



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES**

CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS

**EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE FACTORES
ANGIOGÉNICOS DE CULTIVO CELULAR DE PTERIGIÓN, POSTERIOR A LA
APLICACIÓN DE DOXICICLINA Y PROPRANOLOL.**

PRESENTA

Ivan Delgado Alvarado

para obtener el grado de maestría en investigación biomédica.

Integrantes del comité tutorial

Dra. Raquel Guerrero Alba

Dr. Luis Fernando Barba Gallardo

MCO. Elizabeth Casillas Casillas

Aguascalientes, México, Septiembre 2022

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORAL

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

PRESENTE

Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado del estudiante **IVAN DELGADO ALVARADO** con ID 232067 quien realizó la tesis titulado: **EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE FACTORES ANGIOGÉNICOS DE CULTIVO CELULAR DE PTERIGIÓN, POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE DOXICICLINA Y PROPRANOLOL**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que *él* pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 07 de septiembre de 2022.


Dr. Luis Fernando Barba Gallardo
Tutor de tesis


Dra. Raquel Guerrero-Alba
Co-Tutor de tesis


MCO. Elizabeth Casillas Casillas
Asesor de tesis

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

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

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



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



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 07/09/2022

NOMBRE: IVÁN DELGADO ALVARADO ID: 232067

PROGRAMA: Maestría en Investigación Biomédica LGAC (del posgrado): Biomedicina Molecular y Celular.

TIPO DE TRABAJO: () Tesis () Trabajo Práctico
 EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE FACTORES ANGIOGÉNICOS DE CULTIVO CELULAR DE PTERIGIÓN, POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE DOXICICLINA Y PROPRANOLOL.

TÍTULO: EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN GENÉTICA DE FACTORES ANGIOGÉNICOS DE CULTIVO CELULAR DE PTERIGIÓN, POSTERIOR A LA APLICACIÓN DE DOXICICLINA Y PROPRANOLOL.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Este proyecto de investigación tiene el objetivo de identificar la función de propranolol y la doxiciclina en la actividad angiogénica del cultivo de pterigión.

INDICAR SI NO N.A. (NO APLICA) SEGÚN CORRESPONDA:

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

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

SI
 No

Elaboró:

FIRMAS

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

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO

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

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. RICARDO ERNESTO RAMÍREZ OROZCO

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO

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

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

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

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

10-Aug-2022

Dear Dr. Barba-Gallardo:

Your manuscript entitled "Inhibitory effects of doxycycline and propranolol on cell viability and VEGF and MMP-2 expression in primary culture of pterygium" has been successfully submitted online and is presently being given full consideration for publication in European Journal of Ophthalmology.

Your manuscript ID is EJO-22-1346.

You have listed the following individuals as authors of this manuscript:

Delgado-Alvarado, Ivan ; Barrios-Garcia, Tonatiuh; Casillas-Casillas, Elizabeth ; Valdez-Morales, Eduardo; Barragan-Iglesias, Paulino; Hernández-Mercado, Alicia; Guerrero-Alba, Raquel ; Barba-Gallardo, Luis

Please mention the above manuscript ID in all future correspondence or when calling the office for questions. If there are any changes in your street address or e-mail address, please log in to ScholarOne Manuscripts at <https://mc.manuscriptcentral.com/ej-ophthalmology>, and edit your user information as appropriate.

You can also view the status of your manuscript at any time by checking your Author Center after logging in to <https://mc.manuscriptcentral.com/ej-ophthalmology>.

As part of our commitment to ensuring an ethical, transparent and fair peer review process SAGE is a supporting member of ORCID, the Open Researcher and Contributor ID (<https://orcid.org/>). We encourage all authors and co-authors to use ORCID iDs during the peer review process. If you have not already logged in to your account on this journal's ScholarOne Manuscripts submission site in order to update your account information and provide your ORCID identifier, we recommend that you do so at this time by logging in and editing your account information. In the event that your manuscript is accepted, only ORCID iDs validated within your account prior to acceptance will be considered for publication alongside your name in the published paper as we cannot add ORCID iDs during the Production steps. If you do not already have an ORCID iD you may login to your ScholarOne account to create your unique identifier and automatically add it to your profile.



Agradecimientos

Gracias al CONACYT por la beca que me permitió continuar con el estudio de la maestría en la ciudad de Aguascalientes. Gracias a la UAA por sus instalaciones e infraestructura que me sirvió en muchos aspectos.

Infinitamente agradecido con la labor de la Dra. Raquel Guerrero y siempre apoyarme incondicionalmente. Al Dr. Tonatiuh Barrios por enseñarme a hacer muchas técnicas y por la paciencia que me tuvo siempre. Gracias al Dr. Eduardo Valdez por el apoyo y asesorías que me brindo. Gracias a la MCO. Elizabeth Casillas por tratar de entenderme y gracias al Dr. Barba por mostrarme como se debe trabajar.

Agradezco infinitamente a mis padres Manuel y Verónica por no apartarme nunca de sus oraciones. A mi familia en general por brindarme apoyo que siempre lo necesite; a mi Tía Martha por apoyarme siempre en Aguascalientes y por preocuparse por mí.

Gracias al Dr. Bizueto que ayudo a conseguir algunos tejidos de pterigión fresco se pudo realizar la mayoría de los cultivos celulares

Infinitamente estaré agradecido por siempre con mi amiga, mi confidente, mi pareja que me ha apoyado y he intentado hacer lo mismo por ella, que a pesar de todas las dificultades que hemos atravesado hemos podido seguir; Gracias Liliana Cano.

Índice

Resumen.....	5
I. Introducción	7
II. Marco teórico.....	9
II.1 El sistema visual.....	9
II.2 Pterigión	11
II.3 Epidemiología del Pterigión	12
II.4 Etiología y fisiopatología del pterigión.....	13
II.5 Histopatología	16
II.6 Tratamientos del pterigión.....	17
II.7 Generalidades del cultivo celular	18
II.8 Modelo experimental del pterigión	18
II.9 Doxiciclina	19
II.10 Propranolol.....	22
III. Planteamiento del problema.....	24
IV. Justificación.....	26
IV. Objetivos	27
IV.1 Objetivo general.....	27
IV.2 Objetivos específicos.....	27
V. Hipótesis.....	28
VI. Metodología.....	29
VI.1 Descripciones de la metodología	29
VI.2 Técnicas y procedimientos.....	31
VII. Resultados	36
VII.1 Morfología del cultivo celular	36
VII. 2. La doxiciclina y el propranolol mostraron una potente actividad citotóxica en células de pterigión humano cultivadas.....	36
VII.3. La doxiciclina y el propranolol disminuyeron la expresión de ARNm de VEGF y MMP-2 en células de pterigión de humano.....	38
VII.4. La doxiciclina y el propranolol no afectan la actividad de la MMP-2	38
VIII. Discusión.....	42

IX. Conclusión 45
X. Referencias 46
XI. ANEXO 62



Índice de figuras

Figura 1. Imagen que ejemplifica el ojo con las divisiones mencionadas (25). 10

Figura 2. Representación de pterigión a través de la conjuntiva que llega a la córnea. 11

Figura 3. Roles potenciales de la luz UV en la patogénesis del pterigión.. 14

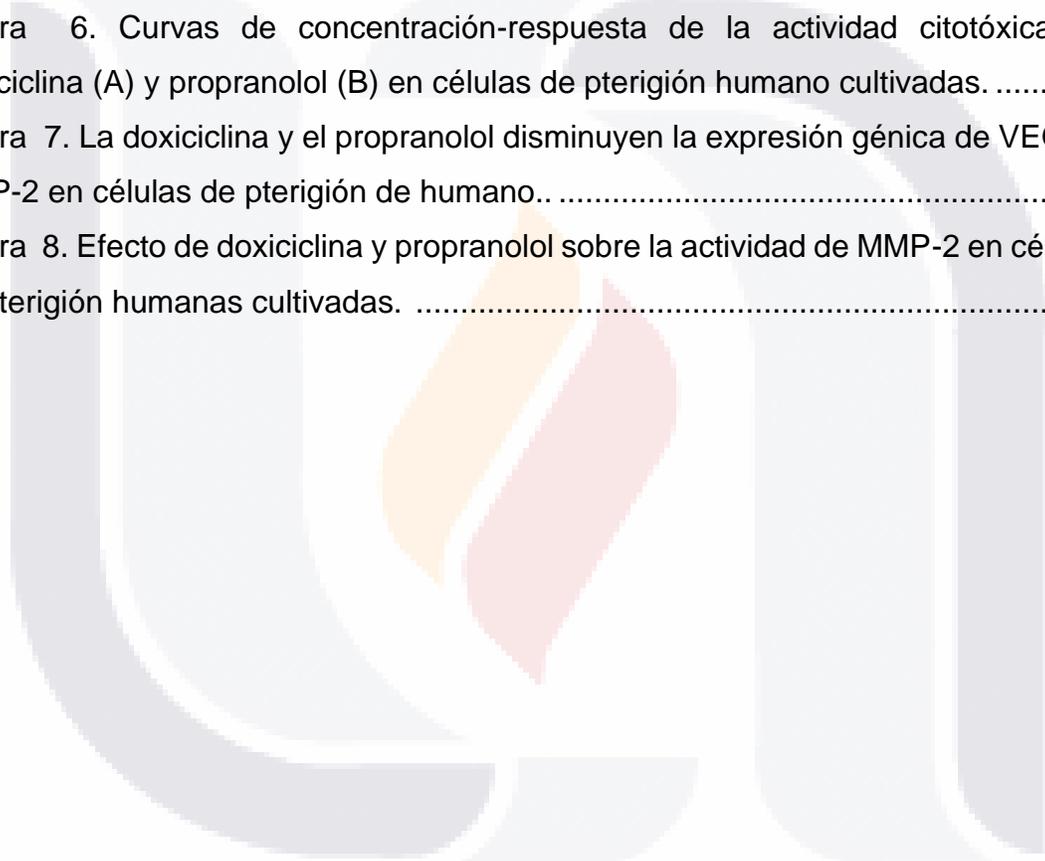
Figura 4. Caja de 6 pozos, enfocado solo en un para observar el tejido fragmentado. 32

Figura 5. Observación de células de pterigión de la muestra de un paciente. 36

Figura 6. Curvas de concentración-respuesta de la actividad citotóxica de doxiciclina (A) y propranolol (B) en células de pterigión humano cultivadas. 37

Figura 7. La doxiciclina y el propranolol disminuyen la expresión génica de VEGF y MMP-2 en células de pterigión de humano.. 40

Figura 8. Efecto de doxiciclina y propranolol sobre la actividad de MMP-2 en células de pterigión humanas cultivadas. 41



Índice de tablas

Tabla 1 de variables del estudio..... 29
Tabla 2. Datos de pacientes relevantes como su oficio y algunas comorbilidades en su diagnóstico previo a cirugía..... 32
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el PCR tiempo real.. 34



Resumen

El pterigión es una enfermedad ocular común que se caracteriza por un crecimiento anormal de las células limbares, lo que hace que la visión sea borrosa. Aunque la extirpación quirúrgica del pterigión se utiliza como tratamiento, su alta recurrencia es un desafío para la práctica clínica. En el presente estudio, evaluamos los efectos de la doxiciclina y el propranolol sobre la viabilidad celular y la expresión de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento básico para fibroblastos (bFGF) y metaloproteinasas de matriz extracelular 2 (MMP-2) en un cultivo *in vitro* de células de pterigión humano. Se recolectaron muestras de pterigión de siete pacientes mexicanos para establecer cultivos celulares primarios. El cultivo celular se incubó con doxiciclina (1, 4, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) o propranolol (1, 5, 10, 25, 50, 100 μM). La viabilidad celular se evaluó mediante ensayos de Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT). La expresión de genes relacionados con la proliferación se midió mediante qRT-PCR y la actividad catalítica de MMP-2 se analizó mediante zimografía. La doxiciclina y el propranolol mostraron una potente actividad citotóxica en células de pterigión humano cultivadas con una $\text{IC}_{50} = 9,76 \pm 2,29 \mu\text{g/ml}$ para la doxiciclina y una $\text{IC}_{50} = 11,46 \pm 3,21 \mu\text{M}$ para el propranolol. Este efecto citotóxico fue dependiente de la dosis. Además, la expresión de ARNm de VEGF y MMP-2 disminuyó significativamente con 10 $\mu\text{g/ml}$ de doxiciclina o 10 μM de propranolol. La zimografía mostró una disminución en la actividad de MMP-2 después de 24 h de incubación con los sobrenadantes de pterigión. Nuestros hallazgos demostraron que la doxiciclina y el propranolol disminuyen la viabilidad celular en las células de pterigión humano al inhibir la expresión génica de VEGF y MMP-2, lo que sugiere una posible aplicación terapéutica para tratar el pterigión.

Abstract

Pterygium is a usual eye sickness characterized by abnormal growth of limbal cells, causing vision to misshape. Although surgical removal of the pterygium is used as a treatment, its high recurrence is challenging for clinical practice. In the present study, we evaluated the effects of doxycycline and propranolol on cellular viability and VEGF, bFGF, and MMP-2 expression in an in vitro culture of human pterygium cells. Pterygium samples from seven Mexican patients were collected to establish primary cell cultures. The cell culture was incubated with doxycycline (1, 4, 10, 20, 40 $\mu\text{g/ml}$) or propranolol (1, 5, 10, 25, 50, 100 $\mu\text{M/ml}$). Cell viability was evaluated by MTT assays. The expression of proliferation-related genes was measured by qRT-PCR, and the catalytic activity of MMP-2 was analyzed by zymography. Doxycycline and propranolol showed potent cytotoxic activity in cultured human pterygium cells with an $\text{IC}_{50} = 9.76 \pm 2.29 \mu\text{g/ml}$ for doxycycline and $\text{IC}_{50} = 11.46 \pm 3.21 \mu\text{M}$ for propranolol. This cytotoxic effect was dose-dependent manner. Furthermore, the VEGF and MMP-2 mRNA expression was decreased significantly by doxycycline 10 $\mu\text{g/ml}$ or propranolol 10 μM . Zymography showed a decrease in MMP-2 activity after 24 h incubation with pterygium supernatants. Our findings demonstrated that doxycycline and propranolol decrease the cellular viability in human pterygium cells by inhibiting VEGF and MMP-2 expression, which suggests a potential therapeutic application for treating pterygium.

I. Introducción

El pterigión es una enfermedad ocular común con una distribución mundial y que se caracteriza principalmente por tejido fibrovascular de forma triangular que crece desde la conjuntiva peribulbar hacia la córnea provocando una distorsión de la visión (1). Los mecanismos de formación del pterigión no están claros, pero se cree que pueden participar varios factores, incluidos la exposición a la radiación ultravioleta (UV), irritantes ambientales como el polvo y el viento, infecciones virales, predisposición genética, mecanismos anti-apoptóticos, factores de crecimiento y la remodelación extracelular (2). Extensa evidencia sugiere que la luz ultravioleta puede dañar las células madre limbares (LSC), lo que induce la proliferación de células limbares, la regulación positiva de citocinas proinflamatorias, la producción de factores de crecimiento y la descomposición de la matriz extracelular (3). Además, se ha demostrado un aumento en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) y metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y MMP-9) en pterigión (2,4–6), lo que sugiere que estas proteínas tienen un papel esencial en la patogenia de la enfermedad.

El tratamiento actual para el pterigión incluye la escisión quirúrgica; sin embargo, la alta tasa de recurrencia es un desafío para los oftalmólogos (3). Por lo que surge la necesidad de buscar nuevas alternativas no invasivas que ayuden a prevenir o disminuir la recurrencia del pterigión. Un estudio demostró que la doxiciclina, un antibiótico oral común, pudo reducir drásticamente las lesiones similares al pterigión en un modelo de ratón a través de un efecto anti-angiogénico (7) probablemente relacionado con la inhibición de MMP-9 (8–10). Otro estudio mediante secuenciación masiva del transcriptoma encontró que la doxiciclina afecta las células del pterigión al regular más de trescientos genes, algunos de los cuales codifican componentes de la matriz extracelular y factores de crecimiento (11). Sin embargo, la aplicación de la doxiciclina como tratamiento para el pterigión sigue siendo controversial ya que en un ensayo clínico de fase II se mostró que la doxiciclina oral pudo reducir el tamaño del pterigión en pacientes caucásicos pero no en hispanos (12).

