



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

ASOCIACION PARA EVITAR LA CEGUERA EN MÉXICO I.A.P.  
HOSPITAL LUIS SÁNCHEZ BULNES

## MODELO DE INFLAMACIÓN CRÓNICA INDUCIDO POR BCG INTRAVÍTREO

TESIS PROFESIONAL  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
ESPECIALISTA EN OFTALMOLOGÍA

PRESENTA  
ROSA ELISA MARTÍNEZ MUÑOZ

DIRECTOR DE TESIS  
DR EN C. JESUS JAVIER FLORES ESTRADA



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.

# **JURADO**

DR. ABELARDO A. RODRÍGUEZ REYES  
PRESIDENTE

DR. MARCO PEDRO HERNANDEZ ÁBREGO  
SECRETARIO

DR. RAFAEL CASTAÑEDA DIEZ  
VOCAL

DRA. MAGDALENA GARCIA HUERTA  
VOCAL

DR. OSCAR ALBIS DONADO  
VOCAL

México, D.F., Agosto de 2011

## **DEDICATORIAS**

A mis padres, que sin ellos no hubiese alcanzado los objetivos que me he impuesto; sin cuyo amor y educación no hubiese logrado sobrevivir esta vida.

A Oscar Andrés Ron Echeverría por su apoyo incondicional.

A mis amigos quienes siempre han tenido un buen consejo que compartir y con su ejemplo me han guiado.

Al Dr. En C. Javier Flores Estrada, quien con su visión y guía a hecho posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Abelardo Rodríguez por su asesoría y disposición al realizar esta tesis.

A mis sinodales por estar siempre dispuestos a apoyarme durante la realización de mi residencia.

# CONTENIDO

<b>1. Marco teórico.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Justificación.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Hipótesis.....</b>	<b>3</b>
<b>4. Objetivos .....</b>	<b>3</b>
<b>5. Diseño del estudio .....</b>	<b>3</b>
<b>6. Metodología .....</b>	<b>3</b>
<b>Criterios de inclusión .....</b>	<b>4</b>
<b>Criterios de exclusión .....</b>	<b>4</b>
<b>Tamaño de la muestra .....</b>	<b>4</b>
<b>Variables en estudio .....</b>	<b>4</b>
Observación de fondo de ojo.....	4
Medición de 8-OHdG (8 hidroxí-desoxi-guanosina) y VEGF por inmunohistoquímica, y qRT-PCR.....	5
<b>Detalle de maniobras y método.....</b>	<b>5</b>
<b>Recolección y análisis de datos.....</b>	<b>6</b>
<b>Aspectos éticos .....</b>	<b>7</b>
<b>7. Resultados .....</b>	<b>9</b>
<b>Características clínicas .....</b>	<b>9</b>
<b>Características histológicas .....</b>	<b>9</b>
<b>La inyección intravítrea de M. Bovis BCG, induce estrés oxidativo.....</b>	<b>10</b>
<b>La inflamación crónica inducida por M. bovis BCG induce VEGF .....</b>	<b>11</b>
<b>8. Discusión .....</b>	<b>12</b>
<b>9. Conclusión .....</b>	<b>12</b>
<b>10. Bibliografía .....</b>	<b>13</b>

## **1. Marco teórico**

La diabetes es la principal causa de ceguera en nuestro país. Los altos niveles de glucemia inducen especies reactivas de oxígeno, inducen inflamación crónica y productos avanzados de la glucosilación que ocasionan permeabilidad vascular y no perfusión capilar a nivel sistémico. Los medios claros de sistema óptico permiten valorar estos cambios en la circulación retiniana, permitiendo reconocer dos fases de la retinopatía diabética.

La retinopatía diabética no proliferativa se caracteriza por daño progresivo de los pericitos, pérdida de la integridad de la barrera hemato-retiniana y la presencia de fuga de contenido vascular al tejido retiniano. Los cambios a nivel celular se expresan clínicamente como microaneurismas, edema de retina, exudados retinianos y hemorragias intrarretinianas.

