

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Licenciatura en Biología

*“ANÁLISIS POR WESTERN BLOT DEL EFECTO DEL FACTOR DE CRECIMIENTO
ENDOTELIAL VASCULAR SOBRE LA VASOPERMEABILIDAD RETINIANA”*

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta

Daniela Granados Carrasco

Dirigido por

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.

Santiago de Querétaro, Qro. México

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES

Licenciatura en Biología

*“ANÁLISIS DE LA VASOPERMEABILIDAD RETINIANA INDUCIDA POR EL FACTOR
DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR MEDIANTE WESTERN BLOT”*

T E S I S

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de

LICENCIADO EN BIOLOGÍA

Presenta

Daniela Granados Carrasco

Exp. 253212

Dirigido por

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L.

Director

Firma

M. en C. Elva Hortencia Adán Castro

Codirector

Firma

Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos

Sinodal

Firma

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Sinodal

Firma

Dr. Fausto Arellano Carbajal

Sinodal

Firma

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Molecular del Departamento de Neurobiología Celular y Molecular en el Instituto de Neurobiología (INB) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) Campus Juriquilla Querétaro, Qro., bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez L. y de la M. en C. Elva Hortencia Adán Castro con el financiamiento de CONACYT (S0008-FONSEC SSA/IMSS/ISSSTE 289568)

Dirección General de Bibliotecas UAQ

RESUMEN

La vasopermeabilidad (VP) es una propiedad intrínseca del endotelio vascular que permite el transporte, la regulación e intercambio de nutrientes, agua y gases entre los tejidos y la sangre. El endotelio vascular tiene la función de barrera semipermeable que controla la salida de proteínas al intersticio celular, mientras que la fuga anormal de proteínas y fluido plasmático caracteriza a diversas patologías como aquellas que comprometen la visión y que incluyen a la retinopatía diabética y el edema macular diabético. El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los principales promotores del incremento de la VP en la retina. La VP de la retina comúnmente se evalúa por colorimetría a través de la extravasación de albúmina unida al colorante azul de Evans administrado intravascularmente. En este trabajo, investigamos un método alternativo que se basa en determinar la concentración de albúmina en la retina mediante Western blot. Ratas macho de la cepa Wistar se inyectaron de manera intravitrea con VEGF (300-600ng/3 μ l/ojo) o vehículo (PBS) y 24 horas después se realizó el ensayo azul de Evans o el análisis por Western blot de extractos de retinas en combinación o no de un paso previo de inmunoprecipitación (IP). El método de azul de Evans registró un aumento en la VP 2.54 veces mayor en las retinas tratadas con VEGF que en las no tratadas. El análisis por IP-Western blot y Western blot directo mostraron aumentos de 1.83 y 2.46 veces de la VP por efecto del VEGF, respectivamente. Nuestros resultados indican que el análisis por Western blot de los niveles de albúmina es efectivo para determinar la VP retiniana. Esta técnica, a diferencia del azul de Evans, requiere menos tiempo y permite utilizar las mismas muestras para la determinación de otros parámetros.

Palabras clave: Vasopermeabilidad, retina, albúmina, VEGF, Western blot.

SUMMARY

Vascular permeability (VP) is an intrinsic property of the capillary wall that enables the transport, regulation, and exchange of gases and nutrients between tissues and blood. The endothelium is a semipermeable barrier that regulates the outflow of proteins to the cellular interstitium, whereas the abnormal leakage of proteins and plasma fluid characterizes pathologies such as diabetic retinopathy and diabetic macular edema that compromise vision. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the main molecules that increase the VP in the retina. The VP of the retina has been conventionally evaluated by the levels of albumin linked to Evans blue dye intravascular injection. In this work we investigated an alternative method based on the Western-blot evaluation of albumin in retinal extracts. Male rats of the Wistar strain were injected intravitreally with VEGF (300-600ng/ 3 μ l/eye) or vehicle (PBS) and 24 hours later the Evans blue test was performed, or the retinas were evaluated by Western blot with or without a previous immunoprecipitation (IP) step. The Evans blue method showed a 2.54-fold increase in VP in retinas treated with VEGF vs. PBS. IP-Western blot and Western blot revealed fold-increments of 1.83 and 2.46, respectively. Our findings indicate that the Western blot evaluation of albumin levels is an efficient method for measuring retinal VP. This technique, relative to the Evans blue method, consumes less time and allows the use of the same samples for evaluation of other parameters.

Key words: Vasopermeability, retina, albumin, VEGF, Western blot.

Agradecimientos

Agradezco a la Dra. Carmen Clapp, por abrirme las puertas de su laboratorio.

Agradezco infinitamente a mi codirectora, la M. en C. Elva Adán por ser mi maestra en cada paso de este proyecto, por su paciencia y apoyo.

Agradezco a mis asesores por su tiempo y disponibilidad.

Agradezco al Instituto de Neurobiología (INB), al personal del laboratorio de Endocrinología Molecular (A-14), Nut. Fernando López Barrera y la Dra. Xarubet Ruiz Herrera por su ayuda y asistencia técnica; así como a Daniel Mondragón y Antonio Padro Galán, al personal del Bioterio del INB el MVZ. José Martín García Servín y la Dra. Alejandra Castilla León.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	12
2.1 Características de la vasculatura y la vasopermeabilidad	12
2.2 Vasopermeabilidad retiniana.....	16
2.3 Factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF.....	19
2.4 Métodos utilizados para la evaluación de la vasopermeabilidad	21
2.4.1 Ensayo in vivo azul de Evans.....	21
2.4.2 Fluorangiografía.....	21
2.4.3 Isótopos radioactivos.....	22
2.4.4 Inmunoprecipitación (IP)-Western blot de albúmina exógena marcada con biotina.....	22
3. JUSTIFICACIÓN.....	22
4. HIPÓTESIS.....	23
5. OBJETIVOS.....	23
5.1 Objetivo general.....	23
5.2 Objetivos particulares.....	23
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
6.1 Animales.....	24
6.2 Administración intravítrea de VEGF.....	24
6.3 Evaluación del incremento de la vasopermeabilidad mediante fluorangiografía	25
6.4 Ensayo <i>in vivo</i> azul de Evans.....	25
6.5 Inmunoprecipitación (IP)- Western blot de albúmina de lisados de retina.....	26
6.6 Western-blot de albúmina de lisados de retina.....	26
6.7 Análisis estadístico.....	27
7. RESULTADOS.....	28

7.1 La inyección intravítrea de VEGF incrementó la vasopermeabilidad retiniana evaluada mediante microscopía de campo claro y fluorangiografía.....	28
7.2 El VEGF incrementó significativamente la vasopermeabilidad retiniana cuantificada mediante el ensayo azul de Evans.....	31
7.3 El análisis por IP-Western blot de albúmina mostró el incremento de la vasopermeabilidad retiniana debido al VEGF.....	32
7.4 El análisis por Western blot sin IP mostró el incremento de la vasopermeabilidad retiniana debido al VEGF.....	33
8. DISCUSIÓN.....	34
9. CONCLUSIONES.....	36
10. REFERENCIAS.....	38

Dirección General de Bibliotecas UAQ

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de la estructura de los vasos sanguíneos.....	13
Figura 2. Morfología de los capilares.....	14
Figura 3. Principales uniones y moléculas célula-célula.....	16
Figura 4. Estructura del ojo humano y la retina.....	18
Figura 5. Esquema del diseño experimental.....	28
Figura 6. Montajes planos de retina.....	30
Figura 7. Ensayo <i>in vivo</i> de azul de Evans.....	31
Figura 8. IP-Western blot de albúmina.....	32
Figura 9. Western blot de albúmina	33

1. INTRODUCCIÓN

La vasopermeabilidad (VP) es una propiedad intrínseca del sistema vascular que hace posible el transporte, la regulación e intercambio de nutrientes y de agua entre los tejidos y la sangre (Bates, 2010). El sistema vascular comprende una amplia red de vasos sanguíneos organizados en venas, arterias y capilares conformados por células endoteliales (Nidavani et al., 2014). Estas células están en contacto con la sangre y realizan una función de barrera que permite contener al plasma sanguíneo dentro de la luz vascular, a la vez que permite el intercambio de agua, gases y el transporte de nutrientes y desechos celulares. Las propiedades del endotelio cambian de acuerdo a los requerimientos del tejido u órgano y su permeabilidad está determinada en gran medida por el tipo de sus uniones celulares (Bharadwaj et al., 2013) y factores vasoactivos o estimuladores de la VP que incluyen hormonas, factores de crecimiento, citocinas y óxido nítrico (NO) (Claesson, 2015).

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es uno de los principales estimuladores de la VP a través de promover la apertura de las uniones entre las células endoteliales (Claesson, 2015). La sobreproducción de VEGF promueve el aumento de la VP el cual caracteriza a diversas patologías entre las que destacan las retinopatías debidas a la diabetes como el edema macular diabético y la retinopatía diabética (Gardner & Antonetti, 2008). El estudio experimental de estas patologías se basa en el establecimiento de métodos confiables y eficientes para valorar los cambios en la VP de la retina.

Uno de los métodos convencionales para evaluar la VP es el ensayo *in vivo* del azul de Evans, un colorante que al ser administrado de manera sistémica se une irreversiblemente a las proteínas del plasma, entre las que sobresale la albúmina por ser la más abundante. La detección del colorante en el tejido es un indicador de la extravasación de albúmina y, por ende, del incremento de la VP (Saunders et al., 2015). Sin embargo, el procedimiento de extracción de la albúmina unida al colorante, impide evaluar otros parámetros capaces de influir sobre la VP en las mismas muestras (por ejemplo, la transcripción y traducción de proteínas involucradas). Para resolver esta limitante, se ha propuesto la cuantificación de la albúmina extravasada en los tejidos como marcador de la VP, mediante los inmunoensayos ELISA o inmunoprecipitación-Western blot (Trichonas et al., 2010) o Western blot sin el

paso previo de inmunoprecipitación (Lin et al., 2011; Liu et al., 2012). Sin embargo, existen discordancias acerca de la necesidad de perfundir o no al animal antes de obtener los tejidos. Aunque se ha reportado que se debe perfundir al animal previamente (Lin et al., 2011) con la finalidad de eliminar el exceso de albúmina sérica presente en los vasos y poder discernir de la proteína extravasada, otros estudios no utilizan este procedimiento (Liu et al., 2012).

Este trabajo de tesis compara la eficacia de la determinación de albúmina extravasada en la retina por los métodos de azul de Evans y Western blot. Además, evalúa el posible beneficio de utilizar o no la inmunoprecipitación de la albúmina como paso previo al Western blot. Los hallazgos apoyan el análisis por Western blot, sin necesidad de inmunoprecipitación previa, de los niveles de albúmina como índice de VP en la retina y, por ende, lo apoyan como método eficaz para el estudio de posibles factores regulatorios de dicha VP en las mismas muestras.

