



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE AGUASCALIENTES**

**CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**TESIS**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA CURCUMINA EN UN  
MODELO ANIMAL DE QUERATOCONO**

**PRESENTA**

**Liliana Elizabeth Cano Gómez**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE**

**MAESTRA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA**

**TUTOR**

**Dr. en C. Luis Fernando Barba Gallardo**

**COMITÉ TUTORAL**

**Asesor: Dr. Javier Ventura Juárez**

**Asesor: M.C. Armida Ivette Bahena Delgado**

**Aguascalientes, Ags., 14 de Junio del 2022**

**AUTORIZACIONES**

CARTA DE VOTO APROBATORIO  
COMITÉ TUTORAL

**DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO**  
**DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

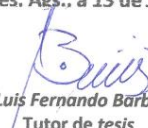
**PRESENTE**

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **LILIANA ELIZABETH CANO GÓMEZ** con ID 285456 quien realizó la tesis titulado: **EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPÉUTICO DE LA CURCUMINA EN UN MODELO ANIMAL DE QUERATOCONO**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"Se Lumen Proferre"**

**Aguascalientes, Ags., a 13 de Junio de 2022.**

  
**Dr. en C. Luis Fernando Barba Gallardo**  
**Tutor de tesis**

  
**Dr. Javier Ventura Juárez**

**Asesor de tesis**

  
**M.C. Armida Ivette Bahena Delgado**

**Asesor de tesis**

c.c.p.- Interesado  
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.  
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-16  
Actualización: 00  
Emisión: 17/05/19



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 14/06/2022

NOMBRE: LILIANA ELIZABETH CANO GÓMEZ ID 285456

PROGRAMA: MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA LGAC (del posgrado): BIOMEDICINA CELULAR Y MOLECULAR

TIPO DE TRABAJO: ( X ) Tesis ( ) Trabajo Práctico  
EVALUACIÓN DEL EFECTO TERAPEÚTICO DE LA CURCUMINA EN UN MODELO ANIMAL DE QUERATOCONO

TÍTULO: EFECTIVIDAD DEL USO DE LA PROTEÍNA DE SUERO DE LECHE

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Esta tesis genera conocimiento en el desarrollo de queratocono en un modelo animal y el efecto con el uso de curcuma

INDICAR	SI	NO	N.A. (NO APLICA)	SEGÚN CORRESPONDA:
<b>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</b>				
SI				El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI				La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI				Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI				Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI				Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI				El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI				Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
SI				Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
SI				Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)
<b>El egresado cumple con lo siguiente:</b>				
SI				Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI				Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
SI				Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
SI				Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI				Coincide con el título y objetivo registrado
SI				Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI				Tiene el CVU del Conacyt actualizado
No				Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<b>En caso de Tesis por artículos científicos publicados</b>				
N.A.				Aceptación o publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.				El estudiante es el primer autor
N.A.				El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.				En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
N.A.				Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.				La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

Sí  X  
No

FIRMAS

Elaboró:

\* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO

\* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO

**Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado**

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.  
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.  
Aprobado por: D. Control Escolar/D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15  
Actualización: 01  
Emisión: 28/04/20

14/6/22, 15:30

Correo: LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO - Outlook

**OFTALMOLOGIA: Confirmación pendiente / Pending OK**

em.oftalmologia.0.7bdd06.6be13688@editorialmanager.com  
<em.oftalmologia.0.7bdd06.6be13688@editorialmanager.com>  
en nombre de

Arch. Soc. Esp. Oftalmologia <em@editorialmanager.com>

Mié 08/06/2022 12:21 PM

Para: LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO <fernando.barba@edu.uaa.mx>

Archivos de la Sociedad Espanola de Oftalmologia

Título: Modelo animal de ectasia corneal en conejo mediante inyección intraestromal de colagenasa tipo II

Autores: Luis Fernando Barba Gallardo; Liliana Elizabeth Cano-Gómez; Armida Ivette Bahena-Delgado; Javier Ventura-Juárez

Estimado/a Luis Barba:

El PDF de su artículo "Modelo animal de ectasia corneal en conejo mediante inyección intraestromal de colagenasa tipo II" ya se ha generado y está listo para su aprobación. Por favor, revise el pdf antes de aceptarlo para confirmar que no contiene errores. Si ya ha aceptado el PDF de su artículo, ignore este mensaje.

Para aprobar el PDF, por favor, entre en su cuenta de Editorial Manager como Autor:

[https://nam04.safelinks.protection.outlook.com/?](https://nam04.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.editorialmanager.com%2Foftalmologia%2F&data=05%7C01%7Cfernando.barba%40edu.uaa.mx%7C8f459381f51e48dd96d808da49734fd%7Ce1e2e29221d64849b7104d47d9578ad0%7C0%7C0%7C637903056850602307%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljoIMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLjBtIl6Ik1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sd=0)

[url=https%3A%2F%2Fwww.editorialmanager.com%2Foftalmologia%2F&data=05%7C01%7Cfernando.barba%40edu.uaa.mx%7C8f459381f51e48dd96d808da49734fd%7Ce1e2e29221d64849b7104d47d9578ad0%7C0%7C0%7C637903056850602307%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljoIMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLjBtIl6Ik1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sd=0](https://nam04.safelinks.protection.outlook.com/?url=https%3A%2F%2Fwww.editorialmanager.com%2Foftalmologia%2F&data=05%7C01%7Cfernando.barba%40edu.uaa.mx%7C8f459381f51e48dd96d808da49734fd%7Ce1e2e29221d64849b7104d47d9578ad0%7C0%7C0%7C637903056850602307%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljoIMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLjBtIl6Ik1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sd=0)

Su nombre de usuario es el siguiente: luisbarba

Entre en la carpeta "Manuscritos en espera de aprobación del autor/Submissions Waiting for Author's Approval" para revisar y aceptar el PDF de su artículo. Si lo desea, puede clicar en "Action Links" para desplegar los links de la columna "Action".

También tendrá que confirmar que ha leído y que acepta la declaración "Ethics in Publishing" antes de completar el proceso de envío. Una vez termine todos estos pasos, recibirá un email de confirmación de la Oficina Editorial. Para más información o si tiene alguna duda con el proceso de envío, consulte:

[https://nam04.safelinks.protection.outlook.com/?](https://nam04.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fhelp.elsevier.com%2Fapp%2Fanswers%2Fdetail%2F%2Fid%2F1411%2Fp%2F7923%2F&data=05%7C01%7Cfernando.barba%40edu.uaa.mx%7C8f459381f51e48dd96d808da49734fd%7Ce1e2e29221d64849b7104d47d9578ad0%7C0%7C0%7C637903056850602307%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljoIMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLjBtIl6Ik1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sd=GI0u2pCDOYclRqLjBV8FT333vtKAWUtZdadQehL%2FI5I%3D&sd=0)

[url=http%3A%2F%2Fhelp.elsevier.com%2Fapp%2Fanswers%2Fdetail%2F%2Fid%2F1411%2Fp%2F7923%2F&data=05%7C01%7Cfernando.barba%40edu.uaa.mx%7C8f459381f51e48dd96d808da49734fd%7Ce1e2e29221d64849b7104d47d9578ad0%7C0%7C0%7C637903056850602307%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljoIMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLjBtIl6Ik1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sd=GI0u2pCDOYclRqLjBV8FT333vtKAWUtZdadQehL%2FI5I%3D&sd=0](https://nam04.safelinks.protection.outlook.com/?url=http%3A%2F%2Fhelp.elsevier.com%2Fapp%2Fanswers%2Fdetail%2F%2Fid%2F1411%2Fp%2F7923%2F&data=05%7C01%7Cfernando.barba%40edu.uaa.mx%7C8f459381f51e48dd96d808da49734fd%7Ce1e2e29221d64849b7104d47d9578ad0%7C0%7C0%7C637903056850602307%7CUnknown%7CTWFpbGZsb3d8eyJWljoIMC4wLjAwMDAiLCJQIjoiV2luMzliLjBtIl6Ik1haWwiLCJXVCi6Mn0%3D%7C3000%7C%7C%7C&sd=GI0u2pCDOYclRqLjBV8FT333vtKAWUtZdadQehL%2FI5I%3D&sd=0)

Por favor, asegúrese de que todos los componentes de su artículo aparecen correctamente en el PDF ya que no será posible modificarlo una vez haya confirmado que es correcto. Si tiene algún problema con el

<https://outlook.office.com/mail/id/AAQKAGRINDQYNGU4LWM1YJEINDg1OC04N2EwLTrHmZMxOGRhNTM4NwAQAMbr2Rj0bjVMsoHS58mhL%2BE...> 1/4

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico que me brindó para realizar mi maestría en la Universidad Autónoma de Aguascalientes, así como, mi estancia en la ciudad de Aguascalientes durante toda la maestría.

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por abrirme las puertas para poder seguirme desarrollando profesionalmente.

A mi comité tutorial, por sus enseñanzas durante la tesis

Dr. Luis Fernando Barba Gallardo por su apoyo y conocimientos para la tesis.

Dr. Javier Ventura Juárez por su apoyo, consejos y enseñanza, también por su paciencia y por permitirme trabajar en su espacio de laboratorio.

M.C. Armida Ivette Bahena Delgado por su retroalimentación durante la tesis.

Agradezco también al Dr. Manuel Ávila Blanco y al Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega por todas sus enseñanzas y retroalimentaciones para el proyecto. También a Blanca Esthela Romero Díaz por apoyarme en la recta final del proyecto.

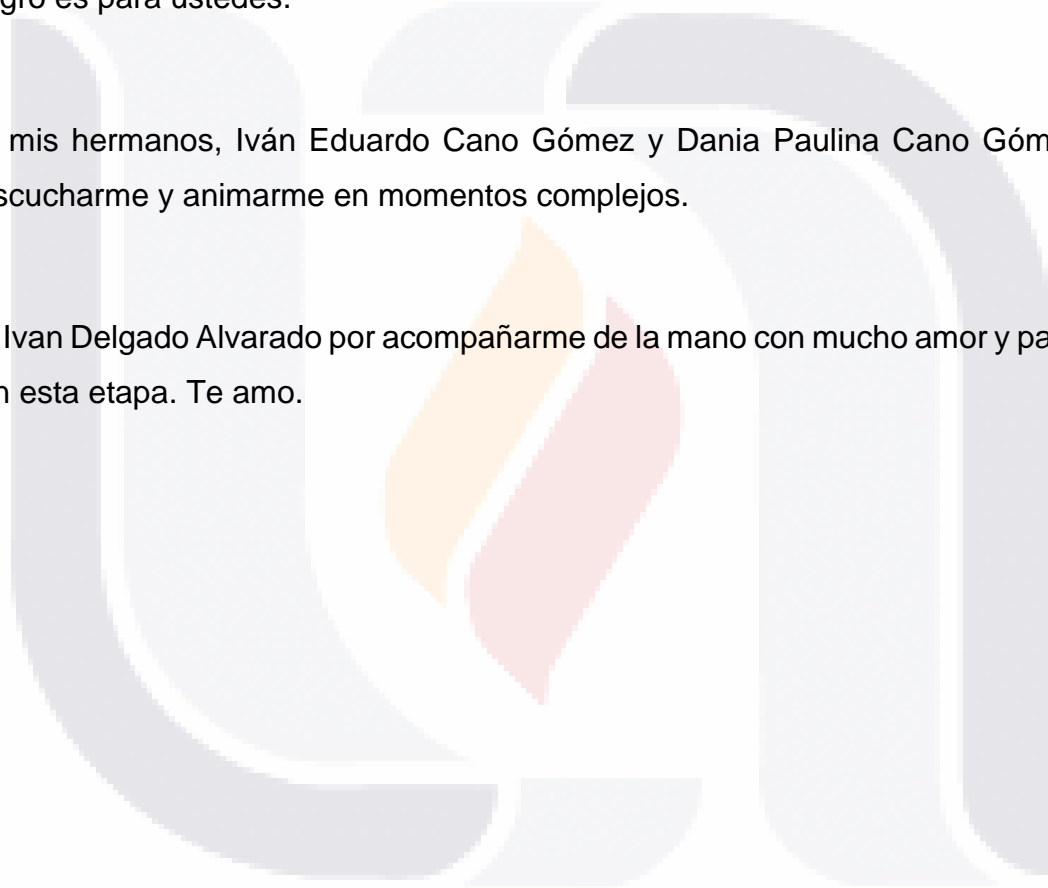
A mis compañeros de la maestría en especial a Ivan Delgado Alvarado y Sandra Lizbeth Aguilera Martínez por alentarme constantemente y apoyarme desde el inicio hasta el final de la maestría.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Everardo Cano Enríquez y Rosalba Gómez Hernández, con todo el amor, por su enorme apoyo en cada paso que doy en mi vida. Gracias porque ambos son un pilar fundamental en mi vida y sin su apoyo esto no se hubiera logrado, gracias por ser un ejemplo de amor, comprensión, cariño y confianza. Este logro es para ustedes.

A mis hermanos, Iván Eduardo Cano Gómez y Dania Paulina Cano Gómez, por escucharme y animarme en momentos complejos.

A Ivan Delgado Alvarado por acompañarme de la mano con mucho amor y paciencia en esta etapa. Te amo.



## 1. ÍNDICE GENERAL

1. ÍNDICE GENERAL .....	1
2. ÍNDICE DE TABLAS.....	4
3. ÍNDICE DE FIGURAS.....	6
4. ACRÓNIMOS.....	8
5. RESUMEN.....	11
6. ABSTRACT.....	12
7. INTRODUCCIÓN.....	13
8. ANTECEDENTES.....	14
8.1. Córnea.....	14
8.1.1. Anatomía.....	14
8.1.2. Histología de la córnea.....	14
8.2. Ectasias corneales.....	16
8.2.1. Queratocono.....	19
8.2.2. Modelo animal de ectasia corneal.....	35
8.3. Fitonutrientes.....	36
8.3.1. Polifenoles.....	36
8.3.2. Curcumina.....	39
9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	42
10. JUSTIFICACIÓN.....	44
11. OBJETIVOS.....	45
11.1. Objetivo general.....	45
11.2. Objetivos específicos.....	45

12.	HIPÓTESIS.....	45
13.	METODOLOGÍA.....	46
13.1.	Tipo de estudio.....	46
13.2.	Variables de estudio.....	46
13.3.	Universo de trabajo .....	48
13.4.	Muestreo y grupos de trabajo.....	48
13.5.	Diseño experimental .....	49
13.6.	Técnicas y procedimientos.....	50
13.6.1.	Modelo animal de queratocono A en conejo raza Nueva Zelanda mediante administración de colagenasa II en gotas oftálmicas.....	50
13.6.2.	Modelo animal de queratocono B en rata Wistar mediante la administración de colagenasa II por inyección intraestromal.....	50
13.6.3.	Modelo animal de queratocono C en conejo raza Nueva Zelanda mediante la administración de colagenasa II por inyección intraestromal .....	51
13.6.4.	Queratometrías .....	51
13.6.5.	Tinción Hematoxilina-Eosina.....	51
13.6.6.	Tratamientos de curcumina.....	52
13.6.7.	Extracción de ácido ribonucleico (ARN).....	52
13.6.8.	Cuantificación del ARN .....	53
13.6.9.	Evaluación de la integridad del ARN.....	53
13.6.10.	Retrotranscripción del ARN.....	53
13.6.11.	Análisis por PCR semicuantitativa .....	54
13.6.12.	Análisis estadístico.....	55
14.	CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	56



15.	RESULTADOS.....	57
15.1.	Alteración de la superficie corneal por acción de la colagenasa II en los modelos animales de queratocono .....	57
15.2.	Cambios morfológicos en la córnea por acción de la colagenasa II en los modelos animales de queratocono. ....	60
15.3.	Evaluación del efecto terapéutico de la curcumina sobre la superficie en el modelo animal de queratocono en conejo Nueva Zelanda .....	64
15.4.	Evaluación de la expresión génica de marcadores de estrés oxidativo en el modelo animal de queratocono después de la administración de curcumina 67	
16.	DISCUSIÓN .....	70
17.	CONCLUSIONES.....	75
18.	REFERENCIAS.....	76
	ANEXOS.....	88

**2. ÍNDICE DE TABLAS**

**Tabla 1.** Genes involucrados en el desarrollo del queratocono ..... 21

**Tabla 1 (continuación).** Genes involucrados en el desarrollo del queratocono... 22

**Tabla 1 (continuación).** Genes involucrados en el desarrollo del queratocono... 23

**Tabla 1 (continuación).** Genes involucrados en el desarrollo del queratocono... 24

**Tabla 2.** Fitonutrientes, sus fuentes dietéticas y sus propiedades terapéuticas ... 37

**Tabla 2 (continuación).** Fitonutrientes, sus fuentes dietéticas y sus propiedades terapéuticas..... 38

**Tabla 2 (continuación).** Fitonutrientes, sus fuentes dietéticas y sus propiedades terapéuticas..... 39

**Tabla 3.** Mezcla para la reacción de síntesis de ADN complementario (cADN) ... 53

**Tabla 4.** Protocolo del termociclador para la reacción de síntesis de cADN..... 54

**Tabla 5.** Mezcla para la reacción de PCR ..... 54

**Tabla 6.** Oligonucleótidos utilizados en PCR ..... 55

**Tabla 7.** Valores queratométricos antes y después de la administración de la colagenasa II en gotas oftálmicas ..... 57

**Tabla 8.** Valores queratométricos antes y después de la administración de la colagenasa II por inyección intraestromal ..... 59

**Tabla 9.** Valores queratométricos antes y después de la administración de curcumina a una concentración de 40  $\mu$ M ..... 65

**Tabla 10.** Valores queratométricos antes y después de la administración de curcumina a una concentración de 80  $\mu$ M ..... 66

**Tabla 11.** Tren de tinción Hematoxilina-Eosina ..... 88

**Tabla 12.** Solución madre de curcumina ..... 89

**Tabla 13.** Concentración y pureza de ARN de las córneas con colagenasa II en tratamiento con curcumina a 40  $\mu\text{M}$ ..... 90

**Tabla 14.** Concentración y pureza de ARN de las córneas con colagenasa II en tratamiento con curcumina a 80  $\mu\text{M}$ ..... 90



### 3. ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Esquema del globo ocular..... 14

**Figura 2.** Estructura morfológica de la córnea..... 15

**Figura 3.** Visión de un ojo normal y con miopía..... 17

**Figura 4.** Mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de queratocono ..... 25

**Figura 5.** Esquema de las moléculas que activan el factor de transcripción NF-kB ..... 27

**Figura 6.** Estructura de la proteína Nrf2 ..... 31

**Figura 7.** Activación de Nrf2 ..... 32

**Figura 8.** Esquema de los círculos observados en las miras del queratómetro de Bausch y Lomb ..... 33

**Figura 9.** Estructura general de los polifenoles ..... 37

**Figura 10.** Estructura de la curcumina..... 40

**Figura 11.** Mecanismos antioxidantes de la curcumina..... 41

**Figura 12.** Cambios en valores queratométricos después de la administración de gotas oftálmicas de colagenasa II..... 58

**Figura 13.** Alteración de la curvatura de la córnea de rata Wistar después de la administración de colagenasa II por inyección intraestromal. .... 59

**Figura 14.** Cambios en valores queratométricos después de la administración de colagenasa II por inyección intraestromal. .... 60

**Figura 15.** Alteraciones morfológicas después de la administración de gotas oftálmicas de colagenasa II en conejo. .... 61

**Figura 16.** Infiltrado celular proinflamatorio después de la administración de gotas oftálmicas de colagenasa II en conejo ..... 61

**Figura 17.** Alteraciones morfológicas después de la administración de colagenasa II por inyección intraestromal en rata Wistar. .... 62

**Figura 18.** Alteraciones morfológicas después de la administración de colagenasa II por inyección intraestromal en conejo Nueva Zelanda..... 63

**Figura 19.** Desprendimiento de membrana de Descemet por acción de colagenasa II en inyección intraestromal en conejo Nueva Zelanda. .... 64

**Figura 20.** Cambios en valores queratométricos después de la administración de curcumina a una concentración de 40  $\mu$ M..... 65

**Figura 21.** Cambios en valores queratométricos después de la administración de curcumina a una concentración de 80  $\mu$ M..... 67

**Figura 22.** Integridad de ARN y especificidad de los oligonucleótidos. .... 68

**Figura 23.** Efecto terapéutico de la curcumina a una concentración de 40  $\mu$ M sobre el estrés oxidativo. .... 68

**Figura 24.** Efecto terapéutico de la curcumina a una concentración de 80  $\mu$ M sobre el estrés oxidativo. .... 69

#### 4. ACRÓNIMOS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AKT	Proteína quinasa B
ALDH3	Aldehído deshidrogenasa 3
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
cADN	ADN complementario
CAT	Catalasa
COX	Ciclooxigenasa
CUL3	Culina 3
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
GAPDH	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
GSH-Px	Glutación peroxidasa
GSR	Glutación reductasa
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
HMOX	Hemo-oxigenasa
HOCL	Ácido hipocloroso
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK	c-Jun N-terminal quinasa
Keap	Proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch
Kg	Kilogramos
LASIK	Queratomileusis <i>in situ</i> asistida por láser
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógenos
mL	Mililitro

$\mu\text{L}$	Microlitro
mM	Milimolar
mm	Milímetro
$\mu\text{m}$	Micrometro
$\mu\text{M}$	Micromolar
mtADN	ADN mitocondrial
MVP	Prolapso de la válvula mitral
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótido
Neh	Proteína homóloga Nrf2-ECH
NF- $\kappa\text{B}$	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B
nm	Nanómetros
NO	Óxido nítrico
$\text{NO}_2$	Dióxido nítrico
NOTCH	Homólogo de notch del locus neurogénico
Nox	NADPH oxidasa
Nrf2	Factor nuclear derivado del eritroide 2
$1\text{O}_2^-$	Superóxido
$\text{O}_3$	Ozono
-OH	Radical hidroxilo
ONOO	Peroxinitrito
p53	Proteína supresora de tumores 53
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PI3K	Fosfoinositol-3-quinasa
RO-	Radical alcoxil
$\text{RO}_2^-$	Radical peroxil
RXR $\alpha$	Receptor $\alpha$ retinoide X
sMaf	Proteína pequeña del fibrosarcoma musculoaponeurótico
SOD	Superóxido dismutasa
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante beta

TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
UV	Ultravioleta
Wnt	Wingless and Int-1 (Vía de señalización)
xg	Fuerza g





## 5. RESUMEN

La colagenasa II es una proteasa que se ha utilizado en modelos animales de queratocono para degradar el colágeno tipo I, componente principal del estroma corneal, con la finalidad de producir el adelgazamiento y alteración en la superficie de la córnea. Se ha comprobado que la colagenasa II es capaz de producir estrés oxidativo en la córnea, cuyo proceso se encuentra involucrado en la fisiopatología del queratocono. Por su parte, la curcumina ha mostrado en diversas enfermedades del segmento anterior de la córnea tener efectos antioxidantes. El presente estudio se diseñó para evaluar el efecto antioxidante sobre marcadores de estrés oxidativo a diferentes concentraciones. La evaluación de las queratometrías confirmó que la colagenasa II es capaz de alterar la curvatura de la córnea en comparación con los controles. Así mismo, se observaron cambios morfológicos significativos en las córneas con colagenasa II, principalmente la activación de queratocitos, no obstante, estos cambios son similares a los manifestados en un proceso de cicatrización corneal, por lo que se atribuye que a los 7 días después de administrar la colagenasa II se produce un proceso de regeneración del tejido. Por otra parte, al evaluar el efecto de una solución oftálmica de curcumina en dos diferentes concentraciones 40  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$  sobre 3 marcadores génicos de estrés oxidativo en el modelo animal de queratocono: Superóxido dismutasa 1 (SOD1), NADPH oxidasa 2 (Nox-2) y factor nuclear derivado del eritroide 2 (Nrf2), no se observaron diferencias significativas con respecto al control positivo, debiéndose principalmente a la baja disponibilidad que tiene la curcumina. Sin embargo, se observó una tendencia a disminuir el estrés oxidativo con la concentración de curcumina 40  $\mu\text{M}$ .

