



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FUNDACIÓN HOSPITAL DE NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ I.A.P**

**ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEÓMICO
EN CÉLULAS DE PTERIGION PRIMARIO Y RECIDIVANTE**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

CIRUJANO OFTALMÓLOGO

P R E S E N T A:

DRA. ARACELI ROJAS DÍAZ

ASESORES

Dr. Ellery Marino López Star

Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio



AGOSTO 2010





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio
Director de Tesis

Dr. Ellery Marino López Star
Director de tesis

Dra. Gloria A. Campomanes Eguiarte
Jefe de Enseñanza

Dr. Jaime Lozano Alcázar
Asesor del Curso de Especialidad

El trabajo de investigación “ANÁLISIS DEL PERFIL PROTEÓMICO EN PTERIGION PRIMARIO Y RECIDIVANTE”, se realizó en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana IAP en colaboración con la Fundación Hospital Nuestra Señora de la Luz I.A.P., bajo la dirección del Dr. Ellery Marino López Star, Dr. Víctor Manuel Bautista de Lucio y Dra. María del Carmen Jiménez Martínez. Este trabajo fue financiado en parte por el proyecto CONACyT 71291 .

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

A Dios por darme fuerza y permitirme terminar la especialidad.

A mis padres y hermano por su cariño y compañía en todo momento.

A la Dra. Gloria Alicia Campomanes por su comprensión y apoyo.

A Mauricio y mis amigos por su confianza, lealtad y amistad incondicional.

Al Dr. Ellery y Dr. Víctor Manuel por su amable asesoramiento para la realización de ésta tesis y su enseñanza durante estos años.

ÍNDICE

INDICE v	
INDICE DE FIGURAS Y TABLAS	vii
ABREVIATURAS	viii
I RESUMEN.....	1
II INTRODUCCIÓN	4
2.1 HISTORIA.....	4
2.2 EPIDEMIOLOGÍA.....	4
2.3 DEFINICIONES.....	5
2.4 CLASIFICACIÓN.....	6
2.5 FISIOPATOLOGÍA.....	6
2.6 DIAGNÓSTICO.....	9
2.6.1 HISTOPATOLOGÍA.....	10
2.7 TRATAMIENTO.....	11
III ANTECEDENTES.....	15
IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
V JUSTIFICACIÓN... ..	23
VI HIPÓTESIS	24
VII OBJETIVOS	25
7.1 Objetivo general	25
7.2 Objetivos particulares.....	25
VIII METODOLOGÍA	26
8.1 Reactivos y material	26
8.2 Aislamiento y manejo de las células de Pterigión.....	27
8.2.1 Obtención del tejido	27
8.2.2 Cultivo celular primario	27
8.2.3 Tripsinización.....	28
8.2.4 Fenotipificación y tinción... ..	29
8.2.5 Cuantificación de proteínas	29

8.2.6 Purificación de proteínas	30
8.2.7 Isoelectroenfoque	30
8.2.8 Electroforesis bidimensional	31
8.2.9 Tinción de azul de Coomasie.....	31
8.3 Diseño del estudio.....	32
8.4 Universo	32
8.4.1 Criterios de Inclusión	32
8.4.2 Criterios de Exclusión	32
8.4.3 Criterios de Eliminación	33
IX RESULTADOS ..	34
X DISCUSIÓN ..	41
XI CONCLUSIONES ..	47
XII BIBLIOGRAFÍA ..	48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 CONFLUENCIA CELULAR.....	28
FIGURA 2 CÉLULAS DE PTERIGIÓN PRIMARIO 4X	36

FIGURA 3 CÉLULAS DE PTERIGIÓN RECIDIVANTE 4X	36
FIGURA 4 CÉLULAS DE PTERIGIÓN PRIMARIO 10X.....	37
FIGURA 5 CÉLULAS DE PTERIGIÓN RECIDIVANTE 10X.....	37
FIGURA 6 CÉLULAS DE PTERIGIÓN PRIMARIO 20X	38
FIGURA 7 CÉLULAS DE PTERIGIÓN RECIDIVANTE 20X	38
FIGURA 8 FENOTIPIFICACIÓN DE CÉLULAS DE PTERIGIÓN	39
FIGURA 9. GEL DE POLIACRILAMIDA DE PTERIGIÓN PRIMARIO	40
FIGURA 10 GEL DE POLIACRILAMIDA DE PTERIGIÓN RECIDIVANTE ...	40
FIGURA 11 GEL DE POLIACRILAMIDA RECIDIVANTE Y PRIMARIO.....	41

ABREVIATURAS

AND	Ácido desoxirribonucleico
bFGF	Factor de crecimiento básico de fibroblasto
CD117	Anticuerpo
c JUN	Uniones c de la terminal quinasa
CK	Siglas en inglés: <i>Cytokeratin</i>
DMEM	Siglas en inglés: Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTT	Dithiothreitol
EGFR	Siglas en inglés: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERK	Siglas en inglés: <i>extracellular regulated kinases</i>
FGFβ	Factor de crecimiento de fibroblastos β
HB-EGF	Factor de crecimiento epidérmico de unión a la heparina
IEE	Isoelectroenfoque
IFN-γ	Interferón gamma
IgE	Inmunoglobulina E
IGFBP	Insulin-like growth factor binding protein
IGF-I	Factor de crecimiento parecido a la insulina
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
KDa	Kilodaltones
KSFM	Siglas en inglés: <i>Keratinocytum Serum Free Medium</i>
LIF	Siglas en inglés: Factor de inhibición de la migración de linfocitos
MARPK	Señal extracelular reguladora de cinasa
MMP	Metaloproteinasas de la matriz
MMP-1	Colagenasa 1
MC_t	Célula mastocito que contiene triptasa

MCt_c	Célula mastocito que contiene triptasa y cinasa
Nm	Nanómetros
NF-κB	Siglas en inglés: <i>nuclear factor kappa b</i>
p53	Siglas en inglés: <i>Protein 53KDa</i>
PBM	Proteína básica mayor
PBS	Por sus siglas en inglés: <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCE	Proteína catiónica eosinofílica
PDGF	Siglas en inglés: <i>platelet-derived growth factor</i>
SDS	Sodium dodecyl sulfato
SFB	Suero fetal bovino
SMA	Siglas en inglés: Smooth muscle actin
TGF-β	Siglas en inglés: <i>Tumor Growth Factor beta</i>
Th 2	Siglas en inglés: <i>T helper cells type 2</i>
TIMP_s	Inhibidor tisular de metaloproteinasas
TNF-α	Siglas en inglés: <i>Tumoral necrosis factor alfa</i>
TNFR	Receptor del factor de necrosis tumoral
UV	Ultravioleta
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

I. RESUMEN

El Pterigión es considerado una enfermedad crónica degenerativa con degeneración elastótica causada por irradiación ultravioleta, actualmente se ha considerado una enfermedad proliferativa. Histopatológicamente se encuentra hiperplasia epitelial y abundante tejido fibrovascular en el estroma del Pterigión que invade la córnea ⁽¹⁾. Puesto que las recidivas ocurren a los pocos meses de la operación, lo cual no se puede explicar con la simple exposición a los rayos ultravioleta, se han propuesto otras teorías. Aunque el mecanismo subyacente no se entienda del todo, las teorías recogen mecanismos inmunológicos, neoplásicos y reparadores. Apoyando las mencionadas modalidades en el tratamiento quirúrgico del Pterigión, sea mediante reconstrucción anatómica o sea utilizando tratamiento complementario químico y de radiación, tratamos de prevenir la recidiva y también las complicaciones asociadas a dichas modalidades. En el caso del Pterigión recidivante, existe la hipótesis de una aceleración de la proliferación fibroblástica producida por el trauma quirúrgico como causa del mismo, independientemente de la exposición o no a la luz ultravioleta. En los casos de recidiva, el Pterigión se comporta de forma más agresiva, siendo su tratamiento más difícil.

Objetivo. Identificar los receptores de membrana del Pterigión primario y recidivante, en cultivos realizados de tejido obtenido de pacientes intervenidos quirúrgicamente.

Material y Métodos. Se realizaron cultivos de tejido de Pterigión primario, recidivante y conjuntiva sana, obtenidos en cirugía de pacientes del Hospital Oftalmológico de Nuestra Señora de la Luz del periodo junio 2008 – octubre 2009, los cuales fueron transportados al laboratorio del Hospital Conde de Valenciana, utilizando dispasa e incubación a 37° posterior lavado del tejido y cultivo en pozos. Segunda dimensión: Esta se realizó con extracción de proteínas de las células cultivadas, la cuales fueron purificadas y posteriormente separadas por su punto isoeléctrico en cámara de Isoelectroenfoque. Se realizo posteriormente separación de proteínas por peso molecular y electroforesis en gel de bisacrilamida.

Resultados.

Se obtuvieron fibroblastos de los tejidos de pterigión primario y recidivante. Estos fueron caracterizados fenotípicamente por citometría de flujo, en donde se analizó la expresión de los marcadores vimentina, citoqueratina 19 (CK-19) y Ki-67.

Morfológicamente se observaron diferencia entre las células del pterigión recidivante comparando con el pterigión primario, las primeras eran más grandes y en forma de huso alargado; se agruparon formando multicapas. Por otro lado, se observó una tasa de crecimiento mucho mayor en las células proveniente de pterigión recidivante, respecto a las de pterigión primario. Al realizar el análisis del perfil proteómicos del extracto total de las células cultivadas de ambos tipos de pterigión, se observaron diferencias importantes en la expresión de varias proteínas, tales como expresión diferencial, aumento de la expresión, así como también disminución de algunos de los grupos, sobre

todo de aquellos con alto peso molecular y en un rango de pH de 8-10. Estos resultados sugieren una diferencia en el proteoma de las células obtenidas de pterigión primario y recidivante, lo que ayudaría a entender las diferencias entre ambas entidades patológicas.

Conclusiones. Existen proteínas que se están expresando de manera diferencial entre el Pterigión primario y recidivante, sin embargo, es necesario continuar la segunda fase de este estudio para poder identificarlas mediante espectrometría de masas.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 Historia

El pterigión es una de las más antiguas afecciones oculares descritas. Desde tiempos remotos los más famosos médicos ya lo conocían y hacían descripciones precisas de sus diversas formas. Los estudios iniciales realizados por el médico hindú Susruta, considerado como el primer cirujano oftalmólogo, datan de mil años a.C. Susruta describió con precisión el pterigión, su tratamiento, así como su fácil recidiva. Hipócrates (469 a.C.) sugirió el tratamiento con zinc, cobre, hierro, bilis, orina y leche materna. Celso (50 d.C.) y Galeno (131 d.C.) trataron el pterigión con soluciones de vino blanco, vinagre, azúcar, así como su pinzamiento y exéresis ⁽¹⁾.

2.2 Epidemiología

En cuanto a su distribución mundial, se sabe que es más común en climas cálidos y secos, tiene una prevalencia de 22% en las zonas ecuatoriales y menos de 2% en las latitudes cercanas a los 40°. El riesgo relativo para desarrollar pterigión en una persona que vive en los trópicos (menos de 30° de latitud), es 44 veces mayor; 11 veces mayor para quienes trabajan en un lugar arenoso, al exterior; 9 veces mayor para una persona que no usa lentes con filtro ultravioleta (UV) y 2 veces mayor para quien nunca ha usado sombrero ⁽²⁾.

Existen factores externos entre los que se mencionan exposición al polvo, la sequedad ambiental, la radiación ultravioleta y factores endógenos como la edad, una mayor proximidad de la inserción tendinosa al limbo esclerocorneal y una susceptibilidad genética. ⁽²⁾

2.3 Definiciones

Receptor puede ser definido como una proteína que permite la interacción de sustancias en el metabolismo celular, estas proteínas se encuentran en la membrana plasmática, así como organelos y citosol. Las moléculas señalizadoras como hormonas y neurotransmisores se unen a estos receptores, lo cual permite una transducción de señal que es influenciado por varios factores celulares y extracelulares ⁽³⁾.

