



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
FUNDACIÓN HOSPITAL NUESTRA SEÑORA DE LA LUZ, I.A.P.
DEPARTAMENTO DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS OCULARES

“ EFECTO DE LA DOXICILINA EN EL PERFIL DE CITOCINAS Y EN LA
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS PRO/ANTI-APOPTÓTICAS EN CÉLULAS
DERIVADAS DE PTERIGIÓN.”

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
CIRUJANO OFTALMÓLOGO
P R E S E N T A

DR. MIGUEL ANGEL VÁZQUEZ MEMBRILLO

ASESORES:

DRA. TERESA VALDEZ GONZÁLEZ
DR. ELLERY MARINO LÓPEZ STAR
DRA. STEPHANIE VOORDUIN RAMOS
DR. FRANCISCO MARTÍNEZ CASTRO
DRA. XIMENA MIRA LORENZO
DRA. ILIANA MINERVA PEÑALOZA ROMÁN
DRA. JUDITH ADRIANA ESPINOZA NAVARRO

TUTORES EXTERNOS:

DR. VICTOR BAUTISTA DE LUCIO
DRA. MARIA DEL CARMEN JIMÉNEZ MARTÍNEZ
M EN C ATZIN ROBLES CONTRERAS



MÉXICO D.F.

AGOSTO 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

Este trabajo se realizó en el Departamento de Enfermedades Inflamatorias del Hospital de Nuestra Señora de la Luz bajo la dirección de la Dra. Teresa Valdéz González y el Dr. Ellery López Star en la Unidad de Investigación del Instituto de Oftalmología “Fundación Conde de Valenciana” dirigido por el Dr. Victor Bautista De Lucio y la Dra. Ma. Carmen Jiménez Martínez. Este trabajo fue apoyado por los proyectos CONACYT-SALUD 71291 .

*A mis padres, Aracely y Miguel ,
Gracias por su apoyo, los amo.*

*A mi hermana, Araceli,
Gracias por estar siempre conmigo.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero mencionar las personas sin las cuáles éste trabajo no hubiera sido posible.

A Dios por haberme brindado la oportunidad de vivir y de conocer a las personas que me rodean.

Al Dr. Ellery López Star por su confianza, tenacidad, y tiempo. Por haberme brindado la oportunidad de participar en éste maravilloso proyecto.

A ti Miriam González Membrillo por tu apoyo desde un inicio.

A la M en C Atzin Robles Contreras por su amistad, por su tiempo dedicado en el laboratorio, por su apoyo, por las bromas y por todas aquellas desmadrugadas haciendo experimentos.

A la Dra. Maricarmen Jiménez por sus enseñanzas y por brindarme la confianza de seguir adelante basado en su ejemplo.

Al Dr. Victor Bautista De Lucio quien con su experiencia, buen humor y conocimientos debo la supervisión de éste trabajo. Gracias.

Al Dr Garfias por su apoyo y sus aportaciones a éste trabajo.

A Xime por su gran fuerza de voluntad y por su Fe que la han y la seguirán llevando lejos.

A la Dra Campomanes, a la Dra. Teresa Valdéz, a la Dra Stephanie Voorduin, al Dr. Francisco Martínez Castro y a la Dra. Judith Espinoza por su apoyo durante la realización del trabajo.

A los que ya no están conmigo mis abuelos Nestor, César, Conchita, Kika, y en especial a mi Luz preciosa que la siento conmigo todos los días.

Gracias Simbi por haberte conocido.

A toda mi familia, por su comprensión y apoyo.

A ti tía Luz María Membrillo Saíd por tu gran apoyo.

Gracias Tatatita sin ti no hubiera sido posible caminar.

A Chama, Esav y Aracely por su amistad.

A todos mis compañeros residentes que tuvieron que ver con la toma de muestras de pterigiión.

INDICE

<i>I.</i> Introducción.....	1
<i>II.</i> Objetivo.....	12
<i>III.</i> Materiales y Métodos.....	13
<i>IV.</i> Resultados.....	22
<i>V.</i> Discusión.....	44
<i>VI.</i> Conclusión.....	47
<i>VII.</i> Bibliografía.....	48

INTRODUCCIÓN

Pterigión

El pterigión es un desorden conjuntival común que exhibe cambios degenerativos, hiperplásicos y proliferativos así como características inflamatorias además de una rica vasculatura ⁽¹²⁾. El término pterigión deriva del griego *pterygion* que significa “ala”. Se trata de una tumoración benigna de forma triangular que se extiende desde la conjuntiva hacia la córnea. Se ha considerado una condición relativamente benigna, sin embargo es localmente invasivo y puede exhibir gran variedad de grados de anormalidad, variando desde displasia hasta carcinoma in situ ⁽¹⁹⁾. Esta tumoración se sitúa en la hendidura interpalpebral, suele ser bilateral y asimétrica y es más frecuente en el sector nasal⁽¹⁸⁾. Se han propuesto diferentes etiologías tales como remodelación de matriz extracelular, proceso inflamatorio, mecanismos antiapoptóticos, citoquinas, pérdida de la homeostasis de células conjuntivales⁽¹⁸⁾, factores de crecimiento y antiangiogénicos e infecciones virales, sin embargo diversos autores proponen una patogenia relacionada con la radiación ultravioleta, siendo considerado como un tumor relacionado con la exposición a radiación UV en vez de una patología degenerativa ⁽¹²⁾. La incidencia del pterigión varía según la edad y es mayor en regiones situadas 37° por encima y por debajo del ecuador, donde la intensidad de

la radiación ultravioleta es más elevada. El pterigión ha sido considerado como una patología degenerativa crónica con degeneración elastótica causada por radiación ultravioleta. Sin embargo, Touhami et al. ⁽¹⁰⁾ proponen que es una enfermedad proliferativa. Hallazgos histopatológicos revelan una hiperplasia epitelial con un tejido fibrovascular exuberante en el estroma del pterigión. La extensión de la proliferación fibrovascular ha sido considerado como un marcador confiable para predecir la propensión del tejido a recidivar. La radiación UV tiene un papel esencial en la formación de especies reactivas al oxígeno (ERO), entidades de vida corta continuamente generadas a bajos niveles durante el curso de un metabolismo aerobio normal, los cuales han sido relacionados con inflamación, iniciación y progresión de tumores y activación de carcinogénesis⁽¹³⁾. Las ERO pueden inducir la producción de Ciclooxygenasa 2(COX-2). Las ciclooxigenasas son enzimas involucradas en la síntesis de prostaglandinas. Existen 2 subtipos de COX's; COX-1 y COX-2. ERO y COX-2 tienen una participación importante en la carcinogénesis cutánea⁽¹⁴⁾. La expresión de COX-2 es suprimida por la acción de p53 ⁽¹⁵⁾, y la sobreexpresión de COX-2 fue observada en lesiones premalignas, malignas y metastásicas en cánceres epiteliales humanos ⁽¹⁶⁾. Por otro lado, se ha demostrado que la activación de survivina, miembro de la familia inhibidora de apoptosis, se encuentra sobreexpresada en la carcinogénesis humana, y la pérdida funcional de p53 se encuentra asociada con el aumento de la expresión de survivina en diferentes tipos de tumores⁽¹⁷⁾. Cristina Maxia, et al.

(12) describen el incremento de survivina mediado por COX-2, lo que sugiere un origen potencial del pterigión por medio de un mecanismo antiapoptótico y el desarrollo de ésta lesión a través de un crecimiento neoplásico en vez de una condición degenerativa de la conjuntiva.

En el pterigión, existe una expresión anormal en genes asociados con el control de la apoptosis como p53, bax y bcl-2. El factor de transcripción p63, miembro de la familia del gen p53 ha demostrado ser un marcador específico para células epiteliales y corneales, mismo que se encontró elevado en muestras de pterigión (18). Tan THD, et al (19) reportaron el gen p53 positivo en el 60% de las muestras de pterigión en comparación con las muestras conjuntivales en donde el resultado fue negativo, bcl-2 positivo en el epitelio de muestras de pterigión pero negativo en conjuntiva normal y en la capa fibrovascular del mismo pterigión, el gen bax positivo en todas las muestras epiteliales de pterigión y en la capa epitelial de conjuntiva.

El término apoptosis como forma de muerte celular, diferente de la muerte celular secundaria a necrosis, fue por primera vez descrita por Kerr y colaboradores en 1972(19). En contraste con la necrosis, la cual es un fenómeno pasivo, la apoptosis celular requiere de energía y la acción concertada de una cascada de genes. Existen tres características de la apoptosis que incluyen disminución del volumen celular, marginación de cromatina, y fragmentación del DNA el cuál forma grupos 3'-hidroxilo libres considerados como marcadores de células apoptóticas. Dentro de los

inhibidores de la apoptosis se encuentran genes como bcl-2 y bcl-xl, mientras que los promotores de la apoptosis incluyen otros genes como bax, bad, bak y bcl-xs.⁽¹⁹⁾

El inhibidor de la apoptosis bcl-2 es conocido por formar heterodímeros con genes promotores de apoptosis como por ejemplo bcl-2 con bax en la determinación del destino celular. Si bax se encuentra en exceso, la célula progresa hacia apoptosis. Si bcl-2 se encuentra aumentada, la célula se encuentra protegida contra apoptosis. Interesantemente, la transcripción de estos dos genes es regulada por el gen supresor de tumor p53, mismo que inhibe la expresión de bcl-2 y promueve la expresión de bax. En condiciones normales el gen p53 se encuentra presente en niveles no detectables mediante métodos de inmunohistoquímica convencionales, y sólo es detectable a través de mutación puntual o amplificación mdm2.

Doxiciclina

La doxiciclina (α -6 deoxy-5-hidroxitetraciclina) es un ion quelante metálico y un antibiótico de amplio espectro que previene el acceso de acyl RNAt con su receptor en el complejo de la subunidad ribosomal RNAm-30s. En adición a éstas funciones establecidas, otras propiedades se han descrito recientemente dentro de las que se encuentran inhibición de la actividad de la familia de las metaloproteinasas de matriz (MMP), inhibición en la síntesis de MMP, inhibición de la síntesis de interleucina-1 (IL-1), inhibición de la función de las células B

activadas, inhibición de la síntesis de óxido nítrico (ON) a través de macrófagos activados por lipopolisacáridos (LPS) e inhibición de la síntesis de colágena por condrocitos cultivados. Es un medicamento empleado para patologías de superficie ocular como rosácea, erosión epitelial recurrente y queratoconjuntivitis sicca. ⁽²⁰⁾ Tiene un peso molecular de 512.9 Da. Su actividad es bacteriostática y es altamente efectivo contra muchos microorganismos incluyendo *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus anthracis* y *Yersinia pestis*. ⁽⁹⁾

Apoptosis

Es causa de muerte programada de la célula. Se le ha reconocido en la regulación de procesos fisiológicos y patológicos. La activación inicial en una o más enzimas ampliamente específicas puede iniciar una cascada de activación de otras proteasas que terminan en muerte celular. La activación de estas endonucleasas producen la fragmentación característica del DNA y los cambios en el volumen y la forma de la célula pueden atribuirse al desdoblamiento del citoesqueleto.

Por último la fagocitosis de corpúsculos apoptóticos se facilita por receptores específicos situados en los macrófagos o células parenquimatosas sanas adyacentes.

Uno de los primeros trastornos secundarios a la apoptosis es la translocación de la porción interna de la membrana fosfolipídica fosfatidilserina (PS) a la porción externa de la membrana plasmática, esto expone a PS al espacio extracelular y permite que se una con la Anexina V, la cual es una molécula Calcio dependiente de 35-36 kDa, y tiene gran afinidad a la PS. Ésta translocación antecede procesos como pérdida de la integridad plasmática, fragmentación del DNA y condensación de cromatina. La Anexina-V puede ser conjugada con un fluorocromo como isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE), alofocianina (APC), ficoeritrina-cychrome 5 (Cy5 o Cy5.5) y posteriormente se puede utilizar en citometría de flujo para identificar en las células los estadios tempranos de la apoptosis.

La translocación de PS también sucede durante el proceso de necrosis; por lo tanto la Anexina-V no es un marcador absoluto de apoptosis, por lo que se tiene que utilizar junto con tinciones vitales como el 7 amino actinomicina, o Ioduro de Propidio. Este último se une a los ácidos nucleicos, pero solo puede penetrar a la membrana plasmática cuando la integridad membranal está alterada, así como ocurre en los estadios tardíos de apoptosis o necrosis⁽⁹⁾.

Citocinas

El concepto “citocinas” ha estado en evolución constante, al inicio, denominadas linfocinas, ya que se pensaba que eran secretadas únicamente

por linfocitos activados. Sin embargo Cohen et al. ⁽²⁹⁾ propusieron el término citocinas. Para designar citocinas individuales, un grupo de participantes en el Segundo Taller Internacional de Linfocinas en 1979, propusieron el término interleucinas con el fin de desarrollar una nomenclatura. Aarden et al.⁽³⁰⁾ sugirieron que el término no se debía reservar para factores que actuaban únicamente en leucocitos. Las citocinas son proteínas reguladoras secretadas por células blancas y por una variedad de células en el cuerpo cuyas acciones pleiotrópicas incluyen numerosos efectos en el sistema inmune y en la modulación de células inflamatorias. Algunas de las acciones de las citocinas son descritas en la Tabla 1.

