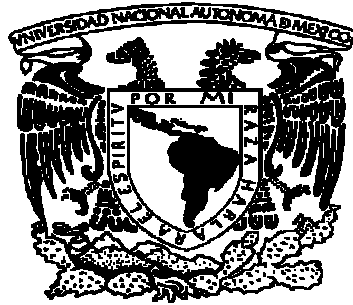


UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Asociación Para Evitar la Ceguera en México, I.A.P

“Hospital Dr. Luis Sánchez Bulnes”



Tesis de posgrado para obtener el título de especialidad en:

OFTALMOLOGÍA

“Aplicación tópica de la Epigallocatequina 3- Galato como una nueva alternativa terapéutica para la neovascularización corneal”

Presentado por:

Dra. Lorena Gutiérrez Sánchez

México D.F. 2011



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.

AGRADECIMIENTOS

A Dios:

Por haberme bendecido siempre en mí camino.

A mis tres Padres:

Por el amor y el apoyo incondicional que han dado a mi vida.

A Víctor:

Por su invaluable ayuda siempre.

A Javier Flores-Estrada, Dr. Abelardo A. Rodríguez-Reyes, Dra. Dolores Ríos y Valles-Valles, Dra. Sonia Corredor- Casas

Por ayudarme y guiarme en la realización de este trabajo.

ÍNDICE

Introducción.....	1
Antecedentes.....	2
Justificación.....	3
Problema.....	4
Objetivo.....	5
Material y métodos.....	6
Resultados.....	8
Análisis.....	12
Conclusión.....	13
Bibliografía.....	14

INTRODUCCIÓN

La neovascularización corneal es el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos en la córnea, acompañado de respuestas inflamatorias y pérdida del privilegio inmunológico. Varias modalidades de tratamientos han sido utilizadas; sin embargo existen algunas limitaciones asociadas a estos tratamientos. La epigallocatequina 3-galato es un flavonoide antioxidante del té verde (*Camellia sinensis*), que ha sido estudiada como tratamiento potente para una variedad de tratamientos asociados a cáncer y a enfermedades degenerativas.

La EGCG dosis dependiente suprime una amplia variedad de citocinas inflamatorias y angiogénicas (NF- κ B, IL-1, COX2, VEGF, y MMP2 – 9), similar a las citocinas que se ven envueltas en la neovascularización corneal. Su margen amplio de seguridad, su uso como tratamiento crónico y su gran solubilidad en agua, lo hacen un fármaco ideal para ser estudiado. Hemos propuesto que el uso tópico de EGCG en un modelo animal puede ser un nuevo y excelente tratamiento para la supresión de la neovascularización corneal.

ANTECEDENTES

La neovascularización corneal es un proceso de desarrollo vascular caracterizado por el crecimiento de los vasos sanguíneos originados del limbo, la cual toma una serie de eventos que incluye la reorganización, degradación de la matriz extracelular, proliferación y migración de células endoteliales. La neovascularización corneal es comúnmente asociada a queratitis infecciosas, traumas, isquemia y a enfermedades degenerativas. Existen diferentes mediadores inflamatorios y angiogénicos importantes para la neovascularización corneal como son el factor de crecimiento vascular endotelial (del inglés: VEGF), las metaloproteinasas (MMP-2 y MMP-9), la interleucina1(IL-1), el factor nuclear kappa B (NF-B) y COX2 (Ciclooxygenasa-2) (1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14).

La actividad neovascular ejercida por estos factores ha permitido el desarrollo de nuevos fármacos inhibidores de la angiogénesis e inflamación. En la búsqueda de fármacos para inhibir el proceso de neovascularización corneal se han realizado una búsqueda de nuevos factores anti-angiogénicos; Algunos de ellos han usado el antioxidante epigallocatequina 3-galato (EGCG), el cual es un flavonoide producido por el metabolismo secundario de la planta del té verde “camelia sinesis” por sus propiedades antioxidantes, antiproliferativas, antiangiogénicas, antimetastásicas y antiinflamatorias la hacen un blanco de estudio. (15, 16, 17, 18). La actividad antiinflamatoria del té verde y de EGCG presenta un papel importante en la quimioprevención del desarrollo de enfermedades neoplásicas y en enfermedades cardiovasculares.(19, 20, 21, 22).