2. ANTECEDENTES

2.1 Características de la vasculatura y la vasopermeabilidad

El sistema vascular es el encargado del transporte de nutrientes, intercambio de gases (oxigenación) y la eliminación de productos de desecho celular y metabólico de los tejidos para mantener la homeostasis del organismo (Alkadhim et al., 2015; Pugsley & Tabrizchi, 2000). Esto es posible gracias a una extensa red de vasos sanguíneos que se organizan en arterias, venas y capilares (Nidavani et al., 2014). Las arterias transportan sangre oxigenada desde el corazón hasta los tejidos, mientras que las venas llevan sangre poco oxigenada en dirección del corazón. Los capilares son los vasos sanguíneos más delgados donde tiene lugar el intercambio de oxígeno, nutrientes y desechos entre los tejidos y la sangre, por lo que se les considera el lecho vascular más importante del sistema vascular (Hayreh, 2015).

La estructura de los vasos sanguíneos es importante para su función, ya que constituyen tubos flexibles y adaptables a los requerimientos fisiológicos de cada tejido (Aird, 2012). Los vasos sanguíneos están constituidos por tres capas o paredes llamadas túnica íntima, media y externa. La túnica íntima corresponde a una capa de células endoteliales que reviste directamente la luz o lumen del vaso donde circula la sangre. La túnica media se compone principalmente por células del músculo liso así como por láminas de elastina que dependiendo de las necesidades fisiológicas, ayudan a controlar la dinámica circulatoria mediante la vasoconstricción o la vasodilatación. Por su parte la túnica externa está formada por fibras de colágeno, fibras nerviosas, vasos linfáticos y venas que se encargan de nutrir los tejidos circundantes. Los capilares carecen de las túnicas media y externa y sólo están conformados por una capa de células endoteliales, una membrana basal, y células contráctiles denominadas pericitos (Figura 1) (Blaisdell & Anthony, 1969)

Las células endoteliales se unen formando una monocapa sobre la membrana basal y exponen su lado apical hacia el flujo sanguíneo, por lo que son las encargadas de formar una barrera dinámica, semipermeable y altamente selectiva entre los tejidos y la sangre (Claesson, 2015). El endotelio regula la permeabilidad vascular (Laurent, 2002) que es fundamental para la homeostasis de los tejidos (Pugsley & Tabrizchi, 2000). No obstante, para la correcta circulación sistémica, los vasos están sometidos a propiedades hemodinámicas como el flujo,

la presión y la resistencia (Nidavani et al., 2014) y se adaptan a través de cambios en la vasoconstricción (disminución del diámetro de la luz) y la vasodilatación (aumento del diámetro de la luz) que afectan la vasopermeabilidad (Bharadwaj et al., 2013).

La vasopermeabilidad también depende de la morfología de los capilares, estos se clasifican en continuos, fenestrados y sinusoidales (Figura 2). Los continuos (característicos de las barreras hematorretiniana y hematoencefálica) forman paredes unidas por uniones celulares estrechas o apretadas (“tight junctions”) que evitan el tránsito libre de moléculas pequeñas al intersticio (Blaisdell & Anthony, 1969). Por el contrario, los capilares sinusoidales (abundantes en hígado, médula ósea y bazo) son escasos en uniones estrechas lo que permite la salida de moléculas de gran tamaño y de células de la sangre al tejido. El endotelio de los capilares fenestrados (frecuentes en glándulas endócrinas), tiene poros pequeños pero altamente permeables a fluidos y moléculas pequeñas (Blaisdell & Anthony, 1969; Pugsley & Tabrizchi, 2000).

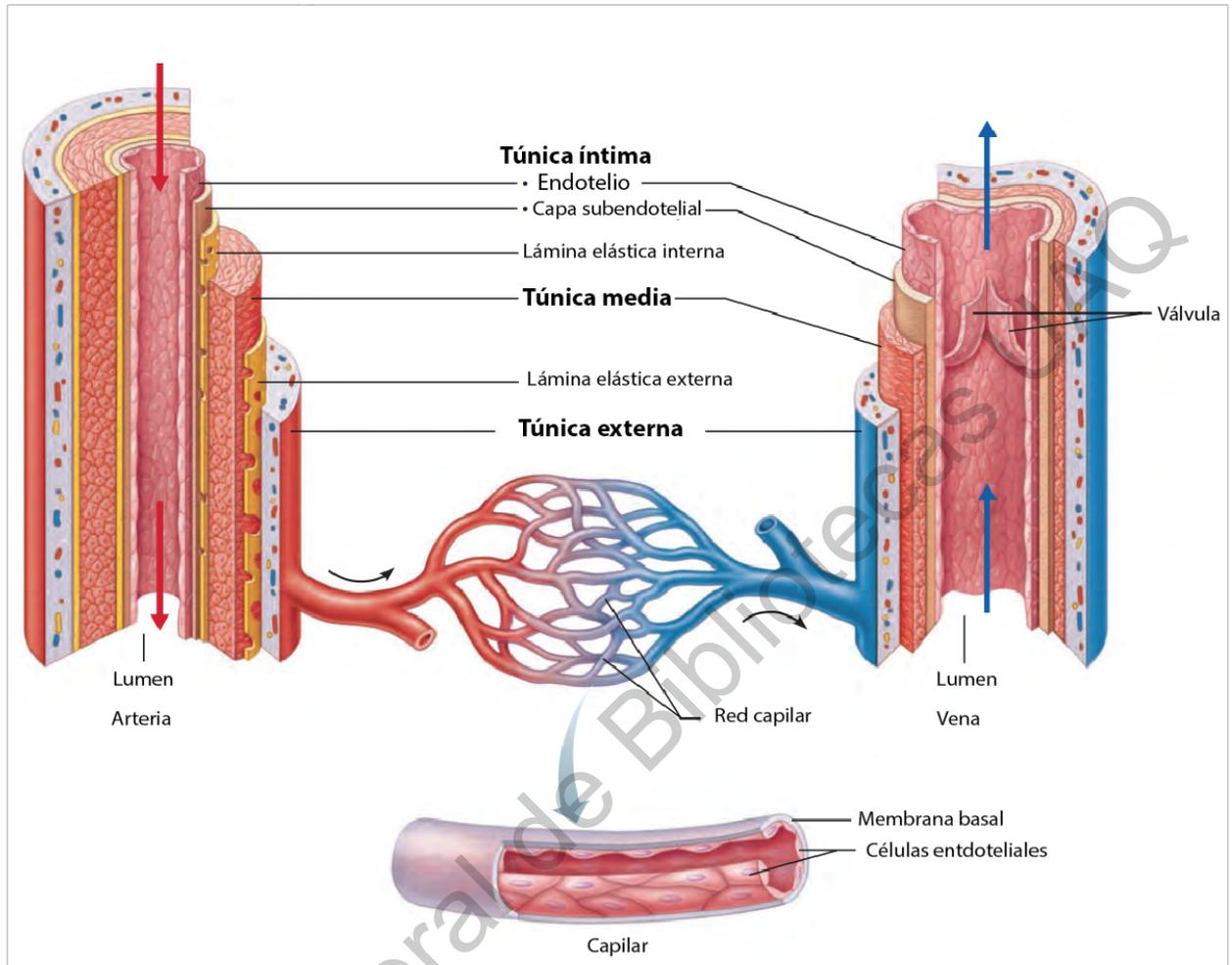


Figura 1. Esquema que muestra la estructura de los vasos sanguíneos (arterias, venas y capilares). Se muestran las 3 capas: Túnica íntima, túnica media y túnica externa que rodean el lumen de venas y arterias. Mientras que los capilares sólo cuentan con un recubrimiento de células endoteliales y la membrana basal (modificada de Blaisdell & Anthony, (1969)).

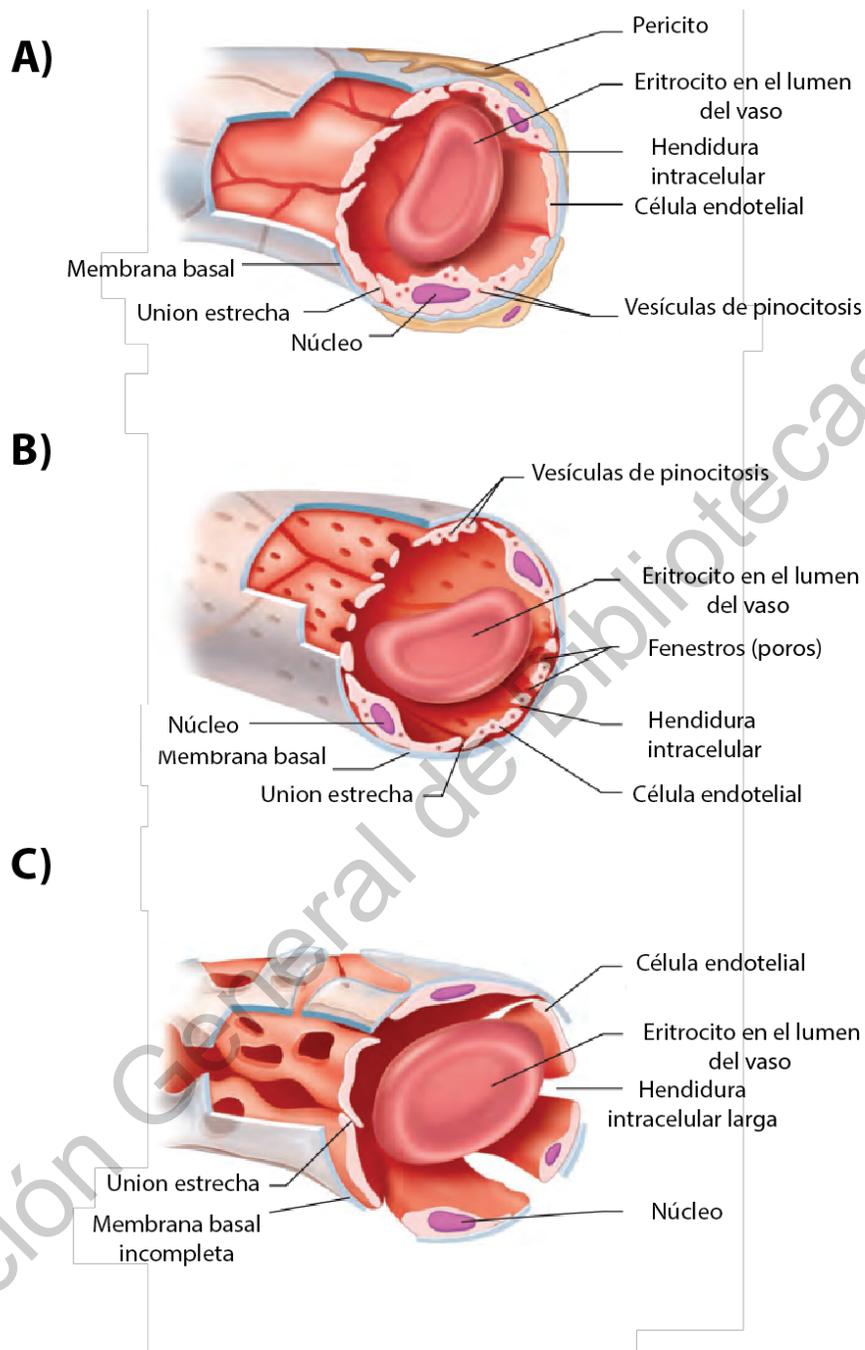


Figura 2. Esquema representativo de la morfología de los capilares a) continuos, b) fenestrados y c) no fenestrados (modificada de Blaisdell & Anthony, (1969)).

