



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

TESIS

“MARCADORES MOLECULARES DE LA FISIOPATOLOGÍA DEL PTERIGIÓN”

PRESENTA:

Luis Fernando Barba Gallardo

PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COMITÉ:

TUTORES:

DR. EN C. Luis Fernando Torres Bernal

DR EN C. Rafael Gutiérrez Campos

ASESOR:

DR. EN C. David Kershenobich Stalnikowitz

Aguascalientes, Ags, 28 de Febrero de 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Centro de Ciencias Básicas

M. C. M. LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO
ALUMNO (A) DEL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T E .

Estimado (a) alumno (a) Barba:

Por medio de este conducto me permito comunicar a Usted que habiendo recibido los votos aprobatorios de los revisores de su trabajo de tesis y/o caso práctico titulado: "**Bases Moleculares de la Fisiopatología del Pterigión**", hago de su conocimiento que puede imprimir dicho documento y continuar con los trámites para la presentación de su examen de grado.

Sin otro particular me permito saludarle muy afectuosamente.

A T E N T A M E N T E

Aguascalientes, Ags., 22 de febrero de 2013.

"SE LUMEN PROFERRE"
EL DECANO SUSTITUTO

M. en C. JOSÉ DE JESÚS RUIZ GALLEGO



c.c.p.- Archivo
JJRG,mjda



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES


M.C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ
DECANO (A) DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E.

Por medio del presente como Tutores designados del estudiante **Luis Fernando Barba Gallardo** con ID 9643 quien realizó la tesis titulada: **BASES MOLECULARES DE LA FISIOPATOLOGIA DEL PTERIGIÓN**, y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia, nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el pueda proceder a imprimirla, y así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

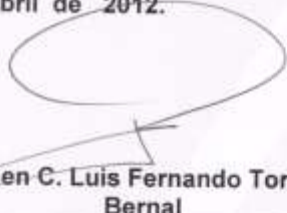
Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, nos permitimos enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 20 de Abril de 2012.


Dr. en C Rafael Gutiérrez Campos

Tutor de Tesis


Dr. en C. Luis Fernando Torres
Bernal

Tutor de Tesis

c.c.p.- Secretaría de Investigación y Posgrado del Centro de Ciencias Básicas
c.c.p.- Secretaría Técnica del Doctorado en Ciencias Biológicas.
c.c.p.- Tutores
c.c.p.- Interesado



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA EXPERIMENTAL
LABORATORIO DE HIGADO, PANCREAS
Y MOTILIDAD

M. en C. MARTHA CRISTINA GONZÁLEZ DÍAZ
DECANA DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS
P R E S E N T E

Por medio de la presente como asesor designado al estudiante **Luis Fernando Barba Gallardo** con ID 9643 quien realizó la tesis titulada: "**BASES MOLECULARES DE LA FISIOPATOLOGIA DEL PTERIGIÓN**" y con fundamento en el artículo 175, apartado II del Reglamento General de Docencia, me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que el sustentante pueda proceder a imprimir la tesis, y así continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
México, D.F. a 31 de Mayo del 2012

DR. DAVID KERSHENOBICH STALNIKOWITZ
ASESOR DE TESIS

DEDICATORIA:

A Dios, fuente de fortaleza, tenacidad y constancia porque siempre estuvo cerca de mí.

A mi esposa, por su compañía y cariño que me impulsaron a seguir siempre adelante.

A mis hijos, para ser ejemplo para ellos, porque han sido piedra angular y mi inspiración a alcanzar mis metas.

A mis padres por sus consejos, su apoyo y porque siempre han sido mis guías en la vida.

Luis F. Barba G.

AGRADECIMIENTOS:

A Dios por hacer saber que siempre ha estado cerca de mí.

A mi esposa a cada paso que di en esta decisión ella ha estado apoyando mi esfuerzo y al pendiente de mis logros y fracasos.

A mis hijos agradezco su paciencia por el tiempo que no les he dedicado y me han permitido alcanzar mis metas profesionales.

A mis papás agradezco sus oraciones, compañía y confiaron en que podía acabar con este proyecto.

A mis hermanos con quienes compartí mis alegrías y mis fracasos en esta y en todas las empresas que emprendí, porque siempre me han mostrado su apoyo.

A mis tutores por su apoyo y consejos que fueron artífices fundamentales de mi formación.

A mis amigos Ricardo, Paty, Arturo, Paty, Gregorio, porque siempre me mostraron su preocupación por estar al pendiente de este proceso y por sus oraciones que me fortalecieron en momentos de flaqueza.

A mis compañeros de laboratorio, Martín, Faby, Sandy, Manuel, Rosario cada uno de ellos puso un granito de arena para que el objetivo se alcanzara.

Y MUY ESPECIALMENTE AL DR. JAVIER VENTURA QUE DESINTERESADAMENTE ME BRINDO SU APOYO SIN CONDICIÓN ALGUNA EN ESTE PROYECTO, PORQUE SIN SU APOYO LA META SE VEÍA MÁS LEJANA.

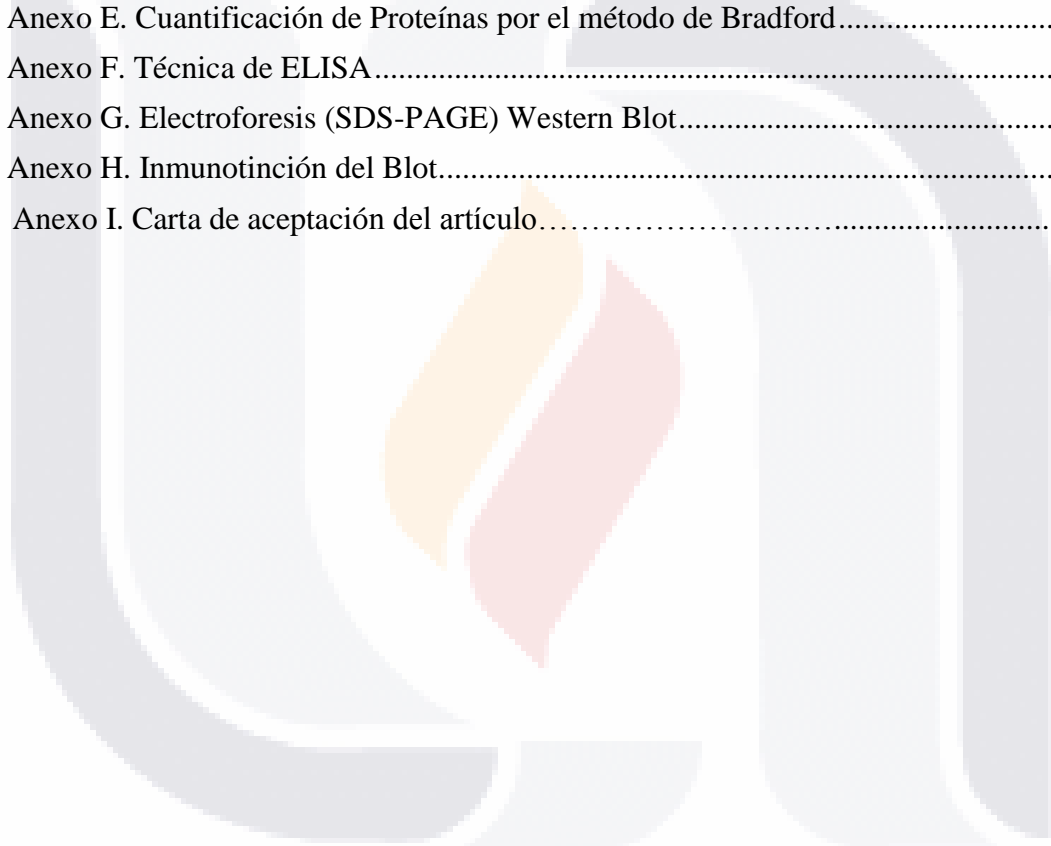
Luis F. Barba G.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	6
ABSTRACT	8
I. INTRODUCCIÓN	9
II. ANTECEDENTES	12
II.1 Fisiopatología Del Pterigión	14
II.2 Efecto de la radiación ultravioleta.....	15
II.3 Defecto hereditario en la reparación del DNA.....	16
II.4 Estrés Oxidativo	18
II.5 Factores inductores de crecimiento, activación de receptores e inhibición de la señalización de eventos.....	19
II.6 Citoquinas, factores de crecimiento y matriz metaloproteinasas	20
II.6.1 Metaloproteinasas	20
II.7 Fibroblastos	21
II.8 Citocinas.....	22
II.9 Miofibroblastos	23
II.10 Expresión e investigaciones de p53	24
II.11 NCélulas progenitoras derivadas de médula ósea	26
II.12 Expresión de la Ciclooxygenasa-2 en pterigión primario y recurrente.....	27
II.13 Transición Epitelial-Mesequimal	30
II.14 Cambios Preneoplásicos en el Pterigión	31
II.14.1 Cambios fenotípicos.....	31
II.15 Cambios genéticos	32
II.16 Cistatina C Humana (CCH)	33
II.17 Gene de la Cistatina C.....	35
II.18 Proteína Cistatina C.....	36
II.19 Funciones Fisiológicas de la Cistatina C	39
II.19.1 Inhibidor de Catepsinas.....	39
II.20 Modulador de inflamación y acción antiviral	40
11.21 Funciones como promotor de Crecimiento.....	41
III. METODOLOGÍA	42
III.1 Diseño del estudio.....	42

III.2 Universo.....	42
III.3 Justificación	42
III.4 Hipótesis	43
III.4 Objetivos.....	43
III.4.1 Objetivo general.....	43
III.5 Objetivos especificos	44
III.6 Tamaño de la muestra	44
III.7 Descripción de sujetos de estudio.....	45
III.7.1 Criterios de inclusión	45
III.7.2 Criterios de exclusión	45
III.7.3 Criterios de eliminación.....	46
III.8 Procedimiento para obtención de muestras	47
III.8.1 Método quirúrgico	47
III.9 Procesamiento de las pruebas	49
III.9.1 Valoración del patrón de expresión por biología molecular.....	49
III.10 Aislamiento de DNA plasmídico mediante mini preparaciones (minipreps) por el método de Birboin.....	50
III.11 Técnica de Ficoll/Hypaque (Boyum 1968) para la extracción de Linfocitos	51
III.12 Preparación y Calidad de control de RNA.....	52
III.12.1 Extracción de RNA total para linfocitos y tejidos	52
III.13 Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN total	53
III.14 Síntesis de ADNc Retro-transcriptasa-reversa (RT).....	54
III 15 Procedimiento de elaboración de Electroforesis.....	55
III.16 Procedimiento para realizar Inmunohistoquímica	56
III.17 Procedimiento Microscopia Electrónica de Transmisión	56
III.18 Procedimiento de ELISA	57
III.19 Procedimiento de Western Blot (SDS-PAGE)	57
IV. RESULTADOS.....	59
IV. 1 Pruebas para determinar factibilidad de oligos de CCH.....	61
IV.2 Análisis de RT-PCR.	62
IV.3 Resultados en Inmunohistoquímica.....	65
IV.4 Inmunoblot (Western Blot).....	70
IV.5 ELISA	71
IV.6 Microscopía electrónica.....	73

V. DISCUSIÓN	74
VI. CONCLUSIONES	82
VII. REFERENCIAS	84
VIII. ANEXOS	99
Anexo A. Carta de Consentimiento informado	99
Anexo B. Procedimiento de extracción de RT-PCR.....	102
Anexo C. Materiales y procedimiento para Inmunohistoquímica	104
Anexo D. Materiales Biológicos y Procedimiento para MET	107
Anexo E. Cuantificación de Proteínas por el método de Bradford.....	110
Anexo F. Técnica de ELISA	111
Anexo G. Electroforesis (SDS-PAGE) Western Blot.....	113
Anexo H. Inmunotinción del Blot.....	116
Anexo I. Carta de aceptación del artículo.....	117



ÍNDICE DE TABLAS

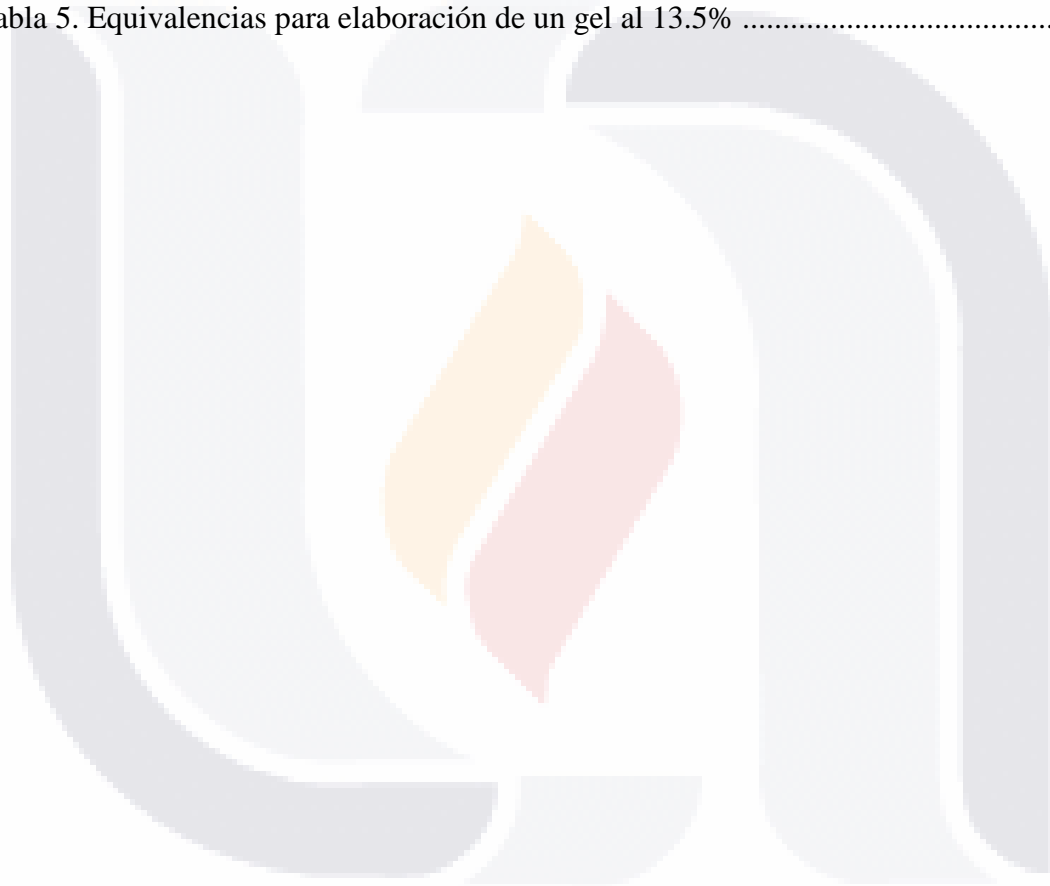
Tabla 1. Referencia de los datos clínicos de los pacientes que se obtuvieron las muestras quirúrgicas47

Tabla 2. Relación de oligos con tiempos y temperaturas de ciclado55

Tabla 3. Relación de uso de los pozos en ELISA para pterigiones y conjuntivas sanas112

Tabla 4. Porcentajes empleados de acrilamida113

Tabla 5. Equivalencias para elaboración de un gel al 13.5%114



ÍNDICE DE GRÁFICAS

Figura 1. Pterigión activo..... 12

Figura 2. Vía de acceso de a la luz UV, retrocameral 15

Figura 3. Estructura de la Cistatina C 34

Figura 4. Mapa del vector pKYLX80..... 49

Figura 5. Mapa del vector pCAMBIA..... 50

Figura 6. Técnica de extracción de linfocitos de Boyum. 52

Figura 7. Gel de agarosa 1% plásmido pKYLX80 61

Figura 8. Gel de agarosa al 2% mostrando bandas de 28s y 18s de la integridad y pureza del RNA extraído de conjuntiva, pterigión primario activo y pterigión recurrente activo, por la técnica de TRIzol 62

Figura 9. Gel de agarosa del gen de β -actina..... 63

Figura 10. Gel de agarosa del de β -globina. 63

Figura 11. Gel de agarosa del gen de la CCH en lifocitos..... 63

Figura 12. Gel de agarosa del gen de Cistatina C Humana conjuntiva, pterigión primario activo y pterigión recurrente activo y control interno..... 64

Figura 13. Corte histológico de pterigión. Tinción HE. 65

Figura 14. Corte histológico de conjuntiva sana de neutrófilos (CD-54)..... 66

Figura 15. Corte histológico de pterigión primario inflamado neutrofilos (CD-54). 66

Figura 16. Corte histológico de conjuntiva macrófagos (CD-68). 66

Figura 17. Corte histológico de pterigión primario de macrófagos (CD-68). 67

Figura 18. Corte pterigión primario, pterigión recurrente por IH AB vs CCH..... 68

Figura 19. Cortes de conjuntiva sana y de pterigión primario activo AB CCH. S/H..... 69

Figura 20. Wester Blot, de la proteína CCH..... 70

Figura 21. Imagen de microscopía electrónica de transmisión, CCH ptergión recurrente 73

RESUMEN

El pterigión es una patología de la superficie ocular caracterizada por presentar un crecimiento activo, inflamatorio, crónico e invasivo. Se localiza en la conjuntiva bulbar, en el área nasal en más de un 90% de los casos, y se extiende hacia la cornea de forma centrípeta. Su forma típica es triangular, con base hacia la carúncula, y el vértice por encima de la cornea, dando forma a una especie de ala, motivo del que deriva su nombre. Este padecimiento se caracteriza por una proliferación de células epiteliales limbares y fibroblastos, seguida de una metaplasia epitelial, neovascularización y remodelación de la matriz extracelular. Se puede clasificar clínicamente dependiendo del grado de actividad en pterigión activo *versus* pterigión inactivo.

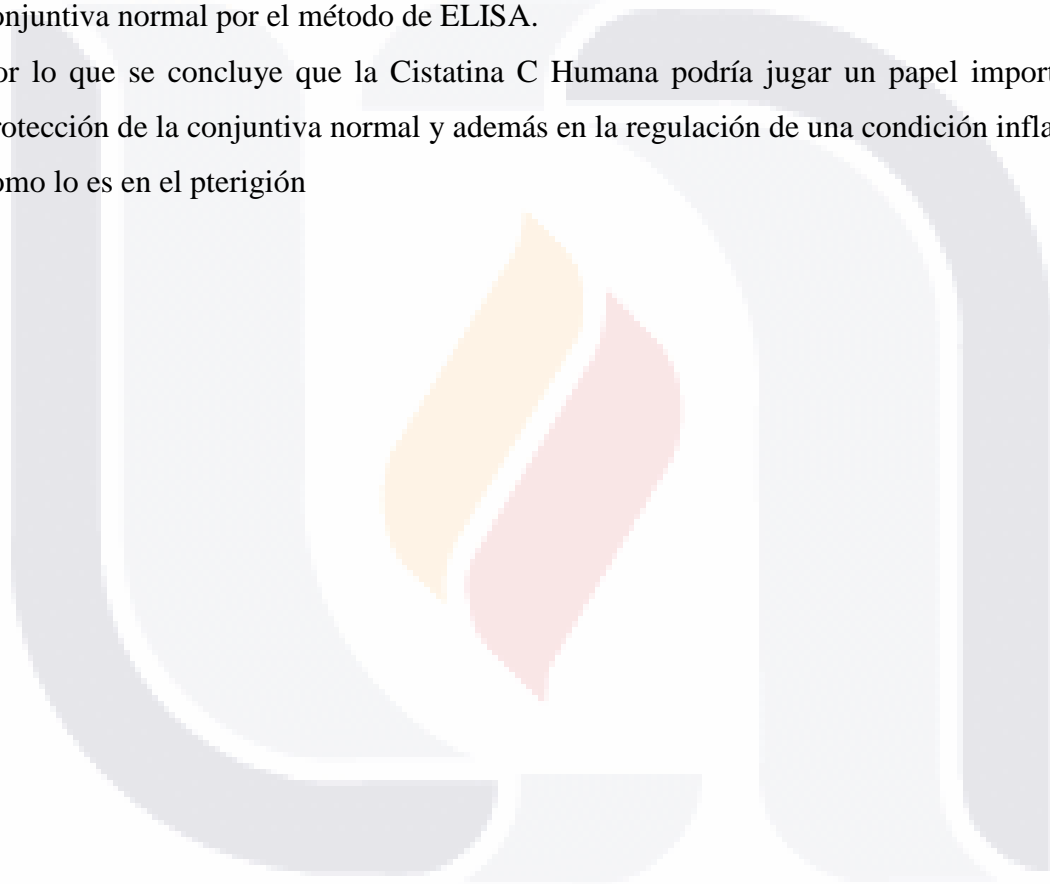
El pterigión es una patología benigna compleja en la que diversos eventos celulares como la proliferación, evasión de apoptosis, inflamación, angiogenesis y recambio de matriz extracelular son necesarios para su desarrollo. Dado que el comportamiento clínico, las opciones terapéuticas y el pronóstico visual de los pterigiones es variable, es importante analizar los eventos celulares y moleculares que intervienen en el desarrollo de esta patología. Hasta este momento no existen reportes en la literatura mundial que valoren los patrones de expresión en las diferentes formas clínicas del pterigión primario (activo vs inactivo). Asimismo se desconoce si las mismas vías activadas en el pterigión primario u otras son reactivadas una vez que el pterigión se ha removido para dar origen al pterigión recurrente en la población mexicana.

La Cistatina C Humana (CCH) es una proteína básica, no glucosilada, y de bajo peso molecular, perteneciente a la superfamilia de las Cistatinas (inhibidores de las cisteínproteasas). Se sabe que participa en inflamación, presentador de antígenos, induce la síntesis de TNF- α , IL-10, regulador de la producción de citocinas, proliferación. Se determinó la expresión de diversos genes con la (CCH) implicados en la fisiopatogenia del pterigión en los eventos que caracterizan al pterigión primario y secundario.

La expresión del RNAm y de la Cistatina C humana analizada por medio de la retro transcriptasa de reacción en cadena de la polimerasa y de ELISA e inmunohistoquímica fue detectada en la conjuntiva normal y en pterigión inflamado. Sus niveles de expresión

estuvieron incrementados en el pterigión respecto a la conjuntiva normal. La cistatina C en la mucosa de la conjuntiva normal estuvo cercana a la membrana basal en las células basales, mientras que en los pterigiones estuvo mayormente expresada en todas las células epiteliales, por lo que estuvo incrementado en la mucosa del tejido inflamatorio. En las glándulas de la mucosa de la mucosa normal estuvo débilmente teñida. La cistatina C estuvo también localizada en las células caliciformes en la conjuntiva normal y en el pterigión. La intensidad de la proteína Cistatina C estuvo más incrementada el pterigión vs conjuntiva normal por el método de ELISA.

Por lo que se concluye que la Cistatina C Humana podría jugar un papel importante de protección de la conjuntiva normal y además en la regulación de una condición inflamatoria como lo es en el pterigión



ABSTRACT

Objetives: To investigate the expression levels and distribution patterns of Cystatin C Human (HCC) in normal and primary and recurrent pterygia and to evaluate it role.

Design: A controlled, prospective study

Setting: A tertiary academic institution

Methods: Normal conjunctiva mucosa was obtained from the anterior segment ocular during surgery in 44 patients undergoing cataract surgery. Pterigia were obtained during pterygium resection in sterile conditions in several hospitals of Aguascalientes, Mexico.

Interventions: Reverse transcription–polymerase chain reaction, immunohistochemical analysis, and ELISA.

Main Outcome Measures: Expression levels and distribution patterns of cystatin C in normal mucosa and pterygium.

Results: Expression of cystatin C messenger RNAs and proteins analyzed by means of reverse transcription–polymerase chain reaction and ELISA was detected in all normal and inflammatory sinus mucosa tested. Their expression levels were increased in pterygium vs normal mucosa. Cystatin C in normal mucosa close to basement membrane in the basal cells and in the pterygium were highest expressed in all epithelial cells, which are increased in inflammatory tissues mucosa. Cystatin C normal mucosal glands were usually weak in staining intensity. Cystatin C was also localized in goblet cells in normal mucosa and in pterygium. The Cystatin C protein intensity was increased more in pterygium vs normal mucosa by ELISA

Conclusion: Cystatin C may play an important role in the protection of normal mucosa and further in regulation of the inflammatory condition like pterygium

I. INTRODUCCIÓN

El pterigión es un proceso inflamatorio, degenerativo, cuya característica distintiva es la alteración focal del limbo. Es una enfermedad que involucra un cuadro de inflamación crónica, proliferación del tejido conectivo subconjuntival y la presencia de angiogénesis, provocando un crecimiento de tejido elastótico y de conjuntiva anormal sobre la córnea (Coroneo, 1999). Debido al clima de la región a la que pertenece Aguascalientes, el cual se caracteriza por ser seco, caluro y en ocasiones con mucho viento hace que se asocie a los factores predisponentes del desarrollo del pterigión. Esta hace que el aumento en su prevalencia y los costos derivados de su atención lo hacen que sea considerado como un problema de salud pública (Harrison, 2002). Aun cuando su etiología no se ha esclarecido por completo, los progresos en el entendimiento de cómo se produce, considerando evidencias epidemiológicas, genéticas, patológicas y moleculares, ha permitido que se desarrollen tratamientos que modifiquen su aparición o progresión (Lawrence, 2003). Es más común en climas cálidos y secos. Su prevalencia es tan alta que alcanza el 22% en las zonas ecuatoriales y menos de 2% en las latitudes cercanas a los 40° (Dake, 1989). El riesgo relativo para desarrollar pterigión de una persona que vive en los trópicos (menos de 30° de latitud), es 44 veces mayor: es 11 veces más para quienes trabajan en un lugar arenoso, al exterior; es 9 veces mayor para una persona que no usa lentes con filtro ultravioleta (UV). A pesar de que se ha demostrado una mayor prevalencia en hombres, la diferencia entre géneros se elimina cuando se considera personas sin actividades con exposición a radiación UV. En el norte del continente el pterigión se confina casi exclusivamente a pescadores y campesinos (Ebana, 1995), (Gazzard, 2002), (Mackenzie, 1992). Personas menores de 15 años de edad rara vez adquieren un pterigión. La prevalencia del pterigión aumenta con la edad, su mayor incidencia es entre 20 y 49 años de edad.

El entendimiento de este proceso ha motivado que su tratamiento quirúrgico tenga como prioridad esencial reconstruir el limbo (Lawrence, 2003). A propósito del pterigión, se han realizado estudios de prevalencia, de implicaciones ambientales, de la película lagrimal, de

la superficie ocular y del tejido extirpado durante su cirugía, con el fin de explicar sus factores de riesgo, sintomatología y fisiopatología, sin embargo, los esfuerzos quirúrgicos no han eliminado al 100 % el riesgo de recurrencia posquirúrgico en ninguno de sus estados ya sea quiescente (inactivo) o inflamado (activo) (Tekin, 2001; Saw, 1999).

Las recurrencias son más frecuentes entre adultos jóvenes. Se han evaluado familias en las que se ha demostrado un patrón hereditario con modalidad dominante, aunque la mayoría de los casos parecen ser esporádicos (McCarty, 2000). De entre las múltiples proteínas y patrones de expresión que se han estudiado para reconocer actores de la inflamación, la remodelación de tejido, la angiogénesis. En apoyo a la exposición de UV en la patogénesis de pterigión está la producción de citoquinas y factores de crecimiento inducidos por UVB, incluyendo IL-1, IL-6, IL-8, TFG-alfa, FGF-2, VEGF, HB-EGF, TGF- β y factores de células raíz (SCF). En pterigión, donde UV, es mostrado como inductor de MMP-1, no alteran la expresión de MMP-3 o MMP-9, además las citoquinas proinflamatorias (IL-1 β y TNF- α), o factores de crecimiento (EGF y TGF- α), podría también influenciar la expresión de MMP en pterigión.

Los pterigiones son con frecuencia clínicamente inflamados y la presencia de depósitos de inmunoglobulinas anormales de células plasmáticas, linfocitos T, y células mastocitos. La presencia de citoquinas proinflamatorias, tales como IL-1, IL-6, IL-8, y TNF- α en el pterigión podría contribuir a la inlfujo de células inflamatorias, mientras que las SCF producidos por los fibroblastos del pterigión podría explicar el porque del número de células mastocito del estroma están elevadas.

Los cambios proliferativos en el pterigión podrían ser atribuidos a la presencia de mitogenos epiteliales y fibroblasto, tales como, EGF, HB-EGF, FGF-2 y TGF- β 1, están apostados a que inducen la migración de células epiteliales o fibroblastos. (Lee, 2001)

La vasculatura natural del pterigion podría estar explicada en parte por la sobre-expresión de factores pro-angiogénicos tales como IL-6, IL-8, TNF- α , VEGF, FGF-2, HB-GF y MMPs combinado con una disminución en factores antiangiogénicos, tales como factores

derivados del epitelio pigmentario (PEDF), endostatina, (c-terminal fragmento de tipo XVIII de colágeno), y tromboposdina-1(Kennedy, 1997), (Kria, 1996), (Wen, 2003) ,sin embargo, aun no se ha identificado la presencia de un posible actor como lo puede ser la proteína Cistatina C Humana (CCH) y su nivel de expresión en el pterigión así como en la lágrima de pacientes con esta patología ocular. El presente trabajo de tesis tiene como propósito el explicar la presencia de la CCH en el pterigión, así como en la lágrima de pacientes portadores de esta enfermedad ocular. El grado de relevancia hacia el estudio de esta enfermedad es importante ya que la extensión del pterigión se presenta en todo el mundo.

Las características histológicas del pterigión los cuales incluyen proliferación, migración celular, infiltrado inflamatorio y remodelación de la matriz extracelular, son explicados por la acción de múltiples citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento y MMPs donde su presencia es consistente con su involucramiento en la cascada herido-curativa de la córnea.

II. ANTECEDENTES

El pterigión es un proceso inflamatorio, degenerativo, cuya característica distintiva es la alteración focal del limbo. Es una enfermedad que involucra un cuadro de inflamación crónica, proliferación del tejido conectivo subconjuntival y la presencia de angiogénesis, provocando un crecimiento de tejido elastótico y de conjuntiva anormal sobre la córnea (Coroneo, 1999). (Figura 1)

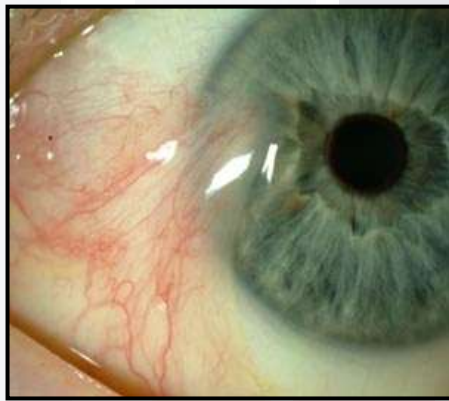


Figura 1. Pterigión activo inflamado ubicado en la región nasal. Nótese la presencia de vasos dilatados, la presencia de tejido fibroso edema e inflamación de la superficie ocular

También se le ha considerado como un desorden de la superficie ocular, que afecta solo a humanos, esta lesión se caracteriza por un crecimiento en la orilla del limbo de células epiteliales, seguida de una quemosis de epitelio con metaplasia de células de un estroma crecido debajo de los fibroblastos, neovascularización, inflamación y remodelación de la matriz extracelular (Harrison, 2002).