**Palabras clave:** Queratocono, colagenasa II, curcumina, estrés oxidativo

## 6. ABSTRACT

Collagenase II is a protease that has been used in animal models of keratoconus to degrade type I collagen, the main component of the corneal stroma, in order to produce thinning and alteration of the corneal surface. It has been shown that collagenase II is capable of producing oxidative stress in the cornea, a process involved in the pathophysiology of keratoconus. Curcumin has been shown to have antioxidant effects in various diseases of the anterior segment of the cornea. The present study was designed to evaluate the antioxidant effect on oxidative stress markers at different concentrations in an animal model of keratoconus. Keratometry evaluation confirmed that collagenase II is able to alter corneal curvature compared to controls. Also, significant morphological changes were observed in the corneas with collagenase II, mainly the activation of keratocytes, however, these changes are similar to those manifested in a corneal scarring process, so it is attributed that 7 days after administering collagenase II a tissue regeneration process occurs. On the other hand, curcumin at two different concentrations 40  $\mu\text{M}$  and 80  $\mu\text{M}$  was evaluated on 3 markers of oxidative stress in the animal model of keratoconus by semiquantitative PCR: SOD1, Nox-2 and Nrf2, no significant differences were observed with respect to the positive control, mainly due to the low availability of curcumin.

**Key words:** Keratoconus, collagenase type II, curcumin, oxidative stress

## 7. INTRODUCCIÓN

El queratocono es una enfermedad ocular que afecta la superficie corneal y se caracteriza por manifestar adelgazamiento y protrusión en forma cónica de la córnea, cuyos mecanismos patológicos desencadenan miopía y astigmatismo en personas afectando su calidad visual. Dichos mecanismos patológicos son variables, complejos, y de retroalimentación positiva o negativa, en los cuales se involucra el estrés oxidativo. Existe suficiente evidencia que demuestra la expresión de marcadores de estrés oxidativos en córneas de pacientes con queratocono como las especies reactivas de oxígeno y algunas especies reactivas de nitrógeno, así mismo, se han encontrado modificaciones en el ADN mitocondrial (mtADN), lo que conlleva a la alteración de la cadena respiratoria, principal fuente de radicales. Actualmente, el tratamiento de esta patología incluye el uso de lentes y/o cirugía. Sin embargo, son tratamientos que no detienen el progreso de la enfermedad, son invasivos y costosos; de manera que, es importante la investigación de un agente terapéutico que disminuya la evolución de la enfermedad, sea seguro, menos invasivo y económico. Como herramienta para la investigación básica de tratamientos farmacológicos para el queratocono se han desarrollado dos modelos experimentales, ambos tienen como base la administración de colagenasa II, la cual degrada al colágeno tipo I, principal componente del estroma corneal, y con esto producir adelgazamiento y alteración de la superficie corneal, dos características clínicas importantes de la enfermedad.

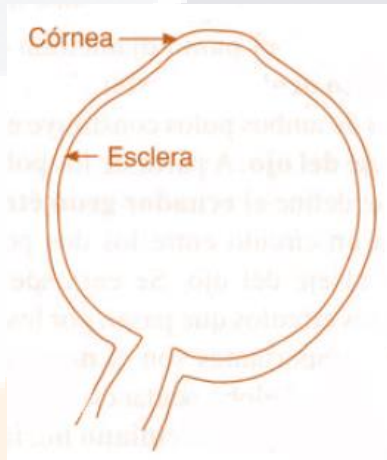
Existen antecedentes que demuestran la aplicación de la curcumina en otras enfermedades visuales, no obstante, su uso contra el queratocono aún no ha sido probado. Por lo tanto, su investigación podría contribuir al desarrollo de un posible tratamiento alternativo o complementario. De manera que, el objetivo de este trabajo consiste en evaluar el efecto terapéutico de la curcumina sobre marcadores de estrés oxidativo en un modelo animal de queratocono.

## 8. ANTECEDENTES

### 8.1. Córnea

#### 8.1.1. Anatomía

El globo ocular está conformado por un segmento anterior de forma curva denominado córnea y un segmento posterior de mayor tamaño denominado esclera (Figura 1) (1).

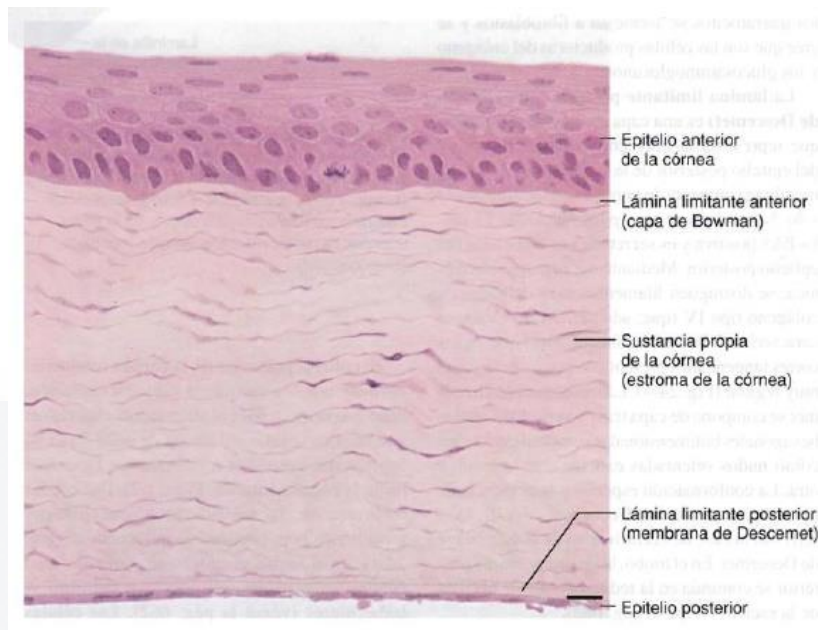


**Figura 1. Esquema del globo ocular.** Segmento anterior: córnea y segmento posterior: esclera. Recuperado de (1).

La córnea es una membrana no vascularizada transparente cuya función es permitir el paso de la luz. Tiene una forma circular con un diámetro de aproximadamente 11.5 mm y un espesor de 0.5 mm en la parte central y hasta 0.7 mm en la parte periférica (1). Aunque la córnea carece de vasos sanguíneos y linfáticos, está ricamente inervada por ramos de nervios ciliares, lo cual produce una alta sensibilidad (2).

#### 8.1.2. Histología de la córnea

Histológicamente, la córnea está conformada por 5 capas: epitelio anterior, membrana de Bowman, estroma, membrana de Descemet y epitelio posterior o endotelio corneal (Figura 2).



**Figura 2. Estructura morfológica de la córnea.** Tomada de un microscopio óptico a partir de un corte teñido con hematoxilina-eosina. Recuperado de (1).

El epitelio anterior es una capa estratificada plana no queratinizada, está compuesta por 5 o 6 capas celulares y debido a las uniones celulares estrechas hay casi nula permeabilidad (1).

La membrana de Bowman se encuentra por debajo de la membrana basal del epitelio anterior, tiene un espesor de aproximadamente 12  $\mu\text{m}$ . Como tal, no es una membrana separada, sino que forma parte del estroma, pero es la parte más superficial y modificada. Está conformada por colágeno tipo I, III, V y VI y debido a la disposición irregular de estas fibras, al observar al microscopio se observa como una membrana homogénea (1).

El estroma es la capa más gruesa de la córnea y está compuesta por laminillas de colágeno, principalmente de tipo I, paralelas entre sí y unidas por glucosaminoglucanos, los cuales forman puentes entre las fibras de colágeno. Entre las laminillas de colágeno se pueden encontrar células denominadas queratocitos, cuya función es producir colágeno y glucosaminoglucanos (1).

La membrana de Descemet está conformada por colágeno tipo IV, V, VIII, IX y XII, los cuales le confieren elasticidad. Generalmente, la membrana de Descemet tiene un tamaño muy variable que va cambiando conforme van pasando los años (1).

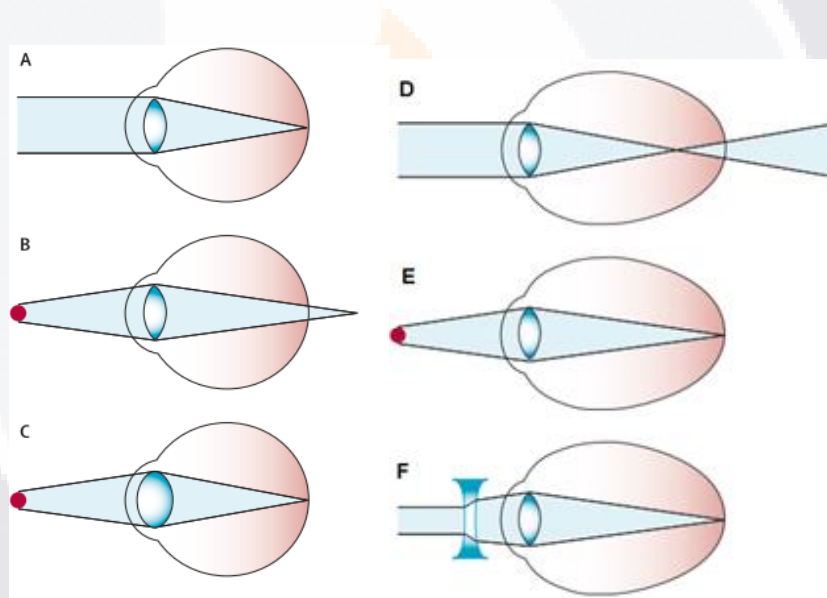
El endotelio corneal está conformado por una capa de células aplanadas cuya función es bombear agua hacia la córnea y al humor acuoso, por lo que mantiene hidratado al estroma, lo cual mantiene la transparencia de la córnea. Es muy importante que se mantenga transparente la córnea porque esto hace que se disminuya la luz al atravesarla y además evita la dispersión difusa de la luz permitiendo ver con claridad las cosas. El diámetro y disposición de las láminas de colágeno del estroma funcionan como un filtro que hace que se elimine la dispersión de la luz y podamos ver con claridad. Otro factor muy importante que mantiene la funcionalidad adecuada de la córnea es su nutrición, la cual se realiza por difusión facilitada y transporte activo desde la red capilar pericorneal y el humor acuoso, siendo este último el más importante porque de ahí proviene la glucosa, principal fuente de nutrición de la córnea (1).

## **8.2. Ectasias corneales**

Las ectasias corneales son enfermedades progresivas que se caracterizan por el adelgazamiento y elevación de la córnea, lo que conlleva a la disminución de la agudeza visual y aumento de aberraciones oculares (3) haciendo que la imagen que se forma en la retina se altere. Las aberraciones más comunes son los errores refractivos, en donde se incluyen la miopía y astigmatismo (4).

La palabra miopía se deriva de las palabras griegas *Muein* que significa para cerrar y *Ops* que significa el ojo (5). La miopía se genera porque la longitud axial es más larga de lo normal, por lo que se afecta la refracción corneal. En la visión normal, los rayos de las imágenes de los objetos se enfocan cerca o sobre los fotorreceptores. Al observar objetos cercanos, los rayos de la imagen inciden detrás de los fotorreceptores y luego se acomoda la lente, para enfocar a los objetos

cercanos y que los rayos se coloquen sobre los fotorreceptores (Figura 3) (6). En ojos con miopía, la longitud axial es más larga y los rayos de la imagen inciden frente a los receptores, y no se pueden reacomodar para el enfoque de objetos por sí solos, por lo que se requiere de lentes para su corrección. Los lentes no pueden corregir la longitud axial, pero pueden hacer que los rayos de las imágenes divergen, enfocándolos en los fotorreceptores. Es importante mencionar, que los ojos con miopía pueden enfocar objetos cercanos (6). Evidencia científica demuestra que existe relación entre el queratocono y la miopía axial, en donde los pacientes con queratocono demuestran mayor longitud axial y mayor longitud en el segmento posterior (7).



**Figura 3. Visión de un ojo normal y con miopía.** A) Los rayos de la imagen de los objetos inciden sobre los fotorreceptores en la parte posterior del ojo. B) Al observar un objeto cercano, los rayos inciden detrás de los fotorreceptores. C) Después la lente se enfoca a los objetos cercanos para que los rayos se reacomoden sobre los fotorreceptores. D) Con miopía, los rayos de las imágenes inciden frente a los fotorreceptores, sin acomodarse. E) Sin embargo, al observar objetos cercanos los rayos inciden sobre los fotorreceptores. D) Los lentes hacen que se divergen los rayos de tal manera que puedan incidir sobre los fotorreceptores. Imagen modificada de (6).

El incremento en la longitud axial se asocia al aumento de la degradación de colágeno y disminución de la síntesis de colágeno por lo que se presenta el adelgazamiento de la esclera (8,9)

La miopía se ha convertido en un problema de salud muy importante debido al incremento importante que ha tenido en su prevalencia (8). Generalmente se desarrolla en la niñez y adolescencia, y en México se realizó un estudio en adolescentes, demostrando un 4.6% de prevalencia en adolescentes (10). Así mismo, a nivel nacional, la ciudad de Aguascalientes tiene el primer lugar en prevalencia de miopía con un 42.5% (11). Las complicaciones de la miopía son las cataratas, glaucoma, desprendimiento de la retina, neovascularización coroidea miópica, atrofia macular y hasta ceguera (8,12–14).

Por su parte, el astigmatismo es un problema relacionado a la refracción ocular, en el cual no se enfocan bien las imágenes a cualquier distancia (15,16). A diferencia de la miopía, este problema puede ocurrir como resultado de una curvatura desigual de la córnea y del cristalino, descentralización del cristalino o a índices de refracción diferentes a través del cristalino (15). Su prevalencia en México es del 15.7% y se demostró que el astigmatismo es más común en hombres que en mujeres y el estado mexicano que demuestra mayor frecuencia es Aguascalientes con un 20.4%. (11).

Los tipos de ectasias corneales son el queratoglobo, la degeneración marginal pelúcida, la ectasia posterior a cirugías y el queratocono (3). El queratoglobo se caracteriza por ser una ectasia corneal bilateral que presenta adelgazamiento extenso de la córnea que abarca de limbo a limbo, especialmente en la periferia de la córnea, y posterior protrusión de la córnea de forma globular, lo cual incrementa la posibilidad de que la córnea pueda romperse de forma espontánea o tras un mínimo traumatismo mecánico (17,18). La degeneración marginal pelúcida es una ectasia corneal que presenta una banda de adelgazamiento de la córnea inferior separada por el limbo. Se distingue por la claridad de la córnea, la ausencia de cicatrización, vascularización o depósito de



lípidos (17,19). Por otra parte, se ha descrito la presencia de ectasias corneales después de realizar diferentes tipos de cirugías refractivas como la queratoplastia penetrante y queratomileusis *in situ* asistida por láser (LASIK), lo cual se ha vuelto preocupante al momento de proceder a las cirugías (20) .

### **8.2.1. Queratocono**

El queratocono, descrito por primera vez en 1854, se deriva de las palabras griegas *Kerato* que significa córnea y *Konos* que significa cono (21,22). Es la ectasia más común y se caracteriza por ser bilateral y presentar degeneración de la córnea de forma asimétrica, llevando al adelgazamiento y posterior protrusión de la córnea (21,23–26). El adelgazamiento se produce en la parte inferior temporal y central de la córnea, aunque también se ha encontrado en la parte superior corneal (21,27).

Se presenta clínicamente como empinamiento y protuberancia corneal con una punta cónica excéntrica y delgada (26,28), lo cual causa miopía y astigmatismo, afectando la calidad visual de los pacientes (21,24,26).

#### **8.2.1.1. Epidemiología del queratocono**

Generalmente, se presenta en la adolescencia, no obstante, se puede desarrollar en etapas más tardías (29,30). La incidencia anual estimada a nivel mundial es de 50-230 por cada 100 000 personas (31), sin embargo, se han reportado diferentes estadísticas de incidencia debido a que se emplean diferentes criterios de diagnóstico aunque se espera que a futuro las estadísticas aumenten debido al avance tecnológico para su diagnóstico (21). Afecta a ambos géneros y se ha demostrado que existen diferentes tasas de incidencia con respecto a las diferencias étnicas, especialmente en aquellas regiones donde hay mayor exposición solar como en India. (28,32). Por ejemplo, en comunidades asiáticas se ha estimado una incidencia de 19.6 por cada 100 000 habitantes y en comunidades caucásicas de 4.5 por cada 100 000 habitantes (33). Estas diferencias en estadísticas se atribuyen a la diferencia de factores genéticos y ambientales (31).

En México, se realizó un estudio en pacientes de 10 – 20 años se obtuvo una tasa de prevalencia de 1.8%, afectando más a mujeres que hombres con una

proporción de 6:3 (34). En contraste con respecto al género, otro estudio realizado en México en pacientes de 10-70 años, reporta mayor prevalencia en hombres con un 58.43% y de edad promedio de 24.5 años (35).

#### **8.2.1.2. Factores de riesgo del queratocono**

En el queratocono se produce una interacción entre factores genéticos y ambientales. Por lo cual, la mayor susceptibilidad para desarrollar queratocono se debe a la exposición de factores ambientales en individuos genéticamente predispuestos. Es heterogénea genéticamente ya que se han demostrado mutaciones en diversos genes. Sin embargo, aún queda por investigar cuales son los genes causantes y cuales confieren susceptibilidad; además, existe una alta variabilidad genética de acuerdo a las regiones geográficas, lo cual complica más la determinación de los genes causantes (36,37).

Los factores ambientales que se han reconocido hasta el momento son el frotamiento de ojos, la atopía o trastorno hereditario que predispone al desarrollo de enfermedades relacionadas a la hipersensibilidad (38) y la exposición a rayos ultravioleta (UV). El exceso de cualquiera de estos factores produce daño oxidativo en la córnea debido a la incapacidad de procesar las especies reactivas de oxígeno (ERO), la disminución de enzimas antioxidantes como aldehído deshidrogenasa 3 (ALDH3), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), lo que conduce a la degradación de la córnea. Así mismo, los microtraumas causados por el frotamiento de ojos producen el incremento en los niveles de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMP) 1 y 13, así como, el incremento de mediadores proinflamatorios como las interleucinas IL-6, IL-1 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), lo que conlleva a la apoptosis de queratocitos y adelgazamiento corneal (30,39,40).

Así mismo, se ha relacionado la presencia de queratocono sobre otras enfermedades. Tal es el caso de algunas enfermedades del tejido conectivo, específicamente el prolapso de la válvula mitral (MVP), de la cual se ha demostrado que el 58% de pacientes con queratocono, presentaban MVP (41,42). Otro estudio de cohorte realizado en Taiwan, reporta que la tasa de incidencia de MVP es 1.77 más elevada en pacientes mayores a 40 años de edad y con queratocono, y

especialmente la tasa de incidencia se eleva 1.49 en mujeres con queratocono (43). De igual manera, existe evidencia científica de la presencia de queratocono en enfermedades psiquiátricas como el síndrome de Tourette debido a que los pacientes con este síndrome muestran comportamientos obsesivos-compulsivos como el frotamiento de ojos (41,44,45).

**8.2.1.3. Genética del queratocono**

Diversos estudios moleculares han logrado identificar polimorfismos de genes en pacientes con queratocono. Estos genes se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 1. Genes involucrados en el desarrollo del queratocono.** Recuperado de (46).

Gen	Proteína que codifica	Función
<b>LOX</b>	Lisil-oxidasa	Estabilización de colágeno en la matriz extracelular (MEC).
<b>COL5A1</b>	Colágeno 5 cadena alfa 1	Síntesis de la cadena alfa del colágeno 5 y se asocia al diámetro de las fibras de colágeno y su orientación dentro del estroma corneal.
<b>CAST</b>	Calpastatina	Inhibición de las proteasas calpaínas que participan en la degradación proteolítica.
<b>RAB3GAP1</b>	RAB3 Subunidad catalítica de la proteína activadora de la GTPasa 1	Regulación la exocitosis. Se han relacionado mutaciones en enfermedades del ojo como las cataratas.
<b>HGF</b>	Factor de crecimiento de hepatocitos	Participación como factor de crecimiento en el proceso de cicatrización corneal.

**Tabla 1 (continuación). Genes involucrados en el desarrollo del queratocono.**  
 Recuperado de (46)

Gen	Proteína que codifica	Función
<b>FNDC3B</b>	Proteína 3B de la fibronectina tipo III	Formación de fibronectina del MEC.
<b>FOXO1</b>	Proteína de caja de horquilla O2. Factor de transcripción.	Regulación de apoptosis, ciclo celular, estrés oxidativo. Además, tiene un papel importante en la síntesis de colágeno I y fibronectina en el queratocono.
<b>PNPLA2</b>	Proteína 2 que contiene dominio de la fosfolipasa similar a la patatina	Participación en la hidrólisis de triglicéridos. Sugiriendo su participación en el estrés oxidativo.
<b>MAML2</b>	Proteína similar al mastermind 2. Factor de transcripción.	Activación de las proteínas homólogas de notch del locus neurogénico (NOTCH), que ejercen un papel proliferativo en el epitelio de la córnea.
<b>TGFB1</b>	Factor de crecimiento transformante beta 1	Interacción de las células con el colágeno de la MEC.
<b>DOCK9</b>	Indicador de la proteína 9 de la citocinesis	Adhesión celular por las cadherinas.
<b>WNT10A</b>	Proteína Wnt-10a (Wingless e Int-1)	Activación de la vía de señalización Wnt, cuya función es la homeostasis de las células progenitoras mediante el control de la hematopoyesis.

**Tabla 1 (continuación). Genes involucrados en el desarrollo del queratocono.**  
 Recuperado de (46).

Gen	Proteína que codifica	Función
<b>ZEB1</b>	Homeobox con dedos de zinc 1 de unión a la caja E. Factor de transcripción.	Diversas funciones a nivel molecular, puede suprimir o activar múltiples procesos. Se han encontrado mutaciones en la distrofia corneal.
<b>SOD1</b>	Superóxido dismutasa 1	Enzima antioxidante
<b>IMMP2L</b>	Subunidad 2 de la proteasa de la membrana interna mitocondrial	Ensamblaje del complejo de la cadena respiratoria en la mitocondria. Participa en el proceso metabólico del superóxido.
<b>COL4A3</b>	Colágeno tipo IV cadenas alfa 3 y 4	Estructura de la córnea.
<b>COL4A4</b>		
<b>VSX1</b>	Sistema visual homeobox 1. Factor de transcripción.	Transducción sensorial y visión.
<b>IL1A</b>	Interleucina 1 alfa	Citocinas proinflamatorias.
<b>IL1B</b>	Interleucina 1 beta	
<b>TIMP3</b>	Inhibidor tisular de metaloproteinasa 3	Inhibición de metaloproteinasas.
<b>ZNF469</b>	Proteína de dedo de zinc 469. Factor de transcripción.	Regulación y síntesis de colágeno en la córnea.