Pterigión

Es un crecimiento fibrovascular excesivo de la conjuntiva bulbar sobre la córnea, son triangulares y orientados horizontalmente, con base periférica y vértice sobre la córnea. Se encuentran situados en la hendidura palpebral, por lo general del lado nasal, pero pueden ser temporales. El vértice presenta una zona avascular grisácea y plana, puede asociarse a una línea de Stocker (de hierro) por delante de la cabeza del pterigión. Por fuera de la zona avascular presenta unos vasos finos anastomóticos y con yemas, los cuales son observados fundamentalmente en el pterigión activo ⁽⁴⁾.

2.4 Clasificación

Tan y cols. en 1996 lo clasificaron morfológicamente en tres categorías: atrófico, carnoso e intermedio. En el atrófico los vasos episclerales por debajo del cuerpo del Pterigión se distinguen claramente. El carnoso, es grueso y los vasos episclerales debajo del cuerpo quedan totalmente escondidos. Los vasos del Pterigión están orientados radialmente mientras que los vasos episclerales no lo están. Si los vasos episclerales no se observan claramente o quedan parcialmente escondidos, se considera intermedio ⁽⁵⁾. El Pterigión puede ser unipolar (sólo afecta una parte) o bipolar, cuando afecta tanto la parte temporal como la nasal. Pueden ser unilaterales o bilaterales ⁽⁶⁾ y también clasifica bajo la categoría de las degeneraciones corneales no involutivas. ⁽⁶⁾

2.5 Fisiopatología

En cuanto a la patogénesis del Pterigión, de acuerdo con investigaciones recientes, diversos autores han descubierto que hay una sobreproducción de ciertas metaloproteinasas de la matriz (MMP) causada por un estímulo inflamatorio de diversas interleucinas y otras citocinas como el factor de necrosis tumoral, lo cual lleva a una alteración de las células epiteliales basales limbales. La alteración focal limbal, produce la conjuntivalización de la córnea con inflamación crónica extensa, proliferación celular, remodelación del tejido conjuntival y angiogénesis ⁽⁷⁾.

En los estudios sobre alteraciones ultraestructurales, se considera una alteración inflamatoria y proliferativa de la superficie ocular. Coroneo y colaboradores¹ plantearon que las células madre limbares se modifican con exposición crónica a la luz ultravioleta, por lo que hay una rotura de la barrera limbal que causa la invasión conjuntival del epitelio corneal. Otro mecanismo mencionado es una reacción de hipersensibilidad tipo I a elementos irritantes exógenos asociada a inflamación local que causa incremento en la producción de IgE. Un estudio reciente muestra una asociación entre una película lagrimal inestable y el inicio de un Pterigión. En otras investigaciones, se ha descubierto que hay sobreproducción de ciertas metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMP) debido a una estimulación inflamatoria de interleucinas y de factores de necrosis tumoral⁽⁷⁾.

La exposición a luz ultravioleta (240 a 400 nm) es un factor importante en el desarrollo del Pterigión; sin embargo, existen otros, como productos químicos, viento, polvo y polen, que también contribuyen a su desarrollo. Estudios han demostrado que la expresión anormal del gen p53 en el epitelio del Pterigión condiciona un crecimiento desordenado más que una degeneración⁽⁷⁾.

Mediante inmunohistoquímica con anticuerpos contra triptasa para mastocito, se ha observado incremento de éstos en el Pterigión en comparación con tejido normal de la conjuntiva. El mastocito puede ser un factor en su patogénesis y tener un papel importante en la hipersensibilidad tipo I. Las propiedades biológicas de los mastocitos incluyen la liberación de productos altamente tóxicos, como la proteína básica mayor (PBM), la proteína catiónica eosinofílica

(PCE) y radicales libres de oxígeno, eicosanoides, citocinas con patrón Th2 y factores de crecimiento que inducen el desprendimiento de las células epiteliales y aumento de la permeabilidad vascular. En el ojo humano hay cinco millones de mastocitos; de los cuales existen dos tipos de acuerdo con la composición de proteasa neutral. Los MCt que contienen triptasa y que se encuentran en conjuntivitis estacional alérgica y los MCtc que contienen triptasa cinasa y se hallan en queratoconjuntivitis alérgica; en los ojos sanos se encuentran en sustancia propia y en estado alérgico en capas más superficiales.⁽⁷⁾

Austin, Jakobiec e Iwamoto plantean que el principal mecanismo para la formación del Pterigi6n es una degeneraci6n elast6tica del col6geno. Otros investigadores proponen que un proceso inflamatorio con un componente de hipersensibilidad tipo I estaría involucrado y que sería estimulado por alergenos como pólenes y otras partículas ambientales. Trantas y Barraquer plantean que los cambios degenerativos conjuntivales causan una superficie corneal irregular que no es cubierta por la película lagrimal, formándose un dellen corneal que es secundariamente cubierto por tejido conjuntival. Por otro lado, la teoría de Fuchs plantea que los agentes externos, como la exposici6n a la luz ultravioleta, el polvo, el viento y el calor, son los responsables de la formaci6n del Pterigi6n. Esto se apoya en el hecho que el Pterigi6n es más frecuente en personas que trabajan al aire libre y tiene una mayor prevalencia en las poblaciones de latitudes tropicales y subtropicales donde la exposici6n a los rayos solares es mucho mayor ⁽⁵⁾.

Los rayos ultravioleta pueden mutar el gen p53 (gen supresor de tumores) en las células limbales. Esto produce una disminución en la regulación de la apoptosis, mayor producción de factor de crecimiento transformante beta, originando aumento en las colagenasas, migración celular y angiogénesis. Esto promueve la proliferación del tejido conectivo subconjuntival (elastosis) y un crecimiento de conjuntiva anormal sobre la córnea, destruyendo la capa de Bowman. ⁽⁶⁾

2.6 Diagnóstico

El examen con lámpara de hendidura revela tres distintas áreas en el Pterigión: la cabeza, el cuello y el cuerpo. La cabeza es un área grisácea, plana y avascular situada en el ápex. En el borde anterior de la cabeza del Pterigión, se aprecia una línea de hierro pigmentada epitelial, llamada línea de Stocker. El cuello conecta la cabeza y el cuerpo del Pterigión, donde se hallan finos neovasos incipientes y anastomóticos. El cuerpo del Pterigión se localiza en la conjuntiva bulbar con vasos que son rectos y radiales respecto al ápex del Pterigión. Aunque la cabeza del Pterigión se adhiere firmemente en la córnea, el cuerpo se puede separar de las capas superficiales del globo ocular. ⁽⁸⁾

Es importante observar la actividad del Pterigión puesto que afecta al tratamiento que se decide emplear. Entre los signos de actividad destaca la presencia de pequeñas opacidades grisáceas en la membrana de Bowman que se anteponen a la cabeza del Pterigión, las llamadas islas de Fuchs que, con el

tiempo, se multiplican y la protuberancia progresa hacia el centro de la córnea. También son signos de actividad la mayor vascularización, congestión, falta de transparencia y las manchas en el epitelio corneal. Además, Tan plantea que la morfología del Pterigión y su grosor son factores de riesgo para su recidiva tras la cirugía. ⁽⁷⁾

En los casos leves y no inflamados, el Pterigión es normalmente asintomático. Sin embargo, en los casos avanzados o de recidiva, la zona elevada puede causar queratopatía epitelial sintomática y producir lagrimeo reflejo, fotofobia y sensación de cuerpo extraño. Los Pterigiones más grandes también pueden reducir la visión provocando astigmatismo irregular o según la regla. Los estudios han corroborado que una longitud o amplitud de 3 mm desde el limbo era lo suficientemente importante como para provocar astigmatismo. También es posible que el Pterigión invada el eje visual y cause una pérdida visual grave. ⁽⁸⁾

2.6.1 Histopatología

Desde el punto de vista histológico, la lesión consiste en una masa de tejido subepitelial que ha sufrido degeneración elastótica (elastosis), llamada así porque las fibras colágenas degeneradas, se tiñen basofílicamente y también positivamente con las tinciones para tejido elástico, pero no son sensibles a la digestión por elastasa, estos haces fibrosos se disponen sobre un fondo de degeneración hialina^(5, 6,8). El epitelio superficial puede ser normal o ligeramente displásico. En la cabeza del Pterigión se encuentran fibroblastos de la sustancia propia, que están dañados actínicamente y que producen fibras elásticas de neoformación. Junto con la producción de las fibras elásticas y de

colágeno anormales, también se invade el subepitelio corneal y la membrana de Bowman. Al estudiar la córnea invadida por el Pterigión, la capa de Bowman se muestra engrosada e incluso destruida. El epitelio que lo cubre puede mostrar acantosis, disqueratosis y cambios de naturaleza displásica, observándose también neoformación de vasos sanguíneos junto a cambios inflamatorios ⁽⁹⁾

Dushku y asociados, utilizando tinciones inmunohistoquímicas, demostraron que las células limbares alteradas del Pterigión producían ciertos tipos de metaloproteinasas de la matriz extracelular que son las encargadas de la disolución del colágeno fibrilar de la membrana de Bowman⁽⁹⁾.

Histológicamente, el Pterigión se ha dividido en tres tipos: 1) angiomaso, en el cual el estroma contiene un número significativo de canales vasculares con edema en el espacio intervascular; 2) fibroso, en el estroma presenta fibrosis de forma predominante con pocos elementos vasculares y 3) mixto, el cual contiene ambos elementos. En México el tipo angiomaso es el más común (40%). ⁽⁷⁾

IV.7 Tratamiento

En el año 1872 Arlt describe la autoplastia conjuntival, proceder que ha pasado por distintas etapas de uso y desuso. Es una técnica factible de realizar en nuestro medio.

Thoft introdujo la utilización de autoinjertos conjuntivales para la reconstrucción de la superficie ocular. La técnica se basa en el uso de membrana mucosa conjuntival normal con su red vascular superficial intacta y con las células de la superficie sanas de tal manera que se tiene una fuente normal de células caliciformes, de superficie columnar y de células madre para reponer la membrana lesionada. Con los nuevos caminos que año tras año fue tomando la cirugía de Pterigión, se fueron observando diversas variaciones en el uso de la superficie de autoinjerto conjuntival, entre ellas: transposición conjuntival ortotópica libre, autoinjerto rotatorio conjuntival, transposición del colgajo conjuntival inferior, técnica de colgajo conjuntival mínimo y pedículo conjuntival limbal.

Aunque la técnica de autoinjerto pueda ser difícil para un cirujano principiante, sus resultados funcionales y cosméticos la han hecho muy popular para tratar el Pterigión primario y secundario. Con esta técnica no se han encontrado otras complicaciones, su única limitación es que no haya disponibilidad de conjuntiva sana en el ojo afectado o en el contralateral, o cuando se prevea la realización de cirugía de glaucoma, en cuyo caso la técnica no es aplicable.

El año 1946 trae un nuevo paso en esta historia, Magitot describió por primera vez la queratoplastia lamelar como un tratamiento para el Pterigión recidivante. Al cubrir los defectos del tejido se suprime la cicatrización del Pterigión recurrente con tejido lamelar corneoescleral del ojo donante y se consigue un efecto barrera del crecimiento vascular y del desarrollo de una nueva fibrosis en la superficie corneal. Las complicaciones que se han observado son

hemorragia intralamelar, depósitos de hemosiderina e infección del injerto. La única desventaja que presenta esta técnica es la disponibilidad de tejido del donante y la utilización de esteroides e inmunosupresores durante un prolongado período de tiempo.

El uso de la mitomicina C en la cirugía de Pterigión comenzó en la década de 1990 pero sólo hasta finales de la misma se estableció su óptima concentración y modo de aplicación para disminuir los pocos efectos adversos deseados (glaucoma secundario, edema corneal, cataratas, perforación corneal o escleral). La mitomicina C es un agente antineoplásico derivado del *Streptomyces caespitosus* cuyo principal efecto en el tratamiento del Pterigión es inhibir la síntesis de ADN a nivel de fibroblastos y linfocitos. Sus efectos, los cuales son dosis-dependientes, continúan hasta 36 días después de aplicada y se ha demostrado que la dosis ideal en la cirugía de Pterigión es de 0,04% utilizada durante un minuto sobre la esclera desnuda en donde se ha resecaado el tejido anormal proliferante, antes de realizar la plastia conjuntival.