La exposición crónica al UV, juega uno de los mayores roles en la patogénesis del pterigión, y esto se sustenta por los datos epidemiológicos (Lawrence, 2003). Recientemente el daño solar fue detectado usando fotografía de fluorescencia UV (Tekin, 2001). El aumento en su prevalencia y los costos derivados de su atención hacen que sea considerado como un problema de salud pública (Archila, 1995).

El entendimiento de este proceso ha motivado que su tratamiento quirúrgico tenga como prioridad esencial reconstruir el limbo (Ebana, 1995). A pesar de obtenerse buenos resultados con tratamiento quirúrgico combinado con terapia farmacológica a base de desinflamatorios, todavía no se cuenta con estudios que validen una mayor eficacia cuando se compara con otras técnicas como injerto de membrana amniótica (Gazzard, 2002).

En este sentido se han realizado estudios de prevalencia, de implicaciones ambientales, de la película lagrimal, de la superficie ocular y del tejido extirpado durante su cirugía, con el fin de explicar sus factores de riesgo, sintomatología y fisiopatología (Khoo, 1998; Mackenzie, 1992; Mackarty, 2000; Panchapankesan, 1998; Saw, 1999; Bekibele, 2004). Aun cuando su etiología no se ha esclarecido por completo, los progresos en el entendimiento de cómo se produce, considerando evidencias epidemiológicas, genéticas, patológicas y de biología molecular, han permitido idear tratamientos que modifican su aparición o progresión (Lawrence, 2003). Ninguna estrategia hasta el momento, evita en un 100% la recurrencia del pterigión.

En un análisis de riesgo de aparición pterigión primario en un estudio realizado en 278 pacientes tratados en el hospital de Brisbane, en donde se comparó un número similar de personas sin pterigión con mismas condiciones de raza, edad, sexo, usando información de un cuestionario estándar que se completo durante una entrevista personal, se encontró que el pterigión se incremento en aquellos pacientes en su tercera década de vida, trabajadores a la intemperie, en un ambiente con superficie reflectante alta de luz ultravioleta comparado con aquellos que trabajaron en el interior de edificios. Aquellos sujetos que pasaron sus primeros 5 años de vida en latitudes de unos 30° tuvieron casi 40 veces más riesgo de pterigión que aquellos que vivieron latitudes de mayores a 40 grados, pasando la mayoría del tiempo fuera de casa (Mackenzie, 1992)

II.1 Fisiopatología Del Pterigión

Para comprender mejor la conducta celular del pterigión, es necesario reconocer los diversos elementos que participan desde su nivel más básico, por lo que se hace un resumen a continuación en el que se explica los hallazgos más importantes en relación a la expresión génica y la presencia de biomarcadores de la entidad patológica referida. El pterigión inicia por una transformación de las células epiteliales-mesenquimales con daño en el DNA lo que trae como consecuencia la expresión de factores de transformación y metaloproteinasas, donde los procesos de reparación dejan de ejercer su función. lo que hace que se realicen los siguientes cambios importantes clínicos y patológicos que desencadenan la aparición del Pterigión de las cuales se mencionan a continuación:

- 1.- Estudios epidemiológicos han establecido firmemente que la radiación UV tipo B es un factor etiológico para pterigión y tumores de limbo.
- 2.- El pterigión crece a partir del epitelio limbal y no desde el epitelio conjuntival.
- 3.- Un segmento del epitelio limbal, el limbo migrante, invade la córnea en forma centrípeta, seguido por el epitelio conjuntival.
- 4.- Un tipo distinto de células corneales se desarrollan en el borde del tejido que origina el pterigión.
- 5.- La membrana de Bowman es disuelta en el área cubierta por el borde del pterigión que invade la córnea.
- 6- El pterigión tiene un alto grado de recurrencia (Dushku, 2001).

Aunque otras teorías como la implicación de virus herpes simple o papiloma, como factor etiológico en la génesis del pterigión, no han mostrado evidencias sólidas, pero han permitido observar que el comportamiento de esta entidad es semejante al que manifiestan algunas neoplasias (Detorakis, 2001), (Piras, 2003), (Reid, 2003).

II.2 Efecto de la radiación ultravioleta

La luz periférica que se enfoca en el limbo nasal es de mayor intensidad que la que recibe el limbo temporal. La vía óptica de esta radiación es transcameraral y la intensidad del foco depende de la curvatura de la córnea y la profundidad de la cámara anterior. A consecuencia de la irradiación focal de las células basales epiteliales por la parte interna, se afecta a las células madre de lado nasal, es decir contrarios al ángulo contrario de ingreso que no cuentan con la protección de las células epiteliales superficiales, alterando su función como barrera en el limbo (Coroneo, 1999) (Figura 2).

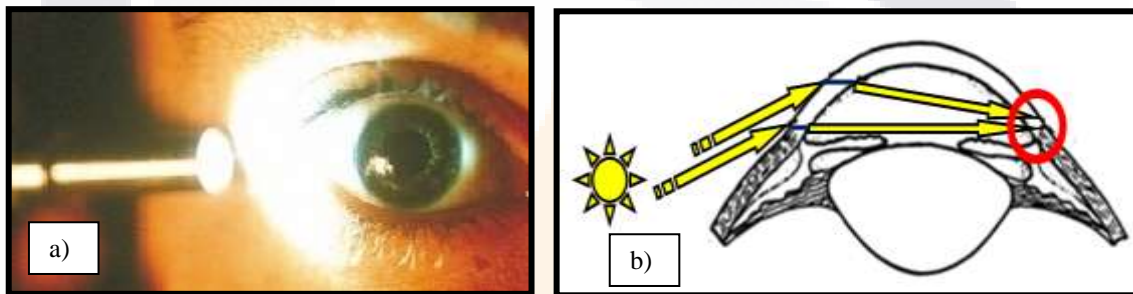


Figura 2. **a)** Vía por la cual la refracción periférica por la cámara anterior resulta del enfoque en el limbo. **b)** Incidencia de la luz desde un aspecto posterolateral por el ojo anterior hacia el limbo nasal. (Coroneo

El rol de la luz UV induce a la citoquina, factor de crecimiento y la matrizmetaloproteinas (MMPs) y que fueron dilucidados, y se propuso que estas proteínas podrían inducir a los cambios histológicos típicos en el pterigión, similar a aquellos que se presentan en la piel (Girolamo, 2004).

Se ha sugerido que la interacción entre fibroblastos y células T puede contribuir a la patogénesis de una respuesta de reparación agresiva (Chang, 2000), como en la cicatriz que loide que contiene un infiltrado fibroblástico que se incrementa a través de los años (Martin, 1990). Chang y cols. demostraron que la interacción anormal entre fibroblastos y células contribuye al desarrollo de inflamación crónica y a la promoción de cicatrización conjuntival persistente (Chang, 2001). Este problema se origina durante la fase de

resolución de la respuesta cicatrizal cuando la apoptosis debe disminuir el número de células T, mediada por INF que tiene efectos antiproliferativos y antiapoptóticos.

Otro panorama de estudio en pterigión han sido los patrones de expresión de genes que regulan tanto positiva como negativamente la apoptosis y de acuerdo con estas evidencias, el pterigión parece resultar, en parte, de una falla en la apoptosis celular (Tan, 2000).

II.3 Defecto hereditario en la reparación del DNA

Un grupo de pacientes presenta una predisposición hereditaria hacia el desarrollo del pterigión, como evidencia del incremento en la incidencia de esta enfermedad en sus parientes (Carmichael, 2001). A los pacientes con pterigión hereditario, se presenta en una edad temprana, en un rango de congénito a media-adulto, cuando el modelo de herencia parece autosómico dominante, con penetración incompleta (Zhang, 1990).

La acumulación de daños en el ADN podría contribuir al desarrollo del pterigión. Pacientes con defectos hereditarios en los mecanismos de reparación, están predispuestos al desarrollo del pterigión. Ello está ilustrado en el incremento de incidencia de pterigión en individuos con Xeroderma Pigmentosa, una condición caracterizada por el defecto de reparación por escisión en el ADN (Goyal, 1994).

Recientemente fue reportado el hallazgo de Polimorfismos de la glucosilación de la oxoguanina humana-8 (HOGG1) Ser326Cys (Kau, 2004), la glutación del S-transferasa M1 (GSTM1) anula el fenotipo, y el Ku70 promotor del polimorfismo de T-991C(Tsai, 2007), con un alto riesgo de desarrollar pterigión, considerando que el polimorfismo involucra al promotor TNF- α -308 , IL-1 β 511 (promotor y exón 5), IL-1 receptor antagonista(Elahi, 2007), p21 (codon 31), and p53 (codon 72) no lo fueron, (Nishigori, 2001; Lu, 1996) HOGG1 es responsable de remover, 7,8 dihydro-8-oxoguanina, (8- OHdG), con una alta mutagenesis de la fotooxidación de DNA, producto que se expresa de la exposición a oxígeno reactivo en las especies.

Un polimorfismo de base única (SNP), en posición 1245 en el exon 7 para el gen HOGG1 constituido de una transición de una C a una G, conlleva a una sustitución de cisteína por serina en el codón 326 (polimorfismo HOGG1 Ser326Cys) y está asociado con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer (Shen, 1996). Aunque la incidencia del polimorfismo de HOGG1 Ser326Cys no difirió entre pacientes con pterigión y controles sin la enfermedad, el genotipo Cys/Cys fue más prevalente en el pterigión, esto hace pensar que confiere incremento en la susceptibilidad para desarrollar esta condición. En algunos especímenes de pterigión, la proteína HOGG1 es co-expresada con 8-OHdG en el núcleo de las células epiteliales, y esto podría ser interesante para correlacionar al genotipo HOGG1 con proteínas de expresión y datos de funcionalidad (Kau, 2004).

Los GSTM1 (GLUTATION S-TRANSFERASA Mu-1), es un grupo de genes cuyos productos representan un grupo de enzimas involucradas en la detoxificación de carcinógenos. La delección de ambos alelos (genotipos anulados) es común en algunas poblaciones (por ejemplo 50% de la población caucásica). El genotipo anulado es caracterizado por una falta total de actividad de enzimas y confiere una sensibilidad incrementada a luz UV (Brown, 2004). Como en el HOGG1, la ocurrencia del genotipo anulado GSTM1 es similar en ambos pacientes con pterigión y controles. Sin embargo, pacientes más jóvenes con pterigión tienen una frecuencia incrementada del genotipo anulado GSTM1 (Tsai, 2004).

En humanos Tsai et Col. Identificaron un polimorfismo involucrado en el promotor T-991C del Ku70, pero no en el promotor C-57G del Ku70 para estar asociado con el pterigión. Comparado al genotipo del tipo silvestre T/T en los individuos en al menos de uno de los alelos se presentan sustituciones T/C o C/C y estos polimorfismos incrementan el porcentaje de desarrollo de pterigión en un 2.83%, así como un incremento en el desarrollo de pterigión bilateral (Tsai, 2007).

Los estudios genéticos constituyen una herramienta fundamental para el entendimiento de la patogénesis del pterigión. Los marcadores genéticos podrían servir para identificar un

riesgo individual para quienes las medidas preventivas reducirían su probabilidad de desarrollar pterigión. Sin embargo, estudios actuales deberían ser interpretados con cuidado, debido a que ellos carecen de funcionalidad y mecanismos de datos. Fueron desarrollados en una población simple, y podría estar relacionado por las vías raciales. Por ejemplo la explicación provista del polimorfismo de Ser326Cys HOGG1, es más prevalente entre Asiáticos (0.41-0.61) comparado con los Caucásicos (0.13-10.27) y la actividad funcional de Ser326Cys y de la enzima substituida no es clara. Es poco seguro si los estudios genéticos en el pterigión se ajustaron por los niveles de UV. En sus análisis de datos, esto podría explicar porque no hubo diferencias observadas entre pacientes con pterigión y controles en la ocurrencia del polimorfismo (Tsai, 2007). De HOGG1 Ser326Cys o el genotipo anulado GSTM1, desde el defecto hereditario en los mecanismos de reparación del DNA podría ser una consecuencia si los individuos estuvieron expuestos al estrés tóxico de los genes por la luz UV.

II.4 Estrés Oxidativo

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) tales como el superóxido radical, (radical hidroxilo y peróxido de hidrógeno) son moléculas altamente inestables y por lo tanto dañinas para los sistemas biológicos. Ello también incluyen al nitrógeno reactivo en las especies (RNS), tal como el óxido nítrico (NO), los cuales son producidos como un producto del metabolismo normal (Elahi, 2007), las ROS reaccionan químicamente con DNA, lípidos y proteínas conduciendo a un daño por peroxidación en los lípidos y alteración de las estructuras de las proteínas.

El estrés oxidativo constituye un fenómeno de defensa celular normal contra el ROS, y este juega un papel importante en muchos procesos de enfermedad, incluyendo la inflamación crónica, enfermedades cardiovasculares, cáncer y envejecimiento. (Nishigori 2001).

Hay una amplia evidencia que sugiere que el estrés oxidativo podría tener un papel importante en la patogénesis del pterigión. Esto incluye la presencia de 8-

hydroxydeoxyguanosinal(8- OHdG),un producto de foto-oxidación del DNA en el núcleo de células epiteliales del pterigion. (Lu, 1996; Shen, 2005) El stress oxidativo es el resultado de la actividad de la actividad del MMP-2 y la reducción de TIMP-1 en queratocono(Brown, 2004).

II.5 Factores inductores de crecimiento, activación de receptores e inhibición de la señalización de eventos.

Una de las respuestas celulares más tempranas a la exposición de rayos UV, es la activación de los factores de crecimiento asociado a las uniones ligando y esto supone al ROS generado por UV (Peus, 1999), (Brenneisen, 2002).

Esta respuesta es común para la superficie ocular (pterigión) y el sistema cutáneo, donde la radiación UV induce la fosforilación e internalización de los receptores de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) en minutos de exposición seguida por la activación de tres vías de proteín-quinasas mitogenas-activadas (MAPK): kinasa extracelular de señal reguladora, (ERK), c-jun amino terminal, (JNK) y p38. (Girolamo, 2005), (Fisher, 1998). En pterigión la activación con UV de la vía de los ERK es mostrada al inducir producción de MMP-1(Girolamo, 1998, 2003), considerando la activación del stress relacionado a los JNK y p38, vías que contribuyen a la inducción de IL-6 e IL-8 con sobreexpresión del EGFR en pterigión (Liu Z, 2002) contribuyendo a la amplificación de estas vías de señalización.

La cascada de EGFR y MAPK activan la inducción de los factores de transcripción, tales como el activador de proteína-1 (AP-1) y el factor nuclear kB (NF-kB) el cual media alguna respuesta celular a los daños por UV (Abeyama, 2000)

La activación de UVB en la ruta del JNK induce la producción de c-Jun y combinado con c-Fos, esto forma complejo el AP-1 responsable de la inducción del MMP-1(Brown, 2004) EGFR induce la activación del NF-kB por otro lado. Esto hace pensar que ocurren varias

vías de señalización e involucran factores de necrosis tumoral con la interacción de proteínas como NF-kB induciendo kinasas (Habib, 2001). NF-kB se muestra como un mediador que induce mediante radiación UV la liberación de IL-1, IL-6 TNF-alfa, y VEGF de piel. IL-1 IL-6 y TNF-alfa de células epiteliales corneales humanas cultivadas (Ansel, 2001). Por lo tanto es posible que la posibilidad de que la luz UV-induzca la activación de NF-kB y que podría llevar a la inducción de estas citoquinas factor de crecimiento en pterigión

II.6 Citoquinas, factores de crecimiento y matriz metaloproteinasas

II.6.1 Metaloproteinasas

En el desarrollo y progresión del pterigión se han involucrado factores de crecimiento como el factor de crecimiento fibroblástico, factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento transformante beta y factor de necrosis tumoral alfa. De estos estudios se ha postulado que estos factores de crecimiento y otras citoquinas contribuyen a la inflamación, proliferación celular, remodelación del tejido conectivo y angiogénesis observadas en el pterigión (Sivak, 2002). Es importante resaltar que estas citoquinas modulan una clase de enzimas proteolíticas llamadas matriz metaloproteinasas (MMP), las cuales son activas contra todos los componentes de la matriz extracelular. Las MMPs han sido implicadas en tumores invasivos, metástasis, destrucción articular en pacientes con artritis reumatoide y en la degradación de la esclera en pacientes con escleritis necrotizante. A consecuencia de la exposición a la radiación UV, y con la acumulación de suficientes mutaciones, las “células pterigión” invaden la membrana basal de la córnea y colocan células conjuntivales epiteliales junto con éstas (Wilson, 2001). La degradación de la membrana de Bowman ocurre a consecuencia de un aumento en la concentración de proteasas que degradan los componentes de la membrana basal como el colágeno tipo IV y el colágeno fibrilar del estroma corneal (Wilson, 2001). También el limbo y la conjuntiva normales presentan pérdida de estas proteasas o tienen bajos niveles de las mismas. La clase primaria de

proteasas que degradan la matriz son llamadas matriz metaloproteinasas (MMPs) (Dushku, 2001).

Las MMPs son una familia de enzimas genéticamente distintas las cuales se producen normalmente en pequeñas cantidades para procesos fisiológicos, por células tales como los fibroblastos y las células epiteliales. Recientemente se reportó que los fibroblastos de pterigión exhiben una expresión elevada de MMPs (Solomon, 2000). En general, las células tumorales invasivas sobre-expresan MMPs de varios tipos dependiendo del tumor. Esas proteasas producidas por las células tumorales facilitan la degradación de los componentes de la membrana basal (como la membrana de Bowman) adyacente a la matriz estromal (Dushku, 2001).

La matrilisina (MMP-7) es el más pequeño miembro de las MMPs y es capaz de desnaturalizar un amplio espectro de proteínas de matriz incluyendo fibronectina, vitronectina, elastina, colágeno IV y proteoglicanos. Esta proteinasa puede amplificar la respuesta inflamatoria a través de facilitar el proceso en la superficie celular implicado en el TNF- α (Girolamo, 2001). Las MMPs son reguladas a varios niveles, incluyendo niveles transcripcionales, donde son moduladas por varias citocinas y factores de crecimiento. A nivel del proceso postrascricional, se requiere la activación en el espacio extracelular por otras proteasas y, finalmente, al nivel de inhibición, donde son reguladas por inhibidores tisulares específicos (TIMPs) (Girolamo, 2000). A la fecha sólo se han clonado y caracterizado cuatro TIMPs. Su principal función es la inhibición de la actividad de las MMPs, sin embargo, algunos estudios en epitelio corneal han demostrado que tienen una potente actividad semejante a factores de crecimiento.

II.7 Fibroblastos

Basados en cultivos celulares, los fibroblastos juegan un papel preponderante en la recurrencia del pterigión. Se han identificado factor de crecimiento fibroblástico y factor de crecimiento transformante beta1 en capilares intraepiteliales, mastocitos y epitelio del

pterigión. Esto sugiere que el tejido conectivo perivascular y defectos asociados en la lámina basal epitelial proveen una vía para la migración de Fibroblastos(Seifert, 1998). Lo anterior sugiere por qué el pterigión tiene una alta tasa de recurrencia y justifica los cambios en la técnica quirúrgica con el propósito de eliminar todo el tejido fibroso posible con daño mínimo a las estructuras adyacentes (Tan, 1999). El desecamiento local de córnea y conjuntiva en la fisura interpalpebral originada por alteraciones en la película lagrimal, puede causar un aumento en los niveles del factor de crecimiento fibroblástico. El incremento en la incidencia del pterigión en climas ventosos y secos es consistente con esta hipótesis.

II.8 Citocinas

Se han presentado datos *in vitro* que sugieren que las citocinas pro inflamatorias pueden modificar la expresión de la matriz extracelular. El rol de las citocinas y factores de crecimiento en la patogénesis del pterigión está por establecerse. Varios estudios han documentado la expresión de citocinas en el pterigión y cultivos de células derivadas del mismo como el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-B), el factor transformante del crecimiento beta 2 ($TGF\alpha_2$), el factor de crecimiento fibroblástico beta ($FGF\alpha$) y el factor vascular endotelial (VEGF). La localización de factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) en el pterigión, en el endotelio vascular, y la presencia de capilares intraepiteliales en pterigión sugieren un rol angiogénico de las citocinas en esta entidad (Kennedy, 1997). La IL-8 es un producto de monocitos activados, fibroblastos y células epiteliales y endoteliales. Es una citocina proinflamatoria, multifuncional, con actividad angiogénica, de quimiotaxis de neutrófilos y de actividad proliferativa de queratocitos con participación descrita en el papel del pterigión. Y se produce en respuesta a numerosas citocinas. También se ha demostrado inducir la producción de MMPs. (Girolamo, 2002)

La IL-6 es una citocina pleiotrópica proinflamatoria sintetizada por fibroblastos células endoteliales y queratinocitos en respuesta a varias citocinas incluyendo TNF α e IL-1, similar a IL-8, IL-6 también puede inducir la expresión de MMPs (Girolamo, 2002, 2002). Consistente con su rol angiogénico, existen evidencias de la producción de estas citocinas que pueden ser inducidas por radiación UV. Kennedy aplicó a fibroblastos corneales humanos dosis fisiológicas de radiación UV-B y demostró una expresión significativa de IL-1, IL-6, IL-8 y TNF- α . Ansel demostró una regulación hacia arriba de las mismas citocinas en el epitelio corneal después de exposición a radiación UV. Estos datos sugieren que esta inducción es mediada por un factor proveniente del núcleo (NF κ B). En experimentos similares, la expresión más elevada del mRNA de IL-6 y fue de 2 a 6 horas después de la irradiación por UV-B en queratinocitos humanos (Ansel, 2001). El óxido nítrico está implicado en un amplio rango de funciones biológicas incluyendo neurotransmisión, vasodilatación e inflamación. También se ha reportado como modulador del tono vascular, permeabilidad y crecimiento capilar, y existen evidencias de que su expresión se incrementa por acción de la óxido nítrico sintetasa, por exposición a radiación UV (Lee, 2001)

II.9 Miofibroblastos

Recientemente se ha obtenido evidencia de la existencia de miofibroblastos en el tejido fibrovascular de pterigionos primarios y recurrentes mediante inmuno histoquímica y análisis de ultraestructural. La presencia de miofibroblastos ayuda a explicar por qué el pterigión produce un astigmatismo corneal (Touhami, 2005). Los fibroblastos están presentes en y alrededor del cuerpo del pterigión, pero están ausentes en la cabeza.

Es posible que los miofibroblastos se originen de fibroblastos residentes activados por estímulos fibrogénicos como factor de crecimiento transformante, factor de crecimiento del tejido conectivo y factor de crecimiento derivado de plaquetas. No se ha demostrado migración de miofibroblastos al tejido periorbitario y sí se ha documentado la existencia de miofibroblastos en el tejido fibroadiposo normal posterior a la cápsula de Tenon. Se

requieren futuros estudios para evaluar la contribución de este tejido en la formación de tejido fibrovascular contráctil del pterigión (Lavker, 2004).

II.10 Expresión e investigaciones de p53

Tradicionalmente el pterigión se ha considerado como una lesión descrita histológicamente como degeneración elástica. Sin embargo, recientemente características parecidas a los tumores fueron encontradas en pterigiones. Entre ellas están las características histológicas tales como media displasia e invasión local (Clear, 1979) y las características clínicas del rango de alta recurrencia. Más aun las modalidades del tratamiento de pterigión tales como escisiones anchas, uso de antimetabolitos e irradiación mimetizan aquellos que son modalidades que son inicialmente modalidades del uso de tratamientos para enfermedades neoplásicas (Wong, 1999), (Sánchez, 1998), (Lam, 1998), (Frucht, 1996). Dushku, Reid y Tan, reportaron alta expresión de p53 en el epitelio encima del pterigión y especularon sobre la existencia de una mutación del gen p53 en el pterigión. Ellos concluyeron que el pterigión es un crecimiento desordenado en el cual la mutación p53 tiene un rol importante. Además hay inestabilidad microsatelital y pérdida de heterocigocidad, dos comunes hallazgos en tejidos tumorosos y se encontraron en pterigión humano apoyando la hipótesis de que el pterigión es una lesión neoplásica benigna (Tan, 1997). Otro común hallazgo en los tejidos tumorosos es la alta actividad proliferativa. Sin embargo, Karukonda et al. mediante el uso de citometría de flujo, actividad proliferativa similar entre pterigión primario y recurrente y conjuntiva normal.

Itai Chowers, no correlacionaron tipo de pterigión, tamaño, volumen, vascularidad, y rango de progresión con la expresión de p53. Algunos de estos factores podrían estar asociados con el rango de proliferación del pterigión. Además concluyen que la patogénesis del pterigión aun poco clara, por lo tanto es concebible que la mutación de p53 no es crucial para la formación del pterigión primario y recurrente. La clasificación del pterigión como un tumor benigno no está aun bien establecido pero los estudios más extensos pueden resolver lo que sucede.

TSIS TSIS TSIS TSIS TSIS

Tsai et al. Evaluaron la expresión de la proteína p53 en tejidos con pterigión y para revisar todos los estudios inmunohistoquímicos sobre el pterigión en Medline, para evaluar los roles de la edad, género, raza, anticuerpos p53, niveles de corte de análisis inmunohistoquímico, partes del pterigión, espectro de mutación de genes p53, pterigión primario y recurrente sobre resultados de tinción de p53. Ellos concluyen un rango positivo de tinción de p53 en 8 estudios inmunohistoquímicos. El anticuerpo para proteína p53, el nivel de corte, la raza y el espectro de mutación del gen p53, todos ellos afectan al resultado de la tinción de p53. Diferentes partes del pterigión y lo que corresponde al género y más allá de la evaluación en su rol sobre los resultados de tinción de p53 (Dushku, 1997).

La causa de diferentes prevalencias del rango de p53 positivo por análisis inmunohistoquímico permanece desconocido. Ha sido propuesto que esto podría estar relacionado a diferentes anticuerpos usados. Sin embargo, aun con el uso de anticuerpos, la prevalencia fue también diferente (Tan, 1997), (Onur, 1998), (Weinstein, 2002), sugiriendo que otros factores podrían jugar un rol que afecta el resultado de la tinción de p53.

Se tienen resultados controversiales sobre el nivel del corte para localizar la expresión de p53, entre varios artículos, sin embargo, Tsai, indica que si se conduce el nivel del corte en un 10% es más exacto para detectar la prevalencia de la mutación del gen p53 para evaluar su rol en la formación del pterigión. En casi todas las partes del pterigión incluyendo la migración al limbo, epitelio corneal adyacente, y epitelio limbal circunferencial, más allá de las capas conjuntivales se tiñeron en anticuerpos para p53 (Tsai, 2005).

Actualmente es bien conocido que establecer una tinción inmunohistoquímica para detección de gen p53 tiene rangos altos falsos negativos debido a que el gen p53 puede estar inactivado por varios mecanismos. (Skilling, 1996), (Inghanas, 1996). Debido a estos rangos altos de falsos positivos y negativos de análisis inmunohistoquímicos para la detección de mutación del gen p53. la secuencia del DNA para el estatus del gen p53 es considerado usar un método más exacto para evaluar la mutación del gen p53. (Skilling, 1996), (Inghanas, 1996).

De acuerdo al texto anterior podemos decir que la radiación ultravioleta se ha reconocido como un factor que produce la mutación del gen supresor de tumor p53. Se ha reportado una expresión anormal de p53 en pterigión, pingüecula y tumores de limbo. A consecuencia de este daño al mecanismo de muerte celular programada dependiente de p53, las mutaciones en otros genes pueden progresivamente adquiridos por las células basales limbales alteradas. Esto es consistente con el concepto de “multi-pasos” en el desarrollo de las alteraciones del limbo en el pterigión y la pingüecula. Inclusive la caracterización de la invasión corneal por un pterigión primario y uno secundario se diferencian porque este último muestra la presencia de células limbales epiteliales basales alteradas. Lo anterior constituye una infiltración local de la conjuntiva adyacente por “células pterigión” que son células basales epiteliales limbales parecidas a células tumorales que tienen alterada la expresión del gen supresor de tumor p53, estas pueden originar no solo un alto porcentaje de recurrencia si no son controladas por el tratamiento quirúrgico o por la quimioterapia.

El estudio de genes supresores de tumores ha demostrado el impacto de la radiación UV en el DNA de las células basales. El método usual para localizar sitios en el genoma de candidatos a genes supresores de tumores es detectando la pérdida de heterogeneidad usando marcadores microsatélites polimórficos. Una característica de las células neoplásicas es su tasa elevada de mutaciones reflejada en la inestabilidad de su DNA microsatelital. Detorakis en 1998 encontró una pérdida de heterogeneidad en el brazo corto del cromosoma 9 “9p” en 48% y en el brazo largo del cromosoma 17 “17q” en 42% de 50 pterigiones. Esta evidencia se correlacionó con factores de riesgo y se interpretó como un posible predictor de recurrencia.

II.11 NCélulas progenitoras derivadas de médula ósea

Lo relevante en la superficie ocular con respecto a las células progenitoras derivadas de médula ósea consiste en que son identificadas como células epiteliales progenitoras, y son identificadas en el limbo mostrando una remarcable capacidad de regenerar el daño de la superficie ocular. (Lavker, 2004). El pterigión está hipotéticamente levantado por las

células raíz limbales alteradas por UV y muy recientemente las células progenitoras de la médula ósea fueron propuestas para contribuir en su patogénesis (Coroneo, 1993). Las células progenitoras de médula ósea están normalmente presentes en la córnea, y esto es demostrado en el trasplante de médula ósea en ratón, lo cual permitió el rastreo de médula ósea progenitora dentro del estroma de la córnea. (CD14, CD11b, CD11c, CD45 y HDL-DR), pero no los marcadores del linaje (CD19, CD3, CD56 o CD66), de las córneas humanas que apoyaron este concepto.

Marcadores hematopoyéticos como (CD34, CD133 o c-kit positivo) y mesenquima (STRO-1 positivo) han sido descritos en el pterigión y se piensa que contribuyen al estroma fibrovascular.

El más reciente estudio sobre infiltrado inflamatorio en el pterigión revelo la presencia de linaje negativo mononuclear de células que no se expresaron CD3, CD20, CD68, o triptasa, y estas células primitivas podrían haber estado siendo atraídas a la superficie ocular por la sustancia P (SP), desde que ellas expresaron al receptor de neurokinina-1 (NK1R) en abundancia.(Chui, 2007). Lee y colegas hipotetizaron que la circulación de las células progenitoras podrían contribuir a nuevos vasos en pterigion. *Para confirmar esta teoria se requerira aislar células progenitoras del pterigión y evaluar su potencial vasculogénico.*

II.12 Expresión de la Ciclooxygenasa-2 en pterigión primario y recurrente

El pterigión tiene una proliferación histopatológicamente fibrovascular. Esta expansión de proliferación fibrovascular es considerada como un índice morfológico conveniente para la evaluación del riesgo de recurrencia después del tratamiento quirúrgico (Hill, 1989), (Degrassi, 1993). El pterigión usualmente regresa después de la escisión quirúrgica (Avisar, 2001). La causa de recurrencia que podría estar relacionado con varios factores de riesgo incluyendo factores ambientales. Si las diferencias etiológicas y patogénicas entre recurrencia y no recurrencia son descubiertos, el tipo de tratamiento puede ser más

fácilmente seleccionado, un tratamiento conveniente puede ser encontrado (Marvovich, 2002), (Tan, 1997).