Pleiotropía	Una citocina tiene múltiples células blanco y múltiples acciones
Redundancia	Diferentes citocinas tienen diferentes acciones
Sinergismo/Antagonismo	La exposición de las células a dos o más citocinas simultáneamente conduce a dos respuestas cualitativamente diferentes
Cascada de citocinas	Una citocina aumenta (o disminuye) la producción de otra citocina
Transmodulación del receptor	Una citocina aumenta (o disminuye) la expresión de los receptores a otra citocina o factor de crecimiento
Transeñalización del receptor	Una citocina aumenta (o disminuye) la señalización de otro receptor por otra citocina o factor de crecimiento

Tabla 1. Acciones de las citocinas.

La citocinas comparten características con otros dos grupos de mediadores protéicos como son factores de crecimiento y hormonas polipeptídicas. Una de las diferencias, entre citocinas y factores de crecimiento, es que éstos últimos (PDGF, EGF, o TGF- α) tienden a ser constitutivos y no son tan estrechamente regulados como las citocinas, y que, a diferencia de las acciones de las citocinas, las mayores acciones de los factores de crecimiento están dirigidas a las células no hematopoyéticas. A su vez no es fácil distinguir entre las citocinas y las hormonas polipeptídicas clásicas (Tabla 2).

Hormonas		Citocinas	
Características	Excepciones	Características	Excepciones
Secretadas por un solo tipo de células especializadas		Secretadas por más de un solo tipo de células	IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, Linfocitos T sólo por células linfoides
Cada hormona es única en su acción		Citocinas diferentes estructuralmente sobreponen su acción {redundancia}	
Especificidad hacia células blanco restringida con acción de espectro limitado	Insulina	Células blanco múltiples con múltiples acciones (pleiotrópicas)	
Actúan en sitios distantes		Usualmente poseen un radio de acción corta {autócrino o parácrino}	TNF, IL-1 o IL-6 en choque séptico

Tabla 2. Diferencias entre hormonas polipeptídicas y citocinas

A mediados de 1960 se descubrió que proteínas secretadas por linfocitos regulaban el crecimiento y la función de una variedad de células blancas. A su vez, pronto se descubrió que los monocitos son fuente importante de proteínas que pueden modular la función leucocitaria. Los interferones fueron descritos desde 1950 como agentes antivirales selectivos, fueron reconocidos gradualmente como proteínas realizando acciones tanto en el crecimiento como en la diferenciación celular dentro y fuera del sistema inmune. Otra fuente de investigación dentro del campo de las interleucinas lo constituye el factor de crecimiento hematopoyético o factor estimulante de colonias (CSFs), promueven el crecimiento y la diferenciación celular de células madre

hematopoyéticas y de células hematopoyéticas totalmente diferenciadas. La cuarta fuente dentro de la investigación de las citocinas deriva del estudio de los factores de crecimiento actuando sobre las células no hematopoyéticas. El factor transformador de crecimiento- β (TGF- β), es actualmente considerada como una citocina.

El Interferón fue descrito por primera vez por Isaacs and Lindenmann (1957) como una factor inducido por una variedad de células infectadas capaces de inducir resistencia a la infección hacia virus homólogos o heterólogos. La capacidad de los interferones en la respuesta inmune no se sospechaba en un principio. Sin embargo, años después Wheelock, describió una proteína relacionada con la inhibición de virus, hoy conocida como INF, producida por linfocitos T activados. Muchas proteínas son capaces de estimular el crecimiento de células no hematopoyéticas, las más conocidas son factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor decrecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Éstas últimas no son consideradas citocinas, sin embargo tienen acciones parecidas.

Según sus características estructurales, los receptores para citocinas son agrupados en familias diferentes. A la familia de receptores clase I de citocinas (familia de receptores de hematopoyetina) pertenecen IL-2, IL-4, IL-5. El INF- α/β , INF γ , y la IL-10 pertenecen a la familia de receptores clase II de citocinas (familia de interferones), nombrada así por las características similares a la

clase I. Otra gran familia es la del TNF, la cual comprende dos receptores de TNF distintos TNF- α y TNF- β ⁽³¹⁾.

Proteínas apoptóticas

La apoptosis es necesaria para la homeostasis normal tisular tanto para la renovación de los tejidos como para el desecho del DNA dañado de células no funcionales o que no se encuentran en el lugar adecuado. La apoptosis se encuentra sujeta a la regulación por las proteínas relacionadas a la familia de Bcl-2 la cuál incluye tanto agonistas para la muerte celular (Bax), como antagonistas (Bcl-2 y Bcl-x). Las concentraciones celulares de los antagonistas de muerte, así como de los agonistas y la dimerización competitiva entre éstos, determinan la susceptibilidad celular para la apoptosis celular. Se ha propuesto que la tumorigénesis es una alteración de la regulación de las vías bioquímicas que controlan la apoptosis así como una alteración de la proliferación celular. La falta de regulación en los genes responsables de la muerte celular lo cual da una sobreexpresión de Bcl-2 o la reducción en la expresión de Bax, altera la relación Bcl-2:Bax. Lo anterior resulta en la resistencia a la apoptosis y asegura su inadecuada supervivencia y por lo tanto aumenta la posibilidad de malignidad ⁽³²⁾.

Planteamiento del Problema

Se sabe que la doxiciclina inhibe la apoptosis en células epiteliales conjuntivales, sin embargo se desconoce si la doxiciclina tiene efecto sobre la viabilidad celular y el perfil de citocinas proinflamatorias en células de pterigión cultivadas *in vitro*.

Justificación del Estudio

Valorar los efectos sobre la viabilidad celular y el perfil de citocinas anti-inflamatorias de la doxiciclina en células de pterigión cultivadas *in vitro*, para proponer su uso tópico en pacientes.

Hipótesis

Si las células de pterigión son tratadas con doxiciclina, entonces, se alterará la viabilidad celular, así como el perfil de citocinas.

Objetivo General:

- Analizar el efecto de doxiciclina en el cultivo de células de pterigión.

Objetivos Particulares:

1. Establecer cultivo primario de células de pterigión
2. Determinar las características morfológicas con microscopía de contraste de fase en células tratadas y no tratadas con doxiciclina

3. Determinar la expresión de moléculas relacionadas a apoptosis/necrosis celular por citometría de flujo en células tratadas y no tratadas con doxiciclina
4. Determinar la concentración de citocinas proinflamatorias en células tratadas y no tratadas con doxiciclina
5. Determinar la concentración de citocinas proinflamatorias y su expresión génica medidas por medio de citometría de flujo

MATERIAL Y MÉTODOS.

Es un estudio prospectivo , experimental , longitudinal que se llevó a cabo en la Unidad de Investigación del Instituto Oftalmológico Conde de Valenciana I.A.P de la Ciudad de México .

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, tripsina (Tryple Select, Gibco, Grand Island, NY, USA); microscopia de contrastes de fases invertida (Axiovert; Carl Zeiss Meditec, Oberkochen, Germany); centrifuga (Centrifuge 5415, Eppendorf, Hamburg, Germany), incubadora (Forma Scientific, Inc., OH, USA); citómetro de flujo (Becton Dickinson, USA). Penicilina /Strepto 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) FITC conjugated, Ki-67 FITC, saponina, paraformaldheido, facs flow. Doxiciclina (Sigma), Ionomicina 1:10, PMMA 1:1000, Trisol.

PROCESAMIENTO DE MUESTRA.

Se obtuvieron muestras de pterigión de pacientes de la Fundación Hospital “Nuestra Señora de la Luz”, sin importar sexo o edad, que fueron

sometidos a cirugía de pterigión tanto primario y recidivante. Se excluyeron aquellos pacientes que padecieran cualquier enfermedad de superficie ocular que involucrara el área de toma de la muestra.

Manejo pterigión. Para su transportación se depositó la muestra en un frasco estéril con solución Hartman o medio de cultivo DMEM suplementado ya descrito y se mantuvo a temperatura ambiente, por un periodo no mayor de 6 h hasta su procesamiento con técnica estéril.

Cultivos celulares. La muestra de pterigión fue procesada bajo condiciones estériles en campana de flujo laminar. Se tomó un fragmento de 1x1 mm aproximadamente y se colocó de forma extendida en cajas de 24 pozos de cultivo, dejando reposar el tejido de 15 a 30 segundos para permitir su fijación. Se agregó 100 µl de suero fetal bovino durante 24h a 37° C en un ambiente de 5% CO₂. Al terminar el tiempo de incubación se agregó 300µl de DMEM suplementado con gentamicina (500µl), Penicilina (1U)/estreptomicina (1µg), Suero Fetal Bovino 10% (10ml). Cambiándose de medio cada 24hrs hasta observar el crecimiento celular microscópicamente con una confluencia aproximada del 80%.

Pase de células a caja de 24 pozos. Al observar una confluencia celular del 80% se empleó tripsina 0.25% y se incubó a 37° durante 2 minutos hasta

observar disgregación celular en microscopio invertido. La reacción enzimática se detuvo con DMEM. Se retiró la dilución con micropipeta realizando resuspensión de células, posteriormente se colocó en tubo cónico 1.5 ml y se centrifugó a 1.2 rpm durante 5 minutos a 4°C. Se retiró sobrenadante y se resuspendió botón, al cuál se añadieron 500µl de DMEM y se colocó en caja de 24 pozos dentro de un pozo nuevo.

Fenotipificación y tinción de células de Pterigión.

Se realizó dilución de 1ml de tripsina con 1ml de de PBS estéril la cual se colocó a la caja de cultivo T25. Se colocó caja T25 a 37° C durante 6 minutos en incubadora, se detiene reacción con 5ml de DMEM. Se colocó dilución total en tubo de 15ml el cual se centrifugó a 1.2 rpm a 37° C durante 5 minutos, se retiró sobrenadante, se resuspendió botón celular colocando 1ml de PBS estéril, y posteriormente colocándolo en cuatro tubos de 1.5ml. Se centrifugó nuevamente a 1.2 rpm a 37°C durante 5 minutos y se agregaron 20µl de paraformaldehído al 1% y 1ml de PBS no estéril a cada tubo. Se centrifugó nuevamente a 1.6 rpm a 37°C durante 5 minutos. Se retiró sobrenadante. Se colocó a 9°C durante 10 minutos. Se colocaron 200µl de saponina a tres tubos dejando uno como control. Se colocaron a 9°C durante 20 minutos. Se lavaron con 1ml de PBS no estéril y se centrifugaron a 1.6 rpm a 37°C durante 6 minutos, posteriormente se resuspendió botón. Se dividieron los tubos en 4: A. tubo control; B. tubo con 8µl de Ki67; C. tubo con 8 µl de vimentina, D. tubo

con 8 µl de citoqueratina. Se realizó mezcla con vortex y se colocaron a 9°C durante 30 minutos. Posteriormente se agregó 1ml de PBS no estéril a cada tubo. Se centrifugó a 1.2 rpm durante 5 min a 4° C se desechó el sobrenadante y se resuspendió botón celular. Se añadieron 400µl de FACS FLOW a cada tubo. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo.

Tratamiento con Doxíciclina

Se realizó dilución de 1ml de tripsina con 1ml de de PBS estéril la cual se colocó a la caja de cultivo T25. Se colocó a 37°C durante 6 minutos en incubadora, se detuvo la reacción con 5ml de DMEM. Se colocó dilución total en tubo de 15ml el cual se centrifugó a 1.2 rpm a 37° C durante 5 minutos, se retiró sobrenadante y se resuspendió el botón celular y se agregaron 1000µl de PBS y 50µl de DMEM suplementado. La dilución se colocó directamente para ser cuantificada en cámara de Neubauer dando un gran total de 160,000 células. Se sembró en caja de 96 pozos, en un total de 21 pozos, en 7 pozos por triplicado, lo que da un total de 7,619.04 células por pozo. Se incubaron durante 24 horas a 37°C en un ambiente con CO2 al 5%. Observando confluencia del 80% .Pozo A1: control negativo con 100µl de DMEM; A2: control positivo con PMA(5µl)/ Ionomicina(2µl) y 93µl DMEM; A3 200MM: con doxíciclina(20µl) y DMEM (80µl); A4 100MM: con doxíciclina(10µl) y DMEM (90µl); A5 200MM PMA/IONOMICINA: con Doxíciclina (20µl), PMA(5µl)/ Ionomicina(2µl) y DMEM (73µl); A6 100MM PMA/IONOMICINA: con

Doxiciclina (10 μ l), PMA(5 μ l)/ Ionomicina(2 μ l) y DMEM (83 μ l);A7 400MM: con doxiciclina(40 μ l) y DMEM (60 μ l) (Tabla 1). Se incubaron durante 24 horas a 37°C en un ambiente con CO2 al 5%. Se retiró dilución y se agregaron 200 μ l de trizol a cada pozo, se resuspendieron células y los sobrenadantes se colocaron en tubos cónicos de 1.5ml los cuáles fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento.