Los injertos de mucosa bucal se han utilizado en oftalmología para reconstruir el fórnix, los párpados y el agujero orbital. En el tratamiento del Pterigión, proporcionan una fuente alternativa de membrana mucosa cuando no hay suficiente conjuntiva en el ojo y dicha cobertura de membrana mucosa previene que vuelva a crecer el Pterigión. ⁽¹⁰⁾

En la cirugía de Pterigión, se ha señalado como un serio problema la alta incidencia de la recurrencia de Pterigión, aproximadamente 30-50%. Por lo tanto, dentro del campo de la medicación para Pterigión, se ha llevado a cabo un exhaustivo estudio activamente promovido con el fin de encontrar sustancias que inhiban la recurrencia de Pterigión. Hasta el momento, por ejemplo, se ha confirmado que agentes anti-tumorales, como la mitomicina, son eficaces. No obstante, estos fármacos han suscitado inquietud debido a sus serios efectos secundarios, como escleromalacia y no son suficientes para su uso clínico. Por otra parte, se ha descrito que la radiación de rayos beta empleando estroncio 90 es eficaz para inhibir la recurrencia post-operatoria de Pterigión. No obstante, se ha señalado la aparición de lesiones como cataratas. Por otra parte, está muy extendido el uso de tranilast como fármaco para el tratamiento de trastornos alérgicos como asma bronquial, rinitis alérgica, dermatitis atópica y conjuntivitis alérgica, así como trastornos cutáneos como cicatriz hipertrófica y queloides. Por ejemplo, se sabe que tranilast posee actividades de inhibición en la liberación de mediador químico provocada por una reacción alérgica, acumulación excesiva de colágeno a través de células de fibroblasto en tejidos cutáneos y proliferación excesiva de las células del músculo liso en los vasos arteriales coronarios. Se describe la inhibición de la proliferación inducida por PDGF- e IGF-1 de células del músculo liso vascular mediante tranilast. No obstante, no se ha descrito de ninguna forma que tranilast tenga una actividad inhibidora sobre el progreso de Pterigión y la recurrencia post- operatoria del mismo y no se conoce en absoluto que tranilast sea útil como agente para inhibir el progreso de Pterigión y la recurrencia post-operatoria del mismo ^(11, 12,13).

III. ANTECEDENTES

El Pterigión es considerado una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por una degeneración elastótica causada por irradiación ultravioleta, actualmente se ha considerado una enfermedad proliferativa. Histopatológicamente se encuentra hiperplasia epitelial y abundante tejido fibrovascular en el estroma del Pterigión que invade la cornea. ⁽¹⁴⁾

El tiempo óptimo de seguimiento es un año después de la resección del Pterigión primario, si se interrumpe dicho seguimiento prematuramente, se nos puede pasar por alto la posibilidad de que ocurra una recidiva. Puesto que las recidivas ocurren a los pocos meses de la operación, lo cual no se puede explicar con la simple exposición a los rayos ultravioletas, se han propuesto otras teorías. Aunque el mecanismo subyacente no se entienda del todo, las teorías recogen mecanismos inmunológicos, neoplásicos y reparadores. Apoyando las mencionadas modalidades en el tratamiento quirúrgico del Pterigión, sea mediante reconstrucción anatómica o sea utilizando tratamiento complementario químico y de radiación, tratamos de prevenir la recidiva y también las complicaciones asociadas a dichas modalidades. ⁽¹⁵⁾

Estudios *in vitro* sugieren que citocinas pro inflamatorias pueden modificar la expresión de la matriz extracelular, estas citocinas son expresadas en el Pterigión y cultivos de células derivadas del mismo e incluyen el factor de

necrosis tumoral alfa (TNF α), factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF), factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-B), el factor transformante de crecimiento beta 2 (TGF β 2), el factor de crecimiento fibroblástico beta (FGF β) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), este ultimo localizado en el endotelio vascular; los capilares intraepiteliales en Pterigión sugieren un rol angiogénico de las citocinas. La IL-8 es un producto de monocitos activados, fibroblastos y células epiteliales y endoteliales. Es una citocina proinflamatoria, multifuncional, con propiedades angiogénicas, quimiotáctica de neutrófilos, inductora de proliferación de queratocitos, siendo estimulada por citocinas, que también estimulan la producción de metaloproteinasas (MMPs). La IL-6 es una citocina pleiotrópica proinflamatoria sintetizada por fibroblastos, células endoteliales y queratinocitos en respuesta a varias citocinas como el TNF α e IL-1. La IL-6 también puede inducir la expresión de MMPs (19, 36). Consistente con su rol angiogénico, existen evidencias de la producción de estas citocinas inducida por radiación UV. Por otro lado, se ha encontrado que el óxido nítrico modula el tono y permeabilidad vascular así como el crecimiento capilar; existen evidencias que la exposición a radiación UV incrementa la acción de la óxido nítrico sintetiza ⁽¹⁴⁾.

Se han encontrado anticuerpos anti α - SMA (Smooth Muscle Actin), desmina, vimentina, para la caracterización de los fibroblastos mediante anticuerpos, estos fibroblastos han sido clasificados como miofibroblastos siendo positivos a α -SMA, pero negativos a desmina y caldesmina, que son marcadores de musculo liso, algunos fueron positivos a vimentina, las células del Pterigión muestran cambios ultraestructurales con microfilamentos con diferenciación a

miofibroblastos, esto podría ser activado por factor β transformador del crecimiento.

Esta patología inflamatoria, invasiva y proliferativa de la superficie ocular, presenta expresión colagenasa 1 (MMP-1), ésta presenta actividad contra el colágeno fibrilar intersticial, con un abundante componente de la matriz extracelular de la córnea, que es inducido por los rayos UVB, esta inducción es similar a la de el factor de crecimiento epidérmico, el inhibidor P15035 de este receptor bloquea parcialmente la inducción mediada por UVB hacia la MMP-1 y su producción después de la estimulación ya sea mediante el factor de crecimiento epidérmico unido a heparina o factor de crecimiento epidérmico

La activación puede dar cambios morfológicos, activar factores proinflamatorios, angiogénicos y de crecimiento, así como invasión mediada por metaloproteinasas sobre sus inhibidores tisulares (TIMPs), la MMPs desnaturalizan la cadena de triple hélice, por lo que se requiere que migre el queratinocito a la matriz de colágena tipo I, esto promueve, la migración de células endoteliales y su sobreexpresión determina la hiperplasia epitelial activando el factor de crecimiento similar al de la insulina, por lo que el determinar la regulación que tiene la MMP-1 en el Pterigión puede explicar el desarrollo en humanos. Existe un señal extracelular que regula la cinasa (MAPK) y es un activador mitogénico de la proteína cinasa (ERK) en la vía de activación de UVB que induce la MMP-1, este camino puede ser bloqueado por el inhibidor PD98059, que da una disminución de la MMP-1, la cual no fue

inhibida por c-JUN de la terminal N quinasa y p 58(proteína supresora de tumor) por lo que la activación de ERK produce proliferación y JNK y p58 da apoptosis, al bloquear el camino que activa la MMP-1 con el inhibidor PD98059, disminuye la producción de MMP-1, esto no es así con el inhibidor de c- Jun N-terminal cinasa (JNK) y el p38, la vía de ERK da sobrevida celular y proliferación.

Se ha encontrado que los receptores de superficie celular, por ejemplo de EGFR, son los implicados en la transmisión de la señales extracelulares de UV, lo que permite la expresión de MMP-1 lo que es bloqueado por el inhibidor PD 153035 del factor de crecimiento epidérmico, el HB-EGF estimula la expresión de TIMP-q y MMP-1, lo cual no es mediado por la presencia de radiación UV ⁽¹⁶⁾.

Varios estudios han demostrado que las señales extracelulares a la radiación UVB o estrés osmótico activa la cascada de MAPK, mediante la fosforilación de factor J de crecimiento y receptores de citocina como el EGFR, TNFR, IL-1R, esto se explica por la vía de un receptor, el EGFR, que es un ligando para HB-EGF, y EGF. El AG1295 es un inhibidor selectivo de PDGFR tirosina cinasa, que ha sido identificado en el Pterigión, el IGFBP3 se ha encontrado poco expresado en el tejido de Pterigión, p53, TNF α , receptor α x del retinoide, IL2 inducen la expresión de IGFBP3 pero estos no se han encontrado en cantidades diferentes comprando con la conjuntiva sana por lo que se desconoce el factor regulador, se ha encontrado que existen niveles bajos de

IGFBP3, comparado con la conjuntiva normal, este se encuentra poco expresado, y esto puede dar menor apoptosis y gran capacidad de proliferación, el IGFBP2 se encuentra sobre expresada en los fibroblastos del Pterigión, el estudio de la proteína IGFBP3 es importante ya que puede ser una medida terapéutica para inhibir el crecimiento del Pterigión.⁽¹⁷⁾

Nolan y cols. mencionan que la IL8, el factor transformador del crecimiento, y el factor de crecimiento epidérmico unido a heparina, HB-EGF, se encuentran sobre expresados, así como la IL1, IL6, y TNF α se encuentran aumentados en la córnea, las cuales alteran las células limbales, y encontraron 9 genes sobre-expresados y 36 infraexpresados, y estos eran tanto factores de crecimiento como receptores, el HB-EGF que es un potente mitógeno para fibroblastos, células de musculo liso y queratinocitos así como inductor de la migración celular, su proteína transmembrana pro HB-EGF que tiene un efecto inhibidor del crecimiento, la interacción de HB-EGF, MMP, TIMP (inhibidor de metaloproteinasas) libera la forma soluble de HB-EGF en el epitelio del Pterigión, que tiene un efecto mitogénico, y estimula la migración celular de factores de crecimiento, el HB-EGF se une al receptor EGFR, que tiene actividad mitótica, el HB-EGF usa como mitogénico endotelial al VGF.⁽¹⁸⁾

En un estudio realizado en el Hospital General de México, el análisis de inmunohistoquímica aportó datos, pues en la valoración estimativa 43% de los casos demostró mastocitos y, al utilizar el anticuerpo CD117, 68.57% fueron positivos, lo que indica una participación importante de los mastocitos en la

patología el Pterigión. Por lo anterior, el CD117 es ideal para valorar la presencia significativa de mastocitos en la conjuntiva. En este estudio, 62% de los casos no registró recidiva, aunque sólo se evaluaron tres meses y puede existir la posibilidad que con tiempo de seguimiento más largo (un año) esta complicación se presente en mayor proporción. De los ocho pacientes que registraron recidiva, 50% son tipo angiomatoso, 37.5% fibrosos y 12.5% mixtos; en la reacción inmunohistoquímica CD117, 62.5% fueron positivos y 37.5% negativos. Es probable que la presencia de mastocitos influya en los cambios estructurales de crecimiento y de recidiva del Pterigión, estimulando la liberación de factores de crecimiento y citocinas. ⁽¹⁹⁾

Solomon, en una revisión sobre las terapias potenciales de tipo médico y no quirúrgico del Pterigión, refiere que hay un gen involucrado en los cambios histológicos del Pterigión, responsable de la expresión de un factor de crecimiento relacionado con la insulina p3 (IGFBP3) y que la falta de regulación de este factor tiene una fuerte correlación con la presencia de metaplasia, displasia y finalmente cáncer; este factor regula la proliferación celular como ocurre en el Pterigión. ⁽⁷⁾

Otra probable etiología del Pterigión son las mutaciones en la expresión del gen p53 secundarias a la radiación ultravioleta B que tiene la función de la apoptosis en las células epiteliales limbales del Pterigión, tumores y pinguécula ⁽²⁰⁾. Aunque la patogenia del pterigium continúa en investigación, ya se mencionó que se han encontrado evidencias epidemiológicas que sugieren una influencia directa de la irradiación por los rayos ultravioletas, así como se han

demostrado niveles anormales de la proteína p53 en el epitelio. Asociado a lo anterior encontramos que el factor genético también determina, encontrándose descrito estudios que lo demuestran. Ejemplo son estudios a familias portadoras de esta patología en los cuales se sugieren un patrón autosómico dominante en su ocurrencia ⁽²¹⁾. Esto es controversial ya que Schneider et al. ⁽²²⁾ encontraron que el gen p53 no tuvo mutaciones en los 11 pacientes caucásicos estudiados. Reisman et al. ⁽²³⁾ encontró una delección monoalélica, con el otro alelo libre en 9 pacientes americanos y Shimmura et al. ⁽²⁴⁾ identificó mutaciones en los exones 5 a 8 en 6 Japoneses, en pacientes Taiwaneses presentaron 8 de 51 pacientes mutaciones en el gen p53 ⁽²⁵⁾.