Los hallazgos histopatológicos revelan que la hiperplasia epitelial y el tejido fibrovascular exuberante es el estroma del pterigión (Tan, 1997). Importamente la extensión de la proliferación fibrovascular en el estroma ha sido usado como un índice morfológico confiable para predecir la recurrencia del pterigión seguida de la escisión primaria (Touhami, 2005), (Kria, 1996). Sin embargo, ese criterio no ha sido suficiente para evitar la recidiva. Las ciclooxigenasas-1 y-2 median la proporción que limita el paso en el metabolismo del ácido araquidónico (Williams, 1999). La expresión de RNAm, COX-2 y proteínas es frecuentemente aumentada en varios tipos de células humanas por las citoquinas inflamatorias tales como IL-1 β , y TNF- α . Ambas isoformas de ciclooxigenasas, constitutivo COX-1 inducible COX-2, catalizan la producción de prostanoide para el ácido araquidónico (Williams, 1999). COX-2 inducen la producción de prostanoide que esta frecuentemente implicado en las enfermedades inflamatorias, caracterizado por el edema y el daño tisular debido a la liberación de muchas citoquinas inflamatorias y factores quimiotácticos, prostanoide, leucotrienos y fosfolipasas. (Kumano, 2004).

La expresión de COX-2 es inducida por varios estímulos, y la sobre expresión esta cercanamente relacionada a la patogénesis de algunas enfermedades degenerativas incluida el cáncer (Smith, 1996). Varias líneas de evidencia indican que la sobre expresión COX-2 puede ser un factor causal para el crecimiento del tumor y metastasis. La sobre expresión de COX-2 *in vitro* es promotor de la producción de células en la proliferación del cáncer de próstata y aumenta la invasión en el hígado humano, pulmón, y células de cáncer de colon (Tsuji, 1997), (Fujita, 2002), (Li G, 2002). Más aun, por los hallazgos se considera que los efectos de COX-2 en la formación de tumores cutáneos también ha sido reportada en el pterigión, incluyendo interrupción de apoptosis, proliferación epiteal limbal, expresión anormal de gen p53 y sobre regulación de factores de crecimiento básico de fibroblastos, factores de crecimiento endotelial vascular y síntesis de oxidó nítrico(Tan, 1997, 2000), (Dushku, 2001), (Lee, 2001). Aunque la patogénesis del pterigión está a un pobremente entendible, las evidencias epidemiológicas sugieren que el estrés ambiental podrían tener

un rol.(Girolamo, 1999). Recientemente varias citoquinas tales como TNF α , factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), y factores de crecimiento de transformación β (TGF. β) han sido localizado para ambos residentes y células inflamatorias del pterigión, Kria *et al*, recientemente reportaron que los fibroblastos de pterigión expresan potentes factores fibroangiogénicos tales como factores de crecimiento de fibroblastos básicos (β -FGF), factores de crecimiento derivados de plaquetas, TNF α y TGF. β sugieren que ellos podrían tener un posible error en la patogénesis de pterigión. (Kria, 1996).

Chiang *et al* investigaron la expresión del COX-2 y encontraron en 75 especímenes (83.3) tinción positiva para COX-2 en grupo de pterigiones. La tinción fue limitada al citoplasma de las capas fibrovasculares. Todos los especímenes fueron negativos en los grupos normales en conjuntiva y en limbo. Este estudio detecto la expresión de COX-2 en ambos tejidos, corneo-escleral, pterigio primario y en el epitelio superficial del pterigión recurrente y también en células estromales con método de inmunohistoquímica, también encontraron que la expresión de COX-2 fue significativamente más intensa en estroma de fibroblastos del pterigión recurrente comparado con el pterigión primario. (Chiang, 2007). Estos hallazgos manifiestan que la proliferación de los fibroblastos es más desarrollada en el pterigión recurrente que en pterigión primario. También en todos los pterigiones recurrentes hubo expresión de COX-2 detectado en células inflamatorias de estroma. Aunque en otra investigación se observo que la expresión de COX-2 es más excesiva en pterigiones recurrentes comparado con pterigiones primarios; esto, no fue estadísticamente significativo. Quizá esto pudo deberse a la pequeña serie de pterigiones recurrentes.

El pterigión es ahora considerado ser el resultado de una proliferación celular no controlada similar a un tumor, en el cual hay daño a la regulación celular y al control de ciclo celular (Perra, 2006). La mitogenesidad en la construcción de una nueva red vascular y remodelación de la matriz extracelular fue observada en el pterigión. Juntos crean un nuevo tejido vascular y fibrótico, los cuales tienen una agresiva forma de crecer sobre la cornea (Solomon, 2006).

Cambios en los proteoglicanos es conocido que inducen cambios edematosos, los cuales en su momento causan proliferación de fibroblastos esto no está aún claro como las alteraciones del tejido son inciertos y se mantienen en progreso (Sakoonwatanyoo, 2004). Factores controversiales incluidos la mutación de células madre en el limbo, modificaciones de fibroblastos del estroma e inmunológicos, y otros procesos en la matriz. Se muestran como nuevos modelos de patogénesis del pterigión y su interacción entre células epiteliales fibroblastos, y matriz, así como la acción de desnaturalización, de la matriz de las metaloproteinasas. (Seifert, 2001).

Para Nermin Karahan et al. la proliferación de fibroblastos explica la aparición clínica y la conducta del pterigión recurrente. Como un resultado en la luz UV de estos hallazgos Karahan piensa que después de la escisión del pterigión la inhibición de COX-2 selectivo, podría ser de ayuda a la prevención del pterigión recurrente, sin embargo, es solo una hipótesis que no ha sido demostrada

II.13 Transición Epitelial-Mesequimal

La transición Epitelial Mesenquimal, es un proceso por el cual las células epiteliales toman características de células mesenquimales. Esto es identificado dentro del desarrollo, reparación de la herida y la carcinogénesis (Hay, 2005), (Zavadil, 2005). Recientes publicaciones sugieren que la transición epitelial-mesenquimal podría estar activamente involucrada en la patogénesis del pterigión, (Kases, 2007), (Kato, 2007) y esto podría proveer un explicación del origen de los fibroblastos del pterigión. Kato y colaboradores describieron cambios en el pterigión que se pareció a la transición epitelial-mesenquimal. Esta incluye disminución de la regulación de la E-cadherina con acumulación intranuclear de β -Cadherina y factor 1- asociado a linfocitos, co-expresión de citoqueratina y actina o vimentina de músculo liso α en células epiteliales extendiéndose hasta el estroma y los factores de transcripción lentos en los núcleos de las células epiteliales del pterigión, las cuales estuvieron ausentes en el epitelio corneal normal. El origen de los fibroblastos de pterigión no es claro, es posible que ellos se originen del epitelio limbal que ha sufrido

transición epitelial-mesenquimal, donde la transición del epitelial-mesenquimal podría ser una consecuencia de la estimulación por factores de crecimiento tales como TGF- β y TGF-2 (Strutz, 2002) o por exposición a la luz UV los cuales inducen factores de transcripción lentes asociados con transición epitelial-mesenquimal en keratocitos (Hudson, 2007). El concepto de células limbales epiteliales nos hace creer que los fibroblastos del pterigión a través de la transición epitelial-mesenquimal esta apoyada por los modelos animales que muestran que podría ocurrir localmente durante la fibrosis. (Iwano, 2002).

II.14 Cambios Preneoplásicos en el Pterigión

II.14.1 Cambios fenotípicos

El Pterigión podría ser considerada una lesión inicial en términos de invasión local y propenso a la recurrencia. Apoyando esa idea es la presencia de cambios displásicos observados en algunos pterigionos, incrementando la proliferación e invasión *in situ* y expresión de marcadores asociados con un fenotipo asociado.

La presencia de los cambios displásicos en una proporción de pterigionos es reportado Sevel y Sealy, quien observo 12 carcinomas de células escamosas y 17 carcinomas *in situ* creciendo de 100 casos de pterigión. Ellos vieron que los “cambios reactivos” podrían ser difíciles para poder distinguir de un carcinoma “in situ” al pterigión. Lo cual ilustra que los cambios de malignidad podrían ser considerados en un pterigión, si hay evidencia inusual de invasión o extensión, o si la lesión se convierte particularmente en vascular (Sevel, 2000).

La proliferación incrementada en la capa fibrovascular del pterigión sugiere que es debido a un incremento del contenido del DNA. (Tan, 2000). Las células epiteliales del pterigión la proteína antiapoptótico BCL-2 y moléculas relacionadas al ciclo celular, asociadas con proliferación, incluyendo la ciclina elevada D1, Ki167 antígeno nuclear de proliferación celular, con supresión de p27 (K1P1) un inhibidor de ciclinas dependientes de kinasas

(Tsironi, 2001), (Ueda, 2001), (Kase, 2007). La presencia de EMT en pterigión es similar a los mecanismos empleadas por las células de cáncer durante la progresión del tumor. Tales cambios podría ayudar a explicar las características del crecimiento transformado de los fibroblastos del pterigión en cultivo, tales como la dependencia al suero reducido y la formación de colonias sobre el cultivo (Chen, 1994).

Otros marcadores expresados por las células del pterigión que son atribuidos a un fenotipo transformado incluyendo el IGF-BP2 incrementado en los fibroblastos del pterigión (Solomon, 2003). y un nivel disminuido del inhibidor de crecimiento IGF-BP3 en el epitelio, el cual a través de la biodisponibilidad alterada de IGF. (Wong, 2006), (Lee, 2002). Más recientemente los receptores a lipoproteínas de baja densidad y la coenzima-A hidroximetilglutaral reductasa fueron reportadas en cultivos de pterigión y en fibroblastos de pinguécula (Peiretti, 2004) y modificaciones al metabolismo del colesterol fueron hipotetizados que juegan un rol en la proliferación de los fibroblastos (Dushku, 1997).

II.15 Cambios genéticos

Los daños genéticos acumulados se sugiere que juegan un rol en la patogénesis del pterigión. (Dushku, 1997), y los defectos hereditarios individuales en la vías de reparación del DNA han incrementado el riesgo de desarrollar esta condición. Evidencia actual de cambios genéticos en el pterigión, sin embargo, varía entre reportes. No obstante, una proporción de pterigiones muestra pérdida de heterozigocidad e inestabilidad microsatelital, (Spandidos, 1997), mutación de p53, mutación del gen K-RAS, e hipermetilación del promotor p16, estos cambios probablemente atribuidos al fenotipo transformado son asociado con esta enfermedad. (Detorakis, 2005), (Chen, 2007).

La pérdida de heterozigocidad (PHO) e inestabilidad microsatelital (MI) fueron inicialmente descritas por Spandidos y colegas, quienes en una serie de 15 pterigiones encontraron 8 especímenes (53%) con PHO y 2 (13%) que mostraron MI (Spandidos, 1997). El mismo grupo después publico en un estudio de 50 casos de pterigión, donde la

PHO fueron descritas por el cromosoma 9p (48%) y 17q (42%), pero únicamente 3 casos de MI fueron reportados (Detoralis, 1998). Más recientemente en 13 casos de pterigión, Schneider y colegas fueron incapaces de encontrar evidencias de MI por amplificación de DNA por componentes del estroma y del epitelio, ellos no encontraron evidencias de PHO (Schneider, 2007).

El supresor de tumor p53 es un factor de transcripción que induce el arresto del ciclo celular. La reparación del DNA o de apoptosis bajo condiciones de estrés tóxico, tal como las que son inducidos por la luz UV. La función normal de p53 previene la acumulación de aberraciones genéticas, e inactiva las mutaciones a este gen es frecuentemente encontrado en cáncer de piel y correlacionado con el daño de DNA inducido por UV (Drouin, 1997). Una liga entre p53 y pterigión, fue primero propuesto por Dushku y Reid, quienes notaron que la expresión de p53 estuvo incrementada en el pterigión, tumores limbales y en pinguécula etapa II. Desde entonces varios investigadores han confirmado inmunohistoquímicamente la presencia de p53 en el pterigión.(Tan, 1997), (Weinstein, 2002) mientras que otros reportan una ausencia de p53 en sus especímenes una pérdida de la expresión de p53 en casos de recurrencia. (Onur, 1998), (Chowers, 2001)

En otro orden de ideas hemos tomado a la Cistatina C Humana como un elemento más de expresión ya que se ha encontrado en una variedad de condiciones como el síndrome cerebral hemorrágico, el cáncer de próstata de pulmón en melanomas, el infarto al miocardio, el infiltrado glomerular, etc.

II.16 Cistatina C Humana (CCH)

La CCH es una proteína miembro de la superfamilia de las Cistatinas, el cual consiste de un grupo de evolucionarias proteínas relacionadas como el inhibidor lisosomal de las cisteine proteasas, Catepsinas. La superfamilia de las Cistatinas esta dividida entre cuatro familias dentro de las cuales se ubican de acuerdo a su secuencias similares (Barret et al 1984, Abrahamson et al 2003, Mussap and Plenabi 2004) El tipo I es llamado Estefinas, son

pequeñas de 11 KDa, and y es una proteína intracelular citoplásmica, La Cistatina Humana A y B así como sus homólogos en ratón, rata, vaca, y cerdo, son representativos de esta familia. La Cistatina A es encontrada principalmente en células epiteliales y en leucocitos B polimorfonucleares mientras que la Cistatina B es ampliamente distribuidas entre las células y los tejidos. Las Cistatina del tipo 2 son principalmente proteínas extracelulares. La Cistatina C junto con la Cistatina de huevo blanco de gallina y las Cistatinas salivales D, S, SA, SN pertenecen esta familia, (Turk and Bode 1991; Bobek and Levine 1992, Abrahamson et al 2004; Mussap y Plebani 2004). La tercera familia es la de los Kininogenos. La cual contiene tres masas de alto peso molecular, H, (Alto peso molecular), L (bajo peso molecular) y T-kininogeno, estas son proteínas intravasculares que son expresadas en el hígado y funcionan como precursores para péptidos vasoactivos (kinina). El más reciente descubrimiento de las Cistatinas 4 es el de la Fetuinas, son expresadas principalmente en el hígado y funciona en el cerebro y en la sangre durante la vida fetal, (Mussap y Plebani 2004).

La Cistatina C y la Cistatina de huevo blanco de pollo son los miembros más estudiados de la superfamilia de las Cistatinas. La Cistatina C fue la primera descubierta en 1961 del fluido cerebroespinal humano (CSF) y de la orina y fue llamada γ -CSF o post- γ .proteína (Mussap y Plebani 2004). También fue llamada γ -trace humana y post γ -globulina antes el nombre Cistatina C fue asignado por Barret en 1984. (Figura 3)

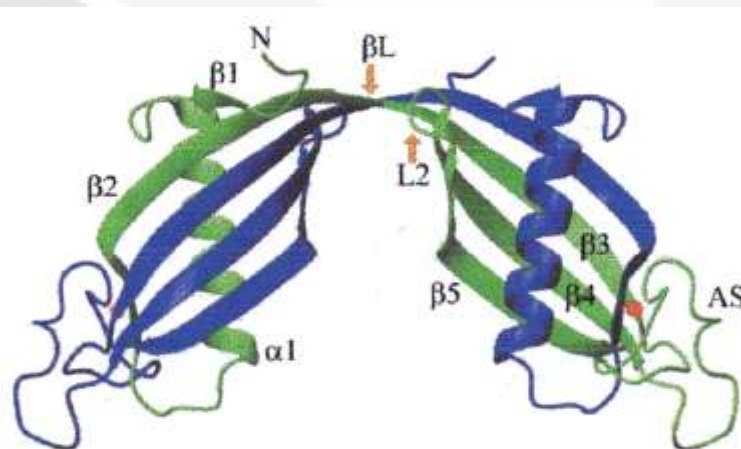


Figura 3. Estructura de la Cistatina C: El pliegue de la Cistatina C de pollo en 3D, con un dominio de intercambio del dímero en una vista horizontal (Modificado por Janowski R, et al. 2001).

II.17 Gene de la Cistatina C

El gen de la Cistatina C humana (CST3) esta localizada en un cluster gen del cromosoma 20p11.2 junto con otras dos familias miembros de las Cistatinas (Abrahamson et al. 1989, Shnittger et al 1993). Los genes de ratón y de rata que codifican para Cistatina C están localizados sobre el cromosoma 2 y 3 respectivamente (Huh et al 1995, Gauguier et al 1999). El tamaño total del gen de la Cistatina C humana es aproximadamente de 4.3 kb y consiste de tres exones interrumpido por dos intrones (Abrahansom et al 1999). La región promotora (flanqueando en la región 5´) tiene varias propiedades que son típicas de los genes constitutivos y su presencia podría explicar la ubicación y la expresión del tejido no específica del gen de la Cistatina c (Abrahansom et al 1990) La región promotora no contiene una secuencia para la caja CAAT y tiene un alto contenido de nucleótidos-GC y un gran número de dinucleótidos CpG (Abrahansom et al., 1990 Levy et al 1989) lo cual podría estar relacionado a su constante transcripción (Bird 1986). Además la región promotora contiene una región motif TATA, ATAAA , (-119) y dos sitios de unión para el factor de transcripción Sp1 (-730 y -146).La organizacional y estructura total del gen de la Cistatina C en el ratón es similar al humano, aunque hay algunas diferencias en la región promotora (Huh et al 1995)

El gen de la Cistatina C humana tiene tres sitios de restricción polimórficos *KspI* localizados en la región flanqueada 5´ en la posición -157 y -72 y en el exón 1 en la posición +73 relacionado al punto de inicio de la translación (Balbin y Abrahamson 1991). Este polimorfismo resulto en dos haplotipos humanos: CST3 A tiene secuencias GAG y CST3 B tiene secuencia CCA en estas posiciones (Finckh et al 2000). El polimorfismo en la región codificada está localizada en la penúltima posición del péptido señal y resulta en una substitución de treonina por alanina (Balbin et al 1993). Este polimosfismo esta asociado con la enfermedad de Alzheimer (AD) así como con degeneración macular dependiente de la edad (Crawford et al 2000; Finckh et al 2000; Zurdel et al 2001). Una sola substitución en el exón 2 (CAG en lugar de CTG) es la causa primaria de la angiopatía amiloide de Cistatina C hereditaria (HCAA) (Jensson et al 1987).

II.18 Proteína Cistatina C

La proteína Cistatina C es trasladada del gen de la Cistatina C como una proproteína conteniendo una secuencia señal hidrofóbica, de 26 aminoácidos, el cual es removido durante su maduración (Grubb et al 1982) La proteína Cistatina C esta compuesta por 120 aminoácidos en una cadena simple polipeptídica con dos uniones disulfuro en la región C-Terminal. La unión de dos puentes disulfuro es característico de la familia de la Cistatina 2 (Barret et al 1990). El peso molecular de la proteína Cistatina C es aproximadamente de 13 kDa. La proteína tiene una secuencia altamente conservada para los humanos, los monos, ratón y rata. Hay un 71 % de homología en la secuencia de la proteína Cistatina C entre humanos y ratones, y un 73% entre humano y rata. La secuencia de la proteína en el ratón y rata son 88% idénticos (Hakansson et al 1996). La Cistatina C humana es una proteína no glicosilada, pero en el ratón y en la rata el 20 % de la Cistatina c puede ser glicosilada, (Esnard et al 1990). Hay un sitio N-glicosilación en la posición 79 en la secuencia de la Cistatina C de la rata (Esnard et al. 1990), pero otras formas glicosiladas han también sido demostrada (Dhal et al 2004).

La estructura secundaria de la Cistatina C es similar a la de la Cistatina C de huevo blanco de pollo y esta compuesta de una hoja envuelta-beta de cinco cadenas antiparalelas rodeando una alfa-helice. (Abrahamson 1996). La primera y la segunda cadena están separadas por la alfa-helice y las otras por dos vueltas de horquilla. Hay tres regiones en la proteína Cistatina C que están conservadas dentro de la superfamilia de las Cistatinas y este forma el sitio de inhibición de las cisteín proteasas. (Mason et al 1998). Este incluye de 9 a 11 aminoácidos en la región N-Terminal, la secuencia Q I-V-A-G. en la primera vuelta de horquilla y el dipéptido C-Terminal P W en la segunda vuelta de horquilla (Mason et al 1998). En la estructura tridimensional estas tres regiones están cerca entre ellas y forman una estructura en forma de cuña filosa que se adapta dentro del sitio activo de la proteasa. El segmento N-Terminal es requerido para la unión y la inhibición de las cisteín proteasas (Abrahamson et al 1991). La Cistatina C existe como un monómero pero puede formar estructuras diméricas envolviendo un dominio de via tridimensional (Ekiel y Abrahamson

1996). Este es un fenómeno donde una parte de la proteína es reemplazada con un elemento idéntico de otra proteína (Bennett et al 1994). En la Cistatina C el intercambio del dominio incluye la alfa-helice y dos cadenas Beta-adjuntas. (Nilsson et al 2004) La dimerización lleva a la completa pérdida de la función inhibitoria de las catepsinas. (Ehkiel y abrahamson 1996). E condiciones fisiológicas la dimerización es rara, pero ocurre en condiciones patológicas tales como la HCAA. Una variante de la Cistatina C con un punto único de mutación dimeriza más fácilmente que la Cistatina C normal. (Sanders et al 2004).

La Cistatina C es una proteína extracelular principalmente pero esta también es encontrada intracelularmente, localizada en el compartimento endosomal/lisosomal o retículo endoplásmico (RE) (Merz et al. 1997). Estos dímeros disociados dentro de la Cistatina C antes o bajo la secreción y la Cistatina C monomérica es secretada fuera de la célula (Merz et al. 1997). La pérdida de la secuencia líder o substitución de aminoácidos que cambia las propiedades de la secuencia señal puede por lo tanto llevar a la secuencia dañada de la Cistatina C y su acumulación dentro de la célula. La Cistatina C sin la secuencia líder no es procesada a través de la secuencia secretoria (Paraoan et al 2003). Además la variante de la Cistatina C dañado apunta a una mutación del exón 2 y faltando la mayoría de los aminoácidos en sitio N-Terminal acumulados en el RE (Bjarnadottir et al 1998). También la substitución polimórfica de un aminoácido que está localizado cerca del sitio de enclave del péptido señal lleva al daño en la secreción de la Cistatina C (Paraoan et al 2004). La Cistatina C secretada es capturada por las células vecinas y degradada en los lisosomas. La Cistatina C que está presente en los fluidos corporales y eventualmente en el plasma sanguíneo es reabsorbido por las células tubulares en el riñón, transportado a los lisosomas y degradado. (Jacobsson et al 1995). En condiciones fisiológicas normales la orina contiene difícilmente Cistatina C, pero con un daño tubular, la concentración de la Cistatina C en el plasma aumenta lo cual lo hace un marcador confiable para promedio de filtración renal (Mussapi and Plenabi 2004).

Una serin proteasas, elastasa de leucocitos, se pegan a la Cistatina C *in vitro*, entre los aminoácidos 10 y 11 llevando a la truncación de la proteína y disminuido el potencial

inhibitorio para la cathepsina B y L. (Abrahamson et al., 1991a) el pegado es específico para la elastasa de los leucitos y no se observa en otras seirn proteasas, (Abrahamson et al., 1991a) La elastasa de los leucocitos podría funcionar por lo tanto como regulador de la actividad de la Cistatina C extracelular en sitios de inflamación. El factor de crecimiento transformante Beta, (TGF- β) regula la expresión de la Cistatina C (Solem et al 1990, Sokol y Shiemann 2004)

La Cistatina C es el miembro más abundante de los miembros de la supefamilia de las Cistatinas y esta presente en niveles moderados en todos los tejidos y fluidos humanos (Abrahamson et al., 1987). Es expresada en tejidos tales como el riñón, páncreas, hígado, intestino, estómago, placenta, cerebro, vesículas seminales y ojo.

Los niveles más altos están en CSF y en semen, el nivel en el CSF inició 5.5 veces más alto que en el plasma (Tavera et al., 1990). El cerebro tiene particularmente niveles altos de Cistatina C, 15 veces más que el hígado.

La Cistatina C fue primero aislada del CSF durante 1960, pero la expresión de la Cistatina C en el cerebro no fue reconocida hasta tiempo después. Uno de los primeros reportes sobre la Cistatina C se hicieron en el cerebro y fue con un estudio de inmunohistoquímica demostrada mediante el hipotálamo post-morten de humano, particularmente en el núcleo supraventricular, paraventricular y arcuato. sugiriendo que la Cistatina C en el CSF viene de las neuronas del hipotálamo que se proyectan directamente al tercer ventrículo (Bernstein et al., 1988). Más tarde en una mayor y conservada expresión de la Cistatina C fue demostrada en las células epiteliales de los plexos coroideos (Tu et al., 1992)

II.19 Funciones Fisiológicas de la Cistatina C

II.19.1 Inhibidor de Catepsinas

La Cistatina C es un inhibidor de unión firme y reversible de la catepsinas B, H, L y S (Abrahamson et al 1994), Las catepsinas son cisteine proteinasas lisosomales, son parte de la familia de la papaína y consiste de 11 miembros de los cuales las catepsinas B y L son las más abundantes en los humanos. Están involucradas en la degradación normal de las proteínas celulares, el procesamiento de prohormonas, presentación de antígenos, ruptura de colágeno y reabsorción de hueso (Turk et al., 2000). Cuando las catepsinas son secretadas fuera de las células se vuelven extremadamente dañinas y rodean un ambiente que conduce a condiciones patológicas. Por ejemplo, artritis reumatoide, cáncer apoptosis, desórdenes neurales, osteoporosis y enfermedades de almacenaje lisosomal. (Chapman et al., 1997)

La principal función de la Cistatina C es regular la actividad de las catepsinas y por lo tanto modular y controlar la actividad extracelular. El balance entre Cistatina C y Cisteine peptidasas es importante para el mantenimiento de condiciones fisiológicas normales, y si este falla, proceden síntomas patológicos, por ejemplo, paredes de vasos arteroescleróticos, la estimulación de la catepsina K y S en la pared vascular de las células de músculo liso, y que es coincidente con una baja expresión de Cistatina C. También niveles bajos de Cistatina C se correlaciona con la progresión del aneurisma aórtico abdominal (Lindholt et al., 2001). Además, un incremento en la actividad de la catepsina K es responsable por la reabsorción de hueso que conduce a la osteoporosis (Yasuda et al., 2005). La actividad excesiva de las catepsinas puede llevar puede también conducir a la degradación de la matriz extracelular por lo tanto habilitar al crecimiento e invasión del cáncer (Buck et al., 1992). La expresión concomitante reducida de la Cistatina C con un incremento de la expresión de la catepsina B ha sido descrita en el cáncer de seno humano y en líneas celulares de glioma (Yano et al., 2001). La reducción corresponde con un incremento de la malignidad y la sobre expresión de la Cistatina C inhine la movilidad y la invasión de las

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

células B16 de melanoma, de glioma celular y células de cáncer de ovario (Sexton y Cox 1997; Konduri et al 2002). La sobre expresión de la Cistatina C es también reportado que inhibe la metástasis en la células B16 de melanoma (Cox et al., 1999). Estos datos aparte de las discrepancias, muestran la importancia de la propia expresión la Cistatina C en el control de la integridad fisiológica de los tejidos.

II.20 Modulador de inflamación y acción antiviral

La Cistatina C es sintetizada y secretada por las células del sistema inmune tales como los monocitos y los macrófagos y su liberación es disminuida cuando los macrófagos son estimulados por lipopolisacáridos o interferón- γ (IFN- γ). Hay varias líneas de evidencia que indican que la Cistatina C también regula la actividad y motilidad de neutrófilos. La incubación de neutrófilos con Cistatina C lleva a la disminución con la liberación de superóxido y fagocitosis, los cuales son característicos de la activación de los neutrófilos. La Cistatina C también modula la quimiotaxis de los neutrófilos (Leung-Tack 1990) El rol de la Cistatina C es controlar la presentación de antígenos en las células dendríticas periféricas, esta a través de un control de la actividad de la catepsina S el cual se pega a la cadena invariante del complejo II mayor de moléculas de histocompatibilidad incapaz de ser transportada a la membrana plasmática y presentar el antígeno a las células del sistema inmune. (Pierre y Mellman, 1998) Sin embargo, recientes estudios han demostrado que contradicción en esta idea demostrando que aun en presencia de Cistatina C es abundante en ciertas células dendríticas no es necesaria para el control del complejo II mayor de histocompatibilidad a la presentación de antígenos y la Cistatina C es diferencialmente expresada durante la maduración de las células dendríticas.

También se sugiere que la Cistatina C regula la producción de Citoquinas. E induce la síntesis del factor de necrosis tumoral α y las interleucinas – 10 y IFN- γ activando a los macrófagos y además estimulando la liberación de óxido nítrico por parte de los macrófagos (Verdot et al., 1996). También la Cistatina C participa en la estimulación de la producción de IL-6, IL-8 en esplenocitos murinos y en fibroblastos gingivales humanos.

(Kato et al., 2000). Además la Cistatina C tiene propiedades antivirales contra ciertos virus e inhibe la replicación del virus del herpes simple y del coronavirus. La actividad regulatoria y la modulación del sistema inmune son relacionadas a sus funciones como inhibidor de cisteine proteasas.

11.21 Funciones como promotor de Crecimiento

Se sugiere que la Cistatina C tiene un rol en la proliferación y en la diferenciación celular, primero demostrando que la Cistatina C induce proliferación de fibroblastos 3T3 de ratón en cultivo, después fue confirmado por Tavera y Colegas quienes demostraron que la Cistatina C incrementa la proliferación de las células mesangiales en el glomérulo de la rata. Ellos también sugirieron que su función de la promoción del crecimiento está relacionado al tetrapéptido N-Terminal, (Tavera et al., 1992). Uno de los más reciente reportes sobre la función de la Cistatina C en el cerebro fue provisto por Taupín y colegas quienes que demostraron que la forma N-glicosilada de la Cistatina C es un co-factor para FGF-2 y es requerida para neurogénesis in vitro e in vivo. La Cistatina C fue purificada de cultivo celulares como factor que fue secretado por las células progenitoras hipocampales de adulto.

Dado entonces que el pterigión es una patología cuyas características desde su origen no son aun comprendidas este trabajo tiene como finalidad ofrecer información relevante y original sobre el pterigión y la proteína Cistatina C Humana (CCH).

III. METODOLOGÍA

III.1 Diseño del estudio

Se realizará un estudio piloto, prospectivo, transversal en el Departamento de Optometría del Centro de Ciencias De la Salud, el Departamento de Química del Centro de Ciencias Básicas, Departamento de Morfología de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

III.2 Universo

El universo de sujetos seleccionados para su participación en este estudio consiste en aquellos pacientes que reúnan los criterios de inclusión y exclusión establecidos en este protocolo.

