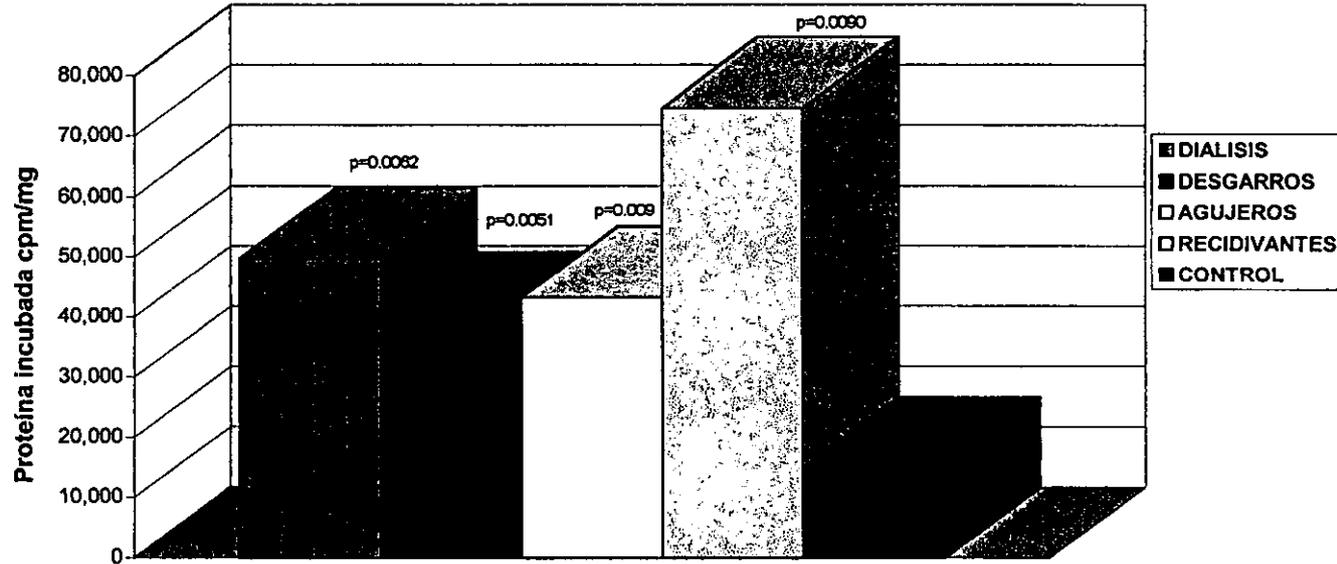
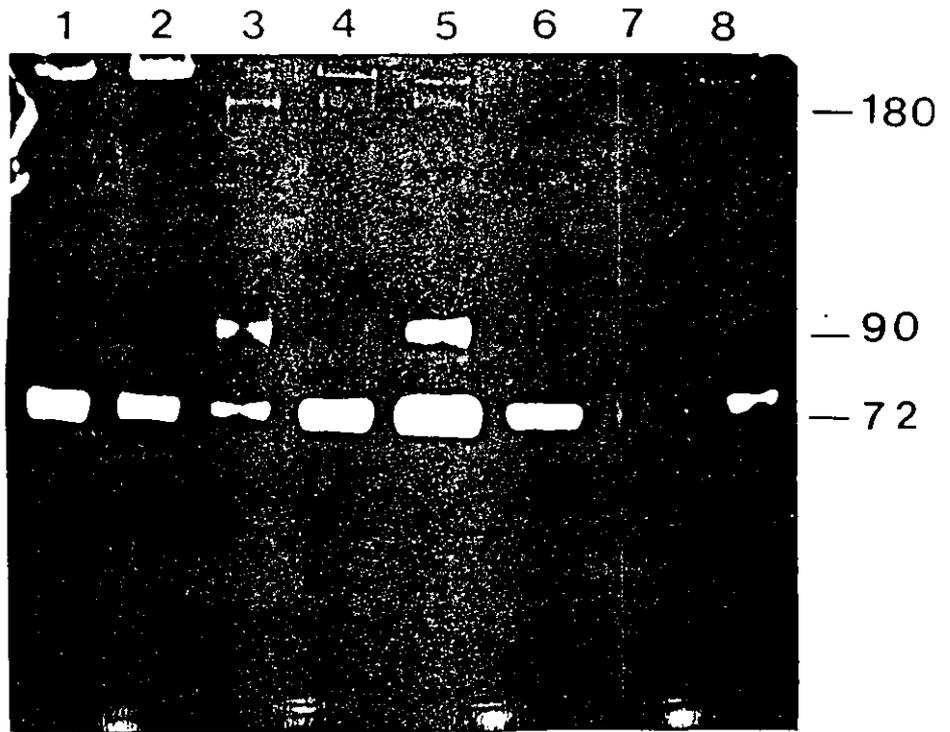
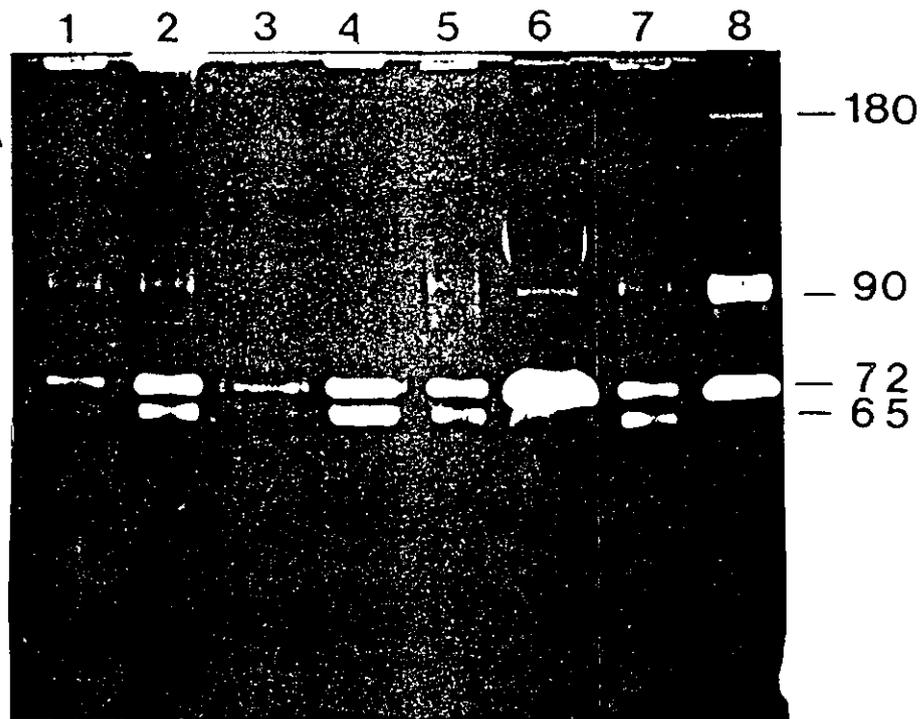