**Tabla 1 (continuación). Genes involucrados en el desarrollo del queratocono.**  
 Recuperado de (46)

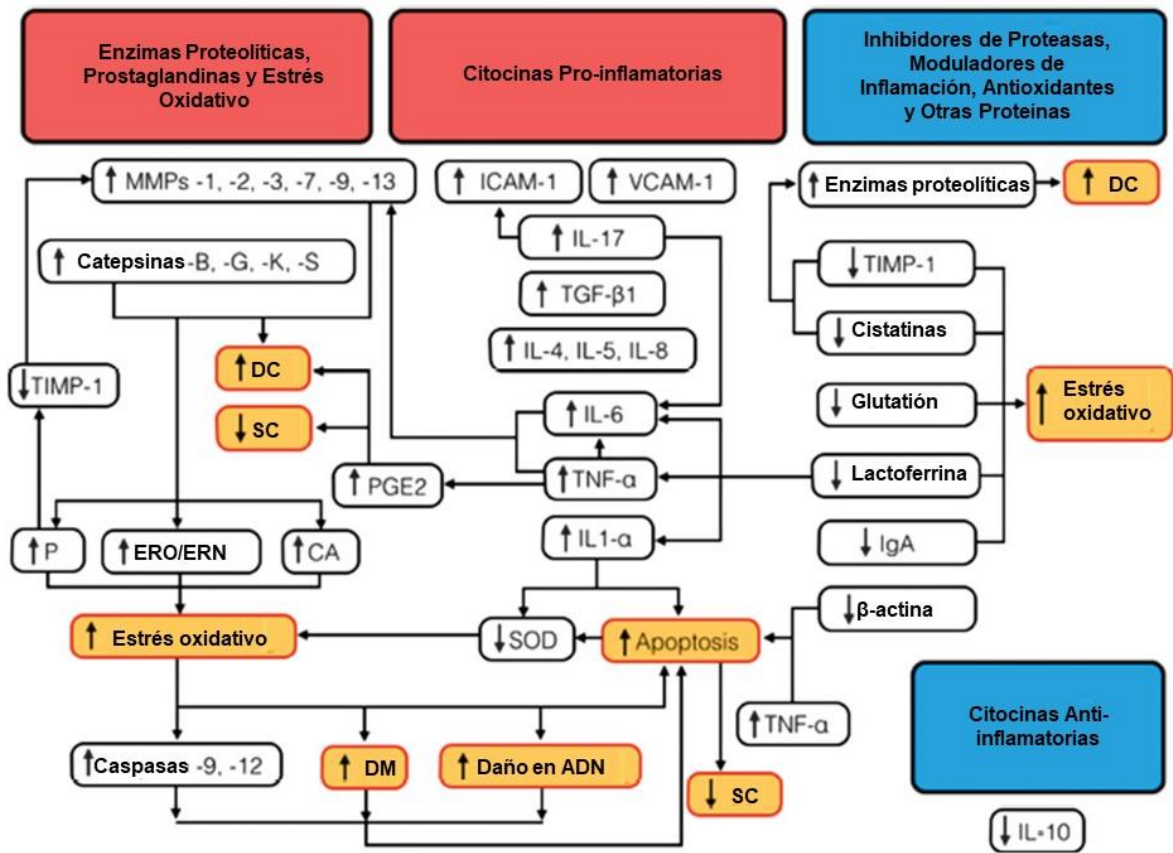
Gen	Proteína que codifica	Función
<b>PIIP5K2</b>	Hexaquisfosfato inositol y difosfoinositol pentaquisfosfato quinasa 2	Participación en la función normal de córnea. Sin embargo, al alterarse conduce al adelgazamiento corneal.

**8.2.1.4. Histopatología del queratocono**

Existen diversas técnicas microscópicas que han permitido evaluar los cambios morfológicos que se presentan en las córneas de pacientes con queratocono. Dentro de los cambios histopatológicos, se ha demostrado disposición irregular y disminución de células epiteliales, lo cual se atribuye a un proceso apoptótico por la liberación de citocinas apoptóticas por la exposición a factores ambientales. También se ha encontrado un incremento en la visibilidad de fibras nerviosas mediante exámenes con lámpara de hendidura, y a su vez un cambio anormal en su morfología. Con respecto a la membrana de Bowman, las córneas de pacientes han mostrado ruptura de esta membrana y, por ende, componentes celulares dentro de ella. El estroma corneal en el queratocono disminuye de manera significativa debido a la reducción de queratocitos, así mismo, se ha demostrado que se produce un infiltrado de células que contienen lisosomas y mitocondrias alineadas siempre de un queratocito, a las que se le atribuye también la degradación del estroma corneal. La membrana de Descemet al igual que la membrana de Bowman muestra ruptura en el queratocono, produciendo complicación de la enfermedad por la entrada del humor acuoso al estroma. Finalmente, existe una controversia con respecto a los cambios que pueden producirse en el endotelio corneal, ya que hay estudios que no demuestran cambios en esta capa, pero existen otros que señalan cambios en ella, como disminución en la densidad celular (47–51).

**8.2.1.5. Fisiopatología del queratocono**

La fisiopatología del queratocono es compleja debido a que se involucran diversos mecanismos que ocurren de manera simultánea y con retroalimentación positiva. Dentro de estos mecanismos se encuentran: alteraciones en la composición del estroma, desbalance de moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias, desbalance entre las enzimas y sus inhibidores que causan la degradación de la matriz extracelular y estrés oxidativo (Figura 4) (52).



**Figura 4. Mecanismos fisiopatológicos involucrados en el desarrollo de queratocono.** Recuperado de (52).

**8.2.1.5.1. Alteración en la composición del estroma**

El estroma de la córnea está formado mayormente por colágeno tipo I, pero también por III, V, VI y XII. El adelgazamiento de la córnea en el queratocono se produce porque disminuye la cantidad de colágeno y además se redistribuye, lo que

genera la disminución de láminas de colágeno en el estroma de la córnea. Adicionalmente, se presenta reducción de la distancia interfibrilar de las láminas de colágeno y aumento de proteoglicanos, lo que permite un mayor contacto entre ambos generando alteración en la organización del estroma (52–54).

#### **8.2.1.5.2. Desbalance de moléculas proinflamatorias y antiinflamatorias**

Las IL son moléculas de señalización cuya función es mediar las respuestas inmunes, proliferación celular y respuestas inflamatorias. En el queratocono, se ha demostrado la sobreexpresión de proteínas proinflamatorias como el factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ), IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 y IL-8, las cuales regulan la cascada de proteasas que se activan en el sistema de plasminógeno plasmina para la degradación de fibrina, aumentan la actividad de las ciclooxigenasas, las cuales participan en la síntesis de moléculas efectoras de la inflamación, y finalmente aumentan la expresión de metaloproteinasas. Cabe mencionar que el incremento de IL-1 y TNF- $\alpha$  inducen a la apoptosis de queratinocitos, lo cuales son más sensibles a la IL-1 porque presentan en su membrana receptores para esta citocina. Así mismo, se disminuye la expresión de moléculas antiinflamatorias como la lactoferrina e inmunoglobulina A. De manera que, el inadecuado balance de proteínas proinflamatorias y antiinflamatorias alteran la estructura y funcionalidad de la córnea mediante el incremento de metaloproteasas y la apoptosis de queratocitos (52,55–57).

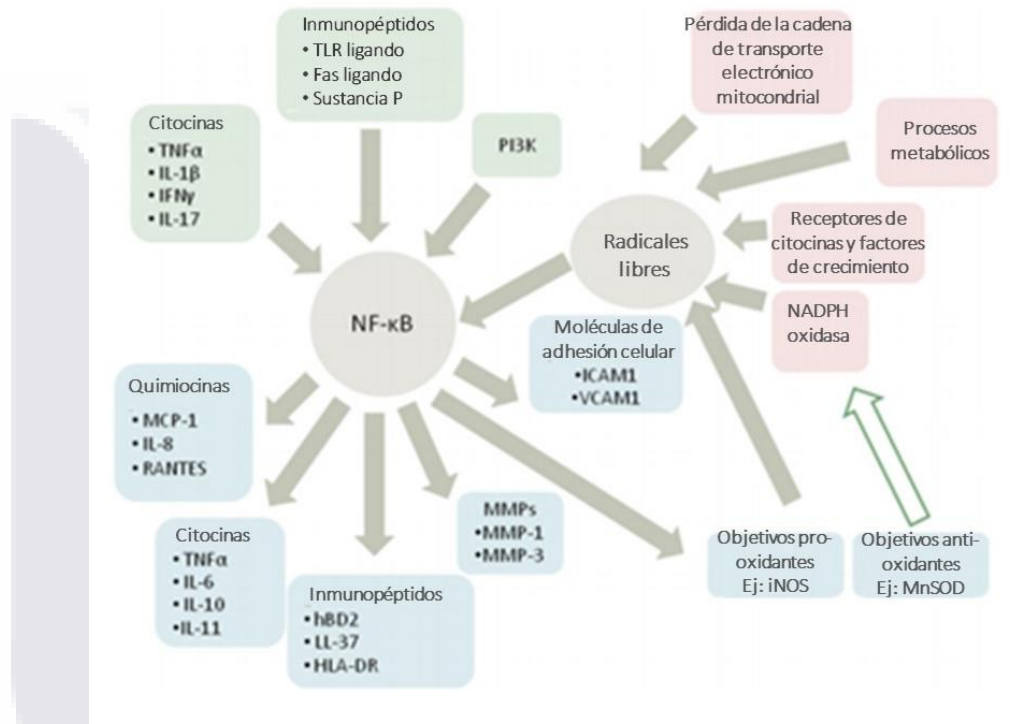
Es importante señalar que se ha demostrado que la IL-1, TNF- $\alpha$  y las ERO pueden estimular la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B (NF- $\kappa$ B), importante en la activación de la inflamación, en la superficie ocular (Figura 5) (58–61).

#### **8.2.1.5.3. Desbalance de enzimas degradadoras**

A su vez, las metaloproteinasas son enzimas proteolíticas de tipo endopeptidasas dependientes de zinc para su función; en el ojo se sintetizan por las células epiteliales corneales y las células estromales. Como se mencionó anteriormente, la expresión de mediadores inflamatorios modula la actividad de las



metaloproteinasas. De modo que, la degradación del estroma corneal se produce por la sobreexpresión de mediadores inflamatorios que activan de manera desregulada la actividad de estas enzimas y por consiguiente aumentan la solubilidad del colágeno disminuyendo la cantidad de este (52,62).



**Figura 5. Esquema de las moléculas que activan el factor de transcripción NF-κB sobre la superficie ocular. Recuperado de (58).**

#### 8.2.1.5.4. Estrés oxidativo

Estar expuesto a diversos factores que inducen estrés oxidativo como la luz UV, conlleva a la producción de ERO y de especies reactivas de nitrógeno (ERN). Debido a esto, la córnea se encuentra equipado con un sistema de defensa contra estos agentes oxidantes, el cual involucra moléculas de bajo peso molecular como la vitamina C, vitamina E, glutatión reducido y ferritina, así como moléculas de alto peso molecular como las enzimas SOD, CAT, glutatión peroxidasa (GSH-Px), entre otros. Cuando ocurre un desbalance en la producción de radicales libres y antioxidantes es posible la activación de factores de transcripción como el Nrf2 y la

proteína supresora de tumores 53 (p53), cuyas proteínas están involucradas en la regulación de antioxidantes y activación de apoptosis, respectivamente (63–65).

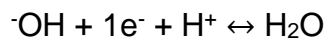
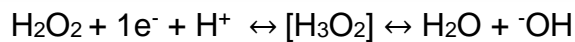
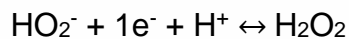
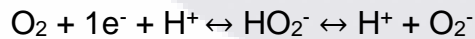
La luz UV produce la ruptura del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) para generar el radical hidroxilo (-OH), el cual reacciona y genera daño a macromoléculas como al ácido desoxirribonucleico (ADN) y lípidos. Como consecuencia se produce la peroxidación lipídica, con una subsecuente producción de aldehídos citotóxicos. Así mismo, las ERO pueden ser un subproducto de la fosforilación oxidativa en la mitocondria, lo que conlleva a un daño mitocondrial e incremento de ERO. El daño progresivo a la mitocondria da lugar a mutaciones del mtADN que conduce a una función deficiente del organelo, exacerbación del estrés oxidativo y apoptosis (63,66–69).

En el queratocono se observa un decremento de enzimas antioxidantes por lo que se genera un aumento de ERO, lo cual induce apoptosis a los queratocitos. Los queratocitos, son susceptibles al estrés oxidativo, por lo tanto, tienen un rol importante en el desarrollo y progresión de queratocono (52,67). Otras células de la córnea que pueden sufrir daño oxidativo son las células epiteliales y endoteliales. Por otra parte, se han detectado cambios en el mtADN de córneas queratocónicas en comparación con córneas normales, lo cual confirma que se produce daño oxidativo en ADN en el queratocono. Así mismo, se ha revelado que la acumulación de los diferentes radicales libres generan un incremento en la actividad de enzimas proteolíticas y disminución en la síntesis de colágeno en esta enfermedad. Como se mencionó anteriormente, también en el queratocono se ha demostrado una mayor producción de ERN a comparación de córneas normales. Se ha encontrado especialmente la expresión de nitrotirosina, óxido nítrico sintasa endotelial (iNOS) y óxido nítrico (NO), teniendo como consecuencia la inhibición de los inhibidores tisulares de metaloproteinasas de matriz (TIMPs) y la activación de MMP, especialmente la 2 (63,70–72).

**8.2.1.5.4.1. Estrés oxidativo y sus mecanismos bioquímicos**

Los organismos multicelulares requieren de la producción de oxígeno molecular ( $O_2$ ), para poder realizar sus funciones orgánicas de manera normal, sin embargo, esto también genera una susceptibilidad a la formación de radicales libres. Las ERO son moléculas derivadas del oxígeno, pueden ser de dos tipos: radicales y no radicales. Dentro de los radicales se encuentra el  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ , peroxil ( $RO_2^-$ ), y alcoxil ( $RO\cdot$ ); por su parte, los no radicales son el ácido hipocloroso ( $HOCl$ ), ozono ( $O_3$ ), superóxido ( $^1O_2$ ) y el  $H_2O_2$ . Así mismo, se encuentran moléculas oxidantes que contienen nitrógeno como el  $NO$ , peroxinitrito ( $ONOO$ ), y dióxido de nitrógeno ( $NO_2$ ) denominadas ERN (73), todas estas moléculas son altamente reactivas debido a la presencia de electrones no apareados. Las especies reactivas son producidas en el metabolismo normal y forman parte de un proceso homeostático, sin embargo, cuando existe la presencia de un factor ambiental de estrés, los niveles de las ERO y ERN tienden a incrementar, reaccionando como consecuencia con biomoléculas como los lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, lo cual genera daño estructural y funcional en la células denominado estrés oxidativo, de manera que es de vital importancia su regulación (74).

Existen diferentes tipos de radicales libres. Dentro de estos encontramos los derivados del oxígeno, nitrógeno, carbono y azufre. Los radicales derivados del oxígeno son los más comunes producidos por los organismos vivos, estos se producen a partir de las siguientes reacciones:



Siendo el  $O_2^-$ ,  $\cdot OH$ , y  $H_2O_2$ , los subproductos de mayor importancia en el estrés oxidativo. El anión  $^1O_2$  es la ERO más común y es generado principalmente por la mitocondria en la reducción parcial del oxígeno a agua que se lleva a cabo en los

complejos de la cadena respiratoria, especialmente en los complejos I (nicotinamida adenina dinucleótido (NADH): ubiquinona oxidoreductasa) y el complejo III (ubiquinol: citocromo c reductasa). De igual manera, este radical se puede producir en la hemo oxidación y por acción de otras enzimas como dihidrorotato deshidrogenasa, aldehído oxidasa y xantin oxidasa. El  $H_2O_2$  es la molécula menos reactiva de las ERO, es producida por la enzima SOD y xantin oxidasa. El radical -OH es el más peligroso ya que es el más reactivo, se produce por el exceso de el anión  $^1O_2$ , la descomposición del agua y la reacción de Fenton. Por otra parte, el  $^1O_2$  puede oxidar directamente proteínas, ADN y lípidos (75).

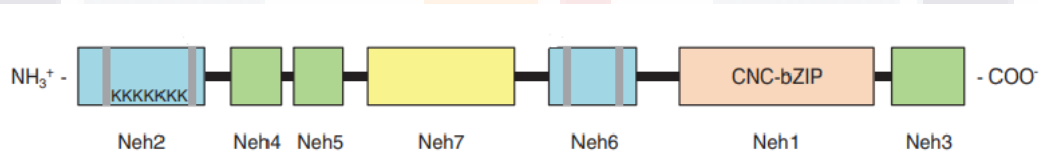
Dentro de los radicales derivados del carbono se encuentran los radicales ROO y RO. La exposición a rayos UV o la presencia de iones de metales de transición pueden producir la lisis de peróxidos para producir los dos radicales mencionados anteriormente. Es importante mencionar que, los ROO se forman de los lípidos, proteínas, ADN y carbohidratos durante el estrés oxidativo (75).

Por su parte, dentro de los radicales derivados del nitrógeno se encuentran especialmente el NO y sus derivados como el nitrato, nitrito, ONOO y 3-nitrotirosina. El NO se produce por la lisis de arginina a citrulina por medio de la enzima óxido nítrico sintasa. Su función en estadios normales es como neurotransmisor y un regulador de la presión arterial, sin embargo, en estadios patológicos participa como un agente oxidante. Cuando el NO se encuentra en la mitocondria, puede inhibir el complejo citocromo c oxidasa, por lo que altera la función normal de la mitocondria e incrementa la producción de estrés oxidativo. NO es capaz de modificar directamente el ADN e inhibir su reparación (75).

En los mamíferos las principales fuentes biológicas de las ERO son la mitocondria, retículo endoplásmico, peroxisomas, citosol, membrana plasmática y el espacio extracelular. Son diferentes los procesos envueltos en la producción de estos agentes oxidantes, dentro de los cuales encontramos la fosforilación oxidativa, la activación de fagocitos y por la actividad de diversas enzimas (75).

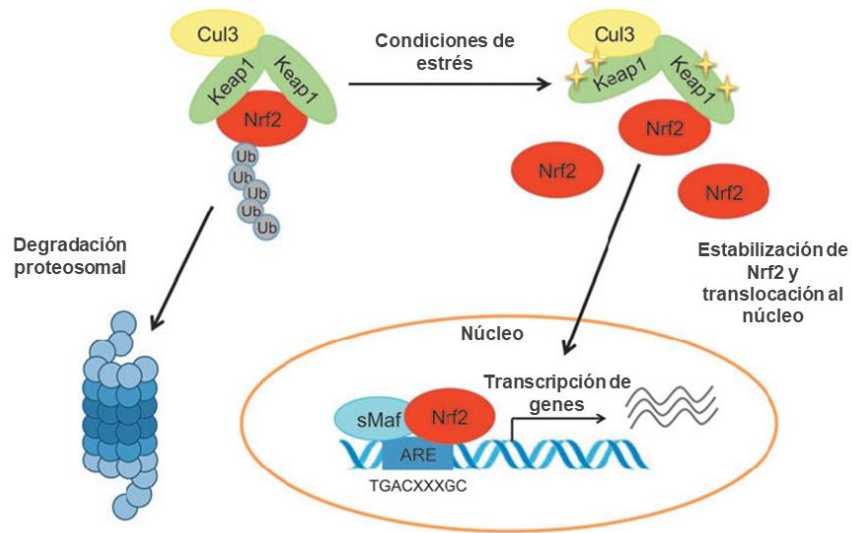
**8.2.1.5.4.2. Nrf2 y estrés oxidativo**

Uno de los mecanismos de defensa que ayudan a contrarrestar los efectos del estrés oxidativo es mediante la activación del factor de transcripción Nrf2 (76,77). Este factor de transcripción tiene un rol muy importante en la regulación de la expresión de enzimas antioxidantes y detoxificantes, específicamente controla la expresión de diversos sistemas antioxidantes como el sistema glutatión, tioredoxina, así como, enzimas que participan en la generación de ERO (76,78). El Nrf2 es una proteína que tiene 7 dominios de proteína homóloga Nrf2-ECH (Neh) (Figura 6). El dominio Neh 1 es el que se une al sitio en el ADN, además se encarga de la dimerización con las proteínas pequeñas Maf; el Neh2 interactúa con la proteína 1 asociada a ECH tipo Kelch (Keap1), el cual es inhibidor de Nrf2; Neh3, Neh4 y Neh5 son dominios de transactivación; Neh6 regula la estabilidad de Nrf2, y Neh7 es un dominio que se asocia a la unión el receptor  $\alpha$  retinoide X (RXR $\alpha$ ) (76).



**Figura 6. Estructura de la proteína Nrf2.** Recuperado de (76).

Bajo condiciones normales Nrf2 se regula mediante dos moléculas de Keap1 que se unen al dominio Neh2 de Nrf2, las cuales funcionan como adaptadores de la enzima ubiquitin ligasa culina 3 (CUL3) para finalmente ser degradado por proteosomas. Sin embargo, bajo condiciones de estrés oxidativo Keap1 es inactivado por residuos de cisteína por lo que se libera Nrf2 y se trasloca al núcleo, donde se heterodimeriza con las proteínas pequeñas del fibrosarcoma musculoponeurótico (sMaf), se une a la secuencia específica de elementos de respuesta antioxidante (ARE) y se activa la transcripción de elementos antioxidantes (Figura 7) (76).



**Figura 7. Activación de Nrf2.** Recuperado de (76).

#### 8.2.1.6. Diagnóstico del queratocono

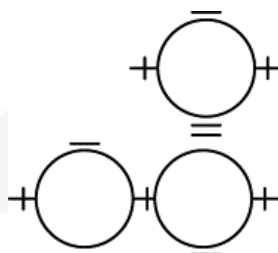
Existen diversos métodos de diagnóstico para el queratocono. El primero en descubrirse fue la queratometría, la cual mide el radio de la córnea que presenta la curvatura basada en la luz reflejada en la superficie corneal. Posteriormente, se desarrolló la queratoscopía que consiste en tomar imágenes de las reflexiones de la córnea en una serie de anillos concéntricos. En la actualidad, el método más utilizado para el diagnóstico de queratocono es la topografía corneal, ya que permite evaluar la superficie anterior de la córnea, no obstante, tiene algunas limitaciones como el hecho de que no puede evaluar la superficie posterior de la córnea, por lo que se desarrolló la tomografía corneal, que puede evaluar ambas superficies de la córnea, siendo más precisa en el diagnóstico de la enfermedad (79).

##### 8.2.1.6.1. Queratometría

La queratometría se realiza mediante un instrumento denominado queratómetro u oftalmómetro, el cual mide la curvatura de la región central de la córnea, equivalente a 2-4 mm de diámetro. Las mediciones obtenidas en este instrumento se denominan "K", cuyas unidades de medida son en dioptrías o milímetros. El principio de este método de análisis es la reflexión de las miras del instrumento sobre la córnea, la cual funciona como un espejo convexo. Mediante la

alineación de las miras podemos obtener los meridianos vertical y horizontal de la córnea (80).

Uno de los queratómetros más usados es el de Bausch y Lomb, en el cual en las miras se observan 3 círculos con el signo + en las posiciones 3 y 9 de un reloj y con el signo - en las posiciones 12 y 6 de un reloj (Figura 8) (80).



**Figura 8. Esquema de los círculos observados en las miras del queratómetro de Bausch y Lomb.** Recuperado de (80)

Se deben alinear las dos superficies de cada imagen, horizontal y vertical para poder obtener los valores de K. La diferencia entre los valores de los meridianos horizontales y verticales indica el tipo de astigmatismo (80).