La permeabilidad vascular ocurre de manera basal por difusión, un tipo de transporte pasivo que permite el fácil intercambio de solutos y moléculas menores a 40 kDa entre la sangre y

el líquido intersticial (Claesson, 2015). Los solutos y proteínas del plasma de alto peso molecular como la albúmina y las globulinas, requieren un transporte activo transendotelial (a través de endocitosis vesicular) o a través de interrupción de las uniones entre las células endoteliales (Laurent, 2002).

El transporte activo transendotelial o transcitosis ocurre a través de la formación de canales transendoteliales a partir de vesículas o vacuolas (organelo vesículo vacuolar; VVO), las vesículas atraviesan a la célula endotelial y se fusionan con la membrana plasmática del lado opuesto de la célula para descargar las macromoléculas al intersticio (Aird, 2012; Dvorak et al., 1996). El mecanismo a través de las uniones entre células endoteliales involucra su rompimiento transitorio para permitir la extravasación de los solutos o proteínas (Aird, 2012). Hay tres tipos de uniones células-célula: las uniones estrechas o apretadas (“tight junctions”), las uniones adherentes (“adherens junctions”) y las uniones comunicantes (“gap”). Las principales proteínas que conforman las uniones estrechas son las claudinas, las ocludinas y las moléculas de adhesión JAMs (“Junctional Adhesion Molecules”). Las uniones adherentes vasculares se conforman por una proteína transmembranal llamada cadherina vascular (Figura 3) (Chistiakov et al., 2015). Por su parte las conexinas son las proteínas que se encuentran mediando la unión célula-célula en las uniones comunicantes. (Bazzoni & Dejana, 2004)

La permeabilidad mediada por las uniones estrechas y uniones adherentes, puede ser afectada por estímulos como el incremento en el flujo y presión sanguíneas que conduce a la vasodilatación generando una distensión endotelial que favorece la desintegración de dichas uniones y que ocurre en respuesta a factores vasoactivos como son el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la histamina y la bradicinina (Claesson, 2015). Sin embargo, el incremento en la permeabilidad vía la interrupción de las uniones estrechas es transitoria bajo condiciones fisiológicas y después del intercambio de las macromoléculas, las uniones se cierran nuevamente (Van Itallie & Anderson, 2004). En situaciones donde es necesaria la remodelación de la vasculatura y el crecimiento de los tejidos como durante el ciclo reproductor femenino (en el crecimiento del endometrio durante la fase folicular del ciclo) o en el desarrollo embrionario y fetal, las uniones entre las células endoteliales permanecen abiertas y resultan en un incremento crónico de la permeabilidad vascular. (Bates, 2010;

Claesson, 2015). También diversas patologías se caracterizan por una permeabilidad vascular excesiva e incluyen los infartos al miocardio, la artritis, el edema macular diabético y la retinopatía diabética (Nidavani et al., 2014).

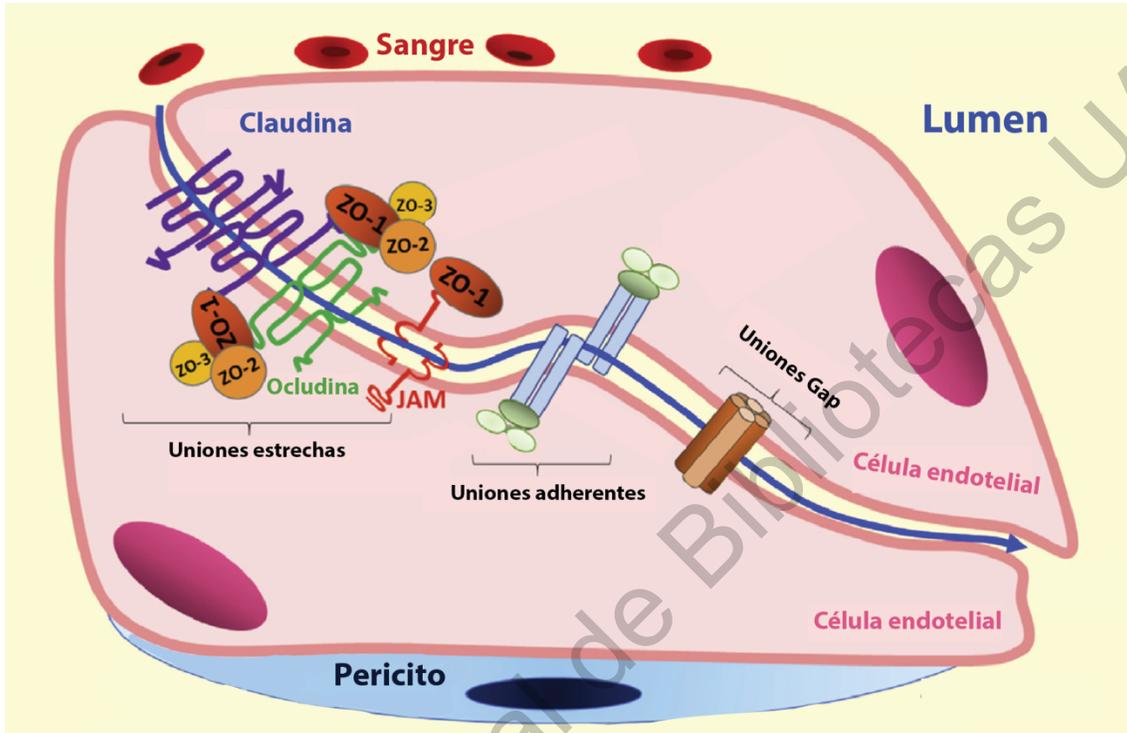


Figura 3. Esquema de las moléculas que intervienen en la interacción célula-célula en el endotelio vascular (modificada de Díaz-Coránguez et al. (2017)).

2.2 Vasopermeabilidad retiniana

El ojo es el órgano principal del sistema visual, con una anatomía y fisiología particulares que hacen posible la entrada de estímulos lumínicos que dan como resultado la percepción visual del entorno. Sin embargo, para que la visión sea posible, los estímulos lumínicos deben atravesar de forma sucesiva la córnea, el cristalino o lente y el vítreo hasta llegar a la retina. Estas estructuras deben mantenerse transparentes para maximizar la transmisión y la refracción de la luz. La retina es un tejido translúcido localizado en la parte posterior (interna) del ojo, que contiene a los fotorreceptores (conos y bastones) responsables de transducir los estímulos luminosos en impulsos nerviosos (Li et al., 2004). La retina es parte del sistema nervioso central y es el comienzo de la vía visual, ya que la luz o señales lumínicas que

recibe, son transformadas en potenciales eléctricos que viajan por el nervio óptico hacia el cerebro (Li et al., 2004).

La retina se encuentra anclada al epitelio pigmentado y a la coroides en la parte trasera del ojo y se mantiene en contacto con el segmento anterior ocular a través del vítreo, un gel avascular que contribuye a mantener la presión ocular, evita que el globo ocular colapse, absorbe impactos y mantiene a la retina en su posición (Sebag, 2014). Anatómicamente la retina se compone de nueve capas celulares que a partir del límite con el vítreo comprenden: una capa de fibras nerviosas que se integran para conformar el nervio óptico; la capa de neuronas ganglionares, la capa plexiforme interna que contiene neuronas denominadas bipolares y amácrinas; la capa nuclear interna constituida por los núcleos de las neuronas bipolares, amácrinas, horizontales y de las células gliales de Müller; la capa plexiforme externa formada por fibras nerviosas que provienen de los fotorreceptores y la capa nuclear externa conformada por los segmentos internos y externos de los conos y bastones. Finalmente, se encuentra el epitelio pigmentado (EP) que contiene el pigmento necesario para capturar y concentrar los estímulos de luz y que está en contacto con la coroides, una capa altamente vascularizada que nutre y oxigena a la capa de los fotorreceptores que es avascular (Figura 4) (Li et al., 2004).

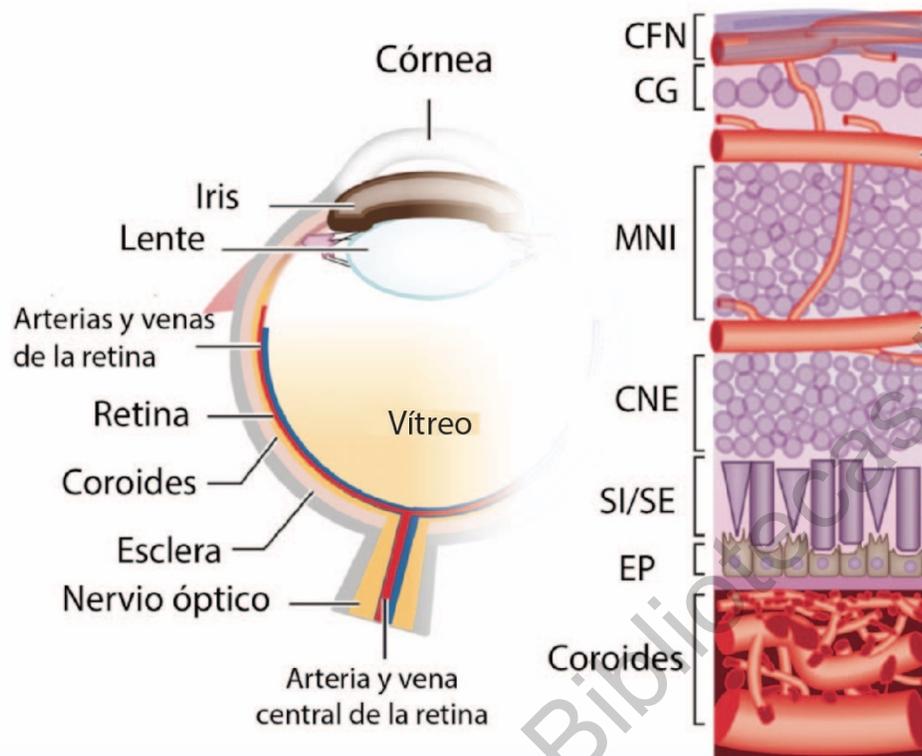


Figura 4. Esquema de la estructura ocular y de las capas que conforman a la retina: CFN, capa de fibras nerviosas; CG, células ganglionares; MNI, membrana nuclear interna; CNE capa nuclear externa; SI/SE, segmento interno y externo de los fotorreceptores; EP, epitelio pigmentado y coroides (modificada de Sun & Smith (2018)).

La retina es un tejido metabólicamente muy activo que demanda una gran cantidad de nutrientes y oxígeno pero que requiere de una distribución y densidad vascular que no obstaculice la función óptica (Bharadwaj et al., 2013). Para cubrir estos requerimientos, la retina recibe el suministro sanguíneo a través de dos vías: los capilares de la coroides (coriocapilares) que aportan oxígeno y nutrientes a los fotorreceptores por difusión a través del epitelio pigmentario y los capilares derivados de la arteria central oftálmica asociada al nervio óptico que irrigan las capas interiores de la retina (membrana nuclear interna, la capa plexiforme interna y la capa de células ganglionares) (Sun & Smith, 2018).