POZO	CONCENTRACIÓN
C-	100µl DMEM
C+	5µl PMA/2µl Ionomicina + 93µl DMEM
100MM	10µl Doxiciclina + 90µl DMEM
200MM	20µl Doxiciclina + 80µl DMEM
400MM	40µl Doxiciclina + 60µl DMEM
100 Doxiciclina/PMA	10µl Doxiciclina + 5µl PMA/ 2µl Ionomicina + 83µl DMEM
200 Doxiciclina/PMA	20µl Doxiciclina + 5µl PMA/ 2µl Ionomicina + 73µl DMEM
400 Doxiciclina/PMA	40µl Doxiciclina + 5µl PMA/ 2µl Ionomicina + 53µl DMEM

Tabla 3. Concentraciones de cada pozo por triplicado.

Preparación de Agua tratada-Dietilpirocarbonato: Se colocaron 100ml de agua bidestilada en matraz con 100µl de Dietil pirocarbonato (DEPC) con el fin de obtener una solución porcentual al 0.1%, se dejó en agitación durante 24h.

Aislamiento de RNA con TRIZOL: Separación de fases: Se colocaron 200µl de cloroformo por cada 1ml de reactivo TRIZOL, se mezclaron durante 15 segundos, posteriormente se incubaron durante 2-3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 12,000rpm durante 15 minutos a una temperatura de 8°C. Posterior a la centrifugación, la mezcla se separó en: 1) fase baja de fenolcloroformo de color rojo, 2) Una interfase, 3) Fase acuosa incolora superior, el RNA se localiza exclusivamente en la fase acuosa. Se transfiere la fase acuosa a un nuevo tubo donde se mide y el 60% de éste volumen es el reactivo de TRIZOL utilizado para la homogenización.

Precipitación de RNA: Se precipitó el RNA mezclando la fase acuosa con alcohol isopropílico. Se añadieron 100µl de alcohol isopropílico, posteriormente se incubaron a 15 - 30°C durante 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 12, 000 rpm durante 10 minutos a una temperatura entre 2 - 4°C, el RNA centrifugado formó un botón en el fondo del tubo. **Lavado de RNA:** Se decantó el RNA completamente y se agregaron 200µl de etanol al 75%, se mezcló y se centrifugó a 7,500rpm durante 5 min a una temperatura entre 2 -8 °C.

Redisolución de RNA: Se decantó contenido y se dejó secar durante 10 minutos a temperatura ambiente y se agregó DEPC previamente preparado, resuspendiendo el botón. Las muestras se sometieron a espectrofotometría.

Espectrofotometría: se colocaron 25ml de agua desionizada, se calibró espectrofotómetro con 200µl de agua desionizada. Se realizó dilución con 198µl con 2µl de muestra y se colocó en tubo eppendorf de 0.6 ml, se realizó mezcla y se colocó dilución para lectura con los siguientes resultados.

APOPTOSIS Y NECROSIS

Conteo celular: Se retiró medio de caja T25 P1, se agregó 1 ml de dilución 1:1 1ml de PBS estéril/Tripsina, se incubó a 37°C durante 7 minutos, posteriormente se detuvo la reacción con 5ml DMEM, se resuspendió, posteriormente, se colocó en tubo estéril de 15 ml, 4 ml de la dilución, se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos a 4°C, se retiró sobrenadante, se resuspendió botón celular con 1ml de DMEM. Se realizó dilución con 1:10 con eosina, se cuenta en cámara de Neubauer para obtener 10, 000 células por pozo. Se incuban 24 pozos a 37° C en un ambiente de 5% CO₂.

Se recuperó sobrenadante y se congeló a -20°C. Se colocó dilución 1:1 500µl Tripsina : 500µl PBS a pozos y se colocaron 20µl a cada pozo y se incubaron durante 10 minutos a 37°C, se resuspendieron células y se colocaron en tubos de 1.5ml, se lavaron células con 500µl de PBS estéril, se centrifugaron a 1.6 rpm durante 5 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante, se resuspendió botón, se centrifugó nuevamente a 1.6 rpm durante 5 minutos a 4°C, se retiró excedente con micropipeta y se agregó a cada tubo 0.26µl de Anexina con 10µl de agua Binding Buffer, se incubó durante 10 minutos en

oscuridad a temperatura ambiente, se lavó con 500µl con PBS no estéril y se centrifugan a 1.5 rpm durante 5 minutos a 37°C, se decantó sobrenadante. Se diluyó 1:4 Binding Buffer con agua bidestilada se agregó Ioduro de propidio. Se realizó citometría de flujo.

Análisis de la secreción de citocinas por CBA. Se realizó análisis de sobrenadante de los pozos por medio de CBA (B&D), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medición de proteínas apoptóticas en células derivadas de explantes de pterigión: Se midieron proteínas apoptóticas bcl-2, bax y bcl-x, por medio de citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con FITC.

Análisis estadístico. Se utilizó T de student o U-Mann Whitney para comparar entre dos grupos. Se consideró una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. Éste análisis se llevó a cabo en Excel (Microsoft Office 2007®).

RESULTADOS.

1. Cultivo primario de células derivadas de explantes de Pterigión.

Se observó una morfología en huso. La confluencia de 80% se alcanzó entre 2 semanas y 3 semanas de haber realizado los explantes de pterigión. Se observó una inmortalización espontánea de la línea celular con la cuál se realizaron todas las pruebas (Figura 1).

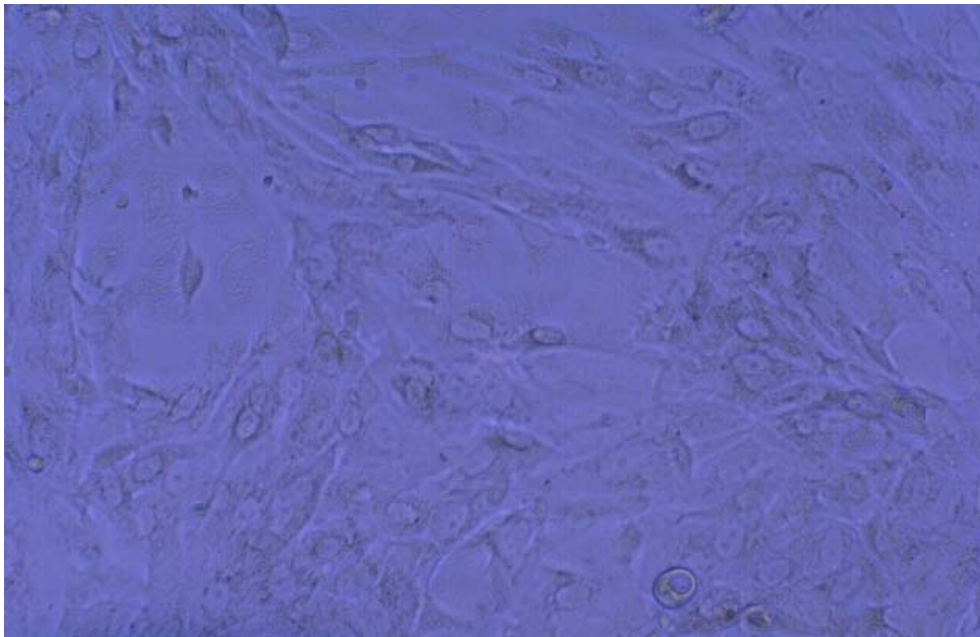


Figura 1. Células derivadas de explantes de pterigión. Fotografía de microscopía de contraste de fases 200x. Se observan células en huso.

2. Fenotipificación de células de explantes de pterigión por medio de citometría de flujo.

Por medio de citometría de flujo se adquirieron 3000 eventos, realizándose en ventana, que por tamaño y granularidad correspondieron a células derivadas de explantes de pterigión. La fluorescencia se mostró positiva

comparando la fluorescencia con el control no marcado. Los resultados se presentan en gráficas de puntos (Figuras 2-4) .

GRUPO CONTROL

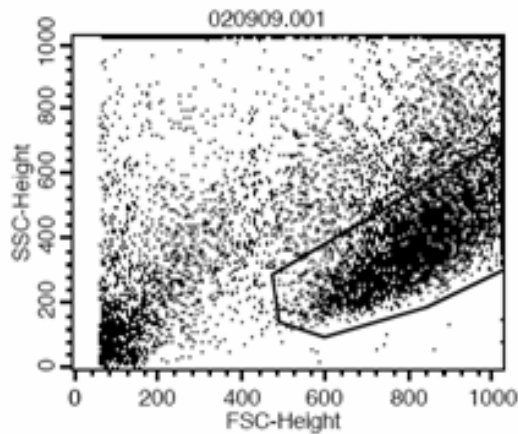


Figura 2. Fenotipificación de células de explantes de pterigión por medio de citometría de flujo. Se observan células que por tamaño y granularidad corresponden a una misma población de células derivadas de explante de pterigión.

CITOQUERATINA 19

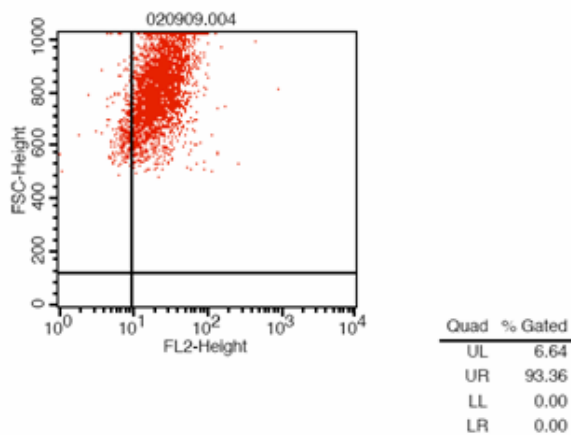
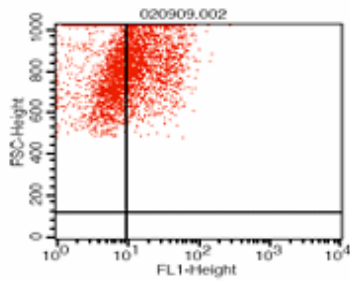


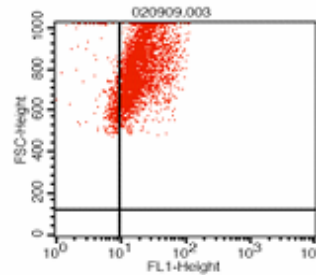
Figura 3. Fenotipificación de células de explantes de pterigión por medio de citometría de flujo con tinción para citoqueratina 19.

A. Ki67



Quad	% Gated
UL	49.05
UR	50.95
LL	0.00
LR	0.00

B. VIMENTINA

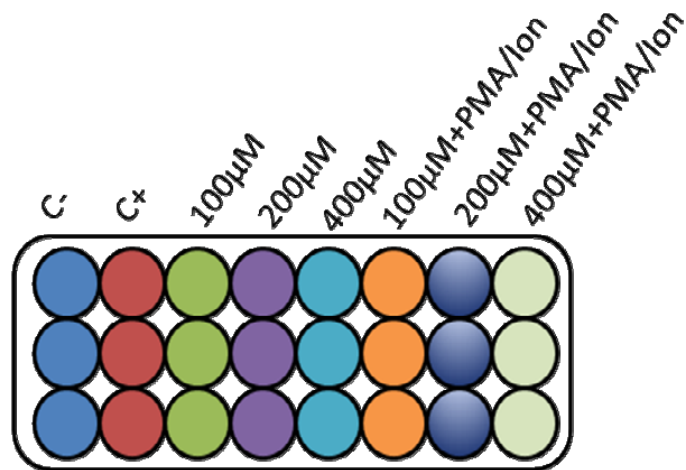


Quad	% Gated
UL	9.04
UR	90.96
LL	0.00
LR	0.00

Figura 4. Fenotipificación de células de explantes de pterigión por medio de citometría de flujo con tinción para Ki67 (A) y para Vimentina (B).

3. Células de explantes de pterigión estimuladas con doxiciclina y PMA/Ionomicina

Se realizó cultivo de siete pozos por triplicado con diferentes concentraciones de doxiciclina y de estimulador policlonal PMA/Ionomicina (Figuras 5-9).



- | | | |
|---|---------------|---------------------------|
| ● | C- | DMEM |
| ● | C+ | PMA/Ionomicina(Ion) |
| ● | 100µM | 10µL Doxiciclina |
| ● | 200µM | 20µL Doxiciclina |
| ● | 400µM | 40µL Doxiciclina |
| ● | 100µM+PMA/Ion | 10µL Doxiciclina ,PMA/Ion |
| ● | 200µM+PMA/Ion | 20µL Doxiciclina ,PMA/Ion |
| ● | 400µM+PMA/Ion | 40µL Doxiciclina ,PMA/Ion |

Figura 5. Representación de pozos por triplicado.

