



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGÍA
FUNDACIÓN CONDE DE VALENCIANA

DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE
NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL Y COLOCACIÓN DE
MEMBRANA AMNIÓTICA

TESIS DE POSGRADO
Para obtener el título de especialidad en

OFTALMOLOGÍA

Presenta

Diana Francisca Rodríguez Matilde

Director de Tesis

Dr. Alejandro Navas



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.

Dr. Enrique Graue Weichers

Profesor de curso

Dr. Alejandro Navas

Director de tesis

Dr. José Luis Rodríguez Loaiza

Jefe de enseñanza

AGRADECIMIENTOS

Mis agradecimientos son para: mi mamá, quien además de darme todo el amor y apoyo del mundo, ha sido la mejor guía que pude haber tenido a lo largo de toda mi vida tanto académica como personal; a mi papá, mi hermano, mi tía Ofe, y mi hermanita Isabella, quienes siempre han estado conmigo en las buenas y en las malas; a mi familia mexicana, que sin su amor y sin su ayuda incondicional nada de esto hubiera sido posible; a mi novio y a mis amigos por hacer todo más fácil y sencillo; por encima de todo, a Dios que sin él nada tendría sentido.

Agradezco de manera especial a mi asesor de tesis el Dr. Alejandro Navas, quien me ayudó e inspiró a realizar este protocolo.

INDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	5
1.1	Neovascularización corneal.....	5
1.1.1	Neovascularización corneal y avascularidad: epidemiología y factores de riesgo.....	6
1.1.2	Posibles factores que explican el privilegio angiogénico de la córnea	7
1.1.3	Factores angiogénicos y neovascularización corneal: El papel del VEGF y FGF en la neovascularización corneal.....	8
1.2	Membrana amniótica.....	11
1.2.1	Historia.....	11
1.2.2	Histología, fisiología.....	12
1.2.3	Propiedades de la membrana amniótica.....	14
1.2.4	Aplicaciones clínicas en Oftalmología.....	18
2	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
3	JUSTIFICACION	21
4	OBJETIVOS	21
5	DISEÑO.....	22
6	MATERIALES Y METODOS.....	22
6.1	Inducción de la neo-vascularización corneal.....	22
6.2	Obtención y preservación de membrana amniótica.....	23
6.3	Colocación de membrana amniótica.....	24
7	ASPECTOS BIOETICOS Y DE SEGURIDAD.....	25
8	RESULTADOS.....	26
9	DISCUSION.....	29
10	CONCLUSIONES.....	34
11	REFERENCIAS BIBILIOGRAFICAS.....	35
12	ANEXOS	46

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Neovascularización corneal

La neovascularización corneal, una condición que amenaza la visión, usualmente asociada a enfermedades inflamatorias e infecciosas de la superficie ocular, es la formación de nuevas estructuras vasculares en áreas que previamente eran avasculares.

Tres mecanismos superpuestos están involucrados con la regulación de neovasos: la vasculogénesis, la formación de nuevos vasos sanguíneos derivados de angioblastos de la médula ósea, (mayormente durante la embriogénesis); el reclutamiento de células endoteliales vasculares progenitoras; y la angiogénesis, la formación de nuevos vasos desde estructuras vasculares preexistentes¹⁻⁵

La angiogénesis es común en crecimientos tumorales y en enfermedades retinianas y corneales. Se ha demostrado, en estudios de angiogénesis de cáncer, que existe un balance ente los factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y moléculas antiangiogénicas como la endostatina, angiostatina, y el factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) en la córnea^{6,7}.

Después de un daño corneal, generalmente la herida sana sin

neovascularización corneal; sin embargo, esta puede ser inducida durante su recuperación en algunas enfermedades inflamatorias, infecciosas, degenerativas o traumáticas⁸. Enfermedades asociadas con neovascularización corneal incluyen enfermedades inflamatorias, rechazo de injerto corneal, queratitis infecciosa, hipoxia por uso de lente de contacto, quemaduras por álcali, úlcera estromal, aniridia, deficiencia de células limbales; en estas condiciones el balance entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos se inclina más hacia una regulación a la alza de factores angiogénicos.^{2,9,10}

1.1.1 Neovascularización corneal y avascularidad: Epidemiología y factores de riesgo

El aporte sanguíneo corneal se origina de las arterias ciliares, ramas de la arteria oftálmica que subsecuentemente se dividen y terminan en el plexo pericorneal en el area limbal. La neovascularización corneal involucra el crecimiento de nuevos vasos esencialmente desde los capilares y vénulas del plexo pericorneal. Tres entidades clínicas pueden ser distinguidas: (1) Neovascularización profunda sobre la membrana de Descemet vista en queratitis herpética y queratitis intersticial luética, (2) Neovascularización estromal principalmente asociada con la mayoría de formas de queratitis estromal y (3) pannus vascular compuesto de tejido conectivo proliferativo en la periferia corneal superficial y principalmente asociado con desordenes de la superficie ocular^{8,11,12,13}.