FIGURA 1. ZIMOGRAMA SIN APMA



Carriles 1 y 2 = Diálisis; carriles 3 y 4 = Desgarros; carriles 5 y 6 = Agujeros; carriles 7 y 8 = DR Recidivantes

FIGURA 2. ZIMOGRAMA CON APMA



Carriles 1 y 2 = Diálisis; carriles 3 y 4 = Desgarros; carriles 5 y 6 = Agujeros; carriles 7 y 8 = DR Recidivantes

BIBLIOGRAFIA

1. The Retina Society Terminology Committee. The classification of retinal detachment with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology* 1983; 90:121-5.
2. Machemer, R.; Aaberg, T.: *Am J Ophthalmol* 1978; 85:181-91.
3. González-Avila, G.; Manjarrez, M.; et al: Influence on collagen metabolism of vitreous from eyes with proliferative vitreoretinopathy. *Ophthalmology* 1995; 102: 1400-1405.
4. Alexander, J.P.; Bradley, J.M.; et al: Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1990; 31:2520-2528.
5. Yoshino, Y.; Ideta, H.; Nagasaki, H.; Uemura, A.: Comparative study of clinical factors predisposing patients to proliferative vitreoretinopathy. *Retina* 1989, 9:97-100.
6. Cowley, M.; Conway, B.P.; Campochiaro, P.A.; Kaiser, D.; Gaskin, H.: Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Arch Ophthalmol* 1989, 107:1147-1151.
7. Girard, P.; Mimoun, G.; et al: Clinical risk factors for proliferative vitreoretinopathy after retinal detachment surgery. *Retina* 1994; 14:417-424.
8. Glaser, B.M.; Cardin, A.C.; Biscoe, A.: Proliferative Vitreoretinopathy. The mechanism of development of vitreoretinal traction. *Ophthalmology* 1987; 94 (4):327-332.
9. Chignell, A.; Carruthers, M.; Rahi, A.: Clinical, biochemical, and immunoelectrophoretic study of subretinal fluid. *Brit J Ophtal* 1971, 51: 525-532.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTEC

10. Nagasaki, H.; Shinagawa, K.: Risk factors for proliferative vitreoretinopathy. *Current Opinion Ophthalmol* 1995, 6; III:70-75.
11. Machemer, R.; Laqua, H.: Pigment epithelium proliferation in retinal detachment (masive periretinal proliferation). *Am J Ophthalmol* 1975, 80:1-23.
12. Matrisian L.M.: The matrix degrading metalloproteinases. *BioEssays* 1992; 14: 455-63.
13. Murphy, G.; Willenbrock, F.; et al: Regulation of matrix metalloproteinase activity. *Annal New York Academy of Sciences*. p.31.
14. Matrisian, L.M.: Metalloproteinases and their inhibitors in matrix remodeling. *Trends in Genetics* 1990; 6:121-5.
15. Krane, S.M.: Clinical importance of metalloproteinases and their inhibitors.: *Annal New York Academy of Sciences*. p. 1-7.
16. Woessner, J.F.: The family of matrix metalloproteinases. *Annal New York Academy of Sciences*. p. 11-17.11.
17. Immonen Woessner JF, Jr:The family of matrix metalloproteinases. *Ann NY Acad Sci* 1994, 732:11-21.
18. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Annal Biochem* 1976, 72:248-254.
19. Vadillo, F.; González, G.;et al: 92-kd type IV collagenase (Matrix metalloproteinase-9) activity in human amniochorion increases whith labor. *Am J Pathol* 1995, 146:148-156.
20. Selman, M.; González, G.; Bravo, M.;et al: Effect of lung T lymphocytes on fibroblasts in idiopathic pulmonary fibrosis and extrinsic allergic alveolitis. *Thorax* 1990, 45:451-455.

21. Immonen, I.; Kontinen, Y.; Sorsa, T.; Tommila, P.; Sirén, V.: Proteinases in subretinal fluid. *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* 1996, 234:105-109.
22. Kalebic, T.; Garbisa, S.; Glaser, B.; Liotta, L.: Basement membrane collagen; degradation by migrating endothelial cells. *Science* 1983; 221: 281-283
23. Stephen, M.; Krane, S.: Clinical importance of metalloproteinases. *Annals New York Academy of Sciences* 1-7.