El mecanismo de acción por el cual la EGCG pudiera suprimir la neovascularización corneal está basado en estudios *in vivo* e *in vitro*. El consumo oral de té verde y sus constituyentes purificados como EGCG inhiben el desarrollo y progresión del cáncer sin afectar a las células normales, asociado con una disminución en la activación de varios tipos de receptores tirosina-cinasas incluyendo el sistema VEGF/VEGFR (22, 23, 24, 25). Además, hay evidencia que la EGCG inhibe la actividad transcripcional de NF-kB, causando inhibición de otros mediadores pro-inflamatorios y pro-angiogénicos como IL-6, TNF a, IL1B, VEGF, MMPs-2 y 9 (26, 27, 28, 29, 30). Por lo tanto, Esto sugiere que EGCG sea considerado como un potente candidato natural que influye en la inhibición de varios tipos de mecanismos producidos durante la inflamación y en angiogénesis similares a los mecanismos producidos en la neovascularización corneal.

A pesar de los datos favorables que apoyan las virtudes del té verde en la dieta y de sus polifenoles, algunos investigadores han reportado factores pro-oxidantes y genotóxicos del EGCG en su uso a altas concentraciones catalizando la formación de peróxido de hidrógeno, sin embargo, muchos reportes han demostrado la seguridad del EGCG en pequeñas concentraciones a rangos micromolares. (42, 43, 44). Esto muestra que EGCG puede tener un gran potencial en el tratamiento de la neovascularización corneal, pero poco se conoce de sus efectos adversos. Por lo anterior, este trabajo propone que el EGCG puede ser un buen candidato para la neovascularización e inflamación corneal, su aplicación ayudaría a prevenir la pérdida de la agudeza visual e inflamación corneal.

JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas de disminución de agudeza visual o ceguera es la degeneración u opacidad de la cornea que afectan a la población mexicana en riesgo a las infecciones herpéticas, traumáticas, isquémicas y degenerativas. La relación de estas enfermedades es el inicio de los procesos inflamatorios y el desarrollo de una neovascularización corneal.

Varias modalidades de tratamientos han sido utilizadas; sin embargo existen algunas limitaciones y complicaciones asociadas. La epigalocatequina 3-galato ha sido estudiada como tratamiento anticarcinogénico y antiinflamatorio en enfermedades degenerativas.

Para demostrar el efecto tópico de EGCG, proponemos realizar un estudio en un modelo animal con inflamación corneal. El desarrollo metodológico de esta propuesta es sencilla, barata, y no requiere de equipo sofisticado de nueva adquisición. Los datos resultantes de esta propuesta servirían para la formación de una línea de investigación la cual demostraría si EGCG puede ser usado vía tópica como un agente antiinflamatorio y antiangiogénico sin efectos tóxicos en corneas de pacientes por las diversas patologías que comprometen su privilegio inmune.

PROBLEMA

¿ Puede la aplicación tópica de la EGCG ser una nueva alternativa terapéutica para la neovascularización e inflamación córnea?

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar el efecto anti-angiogénico de EGCG aplicado vía tópica sobre las corneas neovascularizadas de un modelo de inflamación corneal.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer en conejos un modelo de inflamación corneal inducida por quemadura con álcali.
2. Demostrar el efecto antiangiogénico de EGCG a diferentes dosis sobre las córneas inflamadas.

MATERIAL Y MÉTODO

MATERIALES

Se utilizó el ojo derecho (OD) de 30 Conejos albinos sanos machos de la raza Nueva Zelanda con un peso corporal de 2.5 a 3 kg, su manejo se realizó según las normas NOM-062-ZOO-1999, NOM-087-ECOL-94 y los estatutos de ARVO (Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research), los conejos fueron anestesiados vía intramuscular con ketamina.

Los 30 conejos se dividieron en 5 grupos y cada grupo era de 6 conejos. Los grupos fueron divididos de la siguiente forma: Grupo 1 (quemados y sin EGCG), Grupo 2 (no quemados y sin EGCG), Grupo 3 (quemados y con EGCG a dosis de 25mg/ml), Grupo 4 (quemados y con EGCG a dosis de 10mg/ml), Grupo 5 (quemados y con EGCG a dosis de 1mg/ml).

INFLAMACIÓN CORNEAL Y ADMINISTRACIÓN TÓPICA DE EGCG

Para la inducción de la neovascularización corneal, se realizó en el ojo derecho una quemadura a 2mm del limbo usando un papel filtro de 3mm de diámetro, empapado con NaOH al 1N. La quemadura se realizó por 30 segundos e inmediatamente se lavó con agua durante un minuto, 24 horas después se aplicó vía tópica las diferentes dosis de EGCG a los diferentes grupos mencionados, el EGCG se aplicó cada 4 horas por 7 días. Al octavo día los animales fueron sacrificados.