Las enfermedades neovasculares e infecciosas de la córnea y otras partes del ojo representan un problema de salud pública mayor. Aunque la incidencia exacta y porcentajes de prevalencia de la neovascularización corneal en los

Estados Unidos son desconocidos, el índice de incidencia fue estimado en 1.4 millones de pacientes por año basado en una extrapolación del porcentaje de prevalencia de 4.4% en el Massachusetts Eye and Ear Infirmary en 1996.¹⁴

Veinte por ciento de los especímenes corneales obtenidos durante transplante de córnea muestran evidencia histológica de neovascularización.^{8,12,13,14}

La calidad óptica de la córnea con neovascularización puede estar reducida por cinco posibles mecanismos: (1) opacidad causada por las células sanguíneas circulantes en los canales vasculares, (2) arquitectura irregular de las paredes vasculares que inducen aberraciones de alto orden, (3) alteraciones en el espacio del colágeno estromal entre los vasos sanguíneos, (4) filtración líquida, edema y depósitos de lípidos en el tejido que circunda los vasos sanguíneos permeables y (5) en el caso de pannus superficial, irregularidad de la superficie corneal¹⁵

1.1.2 Posibles factores que explican el privilegio angiogénico de la córnea

La avascularidad de la córnea es importante para permitir la transmisión de la luz sin aberraciones importantes. Varios mecanismos pueden contribuir a la avascularidad de la córnea y la patogénesis de la neovascularización corneal:

1) consideraciones mecánicas de la anatomía de la córnea (que incluyen la constante deshidratación, que resulta en lamelas de colágeno empaquetadas herméticamente y la presencia de redes compactas de queratocitos entre las lamelas, 2) la naturaleza angiostática de las células epiteliales corneales, 3) el privilegio inmunológico de la córnea y su dependencia en la inducción de una desviación immune asociada en cámara anterior (ACAID), en la cual el antígeno específico, de tipo hipersensibilidad retardada (DTH) es suprimido, 4)

temperatura corneal baja, extensa inervación, y movimiento del humor acuoso a través de la córnea, 5) niveles bajos (o incluso ausencia) de factores angiogénicos bajo condiciones homeostáticas y durante la reparación de la herida corneal avascular, 6) bajos niveles de metaloproteinasas proangiogénicas, 7) la función de barrera de las células limbales y 8) la producción activa de potentes factores antiangiogénicos que contrabalancean los estímulos proangiogénicos durante la homeostasis y la curación avascular de la herida.¹⁶

1.1.3 Factores angiogénicos y neovascularización corneal: El papel del VEGF y FGF en la neovascularización corneal

Varias moléculas angiogénicas expresadas durante la reparación de la lesión corneal han sido identificadas, incluyendo VEGF y bFGF. El VEGF tiene una regulación elevada en córneas inflamadas y vascularizadas en ambos, modelos humanos y animales^{17,18,19}. El VEGF fue inicialmente identificado como un estimulador de la permeabilidad vascular (llamado VPF, por factor de permeabilidad vascular) y fue demostrado subsecuentemente que era mitógeno específico celular endotelial y factor angiogénico. La expresión del VEGF ha sido correlacionada con crecimiento en vivo de vasos sanguíneos embriónicos, fisiológicos y patológicos^{20,21,22}

Los patrones de expresión espacial y temporal del VEGF y sus receptores tirosina cinasa, flt-1 y flk-1/KDR en varios sistemas sugiere que el VEGF es una llave mediadora de eventos vasculogénicos y angiogénicos asociados con un amplio rango de eventos biológicos.^{23,24,25} Signos locales y sistémicos

(responsables para la orquestación del crecimiento y regresión de nuevos vasos sanguíneos) regulan la expresión del gen VEGF, incluyendo cAMP, hormonas esteroideas, agonistas proteína cinasa C, factores de crecimiento polipeptídicos, oxígeno, radicales libres, glucosa, cobalto y hierro. Estos agentes (agonistas proteína cinasa C, factores de crecimiento polipeptídicos, oxígeno, radicales libres) modulan la expresión del gen bFGF vía regulación transcripcional a través de la transcripción del activador de proteína-1 (AP-1), AP-2, p53 y NfκB^{26,27}

Los péptidos de VEGF secretados son generados por empalme alternativo en cinco isoformas: VEGF₁₁₅, VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆²⁸. Miembros adicionales del VEGF incluyen VEGF-B, VEGF-C y VEGF-D, los cuales se ligan diferencialmente a los receptores del VEGF y regulan la angiogénesis y linfangiogénesis²⁹.

VEGF-B es un ineficiente mitógeno celular vascular endotelial. Se une al receptor VEGFR-1, pero no al VEGFR-2 o al VEGFR-3. El VEGF-C y D son mitogénicos para células vasculares endoteliales. Activan VEGFR-3 y están involucradas en la regulación del crecimiento y/o diferenciación del endotelio linfático y vascular sanguíneo. El VEGF es producido por pericitos, fibroblastos, macrófagos, células T, células del epitelio pigmentario de la retina, astrocitos y células del músculo liso. El VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅ son eficientemente exportadas desde la célula; VEGF₁₈₉ y VEGF₂₀₆ están predominantemente asociadas a las células y muy pobremente secretadas. La actividad de la permeabilidad vascular fue detectada para todas las isoformas de VEGF y la actividad mitogénica de las células vasculares endoteliales fue aparente solamente en las isoformas VEGF₁₂₁ y VEGF₁₆₅. En adición, el VEGF₁₂₁ es

más angiogénico que el VEGF165 y VEGF189. Así, un empalme alternativo del RNA del VEGF puede producir polipéptidos con patrones de secreción notablemente diferentes, lo cual sugiere múltiples roles fisiológicos para esta familia de proteínas.^{30,31}

La expresión del VEGF es altamente regulada. La producción aumentada de VEGF ha sido demostrada en hipoxia y respuesta inflamatoria. Una sobreproducción de VEGF ha sido identificada en proliferación de células tumorales. En adición, una inducción de la expresión de VEGF fue encontrada en la transformación maligna de células cultivadas. Similarmente, varios reportes demuestran una regulación a la alza de VEGF en córneas vascularizadas. La expresión del VEGF fue localizada en células epiteliales corneales, células endoteliales corneales, células endoteliales vasculares de los vasos limbares y queratocitos. En adición, la expresión del VEGF aumentó notablemente en las células epiteliales de las córneas inflamadas, células endoteliales vasculares, infiltrados de macrófagos y fibroblastos en el tejido de cicatrización corneal. Las concentraciones de VEGF fueron significativamente más altas en córneas vascularizadas que en córneas normales de control.³¹

