



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ, I.A.P.

DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS OCULARES

**“ESTUDIO DE LA VIABILIDAD, APOPTOSIS Y NECROSIS EN
CÉLULAS EPITELIALES CONJUNTIVALES CULTIVADAS IN VITRO
CON DOXICICLINA.”**

TESIS

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE
CIRUJANO OFTALMÓLOGO

P R E S E N T A

DRA. GUADALUPE XIMENA MIRA LORENZO

ASESORES:

DR. ELLERY MARINO LÓPEZ STAR
DRA. ILIANA MINERVA PEÑALOZA ROMÁN
DR. FRANCISCO MARTÍNEZ CASTRO
DRA. TERESA VALDEZ GONZÁLEZ
DRA. JUDITH ADRIANA ESPINOZA NAVARRO

TUTOR EXTERNO:

DRA. MA. CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ



MÉXICO D.F.

AGOSTO 2008



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 realizó en el Departamento de Enfermedades Inflamatorias del Hospital de Nuestra Señora de la Luz bajo la dirección del Dr. Ellery López, y en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” dirigido por la Dra. Ma. Carmen Jiménez. Este trabajo fue apoyado por los proyectos CONACYT-SALUD 71291 .

*A mis padres, MaryLupe y Jesús ,
por su amor, esfuerzo , confianza y apoyo incondicional.*

*A mis hermanos, Mario, Jesús,
por su alegría y compañía.*

*A Daniel ,
Por su apoyo incondicional ,amor, paciencia y comprensión.*

AGRADECIMIENTOS

Éste trabajo no hubiera sido posible si no hubiera habido el apoyo y colaboración de muchas personas a las que quiero mencionar.

A Dios por brindarme la maravillosa oportunidad de vivir. A mis Abuelos Lupita, Antonio y José por estar conmigo todos los días desde el cielo. Así como a mi abuela Virginia que todavía está con nosotros; gracias por seguir regalándonos tu compañía.

Al doctor Ellery López por su amistad y por haber compartido su idea conmigo e invitarme a participar así como sus valiosas aportaciones durante la realización de éste trabajo.

Muy especial a la doctora Maricarmen Jiménez por brindarme su tiempo, además quien nunca perdió la esperanza, siempre fue una gran fuente de apoyo, enseñanza, motivación y buen humor sin olvidar la dedicación y paciencia que le ha supuesto la supervisión de éste. No tengo como agradecerle.

A la Dra. Campomanes, Dra. Teresa Valdez, Dra. Judith Espinoza y al Dr. Francisco Martínez por ser un gran ejemplo a seguir como oftalmólogos y seres humanos así como guía y linda compañía durante la realización del mismo.

Al Dr. Arturo Castellanos por su gran amistad, también por guiarme, enseñarme, apoyarme y acompañarme en ésta bonita experiencia desde sus inicios hasta ahora.

A todos mis compañeros residentes quienes participaron en la obtención de las muestras por muy ocupados que estuvieran en quirófano. Muchas gracias.

Y en especial a Valerie, Carla, Adriana, Iliana, Ángel, Amós, Memo, Cristina y Miguel, nunca olvidaré su apoyo durante la realización de éste trabajo, así como su invaluable amistad, compañía y excelentes momentos que hemos pasado juntos. Son únicos.

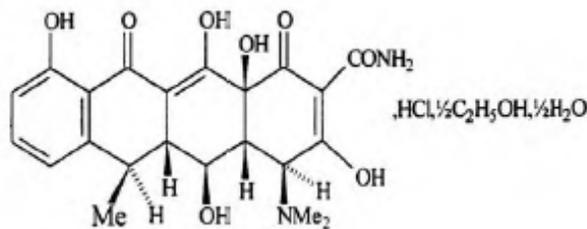
INDICE

<i>I.</i>	Introducción.....	1
<i>II.</i>	Objetivo.....	11
<i>III.</i>	Materiales y Métodos.....	12
<i>IV.</i>	Resultados.....	17
<i>V.</i>	Discusión.....	23
<i>VI.</i>	Conclusión.....	28
<i>VII.</i>	Bibliografía.....	29

INTRODUCCIÓN.

La doxiciclina (a-6 deoxy-5-hydroxytetraciclina) es un antibiótico de amplio espectro que inhibe la subunidad 30 del RNA ribosomal.

La fórmula estructural es:



y tiene un peso molecular de 512.9.

Es un polvo amarillento cristalino soluble en agua y en soluciones de carbonato e hidroxilo. Tiene un alto grado de solubilidad lipídica y baja afinidad para unirse al calcio. Es muy estable en el suero humano. ⁽¹⁾

Es utilizado ampliamente para infecciones causadas por microorganismos Gram negativos y Gram positivos. Su actividad es bacteriostática y es altamente efectivo contra muchos microorganismos incluyendo *Estafilococo aureus*, *Streptococcus aureus*, *Streptococo pyogenes*, *Bacillus anthracis* y *Yersinia pestis*.

La doxiciclina pertenece a la familia de las tetraciclinas, las cuales han demostrado tener otras acciones biológicas independientes a los efectos antibióticos. ⁽²⁾

La doxiciclina inhibe phorbol-12 myristato -13 acetato inducido por metaloproteinasas de la matriz extracelular 8 y 9 (MMP 8 y MMP 9) en las células endoteliales humanas⁽³⁾

Es importante mencionar que Francoeur C y colaboradores realizaron el primer reporte de apoptosis y células mediadoras de la misma donde demuestran que la producción de laminina podría estar directamente modulada por citocinas pro-inflamatoria IL -1 β e IL -6 así como TNF α en células epiteliales intestinales humanas⁽⁴⁾

Las citocinas ejercen una función moderada en la producción de laminina 5 y 10 en células epiteliales normales; así mismo se observó que la secreción de TNF- α e IFN - γ actuaban de manera sinérgica para inducir apoptosis; combinaciones similares se han reportado en múltiples modelos de células epiteliales intestinales en búsqueda de secreción específica de citocinas, inhibición de crecimiento celular, alteración en la propiedades de la barrera epitelial, así como la adquisición de susceptibilidad a la apoptosis inducida por Fas. En este sentido, bloqueando la vía de las caspasas 1 y 3 con inhibidores específicos llevó a una completa inhibición de apoptosis mediada por TNF- α e IFN- γ ⁽⁴⁾

Citocinas proinflamatorias que inducen MMPs

Además el TNF- α induce metaloproteinasas, en particular MMP-2 y MMP-9, Séguin CA et al , reportó las vías de transducción in Vitro de cómo TNF - α induce actividad de MMP`s en el núcleo pulposo de bovinos. Ya que está reportado que las MMP`s sobretodo MMP -2 está implicada en la progresión de enfermedad degenerativa de discos intervertebrales así como inducción de neovascularización⁽⁵⁾

Las Metaloproteinasas son caracterizadas por la habilidad de degradar componentes de la matriz extracelular, ésta familia incluye 25 miembros que juegan un papel importante en la remodelación de tejido, angiogénesis y morfogénesis.