#### **8.2.1.7. Tratamiento del queratocono**

El tratamiento del queratocono depende de la etapa de la enfermedad. En etapa inicial se maneja con anteojos, en etapa leve a moderada con lentes de contacto y en etapa avanzada se trata con algún tipo de cirugía o su combinación. Las opciones de cirugía que se tienen son el trasplante de córnea, implantación de anillos intracorneales, reticulación de colágeno corneal, procedimientos con láser e implantación de lentes intraoculares (21).

##### **8.2.1.7.1. Trasplante de córnea**

También denominada queratoplastia. Es un procedimiento en el cual se reemplaza la córnea completa por una córnea sana de un donante, llamado también queratoplastia penetrante. Sin embargo, en la actualidad, se ha ido modificando esta técnica en la cual es posible reemplazar sólo la capa de la córnea de interés o también denominada queratoplastia laminar profunda (21,81).

#### **8.2.1.7.2. Implantación de anillos intracorneales**

Este procedimiento consiste en la implantación de anillos de polimetacrilato de metilo en el estroma corneal para restaurar la forma de la córnea, con el objetivo de mejorar la agudeza visual o tolerar el uso de lentes de contacto (21,82).

#### **8.2.1.7.3. Reticulación de colágeno corneal**

Esta técnica tiene como propósito aumentar la rigidez de la córnea y recuperar el comportamiento biomecánico. Consiste en la eliminación de epitelio corneal en la zona central de la córnea, aproximadamente de 6-7 mm de diámetro. Posteriormente, se aplica solución de riboflavina y se irradia con luz UV, de esta manera la luz activa la riboflavina para generar ERO que producen enlaces covalentes entre las fibras de colágeno del estroma para reestructura el colágeno. Evidentemente, la irradiación con luz UV es mucho menor que el umbral de daño (21,83).

#### **8.2.1.7.4. Láser**

Estas técnicas básicamente consisten en cambiar de manera permanente la forma de la córnea mediante un láser, el cual elimina una pequeña cantidad de tejido del estroma corneal o de alguna capa de la córnea (21).

#### **8.2.1.7.5. Implementación de lentes intraoculares**

Esta técnica consiste en colocar un lente artificial transparente que se implanta en el ojo y se realiza en combinación con la implementación de anillos intracorneales o el trasplante de córnea, ya que por sí sólo no remodela la forma de la córnea, por lo que aplicados en conjunto se incrementa la agudeza visual (21)

#### **8.2.1.7.6. Efectividad de tratamientos**

Los anteojos, como se menciona anteriormente, se utilizan en etapas tempranas, sin embargo, conforme progresa la enfermedad se va desarrollando astigmatismo irregular por lo que la agudeza visual no se logra con este tipo de tratamiento. Por su parte, los lentes de contacto son la opción más común y exitosa para casos iniciales y moderados de queratocono. Existen varios tipos de lentes de



contacto, sin embargo, los más aptos para el queratocono son de hidrogel y permeables a gases (21,26,84).

No obstante, estos tratamientos únicamente alivian los déficits visuales sin detener el progreso de la enfermedad. Se estima que un 20% de los pacientes en etapa moderada progresan a una etapa avanzada donde el único tratamiento es el trasplante de córnea (26,85). Recientemente, la reticulación de colágeno de la córnea, la implantación del anillo intracorneal y la cirugía con láser han asumido popularidad debido a que estabilizan y mejoran la función visual (86). Sin embargo, en varios países se ha adoptado en la práctica clínica por realizar el reticulado de colágeno corneal para tratar el queratocono en etapa leve a moderada, demostrando tener una alta efectividad para detener e incluso retroceder la enfermedad e impidiendo a los pacientes a progresar a una etapa avanzada en la que se requiera trasplante de córnea (85,87).

#### **8.2.2. Modelo animal de ectasia corneal**

Como se ha mencionado anteriormente, las ectasias corneales conllevan principalmente un proceso de degradación del estroma corneal y posterior protrusión de la córnea, siendo más común el queratocono dentro de este grupo de enfermedades. Existe evidencia científica que existen enzimas degradadoras que generan la disminución del estroma, más aún existen reportes que demuestran un incremento de colagenasas en cultivos celulares de córneas con queratocono y un incremento de la curvatura de la córnea en córneas humanas después de aplicar tópicamente la colagenasa, lo cual ha llevado a los investigadores a probar el uso de esta enzima en córneas de animales, con el fin de producir un modelo de ectasia que pueda ayudar al desarrollo de nuevos diagnósticos y tratamientos (88–90).

Hasta el momento se han desarrollado dos modelos experimentales de queratocono en animales. El primero de ellos, fue desarrollado por Adhamy et al. (91) en ratones a los cuales se les administró 3 concentraciones de colagenasa (1, 3 y 6 mg/mL) en la córnea mediante una dosis de cada concentración respectivamente por inyección intraestromal, posterior a los 7 días después de la administración de la enzima se procedió a realizar evaluaciones morfológicas

mediante la tinción de hematoxilina-eosina. El segundo modelo de ectasia que se ha realizado es en conejo (*Oryctolagus cuniculus*) raza Nueva Zelanda, en donde se administró una solución oftálmica de colagenasa tipo II 5 mg/mL a una sola dosis. A los 15 días posteriores a la aplicación de la enzima, se realizaron mediciones de la curvatura de la córnea mediante queratometrías, así como evaluaciones de cambios morfológicos mediante la tinción hematoxilina eosina (88).

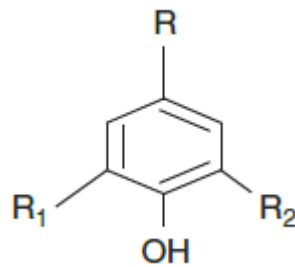
### **8.3. Fitonutrientes**

La alimentación juega un papel muy importante para el mantenimiento de la homeostasis corporal, debido a esto, en los últimos años se han estado investigando alimentos naturales que promueven la salud. La fitoterapia se refiere al uso de diferentes grupos de sustancias naturales, que incluyen hierbas y sus derivados, denominados fitonutrientes, para su uso como suplementos y ser regulados por comisiones sanitarias (92,93).

Evidencia científica ha demostrado que los fitonutrientes pueden actuar sobre diversas enfermedades crónicas degenerativas como cáncer, enfermedades cardiovasculares, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, hipertensión, inflamación, infecciones, así como, enfermedades psiquiátricas. Los fitonutrientes más importantes en base a su naturaleza química y sus propiedades se incluyen en la Tabla 2 (92).

#### **8.3.1. Polifenoles**

Son metabolitos secundarios de las plantas y existen alrededor de 8 000 variantes estructurales, las cuales se caracterizan por presentar anillos aromáticos unidos a radicales-OH (Figura 9) (92).



**Figura 9. Estructura general de los polifenoles.** R: Grupos funcionales.  
Recuperado de (92)

Se ha reconocido que los polifenoles pueden actuar a diferentes niveles, por ejemplo, la modulación de vías de señalización de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK), proteína quinasa B (Akt) y NF-κB, inhibición de la producción de citocinas proinflamatorias, suprimiendo la actividad de ciclooxigenasas (COX) e iNOS y disminuyendo la cantidad de radicales libres (92). En la actualidad existen muchos compuestos naturales que son el principio activo de aproximadamente el 74% de medicamentos por sus propiedades terapéuticas. Debido a los mecanismos patológicos que se producen en la mayoría de las enfermedades oculares como la apoptosis mediada por procesos inflamatorios y oxidativos, se están realizando investigaciones de compuestos naturales para mejorar o prevenir este tipo de enfermedades que afectan a la visión (94).

**Tabla 2. Fitonutrientes, sus fuentes dietéticas y sus propiedades terapéuticas.**  
Recuperado de (92).

Fitonutriente	Fuentes dietéticas	Propiedades terapéuticas
<b>Antocianinas</b>	Zarzamoras, cerezas, naranjas, frambuesas y uvas	Antialérgico, antiinflamatorio, antioxidante
<b>Carotenos</b>	Zanahorias, hojas verdes y rojas, verduras naranjas y amarillas, y calabaza	Anticarcinogénico, mejora la respuesta inmune, provee a la córnea protección contra los rayos UV, y estimula a las enzimas reparadoras de ADN.

**Tabla 2 (continuación). Fitonutrientes, sus fuentes dietéticas y sus propiedades terapéuticas.** Recuperado de (92).

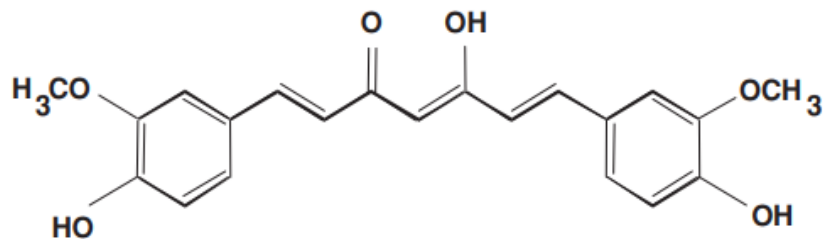
<b>Fitonutriente</b>	<b>Fuentes dietéticas</b>	<b>Propiedades terapéuticas</b>
<b>Licopenos</b>	Albaricoques, papaya, guayaba, tomate y sandía	Disminuye el riesgo de aterosclerosis y cáncer de próstata.
<b>Resveratrol</b>	Arándanos, cacahuates, uvas y vino tinto	Antioxidante, anticarcinogénico, previene el envejecimiento, diabetes y enfermedades cardíacas
<b>Fitoesteroles</b>	Soya	Anticarcinogénico y previene osteoporosis
<b>Probióticos</b>	Alimentos fermentados	Antimicrobiano, previene diarrea, antiinflamatorio, protector del intestino, mejora la respuesta inmune.
<b>Glucosinolatos</b>	Brócoli, col, coliflor, coles, vegetales crucíferos y rábano	Antioxidante, previene el daño en ADN, y reduce el riesgo de cáncer de mama y próstata
<b>Flavonoides</b>	Legumbres, té, uvas, aceite de oliva, cacao, nueces, cacahuates, especias, frutas, verduras, cebolla, manzana	Antibacterial, antioxidante, antiviral, analgésico, inhibe enzimas oxidantes, antiinflamatorio
<b>Quercetina</b>	Cebollas, trigo, uvas, té y piel de manzana	Antioxidante, reduce la lipoproteína de baja densidad (LDL)
<b>Isoflavonoides</b>	Soya, queso, tofu	Antioxidante, anticarcinogénico y previene la osteoporosis
<b>Limonoides</b>	Cítricos	Anticarcinogénico, insecticida, antibacterial, antifúngico y antiviral

**Tabla 2 (continuación). Fitonutrientes, sus fuentes dietéticas y sus propiedades terapéuticas.** Recuperado de (92).

Fitonutriente	Fuentes dietéticas	Propiedades terapéuticas
<b>Polifenoles</b>	Cereales, legumbres, semillas, frutas y verduras	Antioxidante, anticarcinogénico, antiinflamatorio, antineurodegenerativo, antiviral, protector de la piel, antialérgico, citoprotector y protector de ADN
<b>Ácidos grasos omega 3</b>	Pescado, aceites	Disminuye la presión arterial elevada, controla el colesterol, protector contra ataques al corazón, mejora memoria
<b>Fitoestrógenos</b>	Soya, avena, maíz, alfalfa	Anticarcinogénico, previene osteoporosis y síntomas de menopausia
<b>Terpenoides</b>	Vegetales, frutas y granos	Antimicrobiano, antiespasmódico, antiinflamatorio, quimioterapéutico e inmunomodulador

### 8.3.2. Curcumina

La curcumina es un polifenol derivado de la planta *Curcuma longa* que ha sido utilizado en medicina tradicional. Fue descubierto en 1815 y por su estructura química se identifica como 1,7-bis-(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, teniendo una forma enol en medios alcalinos y forma ceto en medios neutros y ácidos. Su estructura contiene grupos  $\beta$ -dicetonas, dobles enlaces entre carbonos y anillos aromáticos a los que se unen grupos hidroxilo y metoxilo (Figura 10). Se ha demostrado que tiene actividad antiinflamatoria, antioxidante, hipoglucémico y antitumoral, por lo que es un potencial agente terapéutico para enfermedades del segmento anterior del ojo, el cual incluye la córnea (95–98).



**Figura 10. Estructura de la curcumina.** Recuperado de (97)

#### 8.3.2.1. Efecto antioxidante de la curcumina

La curcumina actúa sobre el estrés oxidativo mediante tres formas: recolectando diferentes formas de radicales libres por la reactividad con los grupos fenoles de la curcumina, modulando la actividad de enzimas antioxidantes como glutatión reductasa (GSR), CAT y SOD, e inhibiendo la actividad de enzimas generadoras de radicales libres como lipoxigenasa y COX, además por ser un compuesto lipofílico elimina de manera eficiente los radicales peróxido (97,99).

Se ha demostrado que la curcumina a dosis pequeñas o medias tiene la capacidad de eliminar las ERO mediante el incremento de la actividad de enzimas antioxidante o bien aumento del nivel de proteína Nrf2, la cual incrementa en las células la capacidad de eliminar las ERO y reducir la apoptosis (100). El factor de transcripción Nrf2 puede ser activada por algunas quinasas como la quinasa regulada por señales extracelulares (ERK), MAPK y fosfoinositol-3-quinasa (PI3K). Se ha demostrado que las quinasas pertenecientes a las MAPK como la ERK, MAPK p38 y las c-Jun N-terminal quinasa (JNK) tienen la capacidad de unirse a sitios en los dominios para fosforilar Nrf2, activarla y translocarse en el núcleo con el fin de activar la transcripción de los diferentes sistemas antioxidantes (76,101,102). La curcumina tiene la capacidad de activar Nrf2 a través de la vía de señalización MAPK-Nrf2/Keap1 (Figura 11) (103).

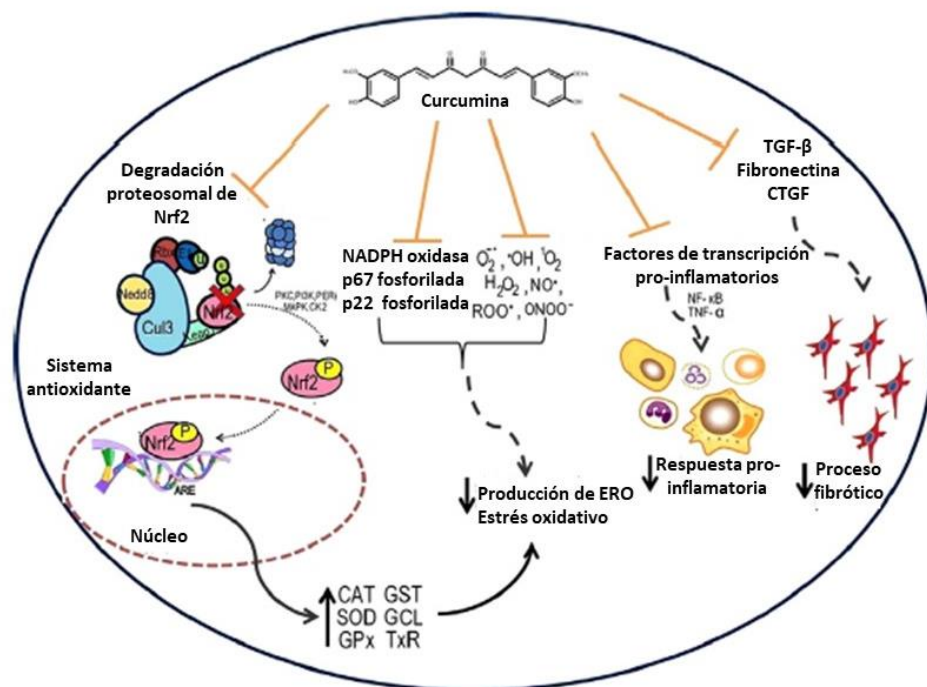


Figura 11. Mecanismos antioxidantes de la curcumina. Recuperado de (104)

## 9. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen diversas enfermedades relacionadas a la visión, una de ellas son las ectasias corneales que se definen como un trastorno en el cual ocurren cambios microestructurales de la córnea que alteran la curvatura y el comportamiento biomecánico (105). El queratocono es la ectasia más común, se presenta en su mayoría de forma bilateral y asimétrica, la cual se manifiesta con protrusión y adelgazamiento progresivo de la córnea que causa miopía y astigmatismo afectando la calidad visual (21,23–26).

La incidencia del queratocono es muy variable debido principalmente a factores ambientales, genéticos y nutricionales (31). Por ejemplo, en Estados Unidos se ha reportado una incidencia de 6 por cada 1000 habitantes (24) y también de 4 por cada 1000 habitantes (106). En comunidades asiáticas se ha estimado una incidencia de 19.6 por cada 100 000 habitantes y en comunidades caucásicas de 4.5 por cada 100 000 habitantes (33). Sin embargo, la incidencia anual estimada a nivel mundial es de 50-230 por cada 100 000 habitantes (31).

En México, se cuenta con información escasa sobre las estadísticas. Sin embargo, en un estudio realizado en pacientes de 10 – 20 años se obtuvo una tasa de prevalencia de 1.8%, afectando más a mujeres que hombres con una proporción de 6:3 (34). En contraste con respecto al género, existe otro estudio realizado en México en pacientes de 10-70 años, el cual reporta que del 100% de los pacientes el 58.43% era hombres y que la edad promedio de aparición fue de 24.5 años (35). Esta afección aparece generalmente en la segunda década de vida, no obstante, también suele desarrollarse en edades más tempranas o más tardías (21,24,26).

El queratocono se desarrolla por diferentes procesos que ocurren simultáneamente y presentan retroalimentación positiva o negativa entre ellos, como el estrés oxidativo (52). Diversos estudios han demostrado que en el queratocono se observa un incremento en las ERO. Estas especies son eliminadas mediante enzimas antioxidantes, sin embargo, en córneas con queratocono estas



enzimas no funcionan adecuadamente, lo que conlleva a un proceso de estrés oxidativo. Los queratocitos son células que se encuentran en la superficie corneal y son susceptibles al estrés oxidativo, por lo que juegan un rol importante en el desarrollo y progresión del queratocono (52). El estrés oxidativo se debe principalmente a los rayos ultravioletas que son absorbidos en su mayoría por el tejido de la córnea (52,66).

El tratamiento del queratocono depende de la etapa en la que se encuentre, los casos iniciales se manejan con el uso de gafas y en casos severos se realiza una queratoplastia, la cual consiste en remover la córnea entera o las partes superficiales de ésta y reemplazarlas con cornea sana (21). En la actualidad, hay componentes naturales que se postulan como posibles tratamientos ya que se tienen bien establecidos sus efectos terapéuticos en múltiples enfermedades, entre ellos, la curcumina (99). La curcumina es un fitoquímico con actividad antioxidante. Este compuesto, tiene la capacidad de reducir las ERO mediante diferentes mecanismos, por lo que disminuye el estrés oxidativo (97,99).

En la actualidad, la curcumina aún no ha sido probada en el queratocono, por lo que debido a sus propiedades ya determinadas y bajo la replicación de un modelo animal, se evaluará el efecto terapéutico de la curcumina sobre el estrés oxidativo; lo que genera la siguiente pregunta de investigación:

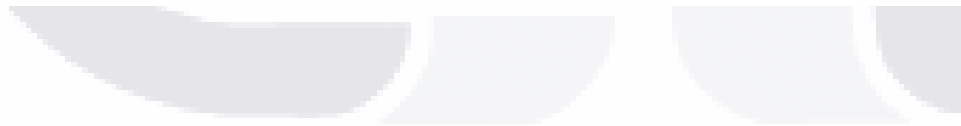
¿Cuál es el efecto terapéutico de la curcumina sobre el estrés oxidativo en un modelo animal de queratocono?

## 10. JUSTIFICACIÓN

Existen múltiples enfermedades que afectan la superficie ocular, una de ellas es el queratocono, cuyo impacto radica en la consecuente aparición de miopía y astigmatismo afectando la calidad visual de los pacientes (21,24,26), debido a que en la fisiopatología se involucran diferentes procesos patológicos como el estrés oxidativo, los cuales alteran el funcionamiento normal de la córnea (52).

El impacto es mayor en las personas jóvenes (21,24,26,35) ya que sus actividades escolares o laborales se ven severamente afectadas debido a los requerimientos visuales que sus ocupaciones demandan a cualquier distancia. El tratamiento del queratocono varía de acuerdo a la etapa en la que se encuentre, sin embargo, esta enfermedad es recurrente y no existe un tratamiento correctivo, de modo que puede progresar hasta llegar a requerir cirugía (21).

Los mecanismos patológicos de las enfermedades oculares del segmento anterior del ojo están relacionados con estrés oxidativo. Por lo que se han realizado investigaciones en este tipo de enfermedades que comprueban el efecto terapéutico de la curcumina sobre el estrés oxidativo (95,107). No obstante, el efecto terapéutico de la curcumina en el queratocono no ha sido probado, por lo tanto, es indispensable la investigación sobre un posible tratamiento que sea menos invasivo que la queratoplastia penetrante, más eficaz y accesible.



## 11.OBJETIVOS

### 11.1. Objetivo general

Evaluar el efecto terapéutico de la curcumina sobre el estrés oxidativo en un modelo animal de queratocono.

### 11.2. Objetivos específicos

1. Estandarizar el modelo animal de ectasia corneal.
2. Identificar el daño en la superficie corneal y adelgazamiento del estroma del modelo animal.
3. Establecer las dosis terapéuticas de curcumina.
4. Analizar el efecto antioxidante de la curcumina en un modelo animal de queratocono.

## 12.HIPÓTESIS

**H<sub>i</sub>:** La curcumina tiene efecto terapéutico sobre el estrés oxidativo en un modelo animal de queratocono.

**H<sub>o</sub>:** La curcumina no tiene efecto terapéutico sobre el estrés oxidativo en un modelo animal de queratocono.

## 13.METODOLOGÍA

### 13.1. Tipo de estudio

Experimental, longitudinal, prospectivo

### 13.2. Variables de estudio

**Variable #1:** Daño en superficie de la córnea

**Concepto:** La córnea se encuentra en la porción anterior del globo ocular y es una estructura avascular y transparente, formada por 5 capas: epitelio anterior de la córnea, membrana de Bowman, estroma de la córnea, membrana de Descemet y epitelio posterior de la córnea (108). En el queratocono se presenta empinamiento y protuberancia corneal con una punta cónica excéntrica y delgada (28).

**Operacionalización:** Queratometría

**Dimensión:** Meridiano vertical (K1), Meridiano horizontal (K2), Promedio de K (Km)

**Tipo de variable:** Dependiente, cuantitativa, continua

**Escala de medición:** Razón

**Unidad de medida:** Dioptrías

**Variable #2:** Cambios del estroma de la córnea

**Concepto:** El estroma corneal es la capa que representa la mayor parte de la córnea y se encuentra entre las membranas de Bowman y de Descemet, está compuesta principalmente formada por colágeno tipo I. En el estroma también se encuentran queratocitos (108). El adelgazamiento de la córnea en el queratocono se produce porque se disminuyen las láminas colágenas en el estroma de la córnea (52)

**Operacionalización:** Microscopía

**Tipo de variable:** Dependiente, cualitativa

**Variable #3:** SOD

**Concepto:** Es una de las principales enzimas antioxidantes que se encargan de eliminar los radicales de anión superóxido derivado de estimulantes extracelulares como la radiación y los productos producidos en la matriz mitocondrial derivados del metabolismo de la cadena de transporte de electrones (109).