Si continúa el estímulo hipóxico e inflamatorio inducido por la hiperglicemia, se presenta la retinopatía diabética proliferativa, responsable principal de la baja visual en pacientes diabéticos. En esta entidad la progresión en la disfunción celular, así como la no perfusión capilar, inducen un medio hipóxico, en el cual se expresan diversos factores hipóxicos. Si estos factores inducen la neovascularización retiniana clínicamente expresados como hemorragia vítrea, hemorragias pre-retinianas y neovascularización iridiana.

Establecer modelos experimentales de neovascularización retiniana permitirá entender la retinopatía diabética proliferativa. Dilucidando las vías moleculares que inducen neovascularización permitirá brindar un tratamiento oportuno a pacientes con diabetes y conservación de su agudeza visual.

El modelo de neovascularización por inflamación consiste en el rompimiento de la barrera hemato-retiniana, infiltración de células inflamatorias e incremento de

varios mediadores de la inflamación (L-1B, IL-6, IL-8, INF- b, TNF- $\gamma$  , iNOS); así como la alteración inicial de señales bioquímicas del estrés oxidativo (1, 2, 3). La interacción final de estas moléculas es la inducción de neovascularización. El factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF (por sus siglas en inglés), juega el rol de orquestador de la proliferación microvascular.

## **2. Justificación**

Con el fin de encontrar un modelo que refleje los procesos patológicos como la neovascularización en diabetes se piensa utilizar extractos de la pared celular de *Mycobacterium sp* para inducir una respuesta inflamatoria tipo crónica en animales experimentales. La infección con estas bacterias puede desarrollar una hipersensibilidad de tipo tardía que involucra la angiogénesis como un mecanismo de reparación del tejido dañado por la inflamación. Se ha demostrado que el glicolípido purificado de Trehalosa 6,6-dimicolato (conocido como factor cuerda) de *Mycobacterium tuberculosis* induce en las corneas de la rata una respuesta granulomatosa local asociada a la neovascularización. Citocinas, incluyendo a TNF- $\alpha$ , interleucina-8 e IL-1b así como VEGF, fueron encontrados en estadios tempranos y detectables hasta los 21 días (4, 5, 6). Interesantemente, se ha demostrado que la activación de los macrófagos por la inmunización con *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin (BCG) induce una respuesta inmune innata a través de TLR 2 y 4 produciendo de manera dependiente la secreción de citocinas inflamatorias tales como TNF- $\alpha$ , IL-6 y generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), (7, 8) Además, BCG activa rápidamente a la proteína cinasa reguladora de la señal de apoptosis (del inglés: ASK1), miembro de la familia de las MAP cinasas MAPKKKs. ASK1 es identificada como un promotor de la angiogénesis temprana induciendo la filtración de células inflamatorias y expresión de VEGF en condiciones isquémicas (9, 10).

El 8-OHdG, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), es una especie reactiva de oxígeno, producto del daño por oxidación al ADN, formado por radicales hidroxilos, singulete de oxígeno y por la directa acción foto dinámica.

El VEGF, es una proteína inducida por células que estimula la vasculogénesis y la angiogénesis. Es parte de un sistema, que restablece el suministro de oxígeno a tejidos en donde la circulación sanguínea es inadecuada.

### **3. Hipótesis**

La aplicación intravítrea de extractos de pared celular de *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette es capaz de inducir neovascularización retiniana a través de una inflamación crónica.

### **4. Objetivos**

Establecer un modelo de inflamación crónica intraocular en conejos inducidos por la inmunización intraocular de *M. bovis* BCG.

### **5. Diseño del estudio**

Se realizará un estudio prospectivo longitudinal del tipo experimental comparativo.

### **6. Metodología**

Se utilizarán 30 conejos de la raza Nueva Zelanda divididos en 6 grupos. Todos los grupos recibieron inyecciones intravítreas de  $5 \times 10^6$  *Mycobacterium bovis* BCG muerta. Los animales control recibieron inyecciones con solución salina balanceada.



### *Criterios de inclusión*

Conejos sanos hembra de la raza Nueva Zelanda con un peso corporal de 2.5 a 3 kg sin aparente inflamación en humor acuoso o cavidad vítrea.

### *Criterios de exclusión*

Conejos con trauma ocular post-quirúrgico, catarata, hallazgos fibróticos causados durante la maniobra de experimentación, y muerte posterior a anestesia.