También se sabe que la MMP-2 y la MMP 9 inducen apoptosis; en estudios hechos en médula espinal inhibiendo a ambas MMP se observa una disminución en la apoptosis y se reporta la importancia de esto como un método terapéutico en pacientes con trauma de la médula espinal para evitar la apoptosis de la misma. ⁽⁶⁾

Los métodos posibles de inhibición reportados son:

- Incremento de los niveles de inhibidores de tejido específico (TIMP) con la administración exógena de TIMP recombinante o por estimulación de su producción local a través de terapia genética.
- Administración de inhibidores sintéticos.
- Reducción de la producción de MMP.

Inhibidores tisulares de las MMP

Los trabajos con TIMP se han realizado en modelos animales y cultivo *in vitro* de células de vasos sanguíneos humanos, y están especialmente relacionados con la hiperplasia neointimal, aterosclerosis y formación de aneurismas.

Sin embargo, la extrapolación de los beneficios obtenidos en esos estudios a los seres humanos es compleja, ya que los TIMP administrados de forma exógena podrían metabolizarse y desnaturalizarse con una penetración tisular mínima en el sitio donde han

de actuar. Por tanto, el tratamiento tendría que ser en forma de liberación tisular local o mediante terapia génica.

Inhibidores sintéticos de las MMP

Entre ellos se han investigado los péptidos batimastat y marimastat. El batimastat es un inhibidor de amplio espectro de las MMP que ha mostrado resultados prometedores en la limitación del crecimiento de aneurismas en modelos experimentales, aunque su empleo a largo plazo se ve limitado por su falta de biodisponibilidad vía oral. El marimastat, de segunda generación, sí es activo por vía oral. Sin embargo, posee un 30% de efectos secundarios a nivel músculo esquelético, aunque se ha estudiado en modelos experimentales humanos de hiperplasia en la íntima y aneurismas con resultados alentadores.

Por último, se están ensayando inhibidores específicos, entre ellos de la MMP-2 y la MMP-9, cuyos resultados aún se desconocen en las enfermedades vasculares.

Tetraciclinas

A este grupo farmacológico pertenece la doxiciclina, que, además de su acción antibacteriana, es un potente inhibidor no específico de las MMP. Trabajos realizados *in vitro* han puesto de manifiesto que este fármaco disminuye la hiperplasia en la capa íntima en un modelo realizado con cultivo de vena humana, al igual que previene la degeneración aneurismática de la aorta abdominal en la rata.

Por otra parte, se ha demostrado que la administración de tetraciclina previa a la intervención quirúrgica del aneurisma no sólo penetra rápidamente en la pared arterial, sino que además disminuye de modo significativo la expresión de MMP-2 y MMP-9 en los mismos.

La actividad de ellas está regulada principalmente a nivel transcripcional a través de inhibidores de metaloproteinasas, la disrupción en ésta regulación involucra la patogénesis de artritis, arterioesclerosis, fibrosis, neoplasias, metástasis, vasculitis y procesos inflamatorios.ojo seco. ^(7,8)

La doxiciclina disminuye la degradación de elastina y reduce la actividad de MMP-8 y MMP -9. Recientemente se descubrió que esta tetraciclina inhibe la producción de IL -1 en cultivo de células epiteliales corneales tratadas con lipopolisacárido, encontrando un efecto similar a los corticoesteroides. In vivo, la Doxiciclina protege a ratones de endotoxemia letal por que produce una disminución en la producción de citocinas derivadas de leucocitos sanguíneos por inhibición en la producción de IL -1, IL -6 TNF α y el IFN γ . ⁽²⁾

Múltiples mecanismos moleculares transcripcionales y postranscripcionales están involucrados en los efectos antiinflamatorios de la doxiciclina. La supresión de citocinas pro-inflamatorias puede involucrar menor activación de la vía de la proteína cinasa C (PKC). La dosis inhibitoria reportada es de 10-15 micro molar; la cual reduce colagenasa, gelatinasa y otras metaloproteinasas in Vitro la cual es comparable y mayor a la concentración en suero posterior a 200 mg vía oral diarios; estudios clínicos indican que

ésta dosis es suficiente para reducir la actividad de colagenasas y gelatinasa en extractos de cartílago humano osteoartrítico ex vivo.

Una dosis subantimicrobiana de doxiciclina 20 mg dos veces al día ha demostrado inhibir la actividad de colagenasa en fluido gingival. ⁽²⁾

Así mismo se recomienda en pacientes con patologías oculares, como lo son: erosiones epiteliales recurrentes, rosácea, meibomitis, queratitis sicca, en éste último se le atribuye la inhibición de MMP e IL -1 en la película lagrimal. ⁽⁹⁾

Es importante resaltar que ellos sugieren que la fuente de MMPs y citocinas proinflamatorias radica en los neutrófilos presentes en la película lagrimal. ⁽²⁾

En el 2005 Xiao QG et al , hicieron un estudio en China donde evaluaron los efectos de doxiciclina en la regulación de moléculas de adhesión (ICAM -1 , CD54), interleucina 1 β , antígeno leucocitario humano (HLA-DR) y apoptosis en células epiteliales conjuntivales , midieron por citometría de flujo y análisis de western Blot la concentración de CD 54 , HLA-DR, IL 1 β , la apoptosis fue valorada por citometría de flujo en el cultivo de células epiteliales conjuntivales tratadas por 72 hrs. Concluyeron que la doxiciclina inhibe la expresión de citocinas inflamatorias y proponen que ésta tetraciclina puede ser un fármaco potente para el tratamiento de enfermedades de la superficie ocular. ⁽¹⁰⁾

Apoptosis

Apoptosis significa “caída a lo profundo”, es causa de muerte programada de la célula, en la actualidad se le denomina muerte inducida por activación y se le ha reconocido importante en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos entre ellos: destrucción programada de la célula durante la embriogénesis como ocurre en la implantación, organogénesis e involución del desarrollo; involución fisiológica dependiente de hormonas, como el endometrio durante el ciclo menstrual; pérdida de células en poblaciones proliferantes como el epitelio de las criptas intestinales o la muerte de células tumorales y la pérdida de células T autorreactivas en el timo; muerte celular de los linfocitos privados de citocina o muerte celular inducida por células T citotóxicas.⁽¹¹⁾

Existen tres familias de genes y sus productos importantes en la inducción y control de apoptosis uno de ellos se centra en la síntesis, activación o ambas de algunas proteasas citosólicas. Ésta inducción o activación se puede desencadenar por diferentes estímulos como eliminación de factores de crecimiento, receptores específicos de muerte celular, como FAS el cual forma parte de una familia de receptores de muerte celular programada como los receptores para TNF α . Otra familia es del gen bcl -2 y por último la familia de las caspasas.⁽¹²⁾

La activación inicial en una o más enzimas ampliamente específicas puede iniciar una cascada de activación de otras proteasas que terminan en muerte celular. La activación de estas endonucleasas producen la fragmentación característica del DNA y los cambios en el volumen y la forma de la célula pueden atribuirse al desdoblamiento del citoesqueleto.

