



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA
NEUROINMUNE EN EL PTERIGIÓN

PRESENTA

Sofía Guadalupe Ocón García

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA

TUTORES

Dr. Luis Fernando Barba Gallardo

Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORIAL

Dr. Javier Ventura Juárez

Aguascalientes, Ags; 01 de febrero del 2024

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

CARTA DE VOTO APROBATORIO
COMITÉ TUTORIAL

DR. SERGIO RAMÍREZ GONZÁLEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS DE LA SALUD

P R E S E N T E

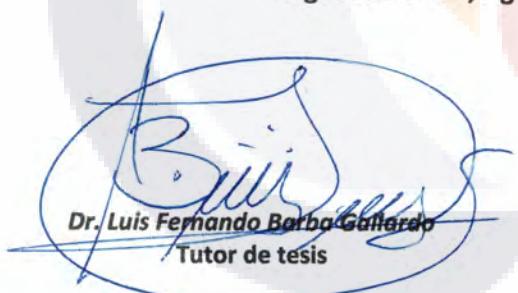
Por medio del presente como **Miembros del Comité Tutorial** designado de la estudiante **OCÓN GARCÍA SOFÍA GUADALUPE** con ID **202529** quien realizó la tesis titulada: **CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROINMUNE EN EL PTERIGIÓN**, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

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

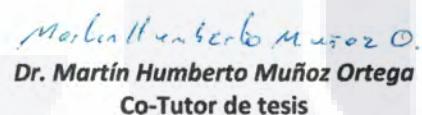
A T E N T A M E N T E

"Se Lumen Proferre"

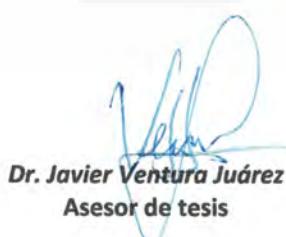
Aguascalientes, Ags., a 01 de febrero de 2024.



Dr. Luis Fernando Barba Gallardo
Tutor de tesis



Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Co-Tutor de tesis



Dr. Javier Ventura Juárez
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/Dept. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

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

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa:

14/02/2024

NOMBRE: SOFÍA GUADALUPE OCÓN GARCÍA

ID 202529

PROGRAMA: MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA LGAC (del posgrado): Biomedicina Molecular y Celular

TIPO DE TRABAJO: (X) Tesis () Trabajo Práctico

TITULO: CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROINMUNE EN EL PTERIGIÓN.

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): El trabajo realizado abona al conocimiento de la respuesta neuroinmune y comprensión de la inervación del pterigón para generar propuestas de tratamiento en un futuro. Cabe resaltar que esta tesis aporta conocimiento nuevo que no se había explorado previamente.

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

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

<i>SI</i>	El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
<i>SI</i>	La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
<i>SI</i>	Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
<i>SI</i>	Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
<i>SI</i>	Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
<i>SI</i>	El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
<i>SI</i>	Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
<i>SI</i>	Generó transferencia del conocimiento o tecnológica
<i>SI</i>	Cumple con la ética para la investigación (reporte de la herramienta antiplagio)

El egresado cumple con lo siguiente:

<i>SI</i>	Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
<i>SI</i>	Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
<i>SI</i>	Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
<i>SI</i>	Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
<i>SI</i>	Coincide con el título y objetivo registrado
<i>SI</i>	Tiene congruencia con cuerpos académicos
<i>SI</i>	Tiene el CVU del Conacyt actualizado
<i>N/A</i>	Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados

<i>N/A</i>	Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
<i>N/A</i>	El estudiante es el primer autor
<i>N/A</i>	El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
<i>N/A</i>	En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
<i>N/A</i>	Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
<i>N/A</i>	La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

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

Sí X

No _____

Elaboró:

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

FIRMAS

DR. RICARDO EBNESTO RAMÍREZ OROZCO

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. LUIS FERNANDO BARBA GALLARDO

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

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DR. SERGIO RAMÍREZ GONZÁLEZ

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.

The Ocular Surface
Characterization of the neuroimmune response in pterygium.
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	High Impact Original Research Report
Keywords:	pterygium, neuroimmunomodulation, sympathetic nervous system
Corresponding Author:	Luis Fernando Barba, PhD Universidad Autónoma de Aguascalientes Aguascalientes, Aguascalientes MEXICO
First Author:	Luis Fernando Barba, PhD
Order of Authors:	Luis Fernando Barba, PhD Sofía Guadalupe Ocon Garcia Gloria Stephanie Villa Jaimes Martin Humberto Muñoz Ortega Ventura Juárez Javier
Abstract:	<p>Abstract</p> <p>Introduction: Pterygium is a fibrotic epithelial growth on the cornea generated by ultraviolet light damage to the stem cells of the limbus. Various authors have demonstrated the action of the sympathetic nervous system in inflammation and fibrosis, however, its relationship in the pathogenesis of pterygium has not been studied, so the objective of this study is to characterize the neuroimmune interaction in inflammation and fibrogenesis of the pterygium.</p> <p>Methods: 16 surgical specimens of primary pterygium and 4 conjunctiva tissues were studied, observing their morphology with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome stains. The gene expression of adrenergic receptors, inflammatory and fibrogenic cytokines was also analyzed, and both adrenergic receptors and tyrosine hydroxylase, a key enzyme in the synthesis of norepinephrine, were located in the tissues by immunohistochemistry, evaluating the interaction of this enzyme with the cells of the system immune by immunofluorescence.</p> <p>Results: An increase in the expression of pro-inflammatory, fibrogenic and adrenergic genes was found in the pterygium compared to the healthy conjunctiva. Adrenergic receptors and tyrosine hydroxylase were in the basal region of the epithelium and in blood vessels, in close relationship with immune cells.</p> <p>Conclusion: There is a neuroimmunomodulation involved in the pathogenesis of pterygium through the activation of the sympathetic nervous system. At the intravascular level, norepinephrine favors the migration of immune cells, perpetuating inflammation. Likewise, sympathetic nerve fibers located at the subepithelial level promote epithelial growth and fibrosis of the pterygium.</p>
Suggested Reviewers:	Urzula Medina, PhD ursula.medina@uaslp.mx Johana Garzon decano.optometria@uan.edu.co
Opposed Reviewers:	

PDF for submission to The Ocular Surface requires approval

De: em.theocularsurface.0.895a41.72d77109@editorialmanager.com <em.theocularsurface.0.895a41.72d77109@editorialmanager.com> en nombre de The Ocular Surface <em@editorialmanager.com>

Enviado: lunes, 12 de febrero de 2024 10:07 a. m.

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

Asunto: PDF for submission to The Ocular Surface requires approval

This is an automated message.

Characterization of the neuroimmune response in pterygium.

Dear Dr Barba,

The PDF for your above referenced manuscript has been built and requires your approval. If you have already approved the PDF of your submission, this e-mail can be ignored.

Please review the PDF carefully, before approving it, to confirm it appears as you expect and is free of any errors. Once approved, no further changes can be made.

To approve the PDF, please:

* Log into Editorial Manager as an author at: <https://www.editorialmanager.com/theocularsurface/>.

* Click on the folder 'Submissions Waiting for Author's Approval' to view and approve your submission PDF. You may need to click on 'Action Links' to expand your Action Links menu.

* Confirm you have read and agree with Elsevier's Ethics in Publishing statement by ticking the relevant box.

Once the above steps are complete, you will receive an e-mail confirming receipt of your submission.

We look forward to receiving your approval.

Kind regards,
The Ocular Surface

More information and support

FAQ: How can I approve my submission?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/5959/p/10523/supporthub/publishing/

Confirm co-authorship of submission to The Ocular Surface

From: em.theocularsurface.0.895a44.9a877002@editorialmanager.com <em.theocularsurface.0.895a44.9a877002@editorialmanager.com> on behalf of The Ocular Surface
<em@editorialmanager.com>

Sent: Monday, February 12, 2024 10:10:39 AM

To: SOFIA GUADALUPE OCON GARCIA <al202529@edu.uaa.mx>

Subject: Confirm co-authorship of submission to The Ocular Surface

This is an automated message.

Journal: The Ocular Surface

Title: Characterization of the neuroimmune response in pterygium.

Corresponding Author: Dr Luis Fernando Barba

Co-Authors: Sofia Guadalupe Ocon Garcia; Gloria Stephanie Villa Jaimes; Martin Humberto Muñoz Ortega; Ventura Juárez Javier

Manuscript Number: THEOCULARSURFACE-D-24-00063

Dear Sofía Guadalupe Ocon Garcia,

The corresponding author Dr Luis Fernando Barba has listed you as a contributing author of the following submission via Elsevier's online submission system for The Ocular Surface.

Submission Title: Characterization of the neuroimmune response in pterygium.

Elsevier asks all authors to verify their co-authorship by confirming agreement to publish this article if it is accepted for publication.

Please read the following statement and confirm your agreement by clicking on this link: [Yes, I am affiliated.](#)

I irrevocably authorize and grant my full consent to the corresponding author of the manuscript to: (1) enter into an exclusive publishing agreement with Elsevier on my behalf (or, if the article is to be published under a CC BY license, a non-exclusive publishing agreement), in the relevant form set out at www.elsevier.com/copyright; and (2) unless I am a US government employee, to transfer my copyright or grant an exclusive license of rights (or for CC BY articles a non-exclusive license of rights) to Elsevier as part of that publishing agreement, effective on acceptance of the article for publication. If the article is a work made for hire, I am authorized to confirm this on behalf of my employer. I agree that the copyright status selected by the corresponding author for the article if it is accepted for publication shall apply and that this agreement is subject to the governing law of the country in which the journal owner is located.

If you did not co-author this submission, please contact the corresponding author directly at fernando.barba@edu.uaa.mx.

Thank you,
The Ocular Surface

More information and support

FAQ: What is copyright co-author verification?

https://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/28460/supporthub/publishing/

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por otorgar los medios para la realización del estudio.

A mis profesores y tutores Dr. Fernando Barba, Dr. Martín Muñoz y Dr. Javier Ventura por su compromiso constante en la formación de nuevos jóvenes investigadores.

A la Dra. Stephanie Villa y a la QFB. Karina Capilla por su guía, amistad y apoyo durante el posgrado.

A mis abuelos Guadalupe Guerra, Antonio García, Roberto Ocón y Mercedes Reyes, a mis padres Silvia García y Roberto Ocón y a mis hermanos Roberto Ocón y Salvador Ocón por ser mi motivación y ejemplo a seguir.

A mi esposo Fernando Pegueros por tomar mi mano en cada paso hasta lograr nuestros sueños.

A todos ellos mi respeto, admiración y agradecimiento.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

A esa pequeña niña que soñó
con ser científica... ¡Lo logramos!



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Índice general

Índice de tablas o cuadros	4
Índice de gráficos o figuras	5
Acrónimos	7
Resumen.....	9
Abstract.....	10
Introducción.....	11
Anatomía de la superficie ocular.....	11
Pterigión.....	14
Antecedentes científicos	21
Fibrosis	21
Sistema nervioso simpático y su relación con la fibrosis	24
Inervación simpática y parasimpática del ojo.....	29
Justificación.....	32
Planteamiento del problema.....	32
Hipótesis	32
Hipótesis alterna	32
Hipótesis nula	32
Objetivos	33
Objetivo general.....	33
Objetivos secundarios.....	33
Materiales, pacientes y métodos.....	33
Tipo, diseño y características del estudio	33
Población de estudio.....	33

Operacionalización de las variables.....	34
Selección de la muestra.....	35
Tipo de muestreo	35
Tamaño de la muestra	35
Criterios de selección.....	36
Criterios de inclusión.....	36
Criterios de exclusión.....	36
Criterios de eliminación.....	36
Logística del estudio	36
Metodología experimental.....	38
Selección de la muestra.....	38
Reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real	39
Tinción de hematoxilina-eosina	43
Tinción tricrómica de Masson	43
Inmunohistoquímica.....	44
Inmunofluorescencia.....	46
Inmunofluorescencia de doble marcaje	47
Análisis estadístico.....	49
Consideraciones éticas	49
Recursos para el estudio	50
Recursos humanos	50
Recursos materiales	50
Recursos financieros	50
Cronograma de actividades	51
Difusión de la investigación.....	51

Resultados	52
Características de los sujetos de estudio.....	52
Descripción macroscópica del tejido.....	52
Descripción microscópica del tejido	53
Expresión de genes inflamatorios y fibrogénicos	55
Expresión de genes adrenérgicos	56
Localización de tirosina hidroxilasa y receptores adrenérgicos en el pterigión..	57
Respuesta inmunitaria en el pterigón.....	60
Relación neuroinmune en el pterigón.....	61
Discusión	63
Conclusión	65
Anexos	74

Índice de tablas o cuadros

Tabla 1. Tratamiento del pterigón.....	19
Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los receptores adrenérgicos.....	26
Tabla 3. Operacionalización de las variables	34
Tabla 4. Mix de reacción para retrotranscripción	40
Tabla 5. Programación del termociclador para retrotranscripción	40
Tabla 6. Mix para la reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real .	40
Tabla 7. Secuencia génica de los oligonucleótidos utilizados	41
Tabla 8. Programación del termociclador para reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real	42
Tabla 9. Anticuerpos primarios en inmunohistoquímica.....	45
Tabla 10. Anticuerpo secundario en inmunohistoquímica	45
Tabla 11. Anticuerpos primarios en inmunofluorescencia	46
Tabla 12. Anticuerpo secundario en inmunofluorescencia	47
Tabla 13. Anticuerpos primarios en doble inmunofluorescencia	48
Tabla 14. Anticuerpos secundarios en doble inmunofluorescencia.....	48
Tabla 15. Cronograma de actividades del proyecto de investigación	51

Índice de gráficos o figuras

Figura 1. Anatomía de la superficie ocular	11
Figura 2. Capas de la córnea	12
Figura 3. Histología conjuntival	13
Figura 4. Pterigión.....	14
Figura 5. Imagen histológica del borde del pterigón	15
Figura 6. Lesión de células del limbo por radiación ultravioleta	16
Figura 7. Origen del pterigón.....	18
Figura 8. Vía de señalización de la fibrosis	22
Figura 9. Interdependencia del daño tisular y la inflamación	23
Figura 10. Relación del sistema nervioso simpático e inmune	25
Figura 11. Estructura y localización del receptor adrenérgico alfa 1	26
Figura 12. Estructura y localización del receptor adrenérgico beta 2.....	26
Figura 13. Síntesis de catecolaminas	27
Figura 14. Neuroinmunomodulación en la fibrosis hepática.....	28
Figura 15. Inervación sensitiva, simpática y parasimpática del ojo	30
Figura 16. Ingreso de las terminaciones nerviosas a la córnea	31
Figura 17. Distribución de las fibras nerviosas en la córnea	31
Figura 18. Logística del estudio	37
Figura 19. Selección de la muestra.....	38
Figura 20. Fotografía macroscópica del pterigón	52
Figura 21. Análisis comparativo de la conjuntiva sana y pterigón	53
Figura 22. Infiltrado inflamatorio en el pterigón	54
Figura 23. Análisis de la composición del pterigón.....	55
Figura 24. Expresión relativa de genes inflamatorios y fibrogénicos.....	55
Figura 25. Expresión relativa de genes adrenérgicos	56
Figura 26. Localización de tirosina hidroxilada en el pterigón	57
Figura 27. Localización del receptor adrenérgico alfa 1 en el pterigón	58
Figura 28. Localización del receptor adrenérgico beta 2 en el pterigón	59

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Figura 29. Respuesta inmune en conjuntiva y pterigión.....	60
Figura 30. Recuento de células inmunitarias presentes en conjuntiva y pterigión	61
Figura 31. Relación neuroinmune en el pterigón.....	62



Acrónimos

- ADRA1:** Receptor adrenérgico alfa 1
ADRA1A: Receptor adrenérgico subtipo alfa 1A
ADRA1B: Receptor adrenérgico subtipo alfa 1B
ADRB2: Receptor adrenérgico beta 2
AMP cíclico: Adenosín monofosfato cíclico
bFGF: Factor de crecimiento fibroblástico básico
cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario
CMV: Citomegalovirus
COL4A1: Subunidad alfa 1 del colágeno tipo IV
DAMP: Patrones moleculares asociados al peligro
D β H: Dopamina-beta-hidroxilasa
FGF- β : Factor de crecimiento fibroblástico beta
FNMT: Feniletanolamina-N-metil-transferasa
GAPDH: Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa
IF: Inmunofluorescencia
IFN- β : Interferón beta
IHQ: Inmunohistoquímica
IL-1: Interleucina 1
IL17A: Interleucina 17-A
IL-6: Interleucina 6
IL-8: Interleucina 8
LAAD: Descarboxilasa de L-aminoácidos-aromáticos
L-dopa: L-dihidroxifenilalanina
MMPs: Matriz metaloproteinasas
MMP-1: Matriz metaloproteinasa-1 o Colagenasa -1
MMP-2: Matriz metaloproteinasa-2 o Gelatinasa A
MMP-3: Matriz metaloproteinasa-3 o Estromelisina -1
MMP-7: Matriz metaloproteinasa-7 o Metaloendopeptidasa uterina
MMP-9: Matriz metaloproteinasa-9 o Gelatinasa B

- MMP-11:** Matriz metaloproteinasa-11 o Estromelisina -3
- mRNA:** Ácido ribonucleico mensajero
- MT1-MMP:** Matriz metaloproteinasa de membrana tipo 1
- MT2-MMP:** Matriz metaloproteinasa de membrana tipo 2
- NO:** Óxido nítrico
- PAS:** Tinción de ácido peryódico de Schiff
- PDGF-B:** Factor de crecimiento beta derivado de plaquetas
- PRR:** Receptores de reconocimiento de patrones
- qPCR:** Reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real
- SMAD:** Mothers against decapentaplegic
- SMURF:** Smad ubiquitination regulatory factor
- SNPS:** Sistema nervioso parasimpático
- SNS:** Sistema nervioso simpático
- TAZ:** Tafazzin
- TGF- β :** Factor de crecimiento transformante beta
- TGFB1:** Gen del factor de crecimiento transformante beta 1
- TGF- β 2:** Factor de crecimiento transformante beta 2
- TH:** Tirosina hidroxilasa
- TIMPs:** Inhibidores tisulares específicos
- TNFA:** Gen del factor de necrosis tumoral alfa
- TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa
- UV:** Ultravioleta
- VEB:** Virus de Epstein-barr
- VEGF:** Factor de crecimiento vascular endotelial
- VHS:** Virus del herpes simple
- VPH:** Virus del papiloma humano
- Wnt1:** Wingless/Int-1
- YAP:** Yes-associated protein 1

Resumen

Introducción: El pterigón es un crecimiento epitelial fibrótico sobre la córnea generado por el daño de la luz ultravioleta sobre las células madre del limbo. Diversos autores han demostrado la acción del sistema nervioso simpático en la inflamación y fibrosis, sin embargo, no se ha estudiado su relación en la patogénesis del pterigón, por lo que el objetivo de este estudio es caracterizar la interacción neuroinmune en la inflamación y fibrogénesis del pterigón.

Métodos: Se estudiaron 16 piezas quirúrgicas de pterigón primario y 4 tejidos de conjuntiva, observando su morfología con tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson. Se analizó además la expresión génica de receptores adrenérgicos, citocinas inflamatorias, fibrogénicas, y se localizó en los tejidos por inmunohistoquímica tanto receptores adrenérgicos, como tirosina hidroxilasa, enzima clave en la síntesis de norepinefrina, evaluando la interacción de esta enzima con las células del sistema inmune por medio de inmunofluorescencia.

Resultados: Se encontró un aumento en la expresión de genes proinflamatorios, fibrogénicos y adrenérgicos en el pterigón en comparación con la conjuntiva sana. Los receptores adrenérgicos y la tirosina hidroxilasa se localizaron en la región basal del epitelio y en los vasos sanguíneos en relación estrecha con las células inmunes.

Conclusión: Existe una neuroinmunomodulación involucrada en la patogénesis del pterigón a través de la activación del sistema nervioso simpático. A nivel intravascular, la norepinefrina favorece la migración de células inmunes perpetuando la inflamación. Así mismo, las fibras nerviosas simpáticas localizadas a nivel subepitelial favorecen el crecimiento epitelial y fibrosis del pterigón.

Palabras clave: pterigón, neuroinmunomodulación, sistema nervioso simpático

Abstract

Introduction: Pterygium is a fibrotic epithelial growth on the cornea generated by ultraviolet light damage to the stem cells of the limbus. Various authors have demonstrated the action of the sympathetic nervous system in inflammation and fibrosis, however, its relationship in the pathogenesis of pterygium has not been studied, so the objective of this study is to characterize the neuroimmune interaction in inflammation and fibrogenesis of the pterygium.

Methods: 16 surgical specimens of primary pterygium and 4 conjunctiva tissues were studied, observing their morphology with hematoxylin-eosin and Masson's trichrome stains. The gene expression of adrenergic receptors, inflammatory and fibrogenic cytokines was also analyzed, and both adrenergic receptors and tyrosine hydroxylase, a key enzyme in the synthesis of norepinephrine, were located in the tissues by immunohistochemistry, evaluating the interaction of this enzyme with the cells of the system immune by immunofluorescence.

Results: An increase in the expression of pro-inflammatory, fibrogenic and adrenergic genes was found in the pterygium compared to the healthy conjunctiva. Adrenergic receptors and tyrosine hydroxylase were in the basal region of the epithelium and in blood vessels, in close relationship with immune cells.

Conclusion: There is a neuroimmunomodulation involved in the pathogenesis of pterygium through the activation of the sympathetic nervous system. At the intravascular level, norepinephrine favors the migration of immune cells, perpetuating inflammation. Likewise, sympathetic nerve fibers located at the subepithelial level promote epithelial growth and fibrosis of the pterygium.

Keywords: pterygium, neuroimmunomodulation, sympathetic nervous system

Introducción

Anatomía de la superficie ocular

La superficie ocular anatómica (figura 1) está conformada por la córnea, el limbo, la conjuntiva y la película lagrimal (1).