ANÁLISIS DE LA INFLAMACIÓN CORNEAL

El grado de inflamación corneal se clasificó de acuerdo a la opacidad dentro de la región quemada en los 3mm de diámetro tratado con NaOH. El criterio para determinar el grado de inflamación se realizó por el médico especialista en cornea: (-) sin cambios en la opacidad de la cornea, considerando los hallazgos del grupo control normal; leve (+) con discretos cambios de coloración de cornea; moderado (++) con severos cambios de coloración; grave (+++) con severa opacidad de la cornea similar a la encontrada en el grupo de corneas quemadas y tratadas con SSB. Los hallazgos inflamatorios encontrados se registraron por las imágenes capturadas en microscopio microquirúrgico adaptado a una cámara digital.

VALORACIÓN DE LA NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL

La longitud y Densidad de los vasos desarrollados: La neovascularización corneal será examinada con las imágenes capturadas del microscopio quirúrgico. La longitud y el número de neovasos serán fotografiadas con una cámara digital la cual estará conectada a un microscopio quirúrgico. Las imágenes serán archivadas en una tarjeta de memoria con una extensión *.jpg. El área de neovascularización será cuantificada con un software obtenido gratuitamente de NIH Image software. La longitud de los neovasos será expresada en milímetros determinado por captura de imagen y transferidos al programa

corel draw 9. En los cortes histológicos de las corneas (realizados a 1.5 mm desde el limbo) se cuantificará el número de vasos presentes en campos de gran aumento (40X) y comparados con el grupo control normal. Posteriormente se calculará la media y desviación estándar y el error estándar para realizar una prueba de χ^2 con una $p=0.05$. El análisis se realizará en doble ciego y el área de neovascularización será expresado como el porcentaje del área total de la cornea neovascularizada.

ANÁLISIS HISTOPALÓGICO

Posterior a la enucleación, el globo ocular fue fijado en formalina neutra al 10%. Se realizaron cortes antero-posterior en sentido vertical, los cortes fueron deshidratado en alcoholes graduales del 60 al absoluto y posteriormente el ojo quedó incluido en parafina. Se realizaron cortes seriados de 4mm de espesor, se desparafinó y se tiñó con hematoxilina-eosina. Los hallazgos morfológicos de daño celular (necrosis) **serán evaluados por microscopía de luz de acuerdo a los siguientes criterios estándar: degeneración hidrópica, apoptosis celular, mitosis (35).**

ENSAYO DE T.U.N.E.L (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-Mediated dUTP-nick endlabeling)

La muerte celular programada fue evaluada mediante el kit de detección y cuantificación de la apoptosis usando la técnica de T.U.N.E.L la cual es basada en el marcaje de los rompimientos de la cadena del ADN y detectada por microscopía de fluorescencia. La técnica fue realizada de acuerdo al manual de procedimientos *In Situ Cell Death Detection Kit, POD* (Roche applied science, Philadelphia, USA). Los cortes histológicos fueron desparafinados y lavados en xilol y alcoholes graduales agua destilada estéril, solución de amortiguadores salino fosfatado, Triton, proteinasa K, etanol, DNasa I, ácido acético, solución label y solución de enzimas, posteriormente se incubó en cámara húmeda y en oscuridad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos de dichos experimentos fueron analizados de acuerdo a la normalidad de los datos y se agruparon en medidas de tendencia central y de dispersión (media y desviación estándar o mediana y cuartiles).

Los grupos estudiados fueron comparados buscando diferencias en base a ANOVA para mediciones no repetidas de una vía en relación a la variable dosis-respuesta. En relación al variable de dosis respuesta, se utilizó ANOVA para mediciones repetidas. El valor de significancia estadístico en todos los casos fue de $P<0.05$.

RESULTADOS

En el modelo de neovascularización corneal inducida por quemadura por álcali en conejos, inmediatamente después de retirar el disco sumergido de álcali se observó opacidad de la cornea. Después de lavar con agua la quemadura aumentó aún más. La cornea de los conejos sometidos únicamente a la quemadura se convirtió al séptimo día en una zona edematosa (+++) con un gran crecimiento de neovasos formados hasta el centro de la quemadura

([fig. 1B.](#)). Los conejos tratados con EGCG a diferentes dosis mostraron al día 7 diferencias en el grado de eritema y crecimiento de los neovasos: EGCG 1mg/ml presentó un edema leve (+)([fig.1E](#)); 10 mg/ml fue moderado (++)([fig.1D](#)) y a 25 mg/ml de EGCG fue observado un edema severo en cornea y conjuntiva (+++) e hinchazón de párpados([fig.1C](#)). La longitud de los neovasos en la córnea se midió mediante una lámpara de hendidura y el área total de neovascularización de la córnea fue calculado. Los resultados mostraron que tanto la longitud de los vasos y el número de neovasos disminuyó proporcionalmente con la dosis de EGCG, comparado con el grupo quemado únicamente. La superficie y el número total de neovasos comenzó a disminuir, desde los 10 mg/ml hasta 1 mg/ml. el crecimiento vascular fue similar entre el grupo quemado sin EGCG con el tratado a 25mg/ml.

ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

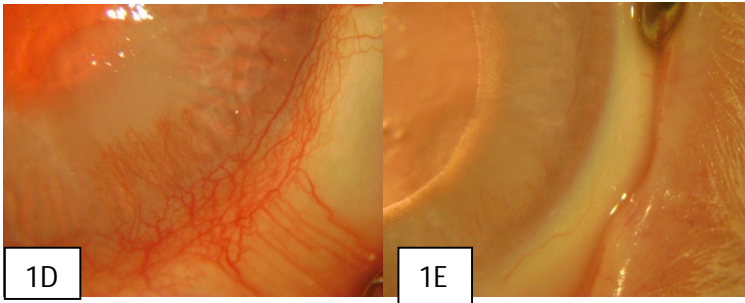
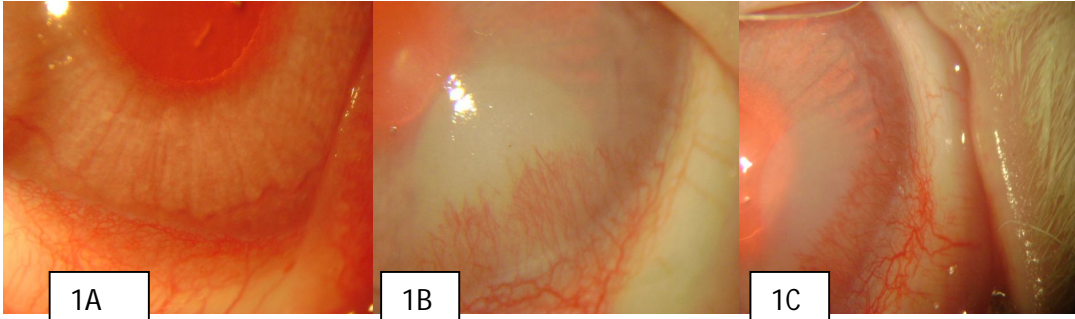
Siete días después de la lesión, todos los componentes celulares dentro de la zona quemada se destruyeron debido a las graves quemaduras alcalinas. La degeneración de la capa de células epiteliales fue observada en el grupo de 25 mg/ml y en el control quemado. La regeneración del epitelio corneal fue recuperada a la dosis de 1 mg/ml y 10 mg/ml. En la parte central del estroma se mantuvo acelular, pero por la parte periférica-anterior presentó ulceración con infiltración de células inflamatorias polimorfonucleares y miofibroblastos, incluyendo la generación de neovasos como se muestra por tinción de Hematoxilina-Eosina (Figura). Bajo el microscopio de luz se observaron variaciones importantes en la progresión de la neovascularización entre los grupos de animales con inflamación inducida por álcali. La neovascularización fue también uniforme alrededor de la herida circular en la córnea entre los sujetos estudiados de cada grupo. Un gran número de vasos y células inflamatorias fueron observados en la cornea a los 7 días post-quemadura alcalina (grupo control). La superficie total de neovasos comenzó a disminuir con el tratamiento de 10 y 1 mg/ml de EGCG, mientras que a la dosis de 25mg/ml el

numero de vasos fueron similares al del control quemado (Fig. 2). Se consideraron las corneas izquierdas como control normal sin quemadura y tratadas solo con el vehículo. Estos tejidos no mostraron desarrollo de úlceras, infiltración inflamatoria ni cambios en la estructura de la córnea con la capa epitelial intacta y el estroma con miofibroblastos. Estos resultados muestran que la neovascularización corneal inducida por álcali es un modelo animal útil y simple para la inflamación corneal y neovascularización corneal.

ENSAYO DE T.U.N.E.L Los resultados encontrados en cuanto al número de neovasos son los siguientes: En el grupo 1 el promedio fue de (41.83), en el grupo 2 fue de (51.17), en el grupo 3 fue de (29.00), en el grupo 4 de (15.23) y por último, el grupo 5 promedió (0.00). Utilizando ANOVA (**Analysis of Variance Calculator - One-Way ANOVA from Summary Data**) se encontró una significancia de **P = 0.00** ($P \leq 0.05$).