Es un estudio prospectivo no aleatorizado donde 101 muestras de pterigión fueron incluidas obtenidas del hospital de zona número 2, en Aguascalientes, Ags. México, hospital general de zona No. 1, hospital centenario Miguel Hidalgo. Fueron analizados 73 pterigiones primarios contra 28 pterigiones recurrentes, 52 de los pterigiones primarios fueron clínicamente activos y el resto de estos inactivos, respecto a lo pterigiones recurrentes 16 fueron activos y el resto inactivos. Aproximadamente la mitad de las muestras fueron usadas para RT-PCR y el resto fue usado para inmunohistoquímica. 44 conjuntivas normales fueron usadas como tejido control para ambas técnicas.

III.3 Justificación

El pterigión es una patología benigna compleja en la que diversos eventos celulares como la proliferación, evasión de apoptosis, inflamación, angiogénesis y recambio de matriz extracelular son necesarios para su desarrollo. Dado que el comportamiento clínico, las opciones terapéuticas y el pronóstico visual de los pterigiones es variable, es importante analizar los eventos celulares y moleculares que intervienen en el desarrollo de esta

patología. Hasta este momento no existen reportes en la literatura mundial que valoren los patrones de expresión en las diferentes formas clínicas del pterigión primario (activo vs inactivo). Asimismo se desconoce si las mismas vías activadas en el pterigión primario u otras son reactivadas una vez que el pterigión se ha removido para dar origen al pterigión recurrente en la población mexicana. Por último no existen reportes en el pterigión donde se evalúen los patrones de expresión de esta patología utilizando a la Cistatina C, mientras que a la Cistatina C se le ha encontrado en el síndrome cerebral hemorrágico hereditario, insuficiencia renal por daño, así como en pacientes con asma, participa en los mecanismos primarios de defensa contra la destrucción proteolítica tisular mediante la formación de complejos inhibitorios de cisteín proteasas. Por lo tanto en este trabajo exploramos la posibilidad de la participación de la Cistatina C como un factor genético y su producto proteico en la inducción de eventos fibróticos, angiogéncios o inflamatorios

III.4 Hipótesis

El patrón de expresión del pterigión primario varía dependiendo del grado de su actividad (activo-inactivo). Además, el patrón de expresión del pterigión primario es diferente al patrón de expresión del pterigión recurrente. En la expresión de la Cistatina C Humana, así mismo la lágrima en los casos mencionados es diferente al patrón de expresión en las conjuntivas sanas.

III.4 Objetivos

III.4.1 Objetivo general

Determinar la presencia y expresión de la proteína Cistatina C Humana en los diferentes tipos de pterigión y sus manifestaciones clínicas que se caracterizan como parte de su fisiopatogenia.

III.5 Objetivos específicos

- Identificar la expresión celular y molecular de la Cistatina C Humana en la conjuntiva normal
- Identificar la expresión celular y molecular de la Cistatina C Humana como parte de la fisiopatogenia del pterigión primario inactivo
- Identificar la expresión celular y molecular de la Cistatina C Humana como parte de la fisiopatogenia del pterigión primario activo
- Identificar la expresión celular y molecular de la Cistatina C Humana fisiopatogenia del pterigión recurrente.

III.6 Tamaño de la muestra

Debido a que este es un estudio piloto, que servirá para establecer un concepto inicial en la fisiopatogenia del pterigión, no se requiere un estimado del tamaño de muestra formal. Se ha propuesto la inclusión inicialmente de 3 grupos de pacientes con pterigión y 1 grupo control sano, que se presentan a continuación:

Grupo 1: Pacientes con pterigión primario inactivo

Grupo 2: Pacientes con pterigión primario activo

Grupo 3: Pacientes con pterigión recurrente

Grupo 4: Conjuntivas normales (grupo control)

En todos ellos se les realizará una sola valoración clínica preoperatoria tomando en cuenta las variables del estudio, incluyendo un examen oftalmológico completo, una topografía corneal. Los pterigiones serán removidos por un solo cirujano con la técnica de resección simple con autoinjerto conjuntival. Las piezas obtenidas serán divididas en dos partes, una de ellas será almacenada en formol y procesada para la evaluación histopatológica mediante la revisión de su laminilla con método de hematoxilina/eosina y la otra parte será congelada en nitrógeno líquido en quirófano y almacenada a -80 C para posteriormente obtener su patrón de expresión usando la técnica de biología molecular denominada PCR

III.7 Descripción de sujetos de estudio

III.7.1 Criterios de inclusión

Para ser elegible y participar en este estudio, los pacientes deben reunir los siguientes criterios:

- Los pacientes deberán entender y firmar el consentimiento informado.
- Los pacientes deberán tener un pterigión primario o recurrente mayor a los 2 mm.
- Los pacientes deberán tener entre 18 y 60 años de edad.
- Los pacientes deberán tener medios intraoculares claros.
- Los pacientes deberán tener criterios quirúrgicos estéticos, sintomáticos o visuales que justifiquen el procedimiento quirúrgico.

III.7.2 Criterios de exclusión

- Los pacientes que reúnan los siguientes criterios no podrán incluirse en el estudio:
- Pacientes con tratamiento médico tópico de cualquier tipo (con excepción de lubricantes) en las últimas dos semanas.
- Pacientes menores de 18 años
- Pacientes que no otorguen o entiendan el consentimiento informado
- Pacientes con alguna patología ocular asociada
- Pacientes que no reúnan los criterios quirúrgicos
- Pacientes que no deseen operarse
- Pacientes con tratamiento sistémico que incremente la sensibilidad a la luz UV (isotretinoína, vitamina A, etc).
- Pacientes con cirugías oculares previas (con excepción de cirugía de pterigión).
- Pacientes con historia de trauma ocular.

III.7.3 Criterios de eliminación

Los pacientes serán eliminados si las muestras de tejido obtenidas son insuficientes para la realización del estudio.

Los pacientes serán eliminados si el RNA obtenido de sus muestras de tejido se encuentra degradado o de mala calidad para la realización del estudio.

1) VARIABLES A MEDIR

A. Valoración clínica.

Las variables a evaluar serán:

1. Edad del paciente
 2. Género del paciente
 3. Tamaño del pterigión
 4. Localización:
 - Nasal
 - Temporal
 - Unilateral
 - Bilateral
 5. Grado de actividad del pterigión
 - Activo:
 - Inactivo:
 6. Tipo clínico del pterigión
 - Primario:
 - Recurrente:
 7. Biomicroscopía con lámpara de hendidura
 8. Foto clínica del pterigión
 9. Topografía corneal del ojo a operar
 10. Patrón de expresión del pterigión
- B. Valoración histopatológica.

III.8 Procedimiento para obtención de muestras

III.8.1 Método quirúrgico

Los pacientes fueron operados bajo anestesia local y usando la técnica de autoinjerto conjuntival con completa resección de la lesión. Seguida por una incisión de la marca en el límite del borde limbal de la cabeza del pterigión. (es la porción del pterigión que cubre la córnea), el cual fue removido de la superficie corneal anterior y el tejido del pterigión fue disecado en un plano subconjuntival. (Adamis AP, Starck T, Kenyon KR. The management of pterygium. *Ophthalmol Clin North Am.* 1990;3:611–23.) Por lo tanto el cuerpo completo y la cabeza fueron tomados para este estudio. Todos los pterigiones fueron tomados de la región nasal con excepción de un pterigión primario de origen temporal. Las muestras de conjuntiva normal fueron tomadas de la región bulbar a menos de 4 mm del limbo al hacer la disección conjuntival del autoinjerto quedaron fuera del estudio aquellos pacientes que estuvieran bajo algún tratamiento farmacológico que alterara la respuesta inflamatoria. La información recolectada de cada paciente incluyó, edad, genero, síntomas, tiempo de duración del pterigión, historia familiar del pterigión, número de intervenciones previas.

Tabla 1. Referencia de los datos clínicos de los pacientes que se obtuvieron las muestras quirúrgicas

Muestras	Edad		Masculino		Femenino		IH	RT-PCR	ELISA
Pterigión Primario	55.21	±10	43	42.57%	30	29.70%	13	19	40
Pterigión Recurrente	65.12	±14	18	17.82%	10	9.90%	2	4	22
Conjuntiva sana	68.71	±13	34	33.66%	10	9.90%	15	14	25

Una mitad del pterigión se fijó en paraformaldehído al 4% mientras que la otra mitad se congelo a -80° para su estudio molecular.

El protocolo de estudio fue aprobado por el comité de ética del Hospital del Instituto Mexicano del Seguro Social y por lo tanto a todos los individuos de estudio se les otorgó y previa firma del consentimiento informado (anexo 1) se tomaron para el estudio. Las investigaciones fueron conducidas de acuerdo a los principios de la declaratoria de

Helsinki. (Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos. ISBN 92 9036 056 9. Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS), 1993, Ginebra, pp.53-56.)

El estudio anatómo-patológico tendrá como objetivos el documentar los cambios histopatológicos característicos de la enfermedad. Este se realizará por solo un investigador especialista, quien no tendrá ninguna información acerca de los resultados de las diversas valoraciones del paciente (clínica, molecular). Se utilizarán tinciones de hematoxilina-eosina para realizar el diagnóstico. Asimismo el bloque de parafina será guardado en el archivo patológico en caso de que se requieran estudios de inmunohistoquímica para corroborar los hallazgos del análisis de expresión diferencial.

Los pterigiones se clasificaron de acuerdo a Buratto, L, MD, 2000, basándose en los síntomas reportados y signos observados en la historia clínica y se determinó que el tratamiento que recibieran previo a la cirugía no fueran fármacos desinflamatorios esteroideos o AINES ni tampoco usaran vasoconstrictores, solo se aplicaron en 5 casos lubricante artificial basada en hidrometilcelulosa 0.1%, sin generar cambios en el efecto inflamatorio. Como control se utilizaron muestras de conjuntiva de procedimientos quirúrgicos diferentes al pterigión, incluyendo el autoinjerto y que no tuvieran algún proceso inflamatorio o infeccioso del segmento anterior. Para las muestras destinadas a IH se aplicó el procedimiento descrito por Ventura y cols., (2002), las piezas fueron colocadas en paraformaldehído al 4% y se hibridó con un anticuerpo anti-conejo contra CCH y revelada con diamino benzidina. Para las muestras obtenidas para biología molecular se realizó RT-PCR y separación de productos en agarosa al 2%.

III.9 Procesamiento de las pruebas

III.9.1 Valoración del patrón de expresión por biología molecular

Materiales:

Muestras biológicas de:

ojo: cápsula de cristalino, iris, conjuntiva y pterigiones primarios, recurrentes, activos e inactivo

Sanguíneo: Linfocitos extraídos por Ficoll

Métodos:

Construcción del plásmido pCAMBIA en el gen de CCH:

En el vector pUC18 previamente ya estaba clonado en el laboratorio previamente dado que se habían realizado experimentos previos, el gen de la CCH entre los sitios de restricción Eco RI, el gen de la CCH se liberó del vector pUC18 mediante las enzima Eco RI de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook en 1989, y posteriormente clonarlo en el vector pCAMBIA 2301, posteriormente se clono en el vector PKYLX80



Figura 4. Mapa del vector pKYLX80 y fragmento linealizado del promotor, sitio múltiple de clonación y el terminador. Organización del vector de expresión en plantas para la liberación del promotor potenciado del virus del mosaico de la coliflor (35S²) y el terminador de la ribosa bifosfato carboxilasa (rbcS3'). Y fragmento linealizado del vector pKYLX80 donde se muestra el sitio de restricción Eco RI del promotor, sitio múltiple de clonación, y el rbcS3'

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

y se transfirió a un tubo para microcentrífuga y se centrifugó a 12000g por 2 min. El sobrenadante se desechó y la pastilla se resuspendió en 100 μ L de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM) y se dejó a temperatura ambiente durante 5 min. Transcurrido este tiempo se agregaron 200 μ L de la solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%) y se mezcló por inversión por 5 min. Enseguida, se adicionaron 150 μ L solución III (acetato de potasio 5M, ácido glacial acético 1N) y se dejó precipitar en hielo por 5 min. Las muestras se centrifugaron a 12000g a 4 °C durante 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le agregó 2 μ L de RNAasa y se dejó incubar a 37°C por 30 min. Pasado ese tiempo, se realizaron extracciones con fenol-cloroformo 1:1 (V:V), y cloroformo-alcoholisoamílico 24:1 (V:V). En ambos casos, se recuperó la fase acuosa y los ácidos nucleicos se precipitaron con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío, mezclando vigorosamente por inversión e incubando después a -70°C por 30 min. La pastilla con el DNA se recuperó centrifugando a 12000g a 4°C por 5 min. y se lavó con etanol frío al 70%, secando luego bajo vacío.

La integridad de la molécula de DNA plasmídico, se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en buffer de corrida de TPE (Sambrook y Maniatis,1989) 1X, el gel fue teñido con bromuro de etidio y visualizado bajo luz ultravioleta.

III.11 Técnica de Ficoll/Hypaque (Boyum 1968) para la extracción de Linfocitos

Una vez reconocido la presencia del gen de la CCH en el plásmido donde se amplificó por PCR se procedió a reconocer capacidad de amplificación en células humanas para lo que se procedió a la extracción de linfocitos de la sangre por la técnica de Ficoll, de acuerdo al siguiente protocolo:

El aislamiento de linfocitos de sangre periférica se tomó de la vena braquial y se repartió en tres tubos con anticoagulante (EDTA disódico), diluida 1 en 3 de PBS, pH 7.2. A cada tubo de centrifuga de 15 ml se le añadió 4 ml de Ficoll-paque ($d = 1087$ g/ml) según el método de

Boyum (BOYUN, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 97: 77-89. 1968.) , sobre el cual se colocaron suavemente 8 ml de sangre diluida con PBS en una relación de 2 a 1 v/v. Los tubos se centrifugaron a 1800 rpm durante 30 minutos. Los linfocitos se obtuvieron, de la interfase Ficoll-paque-plasma con una pipeta Pasteur con sumo cuidado y se colocaron en tubos Fischer. Se añadió PBS y se centrifugó a 500 g por 5 minutos para eliminar el exceso de Ficoll-paque. Se lavaron 3 veces con PBS y de nuevo se centrifugaron a 500 g por 2 minutos. Una vez separadas las células, se procedió al conteo de los linfocitos aislados para determinar el rendimiento celular.

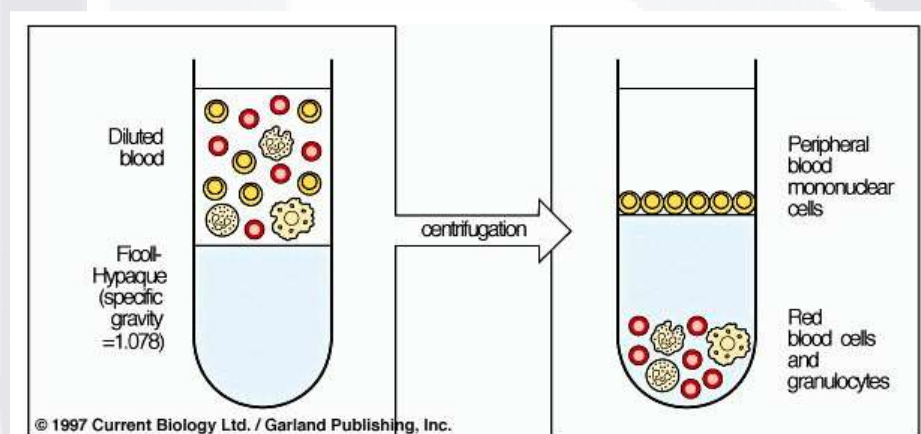


Figura 6. Técnica para la extracción de Linfocitos según Boyum 1968, de acuerdo a las condiciones de esterilidad puede ser de $1-2 \times 10^6$ cel/min.

III.12 Preparación y Calidad de control de RNA

III.12.1 Extracción de RNA total para linfocitos y tejidos

El RNA total fue aislado a partir de los linfocitos y de tejidos humanos resecados quirúrgicamente, por medio del método de extracción fenólica con TRIzol® (Reagent Invitrogen™ Life Technologies) de Chomczynsky (Chomczynsky y Sacchi, 1987). Este método se basa en el uso de monofásica de fenol e isotiocionato de guanidina para la lisis de las células y la separación de la muestra en dos fases (acuosa y orgánica). Seguida de la extracción y precipitación del RNA total con cloroformo e isopropanol respectivamente a

partir de la fase acuosa. Las pastillas de linfocitos pasaron por nitrógeno hasta alcanzar su congelación y se molieron en un mortero hasta obtener un polvo fino. La muestra se pesó y se agregó en un tubo de 1.5 ml y se adicionó 750 μ l de TRIzol®. El tejido se homogeneizó con el homogeneizador (Polytron PT 1200, kinematic AG). con una punta de cristal previamente lavada con agua DEPC (Dietilpirocarbonato) al 1.0%, y entre cada homogeneización con alcohol y secada antes de poner cada muestra. El tejido homogeneizado se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C (en este paso se eliminan los restos celulares). El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf y se adicionaron 150 μ l de cloroformo frío y se agitó vigorosamente durante 15 segundos y se incubó en hielo por 5 minutos. Posteriormente la muestra se centrifugó a 13,000 rpm por 10 minutos a 4°C. en este paso se forman dos fases por diferencias de densidad; la fase fenólica orgánica, contienen el ADN y restos de proteínas desnaturalizadas y la fase superior acuosa contiene el ARN en cloroformo. Esta fase se transfirió a un tubo de 1.5 ml y se adicionaron 500 μ l de isopropanol el cual precipita al ARN. La pastilla se lavó con etanol al 100% y se centrifugó por 5 minutos a 7,500 rpm a 4°C (2 veces). En el último lavado, el etanol se eliminó y la pastilla se secó por un lapso de 5 minutos. Al final la pastilla de ARN se disolvió en 50 μ l de agua DEPC estéril. Se agitó en un vortex y se tomó una alícuota para cuantificar y determinar la integridad del RNA total, el resto se almacenó a -70°C.

III.13 Determinación de la concentración, pureza e integridad del ARN total

Para conocer la concentración del ARN total se preparó una dilución 1:50 por duplicado con agua DEPC y se midió la absorbancia a 260 nm y a 280 nm en un espectrofotómetro (Ultrospec 2000® Pharmacia Biotech™) con lámpara UV. Una vez que se obtuvieron los valores de absorbancia de los ARN's a partir de la siguiente ecuación se puede conocer su concentración:

$$\text{Concentración de ARN } (\mu\text{g} / \mu\text{l}) = (\text{Absorbancia a 260 nm}) (\text{Dilución}) (40) / 1000$$

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sabiendo que 1 densidad óptica a 260 nm (1 OD_{260}) = 40 μg de ARN. La relación de absorbancia a 260/280 indican pureza del ARN, se considera que las relaciones cercanas a 2.0 unidades de OD_{260} son las óptimas.

Para determinar la integridad del ARN total extraído, se sometió una parte de la muestra a electroforesis horizontal en el gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). La técnica de electroforesis se basa en el desplazamiento de ARN a través de una matriz porosa formada por la agarosa polimerizada, siendo el tamaño del poro determinado por la concentración de esta en una solución de sales. Al aplicarse una corriente eléctrica a través del gel, los ácidos nucleídos que poseen una carga negativa conferida por los grupos fosfato, migran hacia el ánodo en condiciones de pH neutro (Maniatis et al. 1989). Se mezclaron 5.0 μl de la muestra de ARN con 2.0 μl de buffer TAE 1X y 2.0 μl de colorante de azul de bromofenol (0.25%) el cual contiene glicerol al 30%. La electroforesis se llevó a cabo por 90 voltios durante 50 minutos. El ARN se vio en un transiluminador con luz UV a 260 nm. La radiación UV es absorbida por el ARN y emitida al Bromuro de Etidio que a su vez reemite la radiación a 590 nm en la región rojo naranja del espectro visible.

III.14 Síntesis de ADNc Retro-transcriptasa-reversa (RT)

El ADNc se sintetizó a partir del ARN total obtenido de las muestras quirúrgicas de ojo obtenidas del ojo, por medio de la transcriptasa reversa utilizando hexámeros. Las moléculas de ARNm como molde y los hexámeros al azar actúan como primers. Además, se requiere la presencia de dNTP's que funcionan como sustrato para la transcriptasa reversa, de lo que resulta una hebra de ADN complementario. Las condiciones de ciclado para cada uno de los pares de oligos empleados se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2. Relación de oligos con tiempos y temperaturas de ciclado

β -Actina		Condiciones de Ciclado					
Forward	AGT GTG ACA TGG TGC ATC TC	Temperatura	96°C	96°C	58°C	72°C	40X
Reverse	TGC CCT GAG GCA CTC TTC CAG	Tiempo	5'(1X)	10"	30"	30"	Ciclos
β -Globina		Condiciones de Ciclado					
Forward	CAA CTT CAT CCA CGT TCA ACC	Temperatura	95°C	95°C	55°C	72°C	40X
Reverse	GAA GAC CCA AGG ACA GGT AC	Tiempo	4'(1X)	1'	30"	30"	Ciclos
Cistatina C Humana		Condiciones de Ciclado					
Forward	GCGGCGTGCCTGGACTTTG	Temperatura	95°C	95°C	55°C	72°C	40X
Reverse	GCCGCCTGCTGCCTTCTCTG	Tiempo	4'(1X)	1'	30"	30"	Ciclos

III 15 Procedimiento de elaboración de Electroforesis

Preparar 100 mL de la solución de agarosa 0,8% en tampón TAE 1X. Para ello, pesar 0,8 g de agarosa requeridos en una fiola de 250 mL y agregar 100 mL del tampón TAE 1X. Posteriormente se disuelve la agarosa calentando hasta hervir en el microondas por 2-5 minutos evitando la evaporación. Cuando la temperatura se acercó a los 50 °C (temperatura tal que se pudo visualizar a la solución aún como líquido), verter la agarosa en el molde con los peines. Se deben evitar la formación de burbujas, en caso de que se formen, removerlas con una aguja. Dejar solidificar el gel a temperatura ambiente. Una vez solidificada la agarosa, remover los peines y colocar el gel en la cámara de corrida con tampón TAE 1X, en un trozo de papel Parafilm fijado al mesón, mezclar 5 μ L de la solución de ADN con 2 μ L del tampón de carga 6X y colocar cada muestra correspondiente. Se colocó un marcador de peso molecular mezclado con tampón de carga y tomar nota de la ubicación de sus muestras. Posteriormente se aplica un voltaje no superior a 5 V/cm y se deja correr hasta que el primer colorante alcanzó $\frac{3}{4}$ partes del gel. Al finalizar la corrida, y utilizando guantes, se tiñó el gel en una solución de Bromuro de etidio a 0,5 μ g/mL⁻¹ durante 1 minutos. Se transferió el gel a una bandeja con agua destilada. Se registró la imagen mediante la exposición sobre un transiluminador de luz UV (312 nm) y utilizando el aparato de fotodocumentación.

III.16 Procedimiento para realizar Inmunohistoquímica

Las muestras obtenidas directamente del quirófano son fijadas en paraformaldehído al 4% en PBS, para ser transportadas hasta el laboratorio. Se procedió a incluir las muestras en parafina, para obtener cortes de 4µm en un micrótopo. Se realizó la recuperación antigénica (desenmascaramiento de epítopes) con ácido cítrico monohidrato 0.1M y citrato de sodio tribásico dihidratado 0.1M a pH 6.0. El bloqueo de la actividad endógena de peroxidasa se realizó con H₂O₂ 10% en metanol 100% por 40 minutos. La permeabilización de las membranas se realizó con Tritón X-100 al 0.2% en PBS durante 30 min. El bloqueo de uniones inespecíficas se realizó con suero fetal bovino al 20% en Triton X-100 0.2% en PBS durante 30 min. Se incubó el primer anticuerpo de conejo policlonal contra Cistatina C (Abcam Ab 7653), a una concentración de 1:100 en cámara húmeda toda la noche, la dilución fue hecha en Tritón X-100 0.2% en PBS - Albúmina-Sérica-Bovina (BSA) 3%. Se usó un segundo anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa (HRP) de la casa Santracruz en cámara húmeda por dos horas. Se incubó con diaminobencidina (1:10) en buffer de fosfatos hasta desarrollar color. Se contrastó con hematoxilina de Harris.

III.17 Procedimiento Microscopia Electrónica de Transmisión

El procedimiento fue basado en el método descrito por Merighi y polak (1993) y Goping et al (1996). Brevemente. Las muestras obtenidas del quirófano de forma inmediata se fijaron en glutaraldehído al 2.5% en buffer de fosfato previamente por 1 hora y colocadas a una temperatura de 4°C. A fin de ser transportadas hasta el laboratorio para su procesamiento, se siguió el procedimiento establecido por Ventura et al., (2002). Se deshidrataron en alcoholes de varias graduaciones por 15 minutos cada uno. El proceso de infiltración se hizo en resino LR-White, en concentraciones de alcohol a 1:1, 2:1, 3:1. Se realizaron cortes de 80 nm y se colocaron en rejillas de níquel. Se incubó con el primer anticuerpo en 1:100 diluido en PBS-ASB 1% 2 hrs a 37°C, después de 10 lavados se incubó con el segundo anticuerpo de la marca (Ted Pella EMGMH), marcado con oro coloidal 20 nm, diluido

1:50 en PBS 1 hr a 37°C más 30 minutos a temperatura ambiente. Después de los lavados se procedió a la fijación con glutaraldehído al 1% en PBS por 15 min. Posteriormente se lavó con agua bidestilada y filtrada. Como paso final se hizo la contrastación con plomo y uranilo.

III.18 Procedimiento de ELISA

A fin de establecer los estándares en la lectura de las proteínas mediante el ELISA, previamente se realizó una curva Bradford (Ver anexo). Como testigos positivos se forraron los pozos de 3 columnas con suero de pacientes con insuficiencia renal a una dilución 1:5000, en la columna 4 la dilución fue de 1:10000, las columnas 5 a 8 se forraron con lágrima de personas con pterigión y las columnas 9 y 12 con lágrima de personas sanas, finalmente las últimas se usaron como testigos negativos con solo agua destilada. En cada pozo se colocaron 50 μ l de muestra y 50 μ l de solución carbonatos/ bicarbonatos (ver en anexo A fórmula), se procedió a 3 lavados de PBS-Tween, se incubó con ASB al 1%, posteriormente se lavó con PBS-Tween 3 veces, se procedió a colocar el AB Cistatina C en una dilución de 1:1000, a 37°C por 1.5 hrs. Y 15 minutos a T°C ambiente, se procedió a lavar 3 veces con PBS-Tween. Posteriormente se procedió a incubar con el AB α IgG de conejo-PO en dilución 1:2000 (5 μ l. de Ab +10 ml de PBS) durante 1 hr. a 37°C y 15 min. a Temperatura Ambiente, se lavó con PBS-Tween. Para culminar el procedimiento con el revelado con Ortofenildiamina, previa preparación (ver fórmula en anexo A) Y se detuvo el revelado con 20 μ l. de H₂SO₄ en cada pozo, la lectura se hizo mediante el espectrofotómetro Lambda Bio Application 23.

III.19 Procedimiento de Western Blot (SDS-PAGE)

De acuerdo al procedimiento de ensable establecido (ver anexo Electroforesis Western Blot) se elaboro un gel a 13.5% dado el PM de la proteína CCH y se cargaron de 50 a 200 μ g de proteína de muestra y se completó con 30 μ l con simple buffer. Las muestras corrieron a 80 V por 1.5 hrs. Para hacer la tranferencia a través de buffer se realizó a

12mAmp durante toda la noche. Se procedió a revelar a la inmuotinción del blot en leche en polvo al 5% en TBS por una hora de agitación, para transferir la hoja con el primer anticuerpo en una dilución de 1:200 y una incubación de 24 hrs a 4 °C. en agitación, después de los lavados en TTBS por 10 minutos y con TBS por 15 minutos. Se procedió a revelar con fosfatasa alcalina a temperatura ambiente por 15 minutos disuelta en 10 ml. Se procedió al secado y observación.



IV. RESULTADOS

De acuerdo a los resultados obtenidos a través de los diferentes tipos de experimentos desde una valoración molecular, morfológica y bioquímica, se determinó la presencia de la CCH.

Para determinar la eficacia de los oligos empleados, se uso un plásmido en el cual previamente ya se tenía la secuencia completa correspondiente al gen de la CCH, el cual requería ser evaluado para determinar la precisión de la secuencia respecto a nuestro gen de interés. Posteriormente se demostró en el uso de dos genes constitutivos que funcionarían como controles internos de reacción para lo que se empleo al gen β -globina y β -actina correspondientes a funciones en todas las células, para los cuales se empleo pterigiones y conjuntivas y donde se demostró en experimentos aislados el rendimiento y posibilidad de extracción de ARN y se estandarizaron las condiciones apropiadas de ciclado para el mayor rendimiento de ambos genes controles. De la misma forma se llevo a cabo corridas en linfocitos de ambos genes constitutivos incluyendo a los de la CCH, para conocer las mejores condiciones en las que éramos capaces de obtener el mayor producto de amplificación de tal forma que nos fuera posible aprovechar bajo condiciones de poco tejido el mayor resultado durante la PCR.

La metodología empleada para las pruebas morfológicas fueron de igual forma se hizo el reconocimiento de áreas de corte histopatológicos correspondientes al pterigión en donde se reconoció la presencia de zonas inflamadas, en presencia de vasos, fibrosis y engrosamiento epitelial. Para lo que se emplearon diferentes anticuerpos tales como anti-CD68, anti-CD54, I-CAM, TNF- α , e IL-10. Además de una valoración por parte de un patólogo quien reconoció y describió las zonas de daño y cambio celular en el tejido epitelial y subepitelial. Una vez reconocidas la presencia positiva de estos anticuerpos en nuestras muestras problema procedimos a buscar la presencia de la CCH.

Otro experimento realizado fue microscopia electrónica de transmisión, este se realizó con la finalidad de demostrar por medio de una técnica más fina de mayor acercamiento a la presencia de la proteína CCH marcada con oro, nos fuera posible determinar su presencia en el pterigión.

Debido a que la CCH está presente en los fluidos procedimos a reconocer si había diferencias entre los grupos control y los diferentes tipos de manifestación clínica de los pterigiones así como de su presentación ya fuera primaria o recurrente. Para tal objetivo realizó en dos pasos, primero, se tomo lágrima de pacientes sanos y mediante la técnica de Western Blot, se reconoció la expresión de la proteína a través del mismo anticuerpo empleado en la inmunohistoquímica y ajustado a las condiciones de la prueba bioquímica y correspondiente a 13.5-14 kDa de peso molecular, resultando positivo en los tres casos tomados para este resultado. Posteriormente se tomaron lágrima de dos diferentes casos de pterigión, siendo primario activo y recurrente activo, y un sano además se tomó suero de un paciente con insuficiencia renal al cual ya se sabía que el nivel de presencia de la proteína Cistatina C estaba presente y que sirvió como control positivo. El resultado obtenido fue contundente por la presencia de la proteína en lágrima de pterigiones además de superior respecto a la lágrima de la persona sana, el control positivo resulto superior dada su cantidad en sangre respecto a la lágrima.