Por último la fagocitosis de corpúsculos apoptóticos se facilita por receptores específicos situados en los macrófagos o células parenquimatosas sanas adyacentes.

De manera habitual la apoptosis implica células únicas o grupo de células que aparecen en cortes teñidos con Hematoxilina y Eosina en forma de masas redondas u ovals con citoplasma intensamente eosinofílico. La cromatina nuclear se condensa y agrega en la periferia, por debajo de la membrana nuclear, en masas bien delimitadas de diferentes formas y tamaños, por último ocurre la cariorrexis lo que se refleja como fragmentación del DNA en pedazos del tamaño de nucleosomas.

Las células se arrugan rápidamente y forman yemas citoplásmicas y fragmentos en corpúsculos apoptóticos compuestos de vesículas unidas a la membrana de citosol y de los organelos. Los fragmentos son expulsados con rapidez y fagocitados. ⁽¹¹⁾

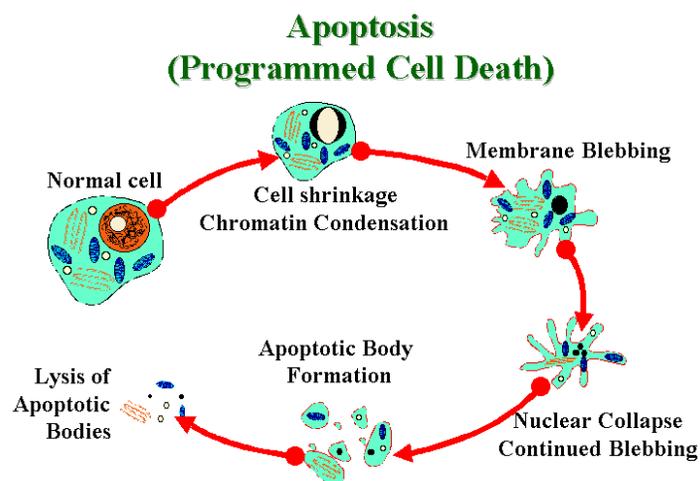
Uno de los primeros trastornos secundarios a la apoptosis es la translocación de la porción interna de la membrana fosfolípida fosfatidilserina (PS) a la porción externa de la membrana plasmática, esto expone a PS al espacio extracelular y permite que se una con la Anexina V, la cual es una molécula Calcio dependiente de 35-36 kDa, y tiene gran afinidad a la PS. Ésta translocación antecede procesos como pérdida de la integridad plasmática, fragmentación del DNA y condensación de cromatina. La Anexina-V puede ser conjugada con un fluorocromo como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), ficoeritrina-cychrome 5 (Cy5 o Cy5.5) y posteriormente se puede utilizar en citometría de flujo para identificar en las células los estadios tempranos de la apoptosis.

La translocación de PS también sucede durante el proceso de necrosis; por lo tanto la Anexina-V no es un marcador absoluto de apoptosis, por lo que se tiene que utilizar junto con tinciones vitales como el 7 amino actinomicina, o Ioduro de Propidio. Este último se une a los ácidos nucleicos, pero solo puede penetrar a la membrana plasmática cuando la integridad membranal está alterada, así como ocurre en los estadios tardíos de apoptosis o necrosis.

Viabilidad celular: cuando las células son negativas para Anexina-V y para las tinciones con yoduro de propidio. Significa integridad en membrana celular.

Apoptosis temprana: son las células Anexina-V positivas y tinción vital negativa, ya hay translocación de membrana pero hay integridad.

Apoptosis tardía o necrosis: Son las células positivas para Anexina-V y tinciones vitales, tienen translocación membrana y pérdida de la integridad de la membrana plasmática .⁽¹³⁾



Planteamiento del problema

Se sabe que las tetraciclinas como la minociclina y Doxíciclina inhiben la apoptosis inducida por metaloproteinasas y citocinas proinflamatorias (IL-1 , IL -6, TNF-a.) en células de sangre periférica, sin embargo se desconoce si la Doxíciclina tiene la capacidad de inhibir la producción de citocinas pro inflamatorias así como la apoptosis inducida en el células conjuntivales epiteliales

Justificación del estudio

Valorar los efectos anti-inflamatorios (inhibición de citocinas anti-inflamatorias) y anti-apoptóticos de la doxiciclina en células conjuntivales para proponer su uso tópico en pacientes.

Hipótesis

Las células conjuntivales tratadas con doxiciclina resistirán la apoptosis inducida por el activador policlonal y disminuirá la síntesis de IL-1 β y TNF-a.

Objetivo General

1. Determinar los efectos anti-apoptóticos y anti-inflamatorios de la doxiciclina en células epiteliales derivadas de explantes conjuntivales in Vitro.

Objetivos particulares

- 1.** Establecer cultivo primario de células derivadas de explantes conjuntivales.
- 2.** Determinar las características morfológicas con microscopia de contraste de fase en células tratadas y no tratadas con doxiciclina y en presencia de un activador de PKC.
- 3.** Determinar la expresión de moléculas relacionadas a apoptosis/necrosis celular (Anexina-V, Ioduro de Propidio) por citometría de flujo en células tratadas y no tratadas con doxiciclina y en presencia de un activador de PKC.
- 4.** Determinar la concentración de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α) en células tratadas y no tratadas con doxiciclina y en presencia de un activador de PKC.

MATERIAL Y MÉTODOS.

Placas de cultivo celular (Costar, Corning, NY, USA); tubos cónicos de 1.5ml (Eppendorf, Hamburg, Germany); medio DMEM (Dulbecco modified Eagle medium), KSFM (keratinocyte serum free medium), suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA); anfotericina B, tripsina/EDTA (Sigma, St. Louis Missouri, USA); ; microscopía de contrastes de fases invertida (Axiovert; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany); incubadora (Forma Scientific, Inc., OH, USA); cámara de Neubauer (Bright Line, Buffalo, NY, USA); citómetro de flujo (Becton Dickinson, USA). Penicilina /Strepto 1 µg (Sigma St. Louis Missouri, USA) anexina-V/ioduro de propidio (Serotec, Oxford UK) ,Kit ELISA para IL-1 β y TNF- α (Minneapolis, USA).

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LA MUESTRA.

Se obtuvieron 24 muestras de conjuntiva de pacientes de la Fundación Hospital “Nuestra Señora de la Luz”, sin importar sexo o edad, que fueron sometidos a cirugía de pterigión o catarata. Se excluyeron aquellos pacientes que padecieran cualquier enfermedad de superficie ocular que involucrara el área de toma de la muestra.