Para caracterizar el daño por apoptosis tardía de las células de la córnea a los 7 días post- quemadura con álcali y tratadas con las diferentes dosis de EGCG, aplicamos el ensayo TUNEL. En las corneas de conejo normales, un núcleo de TUNEL-positivo fue apenas detectado (Figura 3). En las corneas de conejos únicamente quemados, gran cantidad de células positivas al TUNEL y algunos núcleos fragmentados fueron observados en las células epiteliales y del estroma (inflamatorias) (figura 3). En el análisis comparativo entre las células de la cornea de conejos quemados sin tratamiento y entre las diferentes dosis de EGCG se observó una disminución en el número de células positivas al TUNEL en las corneas tratadas con 1 mg/ml con EGCG. Sin embargo el grupo tratado con EGCG 25mg/ml el número de células epiteliales apoptóticas se incremento, similar al del grupo quemado sin tratamiento (fig. 3 c). Estos resultados indican que varias células del epitelio corneal experimentan apoptosis en condiciones de 25 mg/ml de EGCG y disminuye significativamente a al reducir la dosis de 10 mg/ml y 1 mg/ml.

Los resultados encontrados en cuanto a la longitud de neovasos son los siguientes: En el grupo 1 el promedio fue de (2.00mm), en el grupo 2 de (3.30mm), el grupo 3 de (1.40mm), en el grupo 4 de (1.10mm) y el grupo 5 dio un promedio de (0.00). Utilizando ANOVA (**Analysis of Variance Calculator - One-Way ANOVA from Summary Data**) se encontró una significancia de **P = 0.026** ($P \leq 0.05$). Esto sugiere que la neovascularización corneal inducida por inflamación se ve afectada por el tratamiento con EGCG. Por lo tanto, EGCG representa una nueva alternativa efectiva para el tratamiento de la inflamación y la neovascularización corneal.



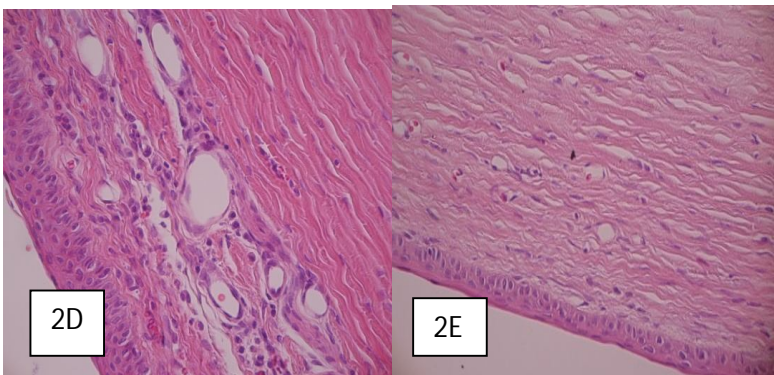
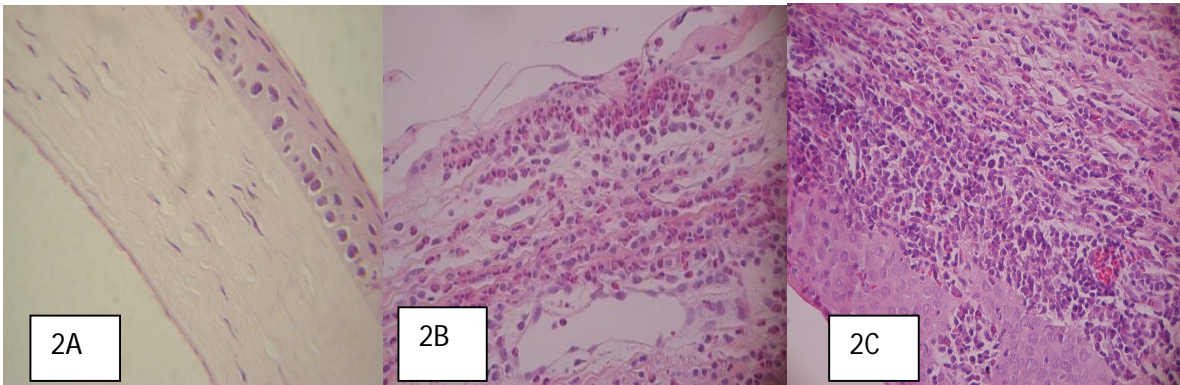
1A : Foto clínica de ojo derecho sin quemadura

1B: Foto clínica de ojo derecho con quemadura pero sin EGCG

1C: Foto clínica de ojo derecho con quemadura y utilizando la dosis de 25mg/1ml.

1D : Foto clínica de ojo derecho con quemadura y utilizando la dosis de 10mg/1ml

1E: Foto clínica de ojo derecho con quemadura y utilizando la dosis de 1mg/1ml.