Una vez demostrada esta parte se procedió a realizar ELISA de los 4 casos estudiados respecto a lágrima sana, este experimento se llevó a cabo por triplicado de cada uno de los pterigiones primarios y recurrentes activos e inactivos y sano, además se conto con control positivo, y control negativo. Después de varias pruebas para estandarizar las concentraciones de lágrima y de suero que se iba a emplear se procedió a la realización de las ELISAS que nos daría como resultado en unidades de absorbancia las cocentraciones adecuadas para el experimento definitivo.

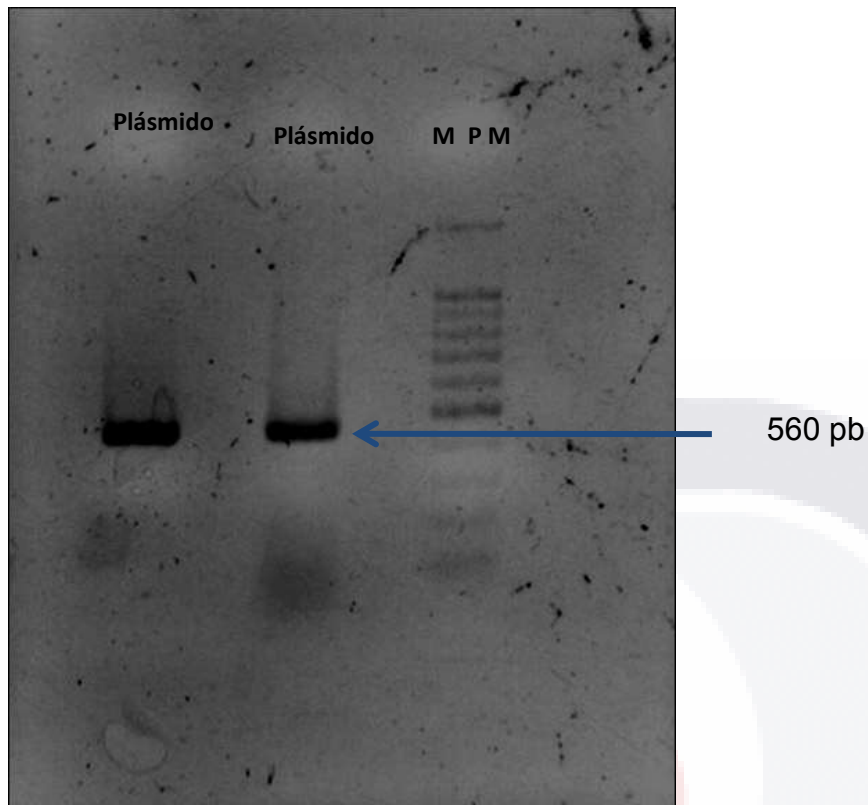


Figura 7. Gel de agarosa 1%: Fragmentos de amplificación mediante una PCR del gen de la CCH clonado en el plásmido pKYLX80 con peso molecular de 560 pares de bases

IV. 1 Pruebas para determinar factibilidad de oligos de CCH

El gen de la CCH, estaba inicialmente clonado en el vector pUC18. Este gen se liberó del vector con el uso de las enzimas de restricción, con las enzimas Eco RI. Con el fin de tener un sitio de restricción que permitiera la restricción que permitiera la inserción del gen de la CCH, en el vector de expresión en pCAMBIA se utilizó como generador de nuevos sitios de restricción el plásmido pBSK. Que fue digerido con la enzima Eco RI. Una vez hecha la construcción del fragmento se clono en el vector pKYLX80 y en el vector pCAMBIA, con la construcción pCAMBIA: cch (Figura 1)

IV.2 Análisis de RT-PCR.

De las muestras obtenidas en el quirófano las cuales fueron de pterigión así como de conjuntiva y se procesaron para la extracción de RNA por medio del uso de la técnica de TRIzol, se requirió conocer la pureza, integridad para lo que se cargaron 200 ngr de RNA en los pozos de un gel de agarosa concentrado al 2% en TAE. (Figura 8)

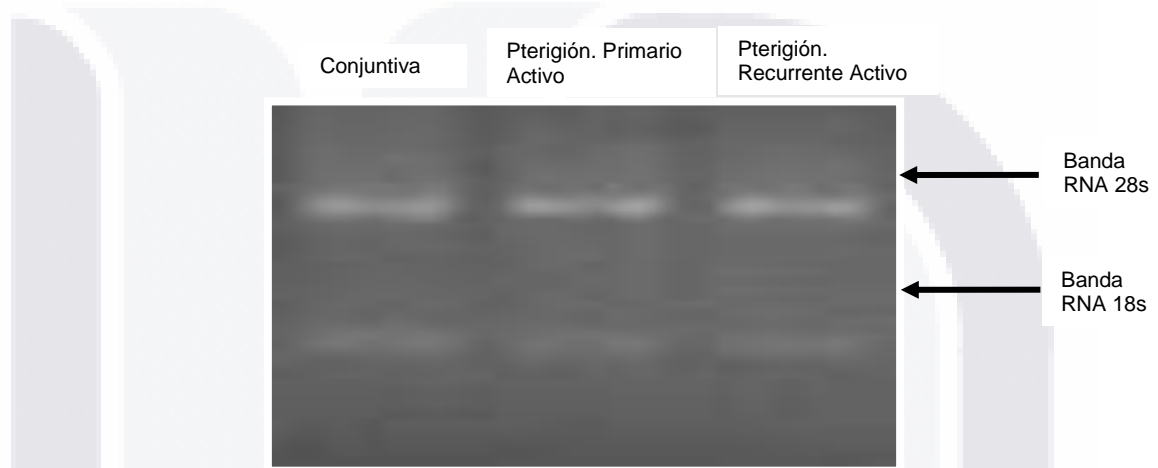


Figura 8. Gel de agarosa al 2% mostrando bandas de 28s y 18s de la integridad y pureza del RNA extraído de conjuntiva, pterigión primario activo y pterigión recurrente activo, por la técnica de TRIzol

Cuando se determino las condiciones óptimas para la extracción del RNA se procedió a probar las condiciones más idóneas de ciclado de las muestras con el gen constitutivo β -actina (Figura 9) así como de β -globina (Figura 10) cuyos oligos previamente se había probado en otras muestras y permitían un rendimiento de amplificación suficiente para determinar la calidad del cDNA extraído previamente por la técnica de retro-transcriptasa descrita previamente.

El producto obtenido de la amplificación de la β -actina, es el siguiente gel de agarosa:

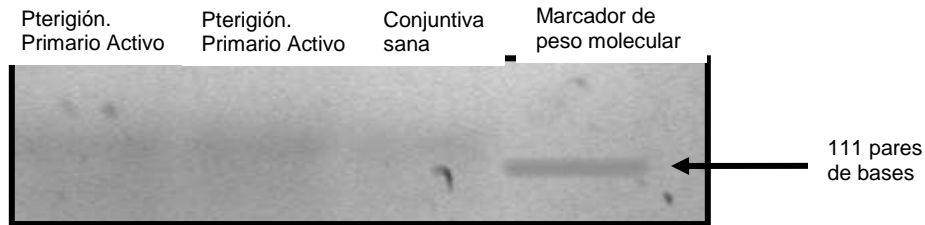


Figura 9. Gel de agarosa donde se amplificó el gen de la β -actina cuyos pares de bases es equivalente a 111pb de muestra de conjuntiva y pterigiones primarios activos.

Los productos obtenidos de la amplificación de la β -globina (gen control constitutivo) es el siguiente:

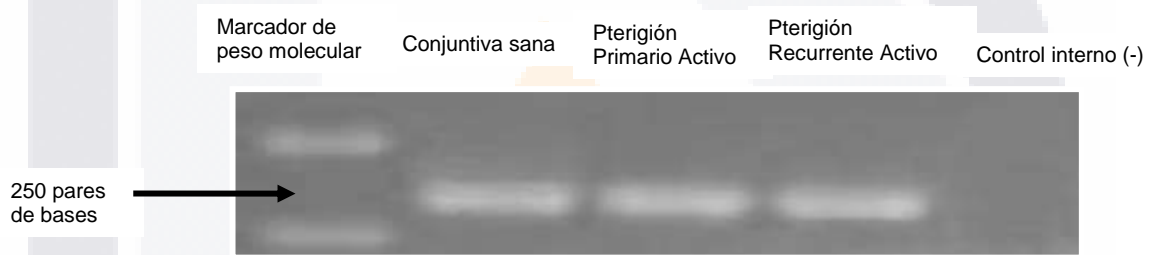


Figura 10. Gel de agarosa donde se muestra el producto de amplificación del gen de la β -globina cuyos pares de bases equivalen a 250 pb correspondiente a las muestras de conjuntiva, pterigión primario activo y pterigión recurrente activo, además se uso control interno (-) al cual no se le puso Cdna.

Productos amplificados de la CCH en muestras de Linfocitos

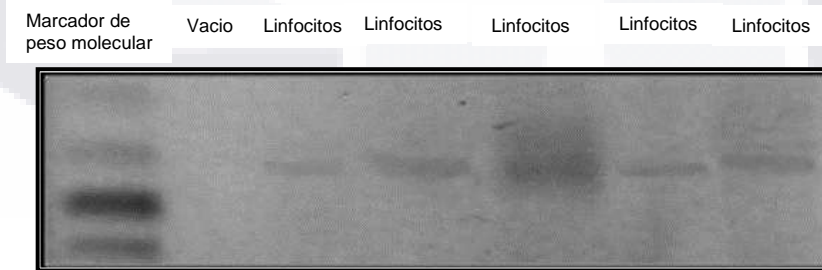


Figura 11. Gel de agarosa donde se muestra el producto de amplificación del gen de la CCH, correspondiente a un valor de 560 pares de bases. Carril 1 marcador de peso molecular, 2 vacio, 3 carril 3 al 7 muestras de linfocitos sanguíneos, cuyas concentraciones de RNA vario.

Se realizaron diversas concentraciones de RNA para esta prueba amplificación del gen de CCH en los linfocitos con la intención de reconocer las cantidades apropiadas de ARN que permitirían obtener el mayor rendimiento con la menor cantidad de RNA expuesta a la amplificación.

Este experimento resultó muy importante pues con este se decidió tomar como gen constitutivo a la β -globina, como control del siguiente gen que se considera amplificar y que fue el gen problema.

Resultados obtenidos de amplificación del gen de la CCH en las muestras problemas La expresión del gen de la Cistatina C humana se pudo observar en 24 muestras de pterigión como lo muestra un ejemplo en un gel de agarosa al 1.5% donde la banda de 560 Kpb se muestran la banda claramente su amplificación como lo muestra la figura 12.

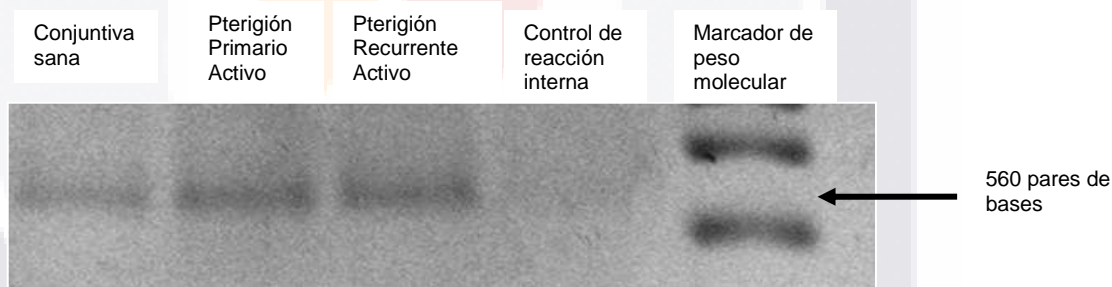


Figura 12. Gel de agarosa mostrando bandas del gen de Cistatina C Humana amplificado en muestra de conjuntiva sana, pterigión primario activo y pterigión recurrente activo y control interno sin cDNA

El resultado obtenido durante la amplificación del gen de la Cistatina C Humana en muestras obtenidas de pterigiones tanto primarios como recurrentes así como nuestro tejido control que fue la conjuntiva de pacientes sanos, nos permite observar bandas cuyos productos que cualitativamente se observan más en las los pterigiones, siendo ligeramente mayor en el pterigión recurrente activo en relación con la banda del pterigión primario activo. Otro dato interesante en este resultado es correspondiente a la conjuntiva la cual muestra un valor de banda meno en otros dos casos. En el carril de la derecha se observa el marcador de peso molecular cuyo valor ronda en las 560 pares de bases.

IV.3 Resultados en Inmunohistoquímica

La estructura del ptergión en la figura 13 muestra área con epitelio engrosado de 10 o más capas de células epiteliales , mantiene en área de pequeñas zonas sus células caliciformes (flecha), en su región basal se muestra bien definida la lámina basal (doble flecha) que lo separa del tejido conjuntivo subyacente, el estroma del tejido conjuntivo subyacente presenta celularidad aumentada (*), en otras áreas se caracterizan por aumento en la densidad por depósitos de colágena (**), adicionalmente en regiones cercanas se observa infiltrado inflamatorio en la periferia de los vasos sanguíneos (β), en forma general estos cambios del estroma muestran una imagen muy diferente de la estructura normal de la conjuntiva semejando un proceso inflamatoria en el tejido conjuntivo y proliferativo en el tejido epitelial. (Figura 13)

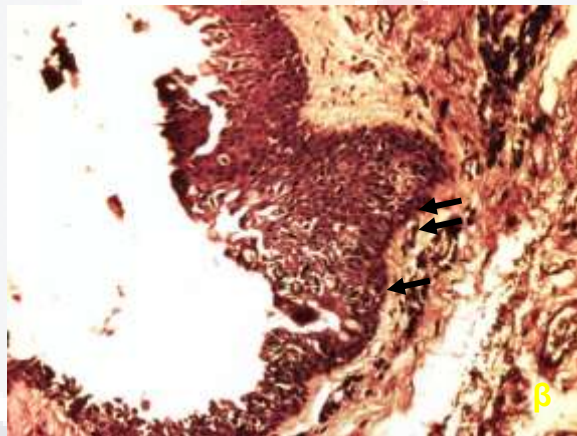


Figura 13. Corte histológico de pterigión donde se muestran el epitelio engrosado, presencia de infiltrado celular, presencia de células caliciformes, angiogénesis, tejido fibroso. Tinción HE.

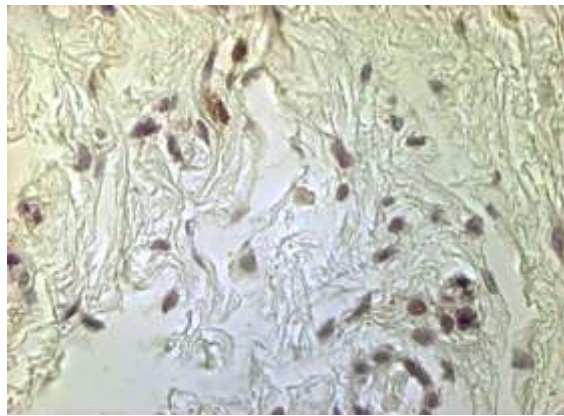


Figura 14. Corte histológico de conjuntiva sana donde se muestra la solo dos neutrófilos (CD-54) positivos en el tejido conectivo asi como en el vaso donde no hay presencia de neutrófilos 40X.

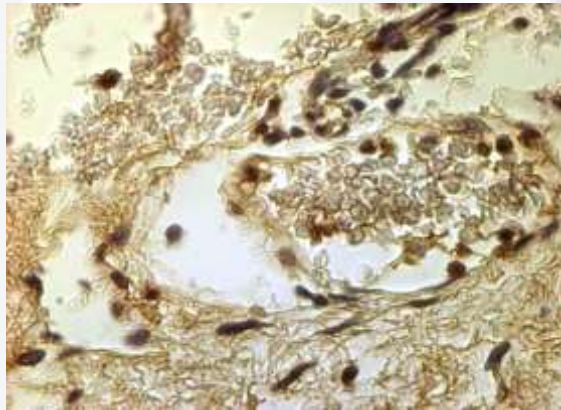


Figura 15. Corte histológico de pterigión primario inflamado con presencia de neutrofilos (CD-54) en vaso y en zona de tejido conectivo positivos 40X.

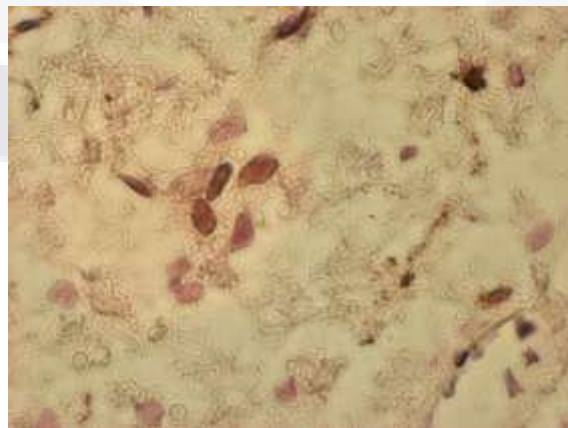


Figura 16. Corte histológico de conjuntiva sana donde se muestran tres macrófagos (CD-68) en tejido conectivo. En la parte inferior de la imagen se muestra un vaso sin presencia de células inflamatorias 40X.

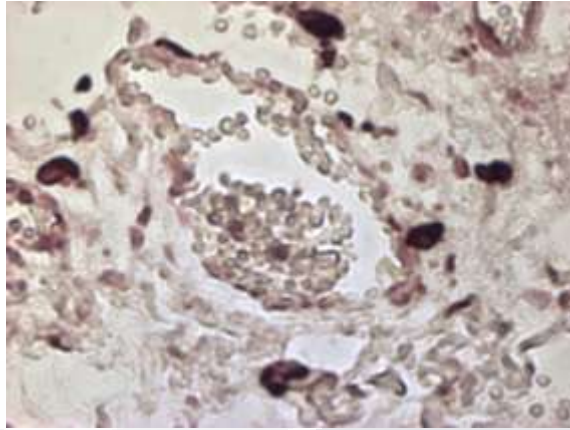


Figura 17. Corte histológico de pterigión primario inflamado donde se muestran macrófagos (CD-68) positivos en zonas de tejido conectivo cercanos a un vaso con abundante agregado celular 40X.

De acuerdo al protocolo estableció que de las muestras obtenidas de pterigiones inflamados y por medio de inmunohistoquímica se reconociera morfológicamente la presencia de agregados celulares que participaran en el proceso inflamatorio para confirmar la actividad en presencia de células como los macrófagos identificando la zonas de los anticuerpos de superficie como son CD-68 y para neutrófilo CD-54, mostrándose que en la figura 14 se observan en un corte histológico de conjuntiva sana la presencia de solo dos neutrófilos por el método de inmunohistoquímica y revelados con diaminobenzidina (DAB) lo que nos muestra la pobre actividad de este agregado celular en este tejido. Situación contraria se observa en la figura 15 donde se puede encontrar una cantidad más abundante de neutrófilos positivos tanto en el interior de el vaso como en el tejido conectivo adyacente de una muestra de pterigión primario inflamado. Con respecto a la presencia de los CD-68 positivos por la misma técnica, se puede observar en la figura 16 que corresponde a conjuntiva sana la presencia de solo dos macrófagos en el tejido conectivo, mientras que en un corte histológico de pterigión primario inflamado se puede encontrar la presencia positiva de una mayor cantidad de macrófagos rodeando a un vaso en el tejido conectivo. Situación que en ambos casos nos permiten mostrar la presencia de actores celulares que participan durante la actividad inflamatoria, resultand así demostrado el objetivo plantado durante la metodología.

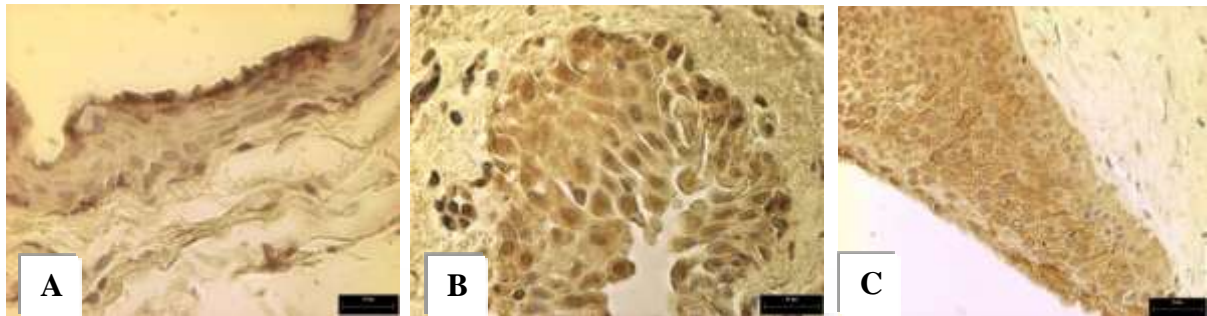


Figura 18. Cortes de 5 nm de conjuntiva sana (A), pterigión primario (B), pterigión recurrente tratados por inmunohistoquímica contra el anticuerpo de Cistatina C Humana 1:200

La Cistatina C se observa positiva en las capas de células superficiales del epitelio de conjuntivas sanas, mientras que el resto de las células basales e intermedias resultaron con mucho menor positividad a la reacción, (Figura 18A). En relación al epitelio del pterigión primario (Figura 18B) la positividad a la Cistatina C fue mayor y más homogéneo en todas las capas del epitelio engrosado desde la capa basal hasta la capa apical, lo que sugiere una mayor actividad en la producción de esta proteína; con respecto a los epitelios del pterigión recurrente observamos la máxima expresión en positividad e intensidad de la reacción, pues como se observa en la figura 18C, las células desde la capa basal, intermedias y apical son fuertemente positivas a la presencia de Cistatina C y que probablemente se este secretando a la superficie del epitelio.

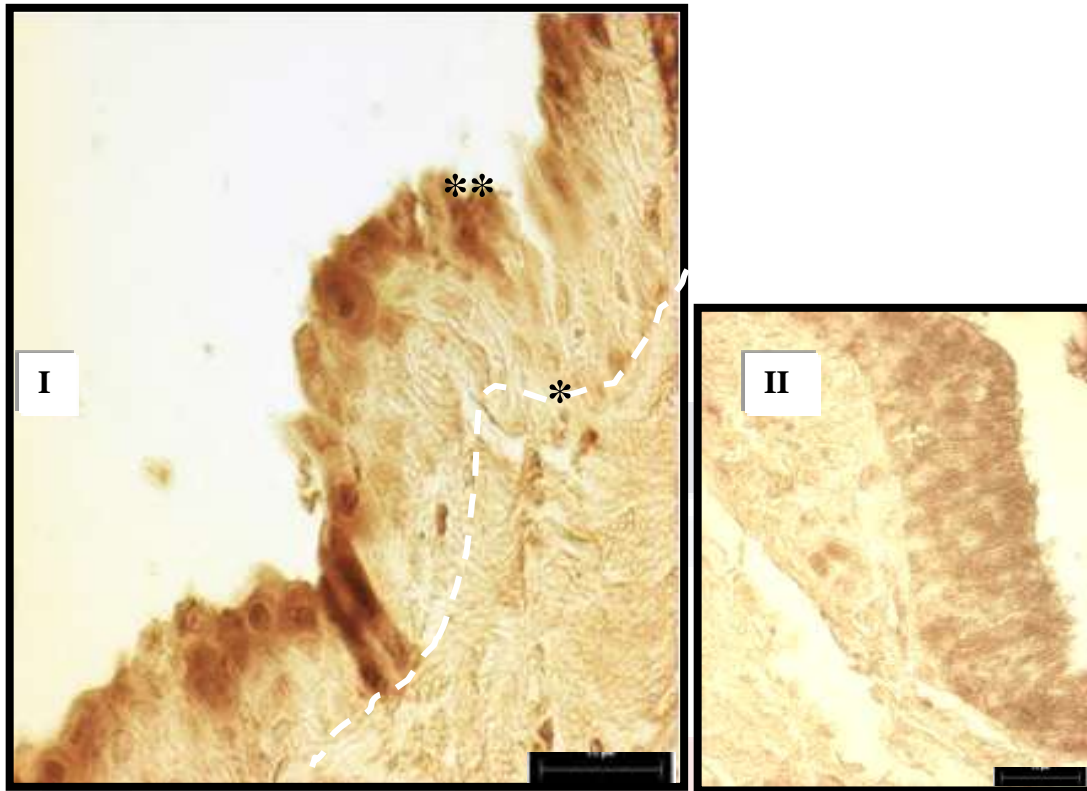


Figura 19. Cortes histológicos de conjuntiva sana (I) y de pterigión primario activo (II) contratados con diamino bencidina y marcados con el anticuerpo contra la proteína Cistatina C Humana. Sin el uso de Hematoxilina

La figura 19 (I) nos permite observar en muestras de conjuntiva sana como control, como la Cistatina C humana solo se muestra positiva en las células epiteliales superficiales, no así en las células intermedias (aladas) ni en las células basales (*), mientras que en una muestra de pterigión primario activo (figura 19 (II)) el resultado obtenido se aprecia positivo en los tres grupos de células, es decir, en las células basales, en las intermedias y en las superficiales (**).

Esta prueba se realizó con la finalidad de que la hematoxilina no creara un efecto de color y que se lograra una reacción más evidente de la Cistatina C en los tejidos procesados.

IV.4 Inmunoblot (Western Blot)

Se tomaron muestras de lágrima en 27 pacientes de los cuales eran 14 pterigiones y 13 personas con conjuntiva sanas de acuerdo al procedimiento descrito por (Barka et al. 1991), las cuales se congelaron a -20° hasta que fueron procesadas. Después de que se descongelaron las muestras se midió en una curva de Bradford la cantidad de proteína contenida por volumen de lágrima y de esta forma determinar su contenido total antes de realizar la prueba, encontrado valores que rondaron entre 32.3 hasta 47.8 mgr de proteína / ml lágrima. Ante estas condiciones se ajustaron volúmenes al momento de cargar en los pozos del gel de acrilamida.

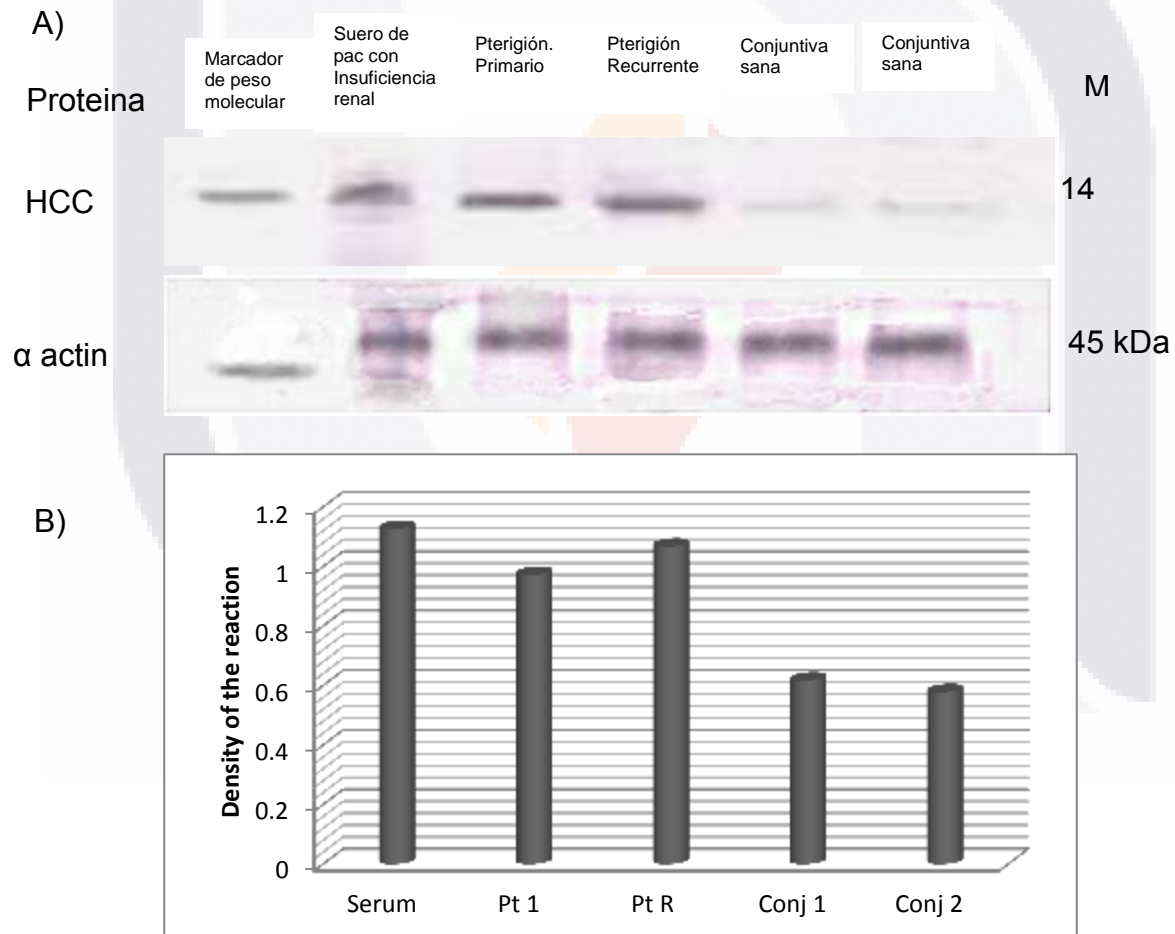


Figura 20. Wester Blot, A) mostrando las bandas de 14 kDa correspondientes a la proteína de la Cistatina C Humana. Como control positivo primer carril con suero de paciente con insuficiencia renal crónica. B) Gráfico de la densidad de la reacción.

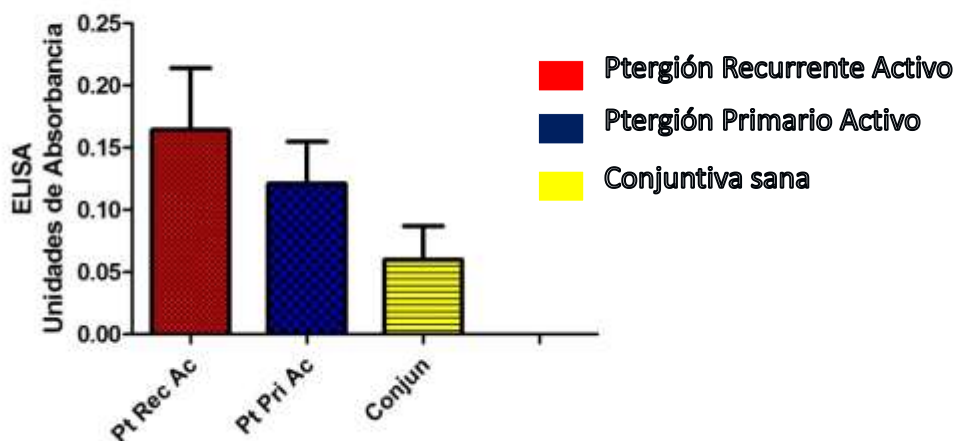
El resultado del Western Blot nos permite observar la presencia de la proteína Cistatina C humana (figura 20) obtenida de las muestras de pacientes con ptergión primario activo, recurrente activo y de una muestra de un paciente sin datos patológicos oculares en el segmento anterior aparentes. Esta prueba nos permite ver que las tres muestras de ptergión contienen cantidades de Cistatina C Humana, siendo mayor en el ptergión recurrente activo

IV.5 ELISA

Los con los resultados obtenidos en biología molecular e inmunohistoquímica, buscamos la relación entre la posible participación de la lágrima en el pacientes con ptergión, en donde buscamos la presencia de este proteína a través de muestras de lágrima de forma que pudiéramos encontrar alguna relación entre sus diversas presentaciones clínicas.