### *Tamaño de la muestra*

Se utilizarán 15 conejos experimentales y 15 conejos control. Esto se determinó a través de la fórmula para prueba de contrastes de hipótesis de medias, utilizando el programa epidem 3.1 de la Universitat de Catalunya.

Prueba de contraste de medias

### *VARIABLES EN ESTUDIO*

#### *A. Observación de fondo de ojo, tipo de variable nominal.*

Se clasificará como fondo de ojo normal (-) sin cambios en cavidad vítrea, retina o a nivel del epitelio pigmentado de retina, considerando los hallazgos del grupo control normal; leve (+) con discretos cambios de coloración de las estructuras anteriormente mencionadas; moderado (++) con severa cambios de coloración y atrofia de los tejidos anteriormente mencionados; grave (+++) con imposibilidad de evaluar clínicamente el nervio óptico y el resto de la retina similar a los hallazgos de fondo de ojo del grupo con inflamación inducida por *M. bovis* BCG.

*B. Medición de 8-OHdG (8 hidroxí-desoxi-guanosina) y VEGF por inmunohistoquímica, y qRT-PCR, tipo de variable continúa.*

- 8-OHdG  
8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) se medirá utilizando la técnica de inmunohistoquímica para 8-OHdG utiliza el anticuerpo monoclonal (clone N45.1)
- VEGF  
Factor de crecimiento endothelial vascular, se medirá utilizando la técnica de reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativo (qRT-PCR). Ésta técnica se usa para amplificar y cuantificar el DNA del VEGF.

#### *Detalle de maniobras y método*

Se cultivó la cepa de *M. bovis* BCG en 50 ml de medio de cultivo midlebroock 7H9 enriquecido con ADC en agitación a 37 °C durante 2-4 semanas hasta obtener la fase logarítmica de crecimiento. El cultivo se cosechó y centrifugó a 3000 rpm por 30 min a 4°C. Luego, la pastilla se resuspendió y se lavó dos veces con SSB. Posteriormente, la carga bacilar se cuantificó por las unidades formadoras de colonia (UFC) en placas de medio de cultivos sólido. Posteriormente las bacterias se lisaron por calor a 80°C.

Se utilizaron  $5 \times 10^6$  UFC de *M. Bovis* BCG en 50  $\mu$ l de solución salina balanceada. Ésta se inyectó utilizando una jeringa de insulina con una aguja 30G. La aplicación se realizó a 2mm del limbo de forma tangencial hacia el nervio óptico. En los conejos control se inyectó 50  $\mu$ l de solución salina balanceada. Los animales se sacrificaron a los días 7, 15, 30, 45 y 60. En dichos tiempos se realizó una evaluación clínica. Se enuclearon los ojos y se procesaron para análisis histológico. Además se tomaron muestras de humor vítreo las cuales se almacenaron a -20°C.

Después de la enucleación, el globo ocular se fijó en formalina neutra al 10%. Se realizaron cortes anteroposteriores en sentido vertical. Se procedió a la deshidratación del tejido en alcoholes graduales del 60 al absoluto, y posteriormente el ojo se incluyó en parafina. Se realizaron cortes seriados de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, se desparafinó y se teñó con hematoxilina-eosina y Ziehl-Neelsen.

Por separado, se realizó cortes seriados de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, se desparafinó el tejido y se montó sobre un portaobjeto recubierto con poli-L-Lisina. La laminilla se calentó en un horno de microondas durante 10 minutos y luego el tejido se trató con suero normal de conejo. A continuación se incubó con el anticuerpo monoclonal N45.1 anti-8-OHdG y anti VEGF, seguido por la adición del anticuerpo secundario anti-IgG de ratón de conejo marcado con biotina. La peroxidasa endógena se bloqueó con peróxido de hidrógeno al 3 % durante 30 minutos. Posteriormente, la laminilla se lavó con amortiguador Tris-HCl 50 mM (pH 8.0) y el complejo antígeno anticuerpo se reveló usando un sistema de detección de peroxidasa streptavidina-horseradish con diaminobenzidina como cromógeno.