Los capilares retinianos están formados por una membrana basal y una pared endotelial que se distingue por la falta de fenestros y complejas uniones estrechas que ejercen un alto grado de control sobre la permeabilidad de los fluidos y solutos (Kaur, Foulds, & Ling, 2008). El rompimiento de estas uniones estrechas da como resultado el incremento de la permeabilidad

que conduce a una variedad de patologías retinianas caracterizadas por la fuga y acumulación de líquido plasmático en el tejido neural de la retina; afectando la calidad visual e incluso, pueden causar ceguera irreversible (Sun & Smith, 2018).

En particular el edema macular diabético y la retinopatía diabética no proliferativa, se caracterizan por una VP excesiva que produce oclusión vascular disminuyendo el flujo sanguíneo y generando zonas de hipoxia. La hipoxia estimula la producción de moléculas como el VEGF que además de promover el incremento de la vasopermeabilidad, estimula la proliferación vascular (angiogénesis) en estados avanzados de la patología, lo que puede conducir a la ceguera debido al desprendimiento de la retina por tracción (Bates, 2010; Frank, 2015; Gardner & Antonetti, 2008). Por lo que es clara la importancia de contar con métodos adecuados para estudiar los cambios en la regulación de la VP de la retina.

2.3 Factor de crecimiento endotelial vascular o VEGF

La vasopermeabilidad endotelial participa en la regulación de múltiples procesos entre los que destacan la coagulación y la inflamación (Laurent, 2002). El VEGF es un importante factor trófico paracrino y endócrino de las células endoteliales y es el principal factor promotor de la vasopermeabilidad (Alon et al., 1995). Se produce bajo condiciones de hipoxia e inflamación en respuesta al factor inducible por hipoxia (HIF-1) (Nidavani et al., 2014) y la acción de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 β (IL-1 β), el factor de necrosis tumoral α (TNF α) (Bates, 2010; Claesson, 2015).

El VEGF fue descubierto a comienzos de 1980 y se denominó factor de la permeabilidad vascular (VPF) debido a que incrementaba la extravasación de proteínas plasmáticas (Senger et al., 1983). Posteriormente se identificó su estructura y su función tanto como estimulador de la VP (Keck et al., 1989) como de la angiogénesis (Leung, et al., 1989).

El VEGF comprende una familia de proteínas de 40 kDa de masa molecular que son producto de 5 genes independientes: el VEGF-A (o VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y el factor de crecimiento placentario (PlGF) (Bates, 2010). El VEGF-A se considera el principal regulador de la angiogénesis y la vasopermeabilidad. Induce fenestros en el endotelio, extravasación mediante la formación de organelos vesiculo-vacuolares y modificación de las

proteínas que forman las uniones estrechas (VE-cadherinas y ocludinas) (Takahashi & Shibuya, 2005).

En la retina el VEGF es producido y secretado por 5 tipos celulares diferentes: las células del epitelio pigmentado, los astrocitos, las células de Müller y las células ganglionares. En cuanto a su receptor (VEGFR) se han encontrado 2 isoformas VEGFR-1 y VEGFR-2 expresadas por neuronas, células gliales y endotelio en la retina humana (Penn et al., 2008).

El VEGF actúa por medio de la unión a sus receptores VEGFR-1 y VEGFR-2 (ambos expresados en las uniones endoteliales vasculares), dicha unión conduce a la dimerización del receptor y lleva a la iniciación de cascadas de señalización que derivan en la movilización intracelular de calcio, en la activación de las cinasas activadas por mitógeno (MAPK), del sistema PI3K/ AKT y de la producción de óxido nítrico endotelial. La movilización de calcio intracelular en respuesta al VEGF resulta de la activación de la fosfolipasa C (PLC), que promueve la producción de inositol trifosfato (IP3) que conduce a la liberación de calcio de sus reservorios intracelulares (retículo endoplásmico) (Takahashi & Shibuya, 2005). La consecuente acumulación de calcio, tiene como resultado el incremento de la óxido nítrico sintasa endotelial y de los niveles de GMP cíclico (Li et al., 2004). Por otro lado, el VEGF induce la fosforilación de las VE-cadherinas del endotelio vascular y de proteínas que se encargan de la regulación del citoesqueleto como la proteína paxillina que media la motilidad celular (Claesson & Welsh, 2013; Schaller, 2001).

Actualmente, el VEGF es usado ampliamente en modelos *in vitro* e *in vivo* para estudiar cambios en la vasopermeabilidad. En la mayoría de los estudios *in vitro*, el VEGF se administra en cultivo celular de endotelio y se ha reportado que induce una disminución en la resistencia transendotelial que refleja un aumento en la permeabilidad una hora después del tratamiento (Clauss et al., 2001). En estudios *in vivo* los efectos del VEGF sobre la función de la barrera vascular, se han realizado mediante la medición de la permeabilidad a solutos como la albúmina. El ensayo más empleado utiliza la inyección subcutánea, intravenosa o intraocular con VEGF de acuerdo con el lecho vascular que se estudie, seguida de una inyección sistémica de colorantes como el azul de Evans que se une irreversiblemente a la albúmina circulante. En estos modelos, el incremento de la vasopermeabilidad se inicia

a partir de los 2-3 minutos posteriores a la administración del VEGF, alcanza niveles máximos a la hora y se sostiene por tiempos prolongados (días) (Bates, 2010).

2.4 Métodos utilizados para la evaluación de la vasopermeabilidad

2.4.1 Ensayo *in vivo* azul de Evans

El colorante azul de Evans, también definido como T-1824, fue usado por primera vez en 1914 por Herbert McLean Evans y colaboradores, con el objetivo de medir el volumen del plasma sanguíneo. Este colorante ha sido utilizado en ensayos para determinar la permeabilidad y la integridad de la barrera hematoencefálica, debido a que se puede unir (*in vivo e in vitro*) a la albúmina, proteína que comprende el 65% del total de las proteínas presentes en el plasma, en una relación de 10 moléculas de azul de Evans por molécula de albúmina (Bohinski, 2000; Yao et al., 2018). Este colorante tiene un peso molecular de 961 Da, es altamente soluble en agua, su excreción es lenta y se mantiene estable en circulación durante varios minutos, por lo que puede ser de gran utilidad para evaluaciones de permeabilidad (Saunders et al., 2015; Yao et al., 2018). Se ha utilizado para determinar el gasto cardíaco y para la identificación de la red vascular de tumores (Yao et al., 2018), así como para evaluar y cuantificar la permeabilidad de la retina (Díaz-Lezama et al., 2016; Qaum et al., 2001). El ensayo *in vivo* de azul de Evans continúa siendo una técnica tradicional para evaluar la permeabilidad vascular ya que tiene como ventaja que puede ser cuantificado a través de espectrofotometría, además de permitir la visualización de la fuga de proteínas plasmáticas mediante técnicas histológicas (Nidavani et al., 2014; Yao et al., 2018). Sin embargo, las limitantes de este ensayo incluyen la incapacidad de discernir entre la cantidad libre del colorante de la que se encuentra unida a la albúmina, la falta de especificidad ya que puede unirse en menor medida a globulinas y otras proteínas presentes en el tejido, así como su posible toxicidad *in vivo* (Saunders et al., 2015). Además, este ensayo no permite utilizar los tejidos para otra evaluación posterior al ensayo ya que todo el tejido queda marcado con el colorante.

2.4.2 Fluoroangiografía

El uso de macromoléculas fluorescentes ha sido una alternativa para estimar la permeabilidad de la vasculatura. Una de las más utilizadas es el polisacárido isotiocianato de fluoresceína

(FITC) acoplada a dextranos, este marcador se ha empleado con el mismo fundamento que el método azul de Evans, cuantificando la extravasación del FITC-dextran mediante espectrofotometría (Ishida et al., 2003). Esta molécula fluorescente permite evaluar la integridad de la microvasculatura de la retina mediante montajes planos y microscopía de fluorescencia y cuantificación de la fluorescencia (Ramírez et al., 2011). Sin embargo, a pesar de los beneficios de este método, el uso de los marcadores fluorescentes puede estar limitado por la propia autofluorescencia del tejido retiniano (Trichonas et al., 2010).

2.4.3 Isótopos radioactivos

La vasopermeabilidad ha sido evaluada también mediante el marcaje de albúmina con yodo radioactivo (^{125}I -BSA), la cual ha demostrado tener una alta sensibilidad (Nagy et al., 2006). Un ejemplo del empleo de esta técnica es la propuesta por Tilton y colaboradores en 1997, donde utilizan dos isótopos de yodo distintos (^{125}I y ^{131}I -BSA) con el propósito de realizar un doble marcaje, utilizando ^{125}I -BSA como marcador de la vasopermeabilidad y ^{131}I -BSA para estimar el volumen de plasma dentro de la vasculatura 10 minutos después de haberlo inyectado de manera sistémica (Tilton et al., 1997). Sin embargo, a pesar de la sensibilidad, esta técnica es poco usual debido a la necesidad de contar con las medidas de seguridad adecuadas para el uso de radioactividad, así como las licencias necesarias que autoricen el manejo de estos compuestos (Trichonas et al., 2010).

2.4.4 Inmunoprecipitación (IP)-Western blot de albúmina exógena marcada con biotina

Debido a la necesidad de contar con una metodología lo suficientemente sensible y que no implique grandes riesgos de bioseguridad, se propuso la inmunoprecipitación de albúmina exógena marcada con biotina (bBSA) por Trichonas y colaboradores en el 2010. La IP es una técnica que se basa en el reconocimiento de una proteína de interés con un anticuerpo específico unido a una matriz sedimentable (agarosa o sefarosa) (en este caso bBSA), formando un complejo proteína-anticuerpo-bBSA, que facilita la separación de la proteína de interés de la muestra total (Williams, 2000). Con la IP de la bBSA, Trichonas y colaboradores, estimaron el incremento de la vasopermeabilidad retiniana inducida por la condición diabética y el VEGF en la rata (Trichonas et al., 2010).

3 JUSTIFICACIÓN

La vasopermeabilidad (VP) es una propiedad del sistema vascular que está involucrada en mantener la homeostasis del organismo (Pugsley & Tabrizchi, 2000). El incremento de la VP conduce a patologías como la retinopatía diabética y el edema macular diabético que comprometen la visión e incluso, conducen a la ceguera (Nidavani et al., 2014). Por lo que contar con metodologías eficientes que permitan el estudio de la VP, es relevante. Este trabajo de tesis propone la determinación de la albúmina endógena extravasada en el tejido retiniano, por Western blot y compara su eficiencia con metodologías convencionales como el azul de Evans y de la inmunoprecipitación de la albúmina como paso previo al Western blot.