Descripción de la técnica quirúrgica. Bajo anestesia local o tópica y con técnica estéril se disecaron fragmentos libres de Tenon, de 1 x 2 mm aproximadamente de la conjuntiva bulbar superior, aproximadamente a 10-15 mm del limbo.

Manejo de la muestra conjuntival. Para su transportación se depositó la muestra en un franco estéril con solución salina o medio de cultivo KSFM y se mantuvo a 4°C, por un periodo no mayor de 5 h hasta su procesamiento con técnica estéril.

Cultivos celulares. La muestra de conjuntiva fue procesada bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar. Se tomó un fragmento de 1x1 aproximadamente y se colocó de forma extendida en cajas de 96 pozos de cultivo, dejando reposar el tejido de 15 a 30 segundos para permitir su fijación. Se agregó 20 µl de suero fetal bovino durante 24h a 37°C en un ambiente de 5% CO₂. Al terminar el tiempo de incubación se agregó 80µl de suero y 100µl DMEM.

Cambiándose de medio cada tercer día hasta observar el crecimiento celular microscópicamente con una confluencia aproximada del 80% en ese momento se cambió el medio por KSFM suplementado con insulina (5µl/ml), hidrocortisona (0.05 µl), extracto de pituitaria bovina (4.5 µl/ml), factor de crecimiento epitelial humano (0.14µl/ml), con Penicilina 1 U /Strepto 1 µg y Anfotericina B (1.25µg/ml) y se quitó el explante tisular reutilizados en otros pozos. Las células así obtenidas crecieron hasta una confluencia de 80% en KSFM y evaluadas para apoptosis y producción de citocinas pro inflamatorias.

Obtención de las células epiteliales derivadas de explantes conjuntivales. Para la obtención de las células se empleó tripsina-EDTA 0.25/0.03 % hasta observar la disgregación celular con microscopio invertido. La reacción enzimática se detuvo con suero fetal bovino.

Activación celular. Antes de su activación las células fueron llevadas a GO añadiendo durante 24 KFSM no suplementado, al término, las células derivadas de los explantes conjuntivales fueron procesadas en diferentes formas: con PMA 5 μ g/mL /Ionomicina 2 μ /mL , con doxiciclina a 200 μ M, con doxiciclina a 200 μ M y PMA/Ionomicina y los controles negativos no estimulados, durante 24h. Las células fueron recuperadas para su evaluación por citometría de flujo y los sobrenadantes fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento por ELISA.

Inmunofluorescencia directa. Una vez recuperadas las células fueron lavadas dos veces con PBS (Phosphate Buffered Saline, por sus siglas en ingles) para eliminar los residuos de tripsina-EDTA y suero fetal bovino. Posteriormente las células fueron incubadas con Anexina-V-FITC durante 15min en oscuridad, al término del periodo de incubación las células fueron incubadas con yoduro de propidio. Los datos fueron analizados por citometría de flujo.

Citometría de flujo.- Se adquirieron 3000 eventos, el análisis se realizó en la ventana que por tamaño y granularidad correspondió a células derivadas de explantes conjuntivales, la fluorescencia se consideró positiva comparando la fluorescencia con el control no marcado, no estimulado. Los datos se presentan en graficas de puntos o histogramas.

Técnica de ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, por sus siglas en ingles).- Los sobrenadantes de cultivo fueron procesados para determinación por ELISA de IL-1 β y TNF- α de la siguiente manera: Se diluyó el anticuerpo de captura (anti TNF- α y anti IL-1 β) en PBS sin proteína acarreadora, y se colocó 100 μ l del mismo en la placa de 96 pozos, se

incubó 24 hrs a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron 6 lavados consecutivos con PBS-Tween.

A continuación se agregó PBS-BSA 1% (proteína acarreadora) y se incubó por un periodo de 1 hora. Posteriormente se realizaron de nuevo 6 lavados con PBS-Tween como se mencionó anteriormente. Al concluir los lavados se agregó la muestra y los estándares con la proteína conocida (TNF- α e IL-1 β), incubándose a temperatura ambiente por 2 horas. Al concluir el periodo de incubación, de nuevo se realizaron lavados con PBS-Tween. Posteriormente se agregó el anticuerpo de detección (anti-TNF- α y anti-IL-1 β) conjugado a biotina, dejándose en incubación por 2 h. Al término de este periodo de incubación se realizaron de nuevo lavados con PBS-Tween. Consecutivamente se agregó estreptavidina-peroxidasa en cada pozo y se dejó incubar durante 20 min en oscuridad.

De nuevo, al concluir la incubación se realizaron lavados con PBS-Tween. Ulteriormente, se añadió el sustrato a cada pozo, dejándose incubar 20 min mas en presencia del mismo a temperatura ambiente y en oscuridad. La reacción colorimétrica fue detenida con 50 μ l de H₂SO₄ a 2N. Por último se determinó ópticamente la lectura a una longitud de onda a 450nm, con una corrección de 540nm.

Determinación de la concentración de proteína por regresión lineal. Éste análisis se llevó a cabo en Excel (Microsoft Office 2007®). Como primer paso se retiraron los números consecutivos que muestra por default el programa. A continuación se corrigió la absorbancia detectada con longitud de onda de 450nm, restándole a la misma la absorbancia detectada a 540nm. Una vez hecho esto, se corrigió la absorbancia restando la absorbancia determinada a la concentración cero. Posteriormente se realizó el promedio de

la curva de concentración específica para cada anticuerpo (TNF- α e IL-1 β). Y se graficó absorbancia vs concentración de anticuerpo, utilizando la ecuación de la pendiente de la recta: $y = mx+b$

Como los valores obtenidos fueron “absorbancia” para todas las muestras, el valor de “y” era conocido, teniéndose que despejar la ecuación para calcular la concentración proteica determinada por el eje “x”, quedando de la siguiente manera: $x = (y - b) / m$

Para obtener los valores de “b” y “m” se realizó una regresión lineal, obteniendo una $R^2=0.99$.

Análisis estadístico. Se utilizó T de student o U-Mann Whitney para comparar entre dos grupos. Se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa.

RESULTADOS.

1. Cultivo primario de células derivadas de explantes conjuntivales.

El tamaño celular promedio observado $11629 \text{ micras} \pm 2323$. Con una morfología en huso (fibroblástica), la cual fue haciéndose epitelioides una vez que las células fueron tratadas con KSFM (Figura 1). La confluencia de 80% se alcanzó entre las 3 semanas-1 mes de haber realizado los explantes conjuntivales. No se alteró la morfología en las células tratadas con doxiciclina (Figura 2).