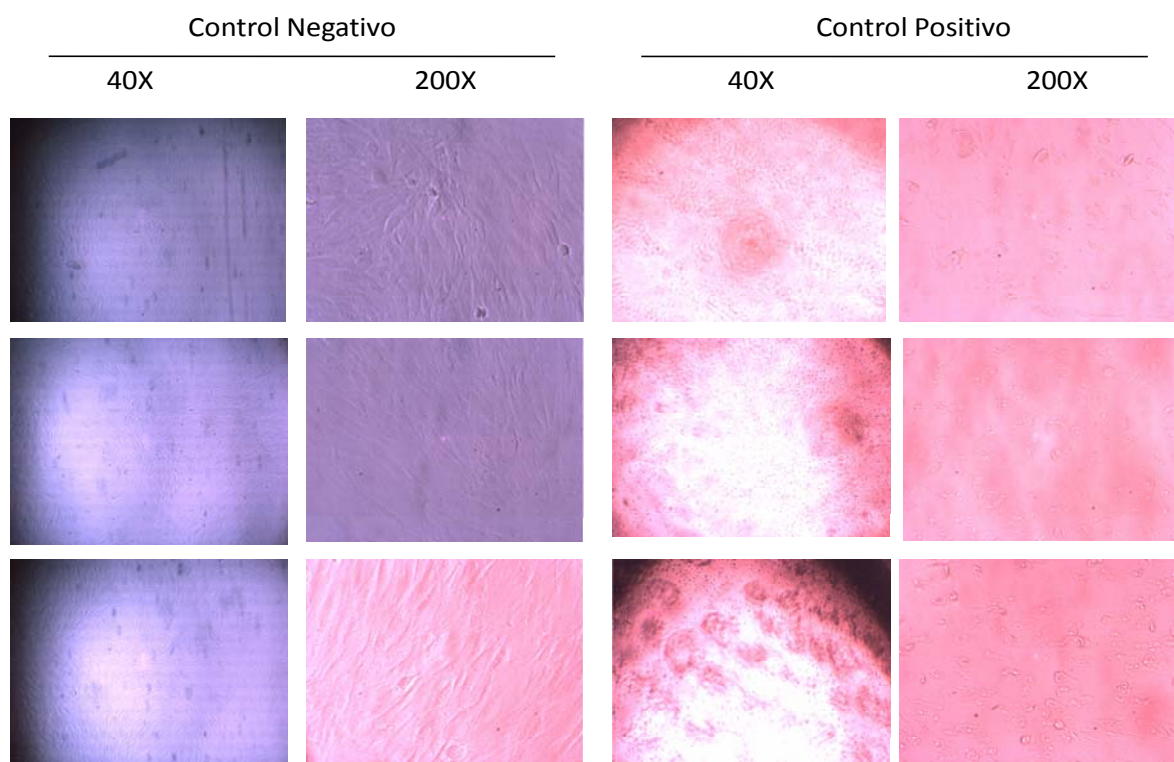


Figura 6. Cultivo de células de explante de pterigi3n. Control negativo y control positivo respectivamente. No se aprecia cambio en la morfología celular.

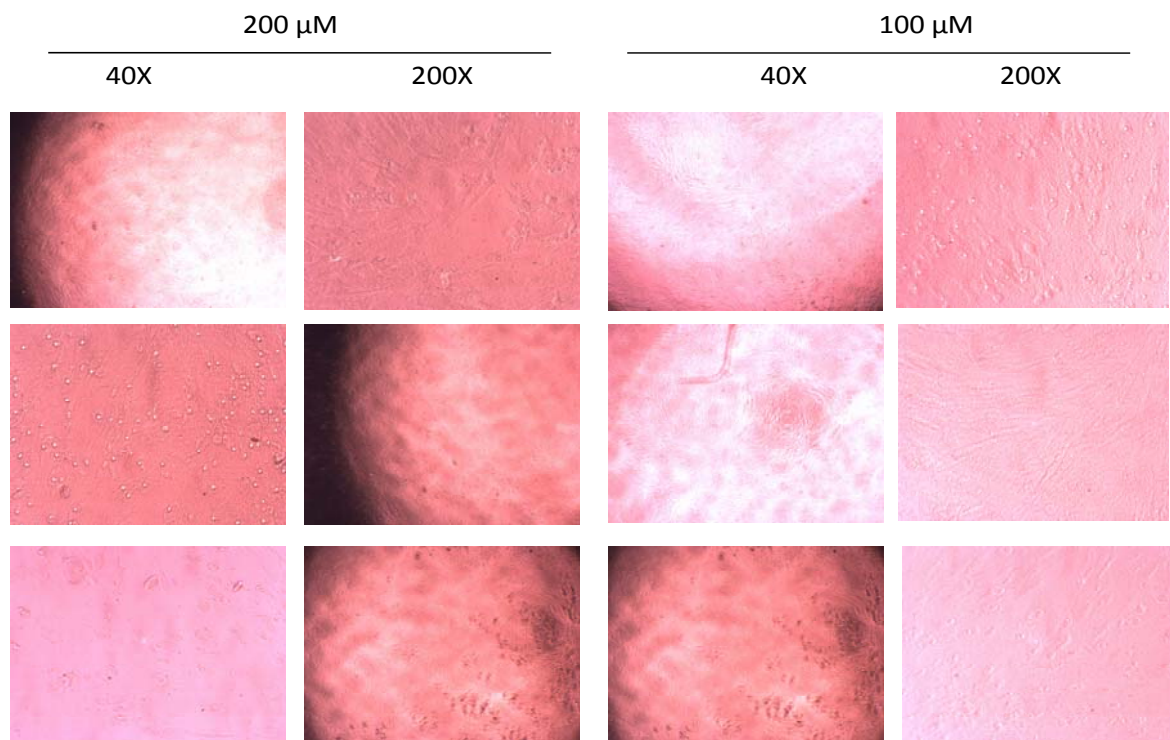


Figura 7. Cultivo de células de explante de pterigi3n . Fotografía de microscopía de contraste de fases de 40x y 200x respectivamente.

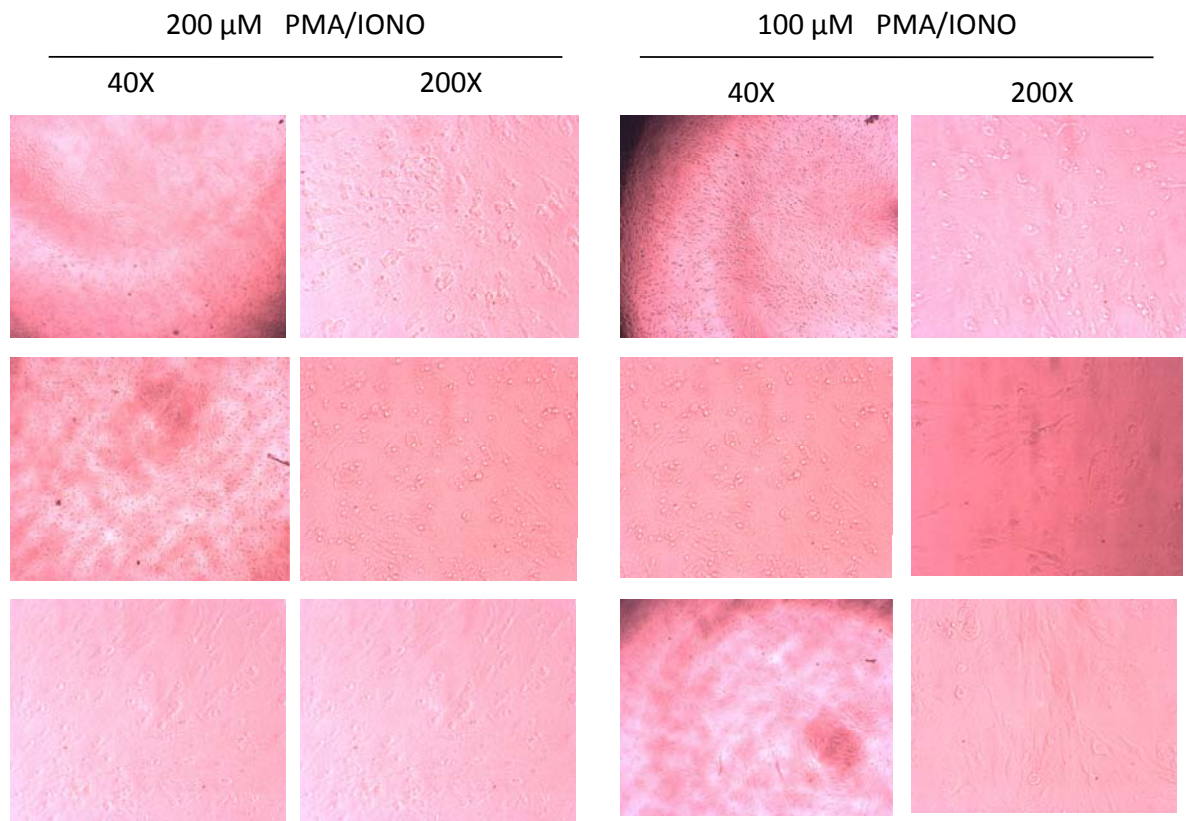


Figura 8. Cultivo de células de explante de pterigi3n . Fotografía de microscopía de contraste de fases de fases de 40x y 200x respectivamente.

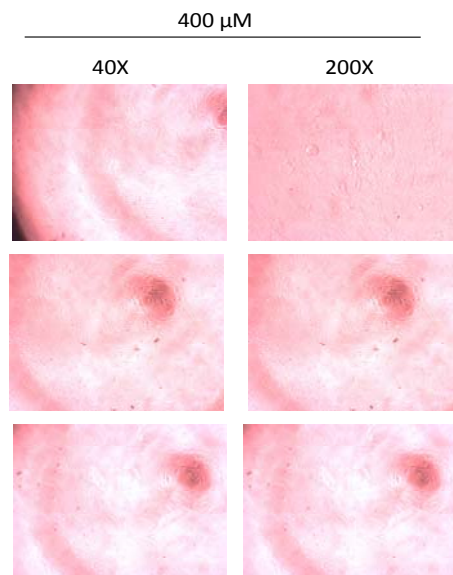


Figura9. Cultivo de células de explante de pterigi3n . Fotografía de microscopía de contraste de fases de fases de 40x v 200x respectivamente.

4. Espectrofotometría para aislamiento de RNA en células de explantes de pterigión.

MUESTRA	260	280	260/280	Cuantificación RNA µg/ml
400 A	0.189	0.102	1.85	754.4
400 B	0.358	0.202	1.77	1431.5
400C	0.200	0.126	1.58	799.4
100 PMA/IONO A	0.154	0.105	1.47	617.3
100 PMA/IONO B	0.311	0.177	1.76	1243
100 PMA/IONO C	0.311	0.177	1.76	1243
200 PMA/IONO A	0.123	0.082	1.50	490.2
200 PMA/IONO B	0.128	0.087	1.47	512.1
200 PMA/IONO C	0.190	0.119	1.60	759.6
100MM A	0.238	0.148	1.61	952.5
100MM B	0.071	0.051	1.39	283.7
100MM C	0.140	0.086	1.63	559.7
200MM A	0.103	0.060	1.72	412.8
200MM B	0.250	0.137	1.82	1001.7
200MM C	0.025	0.024	1.03	99.9
C+ A	0.072	0.051	1.41	286.3
C+ B	0.160	0.103	1.55	640.9

C+ C	0.258	0.161	1.60	1032.8
C- A	0.015	0.018	0.85	61.1
C- B	0.030	0.030	1.01	120.2
C- C	0.096	0.055	1.75	383.0

Tabla 4. Resultados de espectrofotometría para la determinación de RNA en células de explante de pterigión.