4 HIPÓTESIS

La detección por Western blot de albúmina en la retina es un método comparable al método de azul de Evans para medir el aumento en la VP retiniana debido a la administración intravítrea de VEGF.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Corroborar el aumento en la vasopermeabilidad retiniana inducido por la inyección intravítrea de VEGF mediante el ensayo de azul de Evans, la inmunoprecipitación (IP-Western blot) o el Western blot de la albúmina retiniana.

5.2 Objetivos particulares

1. Comprobar que la administración intravítrea de VEGF (300-600 ng/3µl por ojo) induce un incremento de la vasopermeabilidad retiniana mediante la evaluación microscópica de la vasculatura retiniana de animales sometidos o no a fluoroangiografía.
2. Evaluar el incremento de la vasopermeabilidad retiniana inducido por VEGF mediante el ensayo *in vivo* azul de Evans.
3. Evaluar el incremento de la vasopermeabilidad retiniana inducido por VEGF mediante IP-Western blot o Western blot directo de lisados de retina revelados con anticuerpos dirigidos contra la albúmina.

6 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Animales

Se emplearon ratas macho de cepa Wistar de 250 a 300 gramos de peso corporal. Las ratas se mantuvieron bajo condiciones convencionales (12:12 horas luz: oscuridad; a 22°C y con agua y alimento *ad libitum*). Los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité de Bioética del Instituto de Neurobiología de la UNAM siguiendo las normas de la Declaración para el Uso de Animales en la Investigación Oftalmológica y de la Visión de la Asociación para la Investigación en Visión y Oftalmología (ARVO) de EUA.

6.2 Administración intravítrea de VEGF

Los animales fueron anestesiados mediante la inyección intraperitoneal (i.p.) de una solución de ketamina 70% y xilacina 30% (1 µl/g de peso corporal). En cada ojo se aplicó una gota de Tropicamida + Fenilefrina (8 mg/50 mg/mL) para inducir midriasis (dilatación pupilar) y bajo el microscopio de disección se traspasó el limbo esclero-corneal con una aguja hipodérmica calibre 27G a 2 mm del limbo esclero-corneal. En esta incisión se introdujo la aguja de una microjeringa Hamilton con la cual se administraron entre 300 a 600 ng/3 µl de VEGF recombinante humano (rhVEGF) en un ojo y en el contralateral se administró vehículo (PBS pH 7.5). Las ratas fueron sacrificadas 24 horas después de la inyección intravítrea.

6.3 Evaluación del incremento de la vasopermeabilidad mediante fluorangiografía

Se realizó una inyección intravenosa (yugular) con 100 mg/kg de dextran marcado con isotiocianato de fluoresceína (50 mg/mL, FITC-dextran; MW 2x106 Da; Sigma-Aldrich Co.), con los animales previamente anestesiados con ketamina (70%) y xilacina (30%) (1 µl/g de peso corporal/i.p.). El compuesto fluorescente se dejó circular de manera sistémica por una hora, posteriormente las ratas fueron anestesiadas bajo un ambiente saturado de CO₂ y sacrificadas. Ambos ojos se enuclearon, las retinas se disectaron y se colocaron en paraformaldehído al 4% por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las retinas se montaron en portaobjetos de tal manera que se pudiera observar el tejido en su totalidad (montajes planos de retina) y se incluyeron en un medio de montaje que permitió preservar la fluorescencia (Vectashield; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las retinas se observaron bajo el microscopio Olympus BX60 con DP70 a 4X y se tomaron al menos 10 fotografías de cada retina (Olympus camera) que fueron integradas en una sola imagen utilizando el software de diseño Photoshop (Adobe Photoshop®). La fluorescencia del FITC-dextran fue visualizada a 490 nm.

6.4 Ensayo *in vivo* azul de Evans

A los animales previamente anestesiados con ketamina 70% y xilacina 30% (1 µl/g de peso corporal/i.p.), se les inyectó de manera sistémica (intravenosa) 45 mg/kg del colorante azul de Evans. El colorante se dejó en circulación durante dos horas, luego los animales fueron sacrificados uno por uno, bajo un ambiente saturado de CO₂. Los animales fueron perfundidos de manera intracardiaca a través del ventrículo izquierdo con un volumen aproximado de 125 ml de buffer de fosfatos (PBS 1X, pH 3.5) por minuto, durante 2 minutos (250 ml en total por rata) a una temperatura de 37°C drenando el fluido a través de la sección de ambas aurículas.

Las retinas se extrajeron bajo un microscopio estereoscópico, se secaron por centrifugación bajo vacío por 4 horas y se incubaron en formamida (Sigma- Aldrich, #SHBG9108V) por 18 h a 72°C y 350 rpm, para extraer la albúmina unida al colorante extravasado en la retina. Se cuantificó el colorante por espectrofotometría a 620 nm en un volumen de 100 µl por

duplicado de cada retina y los valores se estimaron de acuerdo a la curva de absorbancia del colorante.

6.5 Inmunoprecipitación (IP)-Western blot de albúmina de lisados de retina

Posterior a la inyección intravítrea de VEGF los animales fueron sacrificados bajo un ambiente saturado con CO₂ e inmediatamente perfundidos con solución Ringer (NaCl 115mM, KCl 74 mM, CaCl₂ 1.8 mM, C₈H₁₈N₂O₄S 238.3 mM) mezclada con heparina a un pH de 7.0 de acuerdo con Trichonas et al. (2010). La perfusión empleó 260 ml por minuto durante 6 minutos (1.560 L en total por rata) a una temperatura de 37° C. Una vez concluida la perfusión, los ojos se colocaron en solución de fosfatos (PBS, pH 7.4), las retinas se disectaron y se homogenizaron de acuerdo con la metodología reportada por Trichonas et al. (2010), utilizando 500 µl de buffer de lisis (50 mM Tris pH 7.4, 0.5% Igepal, 100 mM NaCl, 1 µg/µl aprotinina, 0.5 mM PMSF) con inhibidores de proteasas por cada retina. La homogenización fue por sonicación (5 pulsos durante 2 segundo a 30% ciclos de trabajo), los lisados se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, se colectó el sobrenadante para cuantificar la proteína total mediante el método de Bradford (Bradford, 1976).

Con el propósito de favorecer la recuperación específica de la albúmina endógena extravasada, se inmunoprecipitó (IP) de 300 µg de proteína total de cada lisado de retina a través de su incubación en PBS (Phosphate buffered saline; Sigma Aldrich) junto con 35 µl de proteína A (100 mg de proteína A en 1 ml de buffer de fosfato de sodio 0.1 M, pH 8.0) y 2 µl de anticuerpo anti-albúmina de rata (Bethyl Laboratories), y se dejó en agitación toda la noche (O/N) a 4°C. Al día siguiente se realizaron 3 ciclos de lavado. En cada ciclo, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm por 6 minutos a 4° C, se desechó el sobrenadante cuidando la integridad del precipitado y se agregaron 500 µl de PBS seguido de su incubación por 10 minutos a 4°C en agitación. En el tercer lavado se desechó el sobrenadante dejando solamente 20 µl del mismo, se conservó el precipitado, se le agregaron 10 µl de Laemmli 2X condiciones reductoras y se le calentó a 95° C por 10 min a 350 rpm. Las muestras se procesaron mediante la técnica de electroforesis (SDS-PAGE) en un gel de poliacrilamida del 7.5%, con cantidades iguales de proteína total (300 µg); las proteínas migraron bajo una intensidad de corriente de 80 volts durante 1.5 h Las proteínas fueron transferidas a

membranas de nitrocelulosa (0.2 μm) durante 1 hora a 23 volts; posteriormente las membranas se incubaron en solución de bloqueo (PBS pH 7.5+ Tween 0.05%+ leche 5%) y puestas en el anticuerpo primario anti-albúmina de rata (dilución 1:1000) (Bethyl Laboratories) en agitación toda la noche a 4°C. Al siguiente día las membranas fueron incubadas con el anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina y la presencia del antígeno se reveló por una reacción colorimétrica (kit Bio-Rad, Hercules, CA.).

6.6 Western blot de albúmina de lisados de retina

A partir de los mismos lisados de las retinas obtenidos, arriba descrito, 15 μg de proteína total se mezclaron con Laemmli (2X) y se incubaron a 95°C durante 10 min a 350 rpm; las muestras se procesaron mediante el sistema de electroforesis (SDS- PAGE), en un gel de poliacrilamida del 10% con el propósito de observar tanto la banda inmunoreactiva a albúmina, como la proteína gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) empleada como control de carga. Las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membranas de nitrocelulosa con las mismas especificaciones descritas anteriormente y se incubaron con anticuerpos primarios policlonales anti-albúmina de rata (dilución 1:1000) (Bethyl Laboratories) y anti-GAPDH (dilución 1:1000) (Abcam). Se dejaron en rotación toda la noche a 4°C y al día siguiente las membranas fueron incubadas con los anticuerpos secundarios respectivos acoplados a fosfatasa alcalina y la presencia de los antígenos reveladas por una acción colorimétrica (Bio-Rad, Hercules, CA.).

6.7 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba estadística paramétrica t de Student para comparación de dos grupos. Se consideró como valor mínimo de significancia estadística de $p < 0.05$. Para realizar el análisis se utilizó el programa estadístico GraphPad Prism Version 6.0.

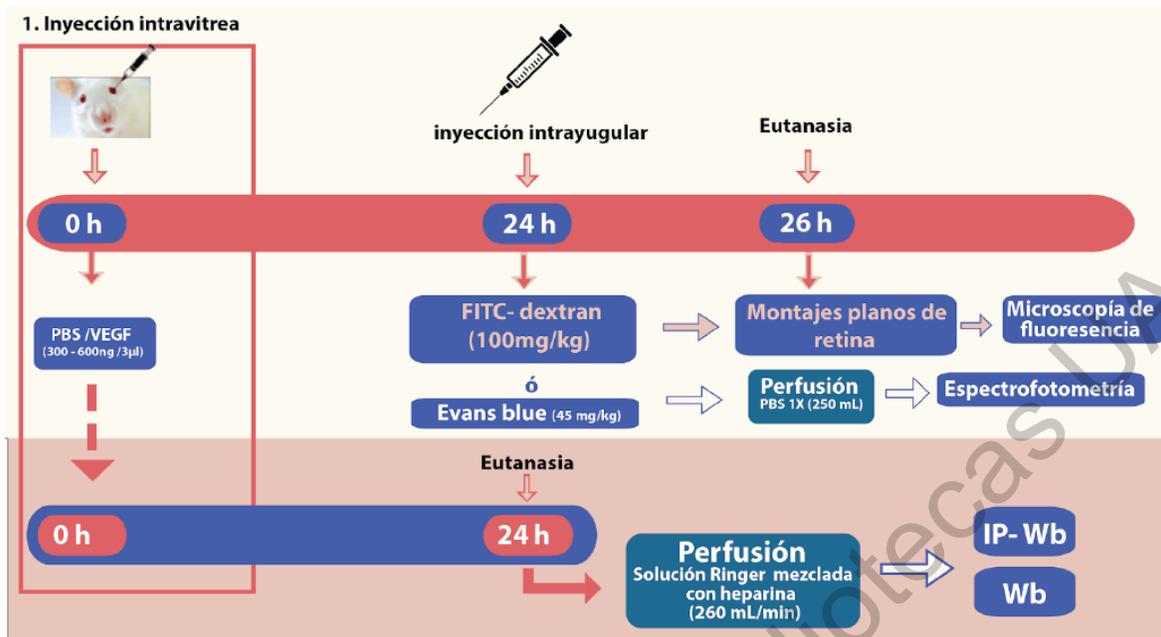


Figura 5. Esquema del diseño experimental. Los animales fueron inyectados de manera intravítrea con rhVEGF (300-600 ng/3 µl/ ojo) o PBS, 24 h después se evaluó el incremento de la vasopermeabilidad retiniana mediante el ensayo azul de Evans, o análisis por IP-Western blot de lisados de retina o únicamente Western blot.