Por otro lado, se ha informado que el propranolol, un antagonista no selectivo de los receptores β -adrenérgicos, es eficaz para reducir la angiogénesis en el ojo (13–15), posiblemente a través de la inhibición de VEGF, bFGF y MMP-2 (16–18), sugiriendo que el propranolol podría contrarrestar el crecimiento del pterigión. Por lo tanto, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar los efectos inhibidores de la doxiciclina y el propranolol sobre el crecimiento celular y la expresión de factores angiogénicos y MMP-2 en cultivos primarios de células de pterigión humano.



II. Marco teórico

II.1 El sistema visual

En este sistema se abarcan los ojos, nervios ópticos, gracias a estos tejidos se vuelve posible las funciones visuales que se describen a continuación:

La agudeza visual es una característica del ojo en la cual se pueden ver los objetos independientemente de la distancia a la que se encuentre. La visión de colores así mismo permite la diferenciación de objetos y formas. La estereopsis o visión binocular que se trata de la percepción de la profundidad en cada persona. La capacidad de diferenciar el contraste que sirve en momentos de cambios de luz como en la noche y campo visual periférico que gracias a este se detectan obstáculos y objetos frente al cuerpo humano (19).

El ojo humano tiene aproximadamente de 22 a 27 mm de diámetro y tiene de 69 a 85 mm de circunferencia. Así mismo consiste en 3 capas primarias que también tienen su propia división. La capa exterior comprende la córnea, la esclera y el limbo, la siguiente capa comprende el iris, el cuerpo ciliar y coroides, la capa interior se conforma de la retina que también su anatomía está conformada por 10 capas (Figura 1) (20).

De igual manera el ojo se divide en 3 diferentes cámaras:

- cámara anterior conformada por la parte entre la córnea y el iris encargada de controlar la luz que ingresa al ojo por la pupila.
- cámara posterior entre el iris y el cristalino que de igual manera funciona como enfoque al ojo de objetos a distancias variables por medio de la contracción de algunos músculos conectados al cristalino.
- y cámara vítrea se encuentra entre el cristalino y la parte posterior del ojo que tiene de función convertir la luz en impulsos que viajaran al cerebro pro medio del nervio óptico (21–24).

Anatomía del ojo humano

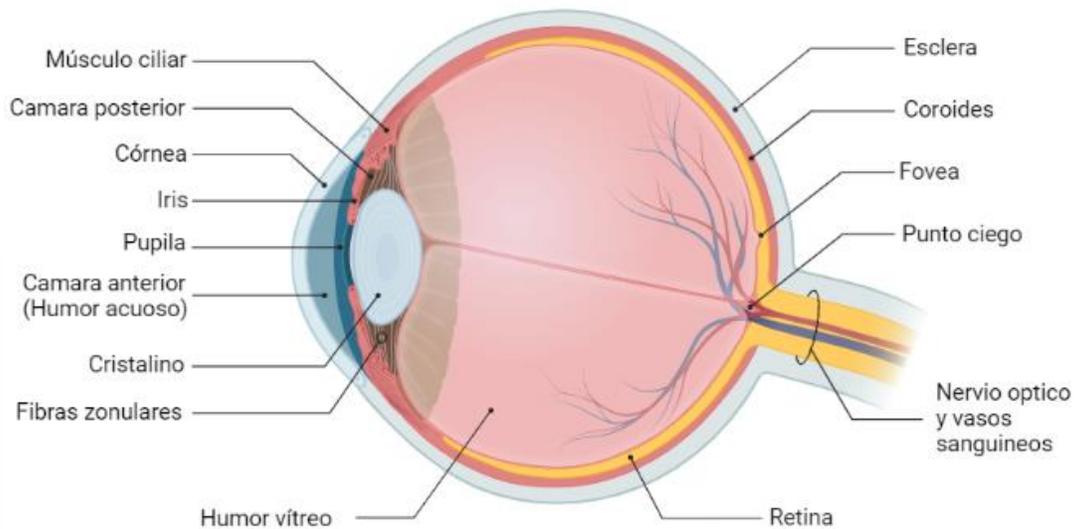


Figura 1. Imagen que ejemplifica el ojo con las divisiones mencionadas (20).

Las enfermedades oculares más comunes en ojo acorde a la Organización Mundial de Salud (OMS) son: la blefaritis que se trata de una inflamación cerca de los párpados que lleva enrojecimiento, irritación del ojo y párpado; chalazión y orzuelo que son problemas en párpados ocasionados por glándulas o infecciones que llegan a causar dolor; conjuntivitis que es la inflamación del tejido conjuntivo presente en todo el ojo que es a causa de infecciones o alergias; ojo seco que se produce por falta de la película lagrimal y conlleva a irritación y visión borrosa; pterigión y pingüecula que son el desarrollo de tejido en la conjuntiva; hemorragia subconjuntival que se trata del rompimiento de vasos sanguíneos debajo de la conjuntiva; degeneración macular senil que se ocasiona porque se tienen daños en la retina y se producen manchas, sombras y distorsión en la visión del paciente y cataratas que son nubosidades en el cristalino del ojo que causa que la visión se vuelva borrosa (25–27).

Una de las enfermedades más comunes y de la que se ha estudiado poco, es el pterigión, que a pesar de que es una enfermedad antigua, hace muy poco se han establecido algunas teorías sobre su fisiopatología.

II.2 Pterigión

La enfermedad de pterigión existe desde la antigüedad y el nombre se deriva del griego antiguo la palabra “pterygos” se refiere a una ala y las primeras descripciones datan del año 1000 antes de Cristo por el cirujano oftalmólogo Susruta (28,29). El pterigión es una degeneración benigna de forma triangular (30), se caracteriza por ser un proceso invasivo (31), que involucra inflamación crónica, proliferación del tejido subconjuntival y angiogénesis, lo que provoca crecimiento de tejido elastótico y de conjuntiva anormal sobre la córnea, que tiene como característica principal la alteración focal del limbo (32). Se ve como un defecto cosmético en lugar de una condición seria (12), sin embargo, a mayor progresión de la enfermedad lleva a problemas visuales que incluye sensación extraña en el ojo, ardor, picazón y visión borrosa (33), así mismo tiene el potencial de reducir la agudeza visual (1).

El pterigión es un cuerpo conformado por fibroblastos que destruye la conjuntiva, la cabeza es la parte vascularizada encontrada detrás del cuerpo y unida a la córnea y es la zona principal de la conjuntiva bulbar (Figura 2) (1). El pterigión con patrón de crecimiento activo y proliferativo esta usualmente caracterizado por tejido engrosado y neovascularización que comúnmente se asocia a la respuesta inflamatoria (34).

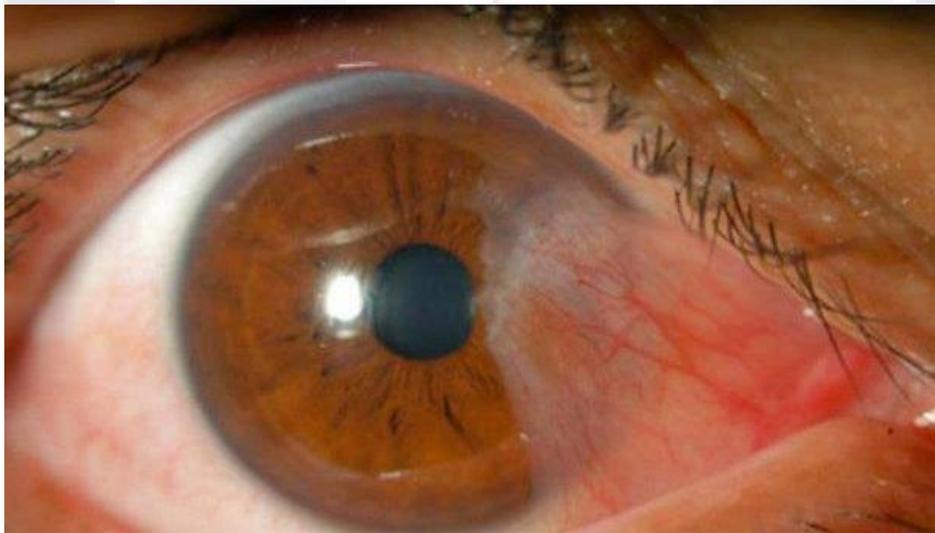


Figura 2. Representación de pterigión a través de la conjuntiva que llega a la córnea..

La enfermedad tiene diversos síntomas, los cuales son: ojos rojos y secos, irritación y disminución de la visión, astigmatismo inducido e interrupción de la película lagrimal (35).

II.3 Epidemiología del Pterigión

Esta enfermedad tiene prevalencia mundial y es más común en climas cálidos y secos con prevalencia de 22% en las zonas ecuatoriales y menos de 2% en latitudes del globo cercanas a los 40° (32). En países fuera de esta región (latitudes norte o sur), la prevalencia de la enfermedad en la población no suele superar el 2% (1). Las personas de países tropicales tienen mayor riesgo para desarrollar la enfermedad, seguido de los trabajadores de lugares arenosos, personas sin gafas protectoras, que no ha usado sombrero viéndose afectados principalmente los hombres (32).

En el año de 2018, se publicó un metaanálisis sobre la prevalencia de la enfermedad a nivel mundial, donde se hizo una recopilación de varios artículos de revisión a través de varios países. A nivel mundial la prevalencia es de 12% (36) y de los datos recopilados, se encontró que el lugar donde hay más prevalencia es en China con una prevalencia de 53% (37).

Campagna y colaboradores (2018) estudiaron la recurrencia post cirugía, con el objetivo de determinar si la etnia y la raza de los pacientes tenía alguna influencia en la recurrencia del pterigión, encontrando que los pacientes hispanos y de raza negra son más susceptibles a la recurrencia de la enfermedad después de ser operados en comparación con los caucásicos y los asiáticos (38).

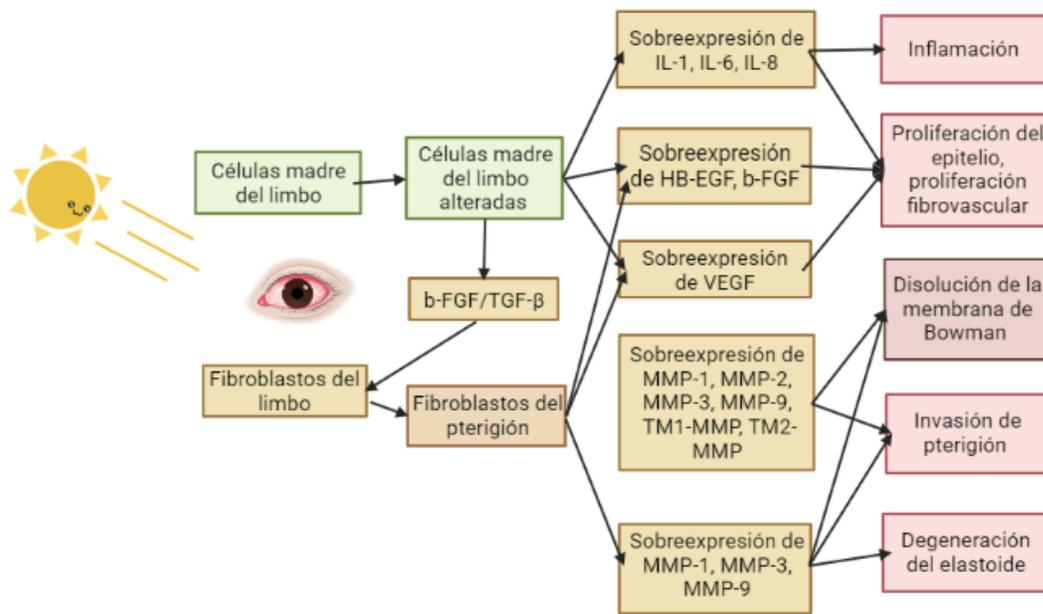
En Estados Unidos, en el año de 2009, S. West realizó un estudio con personas de origen latino a lo largo de dos ciudades fronterizas para determinar la prevalencia de la enfermedad. Los participantes eran mayoritariamente de origen mexicano de diferentes estados, realizaron una examinación clínica para determinar

la presencia de pterigión, concluyendo que la prevalencia era mayor al 16%, siendo los hombres más afectados que las mujeres, 23.7% vs 11.5%, respectivamente (39).

En México, se tienen muy pocos estudios a cerca de la epidemiología de pterigión. En un estudio realizado en el estado de Tlaxcala, se determinó que la prevalencia de la enfermedad fue 415.7 por cada 1000 habitantes, en edades entre 15 y 75 años, donde además se menciona que la actividad económica principal es la agricultura; sin embargo, el estudio fue realizado en el año 1984 (40), por lo que realmente se desconoce la prevalencia e incidencia en la actualidad.

II.4 Etiología y fisiopatología del pterigión.

Por un largo tiempo, la progresión del pterigión se ha considerado ser el resultado de dos eventos consecutivos en el área limbal. Primero, la disrupción de la barrera limbal debido a la exposición crónica a luz UV, y segundo a una subsecuente proliferación extensiva de tejido conjuntival, vasos sanguíneos y células inflamatorias sobre la córnea adyacente, lo que ocasiona la invasión del pterigión, desde la cabeza al cuerpo (41). La exposición a la luz ultravioleta se considera el factor de riesgo más importante debido a que induce la producción de factores de crecimientos, angiogénesis, inflamación crónica y colagenosis (Figura 3) (31,42). Sin embargo, otros factores de riesgo también son importantes, como son, altos niveles de factor de transcripción cAMP, proteína citocromo P450 1A1, fosfolipasa D y acuaporina -1 y -3 (43). Además, se han propuesto varios factores de riesgo para el desarrollo de la enfermedad, como son: las infecciones virales, epigenética, la transición epitelial-mesenquimal, los mecanismos inmunológicos y anti apoptóticos, la estimulación angiogénica y linfangiogénica, la desregulación de los moduladores de la matriz extracelular (MEC), las cascadas de inflamación, el reclutamiento de células madre y progenitoras derivadas de la médula ósea y modificaciones en el metabolismo del colesterol (44). Recientemente, se ha propuesto que el virus del papiloma humano (VPH) tiene probablemente un papel en la patogénesis del pterigión, ya que varios estudios reportan la presencia de este virus en muestras de pterigión (45).



Created in BioRender.com bio

Figura 3. Roles potenciales de la luz UV en la patogénesis del pterigión. La luz UV altera las células madre limbales lo que inicia la formación del pterigión. Las células de pterigión expresan elevados niveles de numerosas citocinas inflamatorias, factores de crecimiento y MMP que contribuyen a la inflamación, fibrogénesis, vascularización e invasión de la enfermedad (43).

Las células madre del limbo alteradas por la luz ultravioleta tipo B son iniciadoras de la formación del pterigión (43), lo que altera la expresión del gen p53 encargado de la regulación de apoptosis (35). Los fibroblastos que proliferan generan especies reactivas de oxígeno que causan inflamación e induce la sobreexpresión de citocinas IL-6, IL-8 (44) y factores de crecimiento en las células epiteliales que desarrollan el pterigión, esto lleva a la remodelación del tejido conectivo por medio de inflamación crónica, la disolución de la membrana de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Bowman por metaloproteinasas de matriz extracelular y angiogénesis (Figura 3) (46).

La angiogénesis es un proceso mediante el cual se desarrollan nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos existentes (46). El proceso inicia con la migración y proliferación de células endoteliales, que se ensamblan para formar la estructura vascular primitiva de capilares pequeños, el plexo vascular se expande debido a la formación de vasos de novo, después se remodela para organizar la red vascular en estructuras tubulares para madurar en vasos sanguíneos que son finalmente cubiertos por pericitos y células del músculo liso, que brinda resistencia y actúan como regulación de la perfusión de los vasos. La angiogénesis puede ser fisiológica o patológica. La angiogénesis patológica se debe a una desregulación de diferentes factores de crecimiento, como son, el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y TGF- β), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 8 (IL-8), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) (47).

En el pterigión se cree que la citocina IL-6, estimula la angiogénesis en células epiteliales del tejido ocular junto con VEGF, FGF, factor de crecimiento epidermal (EGF) y PDGF(39). El VEGF es uno de los factores proangiogénicos más potentes y específicos que hay, además está relacionado a la regulación del crecimiento celular, motilidad celular, inflamación y cicatrización de heridas (46).