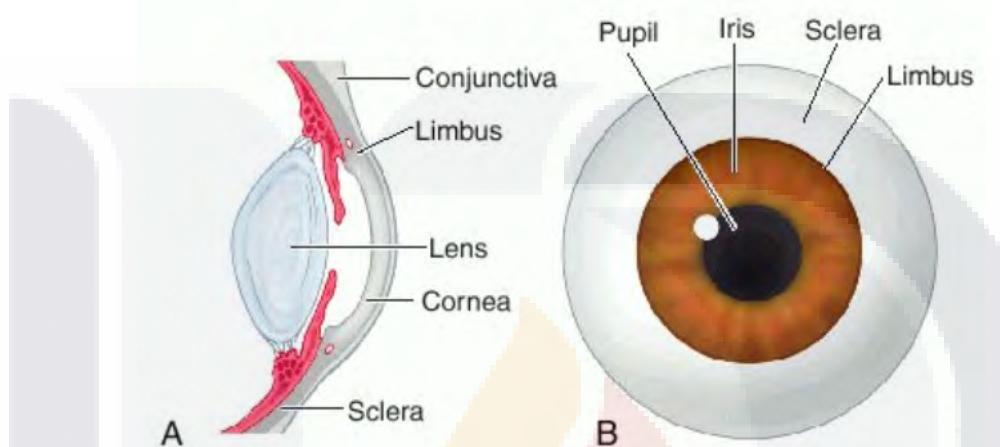


Figura 1. Anatomía de la superficie ocular

Esquema anatómico de la superficie del ojo. Imagen A señala las estructuras y su localización en un corte transversal. Imagen B muestra la cara anterior del globo ocular con sus elementos. Extraído de "Differential Distribution of Laminin N-Terminus α 31 Across the Ocular Surface: Implications for Corneal Wound Repair. Barrera, 2018 (2)".

La córnea es un tejido transparente y avascular localizado en la parte anterior del globo ocular, que ejerce función de barrera y participa en la refracción visual. En su estructura se pueden diferenciar 5 capas corneales como se muestra en la figura 2 (1,3):

1. Epitelio: Epitelio escamoso estratificado no queratinizado, de 50 μm de grosor, formado por 5 a 7 filas de células con una vida útil de 7-10 días. Estas células se distribuyen en 2 o 3 filas de células superficiales poligonales y planas, 2 o 3 filas de células en forma de ala unidas por desmosomas y uniones GAP y 1 fila de células columnares unidas a la membrana basal por hemidesmosomas. El epitelio está recubierto por una fina capa de mucina de la película lagrimal secretada por las células caliciformes de la conjuntiva (1,3).

2. Membrana de Bowman: Estructura acelular de 12 μm de grosor, formada por colágeno tipo I, V y proteoglicanos, carece de poder regenerativo (1,3).
3. Estroma corneal: Comprende el 80-85% del espesor de la córnea, está compuesto por queratocitos (fibroblastos modificados) y matriz extracelular formada por fibras de colágeno (tipo I principalmente, aunque también se encuentran algunas fibras tipo III, IV, VI y XII), glucosaminoglicanos (predominantemente queratán sulfato y en menor cantidad condroitín sulfato y dermatán sulfato). Los queratocitos sintetizan tanto la matriz extracelular como matriz metaloproteinasas para mantener la homeostasis en el tejido (1,3).
4. Membrana de Descemet: Es una lámina basal gruesa formada por el endotelio, de 7-10 μm de grosor, compuesta por colágena tipo IV y laminina (1,3).
5. Endotelio: Una capa de células con forma hexagonal, de 5 μm de grosor, con canales iónicos que regulan el contenido de agua de la córnea (1,3).

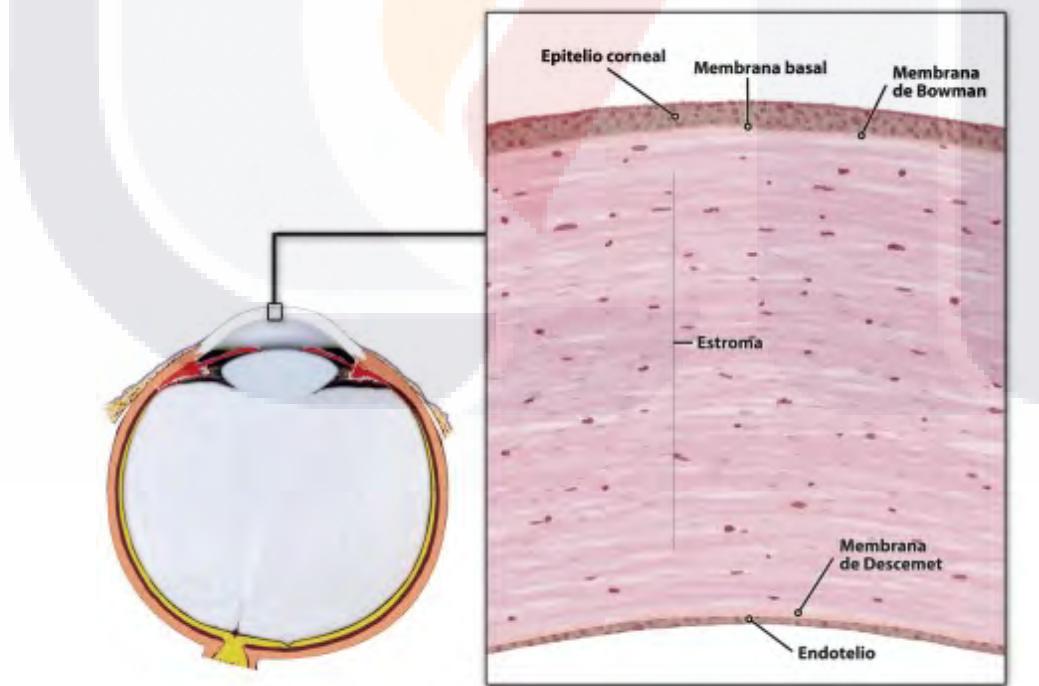


Figura 2. Capas de la córnea

Imagen histológica de la córnea X200. Extraído de “Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. Fernández, 2008 (3)”.

El limbo es la zona de transición del epitelio corneal y la esclera, está formado por epitelio estratificado no queratinizado, posee células dendríticas, linfocitos T, melanocitos y vasos sanguíneos (empalizadas de Vogt). A diferencia de la conjuntiva, no cuenta con células caliciformes. En esta zona se encuentra el nicho limbal y las células madre epiteliales limbales (3).

La conjuntiva (figura 3) abarca desde la región del limbo hasta la zona de fondo de saco de los párpados. Histológicamente está formada por epitelio escamoso estratificado no queratinizado con células caliciformes y melanocitos en su capa basal, bajo la cual se encuentra el estroma formado por tejido conectivo laxo y algunos vasos sanguíneos (1,3).

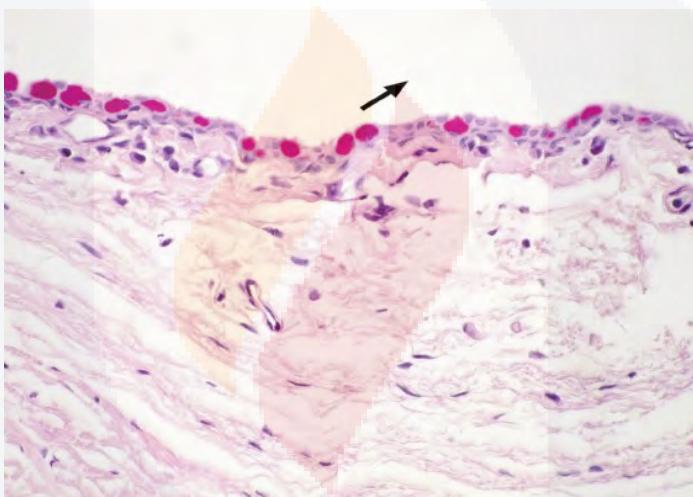


Figura 3. Histología conjuntival

Imagen histológica de la conjuntiva X400 que muestra un epitelio estratificado queratinizado con melanocitos en la capa basal y células caliciformes con tinción positiva al ácido peryódico de Schiff (PAS) señalado con la fecha negra. Bajo el epitelio se encuentra el estroma formado por tejido conectivo laxo y algunos vasos sanguíneos. Extraído de “Regeneración de la superficie ocular: stem cells/ células madre y técnicas reconstructivas. Fernández, 2008 (3)”.

Por último, se encuentra la película lagrimal, en la región más anterior de la superficie ocular, que no sólo la recubre, oxigena, lubrica e hidrata, sino que también la provee de inmunoglobulinas, lisozimas, lactoferrina y defensinas. Está formada por una capa superficial de secreciones oleosas producidas por las glándulas de Meibomio, una capa intermedia acuosa procedente de la glándula lagrimal y una capa interna de mucina, secretada principalmente por las células caliciformes (1).

Pterigión

El pterigón es una patología de la superficie ocular que consiste en la invasión corneal de la conjuntiva bulbar, tiene una característica forma de ala o triangular.

Se compone de tres partes: cabeza, cuello y cuerpo. La cabeza del pterigón se localiza en el vértice, es plana y avascular. En ella se encuentra el borde de avance que se distingue por una línea color marrón-amarillenta causada por el depósito de hemosiderina epitelial denominada línea de Stocker (figura 4), además se pueden observar zonas grisáceas en la membrana de Bowman llamadas islas de Fuchs. El cuello une la cabeza con el cuerpo del pterigón, en él se distinguen algunos nuevos vasos sanguíneos. Por último, el cuerpo del pterigón se encuentra sobre la esclera y se caracteriza por presentar múltiples vasos rectilíneos y radiales en dirección al vértice (4,5).

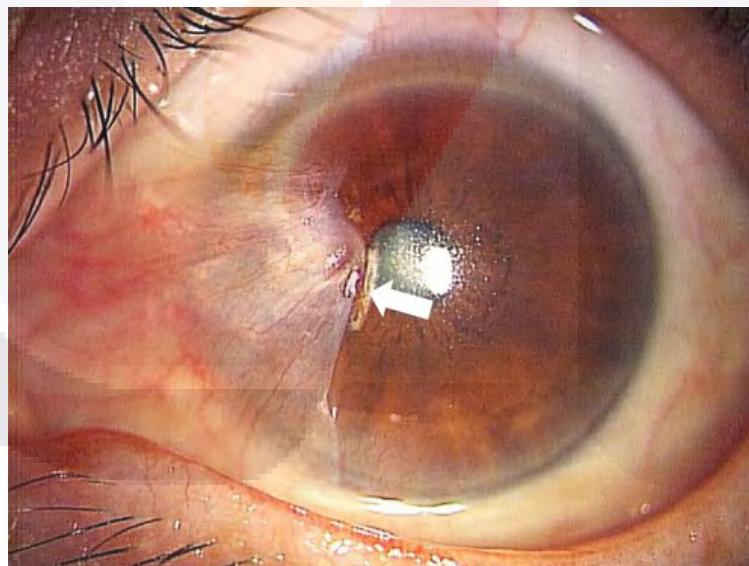


Figura 4. Pterigión

Fotografía del pterigón nasal sobre el ojo izquierdo del paciente. La flecha blanca señala la línea de Stocker de color marrón-amarillenta causada por el depósito de hierro en el tejido epitelial. Extraído de "Stocker's line in pterygium. Arai, 2017 (6)".

Histopatológicamente se caracteriza por una metaplasia escamosa que invade la córnea de forma centrípeta, acompañada de hiperplasia de células caliciformes, ruptura de la membrana de Bowman subyacente, proliferación estromal de fibroblastos, angiogénesis, infiltrado inflamatorio, depósito anormal de matriz extracelular y fibrosis (Figura 5) (7). Las fibras de colágeno tipo III son las más abundantes en el pterigón, aunque también se ha descrito la presencia de fibras de colágena tipo I, II y IV (8). De acuerdo a su componente histológico predominante se clasifica en angiomatoso, fibroso o mixto (9).

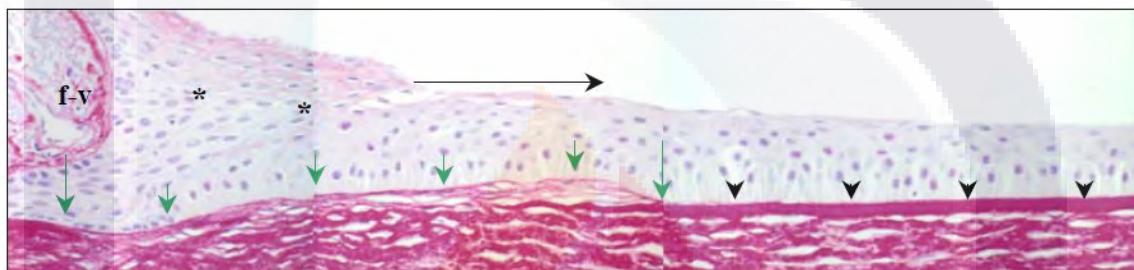


Figura 5. Imagen histológica del borde del pterigón

Tinción de rojo sirio y hematoxilina. Imagen compuesta de 3 microfotografías. **Flecha negra:** migración del pterigón hacia córnea. **f-v:** Componente fibrovascular de la neoformación. **Asterisco:** epitelio proliferante. **Flecha verde larga:** fragmentación de la membrana de Bowman. **Flechas verdes cortas:** Regiones limítrofes del tejido proliferante. **Puntas de flecha:** Membrana de Bowman intacta (X 312). Extraído de "Pathogenesis of pterygia: Role of cytokines, growth factors, and matrix metalloproteinases. Di Girolamo, 2004 (7)".

La prevalencia mundial del pterigón es de 10.2% siendo mayor en regiones cercanas al Ecuador, afectando predominantemente a adultos del sexo masculino que viven en poblaciones rurales, lo cual se asocia con actividades realizadas al aire libre (10). No se ha podido inducir la formación de pterigón en modelos animales, por lo que se considera que es una enfermedad exclusiva de los humanos (7).

El principal factor de riesgo para su desarrollo es la radiación ultravioleta (UV) (11,12). Otros factores involucrados, aunque en menor proporción son infecciones por el virus del papiloma humano (VPH) subtipos 1, 2, 5, 6, 11, 16, 18, 31, 52, 54, 59, siendo los subtipos 16 y 18 los más frecuentes, infecciones por citomegalovirus

(CMV), virus del herpes simple (VHS), virus de Epstein-barr (VEB) (13,14), factores ambientales como el polvo y viento que condicionan resequedad ocular y alteración en la película lagrimal (15), factores hereditarios con afección poligénica principalmente por inactivación de las proteínas mothers against decapentaplegic (Smad) y Smad ubiquitination regulatory factor (Smurf) (16), inmunológicos e inflamatorios (17,18) lo cual le da un carácter multifactorial.

La teoría más aceptada en su patogénesis es la teoría de las dos etapas: inicialmente, la luz UV proveniente de los rayos solares en la periferia del ojo se concentra, atravesando la cámara anterior, en el limbo más distal siendo más frecuente el limbo nasal, la intensidad en la que se enfoque la luz dependerá entonces tanto de la forma de la córnea como de la profundidad de la cámara anterior (Figura 6), esta irradiación ocasiona daño a las células madres del limbo pues se evade la protección propia del epitelio superficial (19).

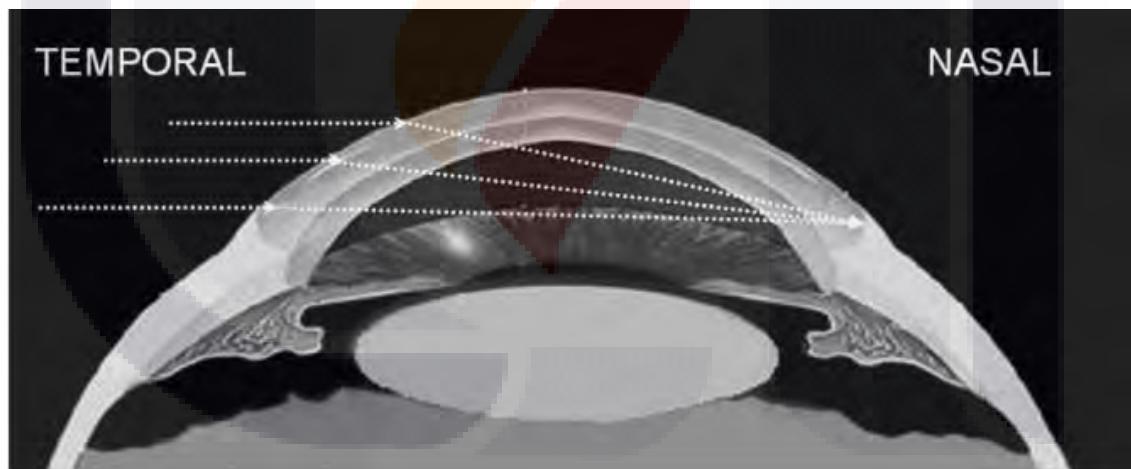


Figura 6. Lesión de células del limbo por radiación ultravioleta

La luz se enfoca en la membrana basal epitelial del limbo en el sector nasal. Extraido de "Génesis del pterigón. Una aproximación desde la biología molecular. Ochoa-Tabares, 2006 (20)".

Como segunda etapa (figura 7) se presenta la transformación del epitelio de la córnea hacia un tipo de epitelio conjuntival (19). Esta inicia con la mutación del gen supresor de tumores p53, causada por la radiación UV, dañando el mecanismo de muerte celular programada en las células madre del limbo, quienes al estar mutadas

cambian su nombre a “células pterigión”, produciendo interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento fibroblástico beta (FGF- β), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF-B), factor de crecimiento transformante beta 2 (TGF- β 2) y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), que junto con la desregulación de interferón beta (IFN- β) favorecerán el infiltrado leucocitario, perpetuarán la inflamación y el remodelado del tejido conectivo al promover la cicatrización conjuntival incrementando los fibroblastos (provenientes del tejido conectivo perivascular) y miofibroblastos (derivados de los fibroblastos residentes), así como la formación de nuevos vasos sanguíneos debido al estímulo del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el óxido nítrico (NO) generados ante el daño epitelial (20).

Tanto la luz UV, como las citocinas y factores de crecimiento, favorecen además la expresión de matriz metaloproteininas (MMPs). La colagenasa-1 (MMP-1), localizada en el epitelio del pterigón, no solo degrada el colágeno tipo III (el tipo de colágeno más abundante), sino que también presenta propiedades quimiotácticas y quimiocinéticas favoreciendo la migración celular dirigida del pterigón sobre la córnea. Además, la gelatinasa B (MMP-9), localizada en los neutrófilos intravasculares del pterigón, permite la migración y extravasación de las células inmunes por su acción proteolítica sobre la membrana basal, favoreciendo la inflamación (8).

Estas dos enzimas junto con la gelatinasa A (MMP-2), estromelisina-1 (MMP-3), metaloendopeptidasa uterina (MMP-7), estromelisina-3 (MMP-11), matriz metaloproteinasa de membrana tipo 1 (MT1-MMP) y matriz metaloproteinasa de membrana tipo 2 (MT2-MMP), degradan los hemidesmosomas de la membrana basal, favoreciendo la migración de las “células del pterigón” en todas direcciones invadiendo por completo las células basales limbales, ocasionando la disolución de la membrana de Bowman. Algunos fibroblastos entre la membrana de Bowman y la membrana basal (islas de Fuch) se activarán produciendo MMP-1 favoreciendo el avance del pterigón (21). Los inhibidores tisulares específicos (TIMPs), también

juegan un papel importante en la formación del pterigión. TIMP-1, TIMP-2 y TIMP-3 no solo inhiben las MMPs, sino que también favorecen la inflamación y la proliferación tisular del pterigón (8). Además, varias mutaciones puntuales en el gen de la elastina en los fibroblastos generarán un depósito anormal de elastina en el pterigón (20,22).

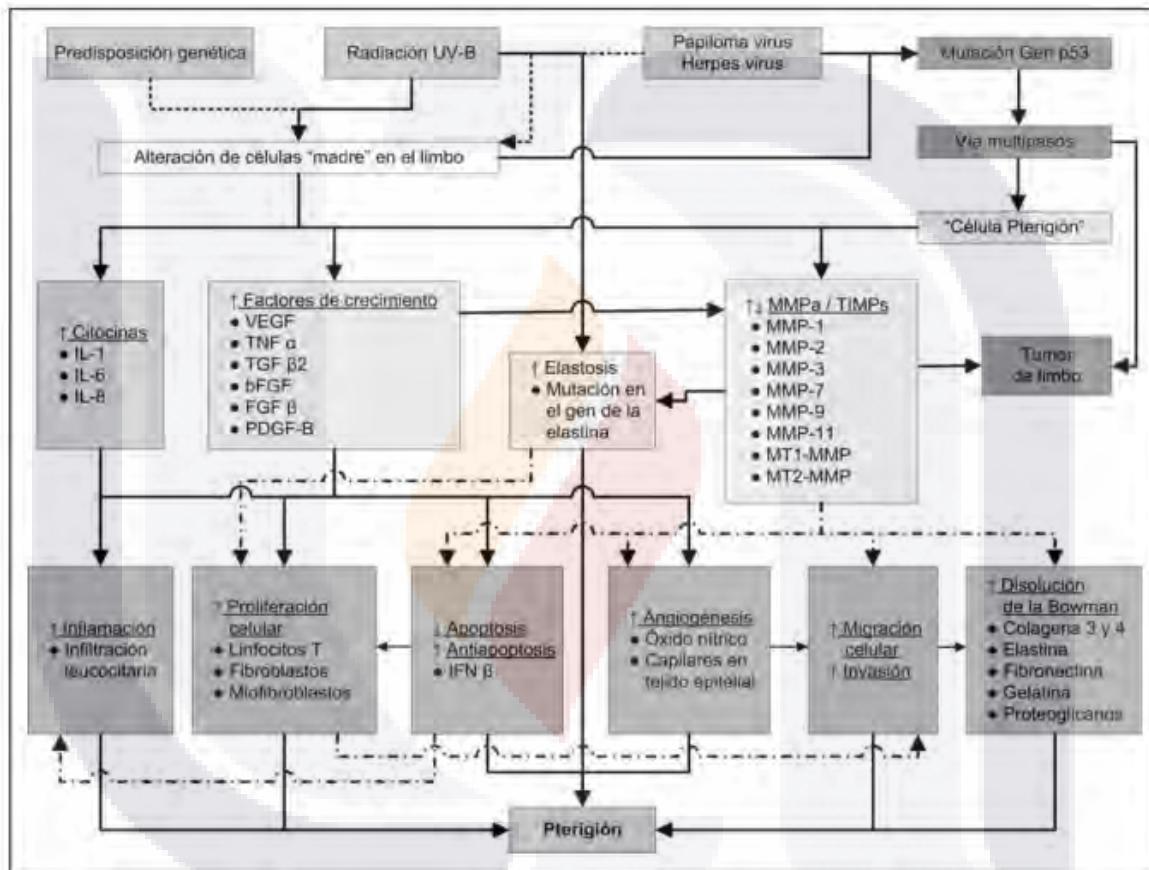


Figura 7. Origen del pterigón

Radiación UV-B: radiación ultravioleta B, **p53:** gen supresor de tumores, **IL:** interleucina, **VEGF:** factor de crecimiento vascular endotelial, **TNF-α:** factor de necrosis tumoral alfa, **TGF-β2:** factor de crecimiento transformante beta 2, **bFGF:** factor de crecimiento fibroblástico básico, **FGF-β:** factor de crecimiento fibroblástico beta, **PDGF-B:** factor de crecimiento derivado de plaquetas, **MMPs:** matriz metaloproteínasas, **MT-MMP:** inhibidores tisulares específicos de MMPs, **IFN-β:** interferón beta. Extraído de “Génesis del pterigón. Una aproximación desde la biología molecular. Ochoa-Tabares, 2006 (20)”.