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

4.1 Pregunta de investigación

Con base a la necesidad de determinar la fisiopatología del Pterigión y analizar los mecanismos celulares que se encuentran implicados, postulamos la siguiente pregunta de investigación

¿Existe una expresión diferencial de proteínas en células cultivadas in vitro de Pterigión primario y recidivante?

4.2 Ubicación espacio temporal

Los tejidos fueron obtenidos de pacientes que sean sometidos a cirugía en la Fundación Hospital de Nuestra Señora de la Luz, procesados y cultivados en el Área de Proteómica Ocular de la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” I.A.P. en el segundo de semestre del 2009.

V. JUSTIFICACION

El Pterigión constituye una de las principales causas de consulta oftalmológica, cuyo motivo es estético o clínico, en este último caso las principales molestias son ojo rojo, ardor, lagrimeo, entre otros, causando una gran morbilidad, entre las teorías de su fisiopatología incluyen diversos factores. Existen varias teorías sobre la patogénesis, una teoría soportada por un número de estudios alude que existe una anomalía lagrimal que causa resequedad córnea y conjuntival, también se apoya que la radiación ultravioleta es el mayor factor predisponente en el Pterigión primario, aunque su rol es menos clara y no tiene relación con el Pterigión recidivante, esta exposición crónica degenera la membrana de Bowman y la superficie estromal favoreciendo la aparición de neovascularización en la misma. Algunos Pterigiones son más agresivos y recurren más después de la estimulación quirúrgica, se presume que quizás puede existir una aceleración de la proliferación fibroblástica estimulada por el trauma quirúrgico, también puede ser importante una alteración corneal periférica, creando un defecto acuoso, una irritación crónica y quizás induce la recurrencia. Por lo anteriormente mencionado, es importante determinar las bases moleculares de la fisiopatología, para encontrar el estímulo inicial del crecimiento del Pterigión, y así en estudios subsecuentes analizar la manera de bloquear dicho estímulo, por lo que se pretende encontrar proteínas que sirvan como biomarcadores y comparar entre las células cultivadas in vitro obtenidas de Pterigiones primarios y recidivantes.

VI. HIPÓTESIS.

Si existen diferencias clínicas y morfológicas entre el pterigión primario y el recidivante, entonces el perfil proteómico de las células obtenidas de ambas patologías será distinto.

VII. OBJETIVOS

7.1 General.

Identificar las diferencias en el perfil proteómico de células cultivadas in vitro de tejido de pterigión primario y recidivante.

7.2 Específico.

- Establecer cultivos celulares primarios a partir de tejidos de pterigión primario y recidivante.
- Caracterizar fenotípicamente los cultivos celulares analizando los marcadores Ki67, vimentina y CK-19 por citometría de flujo.
- Analizar morfológicamente los cultivos celulares de pterigión primario y recidivante.
- Analizar por electroforesis en dos dimensiones, las diferencias de los perfiles proteómicos de los cultivos celulares de pterigión primario y recidivante.

VIII. MATERIAL Y METODOS

8.1 Reactivos

KSFM (keratinocyte serum free medium), campana de flujo laminar, micropipetas (100µl, 200 µl, 1000µl), pipeta automática de 10ml, Placas de cultivo celular (Costar, Corning, NY, USA); tubos cónicos de 1.5ml (Eppendorf, Hamburg, Germany); caja 24 pozos (Costar, Corning Incorporated, NY, USA); caja de cultivo T25 (Nalge Nuc International, USA); medio DMEM (Dulbecco modified Eagle medium), suero fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, USA); anfotericina B, dispasa, tripsina (Tryple Select, Gibco, Grand Island, NY, USA); kit Biorad Protein Assay, microscopia de contrastes de fases invertida (Axiovert; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany); kit Ready prep™ 2-D cleanup, centrifuga (Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, Germany), incubadora (Forma Scientific, Inc., OH, USA); citómetro de flujo (Becton Dickinson, USA), azul de bromofenol (Buffer de Rehidratación ReadyPrep®, BioRad), Penicilina /Estreptomicina 1 µg (Sigma St. Louis Missouri, USA), Dietil Pirocarbonato (Sigma, St Louis, USA) PBS (Phosphate Buffered Saline), citoqueratina 19 (A53-B/A2)IgG1, vimentina (S-20), buffer de equilibrio, urea, tiourea, Tris, 34.5% glicerol, 2% SDS, 0.005% azul de bromofenol, 2 % DTT, 2.5 % iodoacetamida.

8.2 Manejo celular

8.2.1 Obtención del tejido

Se tomo tejido de pacientes con Pterigión primario o recidivante obtenido en cirugía de pacientes del Hospital Oftalmológico de Nuestra Señora de la Luz. Dicho tejido fue obtenido con técnica estéril, y eliminando la mayor cantidad de contenido hemático, y colocado inmediatamente después de la resección en un tubo de Eppendorf de 1.5ml estéril con 500µl de DMEM suplementado con suero fetal, gentamicina y estreptomycin/penicilina y a temperatura ambiente fueron transportados a la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana”.

8.2.2 Cultivo celular

Se realizo cultivo de tejido de Pterigión primario y recidivante, en la campana de flujo con técnica estéril se obtuvo un tejido de 1x1mm el cual fue colocado en 100µl de Dispasa e incubados a 37° por 2 minutos, posteriormente se realizo lavado del tejido con PBS estéril y se colocó el tejido en cajas de cultivo Corning de 24 pozos, se dejo secar por 30 segundos y se colocaron 100µl de SFB, incubándolo a 37°C con 5% de CO₂, a las 24 horas se añadió medio de cultivo DMEM suplementado 500µl (DMEM cada 100ml suplementado con gentamicina (500µl), PBS (Phosphate Buffered Saline), Penicilina 1U/estreptomycin 1µg (500µl), Suero Fetal Bovino 10% (10ml)) y se realizo recambio continuo del mismo cada 24 horas manteniendo en incubación a 37°C con 5% CO₂, el mismo procedimiento se realizo con los dos tipos de

tejido, después de 5 meses de cultivo, al llega a una confluencia de la población celular al 80% del pozo (Figura 1) se trabajó con el cultivo.

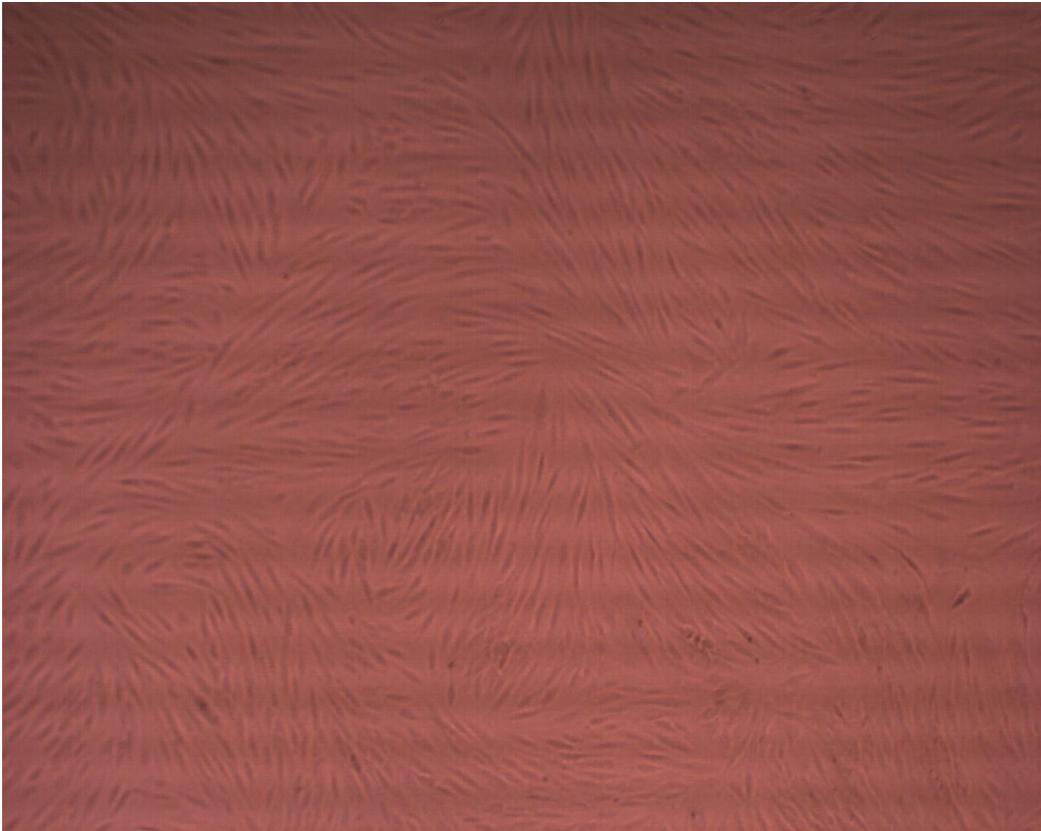


Figura 1. Confluencia celular de pozos del 80%

8.2.3 Tripsinización

Se procedió a realizar la aplicación de tripsina 200 μ l en dilución 1/1 con PBS estéril a cada pozo con 80% de confluencia celular, e incubación a 37°C por 3 minutos en cada uno de los pozos, para lograr la separación de las células, y posterior aplicación de 250 μ l SFB en cada pozo, resuspendiendo y centrifugando por 5 minutos a 1600 rpm a 4°C, tomando el botón celular y colocándolo en cajas de T25 colocando en las mismas 5ml de DMEM

suplementado e incubando a 37°C. Se trabajó con las células al llegar a una confluencia del 80%.

8.2.4 Fenotipificación y tinción de células

Posterior a la tripsinización, se colocaron las células en incubación a 9°C por 10 minutos agregando 200µl de saponina. Se manteniendo a 9°C durante 20 minutos y realizando lavado posterior con 1ml de PBS no estéril y se centrifugo a 1200 rpm a 37°C durante 6 minutos a 4°C, decantando y posteriormente se resuspendió el botón, los tubos fueron clasificados y marcados como: A tubo control; B tubo con 8µl de Ki67; C Tubo con 8 µl de vimentina, D Tubo con 8 µl de citoqueratina. Después de colocar lo correspondiente a cada tubo se mezcló con vortex hasta incorporar y se colocaron a 9°C durante 30 minutos y después se agregó 1ml de PBS no estéril a cada tubo, centrifugando a 1200 rpm durante 5 min a 4° C decantando el sobrenadante y resuspendiendo el botón celular. Para poder realizar el análisis se añadieron 400µl de FACS FLOW a cada tubo y así las 4 muestras fueron analizadas en el citómetro de flujo.

8.2.5 Obtención y cuantificación de proteínas totales de células de Pterigión

Las células cultivadas de pterigión primario y recidivante, fueron tripsinizadas y lisadas con Tritón X-100. Posteriormente el lisado celular se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos y se colectó el sobrenadante. Para realizar la cuantificación de proteínas en células de Pterigión primario y recidivante, se

utilizó el kit Biorad Protein Assay de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las muestras 1 Pterigi3n primario, 2 Pterigi3n recidivante. Se realiz3 curva patr3n utilizando alb3mina 1µg/ml. Se utiliz3 el lector de ELISA Thermo Labsystems.

8.2.6 Purificaci3n de prote3nas

Para la purificaci3n de prote3nas de c3lulas de Pterigi3n primario y recidivante se utiliz3 el kit Ready prep™ 2-D cleanup como lo indica el fabricante, se calcul3 el volumen del lisado celular para obtener 40 µg de prote3nas para cada muestra.