Adicionalmente, el VEGF promueve varios pasos de la angiogénesis, incluyendo actividades proteolíticas (disolución de la membrana del vaso original), proliferación de células endoteliales vasculares, migración y formación de tubos capilares. La importancia del VEGF en la angiogénesis corneal fue demostrada por la inhibición de la neovascularización después de la implantación estromal de un anticuerpo bloqueador anti-VEGF, en un modelo

en ratas. Este resultado ha sido reproducido usando péptidos bloqueadores del VEGF en un modelo corneal en conejos.^{32,33}

1.2 Membrana amniótica (MA)

1.2.1 Historia

Las membranas fetales fueron utilizadas desde el principio del siglo XX para los trasplantes de piel en quemaduras y úlceras cutáneas. En 1940, por primera vez Roth reportó el uso de la membrana amniótica para reparar defectos conjuntivales y simbléfaron en pacientes con quemaduras con álcalis, pero los resultados fueron pobres.^{34,35}

Sorsby y Simons fueron los primeros en utilizar membrana amniótica posiblemente sin corion y reportaron rápida recuperación con pocas complicaciones, en pacientes con quemaduras oculares ocasionadas por agentes químicos.³⁶

Hubo un período de casi medio siglo en el que no se publicaron reportes sobre trasplante de membrana amniótica humana (TMAH) hasta que en 1993, Batlle y Perdomo lo retomaron.³⁷

Transcurridos 50 años de las primeras experiencias, en 1994 Kim y Tseng, demostraron que la membrana amniótica puede ser utilizada para la reconstrucción de superficie corneal en un modelo animal de conejos y establecen una nueva metodología para la conservación membrana amniótica a -80°C en medio Eagle-Dulbecco/glicerol 50% (v/v)³⁸. Con estos trabajos como antecedentes y los avances en la preservación y manejo de la membrana

amniótica, se inicia el desarrollo de nuevas aplicaciones quirúrgicas, la búsqueda y explicación científica de las propiedades inherentes y ventajas del empleo de membrana amniótica como injerto y/o tejido de soporte para el cultivo de diferentes tipos celulares.

1.2.2 Histología, fisiología

La membrana amniótica humana es la capa más interna de la placenta; compuesta por tejido ectodérmico derivado de células columnares, es avascular, cuenta con un grosor de 0.02 a 0.5mm; esta consiste en una sola capa de células epiteliales, una membrana basal gruesa y un estroma avascular. Su membrana basal contiene colágeno tipo IV, laminina 1, laminina 5, y fibronectina que juegan un importante rol en la adhesión epitelial corneal, promueven la diferenciación epitelial y previenen la apoptosis epitelial; el estroma avascular contiene factores de crecimiento, proteínas antiangiogénicas y antiinflamatorias e inhibidores de proteasas que proveen un micro ambiente no inflamatorio, reduce el crecimiento fibrovascular y la neovascularización anormal. También juega un papel importante en la señalización en la comunicación del estroma y el epitelio limbal; su epitelio produce factores antiinflamatorios y de crecimiento que benefician el tratamiento de las enfermedades inflamatorias corneales.^{39,40}

En el citoplasma se encuentran vesículas pinocíticas, abundantes organelos entre los que destacan el retículo endoplásmico y un aparato de Golgi, su núcleo es de configuración irregular, con indentaciones en la membrana

nuclear y acúmulos periféricos e irregulares de heterocromatina⁴¹. En su parte perinuclear revela la existencia de vacuolas de significancia para su importante función secretora.

La matriz estromal es totalmente avascular, rica en colágeno y mucopolisacáridos, y las pocas células que se llegan a encontrar son fibroblastos. Esta matriz estromal la componen tres capas: la capa compacta; la cual se encuentra desprovista de células y formada por un tejido compacto de ahí su nombre; la capa fibroblástica, compuesta de fibroblastos y células de Hofbauer y por último tenemos a la capa esponjosa, que se encuentra formada por el retículo del celoma extreembrionario⁴².

La membrana amniótica se absorbe después de ser transplantada en la superficie ocular dentro de 4-6 semanas.

Dependiendo del tiempo de consumo, se pueden utilizar hasta después de 1 año de preparada, aunque algunos recomiendan almacenarla por un periodo de tiempo indefinido⁴³.

1.2.3 Propiedades de la membrana amniótica⁴⁴

Entre las propiedades de la MA que determinan su utilidad se encuentran las siguientes:

Regula el transporte hidroelectrolítico, ya que se trata de un tejido metabólicamente muy activo que regula la composición del líquido amniótico y produce gran variedad de compuestos activos (hormonas, factores de crecimiento y citoquinas).

Disminuye el crecimiento bacteriano: una de las utilidades más frecuentes de la membrana amniótica en Oftalmología es el recubrimiento de defectos epiteliales corneales persistentes donde el evitar una infección sobreañadida es fundamental. En un estudio experimental, Rao y Chandrasekharam provocaron quemaduras profundas en animales de experimentación y cinco días más tarde se realizó escarectomía y aposición de membrana amniótica sobre la mitad de la herida. Cultivos posteriores de la zona situada bajo la membrana fueron infructuosos, mientras los realizados en la zona descubierta mostraron amplia variedad de gérmenes. Robson y Krize han demostrado recuentos bacterianos menores en aquellas heridas que habían sido inoculadas con *P. Aeruginosa* y recubiertas con membrana amniótica que en aquellas recubiertas con injertos de piel o descubiertas⁴⁵. Se postula que el cierre biológico de la herida con una más rápida instauración de un tejido de granulación bien vascularizado favorece la llegada de leucocitos y la eliminación de restos necróticos.