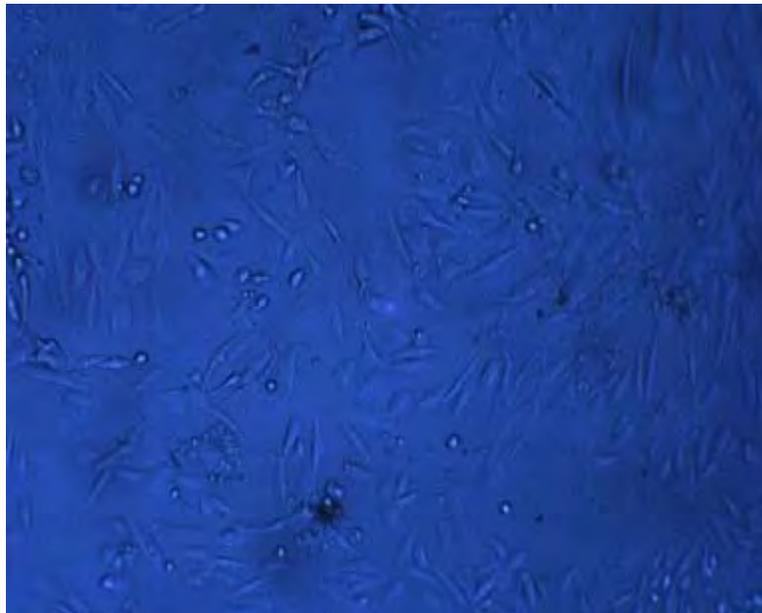


Figura 1. Células derivadas de explantes conjuntivales. Fotografía de microscopía de contraste de fase 20x, se observan formas epitelioides y en huso de las células cultivadas.

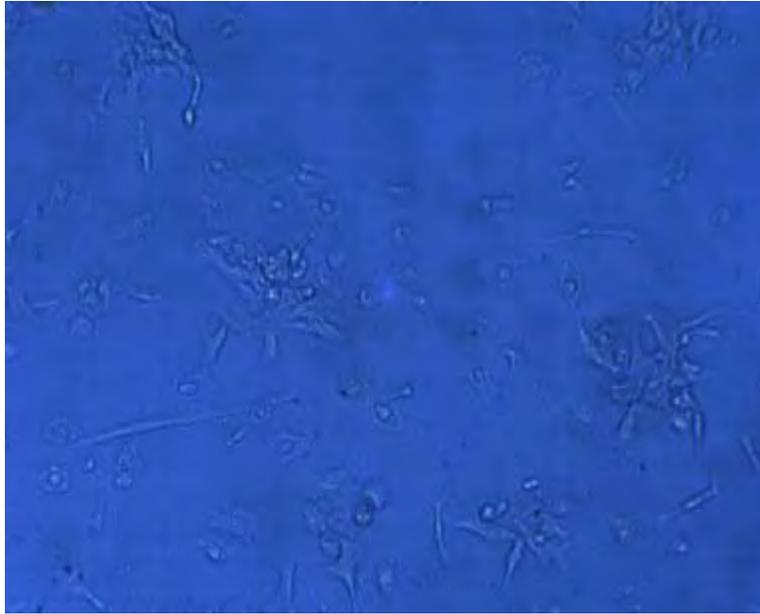


Figura 2. Células derivadas de explantes conjuntivales tratadas con doxiciclina. Fotografía de microscopia de contraste de fase de células cultivadas tratadas con doxiciclina durante 24h, se observan formas epitelioides y en huso similares a las observadas en células no tratadas.

2. Evaluación de la apoptosis/necrosis celular inducida por activador policlonal en células tratadas y no tratadas con doxiciclina.

El análisis por citometría de flujo mostró que las células tratadas con PMA/Ionomicina presentan 54 veces más células con necrosis que las no tratadas, y que existen 4.65 veces más células vivas en las células no tratadas que en las tratadas con PMA/Ionomicina. Cuando se agregó Doxiciclina a las células tratadas con PMA/Ionomicina, se observó que las células apoptóticas disminuyeron significativamente 3.28 veces ($p=0.003$) y que había 1.5 veces más células vivas en las tratadas con PMA/Ionomicina+Doxicilina que en las tratadas exclusivamente con PMA/Ionomicina. (Ver Tabla 1-3 y Figura 3)