**Operacionalización:** Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

**Dimensión:** Intensidad de bandas

**Tipo de variable:** Dependiente, cuantitativa, continua

**Escala de medición:** Razón

**Unidad de medida:** %

**Variable #4:** Nox-2

**Concepto:** Es una enzima transmembranal que conduce el transporte de electrones a través de la membrana y reduce el oxígeno molecular en superóxidos, por lo que es considerada como la principal fuente de radicales libres (110).

**Operacionalización:** PCR

**Dimensión:** Intensidad de bandas

**Tipo de variable:** Dependiente, cuantitativa, continua

**Escala de medición:** Razón

**Unidad de medida:** %

#### **Variable #5: Nrf2**

**Operacionalización:** Es un factor de transcripción que se activa cuando hay un exceso de estrés oxidativo mediante la regulación de la expresión de genes que codifican a las enzimas antioxidantes (111).

**Operacionalización:** PCR

**Dimensión:** Intensidad de bandas

**Tipo de variable:** Dependiente, cuantitativa, continua

**Escala de medición:** Razón

**Unidad de medida:** %

#### **13.3. Universo de trabajo**

Conejos blancos raza Nueva Zelanda con un peso de 3.0-4.0 Kg y ratas Wistar con un peso de 200-300 g, los cuales se mantuvieron en el bioterio, bajo condiciones controladas de temperatura (22-24 °C) y ciclos de luz-oscuridad de 12-12 horas. La dieta consistió en comida y agua de la llave *ad libitum*.

#### **13.4. Muestreo y grupos de trabajo**

El muestreo fue no probabilístico por cuota. Para la selección de grupos se dividieron aleatoriamente los conejos.

Para la estandarización del modelo animal de queratocono se trabajaron con ratas Wistar (n=3 animales = 6 córneas) y conejos Nueva Zelanda (n=10 animales = 20 córneas). Las córneas de los animales se dividieron en 2 grupos:

- Grupo control: Córneas izquierdas
- Grupo experimental: Córneas derechas

Una vez estandarizado el modelo animal se analizó el efecto de la curcumina sobre el estrés oxidativo en el modelo animal de queratocono, se trabajaron con 8

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

conejos equivalente a 16 córneas, distribuidos en los siguientes grupos experimentales:

Curcumina 40  $\mu$ M (n=4 conejos = 8 córneas)

- Grupo control: Córneas izquierdas
- Grupo experimental: Córneas derechas

Curcumina 80  $\mu$ M (n=4 conejos = 8 córneas)

- Grupo control: Córneas izquierdas
- Grupo experimental: Córneas derechas

### 13.5. Diseño experimental

La evaluación del efecto antioxidante de la curcumina se evaluó en un modelo *in vivo* con conejos raza Nueva Zelanda, ya que es un modelo adecuado para evaluar la eficacia de tratamientos porque permite identificar alteraciones en la superficie corneal mediante pruebas clínicas realizadas en humanos (88) .

Se desarrollaron 3 modelos animales. En el modelo A se trabajó en conejo Nueva Zelanda al cuál se le realizó debridamiento epitelial corneal para posteriormente administrar colagenasa II mediante gotas oftálmicas (88). El modelo animal B fue en rata Wistar en el cual, se administró colagenasa II mediante inyección intraestromal (91). El modelo animal C se desarrolló en conejo Nueva Zelanda siguiendo la metodología del modelo de Rata Wistar. El modelo A tuvo una duración de 14 días. Los modelos B y C tuvieron una duración de 7 días. Se evaluaron queratometrías antes de administrar la colagenasa II y al finalizar la duración del modelo, así mismo, se procedió al sacrificio de animales para evaluar cambios morfológicos.

Una vez estandarizado el modelo animal, se administraron concentraciones diferentes de curcumina mediante gotas oftálmicas diariamente hasta cumplir el séptimo día. Se evaluaron queratometrías antes y después de la administración de curcumina y los niveles de expresión génica de marcadores de estrés oxidativo.

Se consideró utilizar las concentraciones de 40 y 80  $\mu$ M debido a que son concentraciones que se han utilizado en solución oftálmica para distintas enfermedades en la córnea. Además, se ha demostrado que estas concentraciones en la córnea logran disminuir la expresión del factor de transcripción NF- $\kappa$ B involucrado en la expresión de citocinas proinflamatorias, y el cuál a su vez está relacionado con la actividad del factor de transcripción Nrf-2 (112,113).

### **13.6. Técnicas y procedimientos**

#### **13.6.1. Modelo animal de queratocono A en conejo raza Nueva Zelanda mediante administración de colagenasa II en gotas oftálmicas**

Para la inducción de queratocono, los conejos se anestesiaron con 10 mL/Kg de pentobarbital sódico 1:10 vía intraperitoneal. Después se realizó un debridamiento epitelial con la ayuda de un bisturí y alcohol 70%, posteriormente se administraron 300  $\mu$ L de solución de colagenasa tipo II (Sigma, C2-28) a una concentración de 5 mg/mL. Para el grupo control, se siguió el mismo protocolo, pero utilizando solución salina balanceada con dextrano al 5%, el cual fue la solución vehículo de la colagenasa II. Al día 14 después de la administración de colagenasa II se procedió al sacrificio de los animales.

#### **13.6.2. Modelo animal de queratocono B en rata Wistar mediante la administración de colagenasa II por inyección intraestromal**

Las ratas Wistar se anestesiaron con Sevoflurano. Después se inyectaron vía intraestromal 5  $\mu$ L de solución de colagenasa tipo II (Sigma, C2-28) a una concentración de 2.5 mg/mL. Para el grupo control, se siguió el mismo protocolo, pero utilizando solución salina balanceada con dextrano al 5%, el cual fue la solución vehículo de la colagenasa II. Al día 7 después de la administración de colagenasa II se procedió al sacrificio de los animales.



### **13.6.3. Modelo animal de queratocono C en conejo raza Nueva Zelanda mediante la administración de colagenasa II por inyección intraestromal**

Para la inducción de queratocono, los conejos se anestesiaron con 10 mL/Kg de pentobarbital sódico 1:10 vía intraperitoneal. Después se inyectaron vía intraestromal 5  $\mu$ L de solución de colagenasa tipo II (Sigma, C2-28) a una concentración de 2.5 mg/mL. Para el grupo control, se siguió el mismo protocolo, pero utilizando solución salina balanceada con dextrano al 5%, el cual fue la solución vehículo de la colagenasa II. Se administró antibiótico cloranfenicol (Cloramfeni® Ofteno, Sophia®) durante los 7 días posteriores a la administración de la colagenasa II para evitar posibles infecciones. Al día 7 después de la administración de colagenasa II se procedió al sacrificio de los animales.

### **13.6.4. Queratometrías**

Las queratometrías se llevaron a cabo antes de la administración de la colagenasa II y el día del sacrificio de los animales. Así mismo, se realizaron queratometrías antes y después del tratamiento con curcumina. Se utilizó un queratómetro manual. Se tomó una medición en cada tiempo y se calculó el Km el cual fue obtenido en dioptrías.

### **13.6.5. Tinción Hematoxilina-Eosina**

Los conejos fueron sacrificados con pentobarbital sódico concentrado vía intracardiaca (1 mL/Kg). Se obtuvo la córnea entera para la evaluación morfológica. Las córneas se fijaron en paraformaldehído al 4% durante 3 días a temperatura de refrigeración 8 °C. Después se procesaron mediante el procesador de tejidos STP120 ThermoFischer™ y se incluyeron en cubos de parafina. Se realizaron cortes de un grosor de 8  $\mu$ m utilizando un microtomo 212SRT Leica™, posteriormente se incubaron por 24 horas a 47°C. Luego las laminillas con las muestras se pasaron por el tren de tinción de Hematoxilina-Eosina (ver Anexos), y finalmente, se montaron las laminillas ya teñidas con entellán. Se obtuvieron imágenes en microscopio de campo claro a 20x.

#### **13.6.6. Tratamientos de curcumina**

Se preparó una solución madre de curcumina (Sigma, C1386) a una concentración de 10 mM utilizando como disolvente alcohol 96%. Partiendo de esta solución se obtuvieron diluciones de las concentraciones establecidas de 40  $\mu$ M y 80  $\mu$ M, utilizando como disolvente solución salina balanceada (SSB Pisa®). Después de la exposición al tratamiento, se procedió a realizar las siguientes pruebas. A los controles se les administró únicamente solución salina balanceada.

#### **13.6.7. Extracción de ácido ribonucleico (ARN)**

Las córneas tratadas con colagenasa II en presencia y ausencia de las dos concentraciones de curcumina fueron procesadas con el kit TRIzol™ Plus RNA Purification Kit, siguiendo el protocolo del fabricante. Las córneas obtenidas fueron recolectadas en tubos Eppendorf con 1 mL de TRIzol® y se homogenizaron con un homogenizador de rotor. Se agregó 0.2 mL de cloroformo grado molecular por cada mL de TRIzol® utilizado, se mezcló vigorosamente durante 15 segundos. Las muestras se centrifugaron a 13,000 xg por 15 minutos a 4°C. Se transfirieron 500  $\mu$ L de la fase acuosa en un tubo Eppendorf limpio, se añadió 500  $\mu$ L de etanol 70% y se mezcló vigorosamente por 30 segundos usando el vórtex. Se transfirió toda la muestra en tubos con columnas, se centrifugó a 12,000 xg por 15 segundos y se desechó el líquido sobrante. Se agregaron 700  $\mu$ L del buffer de lavado I, se centrifugó a 12,000 xg por 15 segundos y se eliminó el líquido sobrante. Después se añadieron 500  $\mu$ L del buffer de lavado II, se siguió el mismo procedimiento de centrifugado y se repitió este paso de lavado una vez más. Finalmente, la columna se transfirió a un tubo Eppendorf limpio y se añadieron 30  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 14,000 xg por 2 minutos. El volumen final del eluido se guardó en el ultracongelador a -80°C.

**13.6.8. Cuantificación del ARN**

El ARN obtenido fue cuantificado en el espectrofotómetro NanoDrop 2000 de Thermo Scientific™ con la absorbancia 260 y 280 nm. La pureza se determinó con la relación  $A_{260/230}$  y  $A_{260/280}$ , considerando valores puros arriba de 1.5 y 1.8 respectivamente.

**13.6.9. Evaluación de la integridad del ARN**

La integridad se evaluó mediante electroforesis en agarosa al 1% en buffer TAE 1x (Tris Base, Ácido acético glacial, Ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5M pH=8.0). Se cargaron 5  $\mu$ L de las muestras de ARN con 1  $\mu$ L de Green Loading Buffer 6x. Se trabajó la migración a 100 V por 30 minutos, en la cámara de electroforesis EasyCast™ B2 de Thermo Scientific™. Se usó un marcador de peso molecular de 50 bp. Finalmente, las bandas se revelaron con bromuro de etidio y se observaron en el transiluminador con luz UV.

**13.6.10. Retrotranscripción del ARN**

La retrotranscripción del ARN se realizó mediante el kit iScript™ cDNA Synthesis de Bio-Rad®, siguiendo las instrucciones fabricante. Se consideraron las siguientes condiciones de la mezcla:

**Tabla 3. Mezcla para la reacción de síntesis de ADN complementario (cADN)**

<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
5x iScript Reaction Mix	4 $\mu$ L
iScript Reverse Transcriptase	1 $\mu$ L
Agua libre de nucleasa	Variable
ARN	1 $\mu$ g/ $\mu$ L
<b>Total</b>	<b>20 <math>\mu</math>L</b>

La mezcla completa se procesó en el termociclador siguiendo el siguiente protocolo:

**Tabla 4. Protocolo del termociclador para la reacción de síntesis de cADN**

Reacción	Temperatura	Tiempo
Cebado	25°C	5 minutos
Transcripción reversa	46°C	20 minutos
Inactivación de la transcripción reversa	95°C	1 minuto

**13.6.11. Análisis por PCR semicuantitativa**

La concentración de cADN utilizada para todas las muestras fue de 1 µg/µL. La reacción de PCR se realizó mediante el kit Taq DNA Polymerase Recombinant de Thermo Scientific™ y los oligonucleótidos correspondientes (T4OLIGO®). Se consideraron las siguientes condiciones de mezcla para la reacción de PCR en el termociclador:

**Tabla 5. Mezcla para la reacción de PCR**

Reactivo	Cantidad por reacción
10x PCR Buffer	2.5 µL
dNTP 10 mM	0.5 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	0.75 µL
Oligonucleótido forward	0.25 µL
Oligonucleótido reverse	0.25 µL
Taq DNA polymerase	0.125 µL
Templado cADN (1 µg/µL)	1 µL
Agua libre de nucleasas	19.625 µL
<b>Total</b>	<b>25 µL</b>

Los oligonucleótidos utilizados para la PCR se muestran a continuación:

**Tabla 6.** Oligonucléotidos utilizados en PCR

<b>Gen</b>	<b>Forward (5'→3')</b>	<b>Reverse (5'→3')</b>
Nrf2	TTAGTGCTTTTGAGGATTCTTTTCGG	AATTCTGTGCTTTTCAGGGTGGTTCT
SOD1	GGTGGTCAAGGGACGCATAA	CACATCAGCCACACCATTGC
Nox-2	TGTGAATGCCCGAGTCAACA	AACCGCGTTACAGCCACTAA
GAPDH	CGAGCTGAACGGGAAACTCA	CCCAGCATCGAAGGTAGAGG

GAPDH, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

Las bandas se revelaron con bromuro de etidio y se observaron en el transiluminador con luz UV. Se realizó el análisis de densitometría de bandas mediante el software ImageJ de Fiji, para obtener el porcentaje de intensidad de bandas.

**13.6.12. Análisis estadístico**

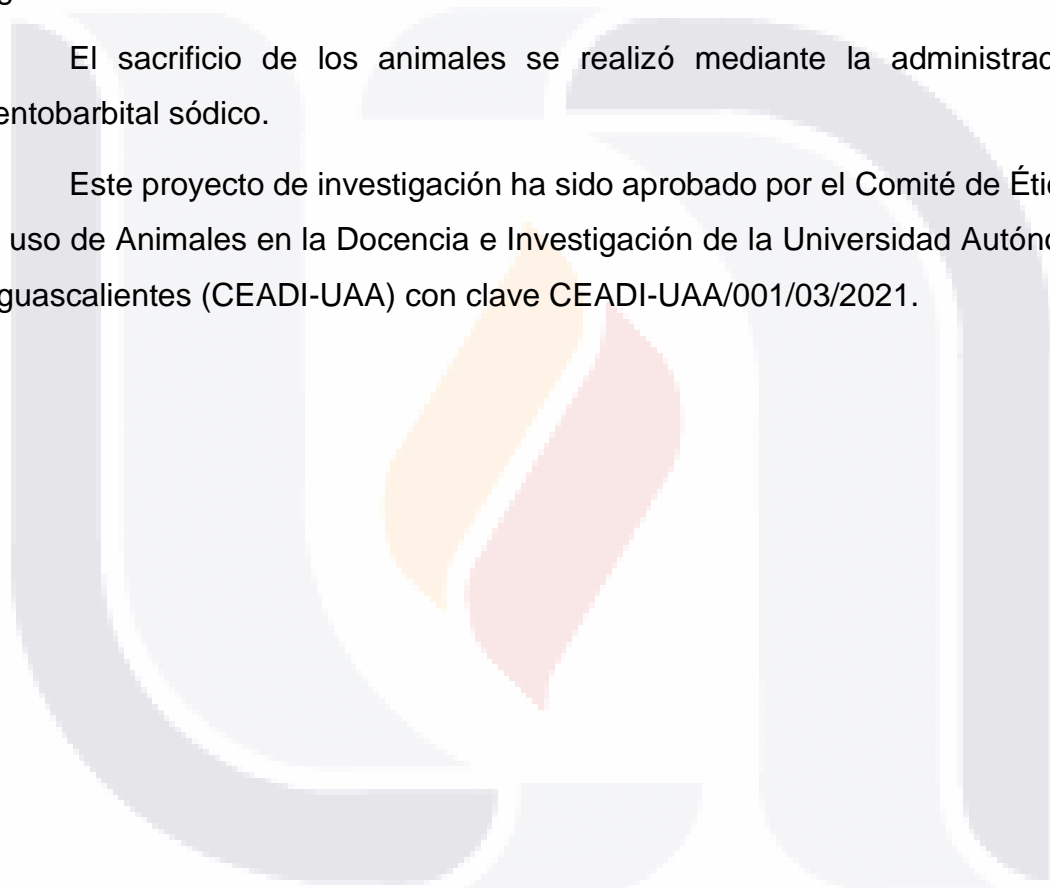
Los datos obtenidos de las variables cuantitativas fueron capturados en hojas de cálculo del software Microsoft Excel. Para el análisis estadístico se utilizó el software Prism GraphPad 8, en donde se evaluó la media, error estándar, las pruebas de normalidad por Shapiro-Wilk y la comparación de medias mediante la prueba paramétrica t de Student o la comparación de rangos mediante la prueba no paramétrica Wilcoxon debido a que son muestras pareadas. Se consideró una *p* significativa  $\leq 0.05$ .

#### 14. CONSIDERACIONES ÉTICAS

Los animales se trataron conforme a lo especificado en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” y el Reglamento de ética para el uso de animales en la docencia e investigación en la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

El sacrificio de los animales se realizó mediante la administración de pentobarbital sódico.

Este proyecto de investigación ha sido aprobado por el Comité de Ética para el uso de Animales en la Docencia e Investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes (CEADI-UAA) con clave CEADI-UAA/001/03/2021.



## 15.RESULTADOS

### 15.1. Alteración de la superficie corneal por acción de la colagenasa II en los modelos animales de queratocono

Los cambios en la superficie corneal se evaluaron cuantitativamente mediante las queratometrías.

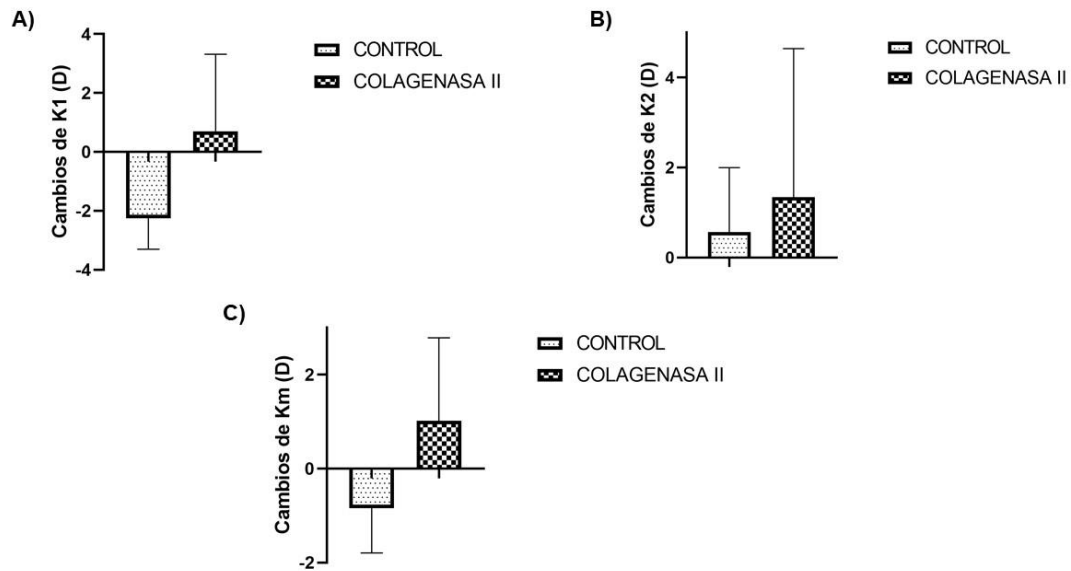
El modelo animal A el cual fue realizado en conejo mediante la administración de colagenasa II por gotas oftálmicas no mostró cambios en la superficie corneal a los 14 días después de su administración.

Los valores queratométricos de la tabla 7 demuestran que no hay diferencia significativa en el día 0 entre los dos grupos para K1 ( $p=0.76$ ), K2 ( $p=0.88$ ) y Km ( $p=0.88$ ). Tampoco, en el día 14 existe diferencia estadística significativa para K1 ( $p=0.52$ ), K2 ( $p=0.50$ ) y Km ( $p=0.53$ ). La variación de los promedios del día 0 al día 14 indica que, no hay cambios significativamente estadísticos en K1 ( $p=0.44$ ), K2 ( $p=0.88$ ) ni Km ( $p=0.53$ ) (Figura 12).

**Tabla 7. Valores queratométricos antes y después de la administración de la colagenasa II en gotas oftálmicas (n=4)**

Factor	Grupo	Día 0	Día 14	Día 14- Día 0
K1 (D)	Control	45.00±0.54	42.75±1.13	-2.25±1.05
	Colagenasa II	44.68±1.20	45.38±2.88	0.70±2.62
	Valor p	0.76	0.52	0.44
K2 (D)	Control	43.94±1.17	44.50±0.31	056±1.43
	Colagenasa II	44.16±0.50	45.50±3.76	1.34±3.30
	Valor p	0.88	0.50	0.88
Km (D)	Control	44.47±0.83	43.63±0.48	-0.84±0.95
	Colagenasa II	44.42±0.76	45.44±2.42	1.02±1.77
	Valor p	0.88	0.53	0.53

*\*Los datos se presentan como media ± error estándar*

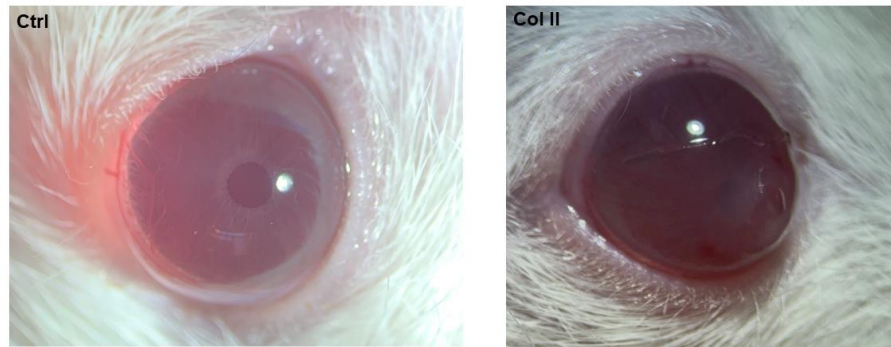


**Figura 12. Cambios en valores queratométricos después de la administración de gotas oftálmicas de colagenasa II.** A) K1 meridiano menos curvo. B) K2 meridiano más curvo. C) Km promedio de K. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar (n=4).

En el modelo animal B de queratocono el cuál fue en rata Wistar no se pudo realizar la prueba de queratometría debido a que la prueba queratométrica únicamente puede medir 3 mm del radio central de la córnea. Sin embargo, se obtuvieron imágenes de los ojos a los 7 días después de la administración de colagenasa II (Figura 13). Se demuestra que existe una alteración en la curvatura de la córnea, lo cual indica que este procedimiento tiene potencial para la inducción del queratocono.

Posteriormente este procedimiento se trasladó al conejo Nueva Zelanda (modelo animal C) en donde las pruebas queratométricas, demostraron que la colagenasa II altera la superficie de la córnea a los 7 días después de su administración. Los promedios queratométricos de la tabla 8 demuestran que no hay diferencia significativa en el día 0 entre los grupos para K1 ( $p=>0.99$ ), K2 ( $p=>0.99$ ) y Km ( $p=0.75$ ).