8.2.7 Isoelectroenfoque (IEE)

Se utilizaron tiras IPG de 7 cm con escala de pH de 3 a 10, para la rehidrataci3n, las prote3nas se diluyeron en un Buffer que contiene 7 M urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 0.5% ANFOLITOS, 50 mM DTT y 0.004% de azul de bromofenol (Buffer de Rehidrataci3n ReadyPrep®, BioRad). Se cargaron las prote3nas sobre la charola de corrimiento, se retir3 la protecci3n de las tiras IPG y se colocaron sobre en cada carril, se utiliz3 el m3todo de hidrataci3n pasiva por al menos 10 horas. Las tiras rehidratadas fueron enfocadas a 20°C utilizando el equipo IEF de Biorad, utilizando el siguiente protocolo: 500 V durante 1 hora (lineal). Las tiras ya enfocadas se almacenaron a -70°C hasta que se analizaron en la segunda dimensi3n.

8.2.8 Electroforesis bidimensional.

Las tiras se colocaron a temperatura ambiente y se equilibraron durante 15 minutos, enseguida se redujeron y alquilaron las proteínas. El buffer de equilibrio contiene 6 M urea, 2 M tiourea, 50 mM Tris, 34.5% glicerol, 2% SDS y 0.005% azul de bromofenol con 2 % DTT, para el paso de reducción de las proteínas; y 2.5 % iodoacetamida reemplazando al DTT, esto para el segundo paso de alquilación de las proteínas. Las tiras se colocaron en la parte superior de un gel de poliacrilamida al 12 % y se sellaron con agarosa al 5 %. Se corrió la electroforesis a 120 Volts durante 2 horas. Las muestras se corrieron en paralelo para minimizar variaciones.

8.2.9 Tinción con Azul de Coomassie

La tinción de los geles de poliacrilamida (2D SDS-PAGE) se realizó en una solución de Azul de Coomassie/metanol/ácido acético manteniendo en movimiento hasta que los geles se tiñeron en su totalidad (Azañero) esta técnica permite observar hasta 0.1µg de proteína como bandas diferenciadas (Berg, 2008). Lo geles se destiñeron con una solución de Acido acético 7%/metanol 15%. Las proteínas de Pterigión primario y recidivante fueron comparadas.

8.3 Diseño del estudio

Es un estudio longitudinal, prospectivo, intervencional, experimental, analítico, descriptivo.

8.4 Universo del Estudio

Se realizó cultivo celular de tejido de Pterigión obtenidos de pacientes operados en el Hospital Oftalmológico de Nuestra Señora de la Luz en el periodo de Julio de 2008 a Octubre de 2009.

8.4.1

Criterios de inclusión:

- Pacientes con diagnóstico de Pterigión Primario o Recidivante
- Sin importar edad ni sexo
- Sin tratamiento tópico actual
- Con criterios para cirugía de Pterigión
- Pacientes que firmaran consentimiento informado

8.4.2

Criterios de exclusión

- Pacientes operados de cirugía de catarata con datos de inflamación o alteración de la superficie ocular
- Pacientes con antecedente de enfermedad sistémica
- Aplicación de fármacos tópicos oculares o inyecciones subconjuntivales no anestésicas.
- Contraindicación de cirugía Pterigión

8.4.3 Criterios de eliminación:

- Pacientes que no aceptaron firmar el consentimiento informado
- Pacientes que no acudieron al tratamiento quirúrgico
- Pacientes que desearon dejar de formar parte del estudio
- Tejido obtenido en la cirugía no viable para cultivo
- Contaminación de la muestra
- Tejido sin crecimiento celular en pozo de cultivo

IX. RESULTADOS.

El seguimiento cronológico fotográfico demuestra que el crecimiento celular tiene características diferentes en las células de pterigión primario y recidivante.

A al primer día de cultivo celular se encuentra un crecimiento similar en los dos cultivos, con escasas células en el borde del tejido, al sexto día las células de Pterigión primario son fusiformes, aisladas, con núcleos ovals con moderado citoplasma, y se encuentran con una disposición uniforme con espacios intercelulares homogéneos (Figura 2), las células de tejido recidivante presentan una mayor cercanía celular, pero continúan aisladas, e inician formación de grupos (Figura 3).

A los 20 días las células del cultivo de pterigión primario presentaban una disposición regular, aisladas con prolongaciones citoplasmáticas, las cuales forman uniones entre sí, tienen núcleos redondos con nucléolo aparente, con clara identificación de cada célula (Figura 4) a diferencia de recidivante que presenta una disposición en multicapas con difícil identificación de cada célula y su borde, con células fusiformes y núcleos poco aparentes (Figura 5).

Al día 30 de cultivo de células de pterigión primario conservan la distribución regular, y específico con espacios delimitados entre las fusiformes (Figura 6) y las células de tejido recidivante tienen contacto intercelular con disposición en grupos y multicapas, con crecimiento estoriforme y son células más fusiformes y delgadas (Figura 7).

Morfológicamente encontramos células de mayor tamaño en aquellos cultivos proveniente de pterigión recidivante comparado con el pterigión primario, la confluencia de los pozos fue mayor en los primeros. Morfológicamente encontramos que son más alargadas, y se agrupan formando multicapas, al ser tripsinizadas presentan una adherencia mayor así como estímulo para su crecimiento, este tejido recidivante presenta mayor resistencia a la aplicación de tripsina.

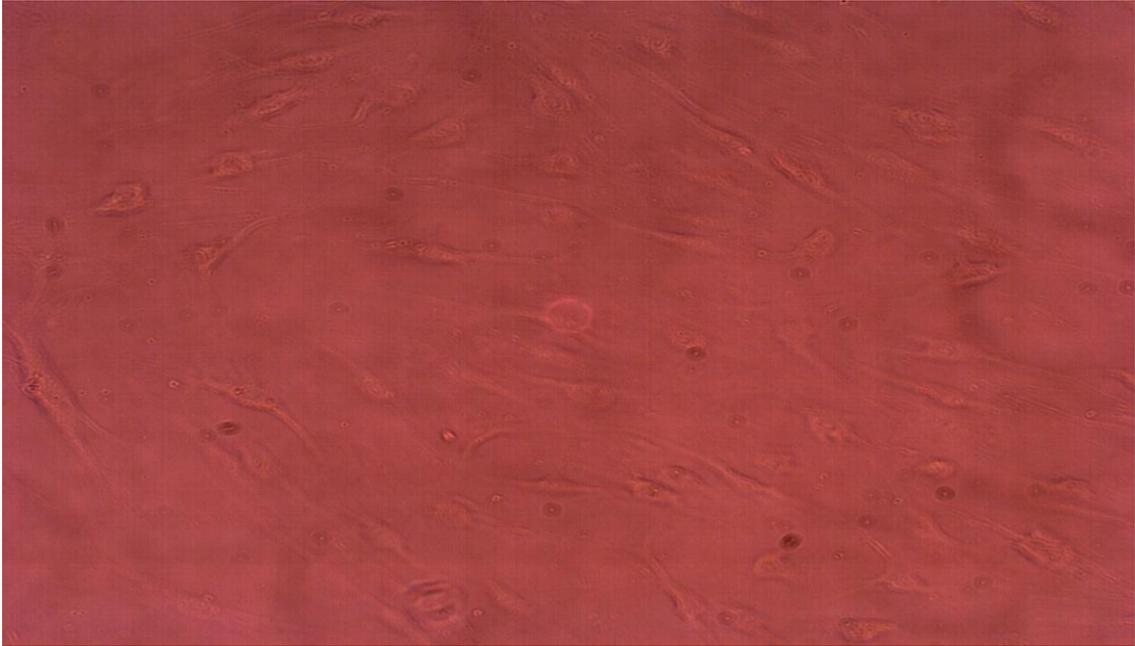


Figura 2. Células cultivadas in vitro y obtenidas de pterigión primario al sexto día de cultivo con forma alargada y dispersas Objetivo 10x.

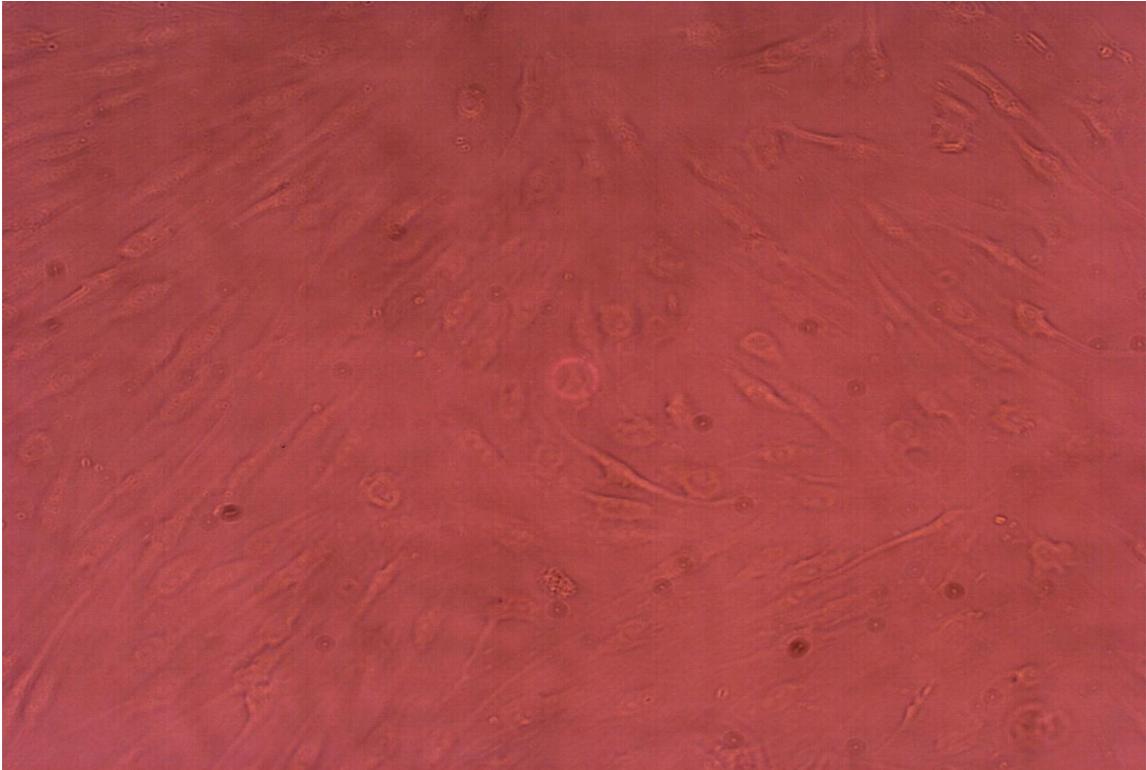


Figura 3. Células de cultivo primario in vitro obtenidas de tejido de Pterigión recidivante al sexto día de cultivo con tendencia a disponerse en cúmulos celulares. Objetivo 10x.