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) o matrixinas son una familia de metaloendopeptidos dependientes de zinc, se unen a una gran variedad de substratos como componentes proteínicos y proteoglicanos de la matriz extracelular (48). Las MMPs son las encargadas de regular la homeostasis de los componentes de la matriz extracelular (49) y se activan en el espacio extracelular e interactúa con varias proteasas con las que en conjunto regulan las funciones celulares, incluyendo viabilidad, diferenciación, muerte celular programada, angiogénesis, vigilancia inmune, la capacidad de invasión y migración celular (50). Las MMPs son moduladas por distintos factores de crecimiento que actúan contra la matriz extracelular; pueden modificar o degradar el colágeno. Estas enzimas han sido

encontradas en tumores invasivos, en metástasis y en la destrucción del cartílago en artritis (32). Previos reportes, han encontrado una sobreexpresión de MMPs en la cabeza del pterigión (51). Así mismo, se descubrió en cultivos celulares de pterigión la sobreexpresión de MMPs que facilitan la invasión de la membrana de Bowman y su degradación (52), por lo que se piensa que la sobreexpresión de MMP podría ser la principal causa de progresión del Pterigión. Entre las MMPs sobre expresadas están MMP-1 (collagenasa-1), MMP-2 (gelatinasa A), MMP-3 (stromelisin-1), MMP-9 (gelatinasa B) (53). La invasión de la córnea por el epitelio limbal sucede por el aumento de la expresión de MMP-2 y MMP-9, estas metaloproteinasas son conocidas por degradar componentes de membrana llevando a la migración e invasión de la conjuntiva (52). La MMP-2 tiene un peso molecular de 72kDa (54) y la MMP-9 tiene un peso molecular de 92kDa (55) ambas en sus formas inactivas. Las metaloproteinasas también se han estudiado en pterigión recurrente, se cree que la recurrencia se favorece debido a la cirugía del pterigión donde los fibroblastos residuales transformados tienen una proliferación acelerada y atacan la córnea (51).

II.5 Histopatología

Al realizarse un examen histológico del pterigión se encuentran varios rasgos característicos: células inflamatorias, neovascularización, remodelación de la matriz extracelular, degeneración del elastoide de la sustancia conjuntiva en combinación con depósitos eosinófilos o basófilos, degeneración de las fibras de colágeno de los tipos I y IV, fibras elásticas maduras (displasia elástica) o degeneración de las fibras de elastina (distrofia de elastina), hiperqueratosis epitelial, paraqueratosis o acantosis, cambios en las células linfáticas epiteliales con posterior detección de epitelio plano metaplásico en el fondo de hiperplasia de células globales y activación de células planas metaplásicas. Estas características histológicas permiten clasificar el pterigión en tres tipos: proliferativo, fibromatoso y atrófico-esclerótico (1). Mientras que el desarrollo del pterigión se da de manera lenta, la recurrencia post operatoria ocurre de manera frecuente y de manera rápida si la cirugía no se realiza de manera meticulosa (56).

II.6 Tratamientos del pterigión

El tratamiento para el pterigión inicia con medidas preventivas con lubricantes oculares y lentes de sol (35). Sin embargo, estas medidas solo retrasan su evolución, más no evitan su crecimiento. Para casos más severos se emplean procedimientos quirúrgicos, de los cuales las más utilizados por médicos oftalmólogos son:

- *La incisión de esclera desnuda*, que es un procedimiento antiguo en el cual se remueve el tejido enfermo y se talla la córnea para eliminar el tejido unido, dejando abierta la herida. Otra versión más completa, donde se realiza la misma técnica, pero se cierra la herida con tejido de la conjuntiva. Esta técnica tiene una recurrencia del 38-88%, y cuando se agrega el tejido de la conjuntiva es de 45-70%. Por lo que, esta técnica no es muy recomendada (57) y actualmente sólo se utiliza alrededor de un 4% entre algunos oftalmólogos (58).
- *Autoinjerto de conjuntiva*, que se une con pegamento de fibrina o sutura. Primero se disecciona la cabeza y el cuerpo del pterigión, la parte restante del pterigión se extirpa, se pule y se alisa la superficie de los limbos, para terminar con la cauterización del tejido sangrante (59). Es una de las mejores técnicas para tratar la enfermedad al tener de 2 a un 20% de recurrencia post cirugía (57). Actualmente tiene uso de aproximadamente de 69% entre los oftalmólogos que la practican (58). Complementando esta técnica, se agrega además tejido del limbo, con esto se evita que el tejido residuo del pterigión proliferare y promueve una curación más rápida, disminuyendo la recurrencia de 0-14% (57), su uso es de aproximadamente 28% entre los oftalmólogos.
- *Injerto de membrana amniótica*, este procedimiento se usa con el procedimiento de *incisión de esclera desnuda* en el cual se coloca sobre la herida un fragmento de la membrana amniótica, lo cual cubre la superficie ayudando a sanar más rápido, tiene una recurrencia de 14 a 27%(57) y su uso quirúrgico es del 23% (58).

Subsecuente a estos procedimientos, se han usado tratamientos para evitar la recurrencia, como es el caso del antibiótico mitomicina C, el fármaco

quimioterapéutico 5-fluorouracilo, los tratamientos anti VEGF y el fármaco inmunosupresor ciclosporina A, los cuales actúan sobre la proliferación celular, estimulan la inducción de apoptosis, inhiben la síntesis y secreción de interleucinas, etc. (30).

II.7 Generalidades del cultivo celular

El cultivo celular es una técnica usada que permite el estudio del metabolismo y fisiología celular en ocasiones donde no se puede realizar de manera *in vivo*. Las células son aisladas de tejido humano o animales que se pueden obtener de biopsias y otros procedimientos como cirugías de tejidos con enfermedades. Al tratarse de biopsias humanas, se tiene que actuar de acuerdo con los procedimientos éticos establecidos por la institución. Al aislarlas células, se pierden las características del tejido y la influencia de las variaciones sistémicas. Un cultivo celular siempre se debe realizaren condiciones de esterilidad y ambiente controlado, como son, la temperatura, O₂ y CO₂ y humedad para mantener las células vivas y funcionales de una manera controlada. Por lo tanto, el cultivo celular es una herramienta utilizada durante muchos años para realizar estudios farmacológicos en células humanas o de otros mamíferos (60).

II.8 Modelo experimental del pterigión

Las primeras hipótesis de la patología enfermedad comenzaron en el siglo XIX, donde gracias al avance de la ciencia, comenzaron a realizarse estudios histopatológicos a principios de los años 60's (61,62), y probablemente, el desarrollo de la primera línea celular de pterigión por el Dr. Briceño Rossi (63). Posteriormente, se realizó el primer estudio de las células de pterigión por W.J. Levy et. Al (64), el cual fue un parteaguas para el análisis molecular del pterigión, ya que comenzaron los estudios sobre la estructura del pterigión (65–67). De los pioneros en estudiar el pterigión y su fisiopatología se encuentra Di Girolamo y Coroneo (2,68,69), quienes han ayudado a establecer algunas características de la enfermedad, así como las descripciones del cultivo celular del pterigión, donde se hace la descripción de fibroblastos y algunas condiciones para su cultivo (64).

Se han propuesto varios modelos experimentales para estudiar la fisiopatología del pterigión, en los cuales se han logrado desarrollar algunas de las características de la enfermedad. Sin embargo, tienen sus limitaciones debido a las diferencias anatómicas del globo ocular. Además, como estos modelos no se originan por una exposición a la luz ultravioleta, no se puede asegurar que los mecanismos fisiopatológicos del modelo sean los mismos que ocurren en el humano (70,71).

Recientemente se desarrolló el modelo experimental “*ex vivo*” de pterigión por Josifovska et al (2017), el cual consiste en realizar un cultivo celular primario a partir de tejido extraído de pacientes operados con pterigión, y suplementado con medio DMEM, además de otros nutrientes para su crecimiento, esperando a formar múltiples capas para así simular el crecimiento en el ojo. En este estudio, se analizaron la expresión de citocinas encargadas de activar las vías de señalización para el desarrollo del pterigión, y concluyeron que puede ser usado como un modelo experimental de la enfermedad que permite la búsqueda de tratamientos novedosos y prevención de la enfermedad (44). Sin embargo, hay otro tipo de cultivo primario más sencillo, que se usa comúnmente para estudiar la fisiopatología del pterigión. En este modelo las células crecen en monocapa, lo que significa menos tiempo de crecimiento y rapidez en la experimentación, además, se pueden utilizar en varios ensayos lo cual brinda seguridad al tratar de replicar (72).

II.9 Doxiciclina

La doxiciclina es un derivado de la tetraciclina, un antibiótico conocido por más de 50 años para tratar y prevenir infecciones. Se ha propuesto su uso como antitumoral debido a que inhibe las MMPs, incluyendo las del tipo gelatinasas y colagenasas (73). Así como su actividad anti metastásica y citotóxica en melanomas y cáncer de mama (74). Además, se ha determinado que la doxiciclina regula alrededor de 332 genes que están involucrados en el metabolismo de las mitocondrias, la respuesta al estrés del retículo endoplasmático y las vías de señalización relacionadas a integrinas, así como componentes de la matriz extracelular, y algunos factores de crecimiento en pterigión (75). Qi Wang y colegas (2016) estudiaron las nuevas aplicaciones que pudiese tener el fármaco, en modelos de cultivos celulares de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

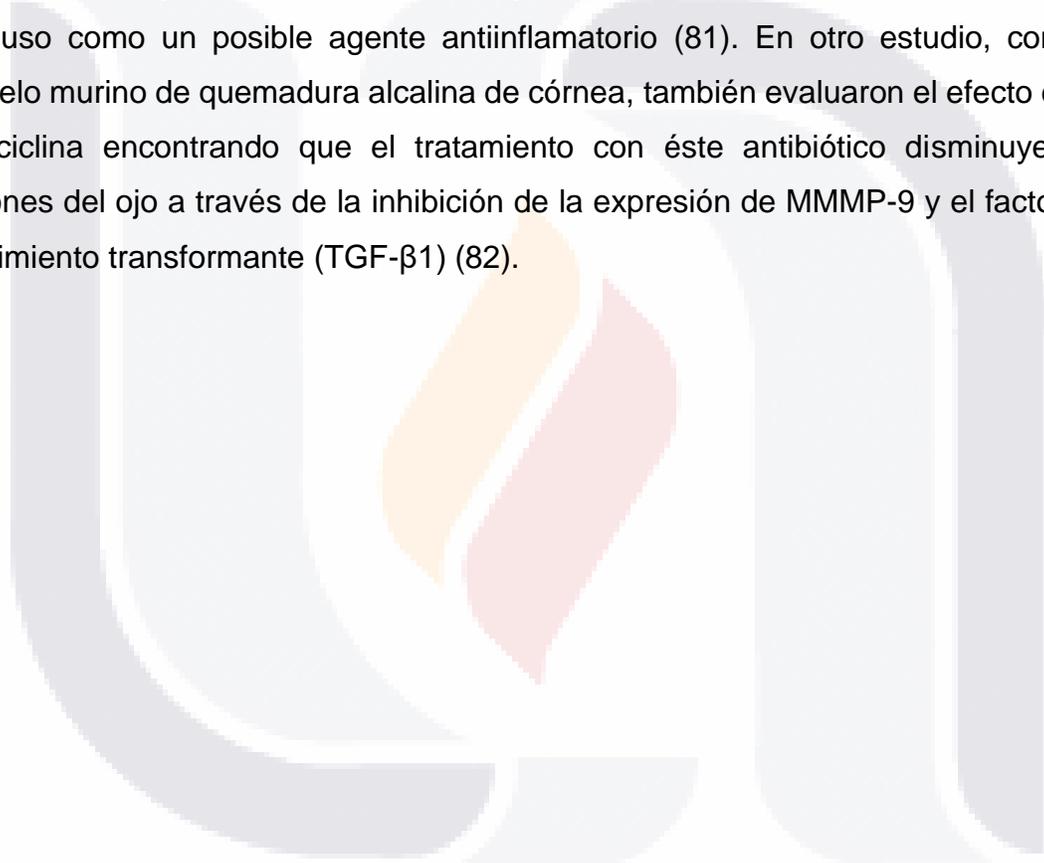
cáncer de pulmón, realizaron ensayos donde obtuvieron como resultado que la doxiciclina inhibe la proliferación y formación de colonias, suprimió la migración e invasión, además de disminuir la angiogénesis a través de la disminución de la secreción de MMP-2, MMP-9 y VEGF, así como el incremento de la secreción del inhibidor tisular de MMP-2 (TIMP-2) (74).

Se han realizado varios estudios donde se observa el efecto de la doxiciclina en células cancerosas. Por ejemplo, Tang y colaboradores (2017) realizaron un estudio en un modelo animal de cáncer de mama y encontraron que la doxiciclina retraso el desarrollo del tumor, además de disminuir la concentración de varias citocinas, entre las que se destacan la Interleucina 6 (IL-6), Interleucina 9 (IL-9) y factores de crecimiento como el VEGF (76).

Otros autores han trabajado sobre el efecto del fármaco sobre la actividad de las metaloproteinasas. Por ejemplo, Gomes y su equipo de trabajo (2016), estudiaron la disminución de la actividad de la MMP-2 en un modelo animal de ligamento periodontal (77). En un modelo de células endométricas, se evaluó la capacidad del medicamento para inhibir MMP-2 y MMP-9, proponiéndolo como un tratamiento para evitar la recurrencia post cirugía de endometriosis (78). En otro estudio, analizaron el efecto de las especies reactivas de oxígeno (ROS), donde se observó que éstas estimulaban la expresión de MMP-2 y MMP-9, dicho efecto fue disminuido por la doxiciclina en dosis bajas (79). En un artículo de revisión, donde se evalúa el efecto antineoplásico del antibiótico en osteosarcoma debido a que inhibe metaloproteinasas, esta enfermedad está ampliamente asociada a la degradación de la matriz extracelular por las MMP ya que gracias a ella se da la metástasis. En los resultados se encuentran que se inhiben las gelatinasas, MMP-2 y MMP-9, además de estimular la producción de TIMP-1 y también la inhibición de VEGF, a pesar de la falta de literatura del tema concluyen que la doxiciclina actúa como un significativo factor anti MMP en modelos *in vivo* e *in vitro*, sin embargo se menciona que la falta de literatura es el punto débil, ya que no se puede decir que realmente actúa contra osteosarcoma solo como un agente anti MMPs (80).

En un ensayo clínico con pacientes de pterigión, se encontró que la administración oral de doxiciclina reduce las lesiones de pterigión a través de la inhibición de las MMPs y angiogénesis (12).

Se ha experimentado con la aplicación tópica de doxiciclina en algunos modelos murinos de enfermedades oculares. Por ejemplo, Zhen Zhang et. Al (2014) trabajaron sobre un modelo de ojo seco de ratón, en el cual evaluaron el efecto de la doxiciclina en diluciones de solución salina 0.025% y 0.1%, llegaron a la conclusión de que alivia la inflamación y mejora el estado de ojo, por lo que se propuso como un posible agente antiinflamatorio (81). En otro estudio, con un modelo murino de quemadura alcalina de córnea, también evaluaron el efecto de la doxiciclina encontrando que el tratamiento con éste antibiótico disminuye las lesiones del ojo a través de la inhibición de la expresión de MMMP-9 y el factor de crecimiento transformante (TGF- β 1) (82).



II.10 Propranolol

El propranolol es un fármaco bloqueador del receptor β adrenérgico ampliamente usado para varias condiciones clínicas como la hipertensión, ansiedad y respuestas excesivas del sistema simpático. Los adrenoreceptores han sido encontrados en una amplia variedad de tejidos y tumores, productores de quetacolininas, que son potentes estimuladores de migración celular en varios tipos de células carcinomas, así como factores pro-angiogénicos (83). Se ha reportado el uso del propranolol para tratar hemangiomas en niños (84), observándose la reducción del hemangioma a través de la estimulación de la vasoconstricción, disminución de la expresión de los factores de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y los factores de crecimiento de fibroblastos (bFGF), ambos son pro-angiogénicos e iniciando la apoptosis en las células endoteliales (83). Además, en otro estudio se ha observado que el propranolol inhibe la expresión de gelatinasa 9 (MMP-9), que es necesaria en la vasculogénesis tumoral (85) y en células endoteliales microvasculares de cerebro humano. Otros autores han reportado su efecto inhibitorio en la progresión de tumores, en la producción de citocinas pro-angiogénicas, factores angiogénicos (VEGF) y matriz de metaloproteinasas 2 (MMP-2) en modelos *in vitro* y animales (86).