El diagnóstico de pterigón es clínico, de forma inicial no presenta sintomatología, pero conforme incrementa su tamaño genera alteración de la película lagrimal

ocasionando síntomas diversos como ardor, sensación de cuerpo extraño, enrojecimiento, prurito, lagrimeo, además de alteraciones visuales como astigmatismo. En casos avanzados puede ocasionar úlceras corneales, simbléfaron, diplopía y disminución de la agudeza visual por invasión de la zona óptica (23–25).

El tratamiento tiene como objetivo lograr la extirpación del pterigón con buenos resultados cosméticos, en un tiempo quirúrgico corto, con pocas molestias postoperatorias, con una buena recuperación de la función ocular y con una tasa baja de complicaciones y de recurrencia. Así, el tratamiento debe individualizarse a cada paciente, por lo que existen diversas técnicas quirúrgicas y adyuvantes para lograr este objetivo (Tabla 1). El autoinjerto conjuntival con pegamento de fibrina es la técnica más empleada por sus buenos resultados cosméticos y su baja tasa de recurrencia (26).

Tabla 1. Tratamiento del pterigón

Técnica	Tasa de recurrencia	Complicaciones
Esclera desnuda	38-88%	Alta tasa de recurrencia
Cierre primario	45-70%	Alta tasa de recurrencia
Autoinjerto conjuntival	5.3-20%	Irritación, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, hiperemia, granuloma
Autoinjerto conjuntival con pegamento de fibrina	0-9.8%	Irritación, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, hiperemia, granuloma
Extirpación extendida de pterigón seguida de trasplante conjuntival	0.1%	Importante dolor, diplopía transitoria, úlceras corneales
Autoinjerto limbo conjuntival	0-14.29%	Granuloma de la cápsula de Tenon, hematoma, formación de pannus, pseudopterigón
Colgajo conjuntival	13-33.3%	Irritación, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, hiperemia

Mini colgajo conjuntival	6.1%	Irritación, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, hiperemia
Colgajo limbo conjuntival	7.1%	Irritación, fotofobia, sensación de cuerpo extraño, hiperemia
Injerto de membrana amniótica	14.5-27.3%	Sensación de cuerpo extraño, edema palpebral, hiperemia, granuloma piógeno, simbléfaron
Injerto de membrana amniótica con inyección esteroidea	3-9.5%	Sensación de cuerpo extraño, edema palpebral, hiperemia, granuloma piógeno, simbléfaron
Injerto de membrana amniótica con pegamento de fibrina	10-10.5%	Sensación de cuerpo extraño, edema palpebral, hiperemia, granuloma piógeno, simbléfaron
Mitomicina C (adyuvante)	3.7-4.2%	Fusión esclero-corneal, vascularización conjuntival, queratitis, escleritis infecciosa, perforación corneal, glaucoma severo, catarata
5-Fluorouracil (adyuvante)	5.83- 8.7%	Malos resultados cosméticos, excesiva vascularización
Beta-Radiación (adyuvante)	9.2%	Ulc eración escleral, escleromalacia, necrosis, catarata

Nota. Técnicas quirúrgicas y adyuvantes empleados en el tratamiento del pterigón con su tasa de recurrencia y complicaciones. Adaptado de “Surgical management of pterygium. Janson BJ, 2014 (26)”.

La recurrencia del pterigón se ha asociado a distintos factores demográficos tales como edad joven al momento de la resección, factores propios de la morfología del tejido como que éste sea carnoso, no translúcido, extenso, así como factores inherentes al procedimiento quirúrgico, por ejemplo, se ha demostrado mayor inflamación y mayor recurrencia a mayor cantidad de suturas (26). Además, con cada recurrencia, el tiempo libre de enfermedad disminuye siendo de 123 ± 113 días en la primera recurrencia y de 67 ± 47 días en la tercera (27).

Antecedentes científicos

Fibrosis

En el pterigón, la luz UV incidente sobre las células madre del limbo induce su transición de epitelio a mesénquima y con ello la hiperproliferación y fibrosis estromal subepitelial propias de la patología (28).

La fibrosis es un proceso que se caracteriza por el depósito anormal de matriz extracelular en los tejidos como respuesta a estímulos nocivos ya sea físicos, químicos, infecciosos o autoinmunes. De forma normal este proceso finaliza con la cicatrización, pero si el estímulo persiste se altera su regulación conduciendo a una acumulación excesiva de matriz extracelular en un ambiente de inflamación crónica donde TGF- β y Wingless/Int-1 (Wnt1) actúan como los principales efectores del proceso fibrótico (29).

Wnt se une a su receptor transmembranal activando la vía de señalización de la β -catenina, mientras que TGF- β activa la vía de señalización de Smad2/3, estimulando la diferenciación de miofibroblastos desde los fibroblastos, las células mesenquimales o desde los fibroblastos circulantes, favoreciendo el depósito de proteínas de la matriz extracelular en el tejido, principalmente de colágeno y fibronectina (29).

Conforme este cúmulo de proteínas aumenta, la matriz extracelular adquiere rigidez que al ser detectada por las integrinas inicia la vía de señalización de Rho, culminando con la síntesis de las proteínas Tafazzin (TAZ) y yes-associated protein 1 (YAP) que contribuyen a la regulación positiva de genes profibróticos perpetuando la fibrosis como se muestra en la figura 8 (29).

Mechanisms of Fibrosis

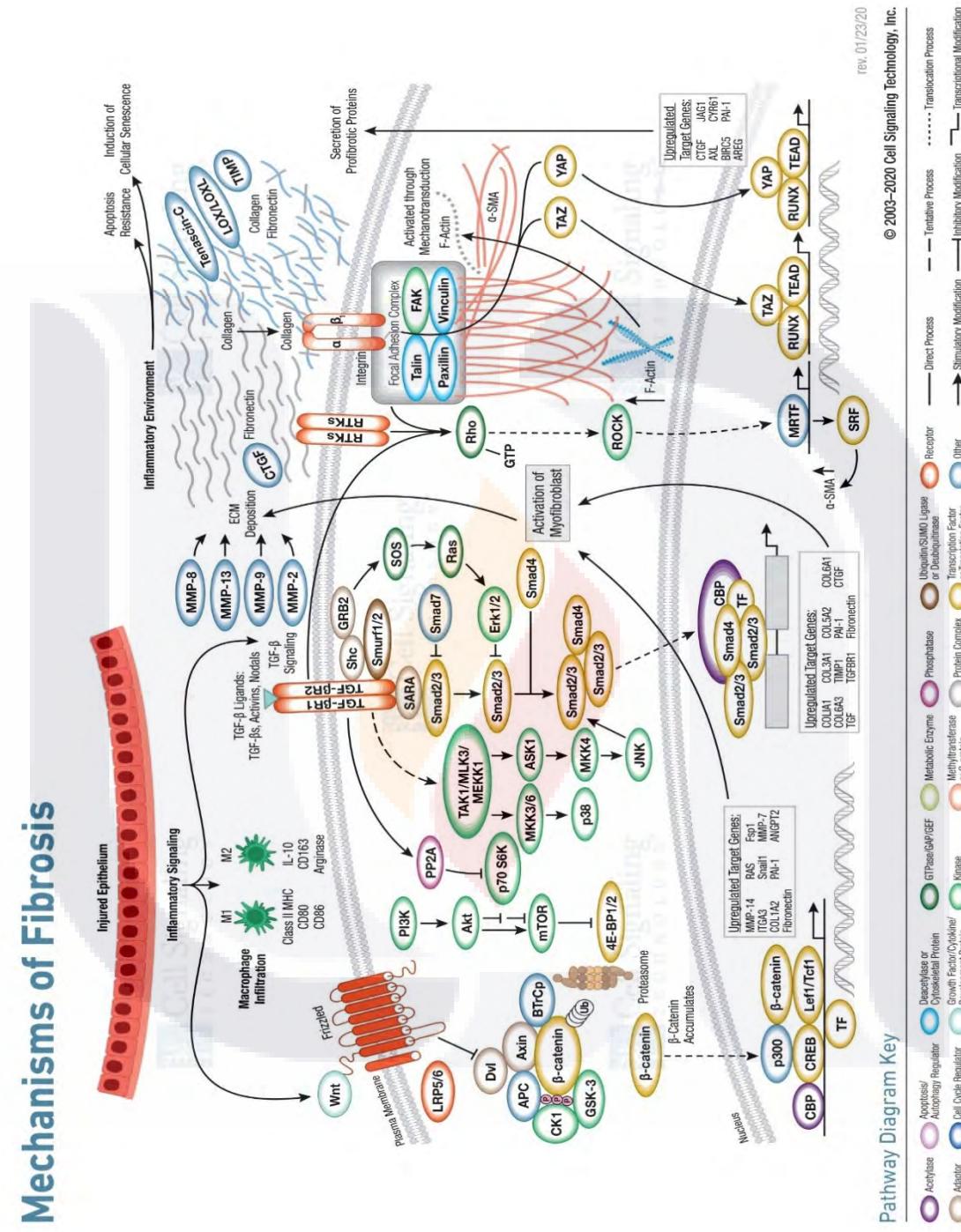


Figura 8. Vía de señalización de la fibrosis
Extraído de “Mechanisms of Fibrosis. Cell Signaling Technology. 2023 (29)“.

La inflamación juega un papel importante en la fibrosis. Cuando el tejido es dañado, las células afectadas presentan necrosis liberando al entorno extracelular diversas sustancias y estructuras que se encontraban contenidas en su núcleo, citosol y organelos, las cuales se agrupan en el término DAMP o patrones moleculares asociados al peligro, que interactúan con los receptores de reconocimiento de patrones o PRR. Algunas de estas sustancias se denominan alarminas por su capacidad de reclutar células inmunes, induciendo inflamación. Esta asociación entre necrosis e inflamación se denomina necroinflamación (30).

Además, en respuesta a la inflamación se liberan distintos mediadores relacionados con las células inmunes (figura 9), que favorecen la migración de fibroblitos desde los vasos sanguíneos hacia los tejidos dañados, la activación de fibroblastos y la transformación de las células epiteliales en células mesenquimales. De este modo, tanto la transición epitelio-mesénquima como la inflamación crónica, desarrollan un ambiente profibrótico que permite la producción de colágeno por los fibroblastos residentes y los fibroblastos infiltrantes (30).

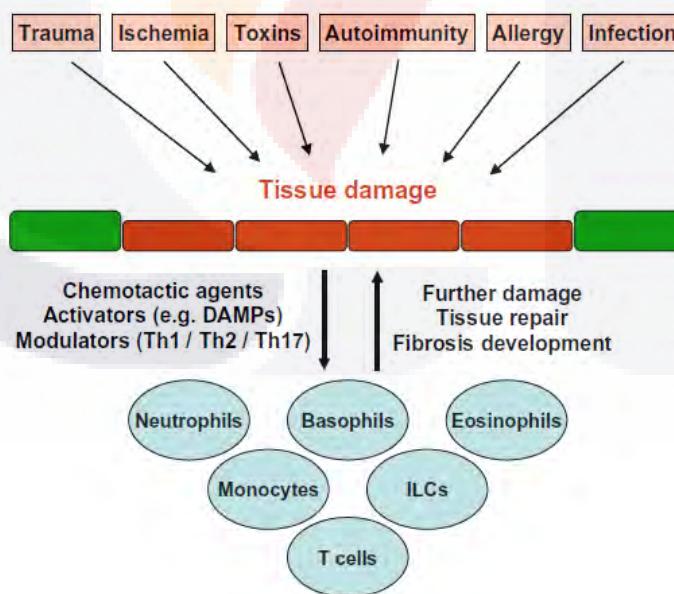


Figura 9. Interdependencia del daño tisular y la inflamación

DAMPs: patrones moleculares asociados al peligro, **ILCs:** células linfoides innatas. Extraído de “Inflammation and fibrosis. Mack M, 2018 (30)”.

Sistema nervioso simpático y su relación con la fibrosis

El sistema nervioso está compuesto por un conjunto de neuronas especializadas que conducen señales eléctricas. Se divide en sistema nervioso central constituido por el encéfalo y médula espinal, y el sistema nervioso periférico formado por nervios y ganglios que conectan con los órganos y tejidos. Dentro del sistema nervioso periférico se encuentra el sistema nervioso autónomo, con acción involuntaria, que se subdivide a su vez en sistema nervioso simpático (SNS) o vía aferente y sistema nervioso parasimpático (SNPS) o vía eferente (31).

El SNS con sus neurotransmisores epinefrina y norepinefrina, centra su acción en la respuesta de lucha o huida del organismo, aumentando la frecuencia cardíaca, dilatando la pupila, los bronquios, los vasos sanguíneos y aumentando la presión arterial, mientras que el SNPS, cuyo neurotransmisor es la acetilcolina, es su contraparte, encargándose del reposo y la digestión, disminuyendo la frecuencia cardíaca, relajando esfínteres, aumentando la peristalsis y estimulando la broncoconstricción (31).

Además, el SNS inerva los tejidos linfoides, tanto neurovascular como de forma no vascular, mediante nervios ubicados en cercanía estrecha con las células inmunes que responden a sus estímulos a través de receptores adrenérgicos localizados en su superficie, su principal neurotransmisor es la norepinefrina. No hay evidencia neuroanatómica de inervación parasimpática de los órganos inmunes (médula ósea, timo, bazo, ganglios linfáticos) (32).

La activación del SNS regula desde la migración celular hasta la secreción de citocinas (figura 10). Esta activación tiene un poderoso efecto antiinflamatorio sobre el sistema inmune innato, que posee receptores adrenérgicos alfa 1 y beta 2 (ADRA1 y ADRB2), regulando principalmente la producción y liberación de TNF- α de los macrófagos. El sistema inmune adaptativo también tiene respuesta a esta estimulación, mejorando o inhibiendo la actividad de los linfocitos T y B a través de sus receptores ADRB2 (32).

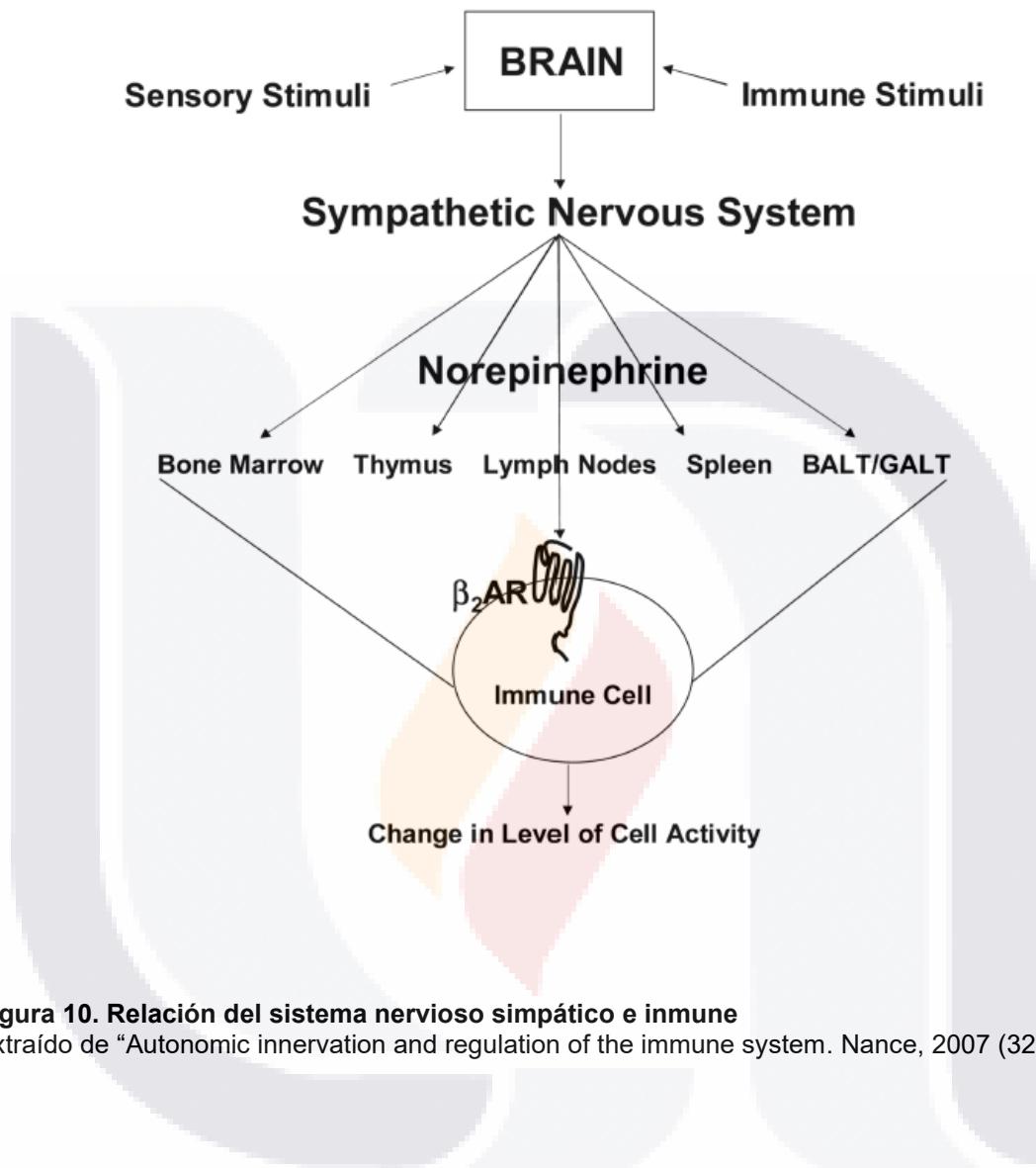


Figura 10. Relación del sistema nervioso simpático e inmune

Extraído de “Autonomic innervation and regulation of the immune system. Nance, 2007 (32)”.

Los receptores ADRA1 (figura 11) y ADRB2 (figura 12) son miembros de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, median su efecto a través de la entrada de calcio extracelular (33,34) y presentan propiedades fisicoquímicas similares las cuales se enlistan en la tabla 2.

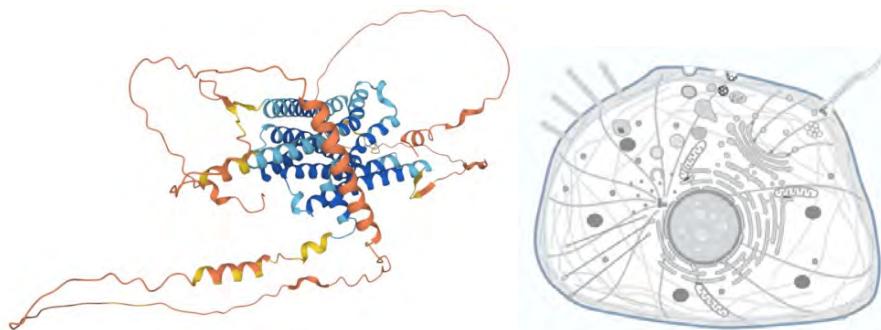


Figura 11. Estructura y localización del receptor adrenérgico alfa 1

La estructura tridimensional de ADRA1 está mayormente conformada por hélices y su localización es transmembranal. Extraído de “ADRA1D - Alpha-1D adrenergic receptor - Homo sapiens (Human). UniProtKB, 2023 (33)”.

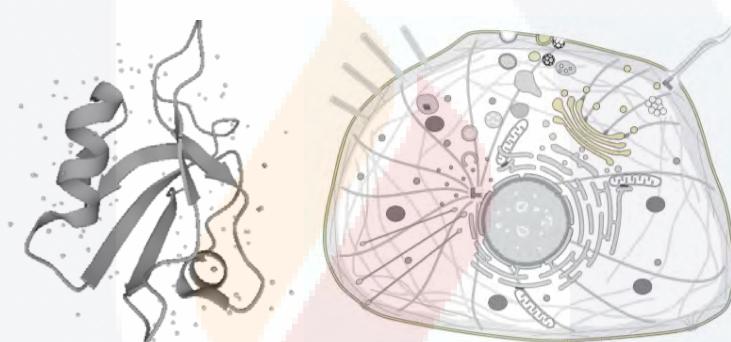


Figura 12. Estructura y localización del receptor adrenérgico beta 2

La estructura tridimensional de ADRB2 está conformada por hebra beta, hélice y giro. Su localización es principalmente en la membrana celular, al activarse los receptores se internalizan en endosomas antes de su degradación por los lisosomas. Los receptores activados también se pueden detectar dentro del aparato de Golgi. Extraído de “ADRB2 - Beta-2 adrenergic receptor - Homo sapiens (Human). UniProtKB, 2023 (35)”.