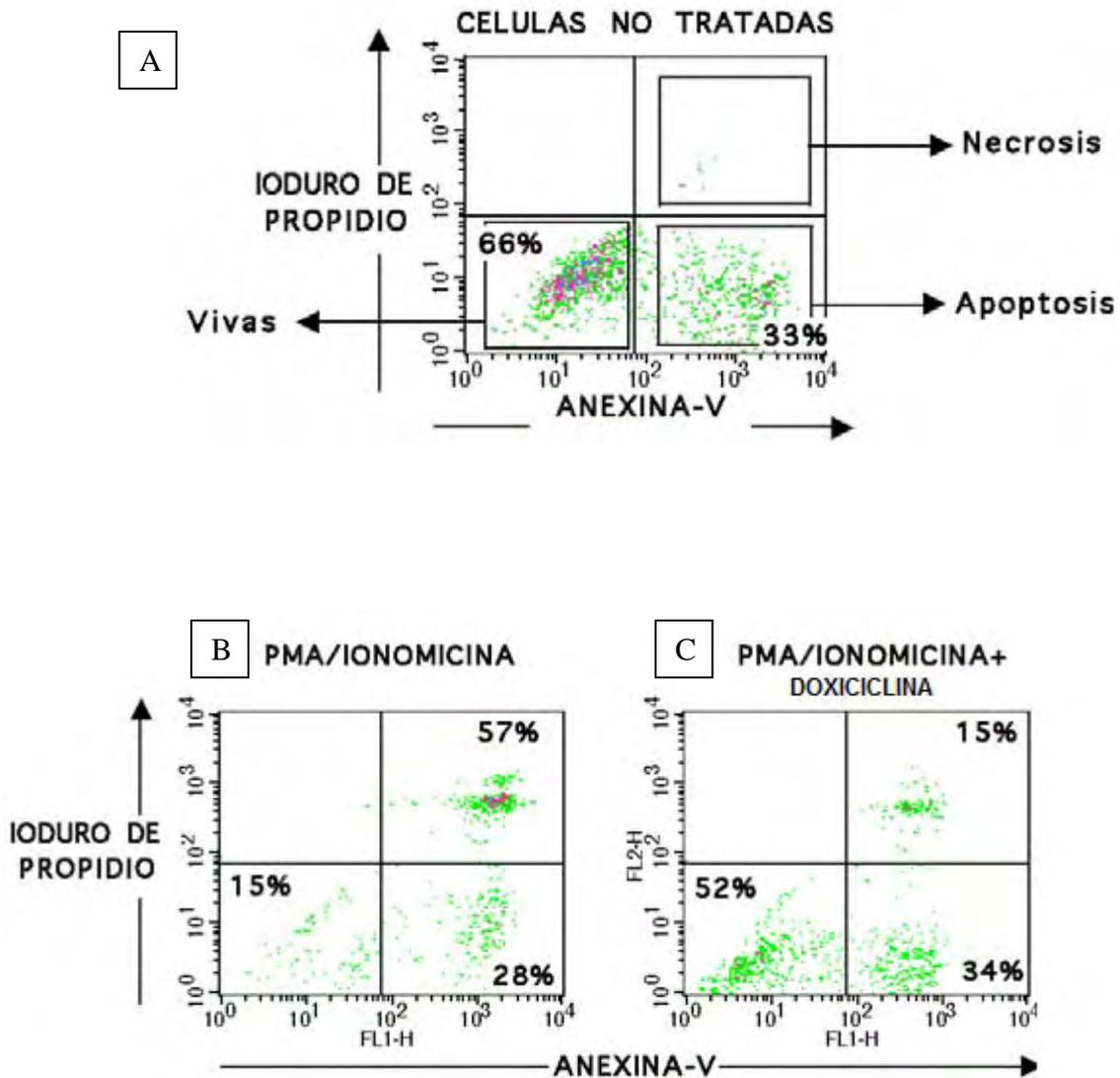


Figura 3. Citometría de flujo apoptosis vs necrosis de células conjuntivales. Se observa en (A) el porcentaje de células vivas y en apoptosis en células derivadas de explantes conjuntivales sin tratamiento. En (B) se observa que el porcentaje de células apoptóticas se incrementa en células tratadas con PMA/Ionomicina con un porcentaje significativo de células en necrosis celular. En (C) se observa que tanto el porcentaje de células en necrosis y en apoptosis disminuye, así como se incrementa el porcentaje de células vivas en aquellas que fueron tratadas con PMA/Ionomicina + Doxiciclina.

Tabla 1. Porcentaje de viabilidad en células derivadas de explantes conjuntivales.

Viabilidad	Control	Doxiciclina	PMA/Ionomicina	PMA/I+ Doxi
	64.5%	29.%	17.%	51%
	43.2%	23.2%	7.7%	24.%
Promedio	56.3 ±	26.1±	12.1±	37.5±
ES	13	3	5	14

ES.- Error Standard

Tabla 2. Porcentaje de apoptosis en células derivadas de explantes conjuntivales.

Apoptosis	Control	Doxiciclina	PMA/Ionomicina	PMA/I+Doxi
	30%	77.%	27%	35%
	57%	77%	35%	55%
Promedio	43.33±	76.75±	30.67±	45.22±
ES	13.3	0	4	10

Tabla 3. Porcentaje de necrosis en células derivadas de explantes conjuntivales.

Necrosis	Control	Doxiciclina	PMA/Ionomicina	PMA/I+Doxi
	0	0	57.%	15%
	0	0	52%	19%
Promedio	0	0	54.69±	16.69±
ES	0	0	2.2	2.3

3. Determinación de citocinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF α) en sobrenadante de cultivo de las células derivadas de explantes conjuntivales.

Al realizar el análisis por ELISA observamos que no existe producción basal de TNF- α y al someter a las células con el estimulador policlonal PMA/Ionomicina se obtuvo una producción de 41 veces más TNF- α que las células no estimuladas. Interesantemente, observamos que las células estimuladas con PMA/Ionomicina y que fueron tratadas además con Doxiciclina mostraron una disminución de 17.4 en la concentración de TNF- α . (Figura 4A)

En el caso de IL-1 β , observamos que existe una producción basal en células no estimuladas de 7.5 pg/mL, al agregar doxiciclina se observó ausencia total de la producción basal de IL-1 β . Al estimular a las células con PMA/Ionomicina se observó un incremento significativo en la producción de IL-1 β de 59.4 veces. Interesantemente, al agregar doxiciclina en las células tratadas con PMA/Ionomicina se observó una disminución total en la concentración de IL-1 β . (Figura 4B)

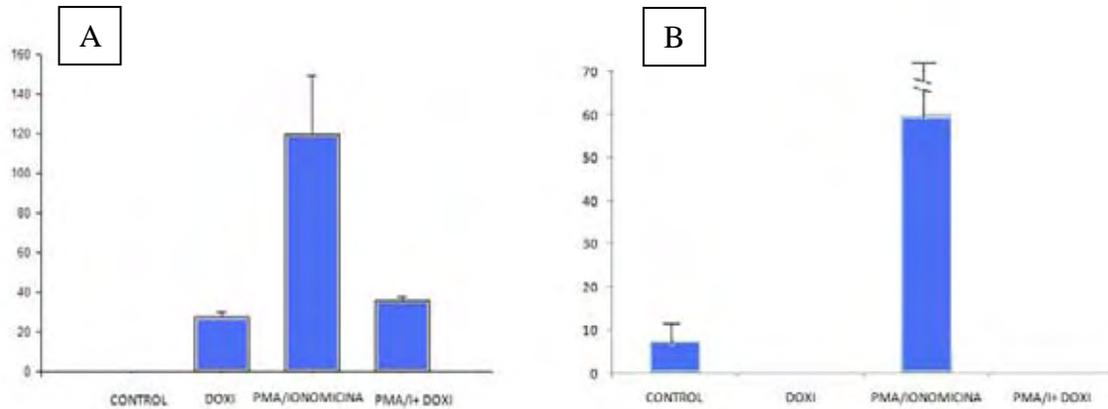


Figura 4. Determinación de citocinas proinflamatorias en sobrenadante de células derivadas de explantes conjuntivales. En (A) se observa la concentración de TNF- α en los diferentes tratamientos a los que fueron sometidos las células conjuntivales. En (B) se observan los cambios en la producción de IL-1 β con los diferentes tratamientos. En ambas graficas se puede observar efectos inhibitorios en la concentración de citocinas cuando las células son tratadas con doxiciclina.

DISCUSIÓN.

Nuestro estudio demuestra que la activación de células epiteliales derivadas de explante conjuntival in vitro producen compuestos biológicamente activos (IL -1 β , TNF α) que son esenciales en la patogénesis de inflamación ocular, así mismo demuestra como la doxiciclina a una concentración de 200 μ M inhibe la producción de citocinas y moléculas pro inflamatorias, además que es un citoprotector contra la apoptosis y necrosis mediada por las moléculas pro inflamatorias al realizar la prueba con Anexina- V.