En 2015, Shanying Wu y su equipo de trabajo, en un ensayo clínico controlado, estudiaron el efecto del propranolol en hemangiomas infantiles enfocándose en el efecto que tendría sobre los niveles séricos de VEGF, bFGF y MMP-9. Demostraron que el fármaco tuvo una reducción estadísticamente significativa en la concentración sérica de las 3 proteínas mencionadas, lo cual causó la regresión del crecimiento del hemangioma. Además, el medicamento tuvo un alto nivel de seguridad por lo cual se propuso como un tratamiento que se pueda usar contra hemangiomas (87). En un estudio posterior, se evaluó la expresión de MMP-2 y MMP-9 como biomarcadores de hemangiomas infantiles y desarrollo de cáncer, en sus resultados encontraron que la expresión de las gelatinasas se disminuye, mientras que la expresión del Inhibidor tisular de MMP-2 (TIMP-2) aumenta al estar expuesto al propranolol. En este estudio también se observó que el propranolol inhibe la expresión de VEGF, indicando que probablemente la

reducción del hemangioma por el tratamiento con el propranolol puede deberse mediante la inhibición de la expresión MMP-2, MMP-9 y VEGF y por el aumento de TIMP-2 (88). En otro estudio utilizando células endoteliales derivadas de hemangiomas (HemECs), se evaluó el efecto de propranolol sobre la proliferación de estas células. Los resultados demostraron que el propranolol inhibe la proliferación a través de disminución de la expresión de MMP-2, MMP-9 y VEGF (89). Similares resultados con propranolol fueron encontrados en modelo experimental de hemangioma infantil utilizando células del cordón umbilical (HUVECS) debido a su potencial como células madre, ya que los resultados demostraron una disminución en la viabilidad celular, migración, y en la expresión de VEGF (90).

Por otro lado, en el año 2014 Letizia Padriani y colaboradores demostraron que el uso de propranolol al 0.1% diluido en una solución de 0.9% NaCl como gotas oftalmológicas en un modelo experimental de retinopatía prematura en conejo es seguro de usar, ya que no se encontraron cambios estructurales de la córnea ni adelgazamiento en las capas histológicas de ésta y los niveles de propranolol en suero fueron bajos (91). La seguridad del uso de propranolol en solución oftalmológica se corroboró en un ensayo clínico en niños recién nacidos con etapas 2 y 3 de retinopatía prematura, ya que presentó tolerancia local, sin causar lesiones, además de reducir la progresión de la retinopatía prematura en el 50%, sin reacciones adversas (92).

III. Planteamiento del problema

El pterigión es una enfermedad invasiva con cuadros de inflamación crónica, proliferación del tejido subconjuntival y un proceso angiogénico que crece sobre la córnea en forma triangular cuando es más grave puede reducir la agudeza visual (57). Esta enfermedad tiene una prevalencia del 22% en las zonas ecuatoriales, y menos del 2% en latitudes cercanas a los 40°. Las personas que viven en los trópicos tienen mayor riesgo para desarrollar la enfermedad (32). En México, en zonas donde la agricultura es la principal actividad económica, la prevalencia estimada es de hasta 49% (40).

El pterigión presenta un alto grado de recurrencia después de realizar la extirpación mediante un procedimiento quirúrgico. Por ejemplo, la Academia Americana de Oftalmología reporta una recurrencia del pterigión del 27-88% con la incisión de esclera desnuda, el porcentaje de esta reincidencia se disminuye con el tratamiento de mitomicina C de 3-40%. Mientras que, el autoinjerto de membrana amniótica tiene recurrencia de 6-41% (58). Como puede apreciarse, los porcentajes de recurrencia son muy altos, por lo que se requiere la búsqueda de nuevas estrategias que ayuden a prevenir o disminuir la recurrencia del pterigión. Algunos estudios han encontrado que la administración oral de doxiciclina disminuye la angiogénesis en un modelo murino neovascular coroidal (93), al igual que en un estudio clínico con humanos (12), por lo que se ha sugerido la doxiciclina como un tratamiento alternativo para tratar la enfermedad del pterigión. Sin embargo, los mecanismos por los cuales inhibe la angiogénesis no son claros, por lo que se requieren más estudios para determinar su efecto terapéutico. Además, se ha estudiado el uso oral de doxiciclina para el tratamiento del pterigión, sin embargo, los resultados siguen siendo controversiales (79,80), por lo que se requieren más estudios para poder perfilar a la doxiciclina como un candidato al tratamiento local en la enfermedad del pterigión.

Por otro lado, se ha encontrado que el propranolol tiene propiedades anti-angiogénicas a través de la reducción de la secreción de MMP-2 o MMP9 en ensayos clínicos de hemangiomas infantiles y en un modelo de células de cordón

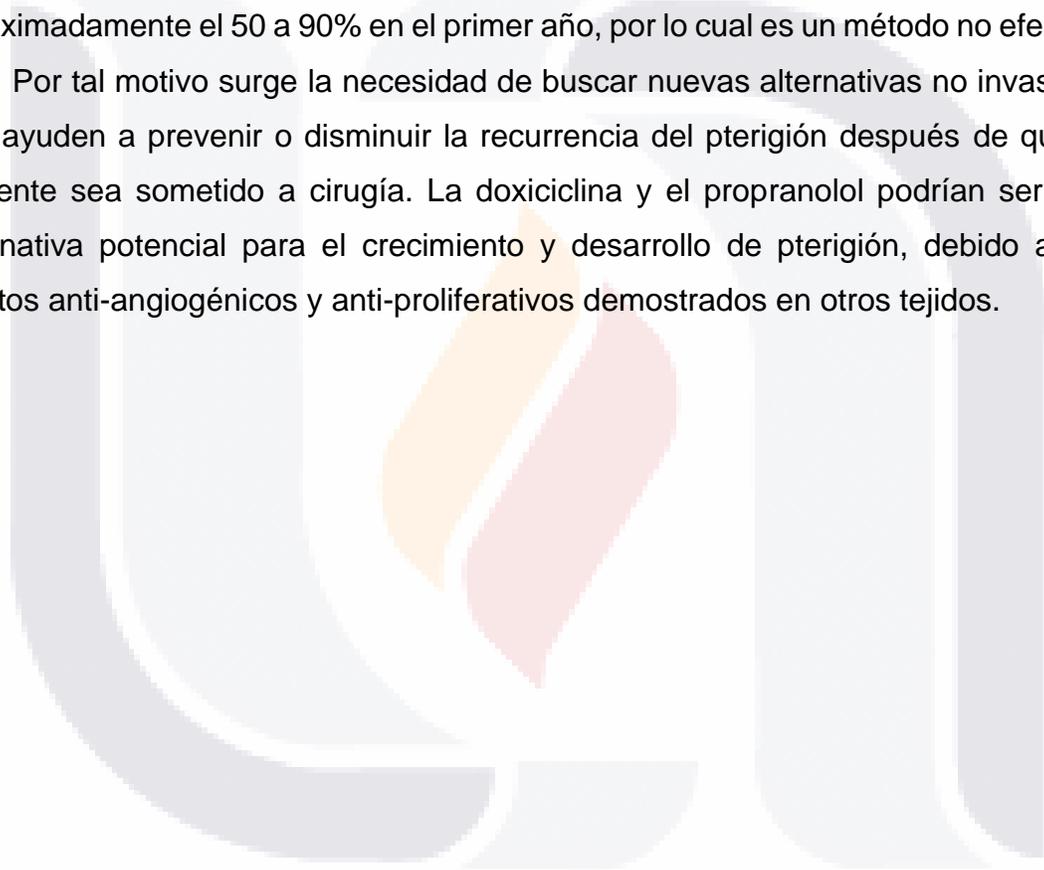
umbilical (85,86). Sin embargo, no se han investigado sus efectos anti-angiogénicos e inhibitorios sobre la expresión de las MMPs en el pterigión.

Por todo lo anterior, es necesario investigar los efectos de la doxiciclina y el propranolol sobre los factores angiogénicos y MMPs en cultivos celulares primarios de pterigión humano, y de esta forma poder determinar si estos fármacos pueden ser una alternativa terapéutica que ayude a prevenir o disminuir la recurrencia del pterigión.



IV. Justificación

El Pterigión es una enfermedad degenerativa, inflamatoria y angiogénica, y se caracteriza por el crecimiento de tejido sobre la córnea alterando el limbo. El mayor factor de riesgo es la exposición a la luz ultravioleta (UV), por lo cual la población que vive en lugares con mayor exposición a la luz solar tiene mayor riesgo a desarrollar la enfermedad. Existe una mayor prevalencia en hombres que en mujeres y es mayor en adultos que en jóvenes (32). Actualmente, el único tratamiento es quirúrgico, sin embargo, tiene un alto grado de recurrencia de aproximadamente el 50 a 90% en el primer año, por lo cual es un método no efectivo (57). Por tal motivo surge la necesidad de buscar nuevas alternativas no invasivas que ayuden a prevenir o disminuir la recurrencia del pterigión después de que el paciente sea sometido a cirugía. La doxiciclina y el propranolol podrían ser una alternativa potencial para el crecimiento y desarrollo de pterigión, debido a los efectos anti-angiogénicos y anti-proliferativos demostrados en otros tejidos.



IV. Objetivos

IV.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de doxiciclina y propranolol sobre la expresión de metaloproteinasas y factores angiogénicos en un cultivo celular de pterigión.

IV.2 Objetivos específicos

- 1) Obtener el tejido de pterigión de pacientes donadores.
- 2) Estandarizar el cultivo primario de pterigión.
- 3) Analizar la morfología del cultivo celular primario de pterigión.
- 4) Evaluar el efecto de la doxiciclina y el propranolol sobre la expresión del factor de crecimiento VEGF y bFGF en el cultivo celular de pterigión.
- 5) Evaluar el efecto de la doxiciclina y el propranolol sobre la expresión de metaloproteinasas MMP-2 en el cultivo celular de pterigión.

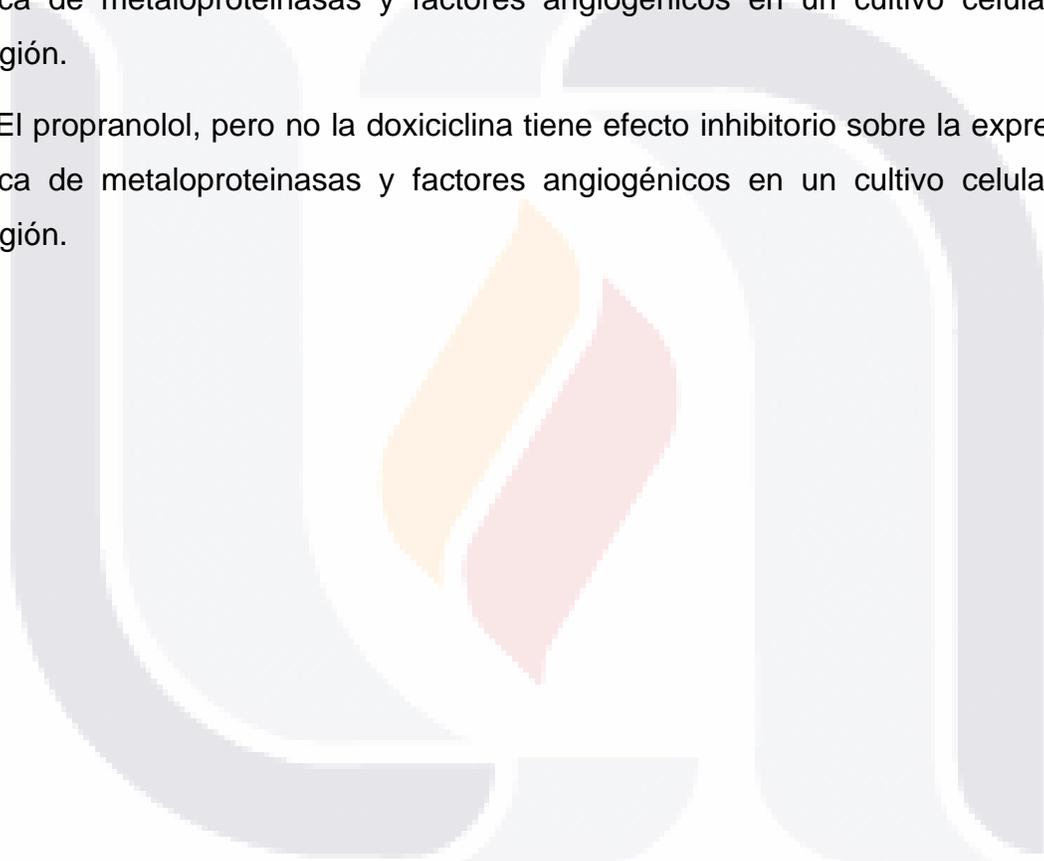
V. Hipótesis

Hi: La doxiciclina y el propranolol tienen efecto inhibitorio sobre la expresión génica de metaloproteinasas y factores angiogénicos en un cultivo celular de pterigión.

Ho: La doxiciclina y el propranolol no tienen efecto inhibitorio sobre la expresión génica de metaloproteinasas y factores angiogénicos en un cultivo celular de pterigión.

Ha: La doxiciclina, pero no el propranolol tiene efecto inhibitorio sobre la expresión génica de metaloproteinasas y factores angiogénicos en un cultivo celular de pterigión.

Ha: El propranolol, pero no la doxiciclina tiene efecto inhibitorio sobre la expresión génica de metaloproteinasas y factores angiogénicos en un cultivo celular de pterigión.



VI. Metodología

VI.1 Descripciones de la metodología

Tipo de estudio: Experimental, prospectivo.

Variables del estudio:

Tabla 1 de variables del estudio

Variable	Tipo de variable	Definición	Dimensión	Escala	Unidad de medida
Doxiciclina	Independiente Cuantitativa	Antibiótico conocido por más de 50 años para tratar y prevenir infecciones además de no producir resistencia bacteriana, se ha propuesto su uso como antitumoral debido a sus múltiples habilidades (73).	Concentración	Razón	µg/mL
Propranolol	Independiente Cuantitativa	Fármaco bloqueador del receptor β adrenérgico ampliamente usado para varias condiciones clínicas como la hipertensión, ansiedad y respuestas excesivas del sistema simpático (83).	Concentración	Razón	µg/mL

Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF)	Dependiente Cuantitativa	Proteína angiogénica de señalización que estimula la formación de vasos sanguíneos (83).	Expresión de VEGF	Razón	pg/mL
Factor de crecimiento de fibroblastos (bFGF)	Dependiente Cuantitativa	Proteína angiogénica de señalización que estimula el crecimiento celular (83).	Expresión de bFGF	Razón	pg/mL
Matriz de metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9)	Dependiente Cualitativa	La matriz de metaloproteinasas o matrixinas son una familia de metaloendopéptidos dependientes de zinc, se unen a una gran variedad de substratos como componentes proteínicos y proteoglicanos de la matriz extracelular (48)	Actividad de matriz de metaloproteinasas	Nominal	N/A

Universo de estudio: Cultivo celular de pterigión

Tipo de muestreo y grupos de trabajo: Muestro no probabilístico por conveniencia, con el objetivo de conseguir 8 tejidos pterigión para el cultivo celular, los grupos de trabajo se distribuirán de la siguiente manera:

- control - cultivo celular de pterigión.
- Cultivo celular de pterigión + tratamiento con doxiciclina.
- Cultivo celular de pterigión + tratamiento con propranolol.

VI.2 Técnicas y procedimientos

Pacientes y cultivo primario de células de pterigión humano

Se obtuvieron muestras de pterigión de cuatro mujeres y tres hombres, con una edad media de 60.25 ± 13.64 años (rango de edad 40-80 años; Tabla 2). La toma de muestra fue aprobada por el Comité de Ética Institucional (CIB-UAA-44) según la declaración de Helsinki, y todos los pacientes dieron su consentimiento informado por escrito. Los pterigiones extirpados fueron trasladados al laboratorio para establecer los cultivos celulares descritos previamente (7). Brevemente, las muestras de pterigión se cortaron en secciones pequeñas (Figura 4), se lavaron con solución de Hank y se colocaron en una placa de seis pozos en medio DMEM/F12 suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 % y 100 UI/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina a 37°C en una incubadora humificada con 95% de O₂ y 5% de CO₂. Una vez que las células migraron de los explantes y se adhirieron a la superficie de la placa, se retiraron los trozos pequeños y se añadió medio DMEM/F12 fresco. Cuando las células alcanzaron el 80 % de confluencia, se pasaron a un medio nuevo en una placa nueva usando 0,25 % de tripsina. Se usaron células en los pases 3 o 4 para todos los experimentos.