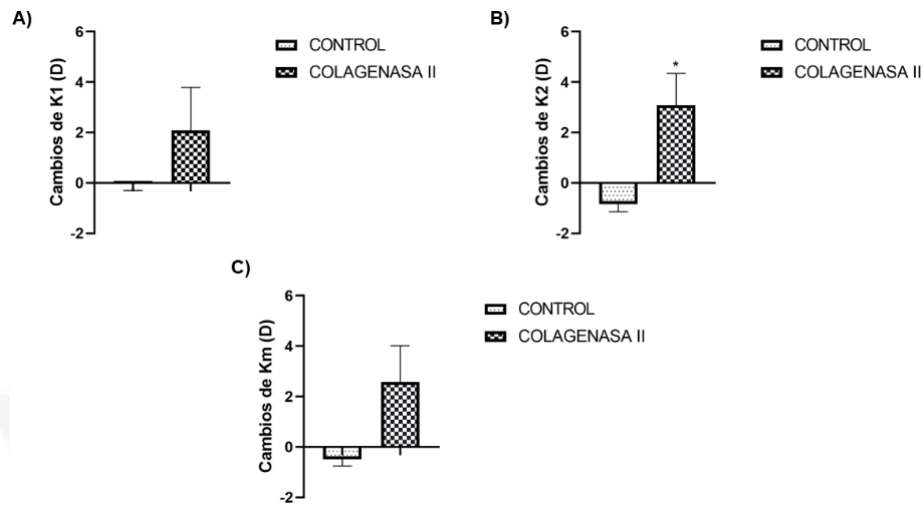
**Figura 13. Alteración de la curvatura de la córnea de rata Wistar después de la administración de colagenasa II por inyección intraestromal.**

Sin embargo, en el día 7 para K2 existe diferencia estadística significativa ( $p=0.03$ ) aunque no para K1 ( $p=0.28$ ) y Km ( $p=0.09$ ). Con respecto a la variación de los promedios del día 0 al día 7 se demuestra que, no presenta diferencia significativamente estadística K1 ( $p=0.25$ ) ni Km ( $p=0.06$ ), no obstante, K2 si presenta diferencia ( $p=0.01$ ) (Figura 14), lo cual nos confirma que este modelo si produce alteraciones en la superficie corneal.

**Tabla 8. Valores queratométricos antes y después de la administración de la colagenasa II por inyección intraestromal (n=6)**

Factor	Grupo	Día 0	Día 7	Día 7- Día 0
K1 (D)	Control	46.42±0.50	46.38±0.45	-0.04±0.26
	Colagenasa II	46.50±0.44	48.58±1.75	2.08±1.71
	Valor <i>p</i>	>0.99	0.28	0.25
K2 (D)	Control	46.33±0.53	45.50±0.37	-0.83±0.31
	Colagenasa II	46.42±0.52	49.50±1.13	3.08±1.26
	Valor <i>p</i>	>0.99	<b>0.03</b>	<b>0.01</b>
Km (D)	Control	46.38±0.49	45.88±0.38	-0.50±0.26
	Colagenasa II	46.46±0.48	49.02±1.41	2.58±1.43
	Valor <i>p</i>	0.75	0.09	0.06

*\*Los datos se presentan como media ± error estándar*



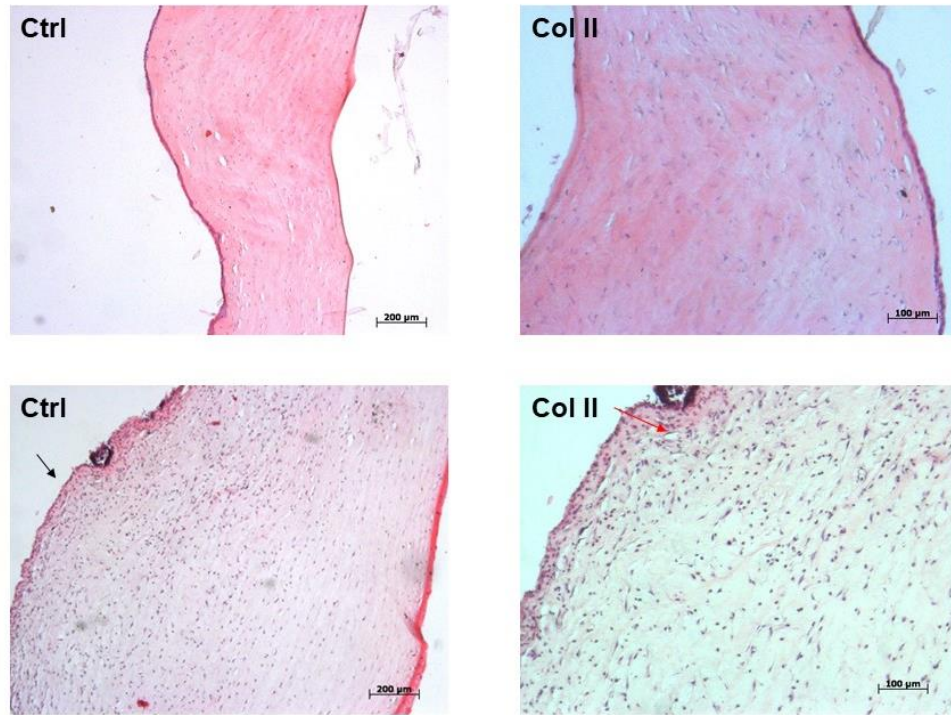
**Figura 14. Cambios en valores queratométricos después de la administración de colagenasa II por inyección intraestromal. A) K1. B) K2. C) Km promedio de K.** Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar (n=6). \*Estadísticamente significativo en comparación con el control (\*P: <0.05) por la prueba t de Student pareada.

### 15.2. Cambios morfológicos en la córnea por acción de la colagenasa II en los modelos animales de queratocono.

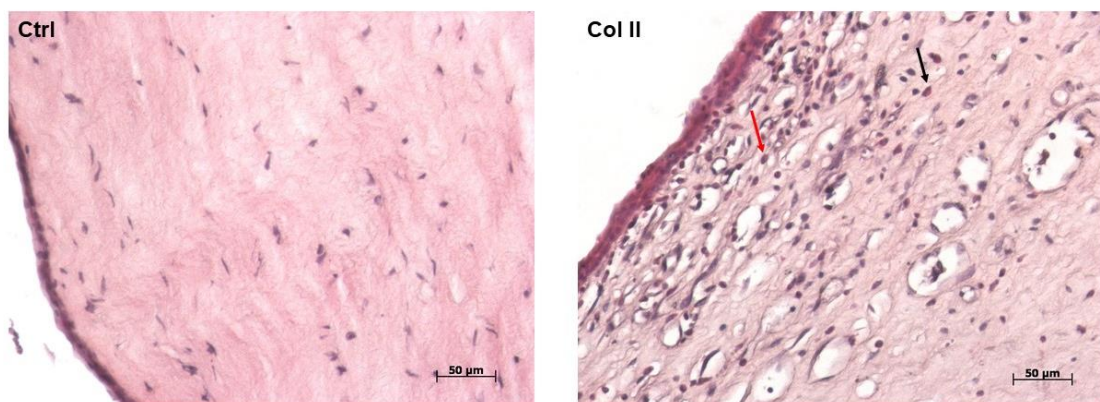
Los cambios morfológicos en la córnea se evaluaron cualitativamente mediante la tinción de hematoxilina eosina.

En las córneas del modelo animal de queratocono A, se observan algunos cambios histológicos dentro de los cuáles se encuentran pérdida total del epitelio, exceso de infiltrado celular inflamatorio, incremento en el grosor del estroma debido a la inflamación producida y hendiduras en el segmento anterior del estroma con respecto al control (Figura 15).

Dentro del infiltrado celular encontramos principalmente la presencia de neutrófilos y eosinófilos (Figura 16). Es importante mencionar que estos cambios morfológicos no simulan completamente a las características morfológicas del queratocono, por lo que se atribuye principalmente al procedimiento agresivo y a la colagenasa II. De manera que, se descartó este modelo animal.

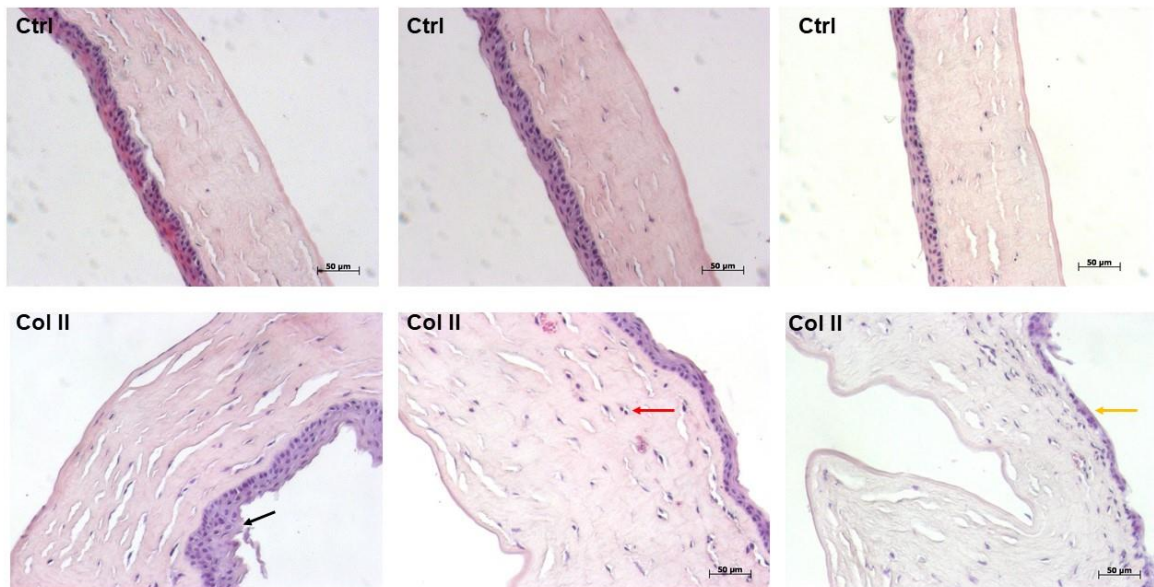


**Figura 15. Alteraciones morfológicas después de la administración de gotas oftálmicas de collagenasa II en conejo.** Los cambios morfológicos de las córneas expuestas a collagenasa II muestran cambios característicos a un proceso inflamatorio a comparación de los controles. Flecha negra: ausencia de epitelio, Flecha roja: Hendidura en el estroma. Así mismo se observa engrosamiento del estroma y presencia de células inflamatorias Se visualizó en microscopio campo claro (Aumento 500 y 1000, barra de escala 200 µm y 100 µm, respectivamente).



**Figura 16. Infiltrado celular proinflamatorio después de la administración de gotas oftálmicas de collagenasa II en conejo.** La presencia de infiltrado celular en las córneas expuestas a collagenasa II es mayor a comparación de los controles. Flecha negra: eosinófilos, Flecha roja: Neutrófilos. Se visualizó en microscopio campo claro (Aumento 2000, barra de escala 50 µm).

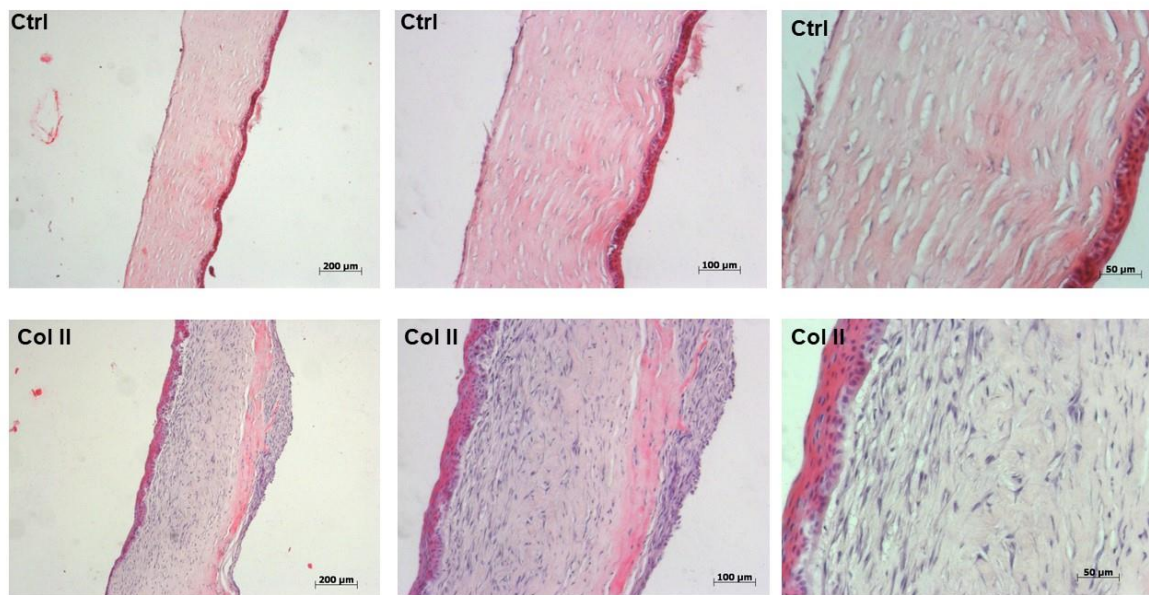
Al evaluar el tejido corneal del modelo animal B, se observaron los siguientes cambios: engrosamiento y adelgazamiento en algunas zonas del epitelio y presencia de infiltrado celular inflamatorio (Figura 17), lo cual indica que se está llevando a cabo un proceso apoptótico en las células epiteliales por la liberación de citocinas inflamatorias, a lo que a su vez nos indica que la colagenasa II per se genera un proceso inflamatorio dentro de la córnea debido a que es un agente extraño al tejido por lo que se activa el sistema inmunológico. Al ser un modelo en el que no se puede realizar queratometrías, se procedió a trasladar el procedimiento a conejo Nueva Zelanda.



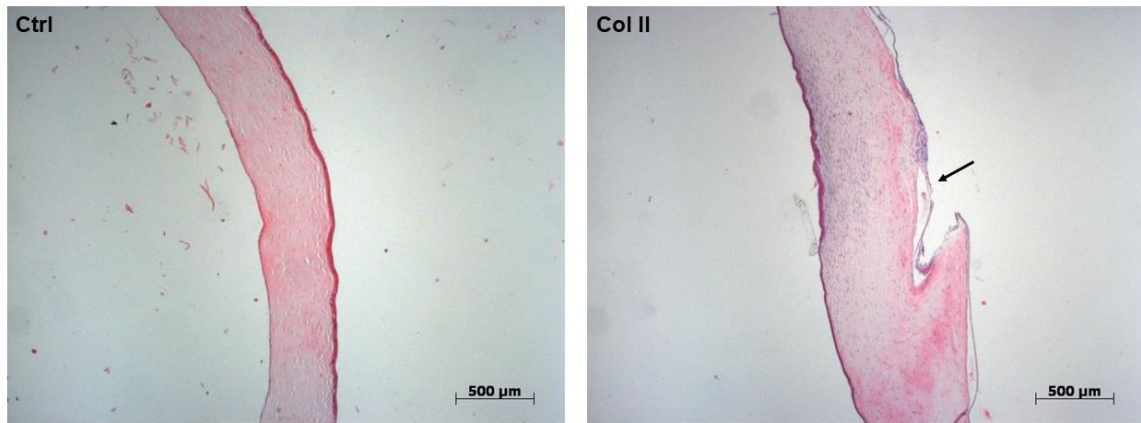
**Figura 17. Alteraciones morfológicas después de la administración de colagenasa II por inyección intraestromal en rata Wistar.** Los cambios morfológicos de las córneas expuestas a colagenasa II muestran cambios característicos a un proceso principalmente apoptótico en el epitelio a comparación de los controles. Flecha negra: engrosamiento de epitelio, Flecha roja: Células inflamatorias, Flecha amarilla: Adelgazamiento del estroma. Así mismo se observa presencia de células inflamatorias Se visualizó en microscopio campo claro (Aumento 2000, barra de escala 50 µm).

Finalmente, en las córneas del modelo animal de queratocono C, se observaron cambios muy importantes en las córneas experimentales a comparación de las córneas control. Dentro de los cambios se encuentra la disposición irregular

del epitelio, las fibras de colágeno dispuesta irregularmente, así como, una alta densidad de queratocitos, lo que genera un incremento en el grosor del estroma debido a la formación de la MEC (Figura 18). De igual manera, se observó que se produce el desprendimiento de la membrana de Descemet a comparación de las córneas control, lo que conlleva al daño en las células endoteliales y la entrada de humor acuoso al tejido, produciendo lo que se denomina hydrop corneal (Figura 19). Estos resultados obtenidos en conjunto con las queratometrías indican que el modelo en conejo Nueva Zelanda inducido por inyección intraestromal de colagenasa II es un modelo de queratocono avanzado.



**Figura 18. Alteraciones morfológicas después de la administración de colagenasa II por inyección intraestromal en conejo Nueva Zelanda.** Los cambios morfológicos de las córneas expuestas a colagenasa II muestran cambios característicos a un proceso inflamatorio y de cicatrización a comparación de los controles. Se visualizó en microscopio campo claro (Aumento 500, 1000 y 200, barra de escala 200  $\mu\text{m}$ , 100  $\mu\text{m}$  y 50  $\mu\text{m}$ ).



**Figura 19. Desprendimiento de membrana de Descemet por acción de colagenasa II en inyección intraestromal en conejo Nueva Zelanda.** Flecha negra: desprendimiento de membrana de Descemet. Se visualizó en microscopio campo claro (Aumento 500, barra de escala 200 µm).

### **15.3. Evaluación del efecto terapéutico de la curcumina sobre la superficie en el modelo animal de queratocono en conejo Nueva Zelanda**

La restauración de la superficie corneal se evaluó cuantitativamente mediante las queratometrías realizadas antes y después de la administración de las dos concentraciones de curcumina.

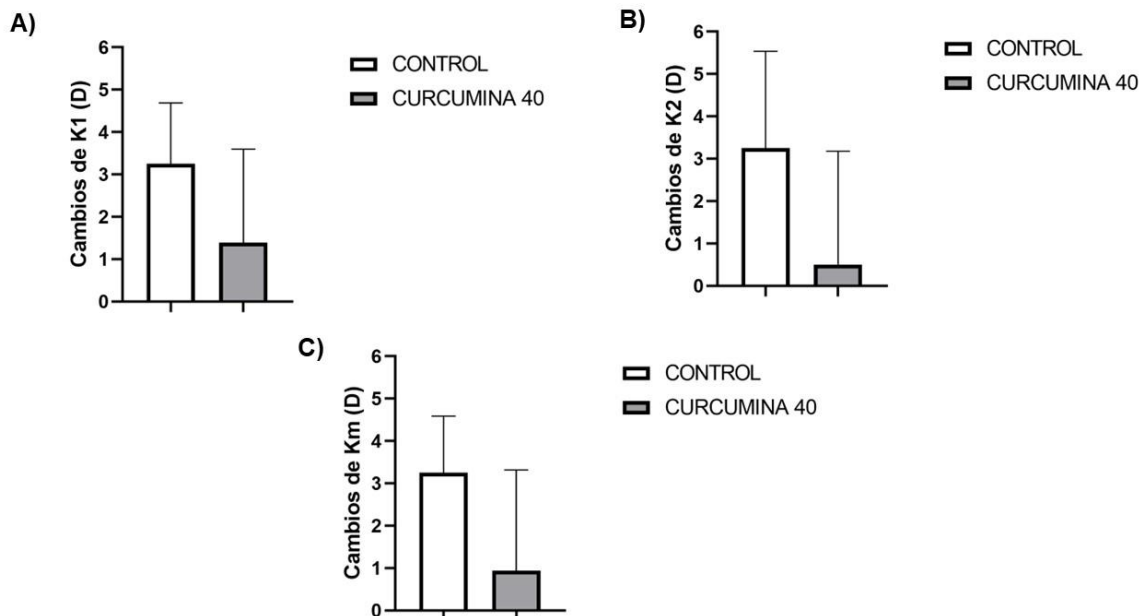
La concentración de curcumina 40 µM administrada por gotas oftálmicas no mostró tener algún efecto terapéutico sobre la superficie corneal a los 7 días.

La tabla 9 muestra los valores queratométricos, los cuales indican que no hay diferencia significativa en el día 0 y 14 entre los dos grupos para K1, K2 y Km. Aunque en las gráficas de la figura 20 se muestre una disminución en las dioptrías en la variación de K1, K2 y Km entre el día 0 y el día 7 en el grupo experimental con curcumina 40 µM, no hubo diferencia significativamente estadísticamente.

**Tabla 9. Valores queratométricos antes y después de la administración de curcumina a una concentración de 40  $\mu\text{M}$  (n=4)**

Factor	Grupo	Día 0	Día 7	Día 7- Día 0
K1 (D)	Control	47.25 $\pm$ 0.63	50.50 $\pm$ 0.96	3.25 $\pm$ 1.44
	Curcumina 40 $\mu\text{M}$	47.11 $\pm$ 0.77	48.50 $\pm$ 1.62	1.39 $\pm$ 2.21
	Valor <i>p</i>	0.88	0.07	0.50
K2 (D)	Control	46.13 $\pm$ 0.24	49.38 $\pm$ 2.15	3.25 $\pm$ 2.29
	Curcumina 40 $\mu\text{M}$	46.63 $\pm$ 0.52	47.13 $\pm$ 2.31	0.50 $\pm$ 2.68
	Valor <i>p</i>	0.75	0.25	0.25
Km (D)	Control	46.69 $\pm$ 0.30	49.94 $\pm$ 1.32	3.25 $\pm$ 1.34
	Curcumina 40 $\mu\text{M}$	46.88 $\pm$ 0.55	47.81 $\pm$ 1.89	0.94 $\pm$ 2.38
	Valor <i>p</i>	0.67	0.12	0.16

*\*Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar*



**Figura 20. Cambios en valores queratométricos después de la administración de curcumina a una concentración de 40  $\mu\text{M}$ . A) K1. B) K2. C) Promedio de K. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar (n=4).**

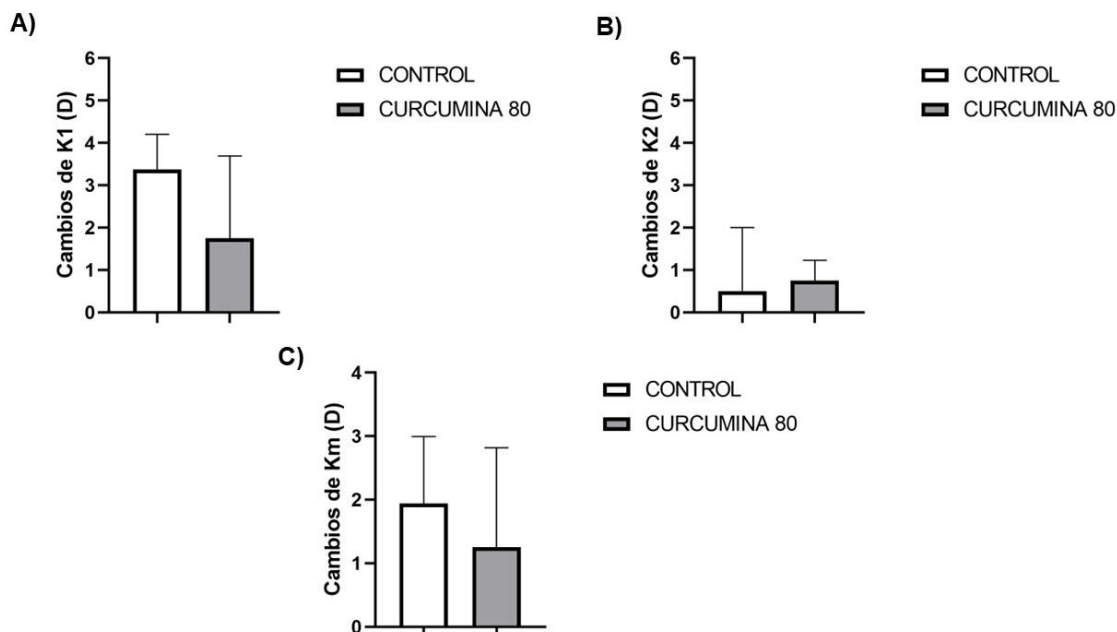
Así mismo, con la concentración de 80  $\mu\text{M}$  de curcumina tampoco mostraron tener algún efecto terapéutico sobre la superficie corneal a los 7 días, como se observan los datos queratométricos en la tabla 10. K1, K2 y Km no mostraron cambios significativamente estadísticos al día 0 y 7. En la figura 21 se demuestra que la variabilidad de K1 y Km disminuyen con la administración de curcumina a una concentración de 80  $\mu\text{M}$ , no obstante, el valor de K2 se encuentra incrementado en el grupo experimental, aunque esto no es de manera significativamente estadística.