Escasa inmunogenicidad: Adinolfi y cols, demostraron con cultivos celulares de epitelio de la membrana amniótica que los antígenos de histocompatibilidad HLA 1, B, C y DR no pueden ser detectados en estas células con las técnicas de inmunofluorescencia habitualmente utilizadas. Sí se puede detectar una proteína relacionada con la β 2-microglobulina, cuya secuencia es casi idéntica al HLA-G, gen del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I aislado a partir de una línea de células B malignas y que se creía que no se expresaba en ningún tejido humano sano. El hecho de que la expresión de esta proteína sea máxima al principio del embarazo y baje posteriormente, añadido al hecho de que no se haya podido encontrar en ningún tejido humano, apoya la hipótesis de que el trofoblasto es un tejido antigénicamente inmaduro y, tal vez, incapaz de provocar una reacción de rechazo.

De forma experimental se implantaron injertos de membrana amniótica a seis voluntarios, dos de los cuales habían rechazado previamente injertos de piel. La región del implante fue extraída y examinada sin que se encontraran datos de reacción inmunológica. Las muestras de suero extraídas un mes más tarde no mostraron reactividad contra células del epitelio amniótico cultivadas in Vitro.⁴⁶

Permitir una adecuada reepitelización: de todas sus propiedades probablemente sea la más importante y la que permite que su utilización sea hoy tan popular en Oftalmología.

Se ha visto que la membrana amniótica expresa mRNA de gran número de factores de crecimiento (EGF, KGF, HGF y bFGF) que pueden favorecer la

reepitelización tras su trasplante, tanto si lleva células como si no, aunque las cantidades de factores de crecimiento son significativamente mayores cuando el epitelio está adherido a la membrana, que sugiere un origen epitelial para estos factores de crecimiento⁴⁷. Se ha demostrado que el cultivo de fibroblastos en presencia de una matriz de membrana amniótica reduce la expresión de TGF β , así como las señales intercelulares vía CD44, integrina b1 y FGFR1/flg⁴⁸. El resultado final conforma un fenotipo menos mitogénico, contráctil y fibrogénico que podría explicar en parte el efecto inhibitor de la cicatrización que la membrana amniótica presenta cuando es utilizada en la reconstrucción de la superficie ocular.

Algunos autores⁴⁹ otorgan a la membrana amniótica una actividad inhibidora de la proteinasa que podría ser útil en el desarrollo de agentes para el tratamiento de queratitis recidivantes. Asimismo, se ha detectado en el estroma de la membrana amniótica criopreservada tinción positiva para los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas, agentes con conocido efecto antiangiogénico y antiinflamatorio⁵⁰.

Facilita la migración de las células epiteliales

En el trabajo experimental de Kim y Tseng⁵¹ se aprecia que, tras el trasplante de membrana amniótica (TMA), algunos ojos (desafortunadamente no todos) experimentan una progresiva epitelización, con una superficie relativamente transparente y escasa vascularización. Dado que las células limbares y corneales habían sido eliminadas con anterioridad, se puede afirmar que las células que cubren la membrana amniótica derivan del epitelio conjuntival.

Evitar la vascularización de la superficie corneal

Una de las características más comunes de la gran mayoría de trabajos consultados (entre ellos el trabajo experimental de Tseng⁵¹ sobre el efecto inhibitor que sobre la neovascularización corneal tiene el TMA en ojos de animales de experimentación), es la coincidencia en destacar la menor vascularización (en algunos ojos ausente) de la córnea en comparación con los ojos no sometidos a TMA. La propia avascularidad de la membrana amniótica podría ser determinante, dado que podría reducir los tejidos de granulación vascularizados y las cicatrices en el postoperatorio.

Impedir la apoptosis de las células epiteliales

Estudios en diferentes órganos han demostrado que la presencia de una membrana basal⁵² o de una matriz extracelular⁵³ es capaz de evitar la apoptosis de las células epiteliales, rescatándolas de nuevo hacia un nuevo ciclo celular. Es interesante señalar que la criopreservación elimina la viabilidad de las células epiteliales de la membrana amniótica⁵⁴.

Actúa como inhibidor de la fibrosis

Se ha demostrado que la membrana amniótica ejerce una regulación a la baja sobre las señales que activan la secreción de factores de crecimiento, responsables de la activación fibroblástica en el proceso de cicatrización de las heridas⁵⁵. Estudios muy recientes de Kim y cols⁵⁶ sugieren que la utilización de un extracto de membrana amniótica sobre una base oleosa reduce la migración de polimorfonucleares, la apoptosis de queratocitos y la peroxidación lipídica en ojos de animales de experimentación sometidos a PRK, lo cual

puede sugerir que su aplicación puede ser útil en aquellos procesos que cursan con cicatrización ocular importante. El mecanismo de acción por el que consigue este efecto no es del todo conocido. La MA constituye una capa continua de colágeno sobre la esclera que podría actuar como barrera mecánica ante la formación de fibrosis. Por otro lado, los diferentes factores de crecimiento producidos en las células epiteliales de la MA podrían ser los responsables de la modulación de la proliferación y diferenciación de los fibroblastos estromales y conjuntivales, así como la inhibición de la señal de beta-TGF39, limitando el proceso de formación de cicatrices. Además, parece que la MA promueve la epitelización normal y el paso de citoquinas entre las células epiteliales y estromales, que podrían ser las responsables de inhibir la formación de tejido fibrótico⁵⁷.

1.2.4 Aplicaciones clínicas en Oftalmología

Córnea

Defectos epiteliales persistentes, úlceras corneales, descemetocele, perforación corneal, queratopatía bulosa, queratopatía en banda después de la remoción quirúrgica de los depósitos calcificados, quemaduras térmicas o químicas, prevención de la cicatrización corneal después de cirugía refractiva con láser excimer, necrosis epidérmica tóxica aguda y síndrome de Stevens Johnson.