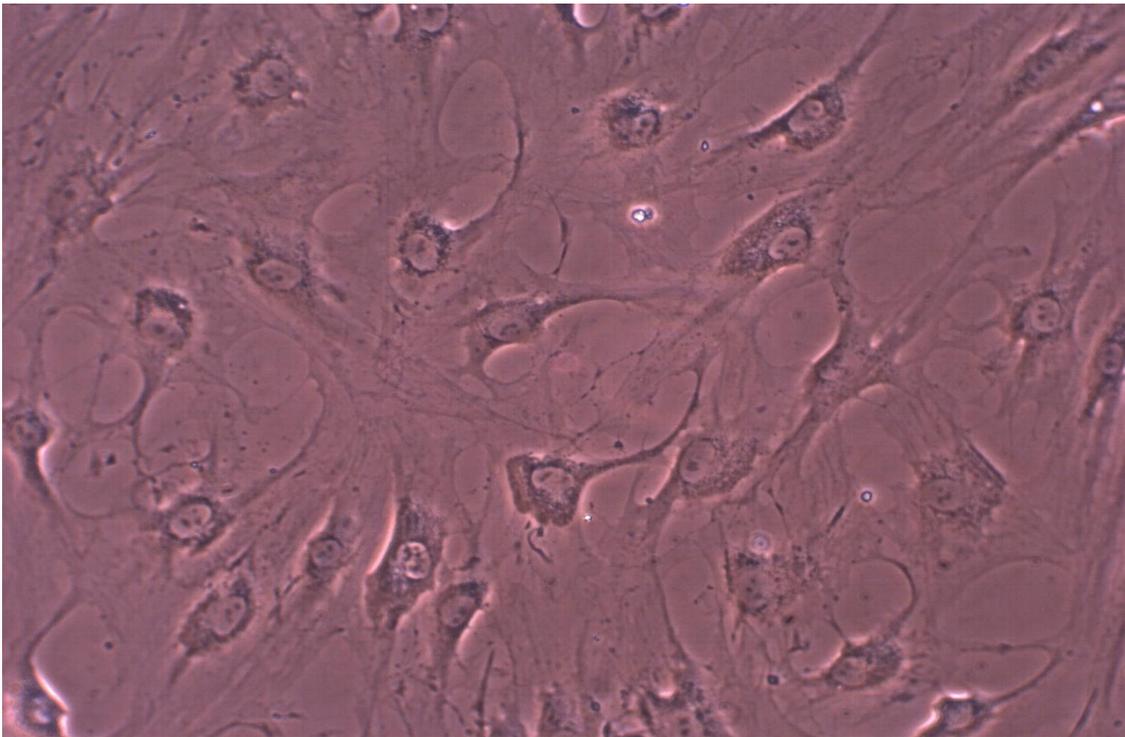


Figura 4. Células cultivadas in vitro obtenidas de Pterigión primario al día 20 del cultivo con una disposición en unicapa con distribución uniforme y con clara identificación de bordes celulares. Objetivo 20x.

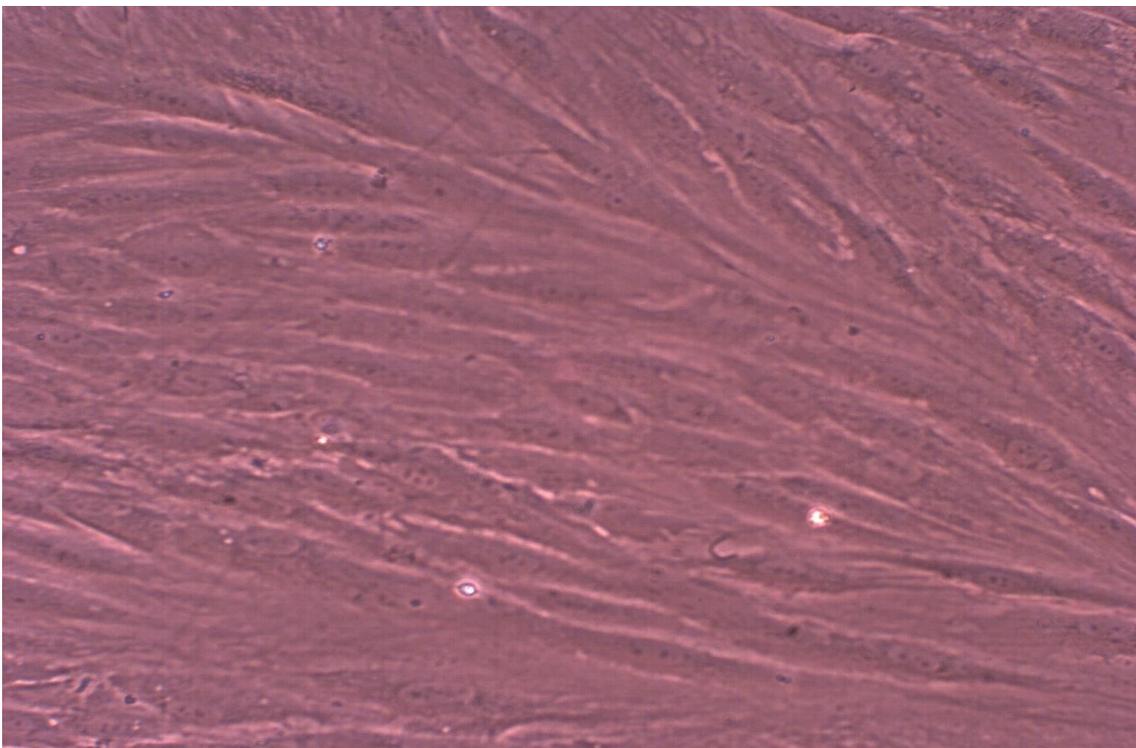


Figura 5. Células cultivadas in vitro obtenidas de Pterigión recidivante al día 20 con morfología fusiforme dispuestos en con difícil identificación de margen celular por superposición. Objetivo 20x

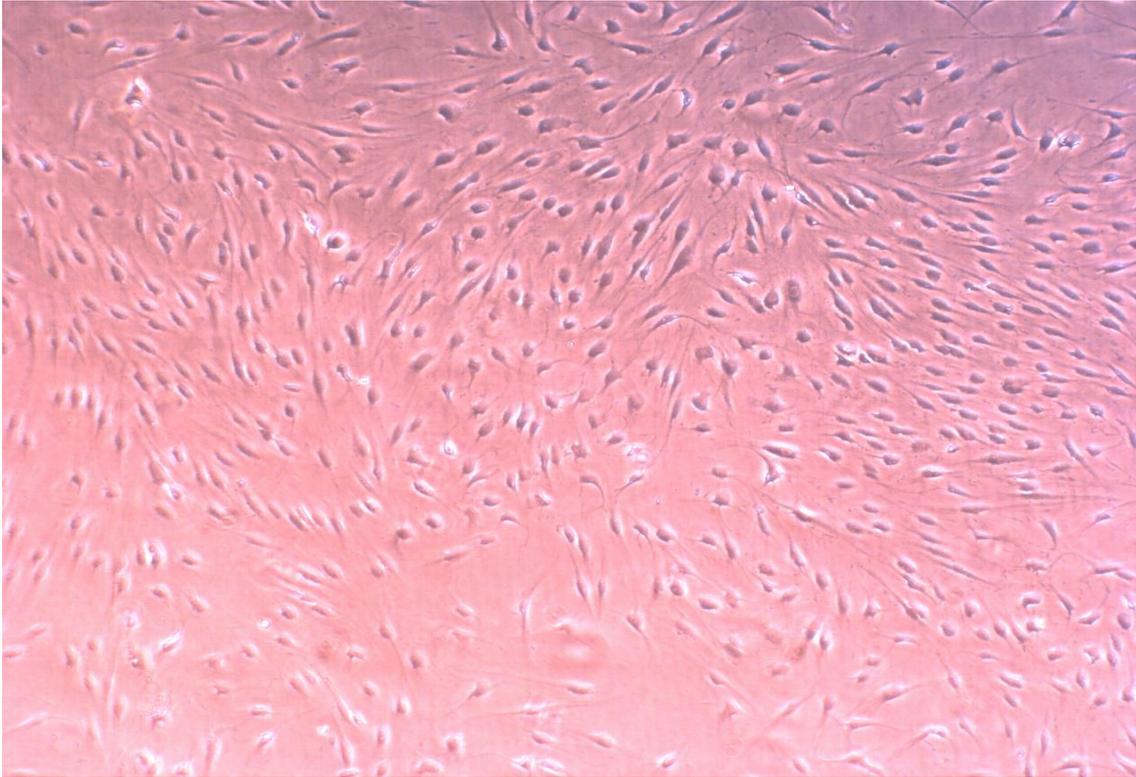


Figura 6. Células cultivadas in vitro y obtenidas de pterigión primario al mes de cultivo, confluencia de 80% del pozo, conservando espacio intercelular y morfología uniforme. Objetivo 4X.

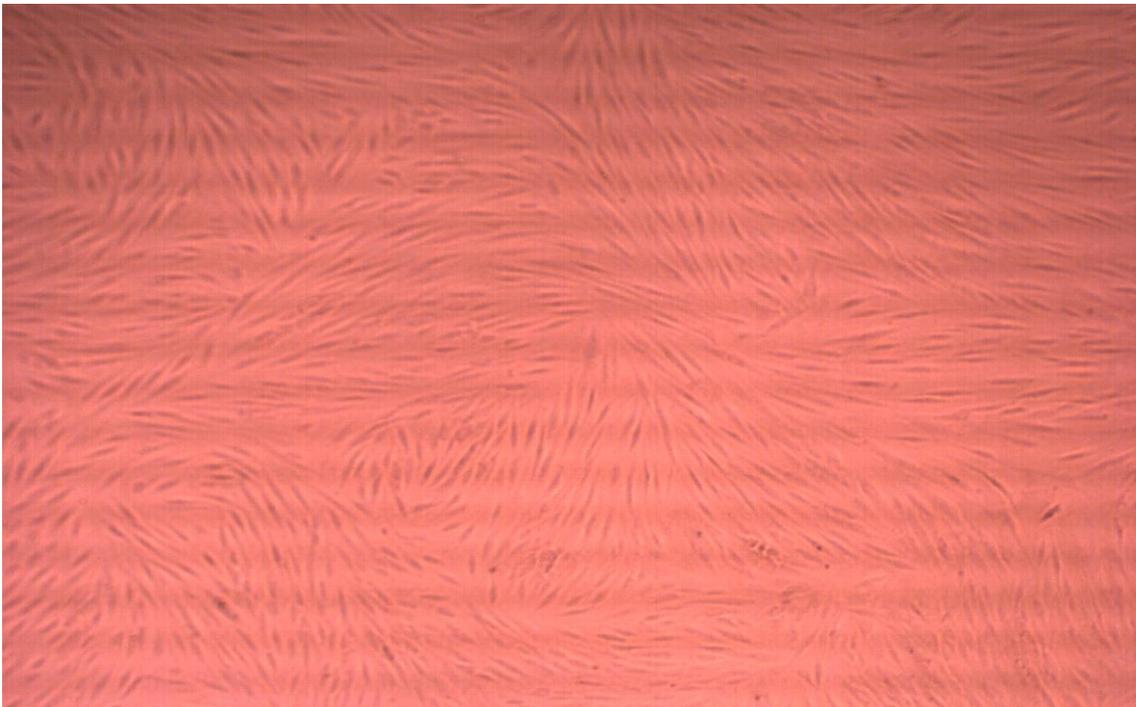


Figura 7. Células cultivadas in vitro y obtenidas de pterigión recidivante al mes de cultivo, confluencia de 80% del pozo, con crecimiento estoriforme. 4X.

GRUPO CONTROL

CITOQUERATINA 19

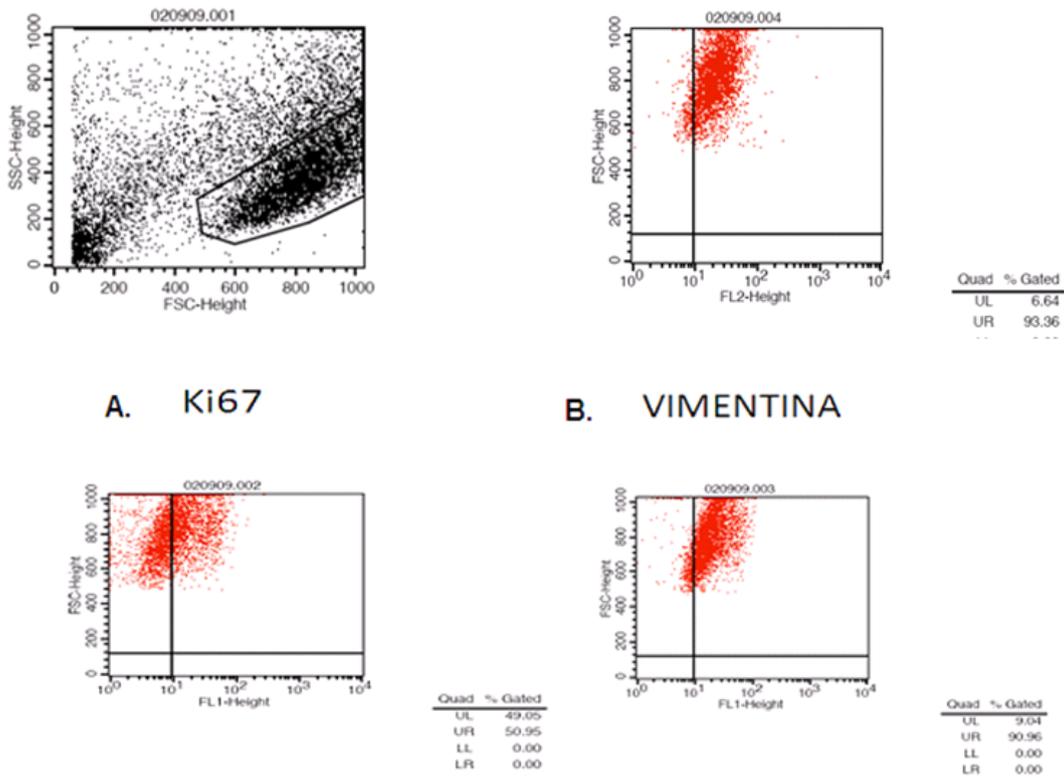


Figura 8. Caracterización fenotípica por citometría de flujo de las células cultivadas in vitro obtenidas de pterigión primario y recidivante.