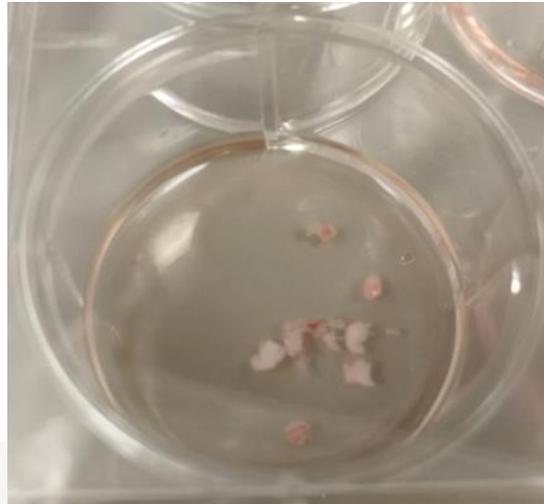


Figura 4. Caja de 6 pozos, enfocado solo en un para observar el tejido fragmentado.

Tabla 2. Datos de pacientes relevantes como su oficio y algunas comorbilidades en su diagnóstico previo a cirugía.

Nombre	Edad	Sexo	Comorbilidad	Actividad laboral	Residencia	Ojo	Recurrencia	Tratamiento
Antonio Andrade Altamira	54	H	N/A	policía	Aguascalientes	O.D	primer cirugía, removido del ojo izquierdo	Betadine gotas, Ponti gotas
Ma. De Jesús Aguilar Torres	60	M	N/A	ama de casa	Aguascalientes	Am bos ojos	primera cirugía	N/T
Ma. Magdalena Zamora Santos	47	M	N/A	jornalera	San francisco de los romos	O.I.	primer cirugía	Ponti gotas
Marina Pérez Esquivel	62	M	Hipertensión arterial sistémica	vendedora de comida	Loreto, Zac.	Am bos ojos	primer cirugía	N/T
Juan Guzmán Quesada	80	H	Hipertensión arterial sistémica	soldador	Aguascalientes	O.I.	segunda cirugía	N/T
Salvador Vargas Bautista	77	H	Hipertensión arterial sistémica, cardiopatía hipertensiva, catarata en O.D.	taxista	San francisco de los romos	O.I.	primer cirugía	metoprolol, enalapril, atorvastatina
Lucía Hernández Reyes	40	M	N/A	empleada domestica	Jesús María	O.D	primer cirugía	N/T
Pedro Dávila Ramírez	62	H	Hipertensión arterial sistémica	jornalero	Asientos	O.D	primer cirugía	Hartman, ponti gotas

Ensayo de MTT

La viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo de reducción metabólica de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, M2128). Para cada paciente, se sembró una densidad de 1.5×10^5 células de pterigión humano por pozo en placas de 96 pozos en medio DMEM/Ham's F12 y luego se trataron con varias concentraciones de doxiciclina (1, 4, 10, 40 y 100 $\mu\text{g/ml}$) o propranolol (1, 5, 10, 25, 50 y 100 μM) durante 24 h. Después de la incubación, las células se incubaron con MTT (0.5 mg/ml en solución salina en buffer de fosfatos) durante 4 horas a 37°C . Luego, se retiró el medio y los cristales de formazán se disolvieron en 100 μl de isopropanol acidificado al 0.1%. La densidad óptica se midió a 570 nm usando un lector de placas (Thermo-Scientific, Multiskan Sky Microplate Spectrophotometer). Los resultados se expresan como porcentaje del control y representan la media de siete experimentos independientes \pm error estándar de la media (S.E.M.)

Extracción de ARN y RT-qPCR

Para el análisis de la expresión génica, se incubaron 1.5×10^5 células de pterigión humano con doxiciclina (10 $\mu\text{g/ml}$) o propranolol (10 μM) durante 24 h. Después de este período de incubación, se extrajo el ARN total de las células usando TRIzol (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc) siguiendo el manual del fabricante. Se utilizó un Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) para medir la concentración y la calidad del ARN. Para la síntesis de ADNc, se realizó la transcripción inversa utilizando un kit de síntesis de ADNc iScript (Bio-Rad) con oligo (dT)-18 en un termociclador T100 (Bio-Rad) de acuerdo con el protocolo del fabricante. La amplificación génica por qPCR se realizó siguiendo el protocolo del kit (SsoAdvanced Universal SYBR®Green Supermix, Cat. #1725270, Bio-Rad) en un termociclador CFX96™ Real-Time System, C100Touch (Bio-Rad). Los oligos utilizados para la cuantificación de la expresión de ARNm se muestran en la Tabla 3. Los niveles de expresión se determinaron en cinco cultivos de células de pterigión humano de cinco pacientes diferentes por duplicado. Los cambios en la expresión

génica se calcularon usando el método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) usando GAPDH como gen de referencia (19).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el PCR tiempo real. El primer de FGF-2 se extrajo del artículo de C. Barclay et. Al (2005) (94).

Oligos	Acceso NCBI		Secuencia (5'-3')	Tm	Amplicon	%GC
MMP-2	NM_001302509.2	Forward	CGACCACAGCCAACTACGAT	60.11	224	55
		Reverse	GTCAGGAGAGGCCCCATAGA	60.11		60
MMP-9	NM_004994.3	Forward	ACGATGACGAGTTGTGGTCC	60.04	288	60.04
		Reverse	CGGAGTAGGATTGGCCTTGG	60.18		60.18
VEGF	NM_001171623.2	Forward	TGCCCACTGAGGAGTCCAAC	55.11	214	47.37
		Reverse	TGGTTCCCGAAACGCTGAG	58.92		57.89
FGF-2*	NM_001361665.2	Forward	GGCTTCTTCTGCGCATCCA	63.16	354	60
		Reverse	GCTCTTAGCAGACATTGGAAGA	58.13		45.45
GAPDH	NM_001357943.2	Forward	GCTCTTGCTCCTCCTGTTC	57.85	356	59.89
		Reverse	AAATGAGCCCCAGCCTTCTC	60.03		55.00

Zimografía de gelatina

Se incubaron 1.5×10^5 células de pterigión humano para zimografía con doxiciclina (10 $\mu\text{g/ml}$) o propranolol (10 μM) durante 24 h. Después de este período de incubación, se extrajo la proteína total de las células utilizando un buffer de extracción de proteínas: 20 mM de HEPES-NaOH (pH 7.9), glicerol al 20 %, 500 mM de NaCl, 1.5 mM de MgCl_2 , Triton X-100 al 0.1 % y 1 mM de inhibidor de proteasa fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF). Después, las muestras se centrifugaron a 13,000 rpm durante 15 minutos para recuperar los sobrenadantes de proteínas. Quince μg de proteína por carril se separaron en geles de poliacrilamida al 10% que contenían dodecilsulfato de sodio (SDS) y 1 mg/ml de gelatina. Después de la electroforesis, los geles se lavaron con Triton X100 al 2.5 % para eliminar el SDS y se incubaron en 50 mM de Tris-HCl, 150 mM de NaCl y 5 mM de CaCl_2 con un pH de 7.5 a 37 °C durante 48 h. Los geles se lavaron con agua desionizada y se tiñeron con azul brillante de Coomassie (CBB) al 0.25 % en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

isopropanol al 40 % durante 60 min. Las bandas de actividad de MMP se detectaron por la ausencia de tinción con CBB de la gelatina digerida después de desteñir con metanol al 40 %, ácido acético al 10 % y solución de agua desionizada al 50 %. Los geles se documentaron fotográficamente con miniBis Pro (DNR Bio-Imaging System Ltd, Israel) y la densitometría de la banda visible se determinó con el software Image J 1.43 (NIH).

Reactivos utilizados

Medio de Eagle modificado por Dulbecco/medio F12 (DMEM/F12), suero fetal bovino (FBS), penicilina-estreptomicina, HEPES, MTT, doxiciclina, clorhidrato de propranolol, SDS, tripsina-EDTA al 0.25 %, metanol, ácido acético y todas las sales se adquirieron de Sigma- Aldrich (Toluca, México). La gelatina y el azul brillante de Coomassie se compraron a Merk. Triton X-100 y PMSF se adquirieron de Thermo Fisher Scientific.

Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como media \pm S.E.M de 5 o 7 experimentos independientes. Los valores de IC50 a las 24 h se calcularon con una curva de concentración-respuesta ajustada a una regresión no lineal utilizando el software GraphPad Prism 8 (La Jolla, CA, EE. UU). Se utilizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con la prueba post hoc de Dunnett para la comparación múltiple. Una diferencia estadísticamente significativa se estableció en $P < 0.05$.

VII. Resultados

VII.1 Morfología del cultivo celular

Los cultivos primarios de pterigión obtenidos tienen una morfología muy parecida a la descrita por trabajos previos (52, 88). Girolamo y colaboradores (1999) (69), observaron células alargadas en forma de huso como fibroblastos (Figura 5).

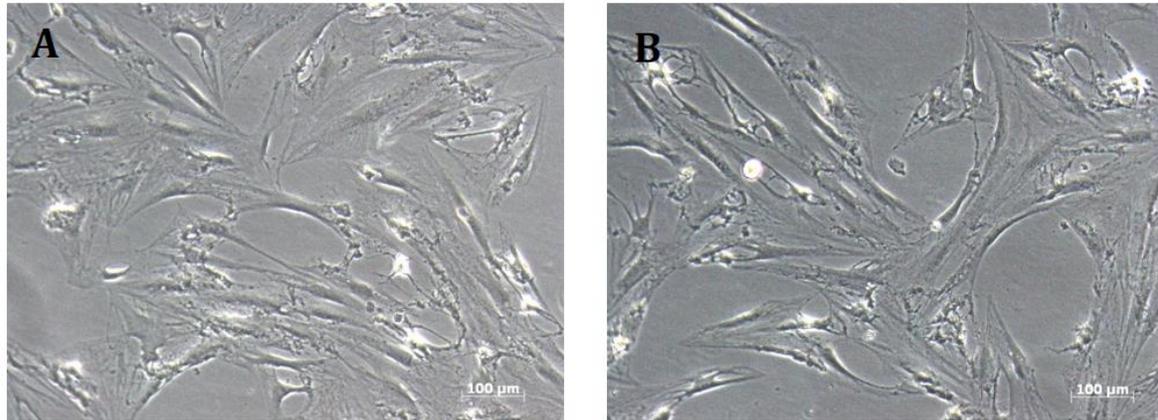


Figura 5. Observación de células de pterigión de la muestra de un paciente. objetivo x10, contraste de fases.

VII. 2. La doxiciclina y el propranolol mostraron una potente actividad citotóxica en células de pterigión humano cultivadas.

Los efectos citotóxicos de la doxiciclina y el propranolol se evaluaron en un cultivo primario *in vitro* de células de pterigión humano utilizando ensayos MTT. Las células se incubaron a diferentes concentraciones de doxiciclina o propranolol durante 24 h. Las curvas de concentración-respuesta para doxiciclina y propranolol se muestran en las Figuras 6 A y B, respectivamente. Para la doxiciclina, la concentración que produjo una inhibición del crecimiento celular del 50 % (IC50) fue de $9.76 \pm 2.29 \mu\text{g/ml}$, mientras que para el propranolol fue de $11.46 \pm 3.21 \mu\text{M}$. Para ambos fármacos, el efecto de citotoxicidad fue dependiente de la concentración. La concentración más alta utilizada de doxiciclina ($100 \mu\text{g/ml}$) y propranolol ($100 \mu\text{M}$) indujo aproximadamente un $77.8 \pm 2.4 \%$ y un $73.5 \pm 3.3 \%$ de mortalidad, respectivamente, en comparación con el control (Figura 6).

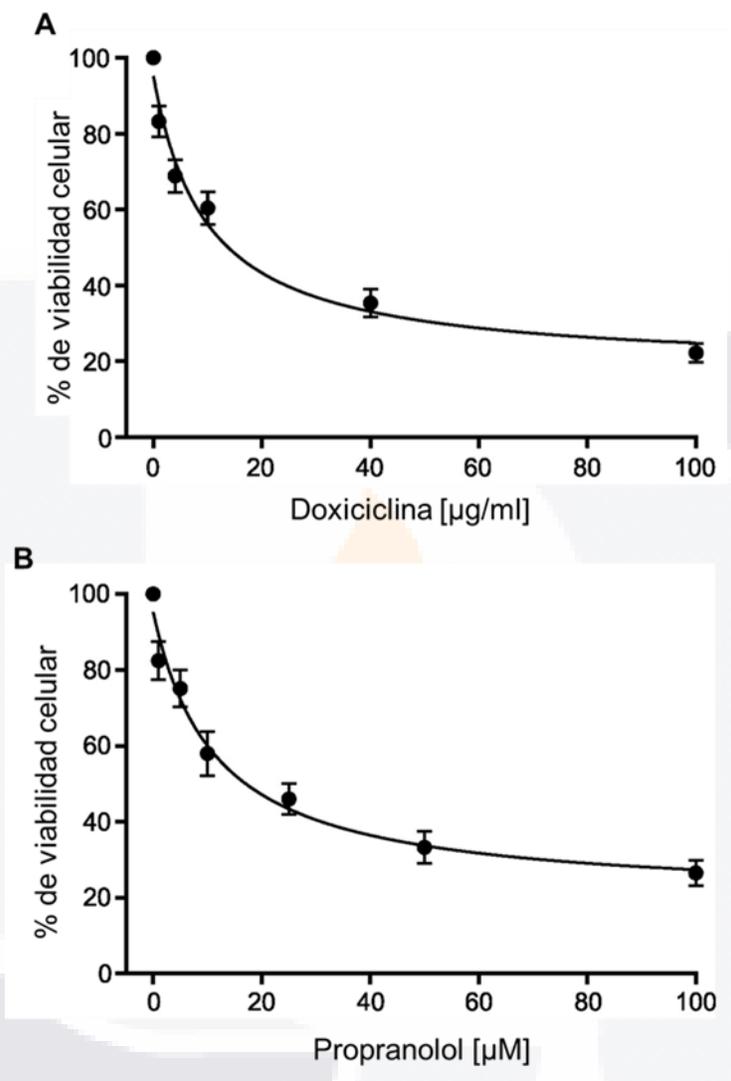


Figura 6. Curvas de concentración-respuesta de la actividad citotóxica de doxiciclina (A) y propranolol (B) en células de pterigión humano cultivadas. La respuesta se expresa como un porcentaje del control y representa la media de siete experimentos independientes \pm S.E.M. Las curvas sigmoidales son el mejor ajuste obtenido con una función logística de tres parámetros.

VII.3. La doxyciclina y el propranolol disminuyeron la expresión de ARNm de VEGF y MMP-2 en células de pterigión de humano.

Se midió la expresión de ARNm de VEGF, bFGF y MMP-2 en células de pterigión de humano tratadas con doxyciclina (10 µg/ml) y propranolol (10 µM). La expresión de ARNm de VEGF y MMP-2 disminuyó significativamente con doxyciclina o propranolol. Específicamente, el tratamiento con doxyciclina y propranolol redujo aproximadamente un 92 % y 95 % la expresión del ARNm de MMP-2, respectivamente, en comparación con las células de control (Figura 7A). De manera similar, la expresión del ARNm de VEGF se redujo en aproximadamente un 60 % y 90 % en las células de pterigión tratadas con doxyciclina o propranolol, respectivamente (Figura 7B). No se encontró un cambio significativo en la expresión del ARNm de bFGF en las células de pterigión tratadas con doxyciclina o propranolol en comparación con las células de control (sin tratamiento) (Figura 7C).

VII.4. La doxyciclina y el propranolol no afectan la actividad de la MMP-2

Se realizó zimografía con gelatina para evaluar el efecto de doxyciclina y propranolol sobre la actividad proteolítica de MMP-2 después de 24 h de tratamiento con doxyciclina (10 y 40 µg/ml) o propranolol (10 y 25 µM). La zimografía mostró que la banda de 72 KDa, correspondiente a la MMP-2, permaneció invariable después del tratamiento con doxyciclina o propranolol. En la Figura 8A se muestran un gel representativo de la zimografía con sobrenadantes de un paciente. El resumen de los datos de zimografía de 5 pacientes se muestra en la Figura 8B y C.