Tsubota et al⁵⁸ comunican que el trasplante de limbo, TMA y tarsorrafia (además del adecuado tratamiento médico de la sequedad ocular y demás circunstancias del paciente) puede permitir una adecuada reconstrucción de la

superficie ocular en casos seleccionados, constituyendo una alternativa a la queratoprótesis o como paso previo a la realización de un trasplante de limbo y posteriormente una queratoplastia penetrante.

En el tratamiento del haze consecutivo a queratectomía fototerapéutica (PRK) y de opacidades corneales de las queratitis herpéticas estromales⁵⁹, se cree que la utilización de membrana amniótica reduciría la muerte de los queratocitos del estroma anterior tras la realización de la PRK, evitando de esta forma la aparición del haze corneal⁶⁰.

Conjuntiva

Reconstrucción de la conjuntiva bulbar y/o fondo de saco conjuntival por cicatrización o grandes lesiones, simblefaron, reparación de bula filtrante⁶¹, pterigión, tumores límbicos.

Estudios experimentales han demostrado que la distribución de las subcadenas alfa del colágeno IV de la membrana amniótica es idéntica a la del colágeno conjuntival, pero distinto del corneal, lo que justifica el hecho de que se comporte como un elemento adecuado para reemplazar la membrana basal de la conjuntiva⁶². El TMA ha demostrado ser eficaz realizado tras amplias resecciones conjuntivales por simblefaron, neoformaciones extensas o cicatrices amplias⁶³. De la misma forma, se ha llevado a cabo con éxito TMA tras la cirugía del pterigión primario, Prabhasawat et al⁶⁴ recomiendan esta técnica como de primera elección en aquellos casos en que existen dos cabezas (nasal y temporal) y en aquellas circunstancias en que nos interesa preservar la integridad de la conjuntiva bulbar (p. ej., en aquellos pacientes que

pueden necesitar más tarde la realización de una cirugía filtrante). En los pterigiones recidivantes que se asocian a simblefaron, el TMA asociado a un autotrasplante de limbo puede ser útil, según comunican Shimakazi et al⁶⁵.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La transparencia corneal es necesaria para la visión normal y puede ser afectada por factores tales como infección, trauma químico, degeneración, rechazo corneal, enfermedades metabólicas, hipoxia relacionada a lentes de contacto, úlceras, aniridia, y deficiencia de células limbales⁶⁶; siendo la neovascularización corneal el resultado final de estas entidades;⁸ la cual es padecida por aproximadamente el 4.4% de los pacientes oftalmológicos. Ocasionalmente, la neovascularización corneal es de gran ayuda para la cicatrización de la herida e impide la infección, sin embargo reduce la transparencia corneal, deteriora en la visión y favorece el rechazo corneal en trasplantes corneales^{14, 67}.

Kim y Tseg demostraron que la membrana amniótica tiene un efecto inhibitor sobre la vascularización corneal por lo que se propone como una alternativa de tratamiento en casos de neovascularización corneal⁵¹. Otros usos reportados son la reconstrucción de conjuntiva bulbar y/o fondo de saco conjuntival por cicatrización o grandes lesiones, simblefaron, reparación de bula filtrante⁶¹, pterigión y tumores límbicos.

3. JUSTIFICACION

Siendo la neovascularización corneal el resultado final de patologías frecuentes como enfermedades inflamatorias, rechazo corneal, queratitis infecciosa, uso de lente de contacto, quemaduras por álcali, úlcera estromal, aniridia, deficiencia de células limbales, entre otras^{19,10,12}, consideramos útil el desarrollo de un modelo murino de neovascularización corneal para el estudio de posibles tratamientos, así como el seguimiento en patologías corneales relacionadas a esta entidad. Así mismo consideramos también de utilidad el desarrollo de un modelo murino de transplante de membrana amniótica por sus reconocidas propiedades tales como: regulación del transporte hidroelectrolítico, disminución del crecimiento bacteriano, escasa inmunogenicidad, promueve una reepitelización adecuada, facilita la migración de las células epiteliales, evita la vascularización de la superficie corneal, impide la apoptosis de las células epiteliales, actúa como inhibidor de la fibrosis entre otras.

4. OBJETIVOS

1. Desarrollar un modelo de neovascularización corneal en ratones C57BL/6.
2. Desarrollar un modelo de transplante de membrana amniótica en ratones BALB/c.

5. DISEÑO

Estudio intervencional, experimental, murino, prospectivo.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Inducción de la neo-vascularización corneal

Se utilizaron 5 ratones C57BL/6 de 4 semanas de edad, obtenidos del bioterio del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Se realizó anestesia vía intramuscular con hidrocloreuro de ketamina (100 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg) y se utilizó anestesia tópica con gotas de proparacaína al 0.5% en el ojo derecho. El ojo izquierdo se tomó como control.

Se realizó una quemadura por álcali en el centro de la córnea, la cual fue previamente desepitelizada con un diámetro de 2mm sin lesionar el estroma adyacente. Se colocó un círculo de papel filtro impregnado con 1N NaOH durante 40 segundos sobre la córnea desepitelizada; posteriormente se realizó un lavado corneal con solución amortiguadora (PBS) para eliminar el exceso de álcali.

Se valoró la inducción de la NVC mediante un examen biomicroscópico 14 días después de la intervención quirúrgica con la utilización de las técnicas de anestesia previamente descritas.

Se documentaron los resultados por medio de fotografías clínicas tomadas con microscopio quirúrgico y lámpara de hendidura. Se determinó el grado de NVC según el número de neovasos encontrados por mm^2 expresada en porcentaje de área corneal (Lu et al, 2009). Este procedimiento sólo se realizó en ojo derecho, el izquierdo se tomó como ojo control.