**Tabla 10. Valores queratométricos antes y después de la administración de curcumina a una concentración de 80  $\mu\text{M}$  (n=4)**

Factor	Grupo	Día 0	Día 7	Día 7- Día 0
K1 (D)	Control	43.88 $\pm$ 2.32	47.25 $\pm$ 2.81	3.38 $\pm$ 0.83
	Curcumina 80 $\mu\text{M}$	44.25 $\pm$ 1.96	46.00 $\pm$ 1.49	1.75 $\pm$ 1.94
	Valor <i>p</i>	0.55	0.65	0.56
K2 (D)	Control	43.25 $\pm$ 2.21	43.75 $\pm$ 3.71	0.50 $\pm$ 1.50
	Curcumina 80 $\mu\text{M}$	43.88 $\pm$ 1.85	44.63 $\pm$ 2.14	0.75 $\pm$ 0.48
	Valor <i>p</i>	0.28	0.65	0.86
Km (D)	Control	43.56 $\pm$ 2.24	45.50 $\pm$ 3.23	1.94 $\pm$ 1.06
	Curcumina 80 $\mu\text{M}$	44.06 $\pm$ 1.89	45.31 $\pm$ 1.31	1.25 $\pm$ 0.78
	Valor <i>p</i>	0.67	0.12	0.73

*\*Los datos se presentan como media  $\pm$  error estándar*



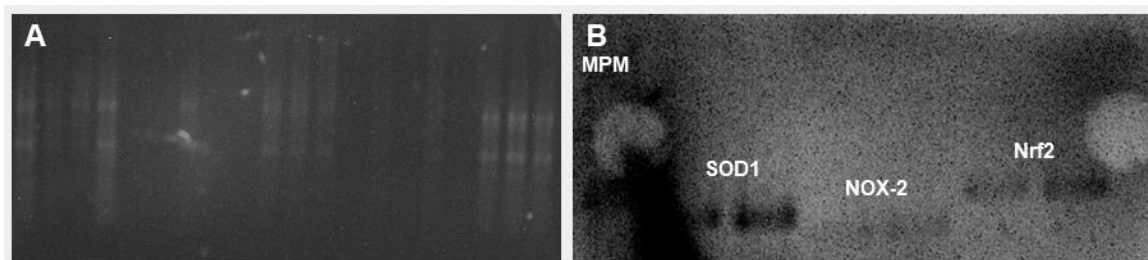


**Figura 21. Cambios en valores queratométricos después de la administración de curcumina a una concentración de 80  $\mu\text{M}$ . A) K1. B) K2. C) Promedio de K. Los datos se representan como la media  $\pm$  error estándar (n=4).**

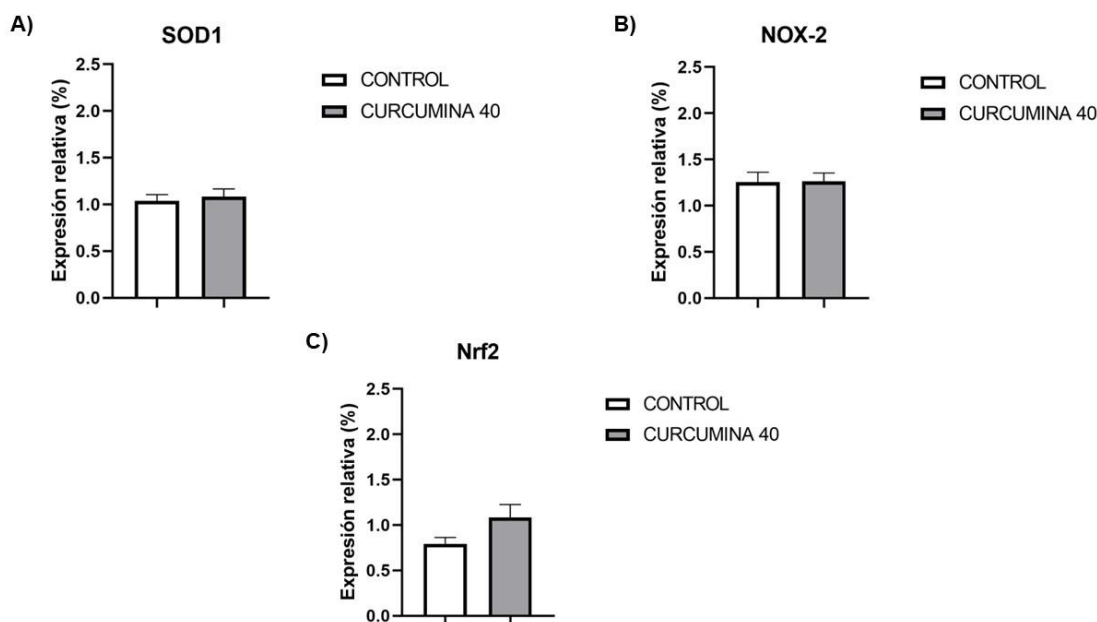
#### **15.4. Evaluación de la expresión génica de marcadores de estrés oxidativo en el modelo animal de queratocono después de la administración de curcumina**

Se evaluó la expresión génica en córneas del modelo animal de queratocono en conejo Nueva Zelanda inducido por colagenasa II mediante inyección intraestromal expuestas a dos dosis de curcumina 40  $\mu\text{M}$  y 80  $\mu\text{M}$  durante 7 días. Mediante la técnica de PCR semicuantitativa se analizó: factor de transcripción Nrf2, SOD1, Nox-2 y el gen constitutivo GAPDH. La integridad del ARN de las muestras se analizó en gel de agarosa (Figura 22a). Así mismo, se comprobaron los oligonucleótidos forward y reverse de los marcadores de estrés oxidativo (Figura 22b).

En la figura 23 se observa la expresión relativa de los genes marcadores de estrés oxidativo en córneas tratadas con curcumina a una concentración de 40  $\mu\text{M}$ . El tratamiento con curcumina a la concentración de 40  $\mu\text{M}$  no disminuyó la expresión



**Figura 22. Integridad de ARN y especificidad de los oligonucleótidos.** A) Integridad del ARN de las córneas tratadas con curcumina. B) Validación de la especificidad de los oligonucleótidos forward y reverse de los marcadores de estrés oxidativo. MPM: Marcador de peso molecular. SOD1: Superóxido dismutasa 1. NOX-2: NADPH oxidasa 2. Nrf2: Factor nuclear eritroide 2.

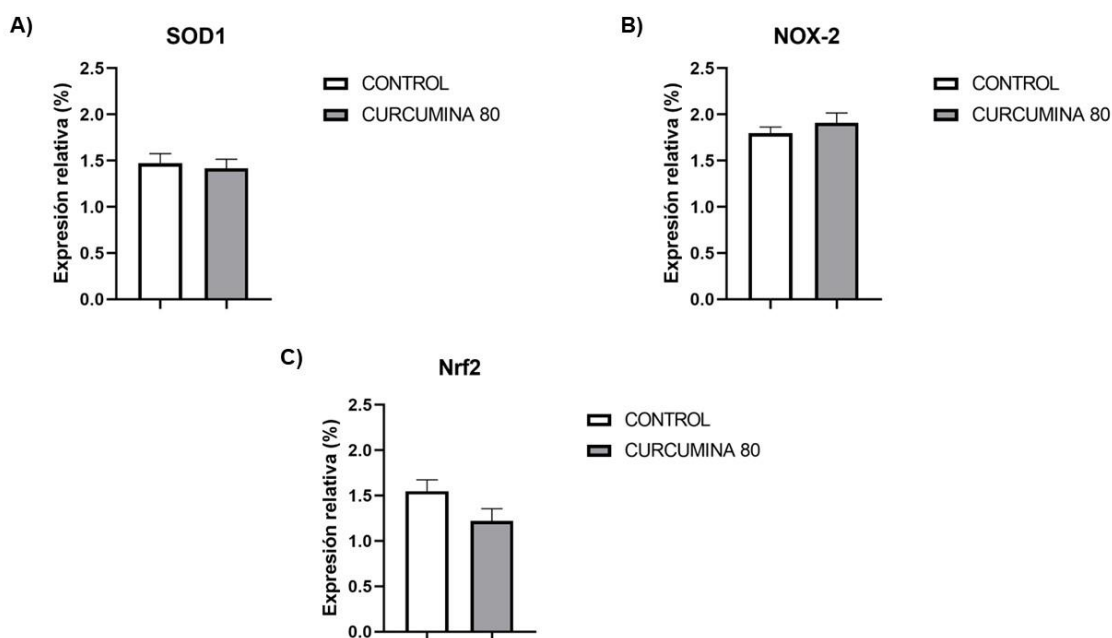


**Figura 23. Efecto terapéutico de la curcumina a una concentración de 40  $\mu$ M sobre el estrés oxidativo.** A) En presencia de curcumina la expresión génica de SOD1 se mantiene similar al control. B) La expresión de NOX-2 también se mantiene sin cambios significativos en comparación al control. C) La expresión génica de Nrf2 se ve incrementada ligeramente en presencia de la curcumina, sin embargo, no de manera significativamente. SOD1: Superóxido dismutasa 1. NOX-2: NADPH oxidasa 2. Nrf2: Factor nuclear eritroide 2. (n=4)

de SOD1 ni de NOX-2. No obstante, la expresión de Nrf2 si se incrementa ligeramente, aunque no de manera significativamente estadística. Lo cual indica que la curcumina puede activar este factor de transcripción e incrementar la protección

por el sistema antioxidante. Sin embargo, no activa a nivel genético la expresión de SOD1 ni inhibe la NOX-2.

El tratamiento con curcumina a una concentración de 80  $\mu\text{M}$  nos muestra que la expresión de SOD1 se mantiene ligeramente por debajo de los controles, al igual que el Nrf2. Por el contrario, la NOX-2 se incrementa ligeramente a comparación del control, aunque todo esto no es de manera significativamente estadística. Esto posiblemente indica que una mayor concentración de curcumina produce efectos oxidantes (Figura 24).



**Figura 24. Efecto terapéutico de la curcumina a una concentración de 80  $\mu\text{M}$  sobre el estrés oxidativo.** A) En presencia de curcumina la expresión génica de SOD1 se mantiene ligeramente disminuida en comparación al control. B) La expresión de NOX-2 también se mantiene ligeramente incrementada, pero sin cambios significativos en comparación al control. C) La expresión génica de Nrf2 se disminuye en presencia de la curcumina, sin embargo, no de manera significativamente. SOD1: Superóxido dismutasa 1. NOX-2: NADPH oxidasa 2. Nrf2: Factor nuclear eritroide 2. (n=4)

## 16. DISCUSIÓN

Derivado de los antecedentes reportados bibliográficamente sobre las características de modelos animales de queratocono, así como, el efecto que tiene la curcumina sobre distintos marcadores de estrés oxidativo, se desarrolló el presente trabajo donde se observaron los siguientes hallazgos: 1) alteración en la superficie corneal y 2) cambios morfológicos por acción de la colagenasa II. Así mismo, se demostró que las dosis utilizadas de curcumina no tienen efecto antioxidante en el modelo animal de queratocono.

En el estudio de Qiao et al. (88), se desarrolló un modelo animal de queratocono mediante la administración de colagenasa II en gotas oftálmicas, en donde las queratometrías muestran un incremento significativo de las dioptrías durante el día 7 y 14 con respecto al control. Sin embargo, en los resultados que obtuvimos no se observan cambios significativos al día 14 en relación con los controles, lo cual se atribuye a la metodología para realizar el debridamiento, ya que existen diversas técnicas. De igual manera, en el mismo estudio demuestran cambios morfológicos como la disminución de fibras de colágeno, disposición irregular de las fibras de colágeno y hendiduras dentro del estroma. No obstante, lo que encontramos en nuestros resultados fue un incremento en el grosor del estroma corneal, exceso de infiltrado celular proinflamatorio y ausencia de epitelio, consecuencia de la técnica de debridamiento. Precisamente McGrath y Lee (114) indican las diferentes técnicas para realizar el debridamiento, siendo el uso del bisturí la técnica más común, sin embargo, entre las posibles consecuencias se menciona la remoción completa del epitelio, que deriva el incremento de la susceptibilidad a infecciones por el ingreso de algún microorganismo a la córnea, ya que la función principal del epitelio es protegerla. Por lo cual, decidimos no continuar con este modelo de queratocono experimental, ya que con nuestras condiciones no fue replicable, y se optó por aplicar la colagenasa II mediante otra vía de administración.

En 2009 Adhamy et al. (91), desarrollaron en rata Wistar otro modelo animal de queratocono también mediante la administración de colagenasa, pero por inyección intraestromal. En este estudio se evaluaron 3 diferentes concentraciones de colagenasa 1, 3 y 6 mg/mL en 3 periodos de tiempo 1, 3 y 5 días. Los resultados que ellos reportan arrojan que las concentraciones de 3 y 6 mg/mL causan opacidad y deformidad en la córnea, así mismo, daño severo en las fibras de colágeno, adelgazamiento del epitelio y el estroma corneal. De manera que, al replicar el modelo, pero a una dosis de 2.5 mg/mL de colagenasa II observamos resultados similares, a los 7 días. Durante el protocolo las ratas desarrollaron opacidad y deformidad de la córnea, cambios en la densidad celular del epitelio, modificación de las fibras de colágeno en el estroma y un ligero infiltrado celular. Por lo tanto, decidimos aplicar la misma técnica en conejos de la raza Nueva Zelanda. De modo que, los resultados obtenidos fueron semejantes a los reportados en rata Wistar, ya que se presentó opacidad y deformidad en la córnea. Además, por medio de las queratometrías se observaron cambios significativos en las dioptrías, lo cual confirma una alteración de la superficie corneal. Con respecto a los cambios morfológicos también hubo cambios significativos en comparación con las córneas control, presentándose principalmente infiltrado celular, activación de queratocitos y regeneración de la matriz extracelular. Estos cambios se atribuyen principalmente a un proceso de cicatrización de la córnea debido a la colagenasa II, ya que al ser una proteinasa es necesaria la regeneración del tejido.

La integridad de la córnea es esencial para una visión correcta, sin embargo, cuando se producen lesiones físicas, químicas o infecciones severas la córnea tiende a volverse opaca y se produce pérdida de la visión, así como observamos en nuestro estudio (115). Durante el proceso de regeneración de daño en el estroma, la primera respuesta es la apoptosis de queratocitos por acción de la IL-1, Fas ligando y TNF- $\alpha$ , así mismo, los queratocitos que persisten al daño se activan y se diferencian en fibroblastos que migran al sitio de daño en el estroma con el fin de regenerar la MEC (115,116). Los procesos de activación y migración de los fibroblastos en la cicatrización corneal son mediados por algunos factores de

crecimiento como TGF- $\beta$ , factor crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF-2) y factor de crecimiento epidérmico (EGF). Además, se ha encontrado que ocurre una transdiferenciación de fibroblastos a miofibroblastos durante la cicatrización, sin embargo, el número de miofibroblastos depende del tipo de daño (117,118). Durante la reparación de la córnea, los fibroblastos y miofibroblastos depositan grandes cantidades de colágeno III, fibronectina, tenascina y glucosaminoglucanos, los cuales facilitan la migración de más fibroblastos, de igual manera es posible observar diferencias en el tamaño de las fibras, composición y arreglo. Es importante mencionar que la reparación del tejido puede alterar la curvatura de la córnea y, por ende, las propiedades ópticas de esta, así como observamos en nuestros resultados queratométricos. Previa literatura científica demuestra que la cicatrización corneal y la inflamación van de la mano en procesos como la abrasión epitelial, quemaduras químicas o incisiones corneales. Las primeras células del sistema inmune en migrar al sitio de regeneración son los neutrófilos, posteriormente los macrófagos, lo cual coincide con nuestros resultados morfológicos en donde se observa infiltrado celular. Esta migración celular se encuentra mediada por las citocinas proinflamatorias IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  que son liberadas por las células epiteliales, de manera que también en el proceso de cicatrización se ve involucrada la neovascularización (115,119).

Song et al. (120), evaluaron la densidad de queratocitos y la distribución del estroma corneal en la cicatrización producida en córneas de pacientes con queratocono avanzado y demostraron que la densidad de queratocitos en el estroma anterior y posterior es baja en el queratocono leve a avanzado en comparación con el control. En contraste, nuestros resultados demostraron que en el estroma anterior hay alta densidad de fibroblastos, sin embargo, es necesario realizar otros estudios para determinar la actividad del fibroblasto.

Existe suficiente evidencia que involucra al estrés oxidativo como un mecanismo patológico que se lleva a cabo en la mayoría de las enfermedades producidas en el segmento anterior del ojo, como el queratocono. La curcumina es una molécula que se ha utilizado en la medicina para tratar diferentes enfermedades

como las oculares debido a que tiene actividades farmacológicas antiinflamatorias, antioxidantes y antiangiogénicas. Maharjan et al. (121) desarrollaron una preparación farmacéutica de curcumina a través de nanopartículas, debido a que una de las desventajas de este fitonutriente es la baja biodisponibilidad, y evaluaron el efecto antioxidante *in vitro* en células epiteliales de la córnea. Sus resultados arrojaron que de manera *in vitro* la curcumina a una concentración de 50  $\mu\text{M}$  incrementa la expresión génica de enzimas antioxidantes SOD1, CAT1 y hemo-oxigenasa 1 (HMOX1) en comparación con el control. Así mismo evaluaron la curcumina a 30  $\mu\text{M}$ , sin embargo, el incremento en la expresión génica de las enzimas antioxidantes no fue tan eficientes como la de 50  $\mu\text{M}$ . Nuestro trabajo de investigación, muestra una tendencia ligeramente incrementada en la expresión de la SOD1 a comparación del control con la concentración de 40  $\mu\text{M}$ , sin embargo, no lo suficiente para ser significativo el cambio. Con respecto a la concentración de 80  $\mu\text{M}$  obtuvimos en general que los marcadores de estrés oxidativos incrementan ligeramente por encima del control debido a que elevadas concentraciones de curcumina inducen apoptosis, que es un proceso relacionado con estrés oxidativo e inflamación.

En el estudio de Guo et al. (122) se evaluó la expresión protéica de Nrf2 y SOD1 en cultivo celular de células endoteliales de córnea en condiciones de estrés oxidativo después de la administración de curcumina a 12.5  $\mu\text{M}$ . Los resultados que obtuvieron es que bajo esa concentración la curcumina es capaz de incrementar la expresión de enzimas antioxidantes e incluso incrementar la expresión de Nrf2, cuyo factor de transcripción se activa para la síntesis de enzimas antioxidantes. De la misma manera, se observa un comportamiento similar con la expresión de Nrf2 al administrar la concentración de 40  $\mu\text{M}$  de curcumina. Sin embargo, no se considera significativo.

La producción de las ERO se puede dar por la activación de enzimas generadoras de ERO como la NOX-2. En el estudio de Li et al. (123) se evaluó el efecto de la curcumina sobre las NADPH oxidasas en un modelo de atrofia vesícula

seminal y obtuvieron que la curcumina a una dosis de 100 mg/Kg vía oral tiene la capacidad de disminuir las oxidasas NOX-1, NOX-2 y NOX-4. En contraste nuestro estudio demostró que los niveles de expresión génica de Nox-2 no disminuyen ni incrementan.

La curcumina es un agente que estabiliza al factor de transcripción Nrf2 e incrementa la expresión de enzimas antioxidantes como la SOD, no obstante, nuestros resultados no mostraron incrementos significativos en la expresión de estos genes en comparación con los controles. De igual manera, la curcumina tiene la capacidad de inhibir enzimas generadoras de ERO, en contraste nuestro estudio no mostró disminución significativa en la enzima Nox-2. Sugerimos que las posibles limitantes fueron la dosis y baja biodisponibilidad de la curcumina, así como el tamaño de muestra pequeño que se trabajó. De manera que, es importante que se sigan realizando estudios más completos que puedan corroborar el posible efecto terapéutico de la curcumina.



## 17. CONCLUSIONES

En el presente estudio se demostró que la curcumina a las dosis que utilizamos no ejerce efecto terapéutico sobre el estrés oxidativo en el modelo animal de queratocono en conejo Nueva Zelanda.

La colagenasa II al ser una metaloproteinasa que degrada específicamente el colágeno I, componente principal de la córnea, es capaz de inducir alteración en la superficie corneal, así como cambios morfológicos característicos que coinciden con un proceso de cicatrización.

La curcumina, aunque es un fitonutriente antioxidante, no incrementa los niveles de mecanismos antioxidantes inducidos por Nrf2, ni disminuye la expresión de Nox-2, enzima generadora de radicales libres.

En base a los antecedentes y los resultados de este proyecto se puede concluir que la curcumina puede ser capaz de ejercer efecto antioxidante, sin embargo, es necesario emplear un sistema de liberación como las nanopartículas para poder incrementar la biodisponibilidad del tratamiento.

## 18. REFERENCIAS

1. Brüel A, Christensen EI, Trantum-Jensen J, Qvortrup K, Geneser F. El ojo. In: *Histología*. 2014. p. 655–93.
2. Latarjet M, Liard Ruiz A. Globo ocular. In: *Anatomía Humana*. 2019. p. 391–9.
3. Garcia-Ferrer FJ, Akpek EK, Amescua G, Farid M, Lin A, Rhee MK, et al. Corneal Ectasia Preferred Practice Pattern®. *Ophthalmology*. 2019;126(1):P170–215.
4. Shen J. Ocular Aberrations and Image Quality, Contact Lens and MYOPIA Progression. *Ophthalmol - Curr Clin Res Updat*. 2014;
5. De Jong PTVM. Myopia: Its historical contexts. *Br J Ophthalmol*. 2018;102:1021–7.
6. Morgan IG, Ohno-Matsui K, Saw SM. Myopia. *Lancet*. 2012;379:1739–48.
7. Touzeau O, Scheer S, Allouch C, Borderie V, Laroche L. Relation entre le et kératocône et la myopie axile. *J Fr Ophtalmol*. 2004;27(7):765–71.
8. Wu PC, Huang HM, Yu HJ, Fang PC, Chen CT. Epidemiology of myopia. *Asia-Pacific J Ophthalmol*. 2016;5(6):386–93.
9. McBrien NA, Gentle A. Role of the sclera in the development and pathological complications of myopia. *Prog Retin Eye Res*. 2003;22:307–38.
10. Signes-Soler I, Piñero DP, Murillo MI, Tablada S. Prevalence of visual impairment and refractive errors in an urban area of Mexico. *Int J Ophthalmol*. 2019;12(10):1612–7.
11. Gomez-Salazar F, Campos-Romero A, Gomez-Campaña H, Cruz-Zamudio C, Chaidez-Felix M, Leon-Sicairos N, et al. Refractive errors among children, adolescents and adults attending eye clinics in Mexico. *Int J Ophthalmol*. 2017;10(5):796–802.
12. Pruett RC. Macular complications associated with posterior staphyloma. Vol.