5. Medición de apoptosis y necrosis con doxiciclina en células de pterigión por medio de citometría de flujo

DOXICICLINA 200mM

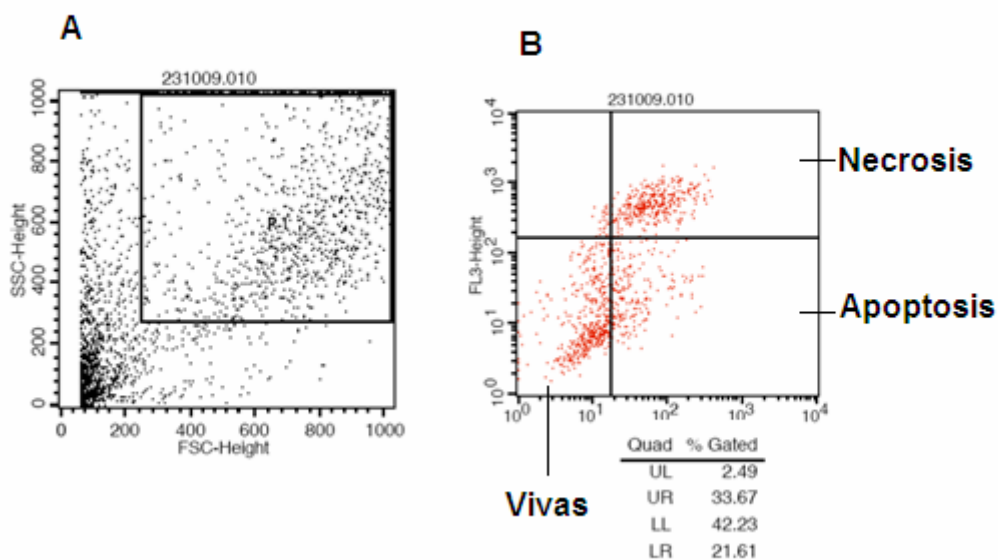


Figura 12. Citometría de flujo de células de explante de pterigión. Doxiciclina 200mM

	NECROSIS	VIABLES	APOPTOSIS
CTL	23.41	58.67	4.34
PMA/IONO	23.57	57.36	12.01
100 mM Doxi	21.18	56.43	19.57
200 mM Doxi	33.67	42.23	21.61
400 mM Doxi	41.23	16.88	41.23
100 mM Doxi + PMA/Iono	9.73	76.11	12.68
200 mM Doxi + PMA/Iono	32.09	43.66	21.64
400 mM Doxi + PMA/Iono	29.46	40.18	25

Tabla 5. Comparativo de resultados de células viables, apoptóticas y necróticas obtenidos por medio de citometría de flujo

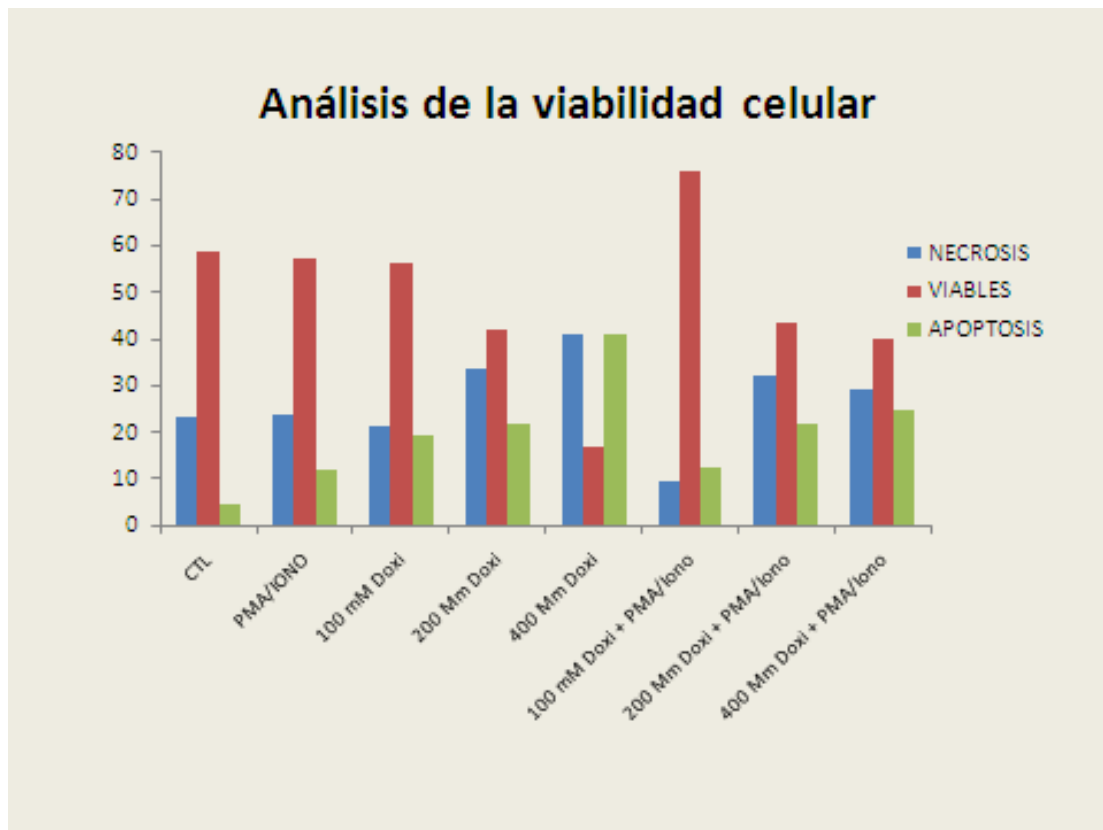


Figura 13. Gráfica comparativa de células viables, necróticas y apoptóticas obtenidas por medio de citometría de flujo.

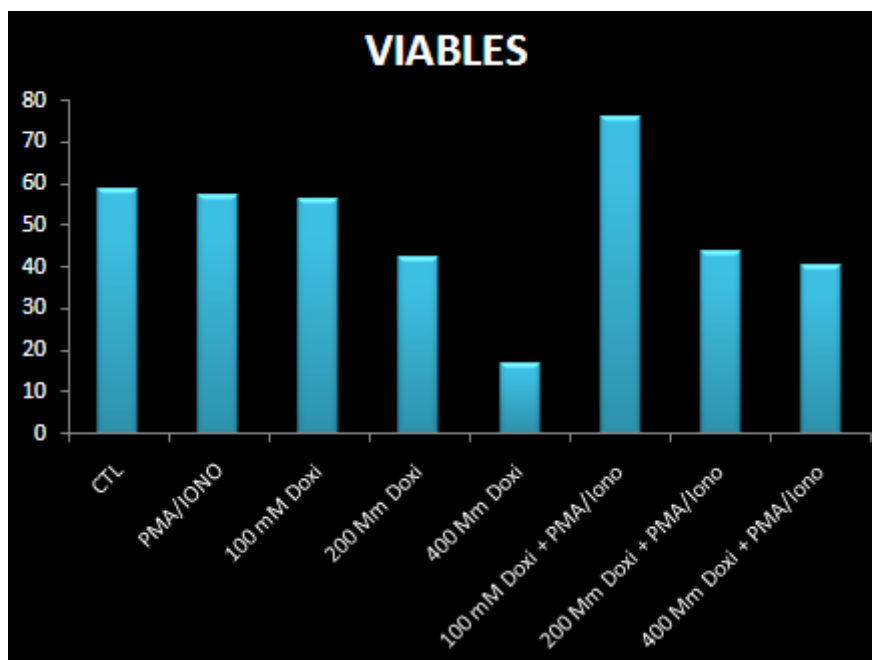


Figura 14. Gráfica comparativa de células viables obtenidas por medio de citometría de flujo.

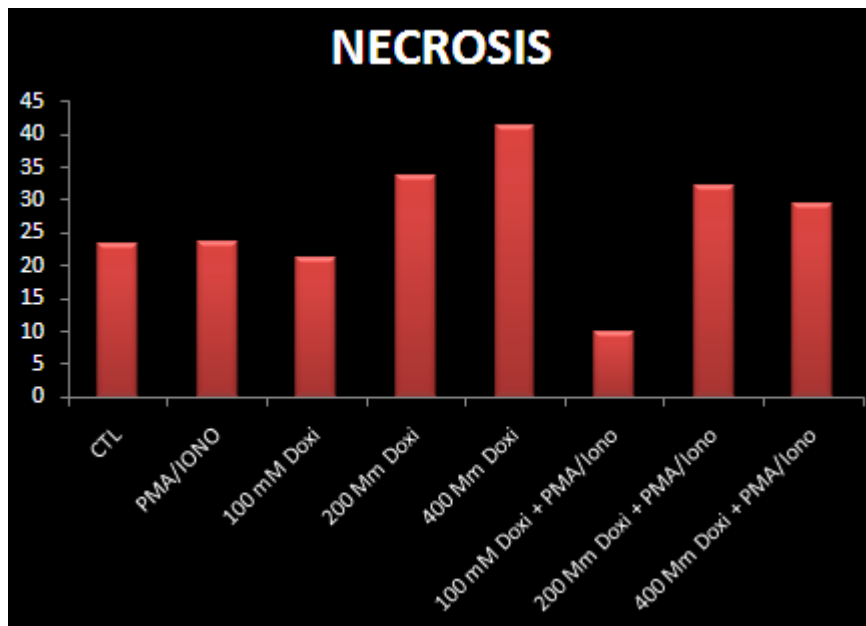


Figura 15. Gráfica comparativa de células necróticas obtenidas por medio de citometría de flujo.

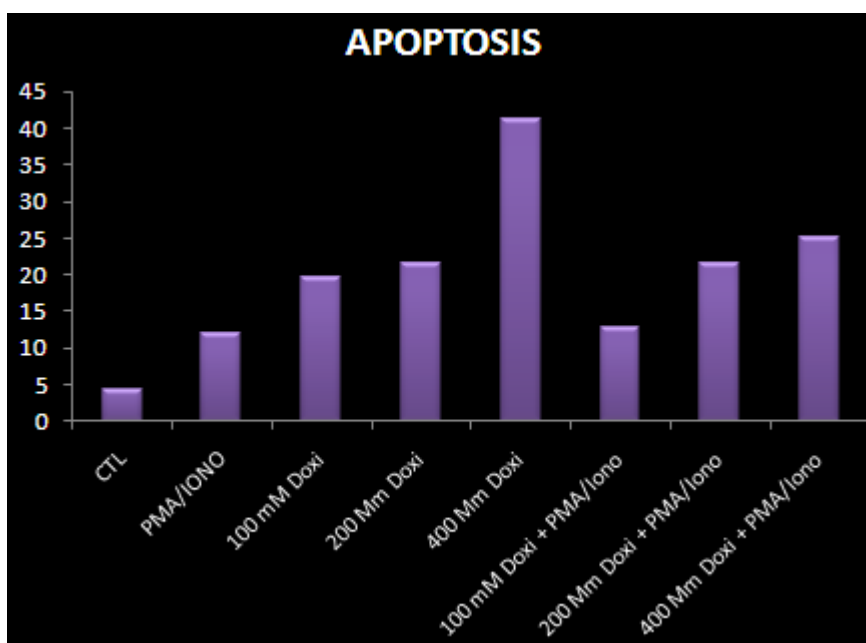


Figura 15. Gráfica comparativa de células apoptóticas obtenidas por medio de citometría de flujo.

1. Análisis de citocinas por medio de CBA

	IFN-γ	TNF-α	IL-10	IL-5	IL-4	IL-2
CTL	3.7	3.3	0	1.7	3.1	3.5
PMA/IONO	5.7	2.7	0	1.4	2.7	1.7
100 mM Doxi	14.5	4.8	4.7	2.3	7.2	5.7
200 Mm Doxi	17.2	10.1	7.9	3.9	8.5	7.6
400 Mm Doxi	41.7	16.2	25.0	6.8	24.3	16.0
100 mM Doxi + PMA/Iono	3.5	0	0	0	0	0
200 Mm Doxi + PMA/Iono	16.9	7.7	8.0	2.9	6.7	5.9
400 Mm Doxi + PMA/Iono	38.3	17.6	21.7	6.8	23.4	15.0

Tabla 6. Comparativo de citocinas por medio de CBA. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

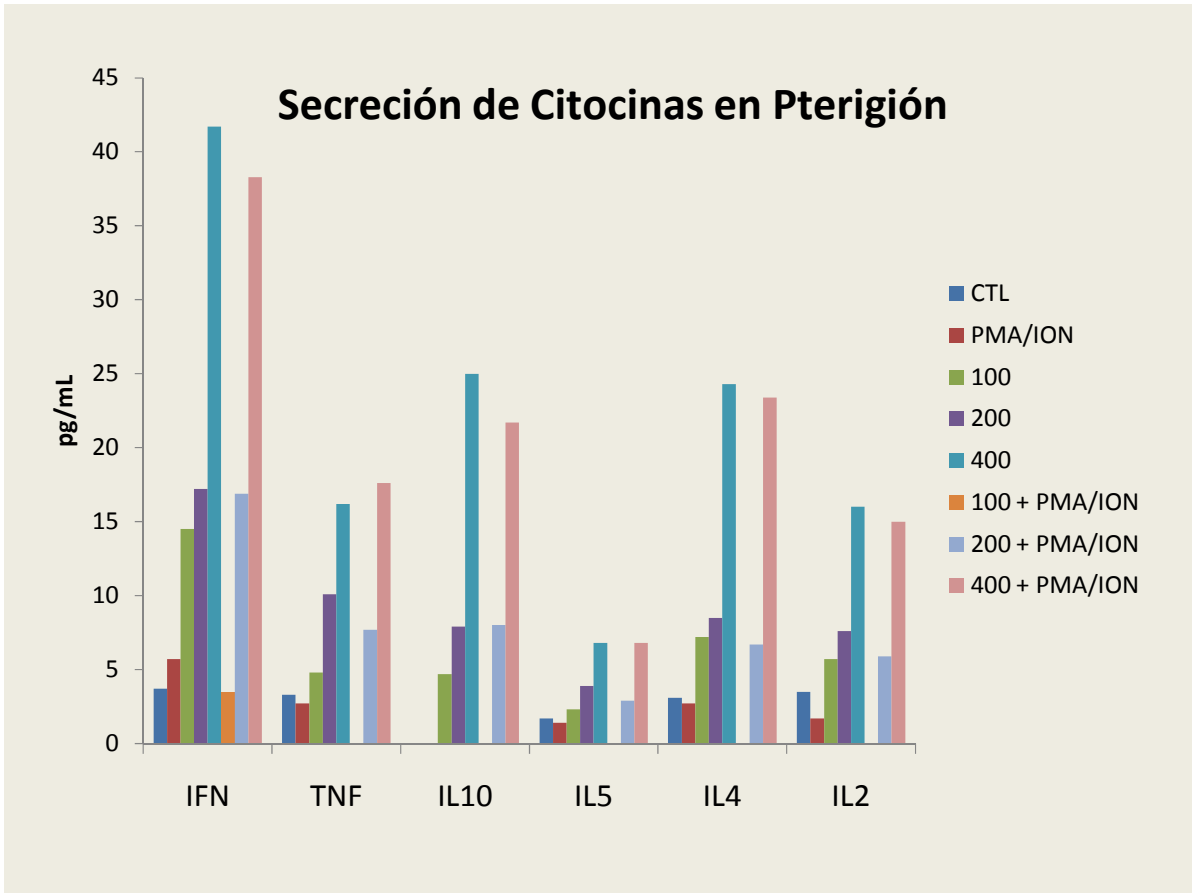


Figura 17. Gráfica de CBA de citocinas proinflamatorias. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