6.2 Obtención y preservación de membrana amniótica

La obtención de la membrana amniótica es a través de un protocolo de cesárea electiva y con el previo consentimiento de la paciente, se le informa de los usos que en el futuro recibirá su tejido. Posteriormente en un periodo de 3 a 6 meses se realizan nuevamente exámenes serológicos a las pacientes para la determinación de infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Virus de la Hepatitis B, Virus de la Hepatitis C y para Sífilis, esto tomando en cuenta el periodo de ventana para dichas enfermedades. Si los resultados son negativos se procede con el protocolo de liberación de la membrana amniótica para uso en humanos.

La obtención del amnios y la producción de membrana amniótica para uso quirúrgico en humanos, deben realizarse en condiciones asépticas y de esterilidad. Una vez obtenidas las membranas corio-amnióticas se procede a lavarlas con una solución constituida por solución salina y antibióticos Penicilina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Estreptomina (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), Neomicina (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y Anfotericina B (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ - 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), con el fin de eliminar sangre remanente del tejido y reducir riesgos de contaminación. Posteriormente se realiza una

disección roma de las membranas corio-amnióticas y se hacen cortes de diferentes tamaños del tejido amniótico dependiendo de la aplicación que posteriormente se le dará. Normalmente los cortes son de 5x5 cm, 3x3 cm, 2x2 cm, 1x1 cm.

El amnios se coloca en un soporte de papel de nitrocelulosa, a fin de fijarlas, colocando la parte estromal del amnios adherido al papel, quedando el epitelio del amnios libre. Las fracciones de membrana amniótica se conservan a -80°C en recipientes individuales, estériles, con una solución de conservación (medio Eagle-Dulbecco y glicerol 50% v/v). Mediante este procedimiento, se conservan las membranas amnióticas un periodo de 1 -2 años. El tejido a emplear se recomienda se descongele a temperatura ambiente, 30 minutos previo a su utilización y se enjuague con solución salina estéril previo a su aplicación.

6.3 Colocación de membrana amniótica

Se utilizaron 5 ratones BALB/c de 4 semanas de edad obtenidos del bioterio del Instituto de Oftalmología Conde de Valenciana. Se realizó anestesia vía intramuscular con hidrocloreuro de ketamina (100 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg) y se utilizó anestesia tópica con gotas de proparacaína al 0.5% en ojo derecho. El ojo izquierdo se tomó como control

Se colocó la membrana amniótica de acuerdo al tamaño corneal medido. Se suturó con 8 puntos de nylon 10-0 a la conjuntiva bulbar.

Al ojo derecho se le colocó membrana amniótica y el izquierdo se tomó como ojo control, se tomaron fotos con microscopio con lámpara de hendidura.

7. ASPECTOS BIOÉTICOS Y DE SEGURIDAD

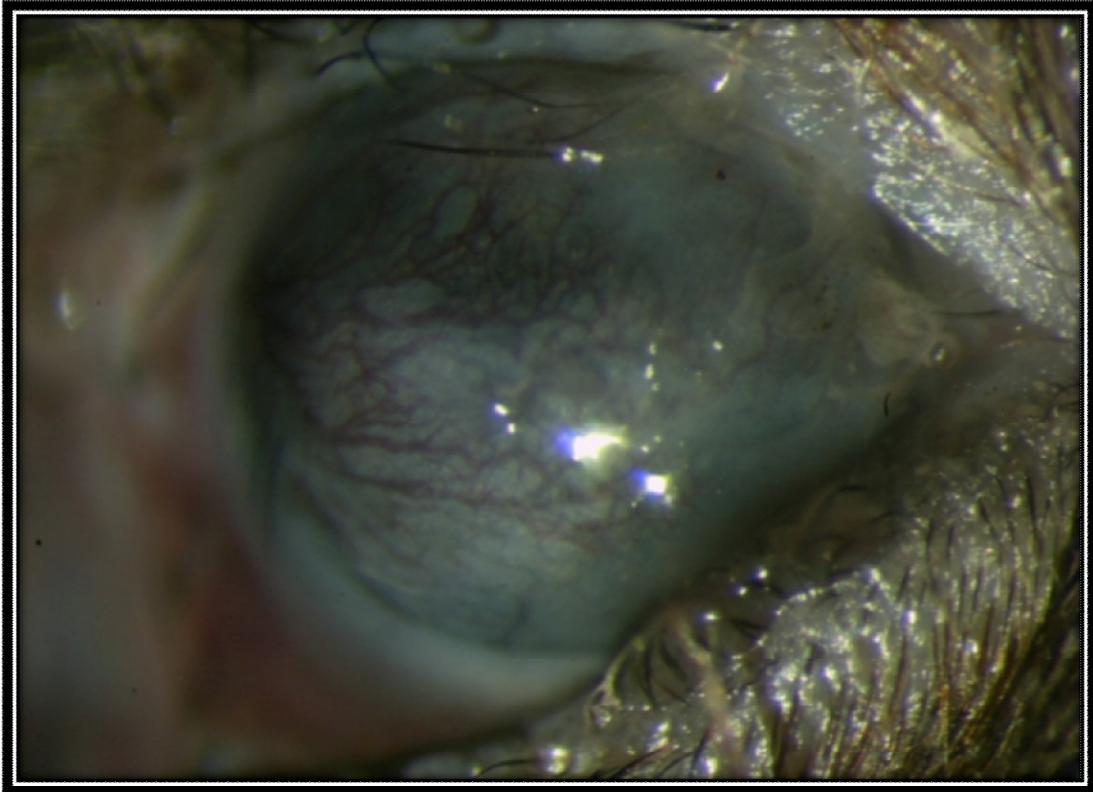
El estudio se llevó a cabo de acuerdo a los lineamientos de ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) en cuanto al uso de animales para estudios de investigación (ver anexos 1 y 2); como también bajo el la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999, donde se especifican las técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Se utilizaron cinco ratones BALB/c y cinco ratones C57BL/6, de 4 semanas que fueron anestesiados vía intramuscular con hidrocloreuro de ketamina (100 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg).