- 9, Current Opinion in Ophthalmology. 1998. p. 16–22.
13. Saw SM, Gazzard G, Shin-Yen EC, Chua WH. Myopia and associated pathological complications. *Ophthalmic Physiol Opt.* 2005;25:381–91.
  14. Saw SM. How blinding is pathological myopia? *Br J Ophthalmol.* 2006;90(5):525–6.
  15. Read SA, Collins MJ, Carney LG. A review of astigmatism and its possible genesis. *Clin Exp Optom.* 2007;90(1):5–19.
  16. Porter J, Guirao A, Cox IG, Williams DR. Monochromatic aberrations of the human eye in a large population. *J Opt Soc Am A.* 2001;18(8):1793–803.
  17. Martínez-Abad A, Piñero DP. Pellucid marginal degeneration: Detection, discrimination from other corneal ectatic disorders and progression. *Contact Lens Anterior Eye.* 2018;1–9.
  18. Maharana PK, Dubey A, Jhanji V, Sharma N, Das S, Vajpayee RB. Management of advanced corneal ectasias. *Br J Ophthalmol.* 2016;100:34–40.
  19. Belin MW, Asota IM, Ambrosio R, Khachikian SS. What's in a name: Keratoconus, pellucid marginal degeneration, and related thinning disorders. *Am J Ophthalmol.* 2011;152(1):157-162.e1.
  20. Salomão MQ, Hoffling-Lima AL, Gomes Esporcatte LP, Correa FF, Lopes B, Sena N, et al. Ectatic diseases. *Exp Eye Res.* 2020;
  21. Romero-Jiménez M, Santodomingo-Rubido J, Wolffsohn JS. Keratoconus: A review. *Contact Lens Anterior Eye.* 2010;33(4):157–66.
  22. Nottingham J. Practical observations on conical cornea: and on the short sight, and other defects of vision connected with it. Deighton & Laughton; 1854.
  23. Zadnik K, Barr JT, Gordon MO, Edrington TB. Biomicroscopic signs and disease severity in keratoconus. *Cornea.* 1996;15(2):139–46.

24. Kennedy RH, Bourne WM, Dyer JA. A 48-year clinical and epidemiologic study of keratoconus. *Am J Ophthalmol.* 1986 Mar;101(3):267–73.
25. Zadnik K, Steger-May K, Fink BA, Joslin CE, Nichols JJ, Rosenstiel CE, et al. Between-eye asymmetry in keratoconus. *Cornea.* 2002;21(7):671–9.
26. Rabinowitz YS. Keratoconus. *Surv Ophthalmol.* 1998;42(4):297–319.
27. Weed KH, McGhee CNJ, MacEwen CJ. Atypical unilateral superior keratoconus in young males. *Contact Lens Anterior Eye.* 2005;28:177–9.
28. Yam GHF, Fuest M, Zhou L, Liu YC, Deng L, Chan ASY, et al. Differential epithelial and stromal protein profiles in cone and non-cone regions of keratoconus corneas. *Sci Rep.* 2019;9(2965):1–17.
29. Mas Tur V, MacGregor C, Jayaswal R, O'Brart D, Maycock N. A review of keratoconus: Diagnosis, pathophysiology, and genetics. *Surv Ophthalmol.* 2017;62:770–83.
30. Davidson A, Hayes S, Hardcastle A, Tuft S. The pathogenesis of keratoconus. *Eye.* 2014;28:189–95.
31. Omer K. Epidemiology of Keratoconus Worldwide. *Open Ophthalmol J.* 2018;12(1):289–99.
32. Gokhale NS. Epidemiology of keratoconus. *Indian J Ophthalmol.* 2013;61(8):382–3.
33. Pearson AR, Soneji B, Sarvananthan N, Sanford-Smith JH. Does ethnic origin influence the incidence or severity of keratoconus? *Eye.* 2000;14(4):625–8.
34. Valdez-García JE, Sepúlveda R, Salazar-Martínez JJ, Lozano-Ramírez JF. Prevalence of keratoconus in an adolescent population. *Rev Mex Oftalmol.* 2014;88(3):95–8.
35. Ruiz-Morales ML, Verdiguél-Sotelo K, Hernández-López A. Frecuencia del queratocono y trasplante de córnea. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc.* 2010;48(3):309–12.

36. Roy S, Yadav S, Dasgupta T, Chawla S, Tandon R, Ghosh S. Interplay between hereditary and environmental factors to establish an in vitro disease model of keratoconus. *Drug Discov Today*. 2018;1–20.
37. Jeyabalan N, Shetty R, Ghosh A, Anandula VR, Ghosh AS, Kumaramanickavel G. Genetic and genomic perspective to understand the molecular pathogenesis of keratoconus. *Indian J Ophthalmol*. 2013;61(8):384–8.
38. Sangorrín Iranzo A, García-Tornel Florensa S. Dermatitis atópica. *Farm práctica*. 2010;29(3):102–5.
39. Gordon-Shaag A, Millodot M, Shneor E, Liu Y. The Genetic and Environmental Factors for Keratoconus. 2015;2015:1–19.
40. Gondhowiardjo TD, Van Haeringen NJ, Volker-Dieben HJ, Beekhuis HW, Kok JHC, Van Rij G, et al. Analysis of corneal aldehyde dehydrogenase patterns in pathologic corneas. Vol. 12, *Cornea*. 1993. p. 146–54.
41. Ferrari G, Rama P. The keratoconus enigma: A review with emphasis on pathogenesis. *Ocul Surf*. 2020;18:363–73.
42. Sharif KW, Casey TA, Coltart J. Prevalence of mitral valve prolapse in keratoconus patients. *J R Soc Med*. 1992;85:446–8.
43. Chang YS, Tai MC, Weng SF, Wang JJ, Tseng SH, Jan RL. Risk of mitral valve prolapse in patients with keratoconus in taiwan: A population-based cohort study. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(6049):1–10.
44. Kandarakis A, Karampelas M, Soumplis V, Panos C, Makris N, Kandarakis S, et al. A case of bilateral self-induced keratoconus in a patient with tourette syndrome associated with compulsive eye rubbing: Case report. *BMC Ophthalmol*. 2011;11(28):1–4.
45. Shinzawa M, Kato N, Kasai K, Konomi K, Chai Y, Shimazaki J. Corneal cross-linking for keratoconus caused by compulsive eye rubbing in patients with Tourette syndrome: Three case reports. *Medicine (Baltimore)*. 2019;98(20):1–

- 7.
46. Bykhovskaya Y, Rabinowitz YS. Update on the genetics of keratoconus. *Exp Eye Res.* 2021;1–11.
47. Khaled ML, Helwa I, Drewry M, Seremwe M, Estes A, Liu Y. Molecular and Histopathological Changes Associated with Keratoconus. *Biomed Res Int.* 2017;1–16.
48. Bitirgen G, Ozkagnici A, Bozkurt B, Malik RA. In vivo corneal confocal microscopic analysis in patients with keratoconus. *Int J Ophthalmol.* 2015;8(3):534–9.
49. Patel D V., McGhee CNJ. Mapping the corneal sub-basal nerve plexus in keratoconus by in vivo laser scanning confocal microscopy. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2006;47(4):1348–51.
50. H. Mathew J, D. Goosey J, G. Bergmanson JP. Quantified histopathology of the keratoconic cornea. *Optom Vis Sci.* 2011;88(8):988–97.
51. Goebels S, Eppig T, Seitz B, Szentmàry N, Cayless A, Langenbucher A. Endothelial alterations in 712 keratoconus patients. *Acta Ophthalmol.* 2018;96:e134–9.
52. Galvis V, Sherwin T, Tello A, Merayo J, Barrera R, Acera A. Keratoconus: An inflammatory disorder. *Eye.* 2015;29(7):843–59.
53. Conrad GW, Dessau W, Von Der Mark K. Synthesis of type III collagen by fibroblasts from the embryonic chick cornea. *J Cell Biol.* 1980;84:501–12.
54. Akhtar S, Bron AJ, Salvi SM, Hawksworth NR, Tuft SJ, Meek KM. Ultrastructural analysis of collagen fibrils and proteoglycans in keratoconus. *Acta Ophthalmol.* 2008;86:764–72.
55. Garlanda C, A. Dinarello C, Mantovani A. The interleukin-1 family: Back to the future. *Immunity.* 2013;39(6):1003–18.
56. Girard MT, Matsubara M, Fini ME. Transforming growth factor- $\beta$  and

- interleukin-1 modulate metalloproteinase expression by corneal stromal cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 1991;32(9):2441–54.
57. Pouliquen Y, Bureau J, Mirshahi M, Mirshahi S, Assouline M, Lorens G. Keratoconus and inflammatory processes. *Bull Soc Belge Ophtalmol.* 1996;262:25–8.
  58. Lan W, Petznick A, Heryati S, Rifada M, Tong L. Nuclear factor- $\kappa$ B: Central regulator in ocular surface inflammation and diseases. *Ocul Surf.* 2012;10(3):137–48.
  59. Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- $\kappa$ B signaling. *Cell Res.* 2011;21:103–15.
  60. Mohan RR, Mohan RR, Kim W, Wilson SE. Modulation of TNF- $\alpha$ -Induced Apoptosis in Corneal Fibroblasts by Transcription Factor NF- $\kappa$ B. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2000;41(6):1327–36.
  61. Lu Y, Fukuda K, Li Q, Kumagai N, Nishida T. Role of nuclear factor- $\kappa$ B in interleukin-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts. *Exp Eye Res.* 2006;83:560–8.
  62. Wojcik KA, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Role of biochemical factors in the pathogenesis of keratoconus. *Acta Biochim Pol.* 2014;61(1):55–62.
  63. Vallabh NA, Romano V, Willoughby CE. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in corneal disease. *Mitochondrion.* 2017;1–27.
  64. Wenk J, Brenneisen P, Meewes C, Wlaschek M, Peters T, Blaudschun R, et al. UV-Induced Oxidative Stress and Photoaging. *Curr Probl Dermatol.* 2001;29:83–94.
  65. Azizi B, Ziaei A, Fuchsluger T, Schmedt T, Chen Y, Jurkunas U V. p53-regulated increase in oxidative-stress-induced apoptosis in Fuchs endothelial corneal dystrophy: A native tissue model. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(13):9291–7.

66. Shoham A, Hadziahmetovic M, Dunaief JL, Mydlarski MB, Schipper HM. Oxidative stress in diseases of the human cornea. *Free Radic Biol Med.* 2008;45:1047–55.
67. Arnal E, Peris-Martínez C, Menezo JL, Johnsen-Soriano S, Romero FJ. Oxidative stress in keratoconus? *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):8592–7.
68. Cheung IMY, Mcghee CNJ, Sherwin T. A new perspective on the pathobiology of keratoconus: Interplay of stromal wound healing and reactive species-associated processes. *Clin Exp Optom.* 2013;96:188–96.
69. Wojcik KA, Kaminska A, Blasiak J, Szaflik J, Szaflik JP. Oxidative stress in the pathogenesis of keratoconus and Fuchs endothelial corneal dystrophy. *Int J Mol Sci.* 2013;14:19294–308.
70. Atilano SR, Coskun P, Chwa M, Jordan N, Reddy V, Le K, et al. Accumulation of mitochondrial DNA damage in keratoconus corneas. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(4):1256–63.
71. Siwik DA, Pagano PJ, Colucci WS. Oxidative stress regulates collagen synthesis and matrix metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2001;53–60.
72. Buddi R, Lin B, Atilano SR, Zorapapel NC, Kenney MC, Brown DJ. Evidence of oxidative stress in human corneal diseases. *J Histochem Cytochem.* 2002;50:341–51.
73. Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: Physiology and pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87:245–313.
74. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Krause KH. Reactive oxygen species: From health to disease. *Swiss Med Wkly.* 2012;1–14.
75. Ozcan A, Ogun M. Biochemistry of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Basic Princ Clin Significance Oxidative Stress.* 2015;



76. Tonelli C, Chio IIC, Tuveson DA. Transcriptional Regulation by Nrf2. *Antioxidants Redox Signal*. 2018;29(17):1727–45.
77. Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:931–47.
78. Itoh K, Chiba T, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(2):313–22.
79. Imbornoni LM, McGhee CNJ, Belin MW. Evolution of Keratoconus: From Diagnosis to Therapeutics. *Klin Monbl Augenheilkd*. 2018;1–9.
80. Whaites JM. The keratometer in the diagnosis of corneal diseases. In: *Corneal Surgery*. 2009. p. 71–3.
81. Funnell CL, Ball J, Noble BA. Comparative cohort study of the outcomes of deep lamellar keratoplasty and penetrating keratoplasty for keratoconus. *Eye*. 2006;20:527–32.
82. Tomalla M, Cagnolati W. Modern treatment options for the therapy of keratoconus. *Contact Lens Anterior Eye*. 2007;30:61–6.
83. Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, Trokel S, Seiler T. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea*. 2007;26(4):385–9.
84. Lim N, Vogt U. Characteristics and functional outcomes of 130 patients with keratoconus attending a specialist contact lens clinic. *Eye*. 2002;16:54–9.
85. Sklar JC, Wendel C, Zhang A, Chan CC, Yeung SN, Iovieno A. Did Collagen Cross-Linking Reduce the Requirement for Corneal Transplantation in Keratoconus? the Canadian Experience. *Cornea*. 2019;38(11):1390–4.
86. Rocha G, Ibrahim T, Gulliver E, Lewis K. Combined Phototherapeutic Keratectomy, Intracorneal Ring Segment Implantation, and Corneal Collagen Cross-Linking in Keratoconus Management. *Cornea*. 2019;38(10):1233–8.

87. Caporossi A, Mazzotta C, Baiocchi S, Caporossi T. Long-term Results of Riboflavin Ultraviolet A Corneal Collagen Cross-linking for Keratoconus in Italy: The Siena Eye Cross Study. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2010;149(4):585–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajo.2009.10.021>
88. Qiao J, Li H, Tang Y, Song W, Rong B, Yang S, et al. A rabbit model of corneal Ectasia generated by treatment with collagenase type II. 2018;18(94):1–6.
89. Kao WW-Y, Vergnes J-P, C.V. Sundar-Raj JE, Brown SI. Increased collagenase and gellatinase activities in keratoconus. *Biochem Biophys Res Commun*. 1982;107(3):929–36.
90. Hong CW, Sinha-Roy A, Schoenfield L, McMahon JT, Dupps WJ. Collagenase-mediated tissue modeling of corneal ectasia and collagen cross-linking treatments. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2012;53(4):2321–7.
91. Moghadam FA, Jahromy MH, Fazelipour S, Khakpour S, Younesian M. Induction of experimental keratoconus in mice using collagenase. *Physiol Pharmacol*. 2009;13(2):209–15.
92. Gupta C, Prakash D. Phytonutrients as therapeutic agents. *J Complement Integr Med*. 2014;11(3):151–69.
93. Bagchi D. Nutraceuticals and functional foods regulations in the United States and around the world. *Toxicology*. 2006;221:1–3.
94. Huynh TP, Mann SN, Mandal NA. Botanical compounds: Effects on major eye diseases. *Evidence-based Complement Altern Med*. 2013;2013:1–12.
95. Liu XF, Hao JL, Xie T, Mukhtar NJ, Zhang W, Malik TH, et al. Curcumin, a potential therapeutic candidate for anterior segment eye diseases: A review. *Front Pharmacol*. 2017;8(66):1–13.
96. Anand P, Sundaram C, Jhurani S, Kunnumakkara AB, Aggarwal BB. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Lett*. 2008;267:133–64.

97. Menon VP, Ram Sudheer A. Antioxidant and Antiinflammatory Properties of Curcumin. *Adv Exp Med Biol.* 2007;(September 2001):105–25.
98. Wright JS. Predicting the antioxidant activity of curcumin and curcuminoids. *J Mol Struct THEOCHEM.* 2002;591:207–17.
99. Radomska-Leśniewska DM, Osiecka-Iwan A, Hyc A, Góźdz A, Dąbrowska AM, Skopiński P. Therapeutic potential of curcumin in eye diseases. *Cent Eur J Immunol.* 2019;44(2):181–9.
100. Lin X, Bai D, Wei Z, Zhang Y, Huang Y, Deng H, et al. Curcumin attenuates oxidative stress in RAW264.7 cells by increasing the activity of antioxidant enzymes and activating the Nrf2- Keap1 pathway. *PLoS One.* 2019;14(5):1–13.
101. Liu T, Lv YF, Zhao JL, You QD, Jiang ZY. Regulation of Nrf2 by phosphorylation: Consequences for biological function and therapeutic implications. *Free Radic Biol Med.* 2021;168:129–41.
102. Xu C, Yuan X, Pan Z, Shen G, Kim JH, Yu S, et al. Mechanism of action of isothiocyanates: The induction of ARE-regulated genes is associated with activation of ERK and JNK and the phosphorylation and nuclear translocation of Nrf2. *Mol Cancer Ther.* 2006;5(8):1918–26.
103. Ashrafizadeh M, Ahmadi Z, Mohammadinejad R, Farkhondeh T, Samarghandian S. Curcumin Activates the Nrf2 Pathway and Induces Cellular Protection Against Oxidative Injury. *Curr Mol Med.* 2020;20(2):116–33.
104. Trujillo J, Chirino YI, Molina-Jijón E, Andérica-Romero AC, Tapia E, Pedraza-Chaverrí J. Renoprotective effect of the antioxidant curcumin: Recent findings. *Redox Biol.* 2013;1:448–56.
105. Romano V, Cueto LFV, Zaldivar R. Refractive Correction Treatment in Ectatic Corneal Disorders. *J Ophthalmol.* 2018;2018:1.
106. Barbara A. Textbook on keratoconus - New insights. 2012.

107. Huynh TP, Mann SN, Mandal NA. Botanical compounds: Effects on major eye diseases. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2013;2013:1–12.
108. Speroni F. *Diccionario de anatomía e histología.* Primera ed. Universidad de La Plata; 2016. 1–192 p.
109. Miao L, St. Clair DK. Regulation of superoxide dismutase genes: Implications in disease. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(4):344–56.
110. Sareila O, Kelkka T, Pizzolla A, Hultqvist M, Holmdahl R. NOX2 complex-derived ROS as immune regulators. *Antioxidants Redox Signal.* 2011;15(8):2197–208.
111. Königsberg Fainstein M. Nrf2: La historia de un nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo. *REB.* 2007;26(1):18–25.
112. Kim JS, Choi JS, Chung SK. The effect of curcumin on corneal neovascularization in rabbit eyes. *Curr Eye Res.* 2010;274–80.
113. Saha S, Buttari B, Panieri E, Profumo E, Saso L. An Overview of Nrf2 Signaling Pathway and Its Role in Inflammation. *Molecules.* 2020;25(5474):1–31.
114. McGrath LA, Lee GA. Techniques, indications and complications of corneal debridement. *Surv Ophthalmol.* 2013;1–17.
115. Bukowiecki A, Hos D, Cursiefen C, Eming SA. Wound-healing studies in cornea and skin: Parallels, differences and opportunities. *Int J Mol Sci.* 2017;18(1257):1–24.
116. Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: Hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res.* 1996;62:325–38.
117. Jester J V., Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix

contraction. *Exp Eye Res.* 2003;77:581–92.

118. Jester J V., Huang J, Petroll WM, Cavanagh HD. TGF $\beta$  induced myofibroblast differentiation of rabbit keratocytes requires synergistic TGF $\beta$ , PDGF and integrin signaling. *Exp Eye Res.* 2002;75:645–57.
119. Ebihara N, Matsuda A, Nakamura S, Matsuda H, Murakami A. Role of the IL-6 classic-and trans-signaling pathways in corneal sterile inflammation and wound healing. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(12):8549–57.
120. Song P, Wang S, Zhang P, Sui W, Zhang Y, Liu T, et al. The Superficial Stromal Scar Formation Mechanism in Keratoconus: A Study Using Laser Scanning in Vivo Confocal Microscopy. *Biomed Res Int.* 2016;2016:1–11.
121. Maharjan P, Jin M, Kim D, Yang J, Maharjan A. Evaluation of epithelial transport and oxidative stress protection of nanoengineered curcumin derivative-cyclodextrin formulation for ocular delivery. *Arch Pharm Res.* 2019;1–17.
122. Guo SP, Chang HC, Lu LS, Liu DZ, Wang TJ. Activation of kelch-like ECH-associated protein 1/nuclear factor erythroid 2-related factor 2/antioxidant response element pathway by curcumin enhances the anti-oxidative capacity of corneal endothelial cells. *Biomed Pharmacother.* 2021;141(111834):1–8.
123. Li R, Li H, Rao K, Liu K, Zhang Y, Liu X, et al. Curcumin ameliorates atrophy of seminal vesicle via reduction of oxidative stress in castrated mice. *PeerJ.* 2019;7(e7192):1–13.

**ANEXOS**

**Tabla 11. Tren de tinción Hematoxilina-Eosina**

<b>Solución</b>	<b>Tiempo</b>
Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos
Alcohol al 100%	2 minutos
Alcohol al 100%	2 minutos
Alcohol al 96%	2 minutos
Alcohol al 96%	2 minutos
Agua destilada	2 minutos
Hematoxilina	3 minutos
Agua de la llave	5 minutos
Alcohol ácido 1%	2-4 segundos
Agua de la llave	10 minutos
Eosina	2 minutos
Alcohol al 96%	2 minutos
Alcohol al 96%	2 minutos
Alcohol al 100%	2 minutos
Alcohol al 100%	2 minutos
Xileno	5 minutos
Xileno	5 minutos

Tabla 12. Solución madre de curcumina

	Curcumina
Concentración	10 mM
Volumen	10 mL
Gramos	0.037 g
Peso molecular	368.38 g/mol

$$\frac{\text{Gramos/Peso molecular}}{\text{Litros}} = \frac{0.037 \text{ g}/368.38 \text{ g/mol}}{0.010 \text{ L}} = .010 \text{ M} \sim 10 \text{ mM}$$

**Diluciones**

- Curcumina 40  $\mu\text{M}$

$$\frac{(40 \mu\text{M})(10 \text{ mL})}{10,000 \mu\text{M}} = 0.04 \text{ mL}$$

- Curcumina 80  $\mu\text{M}$

$$\frac{(80 \mu\text{M})(10 \text{ mL})}{10,000 \mu\text{M}} = 0.08 \text{ mL}$$

**Tabla 13. Concentración y pureza de ARN de las córneas con colagenasa II en tratamiento con curcumina a 40  $\mu\text{M}$**

	<b>Concentración (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Control</b>	15.3	1.62	0.25
	57.2	1.94	1.08
	53.7	1.75	1.32
	134.7	1.89	1.32
<b>Curcumina 40 <math>\mu\text{M}</math></b>	10.6	1.74	0.79
	14.5	1.58	0.23
	137.9	1.92	1.96
	152.0	1.84	1.31

**Tabla 14. Concentración y pureza de ARN de las córneas con colagenasa II en tratamiento con curcumina a 80  $\mu\text{M}$**

	<b>Concentración (ng/<math>\mu\text{L}</math>)</b>	<b>260/280</b>	<b>260/230</b>
<b>Control</b>	230.3	2.09	1.82
	134.5	2.06	1.26
	117.6	2.02	0.97
	108.2	2.06	1.90
<b>Curcumina 80 <math>\mu\text{M}</math></b>	165.5	2.06	2.14
	249.1	2.05	2.16
	31.6	1.98	1.74
	24	1.82	1.19