Gráfica de resultados obtenidos de la presencia de la lágrima en pacientes con diversas presentaciones clínicas del ptergión en relación con pacientes de conjuntiva sana.

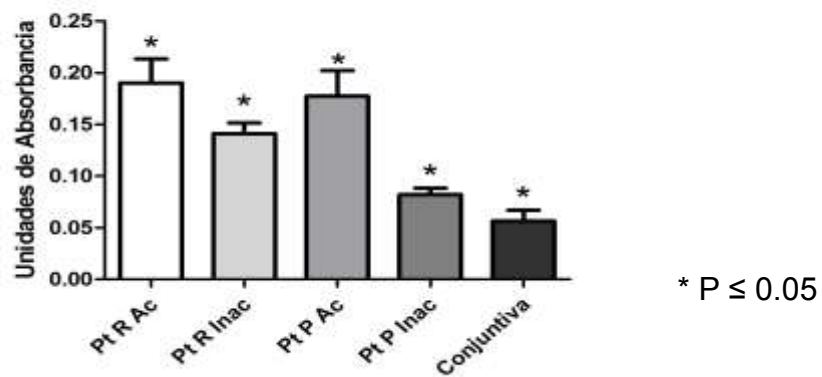
Gráfica de ELISA en Lágrima de Ptergión Primario, Recurrente y Conjuntiva vs CCH para determinar diferencia



Gráfica 1. Gráfica de ELISA comparando la presencia en unidades de absorbancia la presencia de la proteína Cistatina C Humana en muestras de lágrima

Los resultados que muestra la prueba de ELISA (Gráfica 1), nos permite observar claramente que la presencia de la Cistatina C humana es mayor en pterigiones recurrentes, en un promedio de tres veces mayor que en una lágrima de paciente sano, sin embargo, su relación con los casos de pacientes con conjuntiva sana solo un tercio mayor en promedio, lo que nos indica que en los casos evaluados pterigiones recurrente activos, esta más presente que en los primaros y mucho mayor que en la conjuntiva sana.

Gráfica de ELISA de lágrima pacientes por caso de pterigión primario y recurrente, conjuntiva VS Cistatina C Humana



Gráfica 2. Concentraciones en unidades de absorbancia de Cistatina C Humana presentes en lágrima por presentación clínica: (Pt R Ac: Pterigión recurrente Activo), (Pt R Inac: Pterigión Recurrente Inactivo), (Pt P Ac: Pterigión Primario Activo), Pt P Inac: Pterigión Primario Inactivo)

En muestras obtenidas de lágrima de los diferentes casos clínicas se pueden observar que al pterigión recurrente activo muestra niveles más elevados de CCH, respecto al resto de los tipos clínicos de pterigiones cuyo resultado se observa cercano al orden de las 19 unidades de absorbancia, mientras que el pterigión primario activo se encuentra cercano a las 18 unidades de absorbancia, lo que nos indica que el estado activo es predisponente para mostrar niveles elevados de esta proteína. En lo que respecta a los valores de pterigiones recurrentes inactivos también se muestran niveles elevados de CCH respecto al pterigión primario inactivo, sin embargo, el nivel del pterigión recurrente inactivo se encuentra cerca a las 14 unidades de absorbancia, y en el pterigión primario inactivo el valor de unidades de absorbancia esta cercano a las 9 unidades de absorbancia. Lo que muestra el nivel más bajo de esta proteína en las muestras de lágrima analizadas

IV.6 Microscopía electrónica

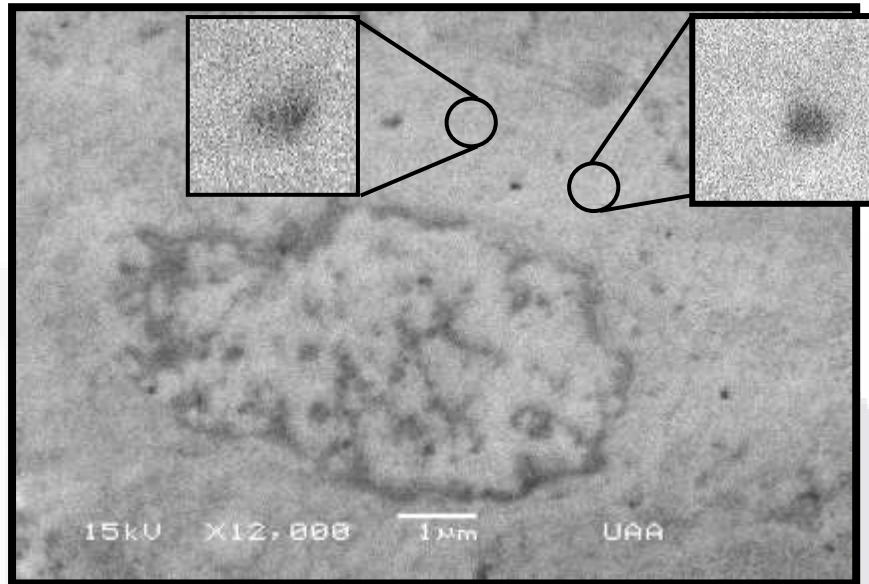


Figura 21. Imagen de microscopía electrónica de transmisión, mostrando núcleo de célula epitelial, con zonas positivas a la presencia de la proteína Cistatina C Humana en un pterigión recurrente activo

Se tomó muestras de paciente para procesarla mediante la técnica de microscopía electrónica de transmisión. La razón de llevar a cabo esta técnica fue para demostrar con otra técnica de estudio morfológico más fino de su presencia, y que además nos permitió reconocer el sitio exacto la presencia de la Cistatina C Humana en las células epiteliales como se puede observar en esta imagen en donde las dos marcas positivas al oro coloidal, a los cuales se une la proteína Cistatina C Humana en el pterigión. Figura 21

V. DISCUSIÓN

La Cistatina C Humana es una proteína plasmática de bajo peso molecular, endógena, pertenece a la superfamilia de las proteínas Cistatinas del tipo 2 inhibidores naturales de las cistein proteasas, del tipo de las catepsinas, la forma activa, madura de la proteína es una cadena polipeptídica no-glicosilada consistente de 120 aminoácidos y una masa molecular de 13,343-13,359 Da (Michele Mussap and Mario Plebani 2010). Tiene uniones disulfuro en las terminaciones carboxilo (Josiah Ochieg 2010), que es un residuo característico de las cisteínas, (*Türk Biyocamya*, 2007). La Cistatina C Humana es trasladada con una secuencia peptídica líder secretoria debido a que contiene una secuencia señal por lo que son consideradas generalmente extracelulares (Michele Mussap and Mario Plebani, 2010). En un análisis de expresión de la CCH en 23 tejidos humanos se encontraron niveles comparables de RNAm en todos ellos (Dickinson DP, 2002), por lo que el gen CST3 (gen de la CCH) se comporta como un gen constitutivo (). La importancia del equilibrio entre las catepsinas y sus inhibidores se hace evidente en enfermedades neurodegenerativas, cardiovasculares, osteoporosis, artritis y cáncer, donde existe una falla biológica en el control de la actividad de proteasas. (*Abrahansom, M.1990*). Los pterigiones primarios y recurrentes activos sobreexpresan Cistatina C Humana (Michele Mussap and Mario Plebani 2010).

El pterigion es una patología compleja que involucra diferentes eventos celulares como la proliferación, el recambio de matriz extracelular, la migración y la inflamación, entre otros. En este trabajo detectamos mediante biología molecular e inmunohistoquímica que tanto el pterigion primario como el recurrente sobreexpresan Cistatina C humana.

Previamente se realizaron pruebas de histoquímica para valorar la diferencia morfológica con el apoyo de un Dr. con la especialidad en el área de patología quien describió la actividad que histoquímica de la inflamación a través de la presencia de agregados celulares, engrosamiento y actividad de la capa de epitelio y la presencia angiogénica exacerbada de los vasos que invaden al tejido que se muestra de acuerdo a los cortes

histológicos (figura 6) con actividad fibrótica y abundantes cantidades de colágeno rodeado de células inflamatorias. Posteriormente a la evaluación histopatológica procedimos a hacer la valoración por inmunohistoquímica donde se tomaron anticuerpos contra CD-54 (neutrófilos) y contra CD-68 (macrófagos) donde se buscó la presencia positivas de ambos agregados celulares para establecer por estos medios la actividad celular que participa en el proceso inflamatorio. Como lo muestran las imágenes donde se comparan en la figura 14 y en la figura 15 la positividad en tejido de conjuntiva sana la poca presencia de neutrófilos y de macrófagos respectivamente, escasa al compararlas con muestras de pterigión primario inflamado en donde tanto los neutrófilos como los macrófagos (figuras 15 y 17, respectivamente), una cantidad mayor de estas células respecto los tejidos sanos de conjuntiva. Con ello confirmamos morfológicamente que tanto por la presencia de los neutrófilos como de los macrófagos hay actividad inflamatoria en los pterigiones respecto a las conjuntivas sanas.

En nuestros controles de conjuntiva normal, la CCH se expresa en la región más superficial del epitelio. A diferencia de lo anterior, la CCH se encuentra sobre expresada en las muestras patológicas de pterigión, principalmente en todas las capas epiteliales. Esta sobreexpresión no solamente se limita al plano epitelial, sino que se manifiesta también en las lágrimas de los pacientes. La expresión secreción de la CCH, además de ser constitutiva (pues se detecto en lágrima de pacientes sanos) se encontró relacionada con el grado de actividad del pterigión, de tal forma que pacientes con pterigiones activos mostraron valores más altos de CCH en lágrima en comparación con los pacientes con pterigiones inactivos.

Papel de las enzimas en el desarrollo del pterigión.

El desarrollo del pterigión involucra la activación de MMP-1 por la luz ultravioleta tales enzimas actúa contra el colágeno fibrilar intersticial, una matriz extracelular abundante componente de la córnea, (*Nick Girolamo, 2005*) Nick en el año 2000, sugirió que las interacciones matriz-célula podrían ser una vía alternativa por la cual la colagenasa-1 es inducida y podría facilitar la migración directa de los keratinocitos a migrar sobre de la

matriz de colágeno, promoviendo la invasión del pterigión dentro de la córnea. (Nick Di. Girolamo, 2004).

La catepsina B pertenece a la familia de las cisteine proteinases tipo papaína, su principal función es degradar las proteínas dentro de lisosomas, y la acción extralisosomal es regulada por la CCH. (A.J Barrett, 1984).

La presencia de la Catepsina B se ha demostrado en córneas de diabéticos humanos y en las células epiteliales humanas cultivadas de queratocono mediante microarreglos, esta enzima participa en la digestión de la matriz extracelular (Mehrnoosh Saghized 2005) así mismo en estudios de queratocono se ha encontrado a la Catepsina B liberada extracelularmente digiriendo gelatina y elementos de la matriz extracelular. (Xiang Shen, 2009). Johan Wassélius encontró en un estudio por inmunohistoquímica y PCR la expresión de la catepsina B en un modelo de rata ubicada a la proteína en varios tejidos oculares entre ellos células basales del epitelio (Johan Wasselius, 2003), lo que confirma que en condiciones no patológicas la catepsina B es constitutiva, y en el pterigión no está descrita su presencia.

La Cistatina C regulador de la catepsina B. en la insuficiencia renal se ha demostrado que la Cistatina C se encuentra considerablemente aumentada y se ha constituido como un marcador de daño en la función renal. El mecanismo mediante el cual Cistatina C inhibe a la Catepsina B se ha explicado en dos mecanismos, uno débil inicia, seguido de un segundo más fuerte conformacional que involucra la región N-terminal en los subsitios S2-S3 (Maria Nycandera, 1998), dicho mecanismo ocurre en las células mesangiales de los glomérulos renales a las 6 horas de iniciado un estímulo dañino a células humanas en cultivo (C. Tavera, 1992).

Entre las funciones de inhibidores de cistein proteasas está la de limitar a las catepsinas lo que va a detener la actividad proteolítica sobre la matriz de colágena extensa que muestran los pterigiones debido a que es inhibida por la CCH, este resultado coincide con el encontrado por Torsten Hansen, 2001 en un modelo de estudio células tumorales de tendones, en donde la fuerte expresión de la CCH en la mayoría de las células que tenían

expresión nula de la catepsina B por lo que no había una degradación del exceso de matriz de colágeno y esto coadyuva con el crecimiento de tumor.

La presencia aumentada de la Cistatina C *in vivo* podría influir en algunos tejidos. En estudios realizados en ratones homocigotos con células B16-F10 donde se anuló el alelo de la CCH, resultó en establecimiento y crecimiento del cáncer de pulmón, mientras que en un estudio de células de glioma (SNB19) hubo una sobre expresión de CCH y no fue encontrado el tumor bajo la inyección dentro del cerebro del ratón, sin embargo, a pesar del conflicto de este resultado el inhibidor de cisteine proteinasas el valor pronóstico sobre los tumores de cáncer de, pulmón, seno, cerebro o colorectal se encontró que son indicadores pronóstico cuando son medidos extracelularmente por ejemplo en fluidos corporal de pacientes con melanoma (Kos J, 1997) y en tumor de ovario, útero o colorectal (Lah TT, 1992).

Durante un estudio en pterigiones y usando la técnica de inmunohistoquímica se busco la presencia de varios factores de crecimiento de la angiogénesis como el VEGF y CD31, resultando que el epitelio de los pterigiones mostró un incremento en la expresión del VEGF en el endotelio y en los fibroblastos y principalmente en el epitelio, (C. Livezenu, 2011) También se ha visto la sobre expresión del factor de crecimiento ligando tipo insulina(IGFBP)-2 el epitelio de los ptergiones. Así como las ciclooxigenasas las cuales se demostraron por inmunohistoquímica en el citoplasma células epiteliales de los pterigiones observados (Karahan N, 2008), otro es el caso del inhibidor de metaloproteinasas tipo 2 y también homologo de L-3 fosfoferin fosfatasa, el cual se encuentra incrementado en el epitelio de pterigiones, recurrentes, observando en estos casos con el uso de anticuerpos e inmunohistoquímica.(Chuan-Hui Kuo, 2007).

Otros estudios que evalúan el papel de la Cistatina C, fue en el daño por radicales libres (ROS) a los miocardiocitos y fibroblastos cardiacos de ratón y rata. Previamente indujeron isquemia en el miocardio y se acompañó de la producción de ROS, y se encontraron niveles altos de Cistatina C y una disminución de catepsina B, y mientras ocurría esto se encontró en la matriz extracelular (MEC) la presencia aumentada de colágeno I, colágeno III y

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

fibronectina en el área de la isquemia. Para evitar que se pegue (el colágeno y la fibronectina) a las MMP's, se hizo el experimento sin MMP's, y se encontró nuevamente que el colágeno I, colágeno III y fibronectina, que son altamente resistentes a la proteólisis estaban aumentadas. Por lo que al aumentar la presencia de la Cistatina C, aumentará la fibrosis en presencia de una mayor cantidad de colágeno I, colágeno III y fibronectina, y una disminución de la catepsina B, (Lifang Xie 2010) en relación al pterigión como ya se sabe desde el año 2000, en donde en su trabajo Girolamo en el 2005, demostró la presencia elevada de colágeno I, colágeno III y colágeno fibrilar y la expresión de metaloproteinasas elevada respecto a la conjuntiva, en pterigiones primarios y recurrentes. En nuestro estudio y de acuerdo a los datos anteriores podemos indicar que la Cistatina C esta deteniendo la función de las metaloproteinasas y catepsinas, lo que podría estar ocasionando que se eleve la presencia de esta materia extracelular de colágeno y fibronectina y eso explique en parte la remodelación del tejido. Por otro lado la presencia aumentada de MMP's y disminuida de sus inhibidores TIMP's no permite que si algún otro factor como el FGF se ve elevado y se incrementa la formación de colágeno no haya algún elemento que este deteniendo el crecimiento de estas fibras en esta patología.

La degradación del colágeno depende de la acción específica de las colagenasas que son capaces de desestabilizar la hélice del colágeno fibrilar nativo.

Otra teoría del efecto que tiene en los microambientes la presencia de la Cistatina C respecto a la MEC y sus componentes como el colágeno es el que se demostró a través de un estudio de aneurisma aórtico abdominal, en donde encontraron tanto a nivel de expresión a través de RNA semicuantitativo mayores niveles de metaloproteinasas y menor la cantidad de Cistatina C, por otro lado la presencia de la proteína fue hasta de un 80% menos respecto a las MMP's, lo que indica un papel importante de la regulación entre estas moléculas, y que trae como consecuencia un adelgazamiento de la pared y por consecuencia la ruptura de la arteria.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Varios reportes indican que la expresión de las MMP así como de cisteín colagenasas es importante que se reconozca la regulación post-translacional de la actividad de las proteasas los cuales involucran activación controlada de las proenzimas inactivas y subsecuente inactivación por inhibidores específicos y no –especificos, más aun el posible involucramiento de la actividad de las colagenasas, como la causa subyacente de ruptura no ha sido direccionada en detalle.

De acuerdo a los anteriores resultados nosotros encontramos la presencia de la CCH, a nivel de los epitelios tanto de los pterigiones primarios como de los recurrentes a través de la localización de la CCH en el epitelio de los diversos pterigiones analizados. Lo cual puede ser uno más de los mecanismos de respuesta del epitelio conjuntival de los pacientes con pterigion al efecto irritativo de los rayos UV, del mismo modo la CCH se encuentra elevada en las células del epitelio de los pterigiones, lo que nos sugiere un efecto protector y el aumento de la CCH en la lágrima de personas con pterigión también nos hace pensar que el péptido tránsito sirve de vehículo para ser expulsado hacia el espacio extracelular.

El hecho de que la CCH se encuentre en niveles basales en suero y en todas las células nucleadas, además de que cuente con una secuencia señal de 26 aminoácidos que funciona como péptido tránsito que se requiere para el tráfico dentro de la célula, antes o en la secreción le permiten a la CCH ser secretada fuera de la célula (*Mertz et al 1997*), ante esta condición y considerando que la CCH es secretada por a la lágrima, en nuestros estudios buscamos la presencia de CCH ya que otros autores como (*Barka et Al 1997*) que establecieron niveles cuantitativos de CCH en la lágrima de personas sin enfermedad ocular en el segmento anterior, por lo que nosotros buscamos niveles de CCH en la lágrima de diferentes casos de pterigión y encontramos que los pacientes con pterigión recurrente activo fueron los que presentaron niveles más altos con respecto a los ojos de personas sanas y de personas con pterigión primario (Gráfica 1). Esto nos permite poder establecer que la Cistatina C puede ser un buen candidato como posible biomarcador pronóstico de recurrencia para los posibles pacientes que pretenden operarse y saber si tienen posibilidades de recurrencia.

El mecanismo explicado anteriormente, es posible que este ocurriendo durante el desarrollo pterigión, siendo los rayos UV el estímulo dañino que promueve la activación del proceso inflamatorio en la conjuntiva y que la Cistatina C Humana que constitutivamente se esta produciendo sea incrementada su expresión y secreción hacia la lágrima para contrarrestar el efecto de las enzimas degradadoras matriz extracelualr (catepsina B y metaloproteinasas) producidas por las células inflamatorias del tejido conjuntivo subyacente al epitelio. (Perra, MT et Al 2011)

Aunque las células T son las que más frecuentemente se encuentran entre los tipos de células inflamatorias, los macrófagos (CD68) son los más frecuentemente encontrados en el pterigion ellos están distribuidos en capas de epitelio y en estroma, sugiriendo que ellos están relacionados con la patogénesis del pterigion.

En nuestro estudio demostramos por la técnica de inmunohistoquímica la presencia los macrófagos a nivel de la lámina propia, y en menor cantidad al interior del epitelio. Esta misma localización la refiere T. Golu et al, en su estudio, la presencia de los macrófagos se ubicaron en formas dispersas así como en forma aglomerada, muy diferente a los linfocitos, en los casos tanto de pterigiones activos como en inactivos, sin embargo, al hacer el conteo celular, se observó una mayor cantidad a nivel de las pterigiones inactivos, esta relación respecto a la actividad clínica de inactividad clínica o de menor inflamación en los pterigiones inactivos con respecto a los macrófagos se puede relacionar con su función secretora de IL-10, como anti-inflamatorio, y como un supreso y regulador de la reparación de heridas, lo que puede explicar su presencia en esta estado inactivo del pterigión, los resultados que nosotros encontramos son similares a los que refiere. Choul Young Park et al, donde demostró en pterigiones la presencia de macrófagos aumentados respecto a conjuntivas sanas. Otra posible explicación de actividad del pterigion en presencia de macrófagos se relaciona directamente la liberación de VEGF, la cual actúa en la fibrosis y en la angiogénesis, por lo tanto los macrófagos se relacionan directamente con la angiogénesis y con los depósitos de colágeno. (Liu, et Al, 2011).

Los macrófagos tienen actividad proteolítica y catabólica, son fagocitarios y remodeladores de tejido después de estar dañado, los macrófagos clasificados como M1 son los encargados de participar en la defensa e inmunidad del huésped, sin embargo, los

macrófagos M2, son supresores y reguladores de la reparación de heridas a través de la liberación de IL-10, lo que los hace actuar como supresores de la inmunidad de tumores. Al respecto de la presencia los macrófagos (CD68), se han detectado en niveles

Como tal es el estudio de Shinowiya K, et al, quien evaluó muestras de conjuntiva inflamada en la zona de la lesión para evaluar la respuesta celular por inmunohistoquímica, quién refiere la presencia de macrófagos en poca cantidad en pacientes con úlcera de Moore, mientras que de linfocitos CD4, si encontró un volumen mayor respecto a los macrófagos. (Shinomiya, et Al. 2013)

Los neutrófilos no solo juegan un papel crítico en la defensa como la primera línea de defensa contra infecciones por bacterias, hongos sino que también contribuyen al tejido dañado asociado con enfermedades autoinmunes e inflamatorias. Entre las funciones de los neutrófilos relacionados con la inflamación están la producción y la liberación de citoquinas y quimiocinas tales como interleucina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral alfa ($\text{TNF-}\alpha$), interleucina 12p70 (IL-12), factor de crecimiento beta ($\text{TGF-}\beta$), interleucina-8 (IL-8), proteínas inflamatorias de macrófagos 1 beta y 3 alfa, sin embargo, los neutrófilos producen menores cantidades de citosinas que los macrófagos y los monocitos, las altas concentraciones que los neutrófilos alcanzan en áreas de inflamación durante el curso de un proceso inflamatorio sugiere que juegan un rol importante en esta respuesta.

VI. CONCLUSIONES

Es el primer estudio de Cistatina C Humana en pterigión, el cual incluye datos de acuerdo al estadio de esta patología.

El incremento de la CCH en los pterigiones al ser encontrada por medio de técnicas de expresión génica y morfológica nos sugiere algún efecto en la actividad de remodelación, inflamación y/o angiogénesis.

La CCH fue encontrada en el epitelio de los tejidos de pterigiones así como en sano.

La presencia de la CCH esta en las tres capas celulares del epitelio de los pterigiones, mientras que en la conjuntiva sana, solo se observa en el la capa de células superficiales, lo que nos sugiere que tiene algún papel en la regulación de la enfermedad, tal y como lo encontró, *Birgitta S.M., 1998*, donde indica que la CCH esta involucrada en la regulación los procesos de enfermedad en el ojo.

El valor encontrado través de 1 Western Blot en lágrima de pterigión y conjuntiva confirma y valida nuestros resultados de ELISA, ya que las bandas encontradas corresponden al PM de la CCH.

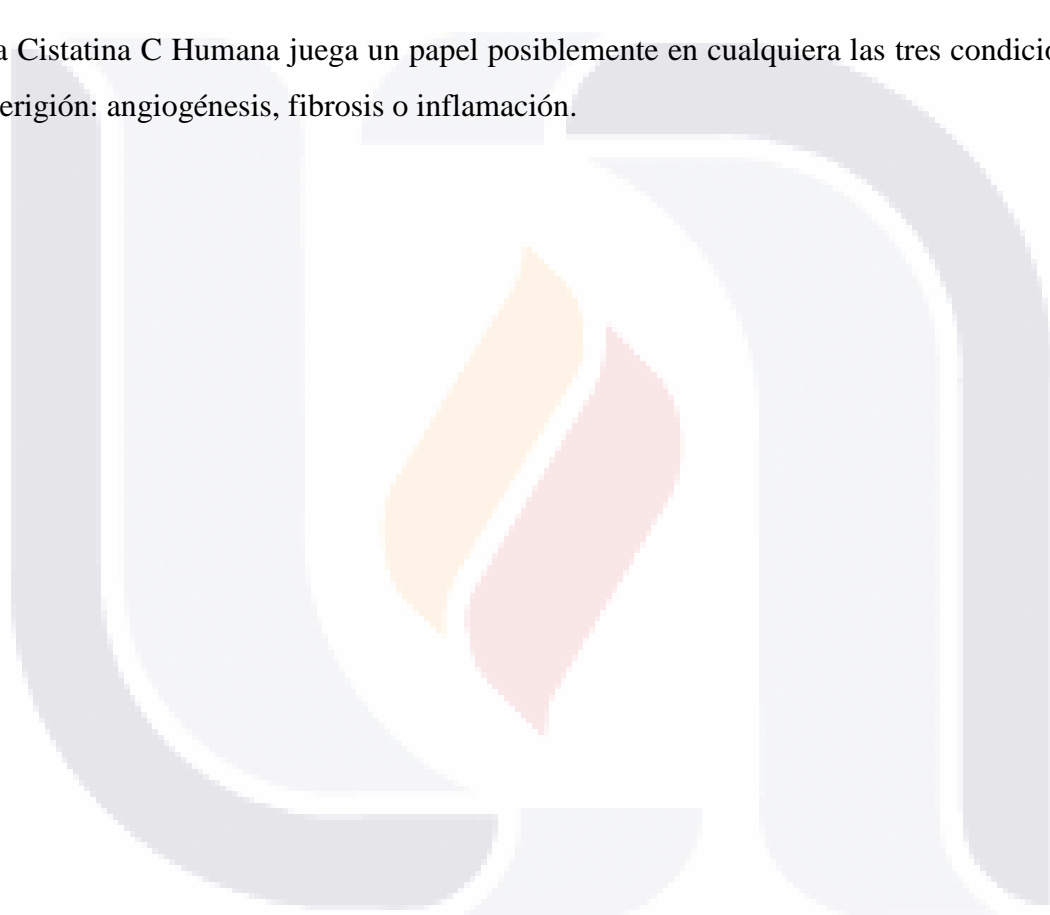
La doble banda que aparece en el WB, corresponde a la posibilidad de que sea una proteína isoforma o una forma procesada de la CCH; la Cistatina S, Cistatina SN o Cistatina SA, descritas por Dayhoff et al. (1979) Donde indica que la secuencia de datos de proteínas de las Cistatinas C, S, SN y SA se ha visto que pertenecen a esta familia de Cistatinas.

De acuerdo a los resultados encontrados de la [CCH] en lágrima de humanos por Barka, et al, coincide con los datos aportados por nosotros al reconocer a la CCH en la lágrima de personas sanas.

Este es el primer trabajo que relaciona a la Cistatina C Humana con el pterigión
Con este trabajo se da la posibilidad de que la CCH puede servir como un posible marcador pronóstico en los pterigiones primarios respecto a los recurrentes.

Para lograr que nos sirva como un marcador de pronóstico de recurrencia se requiere una población mayor de estudio.

La Cistatina C Humana juega un papel posiblemente en cualquiera las tres condiciones del pterigión: angiogénesis, fibrosis o inflamación.



VII. REFERENCIAS

- 1.- Coroneo MT, Di Girolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. *Curr Opin Ophthalmol* 1999; 10:282-8.
- 2.- Harrison M. Cost of pterygium. *Clin Experiment Ophthalmol* 2002; 30:312.
- 3.- Lawrence WH. The treatment of pterygium. *Surv Ophthalmol* 2003; 48(2):145-180
- 4.- Tekin NF, Kaynak S, Saatci AO, Cingil G. Preserved human amniotic membrane transplantation in the treatment of primary pterygium. *Ophthalmic Surg Lasers* 2001; 32:464-9.
- 5.- Archila EA, Arenas MC. Etiopathology of pinguecula and pterigium. *Cornea* 1995; 14:543-4.
- 6.- Ebana-Mvogo C, Bella-Hiag A, Ngosso A, Ellong A. Pterygium: epidemiological, clinical and therapeutical aspects at the Douala General Hospital. *Rev Int Trach Pathol Ocul Trop Subtrop Sante Publique* 1995; 72:151-61.
7. Gazzard G, Saw SM, Farook M y col. Pterygium in Indonesia: prevalence, severity and risk factors. *Br J Ophthalmol* 2002;86:1341-6.
8. Khoo J, Saw SM, Banerjee K y col. Outdoor work and the risk of pterygia: a case-control study. *Int Ophthalmol* 1998; 22:293-8.
9. Mackenzie FD, Hirst LW, Battistutta D, Green A. Risk analysis in the development of pterygia. *Ophthalmology* 1992; 99:1056-1068.
10. McCarty CA, Fu CL, Taylor HR. Epidemiology of pterygium in Victoria, Australia. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:289-92.
11. Panchapakesan J, Hourihan F, Mitchell P. Prevalence of pterygium and pinguecula: the Blue Mountains Eye Study. *Aust N Z J Ophthalmol* 1998; 26 (Supl 1):S2-S5.
12. Saw SM, Tan D. Pterygium: prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiol* 1999; 6:219-28.
13. Bekibele CO, Baiyeroju AM, Ajayi BG. 5-fluorouracil vs. betairradiation in the prevention of pterygium recurrence. *Int J Clin Pract* 2004; 58:920-3.
14. Frau E, Labqtoulle M, Lautier-Frau M y col. Corneo-conjunctival autograft transplantation for pterygium surgery. *Acta Ophthalmol Scand* 2004; 82:59-63.