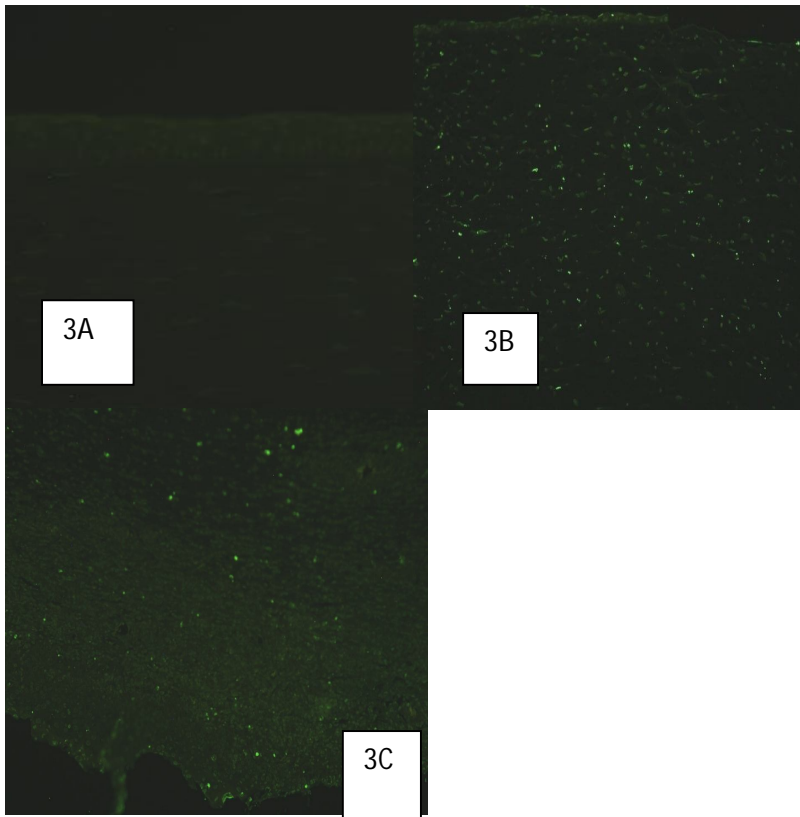
2A: Corte histológico H-E 40x, sin quemadura

2B: Corte histológico H-E 40x, con quemadura pero sin EGCG.

2C: Corte histológico H-E 40x, con quemadura utilizando la dosis de 25mg/1ml.

2D: Corte histológico H-E 40x, con quemadura utilizando la dosis de 10mg/1ml.

2E: Corte histológico H-E 40x, con quemadura utilizando la dosis de 1mg/1ml.



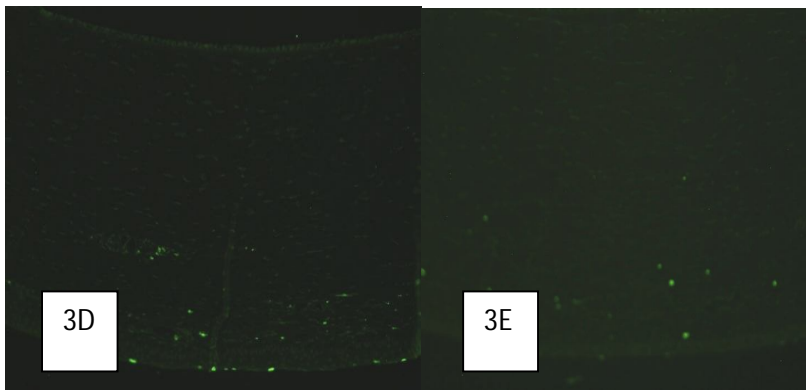
3A: Técnica de T.U.N.E.L 20x, ojo sin quemadura

3B: Técnica de T.U.N.E.L 20x, ojo con quemadura pero sin EGCG.

3C: Técnica de T.U.N.E.L 20x, con quemadura utilizando la dosis de 25mg/1ml.

3D: Técnica de T.U.N.E.L 20x, con quemadura utilizando la dosis de 10mg/1ml.

3E: Técnica de T.U.N.E.L 20x, con quemadura utilizando la dosis de 1mg/1ml.