Para la medición de VEGF por qRT-PCR, se descongelaron las muestras de humor vítreo y se procesaron de acuerdo al protocolo por ROCHE. Previamente, se habían clonado los primers de VEGF.

### *Recolección y análisis de datos*

La recolección de datos se realizará por medio del programa Excell®; y el análisis estadístico se hará a través del programa Epidat.

Los datos obtenidos de dichos experimentos serán analizados de acuerdo a la normalidad de los datos y se agruparan en medidas de tendencia central y de dispersión (media y desviación estándar o mediana y cuartiles). Los grupos serán comparados buscando diferencias con base en ANOVA. En el caso de no tener una distribución normal se utilizará Kruskal-Wallis y Friedman. El valor de significancia estadístico en todos los casos será de  $P < 0.05$ .

### *Aspectos éticos*

El cuidado y manejo de los animales se realizará de acuerdo a los estatutos de ARVO (American Research For Vision and Ophthalmology) y las especificaciones técnicas para el cuidado de la producción y usos de animales de laboratorio descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062- ZOO-1999. Previa a la experimentación los animales se aclimataran al menos por 7 días. Un conejo por jaula será acondicionado a una temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con un ciclo de iluminación alternante de 12 horas día/noche y suministro libre de agua y alimento.

Previo al tratamiento los conejos serán sedados vía intramuscular con acepromacina (3 mg/kg), anestesiados vía intramuscular con zoletil 100 (tiletamina 250mg/ zolazepam 250 mg) a la dosis de 16 mg/kg y luego se aplicará vía tópica una gota de solución de tetracaina oftálmica (5 mg/ml). Para valorar el grado de anestesia se realizará la prueba de reflejo corneal trigémino por la contractura palpebral con un cierre del parpado con menos de 1 mm. Se utilizará una pinza de 0.12 con dientes para generar el estímulo sobre la superficie ocular, tocando el limbo esclero corneal. Los procedimientos experimentales serán realizados en condiciones asépticas utilizando el material quirúrgico y de protección estéril.

Antes y después de la administración intraocular de los compuestos se aplicara vía tópica una gota de tobramicina oftálmica (3 mg/ml). Al final del estudio los animales serán sacrificados con una sobre dosis del anestésico pentobarbital sódico (0.36mg/kg) vía intravenosa comprobando la muerte de los animales a través del latido cardiaco, frecuencia respiratoria, estimulaciones y en caso de ser necesario con pequeño corte en el cojinete plantar que demuestre que no hay sangrado. Además, en este procedimiento solo estarán presentes los grupos de animales que serán sacrificados al mismo tiempo.

Los desechos biológicos, materiales punzo cortantes, entre otros, serán manejados y eliminados de acuerdo con la Norma NOM-087-ECOL-94, así como a la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente. El procedimiento y manejo de los animales estará bajo la responsabilidad de un Médico Veterinario Zootecnista.

## 7. Resultados

### *Características clínicas*

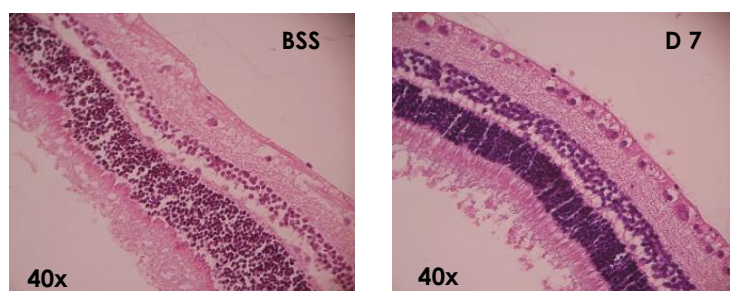
Se examinaron los ojos enucleados a diferentes tiempos, día 7, 15, 30, 45, 60. Se observó desde el día 7 post inyección, una dilatación de los vasos retinianos. Además, la presencia intravítrea de material fibrinoide, desde el día 30. La cantidad de tejido fibrinoide aumentó desde este día hasta la finalización del experimento. Dicho material imposibilitó la valoración clínica de las estructuras retinianas. **Figura 1**

**Figura 1.** *Características clínicas.* Desde el día 15 se observe la dilatación de vasos retinianos. La presencia de material fibroso se observó en cavidad vítrea desde el día 30.