7 RESULTADOS

7.1 La inyección intravítrea de VEGF incrementó la vasopermeabilidad retiniana evaluada mediante microscopía de campo claro y fluorangiografía

Para corroborar y visualizar el efecto del VEGF sobre la vasopermeabilidad retiniana, se analizó la red vascular en montajes planos de retinas mediante microscopía en campo claro y fluorescencia. La figura 6 muestra imágenes de la misma retina bajo campo claro o fluorescencia proveniente de animales inyectados intravítrealmente con PBS (control) o con VEGF. En la condición control, se puede observar la ausencia de hemorragias (Figura 6A) y el compuesto fluorescente dentro de la red vascular (Figura 6C). Mientras que el tratamiento con VEGF, la microscopía en campo claro mostró zonas de hemorragia (Figura 6B) que, bajo fluorescencia, coinciden con zonas opacas a la fluorescencia (Figura 6D). Estos hallazgos ilustran el efecto del VEGF produciendo un daño a la integridad de los capilares que se traduce en una vasopermeabilidad incrementada. Resultados similares reportaron Ramírez et al (2011) quienes realizaron ambas evaluaciones para mostrar el efecto causado por la administración intravítrea de VEGF.

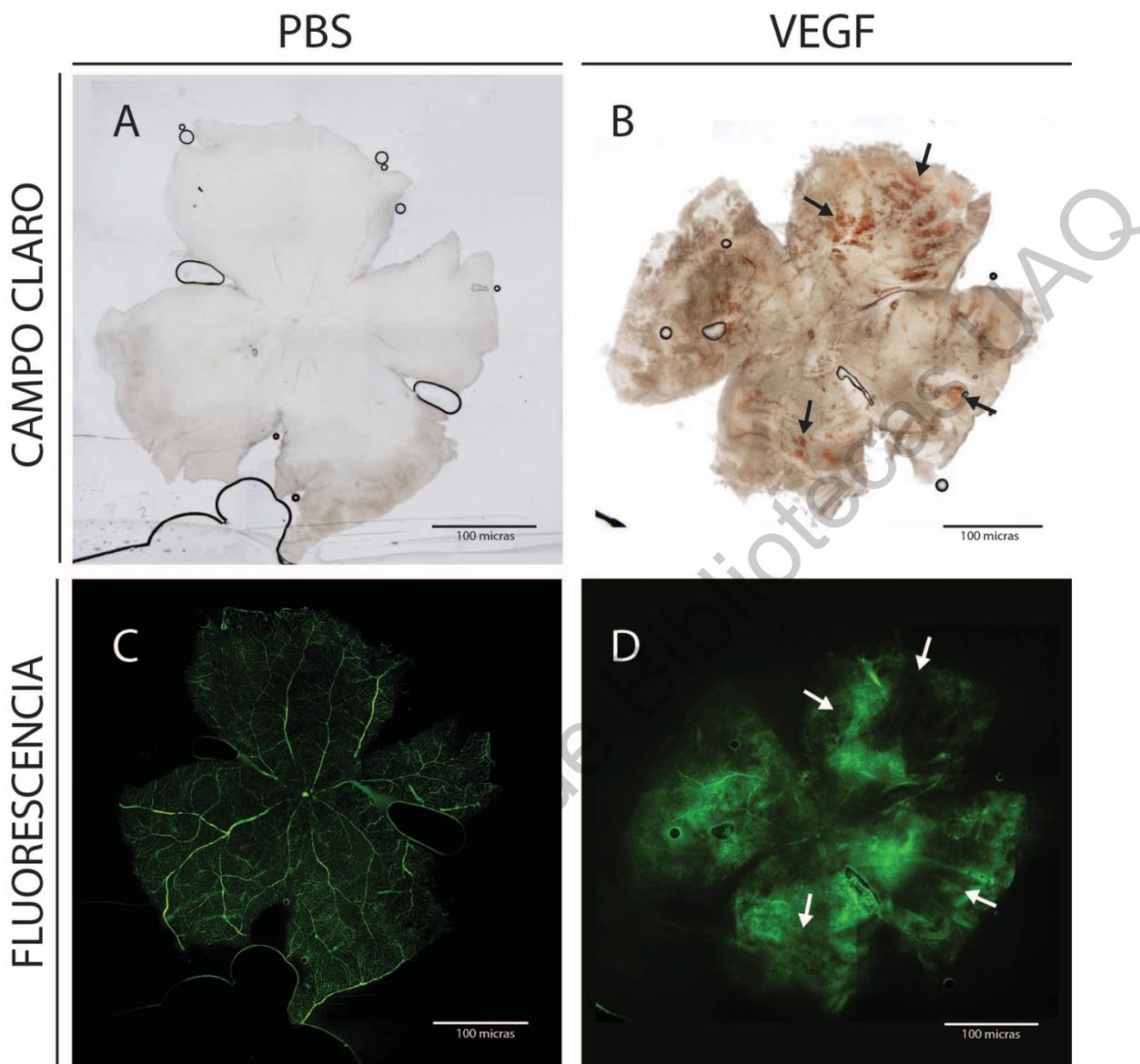


Figura 6. Montajes planos de retina representativos obtenidos 24 h después de la inyección intravítrea de PBS (control) o VEGF (600 ng/ μ l por ojo). Panel A y B corresponden a las retinas con PBS o VEGF bajo microscopía en campo claro. Panel C y D corresponden a las mismas retinas, observadas bajo microscopía de fluorescencia. Las zonas de hemorragia se perciben como acúmulos de eritrocitos extravasados en el tejido (flechas) bajo microscopía en campo claro (panel B), mismas que al exponerse a fluorescencia (panel D) coinciden con zonas opacas a la fluorescencia (flechas) rodeadas de amplias zonas difusas de fuga del dextran acoplado a fluoresceína (cabeza de flecha).

7.2 El VEGF incrementó significativamente la vasopermeabilidad retiniana cuantificada mediante el ensayo azul de Evans

El incremento de la vasopermeabilidad causada por la inyección intravítrea de VEGF fue cuantificado mediante el ensayo del azul de Evans. El colorante azul de Evans se cuantificó como índice de la extravasación de albúmina en la retina por espectrometría y se interpolaron los valores de absorbancia en una curva estándar elaborada con cantidades conocidas del colorante. Se encontró que el VEGF indujo un incremento de la vasopermeabilidad 2.54 veces mayor al de las retinas que recibieron PBS (Figura 7). Esta diferencia fue estadísticamente significativa (* $p=0.0314$) cuando se promediaron los valores de los ojos evaluados. Es convencional que en oftalmología los resultados se reporten por ojo y no por animal, debido a que la condición ocular de ambos ojos es independiente. El grado de aumento coincide con el reportado en respuesta a la administración intravítrea del VEGF (2.8 veces sobre el valor control) y en respuesta a la condición diabética (1.8-2.6 veces el valor basal) (Díaz-Lezama et al., 2016; Ramírez et al., 2011; Xu, Qaum, & Adamis, 2001)

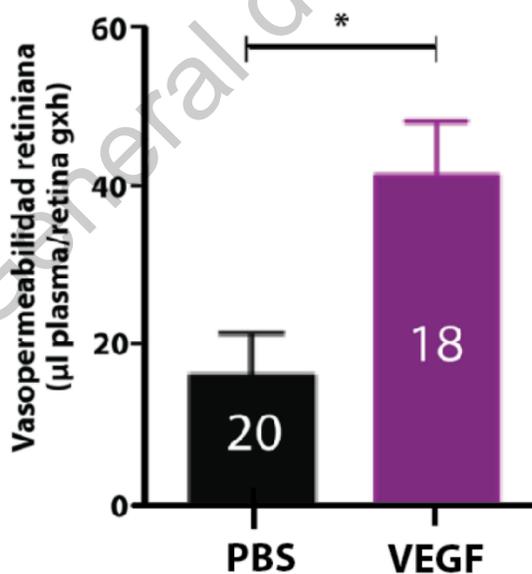


Figura 7. Evaluación de la vasopermeabilidad retiniana mediante en el ensayo *in vivo* de azul de Evans en la rata, 24 h posteriores a la inyección intravítrea con VEGF o PBS. El número dentro de las barras indica la cantidad de retinas. (* $p=0.0314$).

7.3 El análisis por IP-Western blot de albúmina mostró el incremento de la vasopermeabilidad retiniana debido al VEGF

Si bien el ensayo de azul de Evans es un método sensible y ampliamente utilizado para cuantificar la vasopermeabilidad retiniana, no permite evaluar otros parámetros en el mismo tejido. Por lo que diversos autores han reportado a la inmunoprecipitación (IP) como una técnica idónea para concentrar a la albúmina extravasada en la retina y facilitar su detección mediante Western blot, como índice directo de un incremento de la vasopermeabilidad (Trichonas et al., 2010). El análisis por IP-Western blot de extractos de retina reveló una banda inmunorreactiva para albúmina del tamaño esperado (67 kDa) (Figura 8A). También se observaron bandas reactivas de 50-55 kDa que corresponden a las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgG) debido a que están presentes en el control negativo (blanco) donde el anticuerpo anti-albúmina se adicionó al buffer de IP en ausencia de extracto de retina. La IP-Western blot de lisados de retina mostró el aumento de la vasopermeabilidad en las retinas que recibieron VEGF comparado con las retinas inyectadas con PBS (Figura 8A). Esta diferencia fue significativa (** $p=0.0041$) cuando se evaluó la densidad óptica de las bandas inmunorreactivas para albúmina de seis retinas independientes por grupo (Figura 8 B). Esta cuantificación reveló que el VEGF incrementó la vasopermeabilidad retiniana 1.83 veces en relación con el control. Este aumento está en el rango esperado para el efecto de la administración intravítrea del VEGF (Ramírez et al., 2011).