ANÁLISIS

La neovascularización corneal es una causa muy importante de disminución de la agudeza visual. Se han desarrollado diferentes fármacos inhibidores de la angiogénesis e inflamación. La dexametasona es usada en el tratamiento de angiogénesis córnea por su inhibición de NF-KB, VEGF y la activación de la COX-2 (10,13), sin embargo, el uso prolongado de este esteroide podría tener consecuencias como glaucoma, catarata y predisposición a queratitis infecciosa (14,15). Recientemente se ha utilizado el anticuerpo monoclonal anti-VEGF como terapia para suprimir la vascularización corneal, debido a su gran efectividad para inhibir el sistema de la tirosina cinasa VEGF/VEGFR. Sin embargo, es posible encontrar otra vía de activación sin el uso de VEGF, como la vía de NF-KB que regula la expresión de citocinas pro-angiogénicas IL-1B la cual es suprimida por inhibidores de COX2. Es importante mencionar que a pesar de los datos favorables que apoyan las virtudes de la EGCG en la dieta, algunos investigadores han reportado factores pro-oxidantes y genotóxicos del EGCG en su uso a altas concentraciones catalizando la formación de peróxido de hidrógeno. Sin embargo, muchos reportes han demostrado la seguridad del EGCG en pequeñas concentraciones a rangos micromolares.(30)

En estudios con otros flavonoides como el genisteína, luteolina y el curcuminóide ha mostrado que bajas concentraciones administradas por vía tópica son potentes inhibidores in vivo de la neovascularización corneal sin producir efectos citotóxicos. Cao y Cao también demostraron que el consumo del té verde como consumo de agua (1.25% conteniendo 708mg/ml EGCG; con niveles en plasma de 0.1 -0.3 plasma Mmol/L) puede significativamente suprimir la neovascularización corneal estimulada por VEGF (31). Eso muestra que EGCG puede tener un gran potencial en el tratamiento de la neovascularización corneal, pero poco es conocido de sus efectos adversos. La ventaja del uso tópico que utilizamos en este protocolo es que esta no es invasiva comparado a las rutas de invasibilidad las cuales ocasionan a una pérdida de la integridad de la cornea o consecuencias sistémicas. Sin embargo, la administración tópica de EGCG puede tener algunas limitaciones; la aplicación tópica a altas concentraciones de EGCG puede provocar hiperemia en la superficie ocular debido al bajo pH (aproximado de 4.0g/mol) y producción de H₂O₂ causando daño en las células corneales. No obstante, estas limitaciones podrían ser reguladas disminuyendo la concentración de EGCG a niveles submicromolares y por su gran solubilidad en el agua esta podría disolverse en una solución amortiguadora cercana al pH fisiológico, sin cambiar la estructura y actividad de la molécula. Esto indica que la angiogénesis puede llevarse a cabo sin la participación directa de VEGF. Nuestro estudio muestra evidencia que el antioxidante natural EGCG tiene gran potencial terapéutico en el tratamiento de la neovascularización corneal similar a lo reportado.

CONCLUSIONES

La aplicación tópica de la Epigallocatequina 3- galato tiene un efecto terapéutico para las quemaduras inducidas por NaOH que produjeron inflamación y neovascularización. El efecto de la EGCG es inversamente proporcional a la dosis utilizada, ya que con la dosis de 1mg/ml se encontró la menor cantidad de neovasos de células inflamatorias. La toxicidad que puede llegar a inducir la EGCG es directamente proporcional a la dosis, ya que con la dosis de 25mg/ml se encontró que a esta dosis la EGCG llega a ser oxidante.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chang JH, Gabison EE, Kato T,. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol.* 2001;(12):242–249.
2. Cursiefen C. Immune privilege and angiogenic privilege of the cornea. *Chem Immunol Allergy* 2007;(92):50–57.
3. Ebrahem Q, Chaurasia SS, VasANJI A, *et al.* Cross-talk between vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases in the induction of neovascularization in vivo. *Am J Pathol.* 2010;(176):496-503.
4. Azar DT. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing (an American Ophthalmological Society thesis). *Trans Am Ophthalmol Soc.* 2006;(104):264-302.
5. Nakao S, Kuwano T, Tsutsumi-Miyahara C, *et al.* Infiltration of COX-2-expressing macrophages is a prerequisite for IL-1 beta-induced neovascularization and tumor growth. *J Clin Invest.* 2005;(115):2979-2981.
6. Lu P, Liu G, Zhang X, Mukaida N. Enhanced experimental corneal neovascularization along with aberrant angiogenic factor expression in the absence of IL-1 receptor antagonist. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2009;(50):4761-4768.
7. Nakao S, Hata Y, Miura M, *et al.* Dexamethasone inhibits interleukin-1beta-induced corneal neovascularization: role of nuclear factor-kappaB-activated stromal cells in inflammatory angiogenesis. *Am J Pathol.* 2007;(171):1058-1065.
8. Ono M. Molecular links between tumor angiogenesis and inflammation: inflammatory stimuli of macrophages and cancer cells as targets for therapeutic strategy. *Cancer Sci.* 2008;(99):1501-1506.
9. Kondo Y, Fukuda K, Adachi T, Nishida T. Inhibition by a selective I κ B kinase-2 inhibitor of interleukin-1-induced collagen degradation by corneal fibroblasts in three-dimensional culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008;(49):4850-4857.
10. Kuwano T, Nakao S, Yamamoto H, *et al.* Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. *FASEB J.* 2004;(18):300-310.
11. Comstock TL, Holland EJ. Loteprednol and tobramycin in combination: a review of their impact on current treatment regimens. *Expert Opin Pharmacother.* 2010;(11):843-852.