8. RESULTADOS

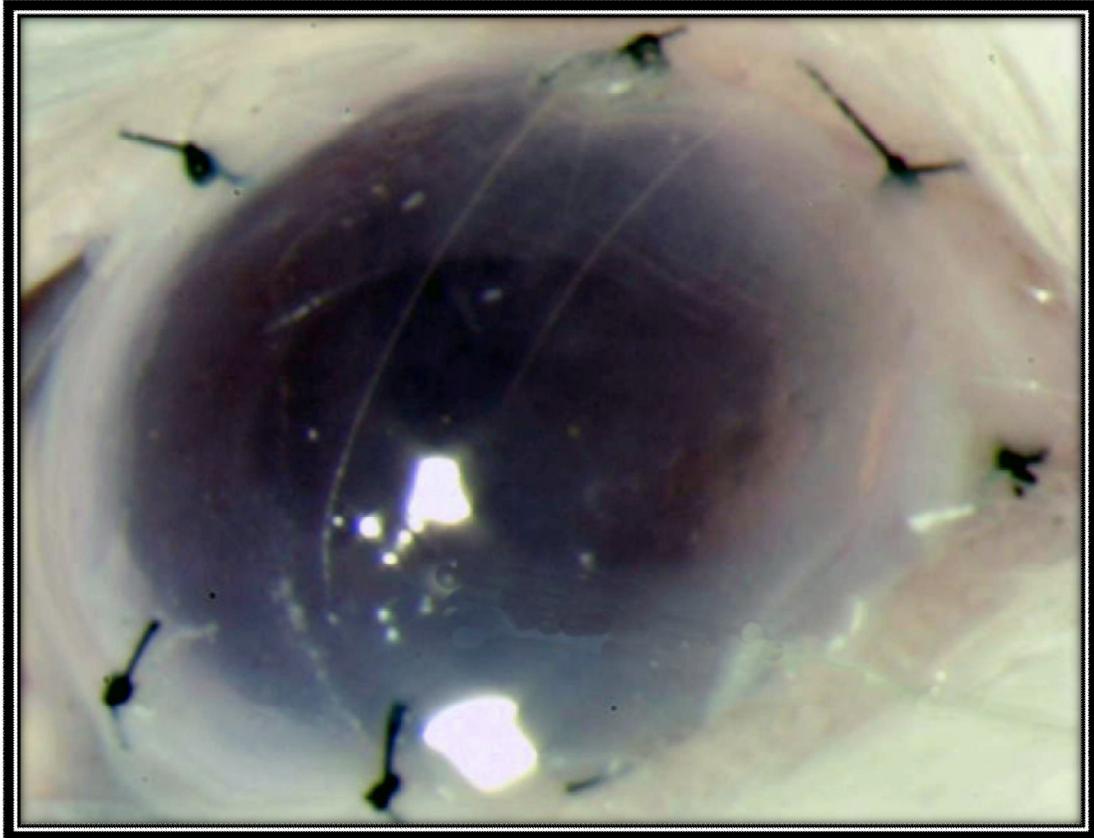
- Obtuvimos inducción de neovascularización corneal en 5 ojos (100%) de ratones C57BL/6 posterior a la realización de una quemadura corneal central con 1N NaOH, previa desepitelización corneal.
- La neovascularización corneal inducida ocupaba aproximadamente el 90% del diámetro corneal a los 14 días posteriores de la realización de la quemadura corneal central en los 5 ojos (100%) de los ratones C57BL/6 . (foto 1)
- Con las dosis anestésicas empleadas no se presentaron complicaciones durante ni posteriormente a la realización de quemadura corneal central con 1N NaOH en los ratones utilizados.
- Con el método descrito de obtención de la membrana amniótica y su posterior conservación en el medio Eagle-Dulbecco y glicerol 50% v/v a -80 grados, se obtiene tejido que puede ser presevado por largos periodos de tiempo.
- El transplante de membrana amniótica criopreservada sobre la córnea se logró realizar en los 5 ojos (100%) de ratones BALB/c, con la colocación de 8 suturas de nylon 10-0 a la conjuntiva bulbar. (foto 2)
- Los ratones BALB/c utilizados en el transplante de la membrana amniótica no sufrieron complicaciones durante ni posteriormente a la aplicación de las dosis anestésicas descritas.

- La transparencia de la membrana amniótica implantada fue observada en los 5 ojos (100%) de los ratones BALB/c desde el primer día de realizado el transplante. (foto 2)
- No se observaron datos de inflamación en los sitios de sutura colocados en la conjuntiva bulbar en los 5 ojos (100%) de los ratones BALB/c desde el primer día del transplante de la membrana amniótica.



Neovascularización inducida por quemadura química en córnea de ratón C57BL/6.

Nótese la gran neovascularización que ocupa aproximadamente el 90% del diámetro corneal, vista a los 14 días posterior a la realización de la quemadura química.



Modelo de membrana amniótica en córnea de ratón BALB/c un día post-transplante.
Nótese la gran transparencia de la membrana amniótica, que permite visualizar las estructuras intraoculares y ausencia de inflamación en los sitios de sutura.

9. DISCUSION

Los animales, particularmente los conejos y los ratones han demostrado ser modelos útiles para estudiar diversas patologías que afectan la córnea, como la queratitis bacteriana y la neovascularización corneal; aunque existen algunas desventajas cuando se usan especies con características diferentes a las de los humanos. Una de las diferencias más obvias es que la mayoría de los animales usados como modelos son consanguíneos. La ventaja de usar animales consanguíneos es la consistencia experimental; sin embargo, los animales consanguíneos no representan la población humana.