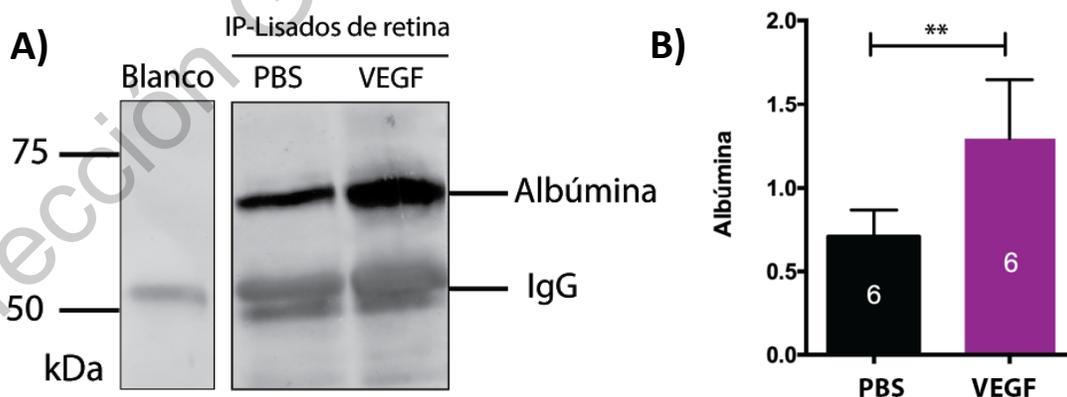


Figura 8. A) Blot representativo de IP- Western blot de los lisados de retinas de ojos inyectados intravítreamente con VEGF o PBS. En el primer carril se muestra el control negativo donde se inmunoprecipitó el buffer de incubación en ausencia de extracto de retina (Blanco). En el carril 2 y 3

se muestran las bandas inmnoreactivas a albúmina y las inmunoglobulinas presentes en el anticuerpo (IgG). Los números a la derecha indican los pesos moleculares en kDa de los marcadores de peso molecular. **B)** Gráfica correspondiente al análisis densitométrico de las bandas de albúmina. Los números dentro de las barras indican en número de retinas evaluadas. (**p= 0.0041).

7.4 El análisis por Western blot sin IP mostró el incremento de la vasopermeabilidad retiniana debido al VEGF

Para evaluar el beneficio de llevar a cabo el paso previo de IP en el análisis del efecto del VEGF los lisados de retina se analizaron por Western blot sin ser sometidos a IP. El análisis por Western blot directo mostró la presencia de una única banda del tamaño esperado para la albúmina, cuya concentración se corrigió a través de la valoración inmnoreactiva de la proteína constitutiva, (Gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa o GAPDH) (Figura 9). Encontramos que el VEGF incrementó 2.46 veces los niveles de la albúmina retiniana y que este aumento fue estadísticamente significativo (*p=0.0470) cuando se valoraron siete retinas independientes. El aumento fue similar al obtenido mediante en ensayo de azul de Evans (2.54 veces de incremento) y aparentemente mayor al observado cuando se realiza el Western blot con el paso previo de IP (1.8 veces).

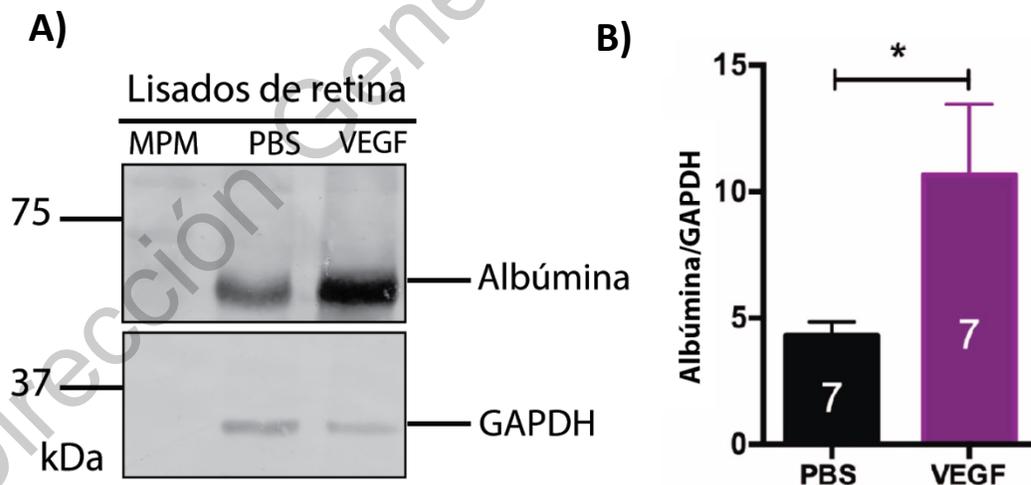


Figura 9. A) Western blot representativo de lisado de retinas revelado con anticuerpos anti-albúmina y anti-GAPDH de animales sometidos a la inyección intravítrea de VEGF o PBS. Análisis mediante Western blot de extractos de retina sin previa IP. En el primer carril se muestran los marcadores de

peso molecular (MPM). En los carriles 2 y 3 se procesaron los lisados de retina tratados con PBS y VEGF, respectivamente. Los números a la izquierda indican los pesos moleculares en kDa. En la parte inferior se muestra la banda inmunoreactiva para la proteína GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) utilizada como control de carga. **B)** Gráfica correspondiente al análisis densitométrico de las bandas de albúmina normalizados contra la proteína GAPDH. Los números dentro de las barras indican el número de retinas evaluadas. (*p=0.0470)

8 DISCUSIÓN

La VP es un parámetro que se ve comprometido en padecimientos como el edema macular y la retinopatía diabética (Nidavani et al., 2014). En particular, el edema macular diabético es la causa más común de la pérdida de visión en la diabetes, ya que involucra a la mácula que es el área central de la retina donde se concentra el mayor número de fotorreceptores (conos) responsables de la agudeza visual y de la visión en color (Li et al., 2004). Este padecimiento se define como el engrosamiento de la retina en el centro de la mácula (fóvea) causado por la acumulación de fluido retiniano y subretiniano que resulta del incremento de permeabilidad de la vasculatura de la retina (Li et al., 2004). El edema macular diabético puede ocurrir temprano en la diabetes (5 años después de su diagnóstico) y afecta alrededor del 30% de los pacientes con diabetes y el 12% de los pacientes con retinopatía diabética (Klaassen et al., 2013). Por lo que el estudio de factores involucrados en el incremento de la VP es fundamental para intentar resolver este padecimiento. En este sentido, la evaluación de la VP y de los factores que pudieran alterarla en las mismas muestras biológicas se presenta como una opción metodológica importante.

Nuestro trabajo apoya el uso de la detección por Western blot de la albúmina en la retina como una técnica para evaluar la VP de este tejido comparable en eficacia al método convencional (ensayo de azul de Evans) pero que, a diferencia de este, permite cuantificar en las mismas muestras el incremento de la vasopermeabilidad y la expresión de factores involucrados en su regulación.

Utilizamos como modelo para inducir VP en la retina la administración intravítrea de VEGF, el principal promotor de la VP retiniana asociada al edema macular diabético y la retinopatía diabética (Gardner & Antonetti, 2008; Klaassen et al., 2013). El aumento de la albúmina extravasada en la retina fue similar cuando se evaluó por Western blot directo y por el método de azul de Evans (2.46-veces vs. 2.54-veces mayor a la observada en ausencia de VEGF, respectivamente). Sin embargo, llama la atención que la valoración de este efecto requirió de menos retinas (6 vs. 18) que cuando la evaluación se realizó mediante el método de azul de Evans. No es claro a qué se debe esta diferencia, pero es posible que las condiciones de los animales durante la administración del colorante (anestesia durante dos horas) y el método de extracción del colorante introduzcan variaciones que requieren de un mayor número de animales para observar diferencias significativas. La mayor variabilidad del ensayo de azul de Evans así como el mayor cuidado y tiempo de manejo de los animales con respecto al Western blot representan ventajas adicionales de este último método.

Además, nuestro estudio evidencia que no es necesario el paso previo de IP para lograr una evaluación confiable de la albúmina extravasada en la retina y, consiguientemente de la VP. El aumento en respuesta al VEGF fue comparable. Sin embargo, la significancia del efecto fue mayor en presencia de IP para grupos de retinas equivalentes. Por otra parte, la cantidad de albúmina detectada en los extractos, a juzgar por la densidad de la banda inmunorreactiva, fue similar entre el método que utilizó IP y el que no la utilizó (Figuras 8A vs. 9A). Esto no es claro dado que en los Western blots se evaluó la albúmina inmunoprecipitada partir de 300 μg de proteína del extracto (Figura 8A) y la albúmina sin inmunoprecipitar presente en tan solo 15 μg de proteína del extracto. Posibles explicaciones consideran una baja eficacia del proceso de inmunoprecipitación y/o una mayor extracción de la albúmina del extracto sin inmunoprecipitar gracias a las propiedades solubilizantes del buffer de Laemmli sobre el extracto total. El análisis de ambas posibilidades requiere de la evaluación de la inmunoprecipitación y solubilización de un estándar puro de albúmina de rata con el que no contamos hasta el momento (Trichonas et al., 2010).

También queda pendiente evaluar discrepancias sobre la necesidad o no de perfundir a los animales antes de la evaluación por Western blot. Se ha propuesto que este paso es necesario

para eliminar el exceso de albúmina sérica presente en los vasos y así poder identificar a la proteína extravasada en el microambiente tisular (Lin et al., 2011; Trichonas et al., 2010). Sin embargo, también se ha reportado que la perfusión no es necesaria (Liu et al., 2012). Convencionalmente los animales se perfunden, sin embargo, en estudios futuros se evaluará la necesidad de perfusión ya que su eliminación simplificaría aún más el uso de esta metodología.

Un aspecto importante por considerar es que la detección por Western blot de una proteína es en el mejor de los casos una técnica semicuantitativa y no cuantitativa, lo que impide detectar cambios menores, si bien reales, de variación proteica. En este ensayo, los cambios inducidos por el VEGF sobre la VP retiniana son grandes lo que permitió que se vieran reflejados en cambios significativos en los niveles de albúmina retiniana evaluados semicuantitativamente por el Western blot. La magnitud de los efectos del VEGF administrado intravítrealmente quedaron de manifiesto cuando se evaluó visualmente la red capilar en montajes planos de retina por microscopía de luz y de fluorescencia acoplada a una fluoroangiografía.

En conclusión, los resultados de esta tesis apoyan el uso del Western blot directo para evaluar cambios importantes en la VP retiniana asociados a retinopatías como el edema macular diabético y la retinopatía diabética y, por ende, en la valoración experimental de futuros tratamientos contra estos padecimientos.