Tabla 2. Propiedades fisicoquímicas de los receptores adrenérgicos

Receptor	GenBank	PM	# AA	PI	%AA(+)	%AA(-)	GRAVY
ADRA1	U03864.1	60462.82	572	9.41	61	42	0.195
ADRB2	AY136741.1	46528.77	413	7.13	34	34	0.154

Nota. **PM:** Peso molecular. **#AA:** Número de aminoácidos, **PI:** Punto isoeléctrico, **%AA(+)**: Porcentaje de aminoácidos positivos, **%AA(-)**: Porcentaje de aminoácidos negativos, **GRAVY**: Índice de hidropatidad. Extraído de “Expasy - ProtParam tool, 2023 (36) ”

Las catecolaminas norepinefrina, epinefrina y dopamina, son compuestos orgánicos derivados del grupo catecol. En su síntesis intervienen principalmente cuatro enzimas (figura 13): la tirosina hidroxilasa (TH), enzima específica de las células catecolaminérgicas que cataliza la conversión de L-tirosina en L-dihidroxifenilalanina (L-dopa), la descarboxilasa de L-aminoácidos-aromáticos (LAAD) que cataliza la conversión de L-dopa en dopamina, la dopamina-beta-hidroxilasa (DBH) vesicular que convierte la dopamina en norepinefrina, y la feniletanolamina-N-metil-transferasa (FNMT) que transforma la norepinefrina en epinefrina (37).

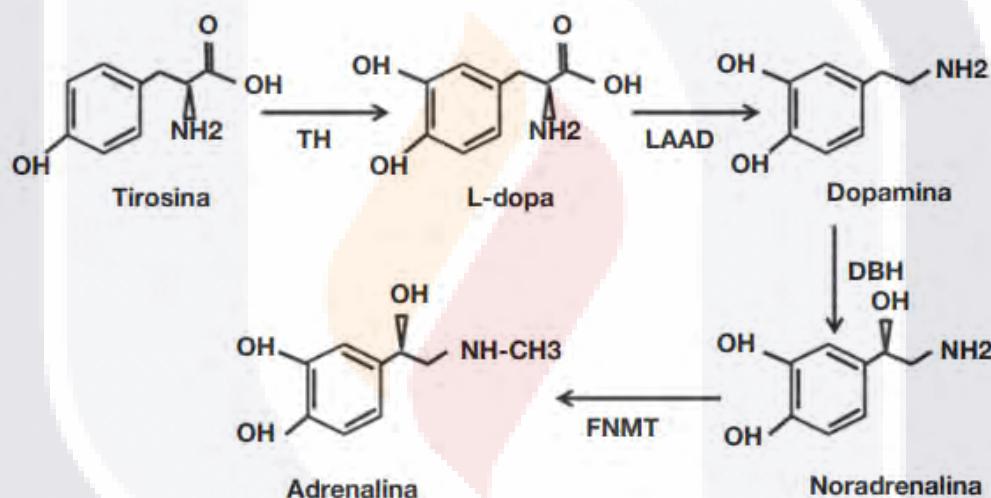


Figura 13. Síntesis de catecolaminas

TH: Tirosina hidroxilasa, **LAAD:** Descarboxilasa de L-aminoácidos-aromáticos, **DBH:** Dopamina-beta-hidroxilasa, **FNMT:** Feniletanolamina-N-metil-transferasa. Extraído de "Catecolaminas, síntesis, metabolismo, receptores adrenérgicos y dopamínicos". Taira, 2013 (37)

En algunos modelos fibróticos tanto *in vitro* como *in vivo* se ha señalado la acción de la norepinefrina en el avance y progreso de la enfermedad, por ejemplo, se encontró que favorece la síntesis de citocinas proinflamatorias como la interleucina 1 (IL-1) e IL-6 en la fibrosis pulmonar (38).

A nivel miocárdico, se demostró también que la norepinefrina y el estrés oxidativo se relacionan con fibrosis miocárdica en la insuficiencia cardíaca (39). Además, favorece la fibrosis en esclerosis sistémica a través de la acción de citocinas, principalmente IL-6, sobre los receptores beta adrenérgicos de los fibroblastos (40).

A nivel renal, promueve la fibrosis a través de la vía TGF- β /Smad3, al estimular los receptores ADRA1 de las células epiteliales en la enfermedad renal crónica (41). Así mismo, la estimulación de la norepinefrina en las células estrelladas hepáticas promueve la migración celular y la transición epitelio-mesenquimática condicionante de fibrosis en el carcinoma hepatocelular a través de la vía de Wnt/ β -catenina (42) junto con la intervención del sistema inmune debido a su comunicación estrecha con el sistema nervioso, conocida como neuroinmunomodulación (43) tal como se muestra en la figura 14.

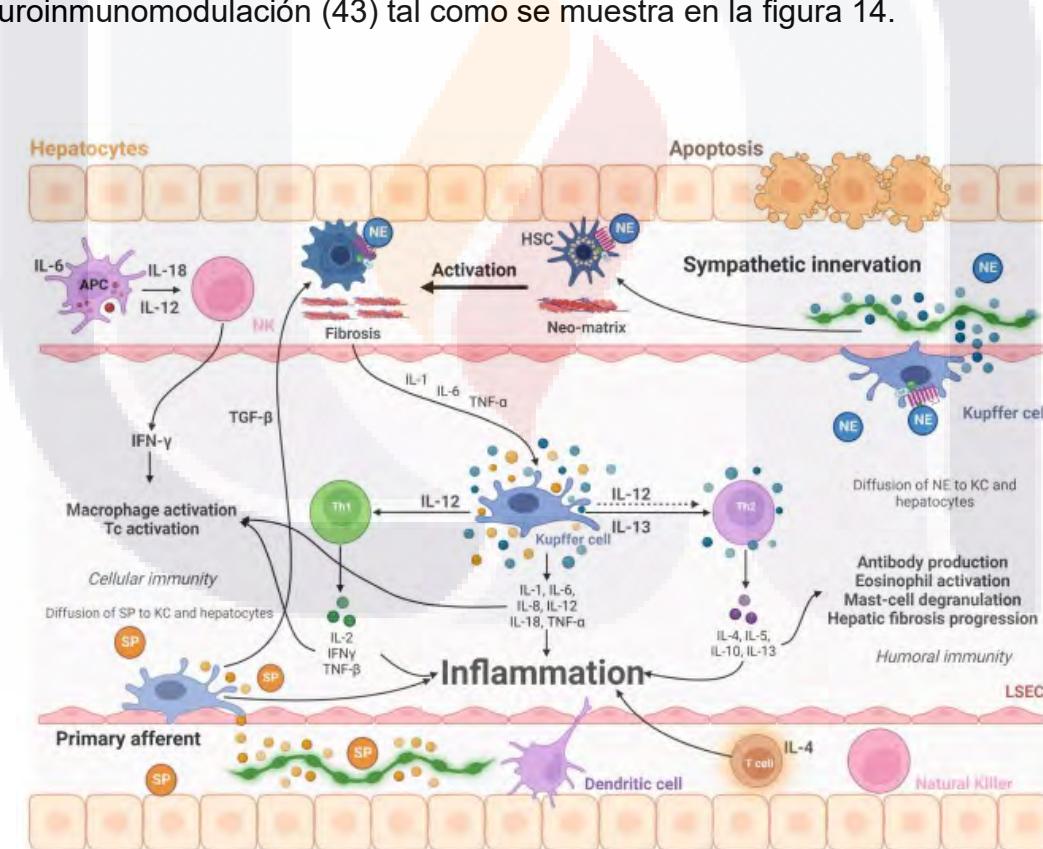


Figura 14. Neuroinmunomodulación en la fibrosis hepática

Extraído de "Neuroimmunomodulation of adrenoblockers during liver cirrhosis: modulation of hepatic stellate cell activity. Medina, 2023 (43)".

Inervación simpática y parasimpática del ojo

La inervación ocular (figura 15) comprende tres tipos de fibras nerviosas, las sensitivas, simpáticas y parasimpáticas. Las fibras sensitivas derivan del nervio trigémino (V par craneal) el cual posee tres ramas: la oftálmica (V1), la maxilar (V2) y la mandibular (V3). De estas, la rama oftálmica es la encargada de la inervación de la superficie ocular, se subdivide a su vez en el nervio frontal que inerva parte de la conjuntiva, el nervio lagrimal que inerva las glándulas lagrimales y parte del párpado superior, y el nervio nasociliar con su rama ciliar larga que inerva gran parte de la córnea, la rama infratroclear con fibras a los párpados y la rama etmoidea (44).

Las fibras parasimpáticas derivan tanto del nervio trigémino como del nervio oculomotor (III par craneal). Las fibras parasimpáticas del trigémino nacen en el núcleo salivatorio superior, recorren el ganglio geniculado y el ganglio esfenopalatino hasta inervar las glándulas lagrimales y el párpado superior (44). Las fibras parasimpáticas del nervio oculomotor inician su trayecto en el núcleo de Edinger-Westphal, dirigiendo sus fibras al ganglio ciliar, de ahí las fibras posganglionares siguen por los nervios ciliares cortos hasta inervar el esfínter pupilar permitiendo el enfoque óptico y la contracción de la pupila (45)

Las fibras simpáticas a su vez nacen en el núcleo motor del nervio facial (VII par) y sigue un trayecto similar a las fibras parasimpáticas provenientes del nervio trigémino, hasta llegar a las glándulas lagrimales y el párpado superior, pero sin pasar por el ganglio geniculado ni el ganglio esfenopalatino (44). Por su lado, las fibras simpáticas provenientes del nervio oculomotor inician su trayecto en el hipotálamo cuyos axones descenden hasta hacer sinapsis en la región intermediolateral del primer segmento torácico de la médula espinal (centro ciliospinal de Budge-Weller), desde donde recorren la cadena simpática cervical hasta llegar al ganglio cervical superior, donde hacen sinapsis con las neuronas posganglionares que transcurren a lo largo de la superficie de la arteria carótida común, luego la arteria carótida interna y el nervio ciliar largo hasta inervar el músculo dilatador de la pupila (45)

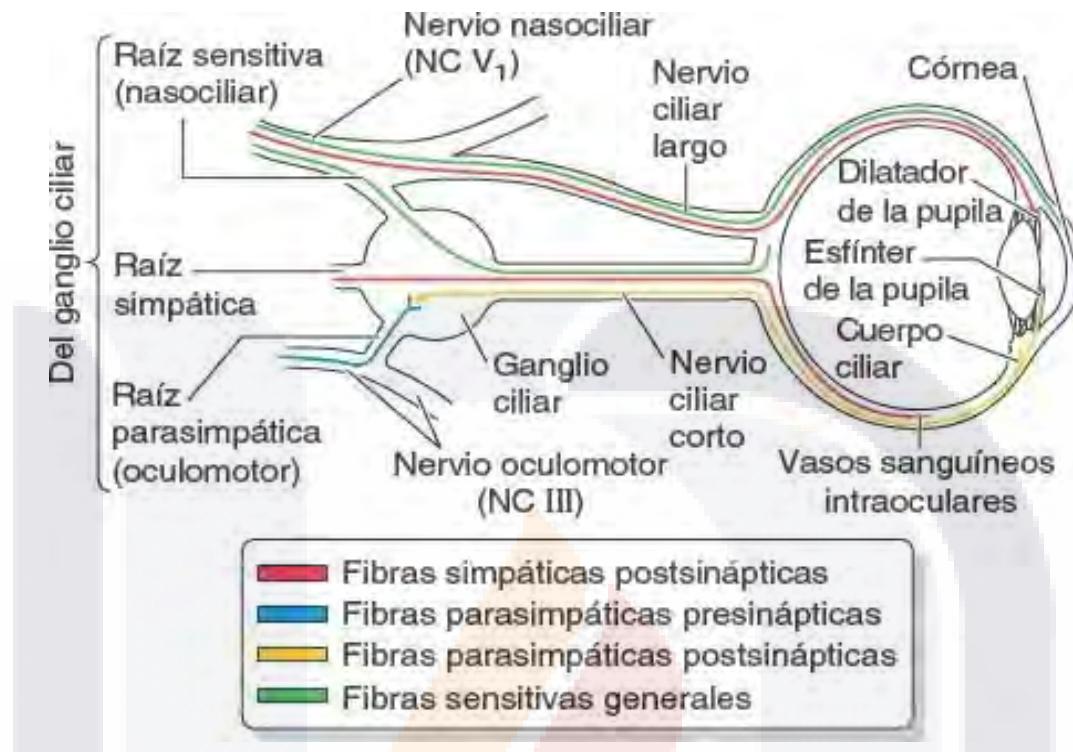


Figura 15. Inervación sensitiva, simpática y parasimpática del ojo

Adaptado de “The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. Stern, 1998 (44)” y “Anomalías pupilares. Sánchez, 2003 (45)”.

En cuanto a la córnea, esta es el órgano con mayor número de terminaciones nerviosas del organismo, la mayoría de sus fibras son sensoriales, aunque también cuenta con fibras simpáticas y parasimpáticas en menor proporción. Los nervios ciliares largos entran por la región posterior del globo ocular, cruzan el espacio supracoroideo, y llegan a la periferia de la córnea a lo largo del limbo, paralelos a la superficie corneal (figura 16). Al llegar al estroma corneal y atravesar el limbo pierden el perineuro y parte de la mielina que los cubre (fibras A-delta), o pierden la mielina en su totalidad (fibras C) para quedar rodeados solamente por las células de Schwann, manteniendo la transparencia de la córnea (46).

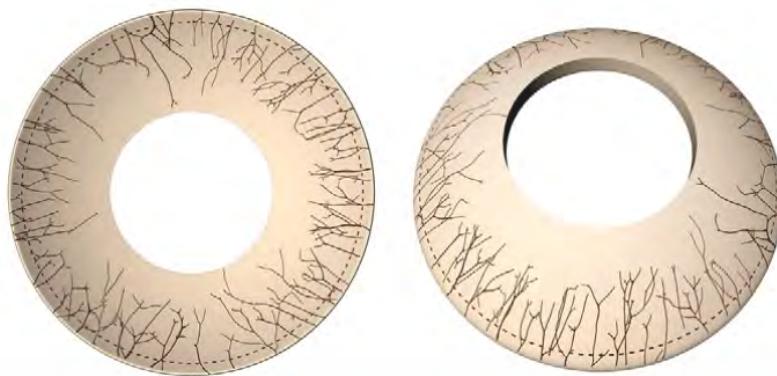


Figura 16. Ingreso de las terminaciones nerviosas a la córnea

Las fibras del nervio estromal ingresan de forma uniforme a la periferia de la córnea. La línea discontinua representa el limbo esclerocorneal. Extraído de “Anatomy of the human corneal innervation. Marfurt, 2010 (46)”.

Cuando estas fibras llegan al estroma anterior, atraviesan la membrana de Bowman y forman una malla de haces nerviosos (fibras lisas y granuladas) en la región basal del epitelio corneal denominado plexo nervioso sub-basal (figura 17). Existen dos vías de redes nerviosas corneales, la red limbal superficial con fibras nerviosas a la región del limbo y la periferia corneal, y la red nerviosa estromal que inerva el epitelio central, estas redes se conectan entre sí creando la red nerviosa epitelial (47).

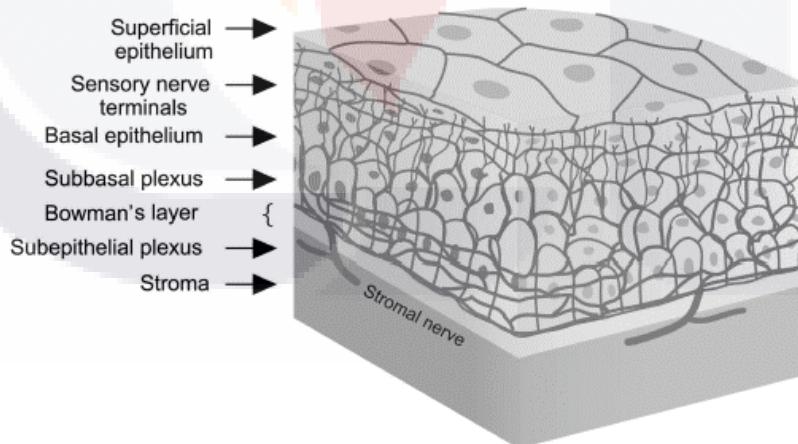


Figura 17. Distribución de las fibras nerviosas en la córnea

Las fibras del nervio estromal atraviesan la membrana de Bowman formando el plexo nervioso sub-basal, para posteriormente crear ramificaciones de menor calibre que atraviesan el epitelio corneal. Extraído de “Update on cenergermin eye drops in the treatment of neurotrophic keratitis. Sheha, 2019 (48)”.

Justificación

El pterigón es un problema de salud pública que condiciona un costo elevado al sistema de salud por su creciente incidencia, riesgo de secuelas visuales y su alta recurrencia, por lo que este estudio pretende determinar nuevos objetivos terapéuticos basados en el tipo de inervación presente en el pterigón.

Planteamiento del problema

¿Existen interacción adrenérgica que regule el proceso inflamatorio y fibrogénico del pterigón?

Hipótesis

Hipótesis alterna

Existe interacción neuroinmune involucrada en el proceso inflamatorio y fibrogénico del pterigón.

Hipótesis nula

No existe interacción neuroinmune involucrada en el proceso inflamatorio y fibrogénico del pterigón.

Objetivos

Objetivo general

Caracterizar la interacción neuroinmune en el proceso inflamatorio y fibrogénico en piezas quirúrgicas de pterigón.

Objetivos secundarios

1. Evaluar la expresión de ADRA1A, ADRA1B, ADRAB2, COL4A1, IL17A, TGFB1, TH y TNFA en piezas quirúrgicas de pterigón.
2. Analizar por pruebas morfológicas la presencia de receptores alfa y beta adrenérgicos y su relación con el proceso inflamatorio en piezas quirúrgicas de pterigón.
3. Analizar por pruebas morfológicas la presencia de receptores alfa y beta adrenérgicos y su relación con el proceso fibrogénico en piezas quirúrgicas de pterigón.

Materiales, pacientes y métodos

Tipo, diseño y características del estudio

Estudio observacional, analítico y transversal.

Población de estudio

Piezas quirúrgicas donadas para el estudio por el Banco de Ojos y Tejidos de Aguascalientes A.C., a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, previo convenio, así como consentimiento informado del paciente, en el periodo comprendido del 01 de julio de 2022 al 31 de diciembre de 2022, que cumplan con los criterios de inclusión.

Operacionalización de las variables

Las variables a estudiar se enlistan en la tabla 3.

Tabla 3. Operacionalización de las variables

Variable	Definición operacional	Tipo	Indicadores	Unidades
ADRA1A	Gen que codifica al receptor adrenérgico subtipo alfa 1A cuya activación estimula la fosfolipasa C, su principal acción es la contracción del músculo liso	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio
ADRA1B	Gen que codifica al receptor adrenérgico subtipo alfa 1B cuya activación estimula la fosfolipasa C, su principal acción es la contracción del músculo liso	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio
ADRB2	Gen que codifica al receptor adrenérgico subtipo beta 2 cuya activación estimula la producción de adenosín monofosfato cíclico (AMP cíclico), su principal acción es la dilatación del músculo liso, la glucogenólisis y gluconeogénesis y la liberación de histamina por los mastocitos	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio
CD3	Antígeno que se expresa en timocitos y células T, interviene en la transducción de señales y en la expresión del receptor de linfocitos T	Numérica discreta	Marcaje celular	cel/mm ³
CD68	Glicoproteína expresada en la membrana plasmática de los macrófagos, cuya función en la captación de lipoproteínas de baja densidad	Numérica discreta	Marcaje celular	cel/mm ³
COL4A1	Gen que codifica a la subunidad alfa 1 del colágeno tipo IV, la cual interviene en la angiogénesis	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

GAPDH	Gen que codifica a la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, gen constitutivo	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio
IL17A	Gen que codifica a la interleucina 17-A, citocina proinflamatoria producida por células T activadas que estimula la expresión de IL-6, ciclooxygenasa 2 y mejora la producción de óxido nítrico	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio
TGFB1	Gen que codifica al factor de crecimiento transformante beta 1, proteína que participa en el crecimiento, proliferación celular, diferenciación y apoptosis	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio
TH	Gen que codifica a la tirosina hidroxilasa, enzima responsable de catalizar la conversión de L-tirosina a L-dopa	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio
TNFA	Gen que codifica al factor de necrosis tumoral alfa, citocina que interviene en la inflamación y apoptosis	Numérica continua	Nivel de expresión	veces de cambio

Nota. La tabla describe las características de las variables.

Selección de la muestra

Tipo de muestreo

Por conveniencia.

Tamaño de la muestra

24 piezas quirúrgicas, 20 de pacientes con pterigión y 4 controles (conjuntiva).

Criterios de selección

Criterios de inclusión

- Ser piezas quirúrgicas de pterigión primario (descartando tumor basófilo o pingüécula) y de conjuntiva sana.
- No recibir tratamiento con esteroides ni vasoconstrictores tópicos al menos una semana antes de la cirugía.
- No presentar complicaciones quirúrgicas.
- Contar con consentimiento informado firmado.

Criterios de exclusión

- Presentar patología de la superficie ocular inflamatoria concomitante al pterigón como conjuntivitis, blefaritis, uveítis, queratitis.

Criterios de eliminación

- Piezas quirúrgicas que no hayan sido colocadas en formalina, TRIzol ® o RNAlater ® después de su remoción.
- Piezas quirúrgicas con muy poco tejido.

Logística del estudio

Se obtuvieron piezas quirúrgicas de pterigón y conjuntiva donadas para este estudio por el Banco de Ojos y Tejidos de Aguascalientes A.C., recolectando la información de los pacientes con el formulario de base de datos (Anexo A).