Durante el estudio observamos que la Doxiciclina favoreció la adherencia celular a la placa de 96 pozos ya que al tratar de llevar a cabo la separación celular con tripsina, esta requirió 30 minutos cuando el tiempo convencional es de 3 -5 minutos. Por lo que nuestros resultados en el grupo con sólo Doxiciclina, desconocemos si el aumento de apoptosis fue por acción directa de la Doxiciclina en tejido sano o por el tiempo prolongado con tripsina. Además debemos continuar la investigación para encontrar una dosis subantimicrobiana que mantenga los efectos antiinflamatorios sin alterar la flora conjuntival normal. También sería interesante poder tipificar y conocer las acciones específicas de las MMP'S ; ya que Limb y colegas recientemente describieron a la MMP-1 como inhibidora de la apoptosis .^(14,17) En éste sentido nosotros confirmamos por medio de la Anexina V que hubo disminución de apoptosis en las células conjuntivales activadas por lo que en nuestro estudio aportamos que en casos donde hay inflamación la Doxiciclina inhibe apoptosis , como también lo reporta Si-Tayeb y colaboradores donde estudiaron la relación de MMP-3 y apoptosis por su actividad catalítica.⁽¹⁷⁾

Vladimirova también estudió la relación del TNF- α como una molécula que induce apoptosis en células HeLa ⁽²⁰⁾, no así cuando es de origen oncogénico donde induce apoptosis para inhibir la replicación tumoral como en leucemias. ⁽¹⁹⁾

Por eso la importancia del artículo publicado por Bettany y Wolowacks en Inglaterra donde descubrieron que la Doxiciclina es un inhibidor de apoptosis selectivo. Ya que es citotóxico contra las células del linaje monocítico (Línea celular del linfoma humano histiocíticoU937) pero no es citotóxico en la línea mesenquimatosa como condrocitos, células de menisco, osteoblastos y fibroblastos. Lo mencionado anteriormente es de relevancia que la Doxiciclina abre una nueva ventana para la investigación de la inhibición de MMP sin inducir apoptosis en los monocitos ya que los macrófagos tienen un papel fundamental en llevar a cabo procesos de reparación de heridas. Ya que la inducción de apoptosis por Doxiciclina en macrófagos que inician una respuesta inflamatoria sería conveniente pero podría ser contraproducente en el retraso de reparación de heridas crónicas, pero la producción de MMP's derivadas de monocitos y macrófagos también promueven un retardo en la reparación de tejidos por lo que una inhibición de las mismas por la Doxiciclina por medio de la inducción de apoptosis de macrófagos podría ser de utilidad en el proceso de reparación. Además los macrófagos también están involucrados en otras condiciones clínicas como la glomerulonefritis, aneurismas aórticos, inflamación de la piel crónica, así como cicatrización y artritis; entre otras patologías. ⁽²¹⁾

También se han estudiado las tetraciclinas a nivel de células endoteliales donde Hanemaaijer realizó un estudio comparativo en con tetraciclinas y la propia Doxiciclina a una concentración de 50 μM donde encontró inhibición de la producción de MMP - 8 MMP - 9 en éstas células activadas con PMA , encontró que la Doxiciclina tiene mayor poder inhibitorio que el resto de las tetraciclinas ya que estas carecen de grupo hidroxilo y carbonilo en 2 carbonos C₁₁ y C₁₂, esto hace que las tetraciclinas carezcan de actividad anticolagenasa ; sería interesante en nuestro estudio por medio de zimografía tipificar a las metaloproteinasas que inhibe la doxiciclina a nivel conjuntival. ⁽³⁾

Smith y Cook realizaron un estudio con Doxiciclina a 100- 200 μM durante 3 a 4 días ya que observaron que concentraciones menores de 20 μM no habían efectos inhibitorios también por zimografía tipificaron la presencia de MMP-1, MMP-2(mayor producción por queratocitos corneales) ,MMP-3 y MMP-9 en la superficie ocular y hacen referencia que probablemente la producción de las mismas sea por el estímulo de IL -1 α , además por conteo celular por medio de microscopía observaron muerte celular y desprendimiento celular en dosis mayor a 120 μM pero por la frecuencia de reducción azul de alamar en el medio confirmaron que ninguna célula estaba en proceso de muerte o muerta. Los resultados demostraron que la inhibición fue irreversible al remover la doxiciclina , también precisan que la actividad de la doxiciclina sobre células epiteliales corneales se debe a que la Doxiciclina es un quelante de Calcio , por lo que ésta destruye de forma permanente la unión catalítica del Zinc con el sitio activo de la MMP. ⁽¹⁵⁾

Aunque Krakauer et al reportaron una dosis inhibitoria in vitro de 10 -15 μ M la cual también reduce colagenasas, gelatinasas y metaloproteinasas, aunque en su estudio utilizaron 50 μ M de Doxiciclina y observaron mismos efectos inhibitorios, además por medio de azul tripano hicieron estudio citotóxico de células mononucleares de sangre periférica, el resultado fue que la doxiciclina no fue tóxico y no hubo producción de lactato deshidrogenasa por las células tratadas. ⁽²⁾

Smith , Khan Lim et al estudiaron si la Doxiciclina vía oral alcanza la circulación de la película lagrimal , ya que se ha visto su eficacia principalmente en rosácea. Meibomitis , disfunción de glándula lagrimal y en erosiones recurrentes los cuales todos los anteriores en su fisiopatología incluyen la producción de MMP's. Obtuvieron concentración de la Doxiciclina a nivel de sangre periférica en un grupo control y con alteración de la superficie ocular y cuantificaron la concentración de Doxiciclina. A nivel plasmático encontraron una concentración entre 1.83 y 13.18 μ M pero no se detectó a nivel de película lagrimal, por lo que no funcionaría su administración vía oral para alteraciones de la superficie ocular por lo que nuestro estudio propone el uso tópico de la Doxiciclina para inhibir directamente la etiología de los procesos inflamatorios previamente mencionados. ⁽¹⁸⁾

La Doxiciclina al inhibir las MMP's inhibe la síntesis de moléculas pro inflamatorias como IL -1 α el cual induce la síntesis de MMP 9 en células epiteliales corneales y MMP-3,9 en queratocitos cultivados. ⁽¹⁵⁾ Sería interesante valorar si la Doxiciclina inhibe también IL -1 α , si esto fuera así , se inhibirían per se las Metaloproteinasas deteniendo así el proceso inflamatorio y la apoptosis.

Como también se ha estudiado a nivel corneal que las tetraciclinas sobre todo la Doxiciclina tiene actividad antiangiogénica sería muy útil especificar cuáles de las MMP tienen actividad angiogénica y antiangiogénica a nivel conjuntival .

En conjunto nuestros resultados sugieren que la Doxiciclina tiene actividad anti-inflamatoria, anti apoptótica , antinecrótica y citoprotectora a nivel de células epiteliales conjuntivales por lo que podríamos aportar a nivel clínico la aplicación tópica de Doxiciclina en aquellos pacientes que tengan una enfermedad inflamatoria a nivel de la superficie ocular .