### *Características histológicas*

Desde el procesamiento de los tejidos se encontró un engrosamiento macroscópico de la retina. Una vez procesado el tejido, se observó desde el día 7 la presencia de infiltrado mononuclear crónico de tipo linfocito, con varios grados de apoptosis, sin embargo se conservó la organización de las capas retinianas. Para el día 15, la retina presentó una desorganización importante, caracterizada por la presencia de gliosis. En este tiempo, la coroides presentó un

engrosamiento destacado. Además, destaca la presencia de neovasos intraretinianos desde el día 15. **Figura 2**

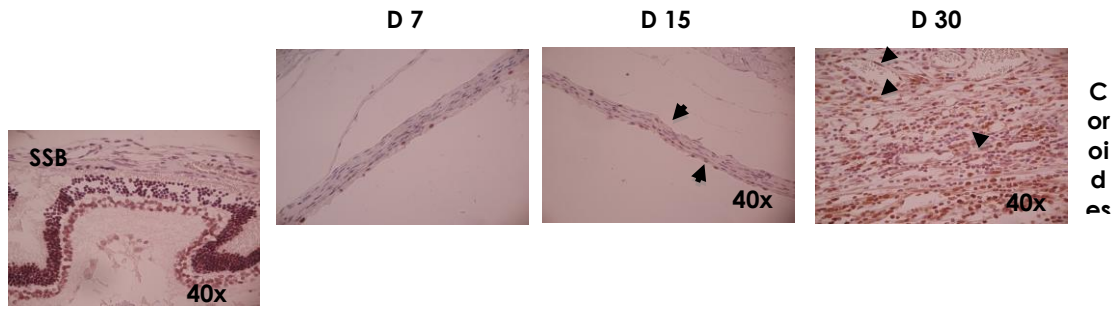


**Figura 2.** Características histológicas. Se muestran los tejidos a 40X, en donde el al día 7 se aprecia el tejido retiniano infiltrado por linfocitos. Para el día 15 hay una marcada gliosis y desorganización anatómica.

#### *La inyección intravítrea de M. Bovis BCG, induce estrés oxidativo*

La presencia de 8-OHdG, un marcador de daño al ácido desoxirribonucleico inducido por estrés oxidativo, se mostró a través de análisis inmunohistoquímico. Las células del epitelio pigmentario de la retina presentaron positividad desde el día 7; dicha señal se presentó en células aisladas. Sin embargo, para el día 15, la señal presentó una marcada positividad tanto en las capas externas de la retina como las internas, así como en algunas células de tipo epitelioide en la capa de la plexiforme interna, y en las células fusiformes de la coroides.

Interesantemente, para el día 30, la señal de positividad disminuyó, probablemente debido a la gran apoptosis presente en el tejido. **Figura 3**

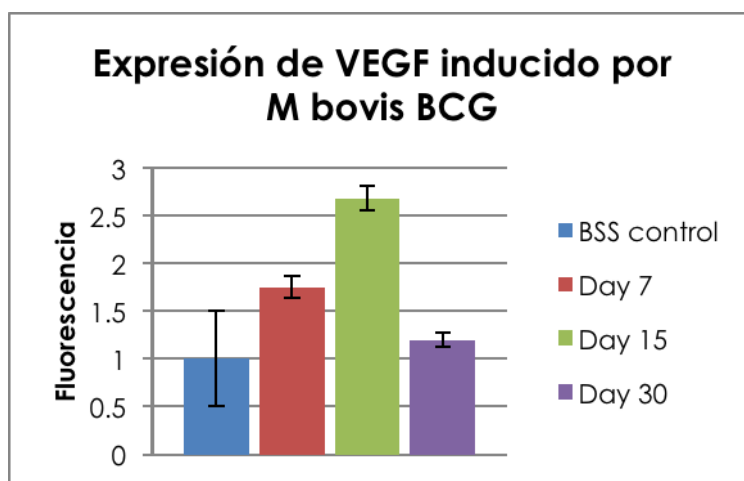


**Figura 3.** Presencia de 8-OHdG en retina y coroides. Las flechas destacan las células positivas para 8-OHdG. La señal es más positiva en el día 15.