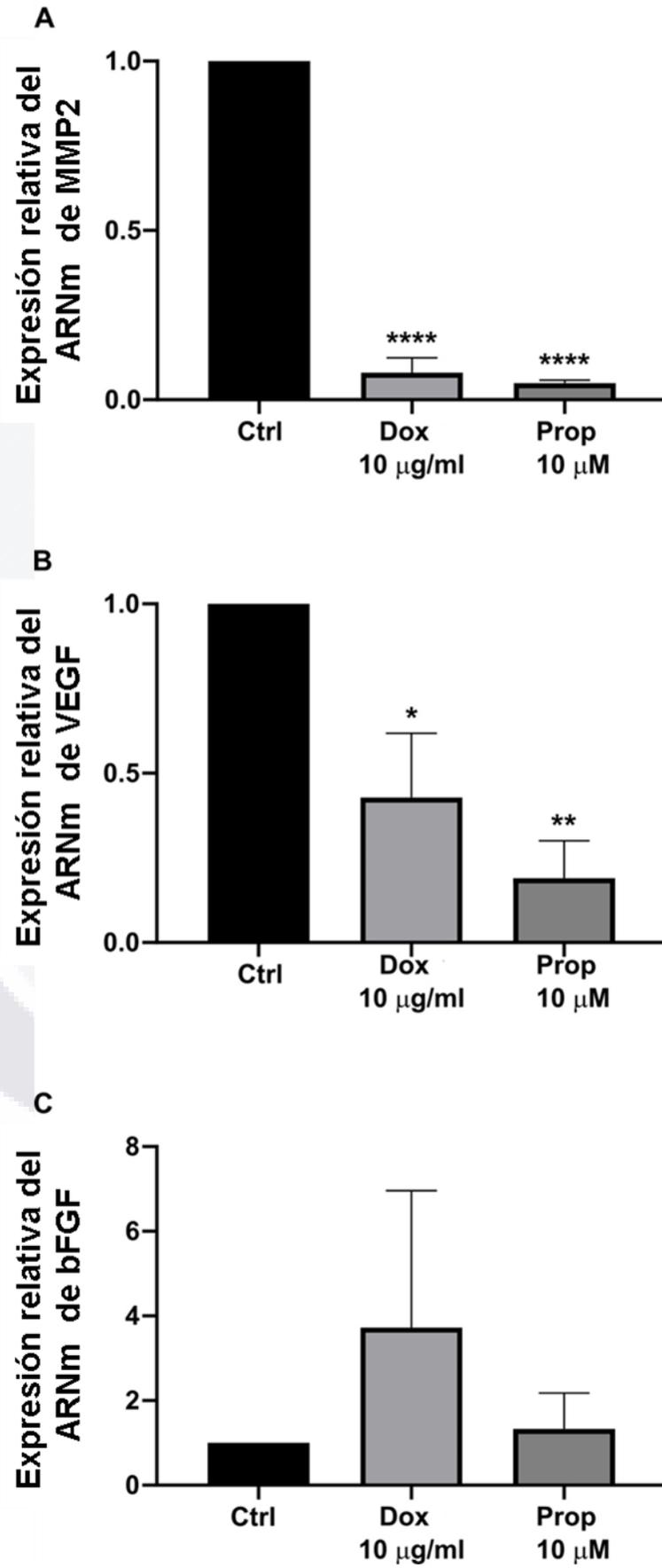


Figura 7. La doxiciclina y el propranolol disminuyen la expresión génica de VEGF y MMP-2 en células de pterigión de humano. Análisis qPCR de la expresión de ARNm de MMP-2 (A), VEGF (B) y bFGF (C) en células de pterigión humanas tratadas con 10 µg/ml de doxiciclina o 10 µM de propranolol. Los datos se expresan como media ± SEM de cinco experimentos independientes por duplicado. El * denota diferencias estadísticas *P < 0,05, **P < 0,005 y **** P < 0,0001 en comparación con las células control sin tratamiento mediante ANOVA de una vía seguido de la prueba post hoc de Dunnett.

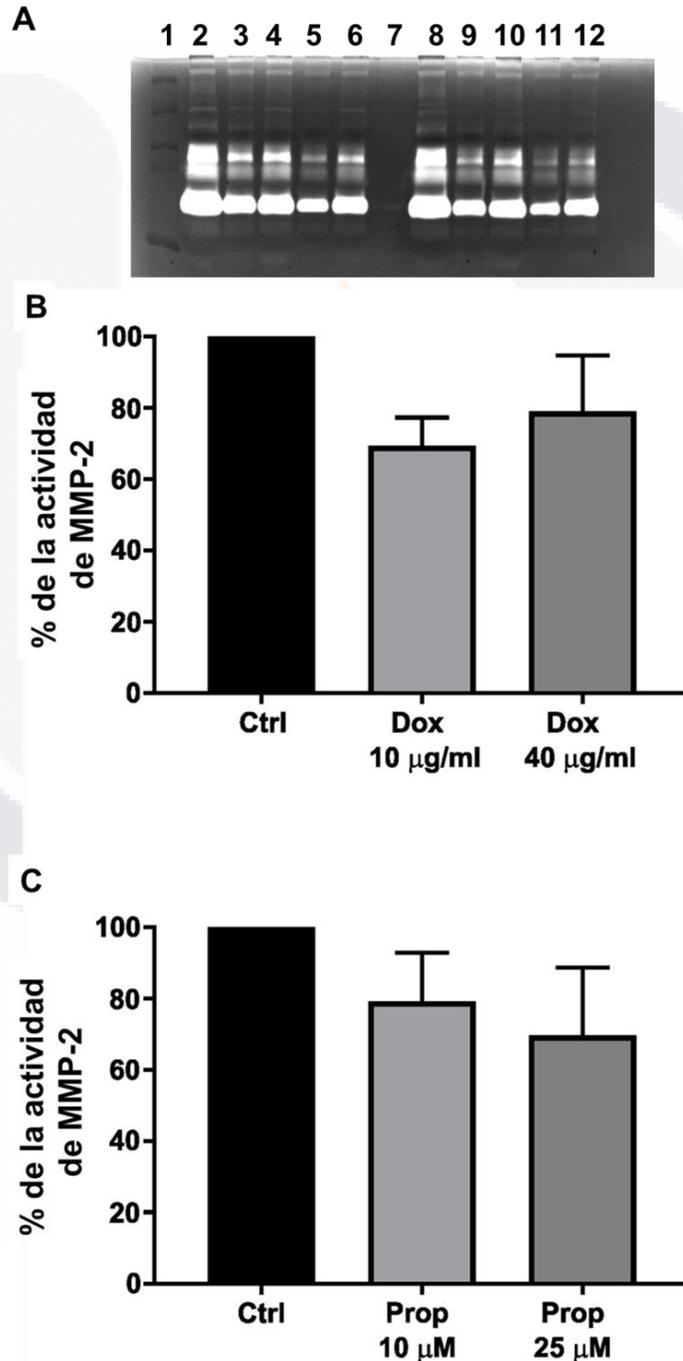
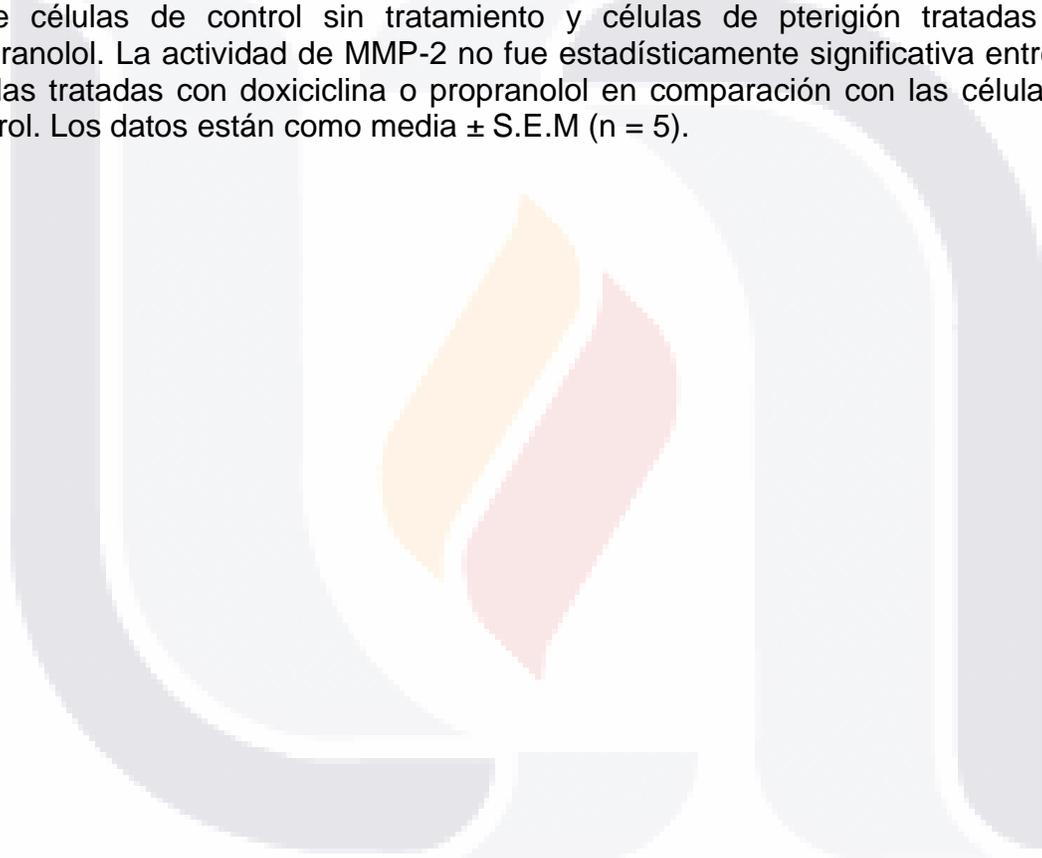


Figura 8. Efecto de doxiciclina y propranolol sobre la actividad de MMP-2 en células de pterigión humanas cultivadas. (A) Gel representativo de la zimografía de un paciente con pterigión. Carril 1, marcador de peso molecular (Amersham™ ECL™ Rainbow™ Marker GERPN800E); carril 2, control sin tratamiento; carril 3, células tratadas con doxiciclina 10 µg/ml; carril 4, células tratadas con doxiciclina 40 µg/ml; carril 5, células tratadas con propranolol 10 µM; carril 6, células tratadas con propranolol 25 µM; carril 6, vacío; carril 7, control sin tratamiento; carril 8, células tratadas con doxiciclina 10 µg/ml; carril 9, células tratadas con doxiciclina 40 µg/ml; carril 10, células tratadas con propranolol 10 µM; carril 11, células tratadas con propranolol 25 µM. (B) Gráfica de barras comparando los niveles de actividad de MMP-2 entre células de control sin tratamiento y células de pterigión tratadas con doxiciclina. (C) Gráfica de barras comparando los niveles de actividad de MMP-2 entre células de control sin tratamiento y células de pterigión tratadas con propranolol. La actividad de MMP-2 no fue estadísticamente significativa entre las células tratadas con doxiciclina o propranolol en comparación con las células de control. Los datos están como media ± S.E.M (n = 5).



VIII. Discusión

El pterigión es una enfermedad ocular caracterizada por una proliferación celular, procesos inflamatorios, fibrosis, neovascularización y remodelación de la matriz extracelular (1). La escisión del pterigión sigue siendo la técnica quirúrgica preferida, pero dejar la esclerótica desnuda conduce a una alta tasa de recurrencia de aproximadamente el 38-88 % (57). Se han utilizado muchas terapias adyuvantes en la cirugía de pterigión para disminuir la recurrencia con diversos grados de éxito (35). En este sentido, la doxiciclina se ha propuesto como tratamiento del pterigión, debido a que, en un modelo de ratón, el tratamiento con este antibiótico redujo drásticamente las lesiones del pterigión (7,12). Sin embargo, su uso permanece controversial, ya que en un ensayo clínico se mostró que el tratamiento con doxiciclina oral no pudo reducir el tamaño del pterigión en pacientes hispanos (12). En el presente estudio, se investigó si la doxiciclina tiene efectos inhibitorios sobre las células de pterigión humano cultivadas *in vitro* de ocho pacientes mexicanos. Se encontró que la doxiciclina inhibió significativamente la proliferación de las células de pterigión de acuerdo con los resultados de MTT, lo que sugiere un posible uso terapéutico de la doxiciclina para el tratamiento del pterigión en pacientes mexicanos.

Una posible explicación a las discrepancias entre la respuesta de las células de pterigión en pacientes hispanos a la doxiciclina observada por Rúa et al. (2012) (12) y las observadas en este estudio pueden ser debidas a las diferencias experimentales, ya que nosotros aplicamos doxiciclina en cultivos *in vitro* de células de pterigión, mientras que ellos la administraron por vía oral a los pacientes, quizás la manipulación de las células cultivadas cambie la susceptibilidad a la doxiciclina. Otra posible explicación es que su estudio consideró más pacientes sudamericanos y nosotros solo consideramos pacientes mexicanos.

Hasta donde está nuestro entendimiento, este es el primer estudio que demuestra los efectos inhibitorios del propranolol sobre el crecimiento de las células de pterigión de humano. Ha habido otros estudios *in vitro* que demuestran las propiedades antiproliferativas, antimigratorias y citotóxicas del propranolol en

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

diferentes tipos de cáncer, por ejemplo, carcinoma de mama (95,96), carcinoma de colon (97) y cáncer de páncreas (98). Además, un estudio reciente demostró que el tratamiento con colirio de propranolol contrarresta la progresión de la neovascularización corneal en pacientes con síndrome de Stevens-Johnson (13). Todos estos estudios, incluido el nuestro, nos llevan a suponer que el uso de propranolol es prometedor para el tratamiento del pterigión y debe explorarse. Por lo tanto, son necesarios más estudios experimentales y clínicos para establecer su eficacia.

Muchos factores de crecimiento angiogénicos y fibrogénicos están sobre expresados en el pterigión, como bFGF y VEGF, lo que los implica como factores clave en la patogénesis de esta enfermedad (2). Además, los fibroblastos de pterigión humanos secretan grandes cantidades de VEGF en comparación con los fibroblastos conjuntivales (99). En el presente estudio se demostró que la expresión del ARNm de VEGF disminuye significativamente en las células de pterigión humano tratadas con doxiciclina o propranolol en comparación con las células sin tratamiento, lo que indica que la doxiciclina y el propranolol tienen actividad anti-angiogénica.

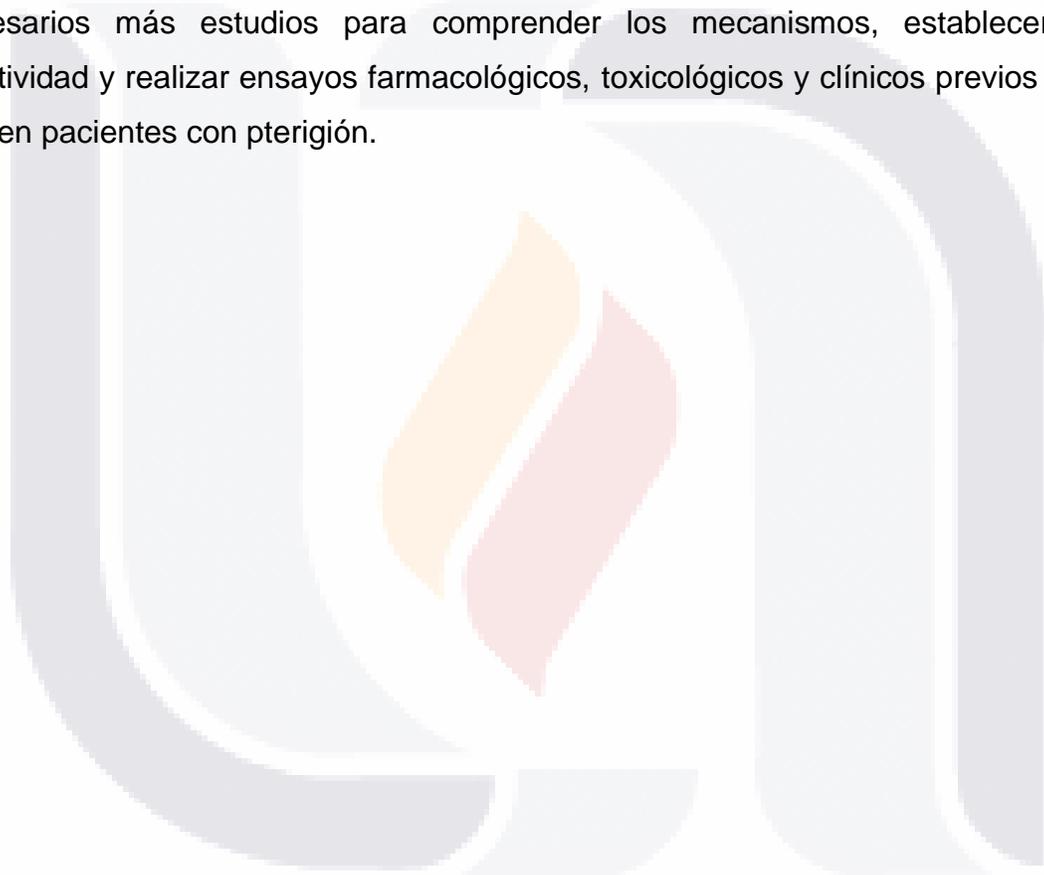
La MMP-2 es un miembro de la familia de las MMPs que pertenece al subgrupo gelatinasa, que tiene un papel importante en la reparación de heridas corneales (100). Algunos reportes han encontrado aumento de MMP-2 en pterigión, implicándolo en la progresión de la enfermedad (101). En el presente estudio, la aplicación de doxiciclina o propranolol durante 24 h en células de pterigión humano redujo significativamente la expresión de ARNm de MMP-2 en comparación con las células de control (sin tratamiento). Sin embargo, ambos fármacos no alteraron la actividad de MMP-2 mediante zimografía. Existen hallazgos controvertidos con respecto a la expresión y actividad de MMP-2 en pterigión. Por ejemplo, algunos estudios encontraron un aumento de MMP-2 en el pterigión (52,101,102), pero no en otros (103,104). En nuestras manos, la doxiciclina y el propranolol redujeron la expresión del ARNm de MMP-2 pero no afectaron la actividad de MMP-2. Una posible explicación para estos resultados contradictorios es que las muestras de

pterigión analizadas presentan diferentes etapas de progresión de la enfermedad. En apoyo de esta noción, un estudio previo demostró que la actividad y/o el ARNm del tejido y fibroblastos del pterigión MMP-2 y MMP-9 aumentan con la progresión del pterigión (101).