9 CONCLUSIONES

La evaluación de la albúmina endógena en lisados de retina mediante Western blot permite evaluar el aumento de la vasopermeabilidad inducida por la inyección intravítrea de VEGF, con una sensibilidad comparable a ensayos convencionales (azul de Evans)

La cuantificación por densitometría de Western blot de la albúmina endógena permitirá valorar el incremento de la permeabilidad retiniana de manera experimental en patologías de la microvasculatura como la retinopatía diabética y edema macular

Implementar esta metodología permitirá reducir los costos necesarios para evaluar la vasopermeabilidad y permitirá el uso del mismo tejido y animal para evaluaciones posteriores.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

10 REFERENCIAS

- Aird, W. C. (2012). Endothelial cell heterogeneity. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 2(1), 1–13. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006429>
- Alkadhim, M., Zoccali, C., Abbasifard, S., Avila, M. J., Patel, A. S., Sattarov, K., ... Baaj, A. A. (2015). The surgical vascular anatomy of the minimally invasive lateral lumbar interbody approach: a cadaveric and radiographic analysis. *European Spine Journal*, 24, 906–911. <https://doi.org/10.1007/s00586-015-4267-5>
- Alon, T., Hemo, I., Itin, A., Pe'er, J., Stone, J., & Keshet, E. (1995). Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nature Medicine*, 1(10), 1024–1028. <https://doi.org/10.1038/nm1095-1024>
- Bates, D. O. (2010). Vascular endothelial growth factors and vascular permeability. *Cardiovascular Research*, 87(2), 262–271. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvq105>
- Bazzoni, G., & Dejana, E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: Molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiological Reviews*, 84(3), 869–901. <https://doi.org/10.1152/physrev.00035.2003>
- Bharadwaj, A. S., Appukuttan, B., Wilmarth, P. A., Pan, Y., Stempel, A. J., Chipps, T. J., ... Smith, J. R. (2013). Role of the retinal vascular endothelial cell in ocular disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 32(4), 102–180. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2012.08.004>
- Blaisdell, F., & Anthony, C. P. (1969). Structure and Function of the Body. *The American Journal of Nursing*, 69(5), 1075. <https://doi.org/10.2307/3453938>
- Bohinski, R. C. (2000). Immunoprecipitation of Serum Albumin with Protein A-Sepharose: A Biochemistry Laboratory Experiment. *Journal of Chemical Education*, 77(11), 1460–1462. <https://doi.org/10.1021/ed077p1460>
- Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.10.005>
- Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., & Bobryshev, Y. V. (2015). Endothelial barrier and its

- abnormalities in cardiovascular disease. *Frontiers in Physiology*, 6(DEC), 1–11.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00365>
- Claesson-Welsh, L., & Welsh, M. (2013). VEGFA and tumour angiogenesis. *Journal of Internal Medicine*, 273(2), 114–127. <https://doi.org/10.1111/joim.12019>
- Claesson-Welsh, Lena. (2015). Vascular permeability - The essentials. *Upsala Journal of Medical Sciences*, 120(3), 135–143. <https://doi.org/10.3109/03009734.2015.1064501>
- Clauss, M., Sunderkötter, C., Sveinbjörnsson, B., Hippenstiel, S., Willuweit, A., Marino, M., ... Risau, W. (2001). A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood*, 97(5), 1321–1329.
<https://doi.org/10.1182/blood.V97.5.1321>
- Díaz-Coránguez, M., Ramos, C., & Antonetti, D. A. (2017). The inner blood-retinal barrier: Cellular basis and development. *Vision Research*, 139, 123–137.
<https://doi.org/10.1016/j.visres.2017.05.009>
- Díaz-Lezama, N., Wu, Z., Adán-Castro, E., Arnold, E., Vázquez-Membrillo, M., Arredondo-Zamarripa, D., ... Clapp, C. (2016). Diabetes enhances the efficacy of AAV2 vectors in the retina: Therapeutic effect of AAV2 encoding vasoinhibin and soluble VEGF receptor 1. *Laboratory Investigation*, 96(3), 283–295.
<https://doi.org/10.1038/labinvest.2015.135>
- Dvorak, A. M., Kohn, S., Morgan, E. S., Fox, P., Nagy, J. A., & Dvorak, H. F. (1996). The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): A distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *Journal of Leukocyte Biology*, 59(1), 100–115. <https://doi.org/10.1002/jlb.59.1.100>
- Frank, R. (2015). Diabetic Retinopathy : Diabetic Retinopathy : *Ferri's Clinical Advisor 2019: 5 Books in 1*, 114(10), 27–28. <https://doi.org/10.1007/s00128-010-0031-z>
- Gardner, T. W., & Antonetti, D. A. (2008). Novel potential mechanisms for diabetic macular edema: Leveraging new investigational approaches. *Current Diabetes Reports*, 8(4), 263–269. <https://doi.org/10.1007/s11892-008-0047-5>
- Hayreh, S. S. (2015). Ocular vascular occlusive disorders. En *Ocular Vascular Occlusive Disorders*. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-12781-1>
- Ishida, S., Usui, T., Yamashiro, K., Kaji, Y., Ahmed, E., Carrasquillo, K. G., ... Adamis, A. P. (2003). VEGF164 is proinflammatory in the diabetic retina. *Investigative*

Ophthalmology and Visual Science, 44(5), 2155–2162.

<https://doi.org/10.1167/iovs.02-0807>

- Kaur, C., Foulds, W. S., & Ling, E. A. (2008). Blood-retinal barrier in hypoxic ischaemic conditions: Basic concepts, clinical features and management. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(6), 622–647. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.09.003>
- Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J., & Connolly, D. T. (1989). Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science*, 246(4935), 1309–1312. <https://doi.org/10.1126/science.2479987>
- Klaassen, I., Van Noorden, C. J. F., & Schlingemann, R. O. (2013). Molecular basis of the inner blood-retinal barrier and its breakdown in diabetic macular edema and other pathological conditions. *Progress in Retinal and Eye Research*, 34, 19–48. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2013.02.001>
- Laurent, G. J. (2002). Cells in focus. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(12), 1507. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(02\)00074-2](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(02)00074-2)
- Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V., & Ferrara, N. (1989). Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246(4935), 1306–1309. <https://doi.org/10.1126/science.2479986>
- Li, P. S. H., Wong, T. H., Tang, W. W. T., & Lai, J. S. M. (2004). Diabetic retinopathy. En *Hong Kong Practitioner* (Vol. 26). <https://doi.org/10.1016/j.mpmmed.2018.11.013>
- Lin, M., Chen, Y., Jin, J., Hu, Y., Zhou, K. K., Zhu, M., ... Ma, J. X. (2011). Ischaemia-induced retinal neovascularisation and diabetic retinopathy in mice with conditional knockout of hypoxia-inducible factor-1 in retinal Müller cells. *Diabetologia*, 54(6), 1554–1566. <https://doi.org/10.1007/s00125-011-2081-0>
- Liu, Y., Leo, L. F., McGregor, C., Grivtishvili, A., Barnstable, C. J., & Tombran-Tink, J. (2012). Pigment epithelium-derived factor (PEDF) peptide eye drops reduce inflammation, cell death and vascular leakage in diabetic retinopathy in Ins2(Akita) mice. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 18(6), 1387–1401. <https://doi.org/10.2119/molmed.2012.00008>
- Nagy, J. A., Feng, D., Vasile, E., Wong, W. H., Shih, S. C., Dvorak, A. M., & Dvorak, H. F. (2006). Permeability properties of tumor surrogate blood vessels induced by VEGF-A. *Laboratory Investigation*, 86(8), 767–780.

<https://doi.org/10.1038/labinvest.3700436>

- Nidavani, R. B., Mahalakshmi, A. M., & Shalawadi, M. (2014). Vascular permeability and Evans blue dye: A physiological and pharmacological approach. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 4(11), 106–113. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2014.41119>
- Penn, J. S., Madan, A., Caldwell, R. B., Bartoli, M., Caldwell, R. W., & Hartnett, M. E. (2008). Vascular endothelial growth factor in eye disease. *Progress in Retinal and Eye Research*, 27(4), 331–371. <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2008.05.001>
- Pugsley, M. K., & Tabrizchi, R. (2000a). The vascular system: An overview of structure and function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00125-8)
- Pugsley, M. K., & Tabrizchi, R. (2000b). The vascular system: An overview of structure and function. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44(2), 333–340. [https://doi.org/10.1016/S1056-8719\(00\)00125-8](https://doi.org/10.1016/S1056-8719(00)00125-8)
- Qaum, T., Xu, Q., Jousseaume, A. M., Clemens, M. W., Qin, W., Miyamoto, K., ... Adamis, A. P. (2001). VEGF-initiated blood-retinal barrier breakdown in early diabetes. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 42(10), 2408–2413.
- Ramírez, M., Wu, Z., Moreno-Carranza, B., Jeziorski, M. C., Arnold, E., Díaz-Lezama, N., ... Clapp, C. (2011). Vasoinhibin gene transfer by adenoassociated virus type 2 protects against VEGF- and diabetes-induced retinal vasopermeability. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 52(12), 8944–8950. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-8190>
- Saunders, N. R., Dziegielewska, K. M., Møllgaard, K., & Habgood, M. D. (2015). Markers for blood-brain barrier integrity: How appropriate is Evans blue in the twenty-first century and what are the alternatives? *Frontiers in Neuroscience*, 9(OCT), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fnins.2015.00385>
- Schaller, M. D. (2001). Paxillin: A focal adhesion-associated adaptor protein. *Oncogene*, 20(44 REV. ISS. 5), 6459–6472. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204786>
- Sebag, J. (2014). Vitreous: In Health and Disease. En *Vitreous: In Health and Disease*. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1086-1>
- Senger, D. R., Galli, S. J., Dvorak, A. M., Perruzzi, C. A., Harvey, V., & Dvorak, H. F. (1983). Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes

- accumulation of ascites fluid. *Science*, 219(4587), 983–985.
<https://doi.org/10.1126/science.6823562>
- Sun, Y., & Smith, L. E. H. (2018). Retinal Vasculature in Development and Diseases. *Annual Review of Vision Science*, 4(1), 101–122. <https://doi.org/10.1146/annurev-vision-091517-034018>
- Takahashi, H., & Shibuya, M. (2005). The vascular endothelial growth factor (VEGF)/VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 109(3), 227–241. <https://doi.org/10.1042/CS20040370>
- Tilton, R. G., Kawamura, T., Chang, K. C., Ido, Y., Bjercke, R. J., Stephan, C. C., ... Williamson, J. R. (1997). Vascular dysfunction induced by elevated glucose levels in rats is mediated by vascular endothelial growth factor. *Journal of Clinical Investigation*, 99(9), 2192–2202. <https://doi.org/10.1172/JCI119392>
- Trichonas, G., Manola, A., Morizane, Y., Thanos, A., Koufomichali, X., Papakostas, T. D., ... Vavvas, D. (2010). A novel nonradioactive method to evaluate vascular barrier breakdown and leakage. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 51(3), 1677–1682. <https://doi.org/10.1167/iovs.09-4193>
- Van Itallie, C. M., & Anderson, J. M. (2004). The molecular physiology of tight junction pores. *Physiology*, 19(6), 331–338. <https://doi.org/10.1152/physiol.00027.2004>
- Williams, N. E. (2000). Immunoprecipitation procedures. *Methods in Cell Biology*, 62(62), 449–453. [https://doi.org/10.1016/s0091-679x\(08\)61549-6](https://doi.org/10.1016/s0091-679x(08)61549-6)
- Xu, Q., Qaum, T., & Adamis, A. P. (2001). Sensitive Blood – Retinal Barrier Breakdown Quantitation AND. *Invest Ophthal Vis Sci*, 42, 789–794.
- Yao, L., Xue, X., Yu, P., Ni, Y., & Chen, F. (2018). Evans Blue Dye: A Revisit of Its Applications in Biomedicine. *Contrast Media and Molecular Imaging*, 2018, 18–24. <https://doi.org/10.1155/2018/7628037>