*La inflamación crónica inducida por M. bovis BCG induce VEGF*

A través de la tecnología de reacción en cadena de proteínas en tiempo real cuantitativa, se logró valorar la presencia del factor de crecimiento endotelial vascular en tejido de retina y coroides. Éste factor se produjo durante los primeros 15 días post inyección. A partir de este punto en el tiempo, comienza a disminuir la cantidad de VEGF detectada. Estos datos son estadísticamente significativos  $p \leq 0.05$ . **Figura 4.**





**Figura 4.** Expresión de VEGF en el complejo retina-coroides inducida por *M. bovis* BCG .

## 8. Discusión

La respuesta inmuno inducida por los antígenos de la pared de *M. bovis* BCG, es capaz de inducir una vasculitis a nivel retiniano desde el día 7 post inyección. Esta respuesta inflamatoria induce daño a través de ROS solo en escasas células de retina y coroides, sin embargo desde este punto comienza la presencia de VEGF por estas células.

Al día 15, histológicamente se observó, la presencia de neovasos, este dato se correlacionó con el pico de VEGF detectado por qRT-PCR. Además en este punto el daño por estrés oxidativo llega a su máximo.

Para el día 30, hay una apoptosis en los tejidos retinianos y coroides por lo que se espera no existan células que produzcan VEGF, así como ausencia de núcleos que sean positivos para 8-OHdG.

## 9. Conclusión

La inoculación intravítrea de antígenos de la pared de *M. bovis* BCG induce una respuesta inflamatoria crónica de tipo linfocítico, el cual a través de citoquinas, induce estrés oxidativo a las células de retina y coroides, siendo el estrés máximo al día 15. Además los antígenos de *M. bovis* BCG induce VEGF, coincidiendo el punto máximo al día 15. En tiempos posteriores hay presencia de apoptosis en los tejidos por lo que los marcadores dejan de ser detectados.

## 10. Bibliografía

1. Jousseaume AM, *et al.* Leukocyte-mediated endothelial cell injury and death in the diabetic retina. *Am J Pathol.* 2001; 158:147-52.
2. Antonetti DA, *et al.* Molecular mechanisms of vascular permeability in diabetic retinopathy. *Semin Ophthalmol.* 1999; 14:240-8.
3. Wilkinson-Berka JL. Vasoactive factors and diabetic retinopathy: vascular endothelial growth factor, cyclooxygenase-2 and nitric oxide. *Curr Pharm Des.* 2004; 10:3331-48.
4. Ryll R, *et al.* Immunological properties of trehalose dimycolate (cord factor) and other mycolic acid-containing glycolipids--a review. *Microbiol Immunol.* 2001; 45:801-11.
5. Sakaguchi I, *et al.* Trehalose 6,6'-dimycolate (Cord factor) enhances neovascularization through vascular endothelial growth factor production by neutrophils and macrophages. *Infect Immun.* 2000; 68:2043-52.
6. Saita N, *et al.* Trehalose 6,6'-dimycolate (cord factor) of *Mycobacterium tuberculosis* induces corneal angiogenesis in rats. *Infect Immun.* 2000; 68:5991-7.
7. Bulut Y, *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* heat shock proteins use diverse Toll-like receptor pathways to activate pro-inflammatory signals. *J Biol Chem.* 2005; 280:20961-7.
8. Sinha A, *et al.* Impaired generation of reactive oxygen species during differentiation of dendritic cells (DCs) by *Mycobacterium tuberculosis* secretory antigen (MTSA) and subsequent activation of MTSA-DCs by mycobacteria results in increased intracellular survival. *J Immunol.* 2006; 177:468-78.
9. Yuk JM, *et al.* Role of apoptosis-regulating signal kinase 1 in innate immune responses by *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Immunol Cell Biol.* 2009; 87:100-7.

10. Lee SB, Schorey JS. Activation and mitogen-activated protein kinase regulation of transcription factors Ets and NF-kappaB in Mycobacterium-infected macrophages and role of these factors in tumor necrosis factor alpha and nitric oxide synthase 2 promoter function. *Infect Immun.* 2005; 73:6499-507.