IX. Conclusión

El cultivo primario de pterigión humano puede ser un modelo *in vitro* útil para estudiar los efectos de terapias potenciales para combatir la enfermedad, como el uso de la doxiciclina y propranolol. En este estudio se ha demostrado que la doxiciclina y el propranolol disminuyen la viabilidad de células de pterigión humano cultivadas al inhibir la expresión de VEGF y MMP-2, lo que sugiere que podrían representar nuevas terapias para el tratamiento del pterigión. Sin embargo, son necesarios más estudios para comprender los mecanismos, establecer su efectividad y realizar ensayos farmacológicos, toxicológicos y clínicos previos a su uso en pacientes con pterigión.



X. Referencias

1. Malozhen SA, Trufanov S V., Krakhmaleva DA. Pterygium: Etiology, pathogenesis, treatment. Vol. 133, Vestnik Oftalmologii. Media Sfera; 2017. p. 76–83.
2. Di Girolamo N, Chui J, Coroneo MT, Wakefield D. Pathogenesis of pterygia: Role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. Vol. 23, Progress in Retinal and Eye Research. 2004. p. 195–228.
3. Yam JCS, Kwok AKH. Ultraviolet light and ocular diseases. Int Ophthalmol [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 5];34(2):383–400. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23722672/>
4. Powers MR, Qu Z, O'Brien B, Wilson DJ, Thompson JE, Rosenbaum JT. Immunolocalization of bFGF in pterygia: association with mast cells. Cornea [Internet]. 1997 Sep 1 [cited 2022 Aug 5];16(5):545–9. Available from: <https://europepmc.org/article/med/9294687>
5. Gebhardt M, Mentlein R, Schaudig U, Pufe T, Recker K, Nölle B, et al. Differential expression of vascular endothelial growth factor implies the limbal origin of pterygia. Ophthalmology [Internet]. 2005 Jun [cited 2022 Aug 5];112(6):1023–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15885787/>
6. Liang K, Jiang Z, Zhao B, Shen J, Huang D, Tao L. The expression of vascular endothelial growth factor in mast cells promotes the neovascularisation of human pterygia. Br J Ophthalmol. 2012 Sep;96(9):1246–51.
7. Cox CA, Amaral J, Salloum R, Guedez L, Reid TW, Jaworski C, et al. Doxycycline's Effect on Ocular Angiogenesis: an In Vivo Analysis. Ophthalmology [Internet]. 2010 Sep [cited 2022 Aug 5];117(9):1782. Available from: </pmc/articles/PMC2934900/>

8. Lee CZ, Xu B, Hashimoto T, McCulloch CE, Yang GY, Young WL. Doxycycline suppresses cerebral matrix metalloproteinase-9 and angiogenesis induced by focal hyperstimulation of vascular endothelial growth factor in a mouse model. *Stroke* [Internet]. 2004 Jul [cited 2022 Aug 5];35(7):1715–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15166398/>
9. Hashimoto T, Matsumoto MM, Li JF, Lawton MT, Young WL. Suppression of MMP-9 by doxycycline in brain arteriovenous malformations. *BMC Neurol* [Internet]. 2005 Jan 24 [cited 2022 Aug 5];5(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15667660/>
10. Lee H, Park JW, Kim SP, Lo EH, Lee SR. Doxycycline inhibits matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis* [Internet]. 2009 May [cited 2022 Aug 5];34(2):189–98. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19200854/>
11. Larráyoz IM, de Luis A, Rúa O, Velilla S, Cabello J, Martínez A. Molecular Effects of Doxycycline Treatment on Pterygium as Revealed by Massive Transcriptome Sequencing. *PLoS One* [Internet]. 2012 Jun 19 [cited 2022 Aug 5];7(6):e39359. Available from: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0039359>
12. Rúa O, Larráyoz IM, Barajas MT, Velilla S, Martínez A. Oral Doxycycline Reduces Pterygium Lesions; Results from a Double Blind, Randomized, Placebo Controlled Clinical Trial. *PLoS One*. 2012 Dec 19;7(12).
13. Filippi L, De Libero C, Gallarati BZ, Fortunato P, Piozzi E. Propranolol eye drops in patients with corneal neovascularization. *Medicine (Baltimore)* [Internet]. 2018 Nov 1 [cited 2022 Jun 3];97(45). Available from: </pmc/articles/PMC6250516/>
14. Lavine JA, Sang Y, Wang S, Ip MS, Sheibani N. Attenuation of choroidal neovascularization by $\beta(2)$ -adrenoreceptor antagonism. *JAMA Ophthalmol* [Internet]. 2013 Mar [cited 2022 Aug 5];131(3):376–82. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23303344/>

15. Ristori C, Filippi L, dal Monte M, Martini D, Cammalleri M, Fortunato P, et al. Role of the Adrenergic System in a Mouse Model of Oxygen-Induced Retinopathy: Antiangiogenic Effects of β -Adrenoreceptor Blockade. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011 Jan 1;52(1):155–70.
16. Park M, Jung HL, Shim YJ, Kim HS, Yoon HS, Park SK, et al. Serum cytokine profiles in infants with infantile hemangiomas on oral propranolol treatment: VEGF and bFGF, potential biomarkers predicting clinical outcomes. *Pediatr Res [Internet]*. 2020 Nov 1 [cited 2022 Aug 5];88(5):749–55. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32311699/>
17. Chen XD, Ma G, Huang JL, Chen H, Jin YB, Ye XX, et al. Serum-Level Changes of Vascular Endothelial Growth Factor in Children with Infantile Hemangioma after Oral Propranolol Therapy. *Pediatr Dermatol [Internet]*. 2013 Sep 1 [cited 2022 Aug 5];30(5):549–53. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/pde.12192>
18. Storch C, Hoegerà P, Hoeger P. Propranolol for infantile haemangiomas: insights into the molecular mechanisms of action. *Br Assoc Dermatologists • Br J Dermatology*. 2010;163:269–74.
19. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods [Internet]*. 2001 [cited 2022 Aug 8];25(4):402–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11846609/>
20. Kels BD, Grzybowski A, Grant-Kels JM. Human ocular anatomy. *Clin Dermatol*. 2015 Mar 1;33(2):140–6.
21. Snell RS, Lemp MA. Clinical Anatomy of the Eye. *Clin Anat Eye [Internet]*. 1997 Dec 11 [cited 2022 May 4]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/9781118690987>

22. Newell FW. Ophthalmology : principles and concepts. 1986;609.
23. Bron AJ, Tripathi RC, Tripathi BJ. Wolff's Anatomy of the Eye and Orbit. 8 th. Boca Raton, Florida: CRC Press. 1998; 1997.
24. Grant-Kels JM, Kels BD. Human ocular anatomy. *Dermatology Clin*. 1992;10(3):473–82.
25. Hong H, Mújica OJ, Anaya J, Lansingh VC, López E, Silva JC. The Challenge of Universal Eye Health in Latin America: distributive inequality of ophthalmologists in 14 countries. *BMJ Open* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2022 May 12];6(11):e012819. Available from: <https://bmjopen.bmj.com/content/6/11/e012819>
26. Organization WH. World report on vision [Internet]. Geneva; 2019 [cited 2022 May 12]. Available from: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/331423/9789240000346-spa.pdf>
27. Muir KW, Santiago-Turla C, Stinnett SS, Herndon LW, Allingham RR, Challa P, et al. Health literacy and adherence to glaucoma therapy. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 2006 [cited 2022 May 12];142(2). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16876500/>
28. Foster CS, Azar DT, Dohlman CH. Smolin and Thoft's the cornea: scientific foundations and clinical. 2005 [cited 2022 May 12];15–199. Available from: https://books.google.com/books/about/Smolin_and_Thoft_s_The_Cornea.html?hl=es&id=93s6aes5ob0C
29. JW R. Chronology of pterygium therapy. *Am J Ophthalmol* [Internet]. 1953 [cited 2021 Sep 23];36(11):1601–16. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13104571/>
30. Fonseca EC, Rocha EM, Arruda GV. Comparison among adjuvant treatments for primary pterygium: A network meta-analysis. *Br J Ophthalmol*

[Internet]. 2018 Jun;102(6):748–56. Available from:

<http://bjo.bmj.com/lookup/doi/10.1136/bjophthalmol-2017-310288>

31. Coroneo MT, Di Girolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia [Internet]. Vol. 10, Current Opinion in Ophthalmology. 1999. p. 282–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10621537>
32. Ochoa-Tabares JC. Génesis del pterigión. Una aproximación desde la biología molecular. Rev Mex Oftalmol. 2006;80(6):318–24.
33. Shirzadeh E, Najafi M, Nazarzadeh M, Fazli G, Falanji F, Aldaghi LS, et al. Expression of pluripotency markers, SOX2 and OCT4, in pterygium development. Crit Rev Eukaryot Gene Expr [Internet]. 2018 [cited 2020 Aug 9];28(2):155–62. Available from: <http://www.dl.begellhouse.com/journals/6dbf508d3b17c437,7a37fedb5a79c722,555771663e25c6f6.html>
34. Cui YH, Feng QY, Liu Q, Li HY, Song XL, Hu ZX, et al. Posttranscriptional regulation of MMP-9 by HuR contributes to IL-1 β -induced pterygium fibroblast migration and invasion. J Cell Physiol [Internet]. 2020 Jun 1 [cited 2020 Aug 23];235(6):5130–40. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcp.29387>
35. Kit Chu W, Lam Choi H, Bhat AK, Jhanji V. Pterygium: new insights [Internet]. Eye (Basingstoke). Springer Nature; 2020. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32029918>
36. F R, M K, E H, A Y, M S, H H. Prevalence and risk factors of pterygium: a systematic review and meta-analysis. Surv Ophthalmol [Internet]. 2018 Sep 1 [cited 2021 Oct 5];63(5):719–35. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29551597/>
37. Ma K, Xu L, Jie Y, Jonas JB. Prevalence of and factors associated with pterygium in adult Chinese: the Beijing Eye Study. Cornea [Internet]. 2007

Dec [cited 2021 Nov 11];26(10):1184–6. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18043173/>

38. Campagna G, Adams M, Wang L, Khandelwal S, Al-Mohtaseb Z. Comparison of pterygium recurrence rates among different races and ethnicities after primary pterygium excision by surgeons in training. *Cornea* [Internet]. 2018 Feb [cited 2020 Apr 3];37(2):199–204. Available from: <http://journals.lww.com/00003226-201802000-00013>
39. West S, Muñoz B. Prevalence of pterygium in Latinos: Proyecto VER. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2009 Oct [cited 2020 Nov 23];93(10):1287–90. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19570772/>
40. Tortolero G, Narro J. [Epidemiologic characteristics of pterygium in a rural community of Tlaxcala]. *Salud Publica Mex* [Internet]. 1984;26(1):26–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6719269>
41. Shahraki T, Arabi A, Feizi S. Pterygium: an update on pathophysiology, clinical features, and management. *Ther Adv Ophthalmol*. 2021 Jan;13:251584142110201.
42. SC C, DN H, PY Y, CY L, CW N, SF Y, et al. Ultraviolet-A irradiation upregulated urokinase-type plasminogen activator in pterygium fibroblasts through ERK and JNK pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2013 Feb [cited 2021 Sep 7];54(2):999–1007. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23322578/>
43. Zhou WP, Zhu YF, Zhang B, Qiu WY, Yao YF. The role of ultraviolet radiation in the pathogenesis of pterygia (Review). Vol. 14, *Molecular Medicine Reports*. Spandidos Publications; 2016. p. 3–15.
44. Josifovska N, Szabó DJ, Nagymihály R, Veréb Z, Facskó A, Eriksen K, et al. Cultivation and characterization of pterygium as an ex vivo study model for disease and therapy. *Contact Lens Anterior Eye* [Internet]. 2017 Oct 1 [cited

2020 Mar 25];40(5):283–92. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28550976>

45. Uthaithammarat L, Kasetsuwan N, Chongpison Y, Kasetsuwan P, Reinprayoon U, Nilyanimit P, et al. Lack of HPV in pterygium with no evidence of autoinoculation and the role of cytokines in pterygium with dry eye. *Sci Rep* [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Feb 10];11(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33531557/>
46. Livezeanu C, Crăițoiu MMC, Mănescu R, Mocanu C, Crăițoiu Ș. Angiogenesis in the pathogenesis of pterygium. *Rom J Morphol Embryol* [Internet]. 2011;52(3):837–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892527>
47. Martínez-Ezquerro J, Herrera L. Angiogénesis: VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cáncer. Vol. 1, *Cancerología*. 2006.
48. Loeb LA. Mutator Phenotype. In: *Encyclopedia of Cancer* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011 [cited 2020 May 9]. p. 2416–9. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-16483-5_3561
49. Hu PS, Chang WS, Chou AK, Hsia NY, Hung YW, Lin CW, et al. The Association of MMP-8 Genotypes with Pterygium. *In Vivo* [Internet]. 2018 Jan 1 [cited 2022 May 12];32(1):41–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29275297/>
50. Hu PS, Wang YC, Liao CH, Hsia NY, Wu MF, Yang JS, et al. The Association of MMP7 Genotype With Pterygium. *In Vivo* [Internet]. 2020 [cited 2022 May 12];34(1):51–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31882462/>
51. An MX, Wu KL, Lin SC. Detection and comparison of matrix metalloproteinase in primary and recurrent pterygium fibroblasts. *Int J*

- Ophthalmol [Internet]. 2011 [cited 2022 May 12];4(4):353–6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22553679/>
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(5):695–706.
 53. Kim YH, Jung JC, Gum S II, Park S Bin, Ma JY, Kim Y II, et al. Inhibition of pterygium fibroblast migration and outgrowth by bevacizumab and cyclosporine A involves down-regulation of matrix metalloproteinases-3 and -13. *PLoS One*. 2017 Jan 1;12(1).
 54. Gu G, Xia H, Hu Q, Liu Z, Jiang M, Kang T, et al. PEG-co-PCL nanoparticles modified with MMP-2/9 activatable low molecular weight protamine for enhanced targeted glioblastoma therapy. *Biomaterials*. 2013 Jan 1;34(1):196–208.
 55. Christensen J, Shastri VP. Matrix-metalloproteinase-9 is cleaved and activated by Cathepsin K. *BMC Res Notes [Internet]*. 2015 Jul 29 [cited 2022 May 27];8(1):322. Available from: </pmc/articles/PMC4518881/>
 56. Cameron ME. Histology of pterygium: an electron microscopic study. *Br J Ophthalmol [Internet]*. 1983 [cited 2022 May 13];67(9):604. Available from: </pmc/articles/PMC1040139/?report=abstract>
 57. Janson BJ, Sikder S. Surgical management of pterygium. Vol. 12, *Ocular Surface*. Elsevier Inc.; 2014. p. 112–9.
 58. Graue-Hernandez EO, Córdoba A, Jimenez-Corona A, Ramirez-Miranda A, Navas A, Serna-Ojeda JC, et al. Practice Patterns in the Management of Primary Pterygium: A Survey Study [Internet]. Vol. 38, *Cornea*. Lippincott Williams and Wilkins; 2019 [cited 2020 Apr 3]. p. 1339–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31403528>
 59. Röck T, Bramkamp M, Bartz-Schmidt KU, Röck D. A retrospective study to

compare the recurrence rate after treatment of pterygium by conjunctival autograft, primary closure, and amniotic membrane transplantation. *Med Sci Monit.* 2019;25:7976–81.