A través de un muestreo aleatorio simple, se distribuyeron los especímenes en dos grupos (figura 18): el de análisis de expresión génica y el de estudio histopatológico. Dadas las características propias del tejido (tamaño y consistencia) no fue posible utilizar la misma muestra para ambos grupos.

En las muestras para análisis génico, se analizó la expresión de ADRA1A, ADRA1B, ADRB2, COL4A1, IL17A, TGFB1, TH y TNFA con la técnica de reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR), utilizando GAPDH como gen constitutivo. Los resultados se analizaron con el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

En las muestras para estudio histopatológico se observó sus características microscópicas con tinciones de hematoxilina-eosina y tricrómica de Masson. Además, se identificó la presencia de tirosina hidroxilasa, receptores ADRA1A y ADRB2 a través de marcaje por inmunohistoquímica (IHQ). Se analizó la presencia de linfocitos T y macrófagos por inmunofluorescencia (IF) y se analizó su relación con la enzima tirosina hidroxilasa por co-localización con doble inmunofluorescencia. Los tejidos se analizaron con microscopio óptico y microscopio de fluorescencia.

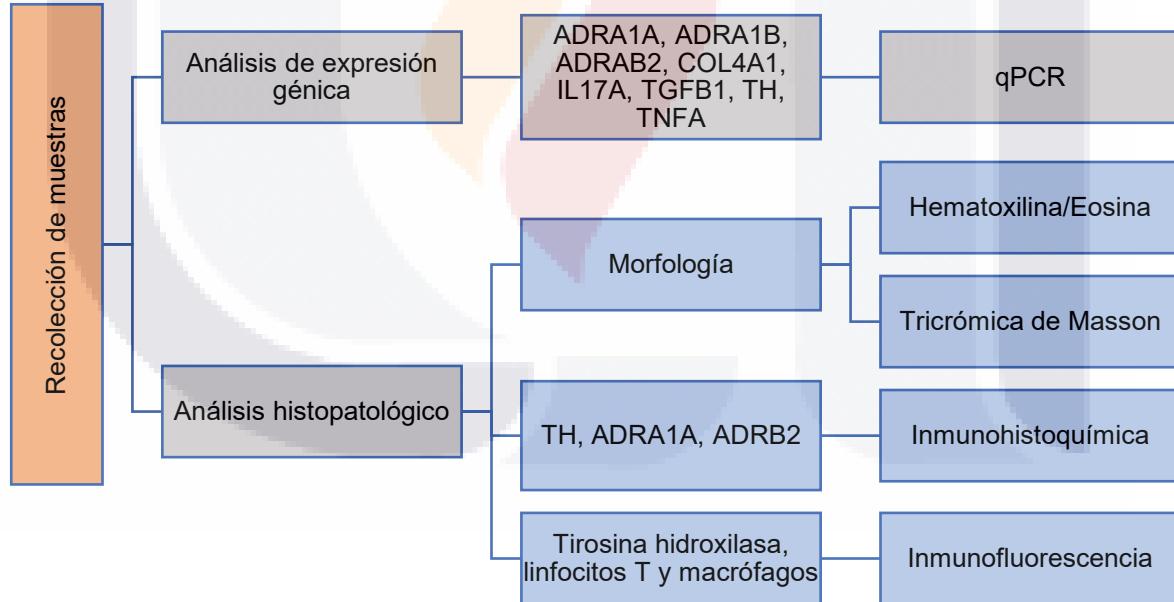


Figura 18. Logística del estudio

ADRA1A: receptor adrenérgico subtipo alfa 1A, **ADRA1B:** receptor adrenérgico subtipo alfa 1B, **ADRB2:** receptor adrenérgico subtipo beta 2, **COL4A1:** subunidad $\alpha 1$ del colágeno tipo IV, **IL17A:** interleucina 17-A, **TGFB1:** factor de crecimiento transformante beta 1, **TH:** tirosina hidroxilasa, **TNFA:** factor de necrosis tumoral α , **qPCR:** reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real

Metodología experimental

Selección de la muestra

Se obtuvieron 24 especímenes (figura 19) que cumplieron con los criterios de inclusión. Sin embargo, 4 tejidos de pterigión primario se excluyeron por no ser aptos para el estudio (3 por contar con muy poco tejido y 1 por una mala recolección de la muestra).

De las 20 muestras que resultaron adecuadas, 10 tejidos de pterigión y 2 tejidos de conjuntiva se asignaron para estudio histopatológico. Así mismo, 6 tejidos de pterigión y 2 tejidos de conjuntiva se utilizaron para evaluar la expresión génica. La asignación de los tejidos a los grupos de estudio se realizó a través de un muestreo aleatorio simple.

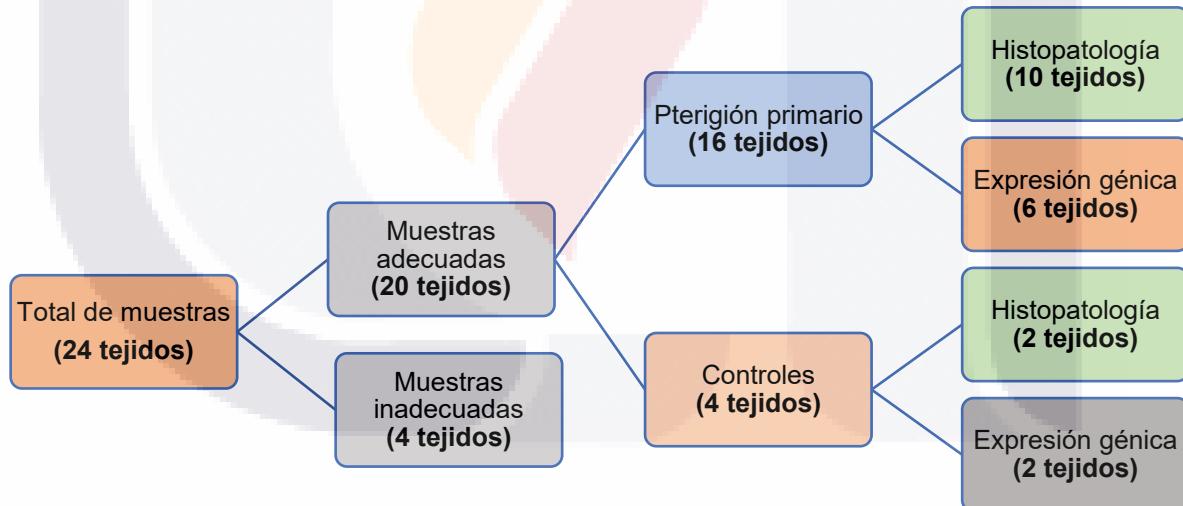


Figura 19. Selección de la muestra

Reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real

Se evaluó la expresión relativa de genes relacionados con inflamación, fibrosis y respuesta adrenérgica por medio de qPCR. Los datos obtenidos se analizaron mediante el método $2^{(-\Delta\Delta Ct)}$ y se presentaron como veces de inducción con respecto al control.

La extracción del ácido ribonucleico mensajero (mRNA) se realizó de acuerdo con el protocolo del kit Quick-RNA MiniPrep Plus (Zymo research, Tustin, CA, USA), manteniendo en todo momento la cadena de frío de las muestras. Se homogenizó cada muestra de pterigón primario y conjuntiva (30 mg) en 400 µl de TRIzol® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), se centrifugó en frío por 10 min a 10,000 rpm, añadiendo al sobrenadante 400 µl de etanol absoluto, se transfirió a una columna con camisa y se centrifugó a velocidad máxima por 30 segundos descartando el líquido. Se agregaron 400 µl de reactivo pre-wash, se centrifugó a velocidad máxima por 30 segundos y se descartó el líquido nuevamente. Se añadieron 700 µl de reactivo wash, se centrifugó a velocidad máxima por 2 min con la tapa del tubo abierta y se colocó la columna en un nuevo tubo verificando la ausencia de etanol. Se añadieron 30 µl de agua del kit, se dejó reposar por 1 min y se centrifugó por 45 segundos. Finalmente se desechó la columna, se transfirieron 30 µl de mRNA a un tubo libre de RNasas y se almacenó de inmediato a -80°C.

Con los 20 µl restantes se realizó la cuantificación de mRNA, tomando 1 µl de cada muestra y se leyó en un Biodrop (Isogen Life Science, Barcelona, España) ajustando el blanco con agua libre de DNAsas. Se ajustó el volumen de mRNA de todas las muestras a 1 µg.

Para la retrotranscripción y síntesis de ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA), se siguió el protocolo GoScript ® (Promega A5000, Madison, WI, USA). Se colocó en un tubo para PCR 1 µl de OligodT, con 1 µg de mRNA y se aforó a 12 µl con agua libre de nucleasas, se mezcló y se llevó al termociclador por 5 min a 70°C. Luego se llevó al hielo y se añadió el siguiente mix de reacción (tabla 4):

Tabla 4. Mix de reacción para retrotranscripción

Reactivos	Volumen
Buffer de reacción	4 µl
Inhibidor de RNasa	1 µl
NTP mix	2 µl
Aid H Minus (RT)	1 µl

Nota. Volumen indicado para cada muestra a procesar.

Una vez colocado, se llevó al termociclador en donde se programó de la siguiente manera (tabla 5):

Tabla 5. Programación del termociclador para retrotranscripción

Proceso	Temperatura	Tiempo
Alineación de los primers con el templado de mRNA	25°C	5 min
Transcripción reversa de RNA	42°C	60 min
Inactivación de la enzima transcriptasa	70°C	5 min

Nota. Al terminar la síntesis de DNA complementario se debe guardar la muestra a -80°C.

Finalmente, para la PCR en tiempo real, tanto los oligonucleótidos como las muestras se diluyeron 1:20 en agua libre de nucleasas para obtener 50 ng de cDNA. Se utilizó el kit máximo SYBR Green/ROX qPCR master mix (2x) (K022.1, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) para preparar el master mix que contiene (tabla 6):

Tabla 6. Mix para la reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real

Reactivos	Volumen
SYBR Green	5 µl
Agua libre de nucleasas	2 µl
Oligo Forward (dilución 1:20)	1 µl
Oligo Reverse (dilución 1:20)	1 µl
Muestra (dilución 1:20)	1 µl

Nota. Volumen indicado para cada muestra a procesar.

Los cebadores oligonucleótidos empleados se enlistan en la tabla 7:

Tabla 7. Secuencia génica de los oligonucleótidos utilizados

Gen		Secuencia (5'→3')
ADRA1A	Fw	TGG CCG ACC TCC TGC TCA CCT C
	Rv	GGC CCC GGC TCT CCC TCT TG
ADRA1B	Fw	CCC CCG ACG CCG TGT TCA AGG TG
	Rv	CTC AGG CGC GGG CAG GCT CAG GA
ADRB2	Fw	GAT TTC AGG ATT GCC TTC CA
	Rv	CTT GAT GGC CCA CAA AGT CT
COL4A1	Fw	CTG GTC CAA GAG GAT TTC CA
	Rv	TTT TGG TCC CAG AAG GAC AC
GAPDH	Fw	GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT
	Rv	GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG
IL17A	Fw	ACC AAT CCC AAA AGG TCC TC
	Rv	GGG GAC AGA GTT CAT GTG GT
TGFB1	Fw	CCC AGC ATC TGC AAA GCT C
	Rv	GTC AAT GTA CAG CTG CCG CA
TH	Fw	GTG TTC CAG TGC ACC CAG TA
	Rv	AGC GTG GAC AGC TTC TCA AT
TNFA	Fw	CTC TTC TGC CTG CTG CAC TTT G
	Rv	ATG GGC TAC AGG CTT GTC ACT C

Nota. Los oligos fueron sintetizados por IDT Integrated DNA Technologies.

En una placa de 48 pozos, se agregaron 10 µl de mix de reacción en cada pocillo, montando las muestras por duplicado. Se cubrió la placa con adhesivo y se fijó por compresión. Se centrifugó para precipitar el contenido al fondo del pozo y se realizó el análisis de qPCR en un equipo StepOne Real-Time (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA). Las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes (tabla 8):

Tabla 8. Programación del termociclador para reacción en cadena polimerasa cuantitativa en tiempo real

Proceso	Temperatura	Tiempo
Pretratamiento UDG	50°C	2 min
Desnaturalización inicial	95°C	3 min
Desnaturalización (ciclos 40)	95°C	40 seg
Alineamiento (ciclos 40)	60°C	45 seg
Desnaturalización*	95°C	15 seg
Alineamiento*	60°C	1 min
Desnaturalización*	95°C	15 seg

Nota. * Curva MELT

Se obtuvieron los valores de C_t de cada muestra y para cada gen por duplicado, dichos valores se normalizaron utilizando el gen constitutivo GAPDH y se analizaron por el método $\Delta\Delta C_t$, que sigue la siguiente ecuación:

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t \text{ muestra} - \Delta C_t \text{ referencia}$$

De donde:

$\Delta C_t \text{ muestra} = \text{valor de la muestra normalizada con el gen constitutivo interno}$

$\Delta C_t \text{ referencia} = \text{valor de la muestra control normalizada con el gen constitutivo interno}$

Los resultados se reportaron como expresión génica relativa.

Tinción de hematoxilina-eosina

Para el análisis histopatológico se fijaron los tejidos con Tissue-Tek ® (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA) y nitrógeno líquido a una base de corcho sobre un soporte metálico para posteriormente realizar cortes de 5 micras a -25°C en criostato (Leica Biosystems, Chicago, IL, USA), colocando las muestras en laminillas silanizadas (3 cortes por laminilla). Los tejidos se conservaron en refrigeración a 4°C.

Para la tinción de hematoxilina-eosina, las laminillas se colocaron en agua destilada 5 minutos, luego se pasaron por hematoxilina 2 min, para después lavarse con agua corriente. Se realizó un baño con alcohol ácido (1% HCl + 96% alcohol) y se lavó con agua corriente por 10 min. Se colocó en eosina por 5 min y se procedió a deshidratar la muestra realizando 2 lavados de 5 min con alcohol al 96%, 2 lavados de 5 min con alcohol al 100% y 2 lavados con xilol de 10 min. Finalmente se realizó el montaje final con el cubreobjetos fijándolo con Entellan ® (Merck, Burlington, MA, USA).

Los tejidos se observaron con los microscopios Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen, Germany) y Axiovert 40 cfl (Zeiss, Oberkochen, Germany). Se analizaron las imágenes con el software AxioVision (Zeiss, Oberkochen, Germany) y se procesaron con el software FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Tinción tricrómica de Masson

Para evaluar las fibras de colágena se utilizó la tinción tricrómica de Masson. Las laminillas con los tejidos se colocaron en solución fijadora de Bouin por 1 hora a 56°C dejando enfriar por 10 min para posteriormente lavar con agua corriente hasta aclarar, y enjuagar con agua destilada. Se tiñó en solución de hierro hematoxilina de Weigert por 10 min lavando al término con agua corriente y agua destilada. Luego se tiñó con solución fucsina escarlata ácida de Biebrich por 15 min, enjuagando con

agua destilada. Posteriormente se colocó en solución fosfomolíbdico-ácido fosfotungstico por 12 min para luego contrateñir con solución azul de anilina por 7 min, lavando con agua destilada y posteriormente con agua acética 1% por 4 min. Luego se deshidrató el tejido realizando 2 lavados de 5 min con alcohol al 96%, 2 lavados de 5 min con alcohol al 100% y 2 lavados con xilol de 10 min. Finalmente se realizó el montaje final con el cubreobjetos fijándolo con Entellan ® (Merck, Burlington, MA, USA).

Los tejidos se observaron con el microscopio Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen, Germany) y analizaron con el software AxioVision (Zeiss, Oberkochen, Germany). Para la imagen compuesta, se realizó un barrido por campos de toda la muestra y se procesaron las imágenes obtenidas con el software FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Inmunohistoquímica

La localización de receptores adrenérgicos, así como la presencia de tirosina hidroxilasa, enzima precursora de la epinefrina y norepinefrina, se determinó por la técnica de inmunohistoquímica.

Para esta técnica se utilizaron las laminillas de tejido obtenidas en el criostato (Leica Biosystems, Chicago, IL, USA), las cuales previo lavado con tampón fosfato salino (PBS), se colocaron en una solución de metanol y peróxido de hidrógeno (45 ml de metanol + 7 ml de peróxido) por 1 hora a temperatura ambiente para inactivar las peroxidatasas endógenas. Se lavó con PBS y se mantuvo por 30 min en PBS-Tritón X-100 al 0.2% para permeabilizar la membrana. Se incubó por 1 hora a temperatura ambiente en suero fetal bovino al 20% en PBS-Tritón X-100 al 0.2% para bloquear las uniones inespecíficas y posterior al lavado con PBS-T se incubó con el anticuerpo primario diluido en suero fetal bovino al 3% con PBS-Tritón X-100 durante toda la noche en cámara húmeda. Terminado el tiempo, se lavó con PBS-Tritón X-100 al 0.2% y se incubó con el anticuerpo secundario marcado con

peroxidasa y suero fetal bovino al 0.5% en PBS 1X por 1 hora a 37°C, manteniendo 30 min después a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios y secundarios empleados, se enlistan en las tablas 9 y 10. Por último, se procedió al revelado con 3,3 diaminobencidina (DAB, Thermo Fisher, Waltham, MA, USA) diluida 1:10 con buffer, se lavó con agua destilada y se deshidrató el tejido con etanol al 100% por 10 min y 2 lavados con xilol de 15 min para su montaje final con el cubreobjetos fijándolo con Entellan ® (Merck, Burlington, MA, USA).

Los tejidos se observaron con el microscopio Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen, Germany) y analizaron con el software AxioVision (Zeiss, Oberkochen, Germany). Para las imágenes compuestas, se realizó un barrido por campos de toda la muestra y se procesaron las imágenes obtenidas con el software FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Tabla 9. Anticuerpos primarios en inmunohistoquímica

Nombre	# de catálogo	Marca	Dilución empleada
Alpha-1A Adrenergic R/ADRA 1A Antibody in rabbit	NB100-78585	Novus Biologicals	1:100
Anti-Tyrosine Hydroxylase, N-Terminal antibody produced in rabbit	SAB4502966	Sigma-Aldrich	1:200
Beta-2 Adrenergic R/ADRB2 Antibody (2204C) [unconjugated] in rabbit	MAB10040-100	Novus Biologicals	1:100

Nota. Los anticuerpos fueron reconstituidos según indicaciones del fabricante.

Tabla 10. Anticuerpo secundario en inmunohistoquímica

Nombre	# de catálogo	Marca	Dilución empleada
Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, (H+L) HRP conjugate	AP307P	Merck	1:200

Nota. El anticuerpo fue reconstituido según indicaciones del fabricante.

Inmunofluorescencia

Se realizó inmunofluorescencia para determinar la presencia de macrófagos y linfocitos T en los tejidos. Se utilizaron las laminillas obtenidas en el criostato (Leica Biosystems, Chicago, IL, USA), se lavaron con PBS y se colocaron por 30 min en PBS-Tritón X-100 al 0.2% para permeabilizar la membrana. Se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en suero fetal bovino al 20% y PBS-Tritón X-100 al 0.2% para bloquear las uniones inespecíficas y se procedió a la incubación con el anticuerpo primario (CD3 dilución 1:250 con suero fetal bovino al 3% y PBS-Tritón X-100 0.2%) y CD68 dilución 1:250 con suero fetal bovino al 3% y PBS-Tritón X-100 0.2%) durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios utilizados se enlistan en la tabla 11.

Posterior a realizar lavados con PBS-Tritón X-100 al 0.2%, se incubó con el anticuerpo secundario unido al fluoróforo Alexa Flúor 594 ® diluido 1:1000 con PBS 1X y se mantuvo por 1 hora a temperatura ambiente y 20 min a 36°C en cámara húmeda. El anticuerpo secundario empleado se muestra en la tabla 12.

Se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258 ® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) al 1X en PBS, incubándolos por 10 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó con PBS y se cubrió el tejido con Glicergel ® (Dako, Santa Clara, CA, USA), evitando la formación de burbujas.

Los tejidos se observaron con el microscopio fluorescente Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen, Germany) y analizaron con el software AxioVision (Zeiss, Oberkochen, Germany). Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el software FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Tabla 11. Anticuerpos primarios en inmunofluorescencia

Nombre	# de catálogo	Marca	Dilución empleada
Monoclonal Mouse Anti-Human CD3	M0756	Dako	1:250
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68	M0814	Dako	1:250

Nota. Los anticuerpos fueron reconstituidos según indicaciones del fabricante.

Tabla 12. Anticuerpo secundario en inmunofluorescencia

Nombre	# de catálogo	Marca	Dilución empleada
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Flúor 594 ®	A11005	Invitrogen	1:1,000

Nota. El anticuerpo fue reconstituido según indicaciones del fabricante.

Inmunofluorescencia de doble marcaje

Se realizó inmunofluorescencia con doble marcaje para determinar la co-localización de la enzima tirosina hidroxilasa, macrófagos y linfocitos T.

Para esta técnica se utilizaron laminillas de tejido obtenidas en el criostato (Leica Biosystems, Chicago, IL, USA), se lavaron con PBS y se colocaron por 30 min en PBS-Tritón X-100 al 0.2% para permeabilizar la membrana. Se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente en suero fetal bovino al 20% y PBS-Tritón X-100 al 0.2% para bloquear las uniones inespecíficas y se procedió a la incubación con anticuerpos.

Se incubaron 5 laminillas con 3 tejidos cada una con el anticuerpo primario (CD3 dilución 1:250 con suero fetal bovino al 3% y PBS-Tritón X-100 0.2%) y 5 laminillas con el anticuerpo primario CD68 dilución 1:250 con suero fetal bovino al 3% y PBS-Tritón X-100 0.2%), durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Al día siguiente, se lavaron los tejidos con PBS-T y se repitió el mismo procedimiento, pero ahora con el anticuerpo primario TH dilución 1:200 con suero fetal bovino al 3% y PBS-Tritón X-100 0.2%) el cual se aplicó a todas las laminillas. Se mantuvo toda la noche a temperatura ambiente en cámara húmeda. Los anticuerpos primarios utilizados se enlistan en la tabla 13.