Al realizar la caracterización fenotípica de las células cultivadas tanto de pterigión primario y recidivante, se analizó la presencia de tres marcadores específicos de fibroblastos de pterigión: citoqueratina (CK-19), Ki-67 y vimentina. Siendo positivas el 96.7% de las células de pterigión primario y recidivante para CK-19; el 50 % de las células expresó Ki-67, un marcador de proliferación celular; y para la vimentina, el 83% de la población fue positiva para este marcador (Imagen 8). Estos resultados nos indican que las células cultivadas son específicas de pterigión.

PTERIGION PRIMARIO

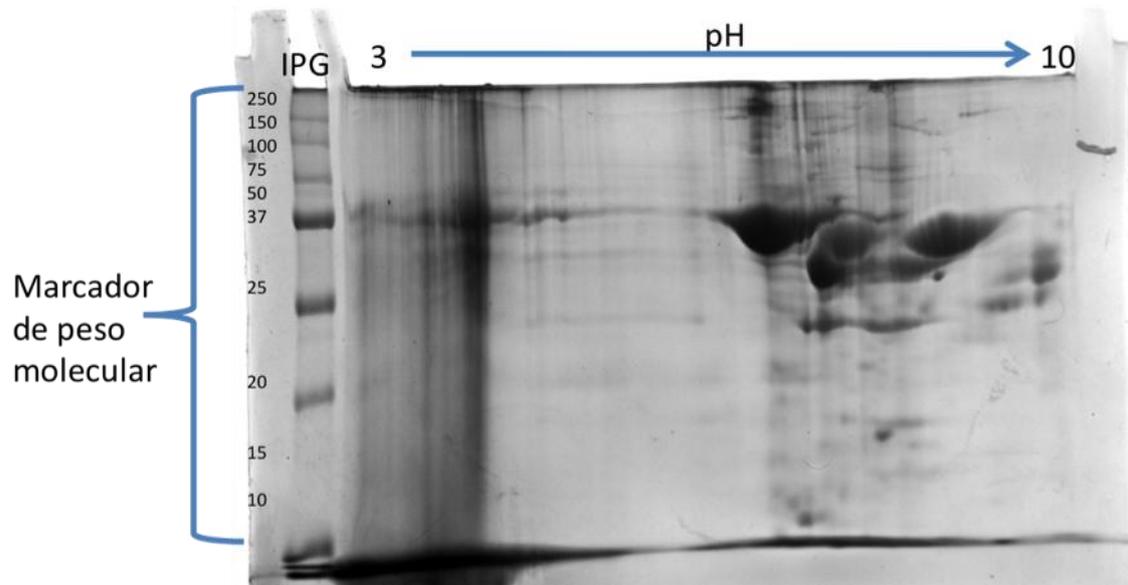


Figura 9. Gel de poliacrilamida representativo de los extractos de proteínas de células obtenidas de Pterigión Primario con identificación por peso molecular y punto isoeléctrico.

PTERIGION RECIDIVANTE

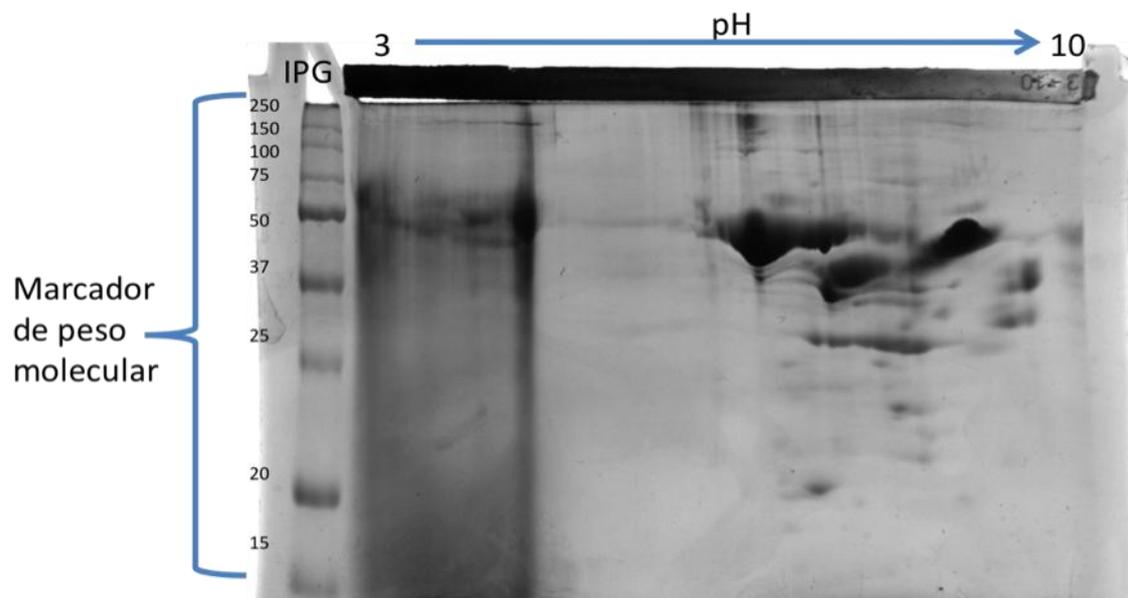


Figura 10. Gel de poliacrilamida Gel de poliacrilamida representativo de los extractos de proteínas de células obtenidas de Pterigión Recidivante con identificación por peso molecular y punto isoeléctrico

PRIMARIO/RECIDIVANTE

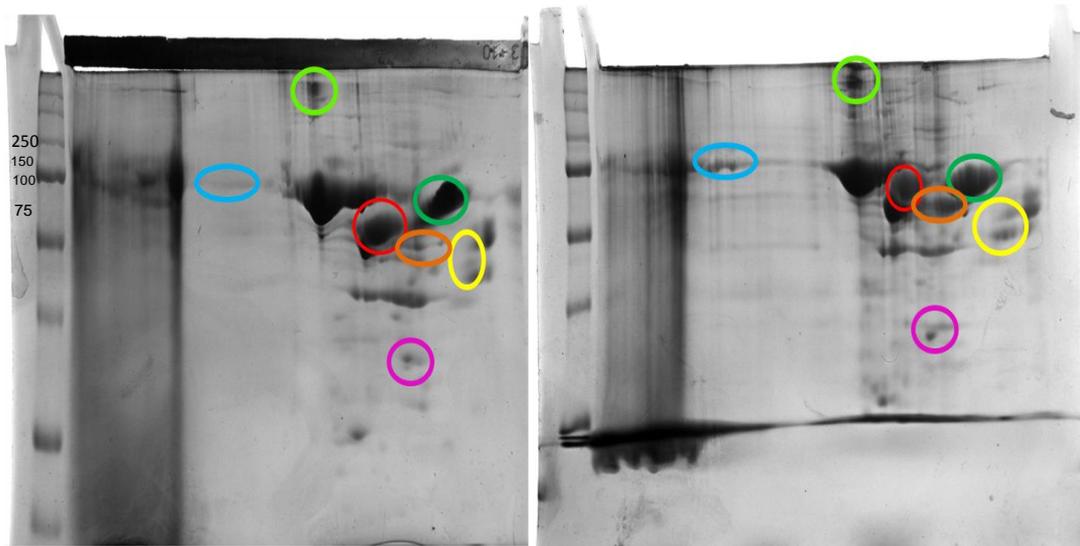


Figura 11. Comparación de la expresión de proteínas en células de Pterigión primario y recidivante, diferenciándolas por su punto isoelectrico y tamaño.

Las células obtenidas de pterigión primario y recidivante, mostraron diferencias en la morfología, así como en sus tiempos de división celular. Estas características están controladas por la expresión de diversas proteínas, por lo que deben de existir diferencias en el proteoma celular. Al analizar el proteoma de las células obtenidas de pterigión primario y recidivante, lo que observamos es que existen diferencias significativas en la cantidad de proteínas expresadas en uno y otro cultivo (Imagen 11). Existe una sobre expresión de las proteínas de alto peso molecular (250KDa) con pH de 7 así como las de bajo peso molecular (22 KDa con pH de 8) en las células de Pterigión recidivante, y también presenta una población de 50KDa con pH ácido (pH5) ausente en el primario, existe un grupo con marcada diferenciación siendo mayor su presencia en el primario con tamaño entre 48 y 50 KDa. Hay distintas proteínas que deben de ser seleccionadas e identificadas y ser corroboradas en la siguiente fase de este estudio.

X. DISCUSIÓN

Histopatológicamente encontramos abundante cantidad de fibroblastos la cual fue mayor en el tejido obtenido de Pterigión recidivante comparado con el Pterigión primario, Touhami en un estudio que realizó en 2005 encontró una hiperplasia epitelial y gran cantidad de tejido fibrovascular en el estroma de Pterigiones, la cual le confería un mayor riesgo de recidiva de Pterigión⁽²⁶⁾.

En 2008 Belmary observó que en la cabeza del Pterigión células del epitelio consistían en varias capas sin la atipia nuclear, y que el espesor del epitelio de la capa celular era más alto en la cabeza del pterigium y el estroma del Pterigión, presentó una variedad de microvasos y fibroblastos con degeneración elástica, solo unas células del epitelio del pterigium eran los p27 (KIP1) positivo. La inmunoreactividad nuclear para ciclina D1 y Ki-67 se descubrió en muchas células del epitelio comparadas con aquellos en la conjuntiva normal, en el cuerpo del Pterigión el epitelio estaba ligeramente delgado, comparado con el de la cabeza y estaba formado por algunas células redondas en una capa superficial. Unas células p27 (KIP1)-positivas se descubrieron en el epitelio. Varios ciclina D1 y Ki-67 inmunopositivos de los eran epiteliales⁽²⁷⁾.

Chowes et al estudiaron tejidos de Pterigión primario, secundario y conjuntiva y para el tejido de Pterigión se realizó la inmunotinción con MIB1 y p53, así como 12 anticuerpos monoclonales que reaccionaron con ki67 y antígeno p53 respectivamente ⁽²⁸⁾. También fue encontrada la inmunoreactividad para p27 (KIP1) en células normales del epitelio así como núcleos ciclina D1 y Ki-67 positivo escasos entremezclado pero en células de Pterigión la cantidad de positivos a estos últimos aumentó en las células epiteliales, en contraste la inmunoreactividad para p27(KIP1), ciclina D1 y Ki-67 fue encontrada en la mayoría de las células del estroma de Pterigión, y concluyeron que el desarrollo del Pterigión se asocia a proliferación del epitelio conjuntival sobre la cornea⁽²⁹⁾. Nosotros encontramos en al citometría de flujo que la población celular tuvo una positividad de 50% las células de Pterigión primario y recidivante a ki67, sin embargo no fue en la mayoría de las células lo que nos ayudo a identificar que el cultivo fue de células epiteliales de Pterigión y no estromales, y así diferenciar también las mismas de células conjuntivales que es similar a lo mencionado por Chowes así como Kase y colaboradores.