Nuestro estudio tiene gran aplicación para investigación básica como para aplicación clínica. Ya que nos permite seguir investigando a la Doxiciclina como un fármaco con propiedades anti-inflamatorias por medio de la inhibición de $TNF \alpha$ y de $IL-1\beta$. Sabemos que múltiples enfermedades oculares tienen dentro de su fisiopatología el involucro de estas moléculas pro- inflamatorias y pro- apoptóticas ($TNF \alpha$ y la $IL-1\beta$). Por ejemplo; en la queratoconjuntivitis alérgica vernal y atópica se conoce que los mastocitos producen $IL-1\beta$ y $TNF \alpha$, así como en pacientes con Síndrome de Sjögren donde el $TNF \alpha$ y la $IL-1\alpha, \beta$ están aumentados en el epitelio conjuntival y por la glándula lagrimal perpetuando el cuadro de queratoconjuntivitis sicca (16). Otra aplicación clínica sería en el rechazo corneal posterior a una queratoplastia penetrante ya que muchas veces los esteroides tienen efectos adversos como glaucoma , catarata e infección. En todas estas entidades sabemos que coexisten los procesos de inflamación y apoptosis además de que actualmente no existe una presentación tópica de Doxiciclina con una concentración ideal que sea subantimicrobiana y que no afecte a los monocitos y

macrófagos la cual podría ser útil in vivo en un futuro para promover una mayor beneficio a los pacientes provocando menos efectos adversos pudiendo así resolver múltiples trastornos inflamatorios de la superficie ocular.

Conclusión.

Durante la realización de éste estudio observamos que la Doxiciclina tiene aplicación en el área oftalmológica ya que disminuye la apoptosis y la necrosis en células epiteliales conjuntivales e inhibe la producción de TNF- α y de IL-1 β en células epiteliales derivadas de explante conjuntival. Los resultados obtenidos in vitro abren una perspectiva importante en la aplicación tópica de Doxiciclina en pacientes cuya manifestación clínica oftalmológica esté relacionada con procesos inflamatorios y de remodelación tisular de la superficie ocular. Estudios posteriores en seres humanos confirmaran los resultados obtenidos in vitro.

Bibliografía:

- 1.- United States Food Drug Administration Safety information and adverse event reporting program. May 2008
2. Teresa Krakauer and Marilyn Buckley; Doxycycline Is Anti-Inflammatory and Inhibits Staphylococcal Exotoxin-Induced Cytokines and Chemokines. Antimicrobial agents and chemotherapy, Nov. 2003, p.3630–3633 Vol. 47, No. 11.
3. Hannemaaijer, R. H. Visser et al . Inhibition of MMP synthesis by doxycycline and chemically modified tetracyclines in human endothelial cells . Adv. Dent. Res 12;114-118.
- 4.-Francoeur, Caroline, Fabrice Escaffit, Pierre H. Vachon, and Jean-Francois Beaulieu. Proinflammatory cytokines TNF- and IFN- alter laminin expression under an apoptosis-independent mechanism in human intestinal epithelial cells. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2004 Sep;287(3):G592-8. Epub 2004 Apr
5. Séguin CA, Pilliar RM, Madri JA, Kandel RA. TNF-alpha induces MMP2 gelatinase activity and MT1-MMP expression in an in vitro model of nucleus pulposus tissue degeneration. Spine, 2008 Feb 15;33(4):356-65.
6. Dang AB, Tay BK, Kim HT, Nauth A, Alfonso-Jaume MA, Lovett DH. Inhibition of MMP2/MMP9 after spinal cord trauma reduces apoptosis. Spine. 2008 Aug 1;33(17):E576-9.
7. Egeblad y Werb, New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. Nature Reviews Cancer 2002 , 163-176.
8. Iruela-Arispe y cols., A Matrix Metalloprotease with Angioinhibitory Properties. Ann. N. Y. Acad. Sci.2003; 995, 183-190
9. Stahl James, Cook Ellen, et al . Differential and cooperative effects of TNF α , IL-1 β and IFN γ on human conjunctival epithelial cell receptor expression and chemokine release. Invest. Ophthalmol Vis Sci. 2003; 44 2010-2015.
10. Xiao QG, Liu ZG, et al. Effect of doxycycline on inflammation –related cytokines and apoptosis in human conjunctival epithelial disease. Zhongshan Ophthalmic Center, Zhonghua Yan Ke Za Zhi, 2005 Sep; 41 (9): 842-6
11. Robbins S, Kumar y Cotran R. Patología Humana. Editorial Mc. Graw Hill. Págs (4-16) Sexta edición.
12. Saint Jean Magdalena, Brignole Françoise, et al . Interferon γ induces apoptosis and expression of inflammation related proteins in Chang conjunctival cells. Investigative Ophthalmology and Visual Science. 1999. Vol 40 No 10 (2199-2212)

13. Becton and Dickson Company . Biosciences. 7 Loveton Circle, MC700 P.O. Box 999, Sparks, MD, USA 21152. Tel: 877.362.2700
14. Limb GA, Matter K, et al . Matrix Metalloproteinase -1 associates with intracellular organelles and confers resistance to lamin A/C degradation during apoptosis. Am .J. Pathology 2005 , 166;1555-1563.
15. V A Smith, S D Cook, Doxycycline—a role in ocular surface repair. Br J Ophthalmol 2004;88:619–625.
16. Gueders y cols. Matrix Metalloproteinase-8 Deficiency Promotes Granulocytic Allergen-Induced Airway Inflammation. J. Immunology 2005. 175 (4), 2589-2597.
17. Karim Si-Tayeb, Arnaud Monvoisin, Claire Mazzocco et al , Matrix Metalloproteinase 3 Is Present in the Cell Nucleus and Is Involved in Apoptosis. The American Journal of Pathology, Vol. 169, No. 4, October 2006 Copyright © American Society for Investigative Pathology
18. V A Smith, D Khan-Lim, L Anderson, S D Cook, A D Dick, Does orally administered doxycycline reach the tear film?, Br J Ophthalmol 2008;92:856–859.
19. IWASAKI Hiromichi ; INOUE Hitoshi ; MITSUKE Yasuhiko ; BADRAN Adel ; IKEGAYA Satoshi ; Doxycycline induces apoptosis by way of caspase-3 activation with inhibition of matrix metalloproteinase in human T-lymphoblastic leukemia CCRF-CEM cells . The Journal of laboratory and clinical medicine 2002, vol. 140, n°6, pp. 382-386
20. Nataliya M. Vladimirova, Nataliya V. Stratienco, Nataliya A. Potapenko. Different behavior of nucleophosmin/B23 and UBF in HeLa cells during apoptosis induced by alpha-TNF/emetine. Structural Biochemistry Laboratory, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry Russian Academy of Sciences, Moscow, 117997,
21. J.T. Betanny R.G. Wolowacks. Tetracycline derivatives induce apoptosis selectively in cultured monocytes and macrophagesbut not in mesenchymal cells. *Adv Dent Res* 12:136-143, November, 1998 Russia.