60. Philippeos C, Hughes RD, Dhawan A, Mitry RR. Introduction to cell culture. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2012 [cited 2022 Jun 10];806:1–13. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22057441/>
61. Takebayashi M. [Histological study of pterygium]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* [Internet]. 1966 [cited 2021 Oct 14];457–70. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5951656/>
62. MORI S. [Studies on the pterygium. II. Clinical and histological investigation on the pterygium]. *Nihon Ganka Gakkai Zasshi* [Internet]. 1961 [cited 2021 Oct 14];1069–80. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13772637/>
63. Briceño Rossi AL, Roys C De. Trabajo experimental sobre pterigion. *Gac Med Caracas* [Internet]. 1962 [cited 2021 Oct 14];119–23. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13873011/>
64. WJ L, J L, WE C. Pterygium tissue culture histoimmunological study. *Arch Ophthalmol (Chicago, Ill 1960)* [Internet]. 1970 [cited 2021 Oct 14];83(4):402–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/5437899/>
65. F van der Z, E van der Z, B D. [Ultrastructural studies on the pterygium. I. Epithelium and glands of the conjunctival part (author's transl)]. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* [Internet]. 1975 Sep [cited 2021 Oct 14];193(3):161–75. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1078958/>
66. F van der Z, E van der Z, B D. [Ultrastructural studies on the pterygium. II. Connective tissue, vessels and nerves of the conjunctival part (author's transl)]. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* [Internet]. 1975 [cited 2021 Oct 14];193(3):177–87. Available from:

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1078959/>

67. KS R, V G, LP A. Mast cells and pterygium. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 1976 [cited 2021 Oct 14];54(3):363–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/988951/>
68. Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 1993 [cited 2021 Oct 13];77(11):734. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC504636/>
69. Di Girolamo N, Tedla N, Kumar RK, McCluskey P, Lloyd A, Coroneo MT, et al. Culture and characterisation of epithelial cells from human pterygia. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 1999 [cited 2020 Nov 10];83(9):1077–82. Available from: [/pmc/articles/PMC1723209/?report=abstract](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1723209/?report=abstract)
70. Di Girolamo N, Wakefield D, Coroneo MT. Doxycycline's and ocular angiogenesis [Internet]. Vol. 118, *Ophthalmology*. 2011. p. 789–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21459227>
71. Kwok LS, Coroneo MT. A model for pterygium formation. *Cornea* [Internet]. 1994 [cited 2022 May 30];13(3):219–24. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8033571/>
72. Cao D, Chu WK, Ng TK, Yip YWY, Young AL, Pang CP, et al. Cellular Proliferation and Migration of Human Pterygium Cells: Mitomycin Versus Small-Molecule Inhibitors. *Cornea* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2020 Aug 22];37(6):760–6. Available from: <http://journals.lww.com/00003226-201806000-00016>
73. Protasoni M, Kroon AM, Taanman JW. Mitochondria as oncotarget: A comparison between the tetracycline analogs doxycycline and COL-3. *Oncotarget*. 2018;9(73):33818–31.
74. Wang SQ, Zhao BX, Liu Y, Wang YT, Liang QY, Cai Y, et al. New application of an old drug: Antitumor activity and mechanisms of doxycycline in small cell

lung cancer. *Int J Oncol* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2020 Aug 15];48(4):1353–60. Available from: <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijo.2016.3375>

75. Larrayoz IM, Ruá O, Velilla S, Martínez A. Transcriptomic profiling explains racial disparities in pterygium patients treated with doxycycline. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2014 Oct 1;55(11):7553–61. Available from: <http://iovs.arvojournals.org/article.aspx?doi=10.1167/iovs.14-14951>
76. Tang X, Wang X, Zhao YY, Curtis JM, Brindley DN. Doxycycline attenuates breast cancer related inflammation by decreasing plasma lysophosphatidate concentrations and inhibiting NF- κ B activation. *Mol Cancer* [Internet]. 2017 Dec 8 [cited 2020 Aug 15];16(1):36. Available from: <http://molecular-cancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12943-017-0607-x>
77. Gomes JR, Omar NF, Neves J d. S, Novaes PD. Doxycycline reduces the expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in the periodontal ligament of the rat incisor without altering the eruption process. *J Periodontal Res* [Internet]. 2017 Jun 1 [cited 2020 Aug 15];52(3):353–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/jre.12398>
78. Samartzis EP, Fink D, Stucki M, Imesch P. Doxycycline reduces MMP-2 activity and inhibits invasion of 12Z epithelial endometriotic cells as well as MMP-2 and -9 activity in primary endometriotic stromal cells in vitro. *Reprod Biol Endocrinol* [Internet]. 2019 Apr 13 [cited 2020 Aug 15];17(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31213768/>
79. Saeed M, Arun MZ, Guzeloglu M, Onursal C, Gokce G, Korkmaz CG, et al. Low-dose doxycycline inhibits hydrogen peroxide-induced oxidative stress, MMP-2 up-regulation and contractile dysfunction in human saphenous vein grafts. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2019 [cited 2020 Aug 15];13:1791–801. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31213768/>
80. Hadjimichael AC, Foukas AF, Savvidou OD, Mavrogenis AF, Psyrris AK,

Papagelopoulos PJ. The anti-neoplastic effect of doxycycline in osteosarcoma as a metalloproteinase (MMP) inhibitor: a systematic review. *Clin Sarcoma Res* 2020 101 [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2021 Jul 22];10(1):1–10. Available from: <https://clinicalsarcomaresearch.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13569-020-00128-6>

81. Zhang Z, Yang WZ, Zhu ZZ, Hu QQ, Chen YF, He H, et al. Therapeutic effects of topical doxycycline in a benzalkonium chloride-induced mouse dry eye model. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2014 May 6 [cited 2020 Aug 24];55(5):2963–74. Available from: www.iovs.org
82. Yi Q, Zou WJ. The Wound Healing Effect of Doxycycline after Corneal Alkali Burn in Rats. *J Ophthalmol*. 2019;2019.
83. Lamy S, Lachambre MP, Lord-Dufour S, Béliveau R. Propranolol suppresses angiogenesis in vitro: Inhibition of proliferation, migration, and differentiation of endothelial cells. *Vascul Pharmacol* [Internet]. 2010 Nov [cited 2020 May 9];53(5–6):200–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1537189110001126>
84. González-Díaz M del P, Ramos-Gómez LI, Yañez-Sánchez JM, Marines-Sánchez HM, Páez-Garza JH. Uso sistémico de propranolol en el tratamiento de hemangiomas infantiles. *Rev Mex Oftalmol*. 2011;85(4):205–14.
85. Annabi B, Lachambre M-P, Plouffe K, Moumdjian R, Béliveau R. Propranolol adrenergic blockade inhibits human brain endothelial cells tubulogenesis and matrix metalloproteinase-9 secretion. *Pharmacol Res* [Internet]. 2009 Nov;60(5):438–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19467330>
86. Xu T, Xiao X, Zheng S, Zheng J, Zhu H, Ji Y, et al. Antiangiogenic effect of propranolol on the growth of the neuroblastoma xenografts in nude mice. In:

Journal of Pediatric Surgery [Internet]. 2013 [cited 2020 May 9]. p. 2460–5.

Available from:

<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022346813006830>

87. Wu S, Wang B, Chen L, Xiong S, Zhuang F, Huang X, et al. Clinical efficacy of propranolol in the treatment of hemangioma and changes in serum VEGF, bFGF and MMP-9. *Exp Ther Med* [Internet]. 2015 Sep 1 [cited 2020 Aug 25];10(3):1079–83. Available from:
</pmc/articles/PMC4533170/?report=abstract>
88. Taran K, Wnęk A, Kobos J, Andrzejewska E, Przewratil P. Tissue and serum mRNA profile of MMPs-2/9 as a potential novel biomarker for the most individual approach in infantile hemangiomas and cancer disease. *Immunobiology* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2020 Aug 25];222(11):1035–42. Available from:
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0171298517300980>
89. Sun B, Dong C, Lei H, Gong Y, Li M, Zhang Y, et al. Propranolol inhibits proliferation and invasion of hemangioma-derived endothelial cells by suppressing the DLL4/Notch1/Akt pathway. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2018 Oct 1 [cited 2020 Aug 25];294:28–33. Available from:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30130526/>
90. Zhao F, Yang X, Xu G, Bi J, Lv R, Huo R. Propranolol suppresses HUVEC viability, migration, VEGF expression, and promotes apoptosis by downregulation of miR-4295. *J Cell Biochem* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2020 Aug 25];120(4):6614–23. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jcb.27957>
91. Padrini L, Isacchi B, Bilia AR it., Pini A, Lanzi C, Masini E, et al. Pharmacokinetics and local safety profile of propranolol eye drops in rabbits. *Pediatr Res* [Internet]. 2014 Oct 1 [cited 2020 Aug 24];76(4):378–85. Available from: <https://www.nature.com/articles/pr2014108>

92. Filippi L, Cavallaro G, Berti E, Padrini L, Araimo G, Regiroli G, et al. Propranolol 0.2% Eye Micro-Drops for Retinopathy of Prematurity: A Prospective Phase IIB Study. *Front Pediatr* [Internet]. 2019 May 7 [cited 2020 Nov 10];7(MAY):180. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fped.2019.00180/full>
93. Zavala J, Hernandez-Camarena JC, Salvador-Gálvez B, Pérez-Saucedo JE, Vela-Martinez A, Valdez-García JE. Extracellular matrix and fibroblast injection produces pterygium-like lesion in rabbits. *Biol Res* [Internet]. 2018 Jan 3 [cited 2020 Feb 10];51(1):15. Available from: <https://biolres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40659-018-0165-8>
94. Barclay C, Li AW, Geldenhuys L, Baguma-Nibasheka M, Porter GA, Veugelers PJ, et al. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) overexpression is a risk factor for esophageal cancer recurrence and reduced survival, which is ameliorated by coexpression of the FGF-2 antisense gene. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2005 Nov 1 [cited 2021 Nov 17];11(21):7683–91. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16278388/>
95. Powe DG, Voss MJ, Zänker KS, Habashy HO, Green AR, Ellis IO, et al. Beta-blocker drug therapy reduces secondary cancer formation in breast cancer and improves cancer specific survival. *Oncotarget* [Internet]. 2010 [cited 2022 Aug 8];1(7):628–38. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21317458/>
96. Pasquier E, Ciccolini J, Carre M, Giacometti S, Fanciullino R, Pouchy C, et al. Propranolol potentiates the anti-angiogenic effects and anti-tumor efficacy of chemotherapy agents: implication in breast cancer treatment. *Oncotarget* [Internet]. 2011 [cited 2022 Aug 8];2(10):797–809. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22006582/>
97. Işeri ÖD, Sahin FI, Terzi YK, Yurtcu E, Erdem SR, Sarialioglu F. beta-Adrenoreceptor antagonists reduce cancer cell proliferation, invasion, and

migration. *Pharm Biol* [Internet]. 2014 Nov 1 [cited 2022 Aug 8];52(11):1374–81. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25026350/>

98. Zhang D, Ma Q, Shen S, Hu H. Inhibition of pancreatic cancer cell proliferation by propranolol occurs through apoptosis induction: the study of beta-adrenoceptor antagonist's anticancer effect in pancreatic cancer cell. *Pancreas* [Internet]. 2009 Jan [cited 2022 Aug 8];38(1):94–100. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19106745/>
99. Liu W, Sha X, Wen Y, Zhao W, Luo W, Hua Z. Effect of Avastin on the migration and invasion of pterygium fibroblasts - PubMed. *Eye Sci* [Internet]. 2014 [cited 2022 Aug 8];29(4):214–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26016073/>
100. Sivak JM, Fini ME. MMPs in the eye: emerging roles for matrix metalloproteinases in ocular physiology. *Prog Retin Eye Res* [Internet]. 2002 [cited 2022 Aug 8];21(1):1–14. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11906808/>
101. Yang SF, Lin CY, Yang PY, Chao SC, Ye YZ, Hu DN. Increased expression of gelatinase (MMP-2 and MMP 9) in pterygia and pterygium fibroblasts with disease progression and activation of protein kinase C. *Investig Ophthalmol Vis Sci* [Internet]. 2009 [cited 2020 Nov 24];50(10):4588–96. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19420332/>
102. Di Girolamo N, McCluskey P, Lloyd A, Coroneo MT, Wakefield D. Expression of MMPs and TIMPs in human pterygia and cultured pterygium epithelial cells. *Investig Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(3):671–9.
103. Li DQ, Lee SB, Gunja-Smith Z, Liu Y, Solomon A, Meller D, et al. Overexpression of collagenase (MMP-1) and stromelysin (MMP-3) by pterygium head fibroblasts. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(1):71–80.
104. Di Girolamo N, Coroneo MT, Wakefield D. UVB-Elicited Induction of MMP-1

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Expression in Human Ocular Surface Epithelial Cells Is Mediated through the ERK1/2 MAPK-Dependent Pathway. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2003 Nov 1;44(11):4705–14.



XI. ANEXO

Asunto: Respuesta por Comité de Bioética

**IBT. IVAN DELGADO ALVARADO
ALUMNO DE LA MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA
P R E S E N T E .**

Informo a Usted, que de acuerdo a la reunión sostenida con el Comité Institucional de Bioética donde fueron aprobados los aspectos éticos científicos del protocolo de Investigación titulado **"Evaluación de la expresión genética de factores angiogénicos de cultivo celular de pterigión, posterior a la aplicación de doxiciclina y propranolol"**

Sin otro particular, aprovecho la oportunidad para enviarle un atento y cordial saludo.

**ATENTAMENTE
"SE LUMEN PROFERRE "
Aguascalientes, Ags., 29 de octubre de 2021**

**DRA. PAULINA ANDRADE LOZANO
PRESIDENTE DEL COMITÉ INSTITUCIONAL DE BIOÉTICA**

c.c.p. M.C.O. Elizabeth Casillas Casillas.-Directora General de Investigación y Posgrado
Archivo.

 UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES DIRECCIÓN GENERAL DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO	
NOMBRE	<i>[Signature]</i>
FIRMA	<i>[Signature]</i>
FECHA	<i>13/enero/2022</i>

Anexo 2. Carta de consentimiento informado para pacientes donadores de tejido ocular enfermo

El que suscribe, IBT. Ivan Delgado Alvarado, investigador principal del proyecto “Evaluación de la expresión genética de factores angiogénicos de cultivo celular de pterigión, posterior a la aplicación de doxiciclina y propranolol”, por medio de la presente se le solicita a usted C. _____ paciente que con pleno uso de sus facultades mentales, de manera libre, voluntaria y no condicionada a la realización de su cirugía de escisión de pterigión, me otorgue el derecho de disponer del tejido que será extraído, tejido del pterigión, que se encuentra en la conjuntiva causándole problema para realizar un cultivo celular que sirva como modelo de la enfermedad para la generación de nuevos conocimientos y desarrollo de un posible tratamiento relacionado a la progresión de la afección, es necesario recalcar que podrá ser usado para beneficiar la vida de personas con el padecimiento, disminuir la recurrencia post cirugía e incluso lograr su regresión. De manera análoga le hacemos saber que su información genética no será de ninguna manera almacenada y es nuestro compromiso mantener el anonimato de su persona durante el desarrollo del proyecto, así como tratar sus células con el mayor respeto y dignidad posibles.

Firmo de consentimiento informado, ya que yo C. _____
_____ he leído y comprendido la información que así se me presenta para donar mi tejido enfermo.

Persona que otorga el consentimiento

Investigador principal