Las citoqueratínas constituyen el principal componente del citoesqueleto de las células epiteliales, donde forman un gran grupo de filamentos intermedios cuyo diámetro oscila entre 8 y 10 nm. En la especie humana forman una compleja familia codificada por, al menos, 20 genes diferentes, cuyo peso molecular varía entre 40 y 70 kDa y su punto isoeléctrico oscila desde 5.2 a 7.8 ^(30, 31) Estas corresponden a un grupo de 19 proteínas que se caracterizan por su estabilidad y su baja solubilidad en tampones fisiológicos. Mediante métodos

electroforéticos e inmunológicos con anticuerpos monoclonales, se han clasificado en 2 subfamilias: la primera comprende proteínas básicas relativamente grandes (56 a 67 kDa), numeradas de 1 a 8; mientras que la segunda está constituida por proteínas más pequeñas, más ácidas y son numeradas de 9 a 19. Los dos grupos de citoqueratínas se comportan como heteropolímeros obligados, es decir, se requiere un miembro de cada grupo para la formación de un filamento de queratina, con excepción de la citoqueratina 19. Como consecuencia de esto, cada epitelio expresa por lo menos dos citoqueratínas diferentes. Por ejemplo, las queratinas 5 y 14 se encuentran juntas en todos los queratinocitos, la 1 y 10 están en los epitelios queratinizados, la 4 y 13 en epitelios estratificados no queratinizados y la 8 y 18 en epitelios simples. La queratina 19 aparece sola, en epitelios simples. Pero dependiendo de la complejidad del epitelio, el número y tipo de queratinas presentes puede variar.^(30,31)

Se ha establecido que las citoqueratínas de bajo peso molecular (40 kDa) se encuentran en epitelios simples y glandulares, las de peso molecular intermedio en epitelios estratificados y las de alto peso molecular (~ 67 kDa) en epitelios queratinizados. Su expresión es afectada por factores ambientales y cambios, la presencia de CK 19, típica de epitelios simples, indica que este epitelio tiene características de un tejido de transición. La mayoría de las células epiteliales pueden expresar cualquier citoqueratina, sin embargo algunas de ellas son más específicas y selectivas de un determinado tipo celular. Así, las células del epitelio conjuntival presentan la citoqueratina CK19 a la que se une el anticuerpo monoclonal de ratón A53-B/A2 anti-humano,

mientras que las células epiteliales corneales y limbales presentan la citoqueratina CK3 y la citoqueratina CK12 a las que se unen el anticuerpo monoclonal de ratón AE5 y el AM5, que son marcadores específicos del epitelio corneal ⁽³²⁾. Las córneas de los pacientes con deficiencia de CML presentan una disminución de las citoqueratínas CK3 y CK12 y un aumento de la citoqueratina CK19 ⁽³³⁾ se ha encontrado particularmente en superficies de transición a epidermis, en sus capas superficiales y ha sido un marcador para varios tumores así como para Pterigión, sin embargo, un análisis de microarreglos revela la expresión importante de CK19 en conjuntiva y ha sido propuesto como marcador de células madre limbales, marcadores para conjuntiva y epitelio limbal CK 13 y de epitelio corneal CK 12 se presentan en epitelios normales, en el Pterigión se ha encontrado una distribución desigual de CK12 y 13 mayor a el epitelio corneal que es específico para CK12, este patrón de expresión de CK, nos puede acercar a la teoría de que el Pterigión se desarrolla a partir de la migración de células conjuntivales y limbales a el epitelio corneal. ⁽³⁴⁾ El resultado que obtuvimos nos demuestra que las células presentaban una configuración de epitelio de Pterigión como ha sido descrito por la positividad de CK 19 del 96.7% en el análisis con citómetro de flujo que corresponde a lo encontrado en estudios realizados por autores como Jaworski et al.

Existen dos tipos de células que expresan vimentina, las cuales son células epitelioides y dendríticas, estas últimas son las únicas que expresan CD1. Las células epitelioides que expresan vimentina se encuentran en toda la superficie del Pterigión y en la conjuntiva adyacente que presenta apariencia normal y es significativamente mayor en células de Pterigión comparado con el primario

($P = 0.016$). Las células dendríticas teñidas con anti-vimentina y anti-CD1 fueron menores en conjuntiva sanas comparado con Pterigión primario ($P < 0.001$) o recidivante ($P = 0.024$)⁽³⁵⁾. El 83% del total de población celular que analizamos fue vimentina positivo, con una distribución homogénea, que corresponde a células identificadas como epiteliales de Pterigión y es sustentado por el estudio mencionado previamente.

XI. CONCLUSIONES

La morfología celular es microscópicamente diferente en tejido de Pterigión primario y recidivante, encontrando, que los pozos que presentaron mayor crecimiento y confluencia en menor tiempo fueron los de Pterigión recidivante, así como el metabolismo celular, y cantidad de células, siendo mayor en Pterigión recidivante. Por otro lado se observaron diferencias en la expresión de proteínas en células cultivadas de pterigión primario y recidivante. Estas diferencias pudieran explicar la fisiopatología de ambas entidades clínicas. Estudios posteriores deben identificar estas proteínas y establecer el papel que tiene cada una de ellas en el desarrollo del pterigión, tanto primario como recidivante.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Buratto L, Phillips RL, Giuseppe C. Pterygium Surgery. Milan Italia: SLACK,2000.
- 2.-John ES, Reza MD, George JF, Kristin H, James JR, Marta L. Basic and Clinical Science Course. Singapur: LEO, 2009.
- 3.- Krachmer JH, Mannis MJ, Holland EJ. Cornea. Fundamentals of cornea and external diseases,2^a ed. Elsevier Mosby, 2005
- 4.- Douglas GC. Fundamentals of Clinical Ophthalmology Cornea. 1^a ed. BMJ Books, London, 2002.
- 5.- Robert CA, Grayson. Enfermedades de la Cornea. 4^a ed. Madrid España: Mosby, 1999
- 6.- Álvarez de Toledo JP, Fidéliz de la Paz DM. Pterygium: clinical report and review Arch. Soc. Canar. Oftal. 2003 - Nº 14
- 7.- Solomon AS. Pterygium. Br J Ophthalmol 2006; 90: 665-666.
- 8.- García AE, Sánchez MM, Paredes FJ, Yepes MY, Flores VJ, Tuno SA. Prevalence of Primary Pterygium at Cobija Ophthalmology Center. Artículo original - Rev Misión Milagro Vol.2 No.1
- 9.- Ochoa-Tabares JC. Génesis del pterigión. Una aproximación desde

la biología molecular. Rev Mex Oftalmol; Noviembre-Diciembre 2006; 80(6):318-324

10.- Tan D et al. Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision. Arch Ophthalmology 1997 Oct; 115 (10): 1235-1240

11.- Rojas EA, Gonzalez AS, Perez AR. Pterigión Primario en pacientes del Centro Oftalmológico San Cristóbal SItaVerapaz. Guatemala. Rev Hanan Cienc Méd la Habana, vol. VIII No. 1, ene-mar 2009

12.- Klinworth GK. Chronic Actinic keratopathy, a condition associated with conjunctival elastosis (pingueculae) and typified by characteristic extracellular concretions. Am J Pathol 1972; 67: 32.

13.- Rojas-Álvarez E. Cirugía del Pterigión: una historia que aún no termina. Arch Soc Esp Oftalmol v.83 n.5 Madrid mayo 2008.

14.- Young Soo Song, Yang Hwan Ryu, Suk Rae Choi, Jae Chan Kim. The Involment of Adult Stem Cells Originated from Bone Marrow in the Pathogenesis of Pterygia. Yonsei Medical Journal, Vol 46, No. 5, 2005; 687-692

15- Espeso, P. Romero, I. Martínez Salcedo, D. del Castillo. Formación de catarata tras el uso de mitomicina C en el tratamiento del pterigión. Nexus Ediciones, Vol 18, No. 2, 1999.

16- Di Girolamo N, Minas C, Wakefield D. Epidermal Grow Factor Receptor Signaling Is Partially Responsible for the Increased Matrix Metalloproteinase-1

Expression in Ocular Epithelial Cells after UVB Radiation. American Journal of Pathology, Vol 167, No. 2, Agosto 2005

17- Wong YW, Chew J, Yang H, Tan DT, Beuerman R. Expression of Insulin-like factor binding protein-3 in pterygium tissue. Br. J Ophthalmol 2006; 90:769-772

18.- Nolan TM, Di Girolamo N, Sachdev NH, Hampartzoumian T, Coroneo MT, Wakefield D. The role of Ultraviolet Irradiation and Heparin-Binding Epidermal Grow Factor-Like Grow Factor in the Pathogenesis of Pterygium. American Journal of Pathology, Vol 162, No. 2, Febrero 2003

19.- Karla GC, Mónica RG, Marco RF, Guadalupe T. Correlación morfológica del pterigión y su evolución clínica. Rev Med Hosp Gen Mex 2006; 69 (4): 205-211

20.- Dushku N. Pterygia pathogenesis: Corneal invasion by matrix metalloproteinase expressing altered limbal epithelial basal cells. Arch Ophthalmol 2001; 119 (5): 695-706.

21.- Tsai YY, Bau DT, Chiang ChCh, Cheng YW, Tseng SH, Tsai FJ. Pterygium and genetic polymorphism of DNA double strand break repair gene Ku 70. Molecular Vision 2007;13:1436-1440.

22.- Schneider BG, John-Aryankalayil M, Rowsey JJ, Dushku N, Reid TW. Accumulation of p53 protein in pterygia is not accompanied by TP53 gene mutation. Exp Eye Res 2006; 82:91-8.

23.- Reisman D, McFadden JW, Lu G. Loss of heterozygosity and p53 expression in Pterygium. *Cancer Lett* 2004; 206:77-83.

24.- Shimmura S, Ishioka M, Hanada K, Shimazaki J, Tsubota K. Telomerase activity and p53 expression in pterygia. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41:1364-9.

25.- Tsai YY, Cheng YW, Lee H, Tsai FJ, Tseng SH, Chang KC. P53 gene mutation spectrum and the relationship between gene mutation and protein levels in pterygium. *Mol Vis* 2005; 11:50-5.

26.- Touhami A, Di Pascuale MA, Kawatika T, Del Valle M, Rosa RH Jr, Dubovy S, Tseng SC. Characterization of myofibroblasts in fibrovascular tissues of primary and recurrent pterygia. *Br J Ophthalmol*. 2005 Mar;89(3):269-74.

27.- Aragonés C, Alemañy MJ. Factores predictivos de recurrencia del pterigium primario. *Rev Cubana Oftalmol* [revista en la Internet]. 2008; 21(2): Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-21762008000200009&lng=es

28.- Chowers I, Pe'er J, Zamir E, Livni N, Ilsar M, Frucht-Pery J. Proliferative activity and p53 expression in primary and recurrent pterygia. *Ophthalmology*. 2001 May;108(5):985-8.

- 29.- Kase S, Takahashi S, Sato I, Nakanishi K, Yoshida K, Ohno Shigeaki. Expression of p27(KIP1) and cyclin D1, and cell proliferation in human pterygium. *Br. J Ophthalmol* 2007, 91(7): 958-61.
- 30.- Crewthe WG, Dowling IM, Steinert PM. Structure of intermediate filament. *Int. J. Biol. Macromol.*1983, 5: 267-74.
- 31.- Steinert PM. Molecular and cellular biology of intermediate filaments. *Ann. Rev. Biochem.*1988, 57: 593-625.
- 32.- Lauweryns B, Oord JJ, Missotten L. The transitional zone between limbus and peripheral cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993, 34: 91-99
- 33.- Tseng SC, Li DQ. Comparison of protein kinase C subtype expression between normal and aniridic human ocular surfaces: implications for limbal stem cell dysfunction in aniridia. *Cornea* 1996, 15: 168-78.
- 34.- Jaworski CJ, Aryankalayil-John M, Campos MM, Fariss RN, Rowsey J, Agarwalla N, Reid TW, Dushku N, Cox CA, Carper D, Wistow G. Expression analysis of human pterygium shows a predominance of conjunctival and limbal markers and genes associated with cell migration. *Mol Vis.* 2009 Nov 20, 15: 2421-34.
- 35.- Chen YT, Tseng SH, Tsai YY, Huang FC, Tseng SY. Distribution of vimentin-expressing cells in pterygium: an immunocytochemical study of impression cytology specimens. *Cornea.* 2009 Jun;28(5):547-52.