15. Avisar R, Arnon A, Avisar E, Weinberger D. Primary pterygium recurrence time. *Isr Med Assoc J* 2001; 3:836-7.
16. Frucht-Perry J, Solomon A, Siganos CS. Treatment of inflamed pterygium and pinguecula with topical indomethacin 0.1% solution. *Cornea* 1997; 16:42-47.
- 17.- Dake Y, Mukae R, Soda Y. Immunohistochemical localization of collagen types I, II, III, and IV in pterygium tissues. *Acta Histochem* 1989; 87:71-79.
- 18.- Avisar R, Arnon A, Avisar E, Weinberger D. Primary pterygium recurrence time. *Isr Med Assoc J* 2001; 3:836-7.
- 19.- Frucht-Perry J, Solomon A, Siganos CS. Treatment of inflamed pterygium and pinguecula with topical indomethacin 0.1% solution. *Cornea* 1997; 16:42-47.
- 20.- Mackenzie F.D. Hirst L.W. Battistuta D. Green A. Risk Analysis in the development of pterygia *Ophsource periodicals*, Volume 99, issue 7 1056-1061 (1 July 1992)
- 21.- Dushku N, John MK, Schultz GS, Reid TW. Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:695-706.
- 22.- Detorakis ET, Sourvinos G, Spandidos DA. Detection of herpes simplex virus and human papilloma virus in ophthalmic pterygium. *Cornea* 2001; 20:164-7.
- 23.- Piras F, Moore PS, Ugalde J y col. Detection of human papillomavirus DNA in pterygia from different geographical regions. *Br J Ophthalmol* 2003; 87:864-6.
- 24.- Reid TW, Dushku N. Does human papillomavirus cause pterygium? *Br J Ophthalmol* 2003; 87:806-8.
- 25.- Di Girolamo, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D. Patogénesis of pterygia: role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. *Prog Retin Eye Res* 2004;23:195-228.
- 26.- Chang L, Crowston JG, Cordeiro MF y col. The role of the immune system in conjunctival wound healing after glaucoma surgery. *Surv Ophthalmol* 2000; 45:49-68.
- 27.- Martin CW, Muir IF. The role of lymphocytes in wound healing. *Br J Plast Surg* 1990; 43:655-62.
- 28.- Chang L, Crowston JG, Sabin CA y col. Human Tenon's Fibroblast-Produced IFN β and the Prevention of T-Cell Apoptosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 2:1531-8.

- 29.- Tan DT, Tang WY, Liu YP y col. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000; 84:212-6.
- 30.- Carmichael Tr. Genetic factors in pterygium in South africans. *S Afr Med J* 2001;91:322
- 31.- Zhang JD. an investigation of aetiology and heredity of pterygium. report of 11 cases in a family. *Acta Ophthalmol (Copenh)* 1987;65:413-6 (9) hecht f, Shoptaugh MG.
- 32.- Goyal JI, rao Va, Srinivasan r, agrawal K. Oculocutaneous anifestations in xeroderma pigmentosa. *Br J Ophthalmol* 1994;78:295-7
- 33.- Kau hc, Tsai cc, hsu WM, et al. Genetic polymorphism of HOGG1 and risk of pterygium in chinese. *Eye* 2004;18:635-9],
- 34.- Tsai yy, lee h, Tseng Sh, et al. Null type of glutathione S-transferase M1 polymorphism is associated with early onset pterygium. *Mol Vis* 2004;10:458-61
- 35.- Tsai yy, Bau DT, chiang cc, et al. Pterygium and genetic polymorphism of Dna double strand break repair gene Ku70. *Mol Vis* 2007;13:1436-40
- 36.-Elahi MM, naseem KM, Matata BM. nitric oxide in blood. The nitrosative-oxidative disequilibrium hypothesis on the patogénesis of cardiovascular disease. *FEBS J* 2007;274:906-23
- 37.- Nishigori c. cellular aspects of photocarcinogenesis. *Photochem Photobiol Sci* 2006;5:208-14 (27) Wlaschek M, Tancheva-Poor I, naderi l, et al. Solar UV irradiation and dermal photoaging. *J Photochem Photobiol B* 2001;63:41-51
- 38.-Lu l, Wang r, Song X. [Pterygium and lipid peroxidation]. *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* 1996;32:227-9
- 39.- Shen a, ye y, Wang X, et al. raman scattering properties of human pterygium tissue. *J Biomed Opt* 2005;10:024036
- 40.- Brown DJ, lin B, chwa M, et al. elements of the nitric oxide pathway can degrade TIMP-1 and increase gelatinase activity. *Mol Vis* 2004;10:281-8
- 41.- Peus D, Meves a, Vasa ra, et al. H₂O₂ is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation. *Free Radic Biol Med* 1999;27:1197-202
- 42.- Brenneisen P, Sies h, Scharffetter-Kochanek K. ultraviolet-B irradiation and matrix metalloproteinases: from induction via signaling to initial events. *Ann N Y Acad Sci* 2002;973:31-43

- 43.- Di Girolamo n, coroneo M, Wakefield D. Epidermal growth factor receptor signaling is partially responsible for the increased matrix metalloproteinase-1 expression in ocular epithelial cells after uVB radiation. *Am J Pathol* 2005;167:489-503
- 44.- Fisher GJ, Talwar hS, lin J, et al. retinoic acid inhibits induction of c-Jun protein by ultraviolet radiation that occurs subsequent to activation of mitogen-activated protein kinase pathways in human skin in vivo. *J Clin Invest* 1998;101:1432-40
- 45.- Di Girolamo n, coroneo MT, Wakefield D. UVB-elicited induction of MMP-1 expression in human ocular surface epithelial cells is mediated through the erK1/2 MaPK-dependent pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:4705-14
- 46.- Liu Z, Xie y, Zhang M. Overexpression of type I growth factor receptors in pterygium. *Chin Med J (Engl)* 2002;115:418-21
- 47.- Abeyama K, eng W, Jester JV, et al. a role for nf-kappaB-dependent gene transactivation in sunburn. *J Clin Invest* 2000;105:1751-9
- 48.- Habib aa, chatterjee S, Park SK, et al. The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (nf-kappa B)-inducing kinase to activate nf-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome. *J Biol Chem* 2001;276:8865-74
- 49.- Ansel JC, Abraham TA, Zivony AS, et al. UV induces human corneal epithelial cell NF - κ B activation and results in the production of proinflammatory cytokines IL-1, IL-6, IL-8, and TNF $-\alpha$. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001;42:S575, abstract 3087
- 50.- Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* 2002;21:1-14
- 51.- Wilson SE, Mohan RR , Ambrosio R, Jr, et al. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001; 20:625-37
- 52.- Dushku N, John MK, Schultz GS, Reid TW. Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol* 2001; 119:695-706
- 53.- Solomon A, Li DQ, Lee SB, Tseng SC. Regulation of collagenase, stromelysin, and urokinase-type plasminogen activator in primary pterygium body fibroblasts by inflammatory cytokines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2154-63

- 54.- Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. Active matrilysin (MMP-7) in human pterygia: potential role in angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42:1963-8.
- 55.- Di Girolamo N, McCluskey P, Lloyd A y col. Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:671-9.
- 56.- Seifert P, Sekundo W. Capillaries in the epithelium of pterygium. *Br J Ophthalmol* 1998; 82:77-81.
- 57.- Tan D. Conjunctival grafting for ocular surface disease. *Curr Opin Ophthalmol* 1999; 10:277-81.
- 58.- Di Girolamo N, Kumar RK, Coroneo MT, Wakefield D. UVBmediated induction of interleukin-6 and -8 in pterygia and cultured human pterygium epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:3430-7
- 59.- Kennedy M, Kim KH, Harten B y col. Ultraviolet irradiation induces the production of multiple cytokines by human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997; 38:2483-91
- 60.- Lee DH, Cho HJ, Kim JT y col. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 2001; 20:738-42
- 61.- Touhami A, Di Pascuale MA, Kawatika T y col. Characterisation of myofibroblasts in fibrovascular tissues of primary and recurrent pterygia. *Br J Ophthalmol* 2005; 89:269-74
- 62.- Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004;78:433-46
- 63.- Clear AS, Chirambo MC, Hutt MSR. Solar keratosis, pterygium, and squamous cell carcinoma of the conjunctiva in Malawi. *Br J Ophthalmol* 1979;63:102-9.
- 64.- Wong VA, Law FCH. Use of mitomycin C with conjunctival autograft in pterygium surgery in Asian-Canadians. *Ophthalmology* 1999;106:1512-5.
- 65.- Sánchez-Thorin JC, Rocha G, Yelin JB. Meta-analysis on the recurrence rates after bare sclera resection with and without mitomycin C use and conjunctival autograft placement insurgery for primary pterygium. *Br J Ophthalmol* 1998;82:661-5.
- 66.- Lam DSC, Wong AKK, Fan DSP, et al. Intraoperative mitomycin C to prevent recurrence of pterygium after excision: a 30-month follow-up study. *Ophthalmology* 1998;105:901- 4; discussion 904-5.

- 67.- Frucht-Pery J, Siganos CS, Ilsar M. Intraoperative application of topical mitomycin C for pterygium surgery. *Ophthalmology* 1996;103:674 –7
- 68.- Dushku N, Reid TW. P53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Curr Eye Res* 1997;16:1179 –92.
- 69.- Tan DTH, Lim ASM, Goh HS, Smith DR. Abnormal expression of the p53 tumor suppressor gene in the conjunctiva of patients with pterygium. *Am J Ophthalmol* 1997; 123:404 –5.
- 70.- Karukonda SRK, Thompson HW, Beuerman RW, et al. Cell cycle kinetics in pterygium at three latitudes. *Br J Ophthalmol* 1995;79:313–7.
- 71.- Onur C, Orhan D, Orhan M, et al. Expression of p53 protein in pterygia. *Eur J Ophthalmol.* 1998;8:157-161
- 72.- Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, et al. Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye.* 2002;16:619-621
- 73.- Tsai, Yi-Yu, Chang, Kong-Chao, Lin, Chien-Lin, Lee, Huei, Tsai, Fuu-Jen, Cheng, Ya-Wen, Tseng, Sung-Huei p53 Expression in Pterygium by Immunohistochemical Analysis: A Series Report of 127 Cases and Review of the Literature. *Cornea.* 24(5), July 2005, pp 583-586
- 74.- Skilling JS, Sood A, Niemann T, et al. An abundance of p53 null mutations in ovarian carcinoma. *Oncogene.* 1996;13:117-123
- 75.- S, Ingnas M, Norberg T, et al. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:173-182
- 76.- Detorakis ET, Sourvinos G, Tsamprakakis J, Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol* 1998; 82:1324-8.
- 77.- Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. *Exp Eye Res* 2004;78:433-46
- 78.- Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* 1993;77:734-9
- 59.- Kennedy M, Kim KH, Harten B, et al. Ultraviolet irradiation induces the production of multiple

- cytokines by human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:2483-91
- 60.- Baba H, Uchiwa H, Watanabe S. UVB irradiation increases the release of SCF from human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 2005;124:1075-7
- 63.- Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA . Immunologic basis for the pathogenesis of pterygium. *Am J Ophthalmol* 1984;98:225-8
- 64.- Liu L, Yang D. Immunological studies on the pathogenesis of pterygium. *Chin Med Sci J* 1993;8:84-8
- 66.- Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor-beta and tumor necrosis factor-alpha in the pterygium. *Acta Histochem* 1996;98:195-201
67. Wen Z, Liu Z. The abnormal expression of interleukine-1 family in pterygium. *Yan Ke Xue Bao* 2003;19:133-6
- 68.- Butrus SI, Ashraf MF, Laby DM, et al. Increased numbers of mast cells in pterygia. *Am J Ophthalmol* 1995;119:236-7
- 69.-Nakagami T, Watanabe I, Murakami A, et al. Expression of stem cell factor in pterygium. *Jpn J Ophthalmol* 2000;44:193-7
- 70.- Nolan TM, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. Proliferative effects of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor on pterygium epithelial cells and fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:110-3
- 71.- Andresen JL, Ehlers N. Chemotaxis of human keratocytes is increased by platelet-derived growth factor-BB, epidermal growth factor, transforming growth factor-alpha, acidic fibroblast growth factor, insulin-like growth factor-I, and transforming growth factor- beta. *Curr Eye Res* 1998;17:79-87
- 72.- Seifert P, Sekundo W. Capillaries in the epithelium of pterygium. *Br J Ophthalmol* 1998;82:77-81
- 73.- Oshida S, Ono M, Shono T, et al. Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 1997;17:4015-23
- 74.- Jin J, Guan M, Sima J, et al. Decreased pigment epithelium-derived factor and increased vascular endothelial growth factor levels in pterygia. *Cornea* 2003;22:473-7

- 75.- Ma DH, Yao JY, Yeh LK, et al. In vitro antiangiogenic activity in ex vivo expanded human limbal epithelial cells cultivated on human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:2586-95
- 76.- Aspiotis M, Tsanou E, Gorezis S, et al. Angiogenesis in pterygium: study of microvessel density, vascular endothelial growth factor, and thrombospondin-1. *Eye* 2007;21:1095-101
- 77.- Dushku N, Reid TW. P53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Curr Eye Res* 1997; 16:1179-92.
- 78.- Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* 1993;77:734-9
- 79.- Chui J, Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. The role of substance p in the pathogenesis of pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4482-9
- 80.- Lee JK, Song YS, Ha HS, et al. Endothelial progenitor cells in pterygium pathogenesis. *Eye* 2007;21:1186-93
- 81.- Hill JC, Maske R. Pathogenesis of pterygium. *Eye* 1989;3:218-26.
- 82.- Degrassi M, Piantanida A, Nucci P. Unexpected histological findings in pterygium. *Optom Vis Sci* 1993;70:1058-60.
- 83.- Avisar R, Arnon A, Avisar E. Primary pterygium recurrence time. *Isr Med Assoc J* 2001;3:836-7
- 84.- Marvovich A, Morad Y, Sandbank J. Angiogenesis in pterygium: Morphometric and immunohistochemical study. *Curr Eye Res* 2002;25:17-22.
- 85.- Tan D, Chee SP, Dear K, Lim AS. Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. *Arch Ophthalmol* 1997;115:1235-40
- 86.- Touhami A, Di Pascuale MA, Kawatika T, Del Valle M, Rosa RH Jr, Dubovy S *et al.* Characterisation of myofibroblasts in fibrovascular tissues of primary and recurrent pterygia. *Br J Ophthalmol* 2005;89:269-74
- 87.- Kria L, Ohira A, Amemiya T. Immunohistochemical localization of basic fibroblast growth factor, platelet derived growth factor, transforming growth factor and tumor necrosis factor in a primary pterygium. *Acta Histochem* 1996;98:195-201

- 88.- Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer and development. *Oncogene* 1999;18:7908-16.
- 89.- Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, Tsuneyoshi M. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J* 2004;18:300-10
- 90.- Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL. Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 1996;271:33157-60.
- 91.- Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:3336-40.
- 92.- Fujita H, Koshida K, Keller ET, Takahashi Y, Yoshimoto T, Namiki M, *et al.* Cyclooxygenase-2 promotes prostate cancer progression. *Prostate* 2002;53:232-40.
- 93.- Li G, Yang T, Yan J. Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;299:886-90.
- 94.- Singh B, Berry JA, Shoher A, Ramakrishnan V, Lucci A. COX-2 overexpression increases motility and invasion of breast cancer cells. *Int J Oncol* 2005;26:1393-9
- 95.- Tan DT, Lim AS, Goh HS, Smith DR. Abnormal expression of the p53 tumor suppressor gene in the conjunctiva of patients with pterygium. *Am J Ophthalmol* 1997;123:404-5
- 96.- Tan DT, Tang WY, Liu YP, Goh HS, Smith DR. Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000;84:212-6.
- 97.- Dushku N, John MK, Schultz GS, Reid TW. Pterygia pathogenesis: Corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol* 2001;119:695-706.
- 98.- Lee DH, Cho HJ, Kim JT, Choi JS, Joo CK. Expression of vascular endothelial growth factor and inducible nitric oxide synthase in pterygia. *Cornea* 2001;20:738-42.
- 99.- Chiang CC, Cheng YW, Lin CL, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, Tsai YY. Cyclooxygenase 2 expression in pterygium. *Mol Vis* 2007;13:635-8.
- 100.- Perra MT, Maxia C, Corbu A, Minerba L, Demurtas P, Colombari R, *et al.* Oxidative stress in pterygium: Relationship between p53 and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Mol Vis* 2006;12; 1136-42.
- 101.- Solomon AS. Pterygium. *Br J Ophthalmol* 2006;90:665-6.

- 102.- Sakoonwatanyoo P, Tan DT, Smith DR. Expression of p63 in pterygium and normal conjunctiva. *Cornea* 2004;23:67-70.
- 103.- Saw SM, Tan D. Pterygium: Prevalence, demography and risk factors. *Ophthalmic Epidemiol* 1999;6:219-28.
- 104.- Seifert P, Eckert J, Spitznas M. Topological-histological investigation of the pterygium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:288-93
- 105.- Hay ED. The mesenchymal cell, its role in the embryo, and the remarkable signaling mechanisms that create it. *Dev Dyn* 2005;233:706-20
- 106.- Zavadil J, Bottinger EP. TGF-beta and epithelial-to-mesenchymal transitions. *Oncogene* 2005;24:5764-7
- 107.- Kase S, Osaki M, Sato I, et al. Immunolocalisation of E-cadherin and beta-catenin in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2007; 91:1209-12
- 108.- Kato N, Shimmura S, Kawakita T, et al. Beta-catenin activation and epithelial-mesenchymal transition in the pathogenesis of pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48: 1511-7
- 109.- Strutz F, Zeisberg M, Ziyadeh FN , et al. Role of basic fibroblast growth factor-2 in epithelial-mesenchymal transformation. *Kidney Int* 2002;61:1714-28
- 110.- Hudson LG, Choi C, Newkirk KM, et al. Ultraviolet radiation stimulates expression of Snail family transcription factors in keratinocytes. *Mol Carcinog* 2007; 46:257-68
- 111.- Iwano M, Plieth D, Danoff TM, et al. Evidence that fibroblasts derive from epithelium during tissue fibrosis. *J Clin Invest* 2002;110:341-50
- 112.- Sevel D, Sealy R. Pterygia and carcinoma of the conjunctiva. *Trans Ophthalmol Soc U K* 1969;88:567-78
- 142.- Tan DT, Liu YP, Sun L. Flow cytometry measurements of DNA content in primary and recurrent pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:1684-6
- 113.- Tan DT, Tang WY, Liu YP, et al. Apoptosis and Bcl-2 related gene expression in normal conjunctiva and pterygium. *Br J Ophthalmol* 2000;84:212-6
- 114.- Tsironi S, Ioachim E, Macheria M, et al. Presence and possible significance of immunohistochemically demonstrable metallothionein expression in pterygium versus pinguecula and normal conjunctiva. *Eye* 2001;15(Pt 1):89-96
- 115.- Ueda Y, Kanazawa S, Kitaoka T, et al. Immunohistochemical study of p53, p21 and PCNA in pterygium. *Acta Histochem* 2001;103:159-65

- 116.- Kase S, Takahashi S, Sato I, et al. Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br J Ophthalmol* 2007;91:958-61
- 117.- Chen JK, Tsai RJ, Lin SS. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit transformed cell characteristics. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 1994;30A:243-8
- 118.- Solomon A, Grueterich M, Li DQ, et al. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 in pterygium body fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:573-80
- 119.- Wong YW, Chew J, Yang H, et al. Expression of insulin-like growth factor binding protein-3 in pterygium tissue. *Br J Ophthalmol* 2006;90:769-72
- 120.- Lee KW, Cohen P. Nuclear effects: unexpected intracellular actions of insulin-like growth factor binding protein-3. *J Endocrinol* 2002;175:33-40
- 121.- Peiretti E, Dessi S, Putzolu M, Fossarello M. Hyperexpression of low-density lipoprotein receptors and hydroxy-methylglutaryl- coenzyme A-reductase in human pinguecula and primary pterygium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004;45:3982-5
- 122.- Peiretti E, Dessi S, Mulas MF, et al. Fibroblasts isolated from human pterygia exhibit altered lipid metabolism characteristics. *Exp Eye Res* 2006;83:536-42
- 123.- Dushku N, Reid TW. P53 expression in altered limbal basal cells of pingueculae, pterygia, and limbal tumors. *Curr Eye Res* 1997;16:1179-92
- 124.- Spandidos DA, Sourvinos G, Kiaris H, Tsamparakis J. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in human pterygia. *Br J Ophthalmol* 1997;81:493-6
- 125.- Tsai YY, Cheng YW, Lee H, et al. P53 gene mutation spectrum and the relationship between gene mutation and protein levels in pterygium. *Mol Vis* 2005;11:50-5
- 126.- Detorakis ET, Zafiroopoulos A, Arvanitis DA, Spandidos DA. Detection of point mutations at codon 12 of KI-ras in ophthalmic pterygia. *Eye* 2005;19:210-4
- 127.- Chen PL, Cheng YW, Chiang CC, et al. Hypermethylation of the p16 gene promoter in pterygia and its association with the expression of DNA methyltransferase 3b. *Mol Vis* 2006;12:1411-6
- 128.- Detorakis ET, Sourvinos G, Tsamparakis J, Spandidos DA. Evaluation of loss of heterozygosity and microsatellite instability in human pterygium: clinical correlations. *Br J Ophthalmol* 1998;82:1324-8
- 129.- Schneider BG, Sahni D, Torres JC, et al. MLH 1 and MSH2 expression in pterygia. *Cornea* 2007;26:468-72

- 130.- Drouin R, Therrien JP. UVB-induced cyclobutane pyrimidine dimer frequency correlates with skin cancer mutational hotspots in p53. *Photochem Photobiol* 1997;66:719-26
- 131.- Tan DT, Lim AS, Goh HS, Smith DR. Abnormal expression of the p53 tumor suppressor gene in the conjunctiva of patients with pterygium. *Am J Ophthalmol* 1997;123:404-5
- 132.- Weinstein O, Rosenthal G, Zirkin H, et al. Overexpression of p53 tumor suppressor gene in pterygia. *Eye* 2002;16:619-21
- 133.- Onur C, Orhan D, Orhan M, et al. Expression of p53 protein in pterygium. *Eur J Ophthalmol* 1998;8:157-61
- 134.- Chowers I, Pe'er J, Zamir E, et al. Proliferative activity and p53 expression in primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology* 2001;108:985-8
- 135.- Barrett AJ. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods Enzymol* 1981; **80**: 771–8.
- 136.- Bostom AG, Dworkin LD. Cystatin C measurement: Improved detection of mild decrements in glomerular filtration rate versus creatinine-based estimates? *Am J Kidney Dis* 2000; **36**: 205–7.
- 137.- Deinum J, Derkx FH. Cystatin for estimation of glomerular filtration rate? *Lancet* 2000; **356**: 1624–5.
- 138.- Risch L, Huber AR. Assessing the diagnostic accuracy of cystatin C as a marker of impaired glomerular filtration rate. *Am J Kidney Dis* 2002; **39**: 661–2.
- 139.- Bobek LA, Levine MJ. Cystatins—inhibitors of cysteine proteinases. *Crit Rev Oral Biol Med* 1992; **3**: 307–32.
- 140.- Barrett AJ. The cystatins: small protein inhibitors of cysteine proteinases. *Prog Clin Biol Res* 1985; **180**: 105–16.
- 141.- Chen JM, Dando PM, Rawlings ND, Brown MA, Young NE, Stevens RA, Hewitt E, Watts C, Barrett AJ. Cloning, isolation, and characterization of mammalian legumain, an asparaginyl endopeptidase. *J Biol Chem* 1997; **272**: 8090–8.
- 142.- Sen LC, Whitaker JR. Some properties of a ficin-papain inhibitor from avian egg white. *Arch Biochem Biophys* 1973; **158**: 623–32.

- 143.- . Keilová H, Tomásek V. Effect of papain inhibitor from chicken egg white on cathepsin B1. *Biochim Biophys Acta* 1974; **334**: 179–86.
- 144.- Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, Isemura S, Jarvinen M, Katunuma N, Machleidt W, Muller-Esterl W, Sasaki M, Turk V. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J* 1986; **236**: 312.
- 145.- Barrett AJ. The cystatins: A diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta* 1986; **45**: 1363–74.
- 146.- Shaw PA, Cox JA, Barka T, Naito Y. Cloning and sequencing of cDNA encoding a rat salivary cysteine proteinase inhibitor inducible by beta-adrenergic agonists. *J Biol Chem* 1988; **236**: 18133–37.
- 147.- Rawlings ND, Barrett AJ. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J Mol Evol* 1990; **30**: 60–71.
- 148.- Dickinson DP. Salivary (sd-type) cystatins: Over one billion years in the making—but to what purpose? *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; **13**: 485–508.
- 149.- Brzin J, Kopitar M, Turk V, Machleidt W. Protein inhibitors of cysteine proteinases. Isolation and characterization of stefin, a cytosolic protein inhibitor of cysteine proteinases from human polymorphonuclear granulocytes. *Hoppe Seyler's Z Physiol Chem* 1983; **364**: 1475–80.
- 150.- Hsieh WT, Fong D, Sloane BF, Golembieski W, Smith DI. Mapping of the gene for human cysteine proteinase inhibitor stefin A, STF1, to chromosome 3cen-q21. *Genomics* 1991; **9**: 207–9.
- 160.- Takahashi H, Asano K, Kinouchi M, Ishida-Yamamoto A, Wuepper KD, Iizuka H. Structure and transcriptional regulation of the human cystatin A gene. The 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) responsive element-2 site (–272 to –278) on cystatin A gene is critical for TPA-dependent regulation. *J Biol Chem* 1998; **273**: 17375–80.
- 161.- Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991; **285**: 213–9.

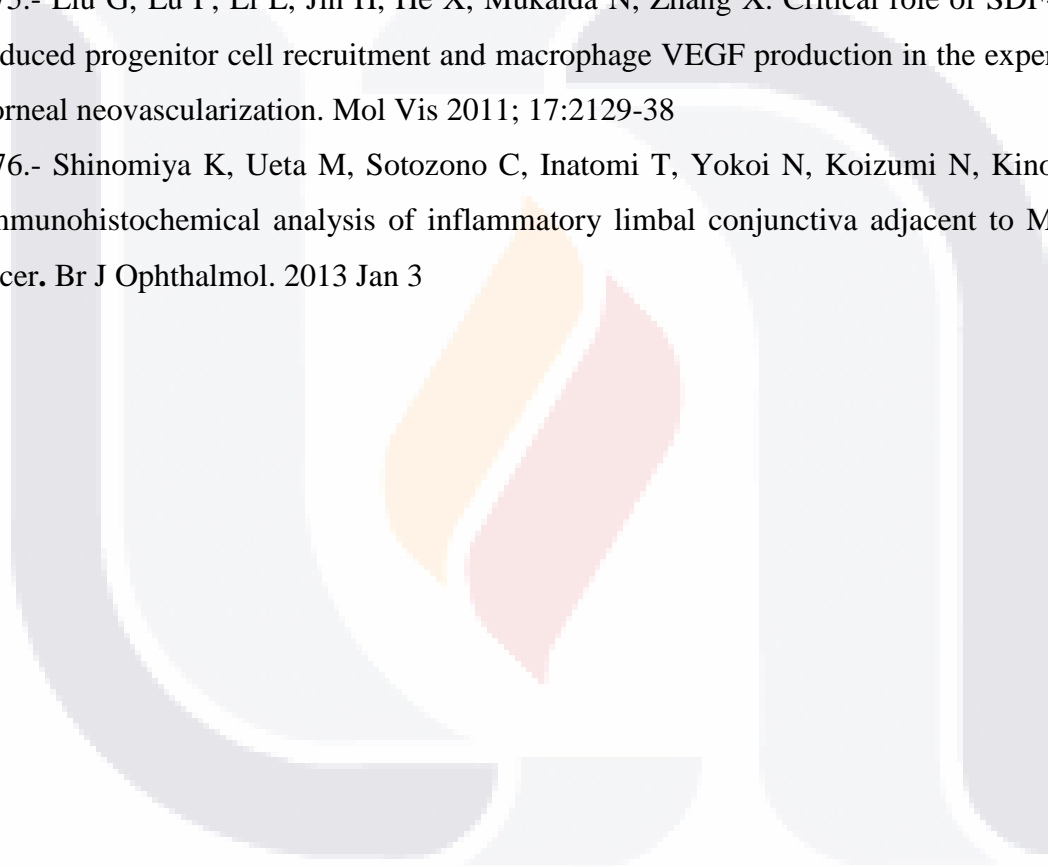
- 162.- Björklund HV, Johansson TR, Rinne A. Rhabdovirus-induced apoptosis in a fish cell line is inhibited by a human endogenous acid cysteine proteinase inhibitor. *J Virol* 1997; **71**: 5658–62.
- 163.- Bernalova IN, Pranzatelli M, Burmeister M. G to C transversion at a splice acceptor site causes exon skipping in the cystatin B gene. *Mutat Res* 1997; **382**: 67–74.
- 164.- Lalioti MD, Scott HS, Buresi C, Rossier C, Bottani A, Morris MA, Malafosse A, Antonarakis SE. Dodecamer repeat expansion in cystatin B gene in progressive myoclonus epilepsy. *Nature* 1997; **386**: 847–51.
- 165.- Virtaneva K, D'Amato E, Miao J, Koskiniemi M, Norio R, Avanzini G, Franceschetti S, Michelucci R, Tassinari CA, Omer S, Pennacchio LA, Myers RM, Dieguez-Lucena JL, Krahe R, de la Chapelle A, Lehesjoki AE. Unstable minisatellite expansion causing recessively inherited myoclonus epilepsy, EPM1. *Nat Genet* 1997; **15**: 393–6.
- 166.- Lehesjoki AE. Molecular background of progressive myoclonus epilepsy. *EMBO J* 2003; **22**: 3473–8.
- 167.- Freije JP, Abrahamson M, O'lafsson I, Velasco G, Grubb A, Lopez-Otin C. Structure and expression of the gene encoding cystatin D, a novel human cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1991; **266**: 20538–43.
- 168.- Ni J, Abrahamson M, Zhang M, Fernandez MA, Grubb A, Su J, Yu GL, Li Y, Parmelee D, Xing L, Coleman TA, Gentz S, Thotakura R, Nguyen N, Hesselberg M, Gentz R. Cystatin E is a novel human cysteine proteinase inhibitor with structural resemblance to family 2 cystatins. *J Biol Chem* 1997; **272**: 10853–8.
- 169.- Ni J, Fernandez MA, Danielsson L, Chillakuru RA, Zhang J, Grubb A, Su J, Gentz R, Abrahamson M. Cystatin F is a glycosylated human low molecular weight cysteine proteinase inhibitor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 24797–804.
- 170.- Tu GF, Aldred AR, Southwell BR, Schreiber G. Strong conservation of the expression of cystatin C gene in choroid plexus. *Am J Physiol* 1992; **263**: R195–200.
- 171.- Yamashita M, Konagaya S. Molecular cloning and gene expression of chum salmon cystatin. *J Biochem (Tokyo)* 1996; **120**: 483–7.
- 172.- Esnard F, Esnard A, Faucher D, Capony JP, Derancourt J, Brillard M, Gauthier F. Rat cystatin C: The complete amino acid sequence reveals a site for N-glycosylation. *Biol Chem Hoppe Seyler* 1990; **371**: 161–6.

173.- Isemura S, Saitoh E, Sanada K, Minakata K. Identification of full-sized forms of salivary (S-type) cystatins (Cystatin SN, cystatin SA, cystatin S, and two phosphorylated forms of cystatin S)

174.- Perra MT, Maxia C, Zucca I, Piras F, Sirigu P. Immunohistochemical study of human pterygium. *Histol Histopathol* 2002; 17:139-49., Golu T, Mogoantă L, Streba CT, Pirici DN, Mălăescu D, Mateescu GO, Muțiu G. Pterygium: histological and immunohistochemical aspects. *Rom J Morphol Embryol* 2011; 52:153-8.