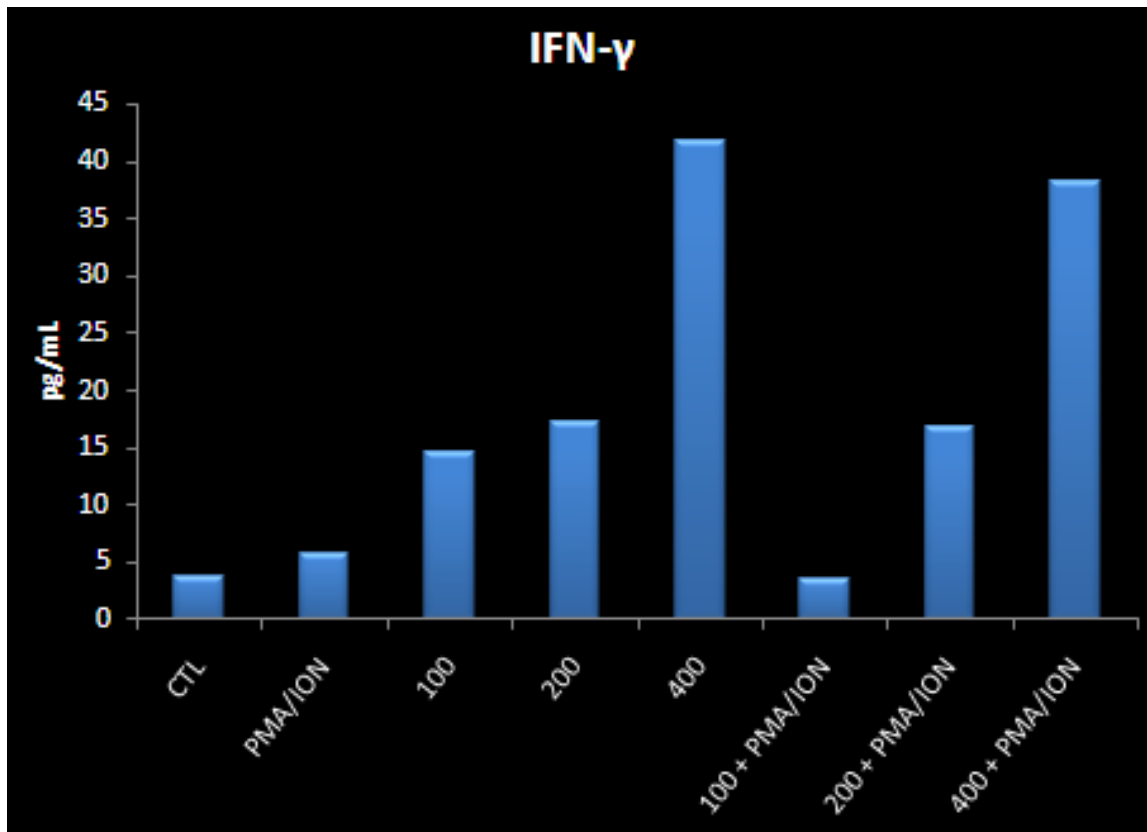


Figura 18. Gráfica de CBA de INF- γ . Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

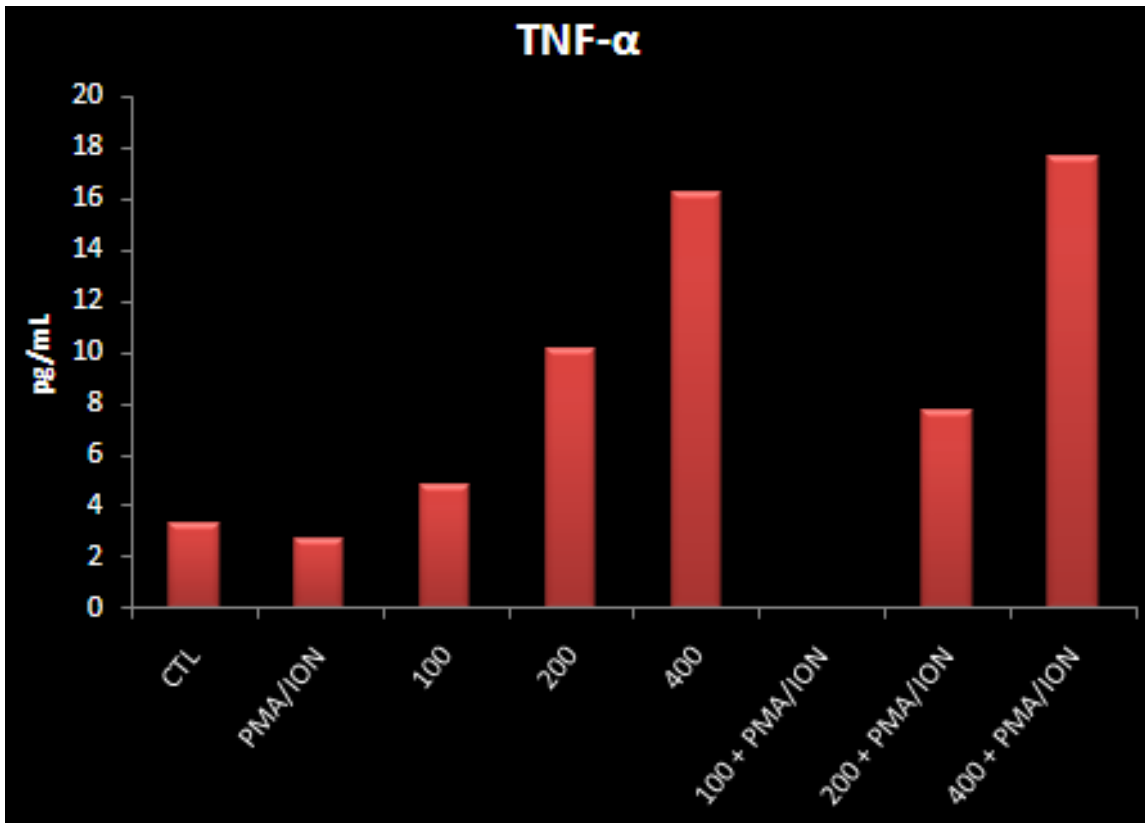


Figura 19. Gráfica de CBA de TNF- α . Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

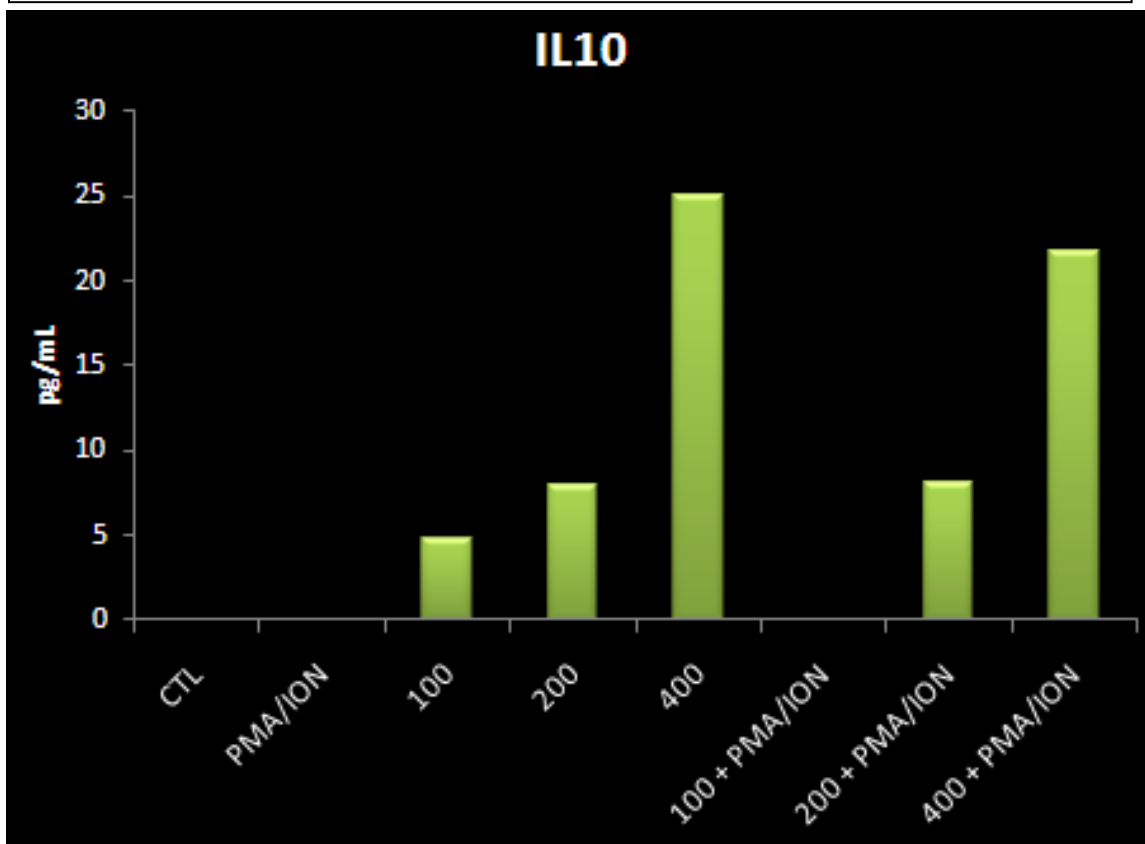


Figura 20. Gráfica de CBA de IL-10. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

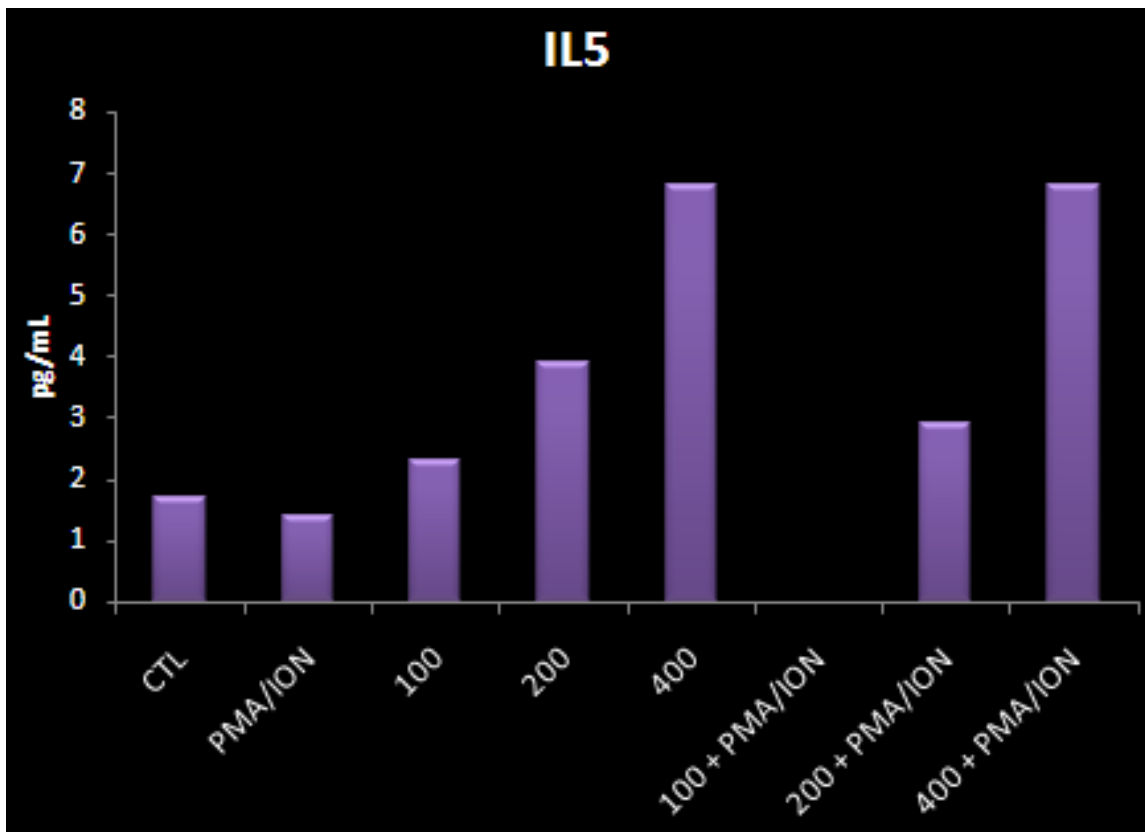


Figura 21. Gráfica de CBA de IL-5. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