Posterior a realizar lavados con PBS-Tritón X-100 al 0.2%, se incubó con el anticuerpo secundario unido al fluoróforo (Alexa Flúor 594 ® para marcaje rojo-naranja de CD3 y CD68, y Alexa Flúor 488 ® para marcaje verde de TH), dichos

anticuerpos se diluyeron 1:1000 con PBS 1X y se mantuvieron por 1 hora a temperatura ambiente y 20 min a 36°C en cámara húmeda. Los anticuerpos secundarios empleados se enumeran en la tabla 14.

Se tiñeron los núcleos con Hoechst 33258 ® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) al 1X en PBS, incubándolos por 10 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se lavó con PBS y se cubrió el tejido con Glicergel ® (Dako, Santa Clara, CA, USA).

Los tejidos se observaron con el microscopio fluorescente Axioskop 40 (Zeiss, Oberkochen, Germany) y analizaron con el software AxioVision (Zeiss, Oberkochen, Germany). Para el procesamiento de las imágenes se utilizó el software FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Tabla 13. Anticuerpos primarios en doble inmunofluorescencia

Nombre	# de catálogo	Marca	Dilución empleada
Anti-Tyrosine Hydroxylase, N-Terminal antibody produced in rabbit	SAB4502966	Sigma-Aldrich	1:200
Monoclonal Mouse Anti-Human CD3	M0756	Dako	1:250
Monoclonal Mouse Anti-Human CD68	M0814	Dako	1:250

Nota. Los anticuerpos fueron reconstituidos según indicaciones del fabricante.

Tabla 14. Anticuerpos secundarios en doble inmunofluorescencia

Nombre	# de catálogo	Marca	Dilución empleada
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Highly Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Flúor Plus 488 ®	A32723	Invitrogen	1:1,000
Goat Anti-Mouse IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Alexa Flúor 594 ®	A11005	Invitrogen	1:1,000

Nota. Los anticuerpos fueron reconstituidos según indicaciones del fabricante.

Análisis estadístico

Se utilizó el software estadístico Prism 8.0.1 (GraphPad). Primero se evaluó la normalidad de los datos con la prueba de Shapiro-Wilk. Posteriormente, dado que la expresión relativa de los genes eran variables cuantitativas y se requería la comparación de dos grupos (pterigión y conjuntiva sana) se utilizó la prueba t de student para aquellos datos que presentaban distribución paramétrica, y U de Mann Whitney para aquellos datos con distribución no paramétrica. Los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando $p<0.05$.

Consideraciones éticas

El estudio se sometió a evaluación por parte del Comité Local de Investigación, el Comité Local de Ética para la Investigación y el Comité de Bioseguridad de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

La presente investigación de acuerdo con el artículo 17 y al artículo 23 del título primero, capítulo único del Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud es considerada investigación de riesgo II, riesgo mínimo ya que sólo se estudiaron piezas quirúrgicas de pterigión y conjuntiva donadas a la Universidad Autónoma de Aguascalientes para la realización del estudio. Los pacientes que donaron sus tejidos firmaron de conformidad el Consentimiento Informado para la Realización del Estudio, así como el Aviso de Privacidad para manejo de datos, manteniendo su confidencialidad (Anexos B y C).

El estudio se apegó a las normas éticas y lineamientos de la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial adaptada por la 18 Asamblea Médica Mundial, Helsinki, Finlandia, Junio de 1964, con enmienda de la 29 Asamblea Médica Mundial Tokio, Japón, octubre de 1983 y la 41 Asamblea Médica Mundial Hong Kong, septiembre 1989; la Ley General de Salud de los Estados Unidos Mexicanos en lo

referente a investigación para la salud en los artículos 17, 22, 23 principalmente y las normativa de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

La contribución de este estudio consistió en caracterizar la respuesta neuroinmune en el pterigión. El estudio implicó riesgo mínimo para los pacientes, se respetó la confidencialidad de la información y de los sujetos en la publicación de los resultados. El beneficio del presente estudio fue aportar la identificación de nuevos objetivos terapéuticos para el tratamiento del pterigón. La información se dio a conocer en la presentación de tesis de posgrado, y los resultados se publicaron en una revista de carácter científico.

Recursos para el estudio

Recursos humanos

Un estudiante de posgrado de la Maestría en Investigación Biomédica encargado de la realización del estudio, procesamiento de la muestra y análisis de los datos.

Recursos materiales

Se utilizaron los laboratorios, equipo y reactivos de la Universidad Autónoma de Aguascalientes para la realización del estudio.

Recursos financieros

Los recursos financieros fueron proporcionados por la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Clave de proyecto: PIBB24-8.

Cronograma de actividades

Las fases del desarrollo del proyecto se realizaron de acuerdo al cronograma mostrado en la tabla 15.

Tabla 15. Cronograma de actividades del proyecto de investigación

Fase del Proyecto	Fecha de realización
Elaboración y aprobación del anteproyecto	01/Ene/2022 al 30/Jun/2022
Selección y recolección de la muestra	01/Jul/2022 al 31/Dic/2022
Fase experimental	01/Ene/2023 al 31/Ago/2023
Análisis de resultados	01/Sep/2023 al 30/Sep/2023
Redacción y revisión de tesis	01/Oct/2023 al 30/Nov/2023
Redacción y envío de artículo científico	01/Dic/2023 al 15/Dic/2023

Nota. El proyecto se realizó siempre bajo supervisión y acompañamiento del comité tutorial.

Difusión de la investigación

Los resultados se presentaron en el examen de grado del investigador, en el 1º Congreso Internacional Multidisciplinario de la Divulgación Científica y se publicaron en una revista científica indexada.

Resultados

Características de los sujetos de estudio

Se estudiaron 16 pacientes con pterigión primario de los cuales 68.8% fueron hombres y 31.3% fueron mujeres, con edades comprendidas entre los 39 y 67 años de edad. Entre las comorbilidades encontradas en los pacientes 31.3% presentaban hipertensión, 18.8% diabetes, 12.5% hipertensión y diabetes, 6.3% hipotiroidismo y 31.3% se reportaron sanos. Los pacientes control, fueron 3 hombres y 1 mujer con edades de 46 y 52 años, sin comorbilidades.

Descripción macroscópica del tejido

El pterigón (figura 20) se caracterizó por ser un tejido en forma triangular, de bordes regulares, de 7.27 ± 2.15 mm de diámetro, de coloración rosa pálido, con consistencia gomosa, que fuera de la estructura ocular tendió a enrollarse sobre su eje lo que dificultó su manipulación. En su interior se mostraron ramificaciones de vasos sanguíneos de diferentes calibres.



Figura 20. Fotografía macroscópica del pterigón

Fotografía tomada con cámara digital del tejido, utilizando una regla para mostrar su longitud (X1).

Descripción microscópica del tejido

Se realizó una descripción comparativa de la conjuntiva sana y el pterigión. La conjuntiva, (figura 21, paneles A, B y C) a la tinción de hematoxilina-eosina, mostró una conformación con capas bien definidas. La primera capa, la capa epitelial, de grosor aproximado de 5-6 células, se observó compuesta por epitelio plano estratificado no queratinizado, ordenado, con melanocitos en su región basal. Por debajo del epitelio, se encontró la capa estromal, principalmente compuesta por tejido conectivo, en donde se observaron fibroblastos y algunos vasos sanguíneos de pequeño calibre.

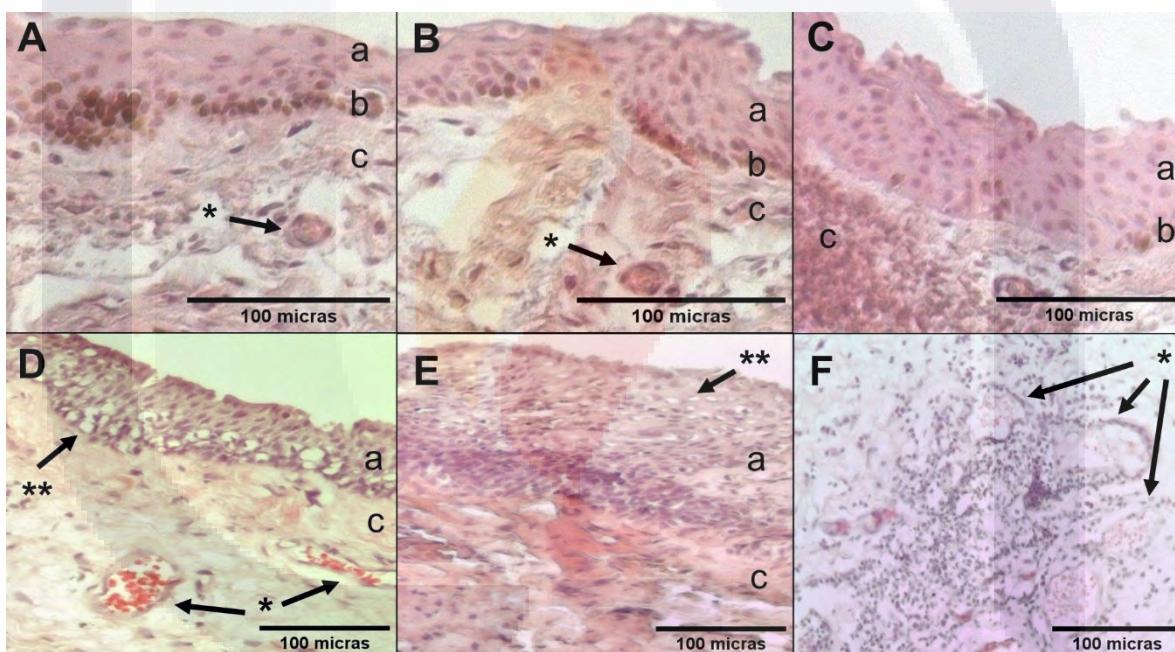


Figura 21. Análisis comparativo de la conjuntiva sana y pterigión

La conjuntiva (**A, B y C**) (SANOS) tiene una capa epitelial (**a**), melanocitos en la zona basal epitelial (**b**) y una capa estromal (**c**) con algunos vasos sanguíneos (*). El pterigión (**D, E y F**) con sus tipos histológicos angiomatoso (**D**) y fibroso (**E**) muestran cambios morfológicos en sus capas epitelial (**a**) y estromal (**c**), con proliferación de vasos sanguíneos (*) e hipertrfia de células caliciformes (**). La imagen **F**, muestra la presencia de infiltrado inflamatorio en el pterigón en la región cercana a los vasos sanguíneos (*). Tinción hematoxilina-eosina. Figuras A, B, C (X20), microscopio Axiovert 40 cfl (Zeiss). Figuras D, E, F (X10), microscopio Axioskop 40 (Zeiss). Análisis de imagen con AxioVision (Zeiss) y FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

El pterigón, a su vez, a la tinción de hematoxilina-eosina mostró tres patrones histológicos predominantes. El 45.5% se clasificó como angiомatoso, el 36.4% como fibroso y el 18.2% como mixto, de acuerdo a su componente principal. El tipo angiомatoso (figura 21, panel D), presentó un epitelio plano estratificado no queratinizado desordenado, con gran hipertrofia de las células caliciformes, la capa estromal presentó múltiples vasos sanguíneos de mayor tamaño que el habitual. El tipo fibroso (figura 21, panel E), se caracterizó por presentar un epitelio plano estratificado no queratinizado muy desorganizado, hiperplásico, de hasta 20 células de grosor, con ligera hipertrofia de las células caliciformes, la capa estromal se mostró fibrótica, engrosada. El tipo mixto fue una combinación de ambos tipos histológicos. Además, se observó un importante infiltrado inflamatorio (figura 21, panel F) en la región perivascular del tejido, compuesto principalmente por monocitos, macrófagos y linfocitos T (figura 22).

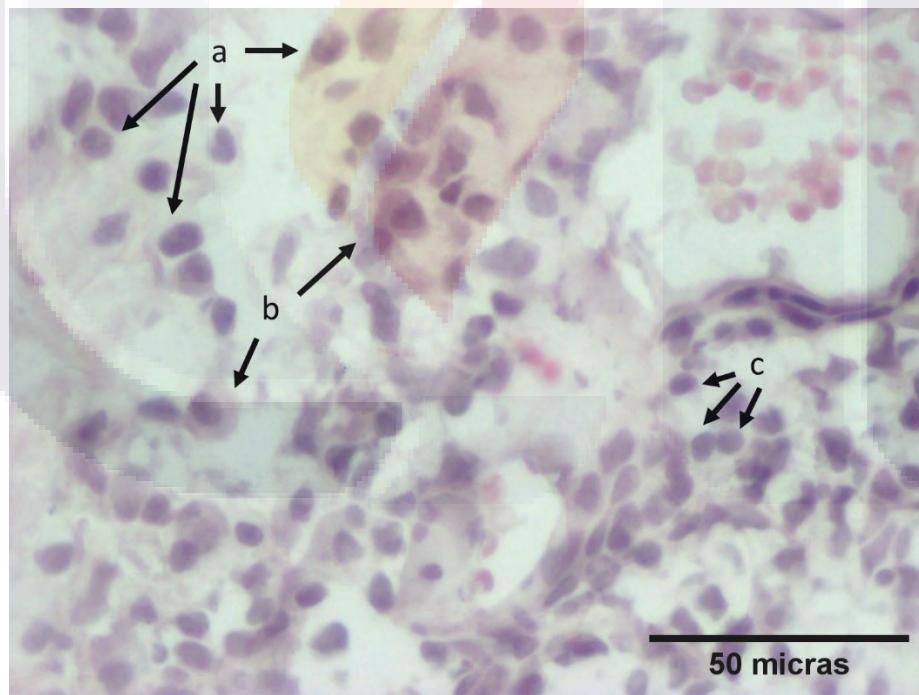


Figura 22. Infiltrado inflamatorio en el pterigón

Infiltrado inflamatorio en la región perivascular del tejido, conformado principalmente por monocitos (a), macrófagos (b) y linfocitos T (c). Tinción hematoxilina-eosina (X40), microscopio Axioskop 40 (Zeiss). Análisis de imagen con AxioVision (Zeiss) y FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

La composición del pterigión, a la tinción tricrómica de Masson (figura 23), mostró predominio de fibras de colágena localizadas en la región subepitelial y estromal.

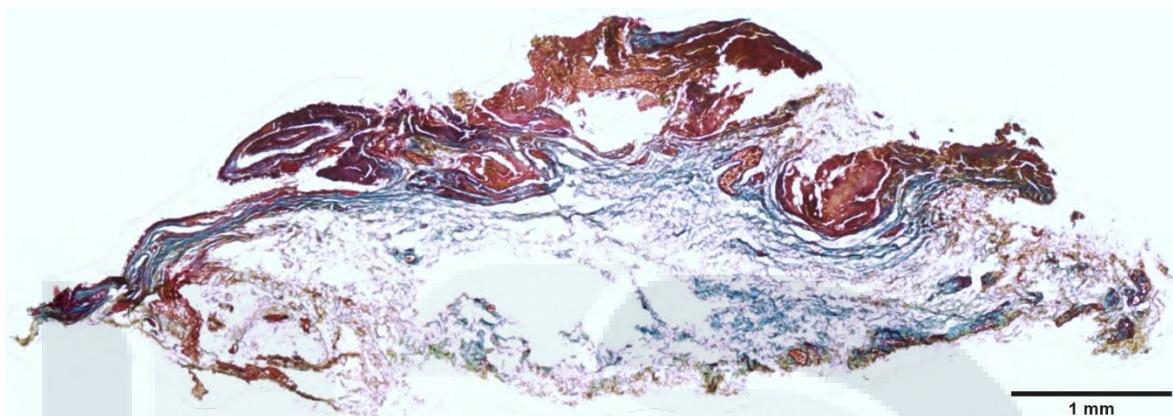


Figura 23. Análisis de la composición del pterigión

El pterigón se mostró conformado en un 90% por fibras de colágena (azul), localizadas por debajo de la capa epitelial (rojo). Tinción tricrómica de Masson, imagen compuesta, realizada campo por campo de todo el tejido (X10), microscopio Axioskop 40 (Zeiss). Análisis de imagen con AxioVision (Zeiss) y FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Expresión de genes inflamatorios y fibrogénicos

El análisis de la expresión génica (figura 24) mostró sobreexpresión de genes inflamatorios de forma significativa en el pterigón, encontrando una diferencia de hasta 24.7 veces mayor para IL17A ($p<0.05$) y de 2.8 veces mayor para TNFA ($p<0.05$) con respecto a la conjuntiva sana.

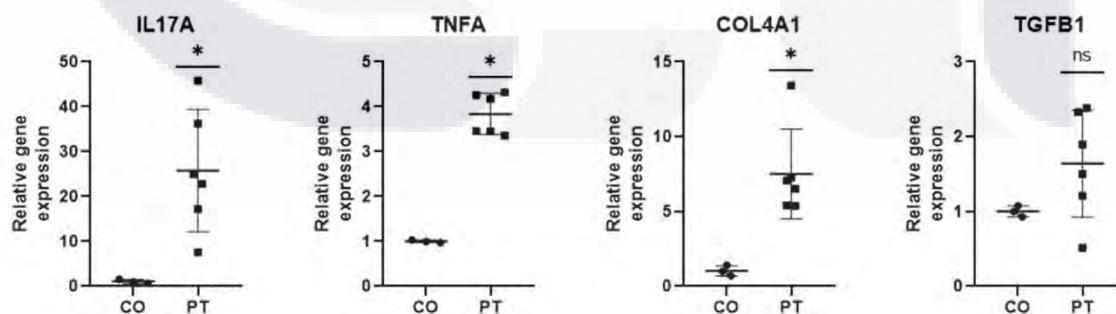


Figura 24. Expresión relativa de genes inflamatorios y fibrogénicos

Expresión relativa de genes inflamatorios (IL17A, TNFA) y fibróticos (COL4A1, TGFB1) en conjuntiva sana (CO) y pterigón (PT). Los puntos determinan la expresión génica de cada paciente. Se muestra además la media ± error estándar de la media (EEM); ns: $p>0.05$, *: $p<0.05$.

La expresión de los genes relacionados con la fibrosis, mostró sobreexpresión del gen COL4A1 de 5.8 veces más ($p<0.05$) con respecto a la conjuntiva, sin embargo, no mostró diferencia significativa en la expresión de TGFB1 ($p>0.05$).

Expresión de genes adrenérgicos

Los genes relacionados con la respuesta adrenérgica mostraron un aumento en su expresión de forma significativa, tanto para TH (14.3 veces, $p<0.05$), como para los receptores adrenérgicos ADRA1A (3.4 veces, $p<0.05$), ADRA1B (1.5 veces, $p<0.01$) y ADRB2 (1.4 veces, $p<0.01$), con respecto a la conjuntiva sana (figura 25).

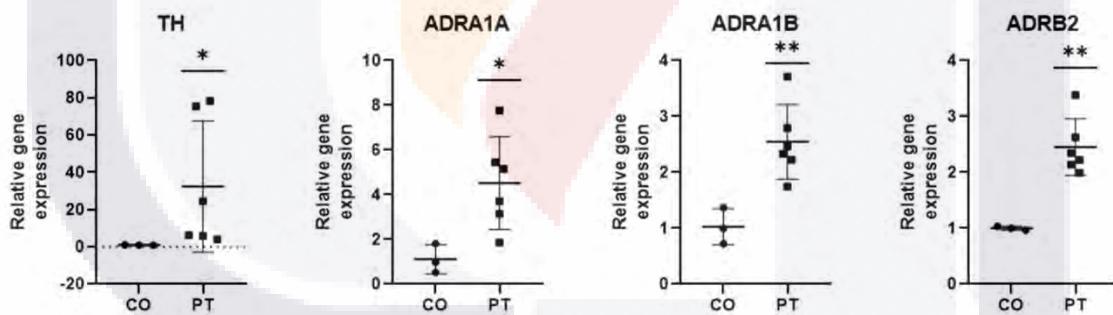


Figura 25. Expresión relativa de genes adrenérgicos

Expresión relativa de genes adrenérgicos (TH, ADRA1A, ADRA1B, ADRB2) en conjuntiva sana (CO) y pterigón (PT). Los puntos determinan la expresión génica de cada paciente. Se muestra además la media ± error estándar de la media (EEM); *: $p<0.05$, **: $p<0.01$.

Localización de tirosina hidroxilasa y receptores adrenérgicos en el pterigón

Con ayuda de inmunohistoquímica se realizó un mapeo para localizar la presencia de TH y receptores adrenérgicos en el pterigón. La TH presentó marcaje predominantemente en la zona subepitelial del pterigón en forma de cintillas y en la capa muscular de los nuevos vasos sanguíneos, tal como se muestra en la figura 26.