175.- Liu G, Lu P, Li L, Jin H, He X, Mukaida N, Zhang X. Critical role of SDF-1alpha-induced progenitor cell recruitment and macrophage VEGF production in the experimental corneal neovascularization. *Mol Vis* 2011; 17:2129-38

176.- Shinomiya K, Ueta M, Sotozono C, Inatomi T, Yokoi N, Koizumi N, Kinoshita S, Immunohistochemical analysis of inflammatory limbal conjunctiva adjacent to Mooren s ulcer. *Br J Ophthalmol*. 2013 Jan 3



VIII. ANEXOS

ANEXO A

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

Título del protocolo: Fisiopatogenia del Pterigión

Investigador principal: Luis Fernando Barba

Sede donde se realizará el estudio: Universidad Autónoma de Aguascalientes

Nombre del paciente: _____

A usted se le está invitando a participar en este estudio de investigación médica. Antes de decidir si participa o no, debe conocer y comprender cada uno de los siguientes apartados. Este proceso se conoce como consentimiento informado. Siéntase con absoluta libertad para preguntar sobre cualquier aspecto que le ayude a aclarar sus dudas al respecto.

Una vez que haya comprendido el estudio y si usted desea participar, entonces se le pedirá que firme esta forma de consentimiento, de la cual se le entregará una copia firmada y fechada.

* Una vez que sea intervenido quirúrgicamente de la recesión del pterigión a la que usted ha aceptado ser operado, se tomará para su procesamiento un laboratorio.

1. JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO. Una población grande en México padece la presencia del pterigión, dicha enfermedad del segmento anterior del ojo es causada por varios factores entre ellos el más importante es la presencia de la luz UV, y una característica que hasta ahora no se ha podido erradicar al 100% la recurrencia, ya que un buen porcentaje que es operado vuelve a presentar la presencia de este pterigión.

2. OBJETIVO DEL ESTUDIO

A usted se le está invitando a participar en un estudio de investigación que tiene como objetivos

1. Generar conocimiento nuevo sobre el conducta genética, celular de los eventos que suceden en el pterigión

3. BENEFICIOS DEL ESTUDIO

La información generada en este estudio permitirá conocer más ampliamente la conducta del pterigión y con ello poder resolver su expresión y recurrencia

4. PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO

Una vez operado el paciente se usará el pterigión resecaado para procedimientos en el laboratorio de genética y de morfología

5. RIESGOS ASOCIADOS CON EL ESTUDIO

En este caso muy particular no hay riesgo para el paciente que no sea el de la cirugía, a la cual el paciente acude por convencimiento propio

6. ACLARACIONES Su decisión de participar en el estudio es completamente voluntaria. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee, -aun cuando el investigador responsable no se lo solicite-,

pudiendo informar o no, las razones de su decisión, la cual será respetada en su integridad. No tendrá que hacer gasto alguno durante el estudio. o recibirá pago por su participación. En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable. La información obtenida en este estudio, utilizada para la identificación de cada paciente, será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. En caso de que usted desarrolle algún efecto adverso secundario no previsto, tiene derecho a una indemnización, siempre que estos efectos sean consecuencia de su participación en el estudio. No en si por la cirugía

Si considera que no hay dudas ni preguntas acerca de su participación, puede, si así lo desea, firmar la Carta de Consentimiento Informado que forma parte de este documento.

7. CARTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Yo, _____ he leído y comprendido la información anterior y mis preguntas han sido respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados o difundidos con fines científicos. Convengo en participar en este estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta forma de consentimiento.

Firma del participante o del padre o tutor Fecha

Testigo 1 Fecha

Testigo 2 Fecha

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o su representante):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas en la medida de lo posible y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella.

Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Firma del investigador Fecha

8. CARTA DE REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Título del protocolo:

Investigador principal: _____

Sede donde se realizará el estudio: _____

Nombre del participante: _____

Por este conducto deseo informar mi decisión de retirarme de este protocolo de investigación por las siguientes razones: (Este apartado es opcional y puede dejarse en blanco si así lo desea el paciente)

_____.

Si el paciente así lo desea, podrá solicitar que le sea entregada toda la información que se haya recabado sobre él, con motivo de su participación en el presente estudio.

Firma del participante o del padre o tutor Fecha

Testigo Fecha

Testigo Fecha

c.c.p El paciente.

(Se deberá elaborar por duplicado quedando una copia en poder del paciente)

ANEXO B

1.- Procedimiento de extracción de RT-PCR

La RT-PCR se realizó en dos fases:

Fase 1:

- 1) 2 µg de RNA total
- 2) 0.5 µl de hexámeros (100 mM)
- 3) Agua libre de RNAsas (hasta completar un volumen de la reacción de 20.0 µl)

Se uso la misma cantidad de RNA en esta reacción por cada muestra.

- a. Se mezcló el contenido gentilmente con una pipeta seguida por una breve centrifugación.
- b. Se Incubó a 42 °C por 5 min.
- c. Se enfrió sobre el hielo inmediatamente por al menos 1 minuto.

Fase 2:

- 1) 4.0 µl de solución amortiguadora 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8.3 KCl 375 mM y MgCl₂ 15mM)
- 2) 1.0 µl de mezcla de dinucleótidos trifosfato (dNTP's) [10 nM de adenina trifosfato, (dATP), citosina trifosfato (dCTP), guanina trifosfato (dGTP) y timina trifosfato (dTTP), con NaOH 10 mM pH 7.0]
- 3) 1.0 µl (200 U/ µl) de la transcriptasa reversa (Invitrogen™ Life Technologies)
- 4) 0.4 µl de detergente ditiotreitól (DTT) 0.1 M como inhibidor RNAasa

Las condiciones de ciclado para cada uno de los pares de oligos empleados se muestra en la siguiente tabla:

β-Actina		Condiciones de Ciclado					
Forward	AGT GTG ACA TGG TGC ATC TC	Temperatura	96°C	96°C	58°C	72°C	40X
Reverse	TGC CCT GAG GCA CTC TTC CAG	Tiempo	5'(1X)	10"	30"	30"	Ciclos
β-Globina		Condiciones de Ciclado					
Forward	CAA CTT CAT CCA CGT TCA ACC	Temperatura	95°C	95°C	55°C	72°C	40X
Reverse	GAA GAC CCA AGG ACA GGT AC	Tiempo	4'(1X)	1'	30"	30"	Ciclos
Cistatina C Humana		Condiciones de Ciclado					
Forward	GCGGCGTGCACTGGACTTTG	Temperatura	95°C	95°C	55°C	72°C	40X
Reverse	GCCGCCTGCTGCCTTCTCTG	Tiempo	4'(1X)	1'	30"	30"	Ciclos

Materiales para la preparación del Gel para Electroforesis

Materiales y reactivos.

- Agarosa 0,8% en tampón TAE 1X
- Tampón TAE 1X (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM).
- Tampón de carga III 6X. (azul de bromofenol 0,25% p/v; cilenol 0,25% p/v; Glicerol 30% v/v)
- Bromuro de etidio 0.5 µg.mL⁻¹
- Agua destilada
- Cámara de electroforesis horizontal/Fuente de poder
- Peines, moldes y bandeja para la preparación de geles
- Balanza
- Horno microondas
- Fiola de 125 mL
- Bandeja para tinción
- Cilindros graduados de 100 y 500 mL
- Papel Parafilm
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas 20-200 µL
- Agujas de inyectadotas
- Transiluminador UV/sistema de fotodocumentación
- Guantes desechables

ANEXO C

Materiales y procedimiento para Inmunohistoquímica – Dab En Cortes De Parafina

Preparación De Reactivos Suero.

Descongelar el suero stock y hacer alícuotas de 1ml/ependorf. Almacenarlas a -20°C hasta su uso. Una vez que se descongele la alícuota guardarla a 4°C.

PBS 10x

Reactivos	
KH ₂ PO ₄ 0.02 M	2.72 gr
Na ₂ HPO ₄ 0.08M	11.3 gr
NaCl 1.54 M	180 gr
Agua destilada	1 lt

Ajustar el pH = 7.4 y almacenar a temperatura ambiente

PBS 1x

100 ml PBS 10x

900 ml de agua destilada

Almacenar en refrigeración

Buffer de Citratos 10x

Acido cítrico monohidratado 0.1 M 1.9gr/90 ml de agua

Citrato de sodio tribásico dihidratado 0.1 M 12.05 gr/410 ml agua

Disolver por separado cada solución y entonces agregar el ácido cítrico al citrato de sodio hasta ajustar el pH = 6. Almacenar la solución en una botella oscura. No usar después de un mes de preparada.

Ajustar el pH con ácido cítrico 1% (0.4 gr/40 ml) o NaOH 10M

BUFFER DE CITRATOS 1x

100 ml de buffer de citratos 10x

900 ml de agua pH = 6

1. Desparafinizar

Xileno (2 veces/7 min.)

Etanol 100% (2 veces /7 min.)

Etanol 96% (1 vez /15 min.)

Etanol 70% (1 vez /5 min.)

Enjuagar con agua corriente durante 5 min

2. Desenmascaramiento de epítomos

Se colocó dentro de la olla de 1.5 lt de buffer de citrato de sodio y se puso a calentar. Dejando que la presión de la olla suba a lo máximo, en seguida se apagó la olla hasta que se enfrió para poder abrir la tapa. Posteriormente se introdujo las laminillas (en un portalaminillas de metal) dentro de la olla, procurando que queden completamente cubiertas por el buffer. Nuevamente se encendió la olla y una vez que salió el vapor por la válvula se dejó dos minutos, después se apagó y se dejan las laminillas reposar dentro del buffer 15 minutos. A continuación se pasan las laminillas a PBS

3. Lavar con PBS (3 veces/5 min)

4. Inactivación de las peroxidases endógenas

Las laminillas se colocaron en una solución de metanol-H₂O₂ al 10% durante 30 minutos a temperatura ambiente

5. Se lavó con PBS (3 veces/5 min)

6. Alrededor del tejido de interés se marcó círculos con el pen PAP

7. Permeabilización de la membrana

Lavar con PBS–Tritón X-100 0.2% (1 vez/30 min)

8. Bloqueo de uniones inespecíficas

Se incubó las laminillas 1 hora a temperatura ambiente con Suero Fetal de Bovino 20% en PBS–Tritón X-100 0.2%

9. Primer anticuerpo

Se incubó el primer anticuerpo hecho en conejo policlonal a Cistatina. (ab7653) Abcam durante toda la noche en cámara húmeda.

El anticuerpo se diluyó en PBS–Tritón X-100 0.2%-BSA 3%

10. Lavar con PBS–Tritón X-100 0.2% (3 veces/5 min)

11. Segundo anticuerpo

Incubar con anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo hecho en cabra conjugado con peroxidasa (HRP) durante 2 horas a temperatura ambiente en cámara húmeda

12. Lavar con PBS (3 veces/5 min)
13. Incubar con DAB (diluido 1:10 con buffer) hasta que se desarrolle el color.

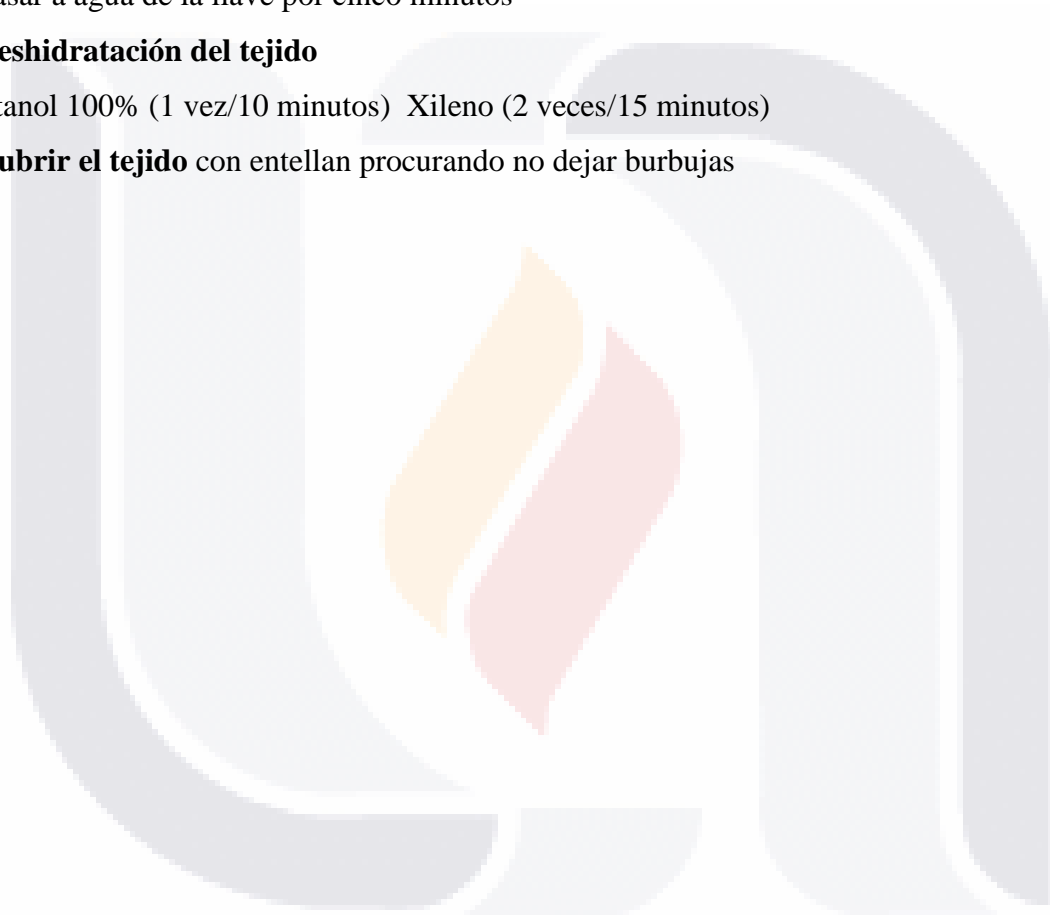
Los restos de DAB inactivarlos en una solución clorada

14. Lavar con PBS (3 veces/5 min)
15. Pasar a agua destilada por 5 minutos
16. Contrastar con hematoxilina durante 1 minuto
17. Pasar a agua de la llave por cinco minutos

18. Deshidratación del tejido

Etanol 100% (1 vez/10 minutos) Xileno (2 veces/15 minutos)

19. **Cubrir el tejido** con entellan procurando no dejar burbujas



ANEXO D

Materiales Biológico y Procedimieneto Para Microscopia Electrónica De Transmisión

Equipos.-

- ❑ Microscopio electrónico de transmisión.
- ❑ Ultramicrotomo con mesa antivibratoria.
- ❑ Cuchilla de diamante.
- ❑ Máquina para confeccionar cuchillas de vidrio.
- ❑ Microscopio óptico.
- ❑ Horno de microondas.

Los fijadores más usados en MET son el glutaraldehído, paraformaldehído, ácido pícrico y tetróxio de osmio; es común que se usen mezclas para combinar sus propiedades de penetración y poder de fijación.

En esta práctica se emplearon tejidos de hígado e intestino cortados en bloques cúbicos de 1 mm de lado.

1. **Fijación:**

- a. Se fija en Glutaraldehído al 2.5%, Paraformaldehído 2% en PBS 0.1M durante 2 horas (1hr a Temp. ambiente y 1hr a 4 grados) en agitación. Enjuagar dos veces con buffer PBS 1X, 10 minutos a temperatura ambiente.

2. **Deshidratación:**

Deshidratar durante 15 min en cada alcohol (en frío y en agitación) 50,60,70,80,90 y 100%

3. **Infiltración:**

- Preincluir 2 hrs. en resina Lr-White-alcohol 1:1 en frío y en agitación.
- Cambio de resina 2:1 alcohol y dejar en frío y en agitación toda la noche
- Cambio de resina 3:1 alcohol y dejar en agitación en frío unas 4-6 hrs
- Cambio a resina pura toda la noche a 4 grados
- Inclusión final en tubos Eppendorf y dejar polimerizar mín. 24 hrs a 56 grados.

4. **CORTE**

- a. Realizar pirámide en el bloque
- b. Cortes Semifinos a 400 micras para buscar área
- c. Teñir con azul de toluidina

- d. Observar a microscopio de luz y elegir área
- e. Realizar pirámide para corte fino
- f. Realizar cortes de color plateado (80 nm)
- g. Montar los cortes sobre rejillas de niquel

5.- Técnica de tinción inmuno-oro:

- 1.-Las rejillas de Niquel con los cortes de 80 nm se incuban con PBS-ASB-1% 45 min.
- 2.- Incubación 1er anticuerpo diluído 1:100 en PBS+ASB 1% 2 H a 37°C.
- 3.- Lavado con PBS + ASB 1% 10 veces
- 4.- Incubación con segundo anticuerpo marcado con oro coloidal 20 nm. 1hr 37 °C 30 min TA.
- 5.- Lavado con PBS-ASB 1% 10 veces
- 6.- Fijación con glutaraldehído 1% 15 min
- 7.- Lavado con agua bidestilada y filtrada
- 8.- Contrastación con uranilo y plomo

5. CONTRASTE

- a. Acetato de Uranilo al 5% 20 min
- b. Lavados en agua destilada
- c. Citrato de plomo 1 min
- d. Lavar en agua destilada

SOLUCIONES Y REACTIVOS.-

Solución de buffer

- A. Fosfato de sodio monobásico 2.7598 gr aforar a 100 ml con agua bidestilada.
- B. Fosfato de sodio dibásico 2.8892 gr. Aforar a 100 ml con agua bidestilada.

Solución de Trabajo.-

- A. Solución A 19 ml
- B. Solución B 81 ml

C. pH de 7.4 y aforar a 200 ml con agua bidestilada, conservar en refrigeración a 4°C.

CACODILATO DE SODIO 0.2M pH 7.4

21.4 gr de cacodilato de sodio se disuelve en 300 ml de agua, se ajusta el pH a 7.4 se puede ajustar con hidroxido de sodio 0.1 N ó con acido clorhídrico 0.1N y aforar a 500 ml con agua bidestilada.

Para transformarla a 0.1M aforar a 1000 ml de agua bidestilada

RESINA LR-WHITE

AZUL DE TOLUIDINA

- a. Borato de sodio (borax) 1 gr.
- b. Azul de toluidina 0.5 gr.
- c. Agua destilada 100 ml.

Calentar el agua, disolver el borax, añadir el azul de toluidina poco a poco agitando y dejar hervir media hora.

Enfriar y filtrar.

ACETATO DE URANILO DE 1 AL 5%

- i. Acetato de uranilo 1g
- ii. Agua bidestilada 100 ml
(conservar en frasco ámbar a 4°C.)

CITRATO DE PLOMO

125 mg de citrato de plomo se disuelven en una solución de hidroxido de sodio 1N y se afora a 50 ml con agua destilada.

Ultramicotomo

Microscopio Electrónico de Transmisión

ANEXO E

CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE BRADFORD

1. Rango 10-200 $\mu\text{g/ml}$: Mezclar 1 ml del reactivo de Bradford con 0.1 ml de la muestra. Agitar y esperar al menos 2 min. Leer en espectrofotómetro a 590 nm. Comparar lectura con curva patrón.
2. Rango 1-10 $\mu\text{g/ml}$: Mezclar 1 ml del reactivo de Bradford con 0.5 ml de la muestra. Agitar y esperar al menos 2 min. Leer en espectrofotómetro a 590 nm. Comparar lectura con curva patrón.
3. Rango 100-1000 $\mu\text{g/ml}$: Mezclar 5 ml del reactivo de Bradford con 0.1 ml de la muestra. Agitar y esperar al menos 2 min. Leer en espectrofotómetro a 590 nm. Comparar lectura con curva patrón.

Preparación del reactivo de Bradford:

Disolver 100 mg de Azul de Coomassie G250 en 50 ml de etanol. Añadir 100 ml de ac. fosfórico y diluir con agua destilada hasta 1 litro.

Curva patrón de 10-200 $\mu\text{g/ml}$ de proteína:

Preparar una solución de 1 mg/ml de seroalbúmina bovina en NaCl 0.9% o en la solución en que se encuentre la proteína problema. Hacer las siguientes diluciones:

Dilución	Proteína μl	Solución μl	Conc. final $\mu\text{g/ml}$
1	10	990	10
2	50	950	50
3	100	900	100
4	150	850	150
5	200	800	200

ANEXO F

Técnica de Elisa para Cistatina C en lágrima

- 1.- Se forró la columna de pozos 3 con suero de paciente con insuficiencia renal diluído 1:5000; la columna 4 con suero diluido 1:10000 (testigos positivos); las columnas 5 a 8 con lágrima de pterigión (problemas) y columnas 9 y 12 col lágrimas de sanos y testigos negativos (agua destilada) 50 μ l y 50 μ l de solución carbonatos/ bicarbonatos (50ml. de agua destilada+0.0795gr. de Carbonato de Sodio+0.1465gr. de Bicarbonato de Sodio); (40 μ l. de Ag.+ 5 ml. de solución) incubar toda la noche en refrigeración
 - 2.- Lavó 3 veces con PBS-Tween.
 - 3.- Se Incubó con ASB (Albúmina Sérica Bovina) al 1% (0.05 gr. ABS+ 5 ml. de PBS 1X)por 45 min. a 37°C, después dejar la placa 15 min. a Temperatura Ambiente.
 - 4.- Lavó 3 veces con PBS- Tween.
 - 5.- Incubar con el anticuerpo Cistatina diluído 1:1000 en todos los pozos excepto los de la columna 1 y 2 1.30 hr. a 37°C y 15 min. a Temperatura Ambiente. Bajo el siguiente esquema se harán las diluciones:
- 1:1000 (1 μ l. suero + 999 μ l. PBS1X)
1:5000 (300 μ l. suero + 1200 μ l. PBS1X)
1:10000 (500 μ l. suero + 500 μ l. PBS1X)

Tabla 3. Relación de uso de los pozos en ELISA para pterigiones y conjuntivas sanas

		Control Positivo Suero Insuficiencia Renal		Lágrima Pacientes Pterigion		Lágrima Pacientes Pterigion						
Blancos		1:5,000	1:10,000	1:1	1:1	1:1	1:1	Lágrima Sanos 1:1	1:1			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A					P 1	Pa 3	P 6	Pa 10	Sano 1		Sano 5	Sano 7
B					P 1	Pa 4	Pa 6	Pa 10	Sano 1			
C					Pa 1	Pa 4	Pa 7	Pa 10	Sano 2		Sano 6	Sano 8
D					Pa 2	Pa 4	Pa 7	Pa 11	Sano 2			
E					Pa 2	Pa 5	Pa 7	Pa 11	Sano 3		Control Negativo	Control Negativo
F					P 2	Pa 5	Pa 8	Pa 11	Sano 3		Control Negativo	Control Negativo
G					Pa 3	Pa 5	Pa 8	Pa 12	Sano 4		Control Negativo	Control Negativo
H					Pa 3	Pa 6	Pa 9	Pa 12			Control Negativo	Control Negativo

6.- Lavar 3 veces con PBS-Tween.

7.- Incubar con el anticuerpo cabra α IgG de conejo-PO en dilución 1:2000 (5 μ l. de Ab +10 ml de PBS) durante 1 hr. a 37°C y 15 min. a Temperatura Ambiente.

8.- Lavar 3 veces con PBS-Tween.

9.- Revelar con Ortofenildiamina mediante la siguiente solución: (Acido cítrico 2.43ml. + Fosfato Dibásico de Sodio 2.57ml. + Agua Destilada 5ml. + 0.004gr. de Ortofenildiamina + 4 μ l. H₂O₂ al 30%. Detener el revelado con 20 μ l. de H₂SO₄ en cada pozo).

ANEXO G

ELECTROFORESIS (SDS- PAGE) WESTERN BLOT

- 1.- Colocar el cristal delgado sobre el cristal grueso (del lado de la ranura)
- 2.- Deslizar los dos cristales sobre el soporte (color verde); hacerlo sobre una superficie plana
- 3.- Presionar las pinzas del soporte para ajustar los cristales
- 4.- Montar el complejo soporte- cristales sobre el estante transparente. No olvidar colocar la esponja sobre la que se montara el complejo soporte- cristales para polimerizar el gel.
- 5.- Una vez polimerizado el gel, sacar los cristales del soporte verde, con cuidado.
- 6.- Ensamblarlo en el soporte de electrodos (ranura del cristal grueso debe coincidir con la ranura del empaque de soporte de electrodos)
- 7.- Colocar el soporte de electrodos y los cristales con el gel polimerizado sobre una cámara de presión (tiene pinzas que hay que cerrar con cuidado.)
- 8.- Preparar el resolving gel (gel separador)

Tabla 4. Porcentajes empleados de acrilamida

Contenido	13.5%	16%
AGUA DESTILADA	2.85ml	2.05ml
LOWER BUFFER	2.5ml	2.5ml
ACRILAMIDA	4.5ml	5.3ml
APS 10%	50 μ l	50 μ l
TEMED	10 μ l	5 μ l
TOTAL	10ml	10ml

- 9.- Introducir el gel, entre los cristales con ayuda de una pipeta Pasteur y con cuidado de que no queden burbujas. Se llenaran hasta la señal marcada anteriormente.
- 10.- Añadir con una pipeta pauster agua destilada, de manera que se vea una pequeña separación entre el gel y el agua.
- 11.- Esperar a que polimerice alrededor de una hora
- 12.- Una vez polimerizado se voltea el aparato para eliminar el agua y secar con cuidado de no distorsionar el gel, el resto que quede con el papel filtro.
- 13.- Preparar el stacking gel: (gel concentrador).

Tabla 5. Equivalencias para elaboración de un gel al 13.5%

Agua Bidestilada	3.5 ml
Upper Buffer	5 ml
Acrilamida	1.3 ml
Aps	50 µl
Temed	10 µl
Total	10 µl

14.- Agregar el stacking gel y colocar el peine, con cuidado de no hacer burbujas, por un lado del peine.

15.- Dejar que polimerice alrededor de media hora

16.- Mientras se preparan las muestras, se cargan de 100 a 50 µg de proteína de muestra dependiendo de lo que se requiera y se completa el volumen a 30 µl con sample buffer, tratando siempre que el volumen mínimo de sample buffer sea la tercera parte del volumen total

17.- Una vez polimerizado el gel, se retira el peine con cuidado y se saca a presión, se montan los cristales en el otro aparato, que se introduzcan en la cubeta para que corran las muestras

18.- Preparar el electrodo buffer:

200ml del electrodo buffer 5X----- 60ml
 800ml de agua destilada----- 240ml

19.- Llenar la cubeta con el electrodo buffer

20.- Colocar con cuidado las muestras en los pocillos

21.- Aplicar los electrodos correctamente y correr las muestras. 80V durante 1.5 horas

22.- Mientras corren las proteínas preparamos el **western blot** buffer (buffer de transferencia)

TRIS BASE----- 3 gr
 GLICINA----- 14 gr
 AGUA----- 833ml
 METANOL----- 167ml

23.- Una vez corridas las muestras paramos el aparato, desmontamos los cristales y el gel lo introducimos en el buffer de transferencia mientras que cortamos dos trozos de papel filtro y un trozo de membrana.

24.- Introducir la membrana, previamente señalizada en metanol, la escurrimos un poco y la introducimos en el western blot buffer.

25.- Montar el sándwich de la siguiente manera (de la parte negra a la roja- blanca)

Esponja (mojada en el buffer)

Papel filtro (mojado)

Gel

Membrana

Papel filtro

Esponja

Se irán eliminando las burbujas que quedan con un tubo de ensaye, pasándolo con cuidado por encima de la membrana.

26.- Se coloca el sándwich dentro del aparato correspondiente (parte negra con negra y roja con roja)

27.- Terminar de llenar la cubeta con el resto del buffer. Guardar un poco del buffer para introducir la membrana al día siguiente antes de ponerla a secar

28.- Colocar dentro de la cubeta un agitador magnético y ponerlo a funcionar para que no se caliente demasiado el gel.

29.- Ponerlo a transferir toda la noche a 12mAmp o a 100mAmp si queremos que termine en unas dos horas. En el caso de ser proteína de alto peso molecular es preferible dejarlo toda la noche.

30.- Las proteínas como están cargadas negativamente se transferirán del polo negro al rojo.

31.- Al día siguiente se desmonta el sándwich, se introduce la membrana en el resto del buffer del día anterior y se pone a secar para su posterior revelado.

ANEXO H.

INMUNOTINCION DE BLOT

- 1.- Bañar la hoja de nitrocelulosa a revelar en metanol al 100%
- 2.- Sumergir la hoja de nitrocelulosa en solución de leche en polvo 5% en TBS por una hora en agitación a TA
- 3.- Transferir la hoja al primer anticuerpo, preparado previamente en leche en polvo al 5%. Durante 24 horas de incubación en agitación a 4°C.
- 4.- Lavar con agua destilada una vez 5min
- 5.- Lavar dos veces con TTBS por 10min cada vez
- 6.- Lavar con TBS una vez por 5min
- 7.- Incubar con el segundo anticuerpo preparado en TBS mas leche en polvo 5% durante 2 horas en agitación a TA
- 8.- Lavar con TTBS dos veces (15 min) y 5 lavados de 5 minutos cada uno.
- 9.- Enjuague en TBS POR 5 min
- 10.- El revelado se realizo con fosfatasa alcalina tomando una pastilla de fosfatasa atemperada por 15min y disolver en 10ml de agua destilada (cubrir de la luz).
- 11.- Detener la reaccion después de 10min. Lavar con agua destilada
- 12.- Secar entre las dos hojas de papel filtro.

ANEXO I.

CARTA DE ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO

Your manuscript is acceptable for publication in principle.

miércoles, febrero 20, 2013, 10:58 pm

De: "BioMed Central Editorial" <editorial@biomedcentral.com>

[Añadir remitente a Contactos](#)

A: "Dr Luis Fernando Barba Gallardo" <barbaluis@yahoo.com>

Authors: Luis F Barba Gallardo, Javier Ventura Juarez, David Kershenobich Stalnikowitz, Rafael Gutierrez Campos, Eugenia Torres Bernal and Luis F Torres Bernal

Title : Over-expression of Human Cystatin C in Pterygium Versus Healthy Conjunctiva

Journal: BMC Ophthalmology

MS : 1136800883809577

Dear Dr Barba Gallardo,

Peer review of your manuscript (above) is now complete, and we are delighted, in principle, **to accept the manuscript for publication in BMC Ophthalmology**. The reviews are accessible in PDF format via the web links provided at the bottom of this email. Do let us know if you have any problems opening the files.

However before acceptance, our editorial production team needs to check the format of your manuscript, to ensure that it conforms to the standards of the journal. They will get in touch with you shortly to request any necessary changes or to confirm that none are needed.

If you have any problems or questions regarding your manuscript, please do get in touch.

Best wishes,

The BioMed Central Editorial Team

e-mail: editorial@biomedcentral.com

Web: <http://www.biomedcentral.com/>