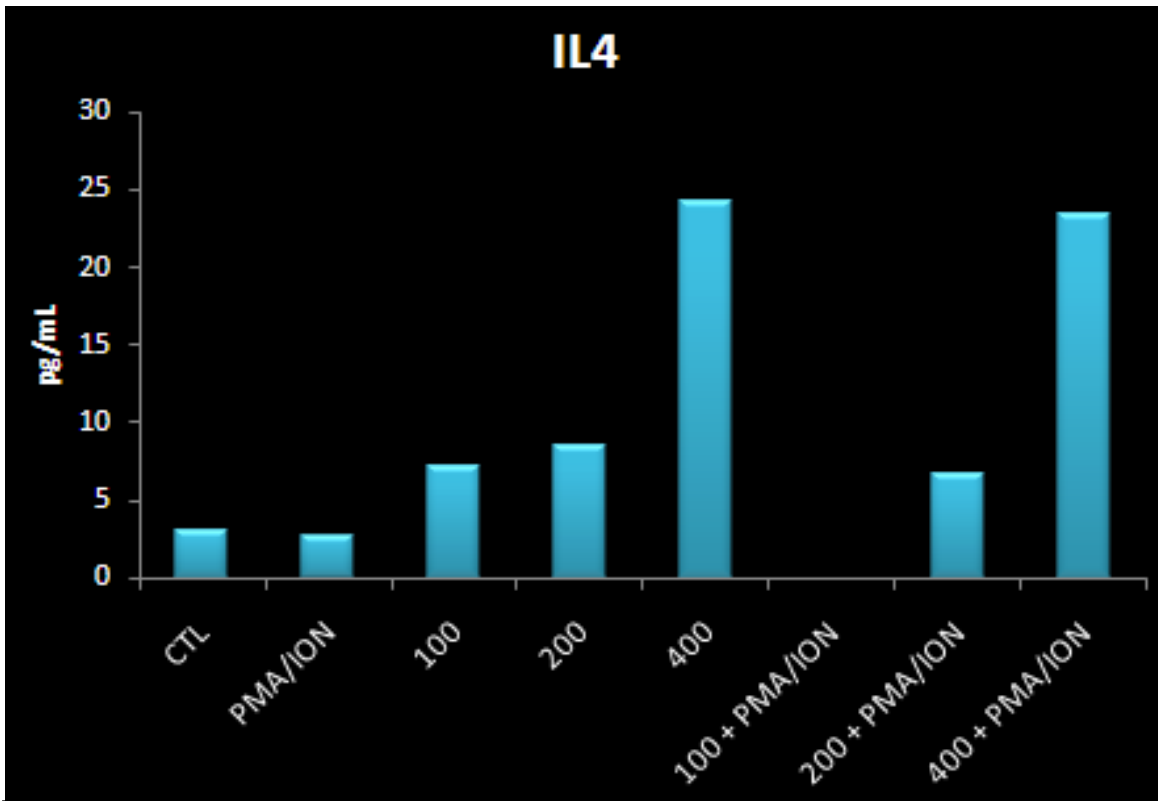


Figura 22. Gráfica de CBA de IL-4. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

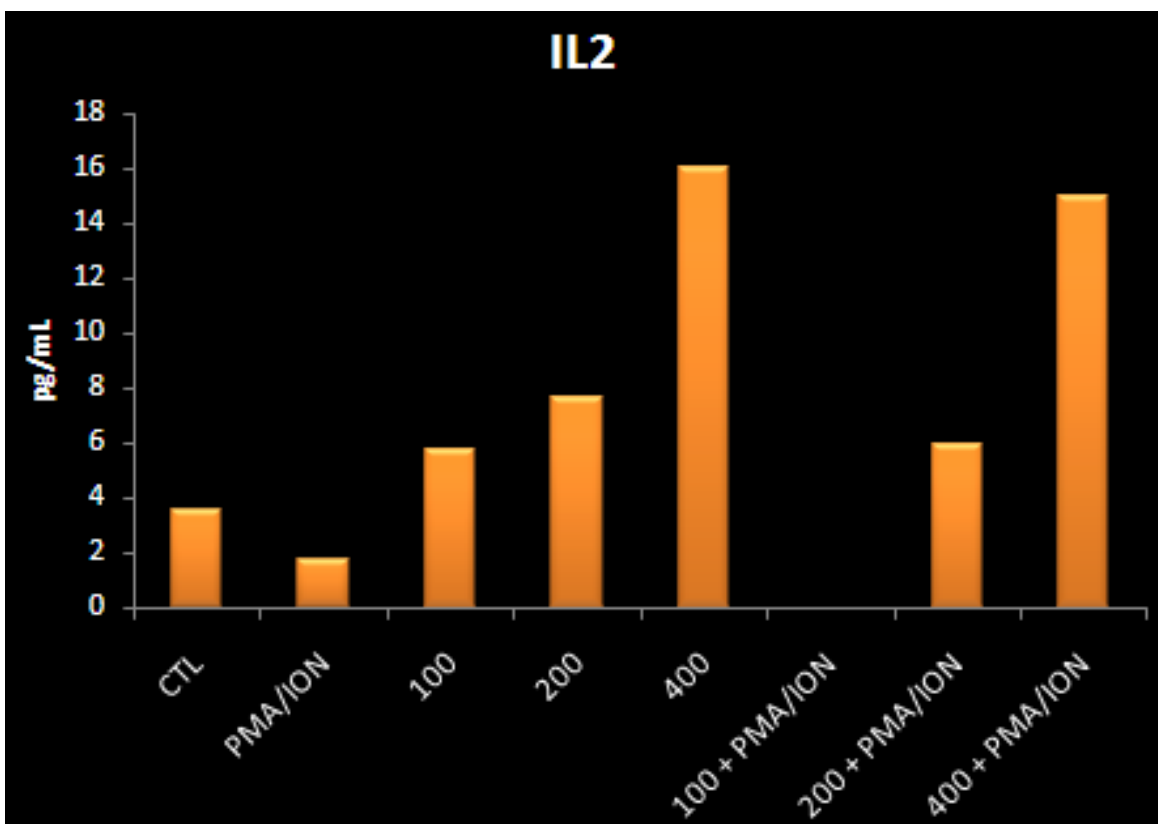


Figura 23. Gráfica de CBA de IL-2. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

7. Medición de proteínas apoptóticas en células derivadas de explantes de pterigión:

	Bax	Bcl-2	Bcl-x
CTL	17.23	99.22	15.13
PMA/IONO	6.71	96.84	8.13
100 mM Doxi	6.30	99.07	4.39
200 Mm Doxi	20.36	99.20	15.99
400 Mm Doxi	62.31	81.18	26.44
100 mM Doxi + PMA/Iono	6.56	93.86	77.69
200 Mm Doxi + PMA/Iono	12.56	95.12	10.99
400 Mm Doxi + PMA/Iono	10.45	92.69	13.24

Tabla 7. Comparativo de proteínas apoptóticas. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

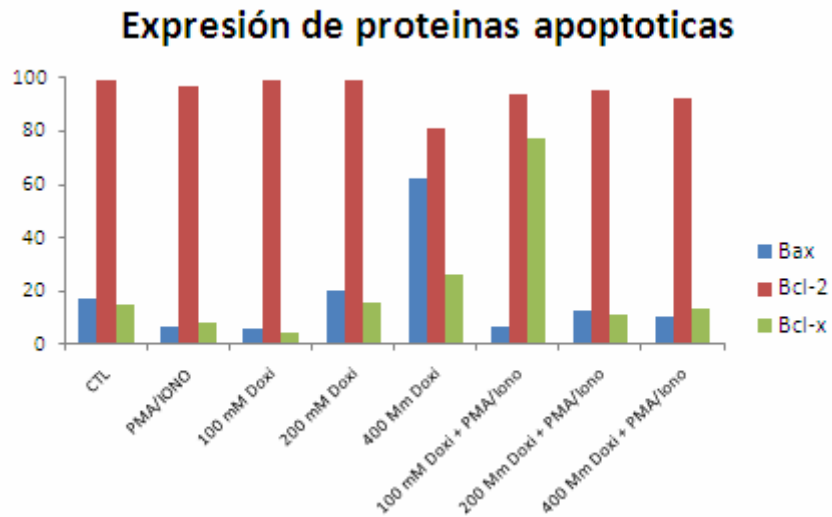


Figura 24. Gráfica de comparación de la expresión de proteínas apoptóticas. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

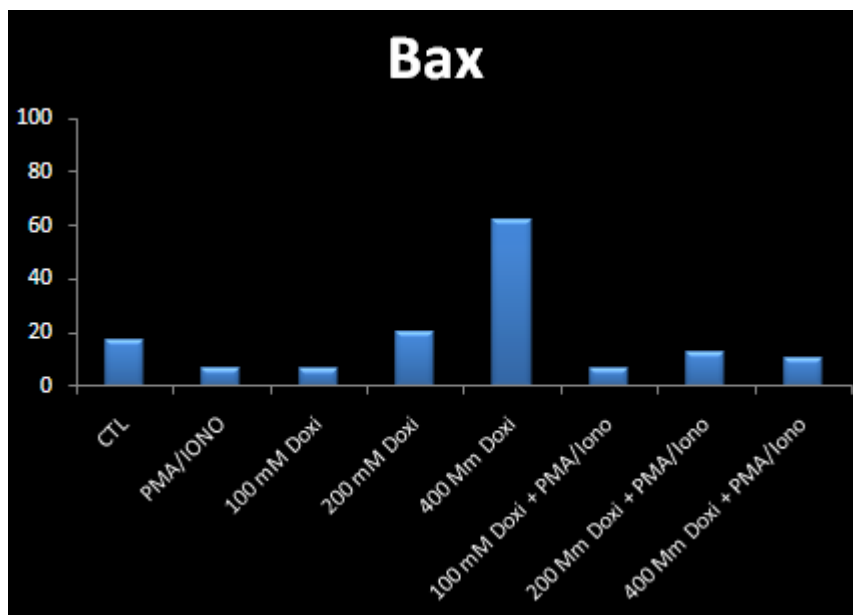


Figura 25. Gráfica de comparación de la expresión de proteínas apoptótica bax. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

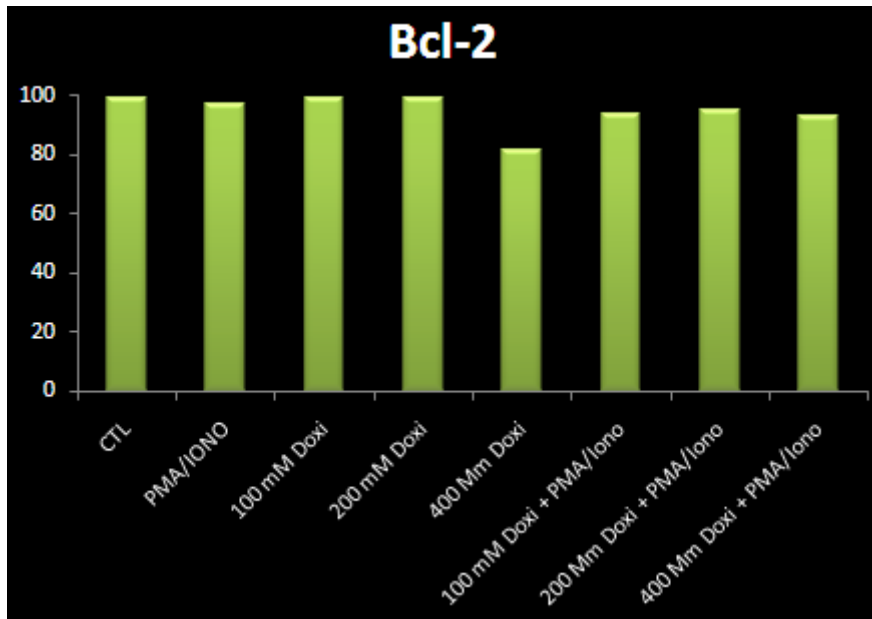


Figura 26. Gráfica de comparación de la expresión de proteínas apoptótica bcl-2. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

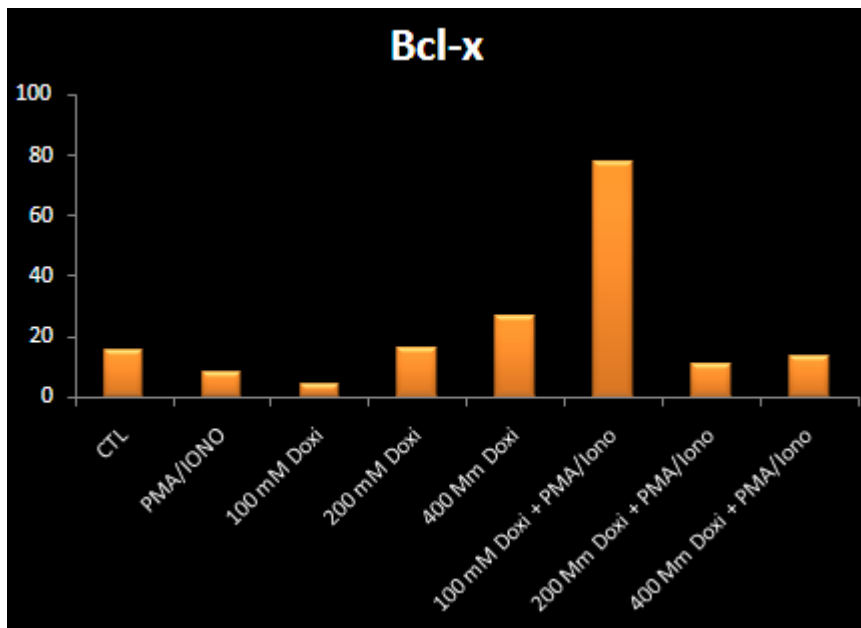


Figura 27. Gráfica de comparación de la expresión de proteínas apoptótica bcl-x. Resultados obtenidos por medio de citometría de flujo.