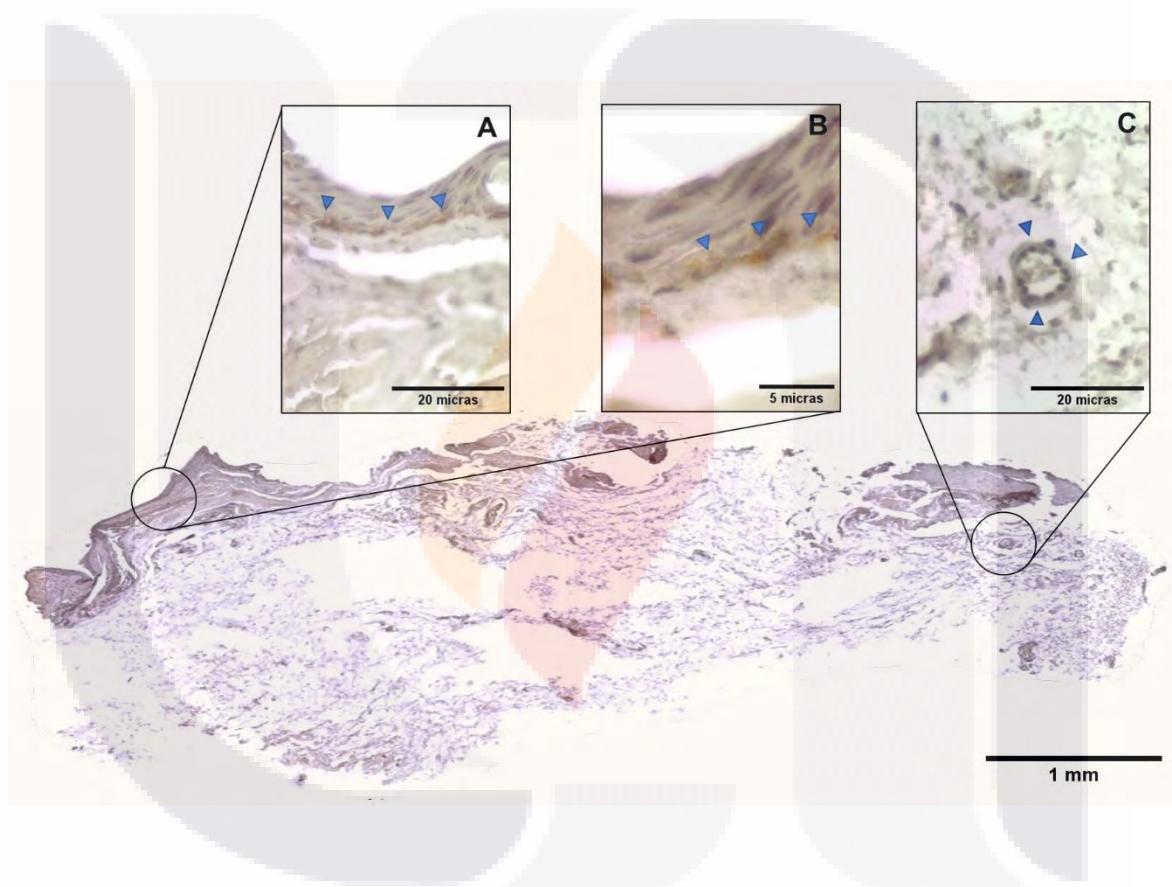


Figura 26. Localización de tirosina hidroxilada en el pterigón

La imagen señala la localización de TH en el pterigón. Inmunoperoxidasa, imagen compuesta, realizada campo por campo de todo el tejido (X10). Las imágenes A y B muestran un acercamiento (X40) y (X100) de la localización subepitelial de la TH (indicador azul). La imagen C es un acercamiento (X40) de la localización vascular de la TH (indicador azul). Microscopio Axioskop 40 (Zeiss). Análisis de imagen con AxioVision (Zeiss) y FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Los receptores ADRA1A (figura 27) se distribuyeron predominantemente en forma de filamentos en la región subepitelial del pterigión, también se localizaron en la zona perivascular del tejido, aunque con menor intensidad.

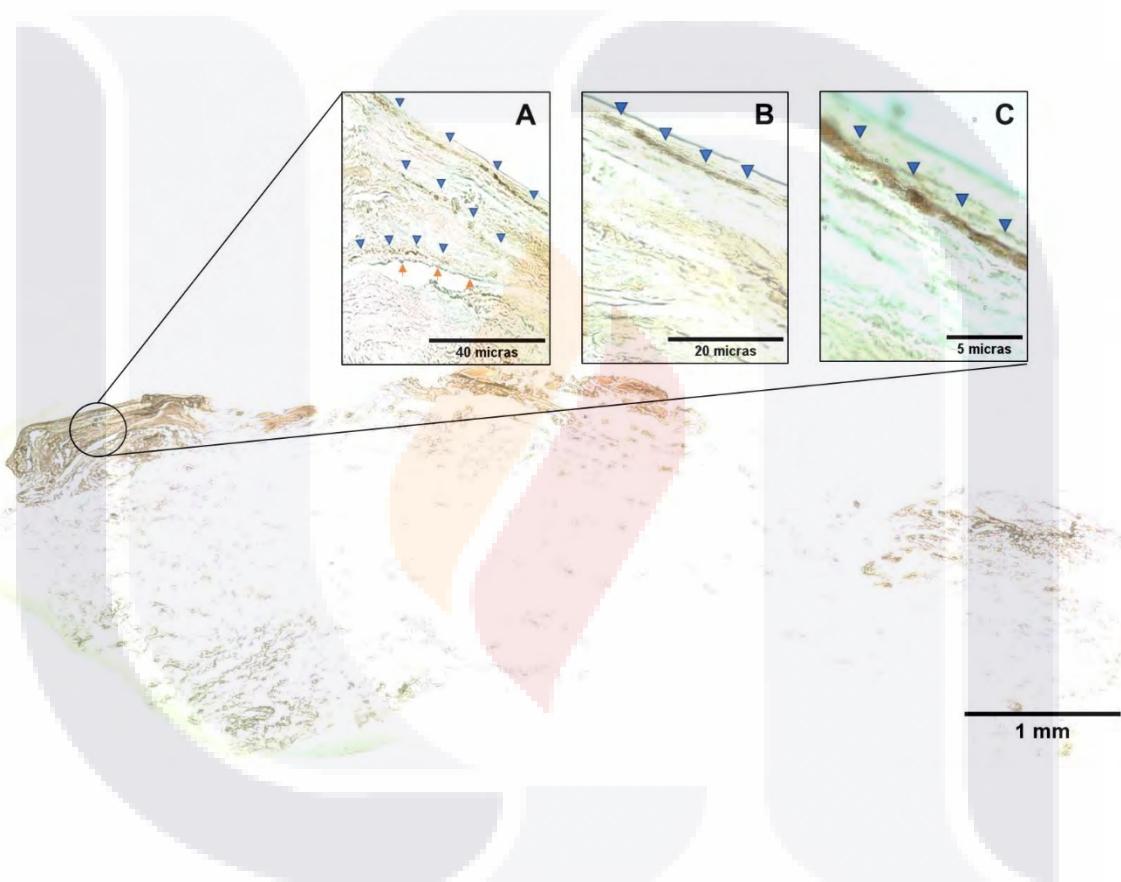


Figura 27. Localización del receptor adrenérgico alfa 1 en el pterigón

La imagen señala la localización de ADRA1A en el pterigón. Inmunoperoxidasa, imagen compuesta, realizada campo por campo de todo el tejido (X10). Las imágenes A, B y C muestran un acercamiento (X20), (X40) y (X100) de la localización subepitelial (indicador azul) y perivascular (flecha) de ADRA1A. Microscopio Axioskop 40 (Zeiss). Análisis de imagen con AxioVision (Zeiss) y FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Los ADRB2 mostraron de igual manera localización subepitelial y en la zona muscular de los vasos sanguíneos, como se puede observar en la figura 28.

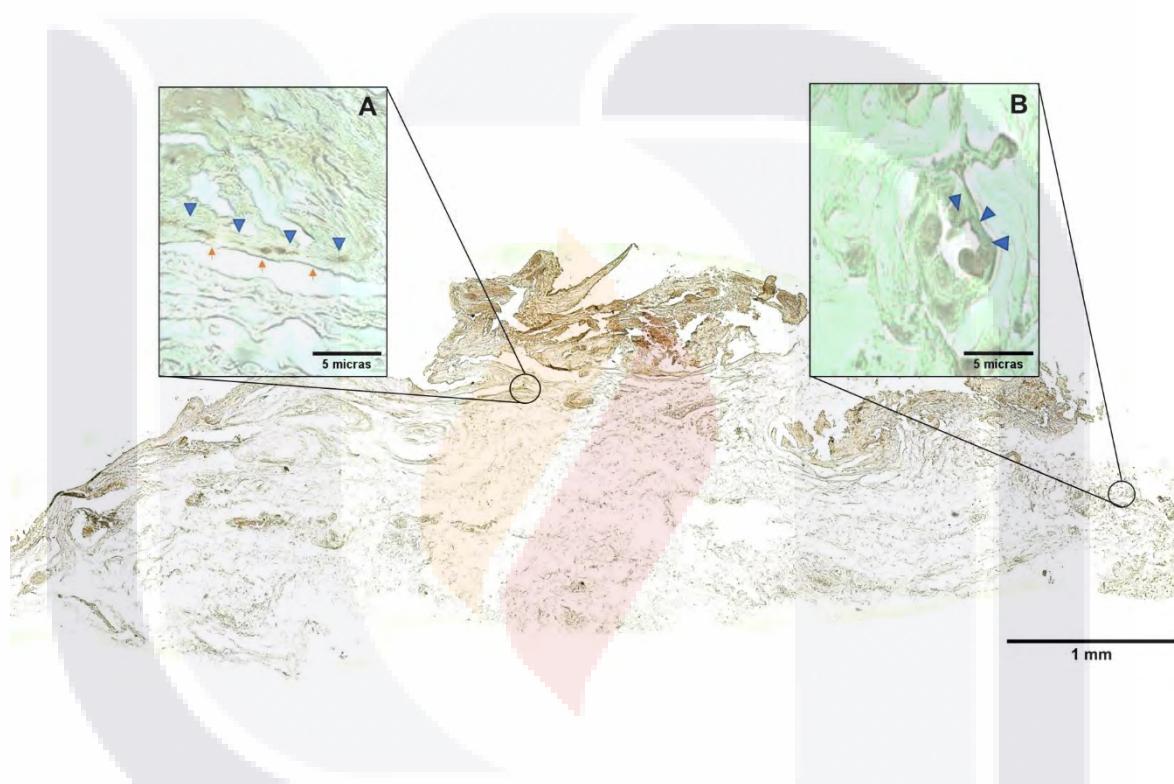


Figura 28. Localización del receptor adrenérgico beta 2 en el pterigión

La imagen señala la localización de ADRB2 en el pterigón. Inmunoperoxidasa, imagen compuesta, realizada campo por campo de todo el tejido (X10). La imagen A muestra en un acercamiento (X100) la ubicación subepitelial (indicador azul) y perivasculares (flecha) de ADRB2. La imagen B señala la ubicación en capa muscular perivascular (X100) de ADRB2 (indicador azul). Microscopio Axioskop 40 (Zeiss). Análisis de imagen con AxioVision (Zeiss) y FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Respuesta inmunitaria en el pterigón

Con inmunofluorescencia se analizó la presencia de células de la respuesta inmune en conjuntiva sana (figura 29, panel A macrófagos y panel C linfocitos T) y en el pterigón (figura 29, panel B macrófagos y panel D linfocitos T), mostrando diferencias significativas entre grupos, encontrando aumento significativo en el pterigón de linfocitos T CD3 positivos (1148 ± 175.4 veces, $p<0.001$), al igual que aumento significativo de macrófagos CD68 positivos (587.0 ± 53.99 veces, $p<0.0001$), en comparación con la conjuntiva sana (figura 30).

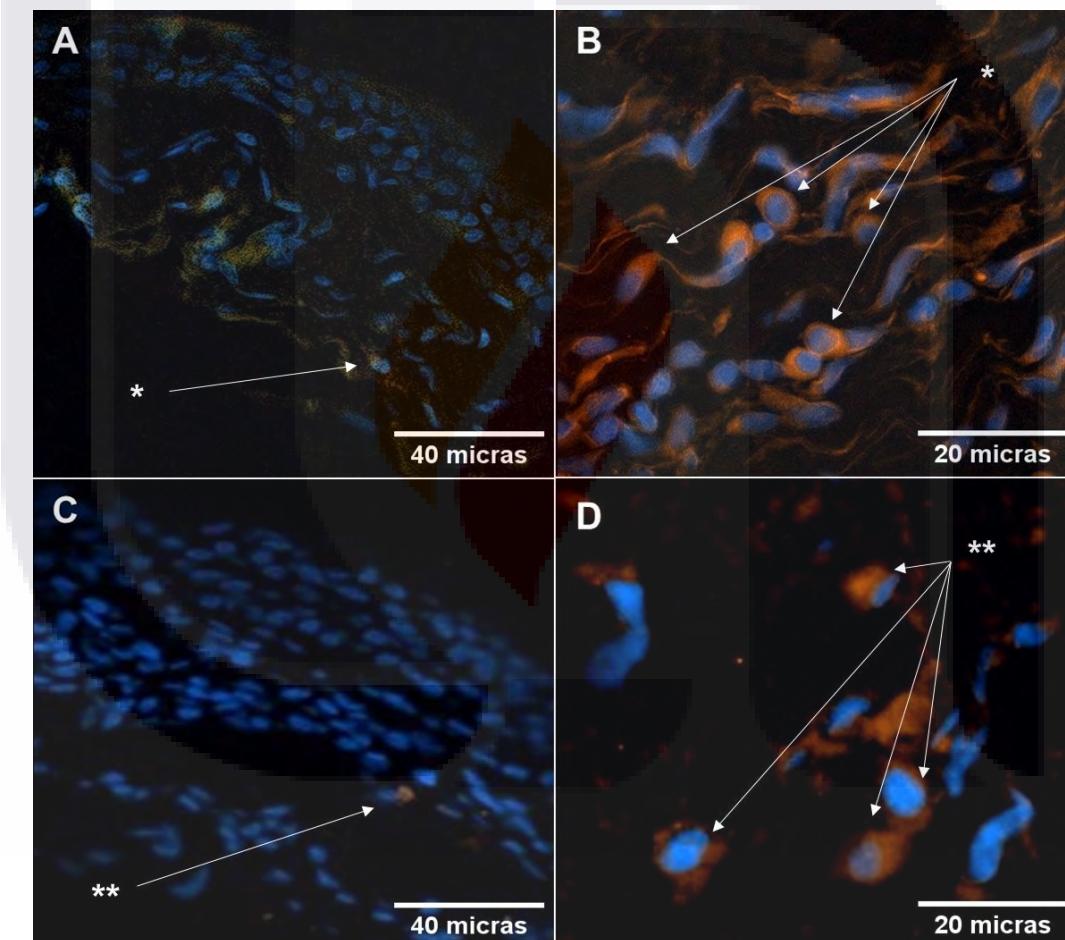


Figura 29. Respuesta inmune en conjuntiva y pterigón

Imagen comparativa de la respuesta inmune en conjuntiva sana y pterigón. Inmunofluorescencia: marcaje con Alexa Flúor 594 ® (rojo-naranja), núcleos con Hoechst 33258 ® (azul). Panel A (conjuntiva X20) y B (pterigón X40) muestran positividad para linfocitos T (CD3) señalado como *. Panel C (conjuntiva X20) y D (pterigón X40) muestran positividad para macrófagos (CD68) señalado como **. Microscopio Axioskop 40 (Zeiss). Análisis de imagen con AxioVision (Zeiss) y FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

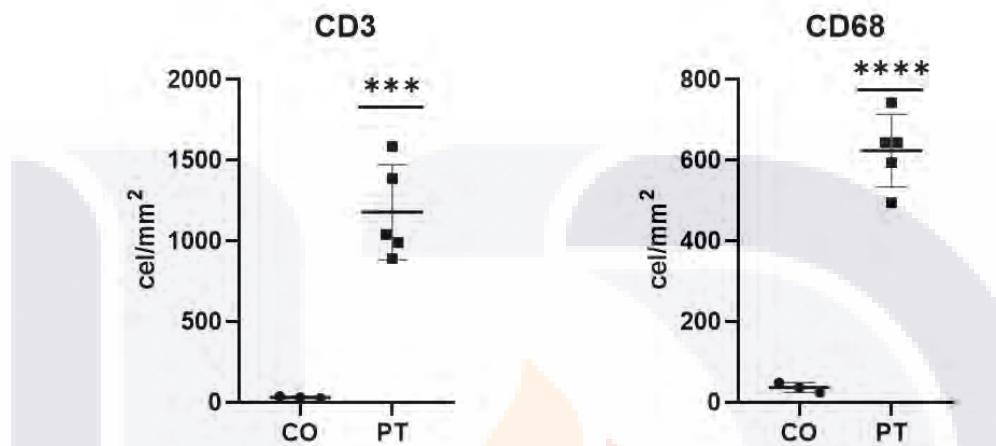


Figura 30. Recuento de células inmunitarias presentes en conjuntiva y pterigión

Recuento celular de linfocitos T CD3 positivos y macrófagos CD68 positivos en cortes histológicos de conjuntiva sana (CO) y pterigión (PT). Los puntos determinan la cuantificación celular de cada paciente. Se muestra además la media ± error estándar de la media (EEM); ***:p<0.001, ****:p<0.0001.

Relación neuroinmune en el pterigón

A través de doble inmunofluorescencia se analizó la co-localización de las células inmunitarias y el sistema adrenérgico, encontrando una interrelación muy estrecha entre TH, linfocitos T (figura 31, panel A) y macrófagos (figura 31, panel B) en el pterigón.

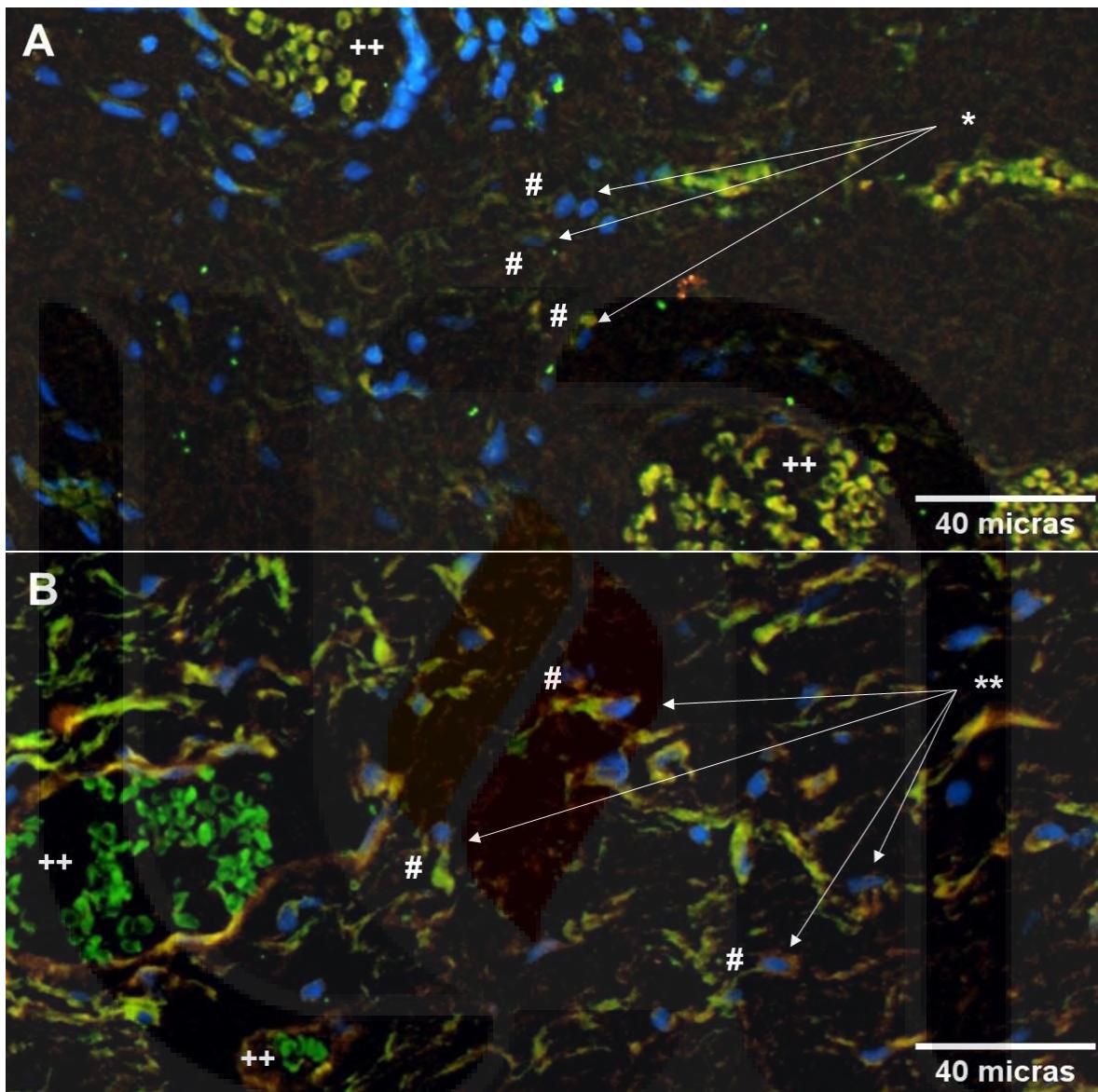


Figura 31. Relación neuroinmune en el pterigión

Imagen que muestra el infiltrado de células inmunes presentes en el pterigón y su estrecha relación con la enzima TH (X20). Doble inmunofluorescencia: marcaje de macrófagos y linfocitos con Alexa Flúor 594 ® (rojo-naranja), TH con Alexa Flúor 488 ® (verde), núcleos con Hoechst 33258 ® (azul). El panel A muestra linfocitos T CD3 positivos (*) y el panel B macrófagos, CD68 positivos (**) en interacción con TH (#). Se observan algunos eritrocitos en vasos sanguíneos (++) . Microscopio Axioskop 40 (Zeiss). Análisis de imagen con AxioVision (Zeiss) y FIJI (Fiji Is Just Image J, GNU General Public License).

Discusión

El pterigión es una patología de la superficie ocular, en la cual la conjuntiva bulbar invade la córnea de forma centrípeta (4). Se origina por una mutación de p53 en las células madres del limbo desencadenada principalmente por la exposición continua a la radiación UV, estimulando la transformación epitelio-mesenquimatosa del epitelio conjuntival y ocasionando cambios conformacionales en el tejido que le confieren su característica fibrótica (20).

Histológicamente el tejido presenta hiperplasia epitelial desorganizada, debido a su crecimiento exponencial, hipertrofia de las células caliciformes, principales secretoras de mucina y antígenos en la superficie ocular, pérdida de los melanocitos en la membrana basal epitelial, reduciendo la protección ocular a la luz UV, ruptura de la membrana de Bowman al invadir la región corneal, tejido que carece de poder regenerativo, depósito importante de fibras de colágena en la región estromal y formación de nuevos vasos sanguíneos, debido a las necesidades energéticas incrementadas del nuevo tejido en proliferación (7). Dichas características reportados en la bibliografía concuerdan con los hallazgos encontrados en los tejidos de pterigón estudiados.