12. Koenig Y, Bock F. Short- and long-term safety profile and efficacy of topical bevacizumab (Avastin) eye drops against corneal neovascularization. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2009;(247):1375-1382.
13. DeStafenoJJ, KimT. Topical bevacizumab therapy for corneal neovascularization. *Arch Ophthalmol* 2007;(125):834–836.
14. Castro MR, Lutz D, Edelman JL. Effect of COX inhibitors on VEGF-induced retinal vascular leakage and experimental corneal and choroidal neovascularization. *Exp Eye Res.* 2004;(79):275-285.
15. Tsuda H, Ohshima Y, Nomoto H, *et al.* Cancer prevention by natural compounds. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2004;(19):245-263.
16. Valcic S, Muders A, Jacobsen NE,. Antioxidant chemistry of green tea catechins. Identification of products of the reaction of (-)-epigallocatechin gallate with peroxy radicals. *Chem. Res. Toxicol.* 1999;(12):382-386.
17. Donà M, Dell'Aica I, Calabrese F, *et al.* Neutrophil restraint by green tea: inhibition of inflammation, associated angiogenesis, and pulmonary fibrosis. *J Immunol.* 2003;(170):4335-4341.
- 18.- Fujiki H. Green tea: Health benefits as cancer preventive for humans. *Chem Rec.* 2005;(5):119-132.
19. Wolfram S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. *J Am Coll Nutr.* 2007;(26):373S-388S.
20. Jousen AM, Rohrschneider K, Reichling J. Treatment of corneal neovascularization with dietary isoflavonoids and flavonoids. *Exp Eye Res.* 2000;(71):483-487.
21. Shimizu M, Shirakami Y, Moriwaki H. Targeting Receptor Tyrosine Kinases for Chemoprevention by Green Tea Catechin, EGCG. *Int J Mol Sci.* 2008;(9):1034-1049.
22. Sen T, Moulik S, Dutta A, *et al.* Multifunctional effect of epigallocatechin-3-gallate (EGCG) in downregulation of gelatinase-A (MMP-2) in human breast cancer cell line MCF-7. *Life Sci.* 2009;(84):194-204.
23. Rodriguez SK, Guo W, Liu L. Meydani M. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate, inhibits vascular endothelial growth factor angiogenic signaling by disrupting the formation of a receptor complex. *Int J Cancer.* 2006;(118):1635-1644.

24. Kim SJ, Jeong HJ, Lee KM, *et al.* Epigallocatechin-3-gallate suppresses NF-kappaB activation and phosphorylation of p38 MAPK and JNK in human astrocytoma U373MG cells. *J Nutr Biochem.* 2007;(18):587-596.
25. Singh R, Ahmed S, Islam N. Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB. *Arthritis Rheum.* 2002;(46):2079-2086.
26. Yang J, Wei D, Liu J. Repressions of MMP-9 expression and NF-kappa B localization are involved in inhibition of lung carcinoma 95-D cell invasion by (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Biomed Pharmacother.* 2005;(59):98-103.
27. Sugisawa A, Umegaki K. Physiological concentrations of (-)-epigallocatechin-3-O-gallate (EGCg) prevent chromosomal damage induced by reactive oxygen species in WIL2-NS cells. *J Nutr.* 2002;(132):1836-1839.
28. Isbrucker RA, Edwards JA, Wolz E. Safety studies on epigallocatechin gallate (EGCG) preparation. Part 2: Dermal, acute and short-term toxicity studies. *Food Chem Toxicol.* 2006;(44):636-650.
29. Bian F, Zhang MC, Zhu Y. Inhibitory effect of curcumin on corneal neovascularization in vitro and in vivo. *Ophthalmologica.* 2008;(222):178-186.
30. Abdulrazik M, Tamilvanan S, Benita S. Non-systemic delivery of topical brimonidine to the brain: a neuro-ocular tissue distribution study. *J Drug Target.* 2006;(14):670-679.
31. Cao Y, Cao R. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature.* 1999;398:3991.