DISCUSIÓN

Apoptosis y Necrosis

Se observa que con células tratadas con PMA/Ion aumenta la necrosis, cuando se le agrega doxiciclina aumenta la cantidad de células que mueren por apoptosis. De tal manera que en la concentración de 400mM Doxiciclina, cantidades muy similares se van hacia la necrosis y hacia la apoptosis. Sin embargo, en presencia de estímulo inflamatorio (PMA/Ion), la doxiciclina tiene un efecto protector al disminuir la cantidad de muerte celular ya sea por necrosis o por apoptosis incluso en concentración de 400 mM Doxi + PMA/Iono.

Interleucinas

Como es sabido la acción de los **interferones** necesita de dos vías conocidas como tirosina cinasa JAK y proteínas STAT. Todos los componentes esenciales pre-existen no activados dentro de las células. Los receptores de INF se unen a las tirosinas cinasas JAK en el citoplasma (JAK1 y Tyk2 se asocian con ambas cadenas de INF- α/β , y JAK1 y JAK2 con las cadenas del receptor INF γ). La consecuencia más importante en la activación de JAK-cinasas es la fosforilación de tirosina y la activación resultante del dominio SH-2 que contiene proteínas STAT. (INF- α/β activa STAT1 y STAT2, INF γ sólo STAT1). Las proteínas STAT activadas forman homo- o hetero- complejos que migran hacia el núcleo, se unen a secuencias de reconocimiento en las

regiones de genes inducible- interferón, de éste modo se activa su transcripción.

La **IL-2** se une a un receptor compuesto de tres cadenas, de las cuales la β y la γ , generan señales. En una manera similar a los receptores de INF, dos cinasas JAK, JAK1 y JAK3, asociadas con las cadenas de señalización de IL-2 producen la activación de dos proteínas STAT (STAT3 y STAT5). Sin embargo, vías de señalización adicional son rápidamente activadas por el receptor de IL-2, incluyendo las tirosinas cinasas Syk y p56lck. La activación del receptor IL-2 también resulta en la activación de la vía de fosfatidilinositol-3 (PI-3) cinasa. Finalmente existe evidencia que la activación del receptor de IL-2 también lleva a la activación de la vía de la proteína activada-mitogena Ras-dependiente (MAP) cinasa.

Miembros de la familia de receptores de **TNF** utilizan diferentes vías que la Clase I y II. No utilizan la vía JAK-STAT. En cambio, incluyen a las proteínas de señalización que se unen a los “dominios de muerte” (TNF asociada a proteína de dominio de muerte (TRADD)), Fas asociada a proteína de dominio de muerte (FADD)/MORT1, y a proteína de interacción con receptor (RIP), así como otras que se asocian con diferentes dominios (factores de receptor-asociados con TNF (TRAFs). El dominio de muerte inicia eventos que llevan hacia la apoptosis.

A su vez se observó el antagonismo existente entre IL-4 e INF- γ . Descrito ya por primera vez por Snapper et al. ⁽³³⁾

Se encontró una mayor concentración de INF- γ con respecto a TNF- α sin embargo se han descrito diversas vías en las cuáles INF- γ Y tnf- α actúan juntos. Por ejemplo, Lee et al. ⁽²³⁾; Fransen et al. ⁽²⁴⁾, quienes describieron que INF- γ potencializaba el efecto citotóxico de TNF- α en células tumorales, Lu et al. describieron éste sinergismo en el aumento de la producción de CSF-1 y G-CSF por monocitos y linfocitos, Trinchieri et al. ⁽²⁶⁾ en la diferenciación de células mieloides y Ding et al. ⁽²²⁾ en la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos.

En el presente estudio observamos las diferencias existentes en las formas de interacción de las citocinas. Se observó que la IL-2 aumentaba entre mayor era el aumento que presentaban INF- γ y TNF- α . Lo cuál coincide con Kamijo et al. ⁽²⁷⁾ quienes describieron que TNF induce la producción de IL-1, IL-2 e IL-6.

A su vez, encontramos la disminución de TNF- α respecto a la IL-4 ya que como describieron Hart et al. ⁽²⁸⁾ ésta última es inhibitoria de TNF- α .

Proteínas apoptóticas

Nuestro estudio demuestra que a mayores concentraciones de doxiciclina mayor es la cantidad de proteína pro-apoptótica (Bax), sin embargo observamos una cantidad relativamente constante en la proteína anti-apoptótica Bcl-2, en comparación con la proteína anti-apoptótica Bcl-x, la cuál también disminuye.

De Angelis et al. ⁽³²⁾ describieron el incremento de Bcl-2 en carcinoma colorectal en comparación con tejido de mucosa normal, así como la expresión reducida de Bax en cánceres primarios de mama.

CONCLUSIÓN.

En éste estudio se observó la reducción de la viabilidad de células de pterigión en comparación con células no estimuladas. Los resultados sugieren que la doxiciclina aumenta las citocinas analizadas. Interesantemente, se observó que la doxiciclina disminuye Bax y Bcl-x y que no produce ningún efecto en la expresión de Bcl-2. La doxiciclina podría ser una herramienta terapéutica importante ya que interviene en las citocinas involucradas en la patogénesis del pterigión. Las estrategias del tratamiento se deben dirigir hacia la restauración de la apoptosis celular ⁽¹⁹⁾.

Tomando en cuenta éstos resultados sugieren que la doxiciclina tiene un efecto positivo en la apoptosis de los fibroblastos de pterigión. Por otro lado, éste fármaco induce la secreción de TNF α , la cuál es una citocina proinflamatoria involucrada con la muerte celular, el aumento de ésta molécula puede parcialmente explicar el fenómeno apoptótico inducido por la doxiciclina. En conclusión, ésta tetraciclina es una terapia alternativa para el tratamiento tanto para el pterigión primario como para el pterigión recidivante.

Bibliografía

1. Austin P, Jakobiec FA, Iwamoto T. **Elastodysplasia and elastodystrophy as the pathogenic bases of ocular pterygia and pinguecula.** *Ophthalmology* 1983;90:96–109.
2. Tan D, Chee S-P, Dear K, et al. **Effect of pterygium morphology on pterygium recurrence in a controlled trial comparing conjunctival autografting with bare sclera excision.** *Arch Ophthalmol* 1997;115:1235–40.
3. Jose Luis Franco. Instituto Nacional de Investigaciones del Genoma Humano.
4. Sorsa T, Lindy O, Kontinen YT, Soumalainen K, Ingman T, Saari H, et al. (1993). **Doxycycline in the protection of serum-alfa-1 antitrypsin from human neutrophil collagenase and gellatinase.** *Antimicrob Agents Chemother* 37:592-594.
5. Egeblad y Werb. **Nature Reviews Cancer.** 2002;163-176
6. Iruela-Arispe y cols., 2003 *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 995, 183-1907. Gueders y cols., 2005 *J. Immunol.* 175 (4), 2589-2597
8. J.C. BOHÓRQUEZ-SIERRA. **Metaloproteinasas de matriz; implicación en enfermedades vasculares periféricas .** *Angiología* 2006; 58 (4): 269-277.
9. X Mira, M.A Vazquez, et al. **Estudio de la viabilidad, apoptosis y necrosis en células epiteliales conjuntivales cultivadas in Vitro tratadas con doxiciclina.** 2008.
10. A Tohuami, M A Di Pascuale, T Kawatika, R H Rosa Jr, S Dubovy, S C G Tseng. **Characterisation of Myofibroblasts in fibrovascular Tissues of Primary and recurrent pterygia.** *Br J Ophthalmology* 2005 ;89:269-274.

11. Oldenburg JB, Garbus J, McDonnell JM, et al. **Conjunctival Pterygia Mechanism of corneal topographic changes.** *Cornea* 1990;9:200-4.
12. Cristina Maxia, Maria Teresa Parra, Paolo Demurtas, Daniela Murtas, Franca Piras. **Relationship between the expression of cyclooxygenase-2 and survivin in primary pterygium.** *Molecular Vision* 2009;15:458-463.
13. Bickers DR, Athar M. **Oxidative stress in the pathogenesis of skin disease.** *J invest Dermatol* 2006;126:2565-75.
14. Herschman HR. **Prostaglandin Synthase 2.** *Biochim Biophys Acta* 1996;1299:125-40.
15. Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. **Inhibition of cyclooxygenase-2 gene expression by p53.** *J Biol Chem* 1999;274:10911-5.
16. Koki AT, Khan NK, Woerner BM, Seibert K, Harmon JL, Dannenberg AJ, Soslow RA, Masferrer JL. **Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers.** *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66:13-8.
17. Aziz MH, Ghotra AS, Shukla Y, Ahmad N. **Ultraviolet –B radiation causes an upregulation of survivin in human keratinocytes and mouse skin.** *Photochem Photobiol* 2004;80:602-8.
18. Sagoonwatanyoo P, Tan D, Smith DR. **Expression of p63 in pterygium and normal conjunctiva.** *Cornea* 2004;23:1.

19. Tan D, Tnng WY, Liu YP, Goh HS, Smith D. **Apoptosis and apoptosis related gene expression in normal conjunctiva and pterygium.** Br J Ophthalmol 2000;84:212-316.
20. Smith V A, Cook S A. **Doxycycline- a role in ocular surface repair.** Br J Ophthalmol 2004;88:619-625.[doi:10.1136/bjo.2003.025551]
21. Son K et al. **Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells.** Anticancer Res. 2009.29(10):3995-4003.
22. Ding, A.H., Nathan, C.F. and Stuehr,D.J. (1988). **Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production.**J. Immunol.141,2407-2412.
23. Lee, S.H., Aggarwall,B.B., Rinderknetch, E., Assisi,F., and Chiu, H. (1984). **The synergistic anti-proliferative effect of gamma- interferon and human limphotoxin.** J. Immunol.133, 1083-1086.
24. Fransen, L., Van Der Heyden, J.,Ruyschaert, R., and Fiers,W.(1986). **Recombinant tumor necrosis factor: its effect and its synergism with interferon- γ on a variety of normal and transformed human cell lines.** Eur. J. Cancer Clin. Oncol. 22, 419-426.
25. Lu, L., Walker, D., Graham,C.D.,Waheed, A., Shaddock,R.K., and Broxmeyer, H.E. (1988). **Enhancement of release from MHC class II antigen-positive monocytes of hematopoietic colony stimulating factors CSF-1 and G-CSF by recombinant human tumor necrosis factor- α : synergism with recombinant human interferon- γ .** Blood 72,34-41.
26. Trinchieri,G., Kobayashi, M., Rosen, M., Loudon, R., Murphy, M., and Perussia, B., (1986). **Tumor necrosis factor and limphotoxin induce differentiation of human myeloid cell lines in synergy with immune interferon.** J.Exp.Med. 164, 1206-1225.

27. Kamijo,R., Le, J., Shapiro, D., Havel,E.A., Huang, S., Arguet, M., Bosland, M. and Vilcek,J. (1993). **Mice that lack interferon- γ receptor have profoundly altered responses to infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide.** J.Exp.Med.178, 1435-1440.

28. Hart,P.H., Vitti, G.F., Burguess, D.R., Whitty, G.A., Piccoli, D.S. and Hamilton, J.A. (1989). **Potential anti-inflammatory effects of interleukin-4: suppression of human monocyte tumor necrosis factor alpha, interleukin-1, and prostaglandin-E2.** Proc. Natl. Acad.Sci. U.S.A. 86, 3803-3807.

29. Cohen, S., Bigazzi, P.E., and Yoshida, T.,(1974). **Commentary.Similarities of T cell function in cell- mediated immunity and antibody production.** Cell.Immunol. 12, 150-159.

30. Aarden,L.A., Brunner, T.K., Cerottini,J-C. et al.(1979). **Revised nomenclature for antigen-nonspecific T cell proliferation and helper factors.** J. Immunol.123, 2928-2929.

31. Thomson Angus. **The cytokine Handbook.** Third edition. Academic Press. P 1-35.

32. De Angelis, P M; Stokke, T; Thorstensen, L; Lothe, R A; Clausen, O P F. **Apoptosis and expression of Bax, Bcl-x, and Bcl-2 apoptotic regulatory proteins in colorectal carcinomas, and associations with p53 genotype/phenotype.** Molecular Pathology. 51(5):254-261, October 1998.

33. Snapper,C.M.,Finkelman, F.D.,and Paul, W.E., (1988). **Regulation of IgG₁ and IgE production of interleukin4.** Immunol. Rev. 102, 51-75.