Se clasifica histológicamente en angiomatoso, fibroso y mixto, siendo el más frecuente el tipo mixto, seguido del angiomatoso y por último el fibroso (9). En nuestro estudio el tipo angiomatoso se mostró predominante en un 45.5%, seguido del fibroso en 36.4%, el tipo mixto se presentó en un 18.2%.

La expresión génica relativa mostró diferencias significativas entre los tejidos de pterigón y conjuntiva sana. El pterigón mostró un aumento en la expresión de genes proinflamatorios y fibrogénicos, con predominio en IL17A y COL4A1, explicando un papel preponderante de los linfocitos T en la fibrogénesis (30), lo que se relaciona con el recuento celular observado. De igual forma, mostró un aumento en la expresión de genes adrenérgicos, principalmente TH, ADRA1B y ADRB2 indicativo de la intervención del sistema simpático en la patogénesis del pterigón. Lo cual corresponde a lo encontrado por varios autores, en donde la norepinefrina

interviene en la fibrogénesis en pulmón (38), corazón (39), piel (40), riñón (41) e hígado (42). La media de los casos, no mostró diferencia significativa en TGFB1, sin embargo, de forma individual se presentaron casos con incremento de la expresión debido a la variabilidad de los tipos histológicos de pterigón que se analizaron.

Varios grupos de investigación han estudiado por pruebas morfológicas tales como inmunohistoquímica e inmunofluorescencia la presencia de tirosina hidroxilasa, enzima clave en las síntesis de norepinefrina, en tejidos de enfermedades fibróticas y su relación tanto con la inflamación como en la fibrogénesis.

Oben y colaboradores (49), a través de la detección de fibras nerviosas simpáticas con inmunohistoquímica e inmunofluorescencia, evidenciaron que la activación de las fibras nerviosas simpáticas aumenta la epinefrina y norepinefrina de forma local, y que al interactuar estas catecolaminas con las células estelares hepáticas y las células ovales hepáticas (células madre del hígado) a través de sus receptores tanto alfa como beta adrenérgicos, exacerbaban la lesión hepática y fibrosis en la cirrosis hepática.

Así mismo, Neuhuber y Tiegs (50), encontraron hallazgos similares en un modelo murino de hepatitis, en donde se demostró por medio de inmunofluorescencia que la activación de las fibras simpáticas aumentaba los niveles de norepinefrina de forma local modulando la inflamación y fibrosis incluso sin estar en íntimo contacto con las fibras nerviosas.

Sin embargo, no se ha estudiado antes la distribución de las fibras nerviosas simpáticas en el pterigón y su relación tanto con la inflamación como la fibrosis, siendo nuestro estudio pionero en esta caracterización. Los receptores adrenérgicos, y consecuentemente la enzima TH, se localizaron en el pterigón en la región basal del epitelio, correspondiente a la inervación del plexo nervioso sub-basal de la córnea (47) y en la periferia de los vasos sanguíneos (31), ubicación clave en la patogénesis de la enfermedad, ya que, al contar las células inmunes con receptores adrenérgicos, principalmente los linfocitos T con ADRB2 (32), estimulan

la migración de las células inmunes de los vasos sanguíneos al tejido y su subsecuente acción en la región subepitelial, favoreciendo el crecimiento epitelial acelerado en el pterigión. Esta relación se demostró al observar la estrecha interconexión de la TH y las células inmunes en el pterigón.

Conclusión

Existe una neuroinmunomodulación involucrada en la patogénesis del pterigón a través de la activación del sistema nervioso simpático y sus neurotransmisores epinefrina y norepinefrina. A nivel intravascular, la norepinefrina favorece la migración de macrófagos y linfocitos T, perpetuando la inflamación. Así mismo, las fibras nerviosas simpáticas localizadas a nivel subepitelial favorecen el crecimiento epitelial y fibrosis del pterigón.

Estos hallazgos abren paso a nuevos estudios enfocados en la inervación simpática del pterigón. El uso de antagonistas de los receptores adrenérgicos de forma tópica a nivel ocular, podría ser quizás en un futuro una meta terapéutica para frenar la progresión y el crecimiento del pterigón disminuyendo con eso su alta tasa de recurrencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sridhar MS. Anatomy of cornea and ocular surface. Indian J Ophthalmol [Internet]. 2018 Feb 1 [cited 2024 Jan 8];66(2):190–4. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29380756/>
2. Barrera V, Troughton LD, Iorio V, Liu S, Oyewole O, Sheridan CM, et al. Differential Distribution of Laminin N-Terminus α 31 Across the Ocular Surface: Implications for Corneal Wound Repair. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018 Aug 1;59(10):4082–93.
3. Fernández A, Moreno J, Prósper F, García M, Echeveste J, Fernández A. Regeneración de la superficie ocular: stem cells/células madre y técnicas reconstructivas. An Sist Sanit Navar [Internet]. 2008 [cited 2024 Jan 8];31(1):53–69. Available from:
https://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272008000100005&lng=es&nrm=iso&tlang=es
4. Chui J, Coroneo MT, Tat LT, Crouch R, Wakefield D, Di Girolamo N. Ophthalmic pterygium: a stem cell disorder with premalignant features. Am J Pathol [Internet]. 2011;178(2):817–27. Available from: files/8/Chui et al. - 2011 - Ophthalmic pterygium a stem cell disorder with pr.pdf
5. Valeria D, Rodríguez R. Physiopathology and differential diagnosis of pterygium. cien tecnol salud vis ocul. 2015;13(2).
6. Arai Y, Makino S, Obata H. Stocker's line in pterygium. J Gen Fam Med. 2017 Apr 1;18(2):92–3.
7. 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.

8. Girolamo N Di, Mccluskey P, Lloyd A, Coroneo MT, Wakefield D. Expression of MMPs and TIMPs in Human Pterygia and Cultured Pterygium Epithelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2000;41(3):671–9.
9. RATNAKAR KS, GOSWAMY V, AGARWAL LP. Mast cells and pterygium. *Acta Ophthalmol* [Internet]. 1976 [cited 2023 Nov 18];54(3):363–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/988951/>
10. Liu L, Wu J, Geng J, Yuan Z, Huang D. Geographical prevalence and risk factors for pterygium: a systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* [Internet]. 2013 [cited 2022 Aug 24];3(11). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24253031/>
11. Moran DJ, Hollows FC. Pterygium and ultraviolet radiation: a positive correlation. *Br J Ophthalmol*. 1984;68(5):343–6.
12. Taylor HR, West SK, Rosenthal FS, Munoz B, Newland HS, Emmett EA. Corneal changes associated with chronic UV irradiation. *Arch Ophthalmol*. 1989;107(10):1481–4.
13. Gallagher M, Giannoudis A, Herrington C, Hiscott P. Human papillomavirus in pterygium. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 2001;85(7):782–4. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1724030/>
14. Chalkia AK, Spandidos DA, Detorakis ET. Viral involvement in the pathogenesis and clinical features of ophthalmic pterygium (Review). *Int J Mol Med* [Internet]. 2013;32(3):539–43. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3782552/>

15. Coroneo MT. Pterygium as an early indicator of ultraviolet insolation: a hypothesis. *Br J Ophthalmol* [Internet]. 1993 [cited 2022 Aug 24];77(11):734. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC504636/>
16. Anguria P, Kitinya J, Ntuli S, Carmichael T. The role of heredity in pterygium development. *Int J Ophthalmol* [Internet]. 2014;7(3):563–73. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4067677/>
17. Pinkerton OD, Hokama Y, Shigemura LA. Immunologic basis for the pathogenesis of pterygium. *Am J Ophthalmol*. 1984;98(2):225–8.
18. Hill JC, Maske R. Pathogenesis of pterygium. *Eye (Lond)*. 1989;3 (Pt 2):218–26.
19. Coroneo MT, Di Girolamo N, Wakefield D. The pathogenesis of pterygia. *Curr Opin Ophthalmol*. 1999;10(4):282–8.
20. Ochoa-Tabares JC. Génesis del pterigón. Una aproximación desde la biología molecular. *Rev Mex Oftalmol* [Internet]. 2006;6(80):318–24. Available from: <https://www.mediographic.com/pdfs/revmexoft/rmo-2006/rmo066f.pdf>
21. Dushku N, John MK, Schultz GS, Reid TW. Pterygia pathogenesis: corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. *Arch Ophthalmol*. 2001;119(5):695–706.
22. Wang IJ, Hu FR, Chen PJ, Lin CT. Mechanism of abnormal elastin gene expression in the pinguecular part of pterygia. *Am J Pathol*. 2000;157(4):1269–76.

23. Alonso García A, Casellas Téllez M, Rodríguez Aguilar M, González Martínez NZ, Recio Acevedo L. Caracterización clínica e histopatológica del pterigion primario. Revista Archivo Médico de Camagüey [Internet]. 2018;22(2):139–51. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1025-02552018000200004&lng=es&nrm=iso&tlng=es
24. Malozhen SA, Trufanov S V, Krakhmaleva DA. Pterygium: etiology, pathogenesis, treatment. Vestn Oftalmol. 2017;133(5):76–83.
25. Ashaye AO. Refractive astigmatism and size of pterygium. Afr J Med Med Sci. 2002;31(2):163–5.
26. Janson BJ, Sikder S. Surgical management of pterygium. Ocul Surf. 2014;12(2):112–9.
27. Hirst LW, Sebban A, Chant D. Pterygium recurrence time. Ophthalmology [Internet]. 1994 [cited 2023 Aug 29];101(4):755–8. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8152771/>
28. Domdey M, Kluth MA, Maßlo C, Ganss C, Frank MH, Frank NY, et al. Consecutive dosing of UVB irradiation induces loss of ABCB5 expression and activation of EMT and fibrosis proteins in limbal epithelial cells similar to pterygium epithelium. Stem Cell Res [Internet]. 2022 Oct 1 [cited 2023 Aug 29];64. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36242878/>
29. Mechanisms of Fibrosis | Cell Signaling Technology [Internet]. [cited 2023 May 14]. Available from: <https://www.cellsignal.com/pathways/mechanisms-of-fibrosis-pathway>

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
30. Mack M. Inflammation and fibrosis. *Matrix Biol* [Internet]. 2018 Aug 1 [cited 2023 Sep 13];68–69:106–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29196207/>
 31. Tortora G, Derrickson B. Principios de Anatomía y Fisiología. 15°. Madrid, España: Editorial Médica Panamericana; 2018. 403–445 p.
 32. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun* [Internet]. 2007 Aug [cited 2023 Oct 22];21(6):736–45. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17467231/>
 33. ADRA1D - Alpha-1D adrenergic receptor - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2023 May 14]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P25100/entry>
 34. beta-2 adrenergic receptor [Homo sapiens] - Protein - NCBI [Internet]. [cited 2023 May 14]. Available from: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000015.2
 35. ADRB2 - Beta-2 adrenergic receptor - Homo sapiens (Human) | UniProtKB | UniProt [Internet]. [cited 2023 May 14]. Available from: <https://www.uniprot.org/uniprotkb/P07550/entry>
 36. Expasy - ProtParam tool [Internet]. [cited 2023 May 14]. Available from: <https://web.expasy.org/protparam/>
 37. Taira CA, Carranza A, Bertera F, Höcht C. Catecolaminas, síntesis, metabolismo, receptores adrenérgicos y dopaminérgicos. In: Hipertensión arterial: Epidemiología, fisiopatología, diagnóstico y terapéutica [Internet]. Buenos Aires, Argentina: Inter-Médica; 2013 [cited 2023 Oct 31]. p. 208–13. Available from: <http://hdl.handle.net/11336/123133>

38. Rassler B. Role of α - and β -adrenergic mechanisms in the pathogenesis of pulmonary injuries characterized by edema, inflammation and fibrosis. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* [Internet]. 2013 Feb 1 [cited 2023 Oct 29];13(3):197–207. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24479719/>
39. Monroe TB, Anderson EJ. A Catecholaldehyde Metabolite of Norepinephrine Induces Myofibroblast Activation and Toxicity via the Receptor for Advanced Glycation Endproducts: Mitigating Role of L-Carnosine. *Chem Res Toxicol* [Internet]. 2021 Oct 18 [cited 2023 Oct 29];34(10):2194–201. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34609854/>
40. Uehara A, Motegi SI, Yamada K, Uchiyama A, Perera B, Toki S, et al. Mechanistic insight into the norepinephrine-induced fibrosis in systemic sclerosis. *Sci Rep* [Internet]. 2016 Sep 21 [cited 2023 Oct 29];6. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27650973/>
41. Ren H, Zuo S, Hou Y, Shang W, Liu N, Yin Z. Inhibition of α 1-adrenoceptor reduces TGF- β 1-induced epithelial-to-mesenchymal transition and attenuates UUO-induced renal fibrosis in mice. *FASEB J* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2023 Oct 29];34(11):14892–904. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32939891/>
42. Lin XH, Liu HH, Hsu SJ, Zhang R, Chen J, Chen J, et al. Norepinephrine-stimulated HSCs secrete sFRP1 to promote HCC progression following chronic stress via augmentation of a Wnt16B/ β -catenin positive feedback loop. *J Exp Clin Cancer Res* [Internet]. 2020 Apr 15 [cited 2023 Oct 26];39(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7158101/](https://pmc/articles/PMC7158101/)

43. Medina Pizaño MY, Loera Arias M de J, Montes de Oca Luna R, Saucedo Cárdenas O, Ventura Juárez J, Muñoz Ortega MH. Neuroimmunomodulation of adrenoblockers during liver cirrhosis: modulation of hepatic stellate cell activity. *Ann Med* [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 26];55(1):543–57. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36826975/>
44. Stern ME, Beuerman RW, Fox RI, Gao J, Mircheff AK, Pflugfelder SC. The pathology of dry eye: the interaction between the ocular surface and lacrimal glands. *Cornea* [Internet]. 1998 [cited 2023 Oct 29];17(6):584–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9820935/>
45. Sánchez Dalmau B. Anomalías pupilares. *Annals d'Oftalmologia* [Internet]. 2003 [cited 2023 Dec 6];11(1):21–32. Available from: <https://annalsoftalmologia.com/articulos/a1170/of-11-1-003.pdf>
46. Marfurt CF, Cox J, Deek S, Dvorscak L. Anatomy of the human corneal innervation. *Exp Eye Res* [Internet]. 2010 Apr [cited 2023 Oct 29];90(4):478–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20036654/>
47. He J, Bazan NG, Bazan HEP. Mapping the entire human corneal nerve architecture. *Exp Eye Res* [Internet]. 2010 Oct [cited 2023 Oct 29];91(4):513. Available from: [/pmc/articles/PMC2939211/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2939211/)
48. Sheha H, Tighe S, Hashem O, Hayashida Y. Update On Cenegermin Eye Drops In The Treatment Of Neurotrophic Keratitis. *Clin Ophthalmol* [Internet]. 2019 [cited 2024 Jan 10];13:1973. Available from: [/pmc/articles/PMC6789413/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6789413/)

49. Oben JA, Diehl AM. Sympathetic nervous system regulation of liver repair. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2004 Sep;280(1):874–83.
50. Neuhuber WL, Tiegs G. Innervation of immune cells: Evidence for neuroimmunomodulation in the liver. *Anatomical Record - Part A Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology*. 2004 Sep;280(1):884–92.



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexos



TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Anexo A. Formulario de recolección de piezas quirúrgicas



Proyecto: Caracterización de la respuesta neuroinmune del pterigón.

Fecha:

Folio:

Nombre del paciente: _____

Edad: _____ Sexo: _____ Pterigión primario: SI / NO

El paciente padece:

- ¿Diabetes? SI NO Tratamiento: _____
 - ¿Hipertensión? SI NO Tratamiento: _____
 - ¿Otra enfermedad? ¿Cuál? _____ Tratamiento: _____

En la última semana:

- ¿Usó vasconstrictores oftálmicos? SI NO
 - ¿Usó desinflamatorios oftálmicos? SI NO
 - ¿Padeció alguna enfermedad ocular? SI NO

Describa cuál:

Anexo B. Carta de consentimiento informado para participación en protocolos de investigación

Aguascalientes, Ags; a _____

Título de la **CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA NEUROINMUNE EN EL PTERIGIÓN**
Investigación:
Número de Registro CIB-UAA-44
UAA:
Investigador Sofía Guadalupe Ocón García
responsable: Dr. Luis Fernando Barba Gallardo
Dr. Martín Humberto Muñoz Ortega
Dr. Javier Ventura Juárez

A través de este documento se le invita a participar en esta investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes. Antes de decidir, si desea participar o no, necesita entender por qué se está realizando esta investigación y en qué consistirá su participación. Por favor tómese el tiempo que usted necesite, para leer la siguiente información cuidadosamente y pregunte cualquier cosa que no comprenda. Si usted lo desea puede consultar con personas de su confianza (Familiar y/o Médico tratante) sobre la presente investigación.

- ¿Cuál es el objetivo de esta investigación?** Conocer algunos de los mecanismos involucrados en la formación del pterigión.
- ¿Por qué es importante esta investigación?** Porque este conocimiento permitirá nuevas opciones de tratamiento.
- ¿Por qué he sido invitado a participar?** Porque será sometido a cirugía de resección de pterigión como parte del tratamiento indicado por su médico tratante.
- ¿En qué consistirá mi participación?** En donar a la Universidad Autónoma de Aguascalientes, con fines de investigación, su pieza quirúrgica (pterigón) extraída durante su cirugía correctiva.
- ¿Estoy obligado a participar?** Su participación es voluntaria, anónima y confidencial; no tiene que participar forzosamente.
- ¿Qué sucede cuando la Investigación termina?** Los resultados serán publicados en revistas de investigación científica, respetando ante todo su confidencialidad. Si usted quiere conocer los resultados de la investigación podrá contactar a los investigadores quien con gusto le brindarán dicha información.

Después de leer y comprender los alcances de esta investigación, en qué consistirá mi participación, y haber resuelto todas mis dudas:

- No autorizo donar mi pieza quirúrgica.
 Si autorizo donar mi pieza quirúrgica.

NOMBRE Y FIRMA DEL PARTICIPANTE

NOMBRE Y FIRMA DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO (PARENTESCO)
DIRECCIÓN:

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO (PARENTESCO)
DIRECCIÓN:

Los datos personales contenidos en la presente Carta de Consentimiento Informado, serán protegidos conforme a lo dispuesto en las Leyes Federal de Transparencia y Acceso a la Información Pública, General de Transparencia y Acceso a la Información Pública y General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados y demás normatividad aplicable en la materia.

Anexo C. Aviso de privacidad integral de protocolos de investigación de la Universidad Autónoma de Aguascalientes.

El investigador principal del protocolo de investigación, es el responsable del tratamiento de los datos personales y datos personales sensibles que usted proporcione con motivo de la participación en un protocolo de investigación, mismos que serán tratados estadísticamente en materia de salud, sin que se vulnere su identidad mediante el proceso de disociación, para proteger la identificación de los mismos, de conformidad con los artículos 1, 2, 3, 8, 16, 17, 18, fracción VII del 22, 26, 27 y demás relativos de la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados.

De manera adicional, los datos personales que usted nos proporcione podrán ser utilizados para contar con datos de control, estadísticos e informes sobre el protocolo de investigación, sin que se vulnere su identidad mediante el proceso de disociación del titular, con la finalidad de no permitir por su estructura, contenido o grado de desagregación, la identificación del mismo, como lo establece la fracción XIII del artículo 3, de la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados.

El investigador principal del protocolo de investigación podrá acceder a sus datos personales de identificación y datos personales sensibles, derivado de la Carta de Consentimiento Informado, debidamente requisitada a través de su firma autógrafa, firma electrónica o cualquier otro mecanismo de autenticación que al efecto se establezca, con la finalidad de cumplir con lo establecido en el párrafo cuarto, del Artículo 21, de la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de Sujetos Obligados.

Adicionalmente, con la finalidad de llevar a cabo el protocolo de investigación, se solicitan todos o algunos de sus siguientes datos personales sensibles: estado de salud presente y pasado (discapacidades, intervenciones quirúrgicas, vacunas, toxicomanías, uso de aparatos oftalmológicos, ortopédicos, auditivos, prótesis, anteojos etc.), historial clínico (alergias, enfermedades, incapacidades, diagnósticos médicos, etc.), características físicas (color de piel, color de iris, color de cabello, señas particulares, estatura, peso, complexión, etc.); características personales (tipo de sangre, ADN, etc.), información genética, preferencias sexuales, datos de identificación (nombre de familiares, costumbres, idioma o dialecto, etc.), nivel escolar, ocupación, datos patrimoniales (ingresos y egresos), datos ideológicos (creencia religiosa, filosófica o moral etc.) y origen étnico o racial, entre otros.

En el caso de protocolos de colaboración con otras instituciones, hospitales, centros de investigación, universidades nacionales o internacionales, los datos que se comparten, se encuentran protegidos, por lo que no se vulnera su identidad mediante el proceso de disociación, para proteger la identificación de los mismos. El tratamiento de sus datos personales y datos personales sensibles, se realiza con fundamento en lo establecido en los artículos 1, 2 fracciones V y VI, 3, 8, 16, 17, y 18, fracción VII del 22, 26, 27 y demás relativos de la Ley General de Protección de Datos Personales en Posesión de los Sujetos Obligados.

Usted podrá ejercer sus derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición de sus datos personales (derechos ARCO), directamente ante la unidad de transparencia de este instituto, ubicada en Avenida Universidad No. 940, Ciudad Universitaria, Aguascalientes, Ags. C.P. 20100; comunicarse al teléfono (449) 910 7400, extensión 53014, o bien, a través de la plataforma nacional de transparencia: <http://www.plataformadetransparencia.org.mx>

En caso de que exista un cambio en este aviso de privacidad, loharemos de su conocimiento a través del portal institucional: <http://www.uaa.mx>