Diferencias menos obvias son las características anatómicas específicas, composición tisular y diferentes funciones de los componentes oculares en animales y humanos. Los humanos tienen un diámetro corneal de aproximadamente 11 mm, mientras que en los ratones mide 2.2-3.5 mm.^{68,69} El grosor corneal es mayor en los humanos que en los ratones y el intervalo de parpadeo para los humanos es aproximadamente 2.8 segundos, mientras que dicho intervalo para los ratones es de 30 segundos.⁷⁰

A diferencia del modelo de neovascularización corneal inducido por quemadura química descrito por Changyou Li y cols. de la Universidad de Qingdao, China, en el cual utilizaron ratones Balb/c de 6 a 8 semanas de edad, a los cuales les colocaron (previa anestesia con clorpromazina intraperitoneal y quetamina y aplicación tópica de hidrocloreuro de proparacaína al 0.5%), una pieza de papel filtro en forma de disco de 2 mm de diámetro sumergida por 15 segundos en una solución de NaOH a una concentración de 1mol/l en la

superficie corneal central durante 50 segundos para producir una quemadura circular, con posterior lavado inmediato con 30 ml de solución salina al 0.9 %, nosotros utilizamos ratones C57BL/6, de 4 semanas que fueron anestesiados vía intramuscular con hidrocloreuro de ketamina (100 mg/kg) y xylazina (5 mg/kg) además de utilizar gotas de proparacaína para anestesiarse la córnea (técnica similar a la descrita por Azar para anestesiarse los ratones en su modelo de neovascularización utilizado para la caracterización de los factores proangiogénicos VEGF y BFGF en la córnea, aunque él utilizó 40 mg/kg de peso de ketamina), realizamos una quemadura por álcali en el centro de la misma, la cual fue previamente desepitelizada, con un papel filtro impregnado con 1N NaOH y colocado durante 40 segundos en la córnea central ; se realizó un lavado de la córnea con abundante solución amortiguadora (PBS) para eliminar el exceso de álcali. El proceso de desepitelización se realizó en la córnea central en un diámetro de 2 mm sin dañar el estroma adyacente.

Valoramos la inducción de la NVC mediante un examen biomicroscópico 14 días después de la intervención quirúrgica, debido a que según los hallazgos de Li y cols. en su modelo de neovascularización inducido por quemadura corneal, el pico más alto de la expresión del gen S100A (proteínas involucradas en la neovascularización corneal inflamatoria), se desarrolló en el día 14. Por medio de un microscopio quirúrgico se tomaron fotos para ser evaluadas; se determinó el grado de NVC según el porcentaje del área de la córnea neovascularizada (Lu et al, 2009), a diferencia de lo reportado por Li y cols., quienes graduaron la neovascularización de 0 a 3, con incrementos de 0.5, usando un sistema de cuadrícula para cada cuadrante, basado en la

extensión centripeta de las ramas neovasculares desde el limbo y los puntajes para cada cuadrante fueron sumados para obtener el puntaje de neovascularización corneal (rango de 0 a 12).⁷¹

La claridad y avascularidad son importantes para el funcionamiento óptico apropiado de la córnea. Varios estudios han examinado el proceso de formación de nuevos vasos sanguíneos en la córnea desde el trabajo clásico de Arnold en 1872, mostró que los procesos vasculares utilizan las estrías de la sustancia del cemento intercelular para la neovascularización corneal. Recientes investigaciones se han enfocado sobre el entendimiento de los mecanismos que operan en mantener la avascularidad corneal bajo condiciones homeostáticas y en la curación avascular de la herida. Estos estudios sugieren que el privilegio angiogénico corneal involucra varias cascadas activas y no es un proceso pasivo.

La neovascularización corneal es una condición que amenaza la visión, usualmente asociada con desordenes inflamatorios o infecciosos de la superficie ocular.

Como ha sido demostrado en investigaciones de la angiogénesis en el cáncer, existe un balance ente los factores angiogénicos tales como el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y moléculas antiangiogénicas como la endostatina, angiostatina, y el factor derivado del epitelio pigmentado (PEDF) en la córnea^{6,7}.

Después de una lesión corneal, la herida sana frecuentemente sin neovascularización corneal; sin embargo, ésta puede ser inducida durante su reparación en algunas enfermedades inflamatorias, infecciosas, degenerativas o traumáticas⁸. Enfermedades asociadas con neovascularización corneal

incluyen enfermedades inflamatorias, rechazo de injerto corneal, queratitis infecciosa, hipoxia por uso de lente de contacto, quemaduras por álcali, úlcera estromal, aniridia, deficiencia de células limbales; en estas condiciones el balance entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos se inclina a favor de la neovascularización debido a una regulación a la alza de factores angiogénicos y/o hacia la baja de los factores antiangiogénicos.^{2,9,10}

Lu y cols. quienes examinaron la expresión del RNA mensajero de factores angiogénicos y antiangiogénicos en córneas de ratones WT después de inducir quemadura con álcali, encontraron que dicha lesión aumentaba la expresión de CCL3 y sus receptores, CCR1 y CCR5, junto con una infiltración transitoria de macrófagos positivos F4/80 y neutrófilos positivos Gr-1, concluyendo que la lesión producida por álcali en la córnea inducía un incremento masivo en la expresión del mRNA intraocular de un potente factor angiogénico, el VEGF, en ratones WT.⁷²

Desde la primera descripción hecha por Roth en 1940, quien utilizó la membrana amniótica para reparar defectos conjuntivales en pacientes con quemaduras con álcali, se ha tratado de darle uso en el tratamiento de defectos de la superficie ocular y es a partir de 1994 que Kim y Tseng, demostraron que la membrana amniótica podía ser utilizada para la reconstrucción de la superficie corneal en un modelo animal de conejos y establecieron una nueva metodología para la conservación de la misma; iniciando el desarrollo de nuevas aplicaciones quirúrgicas, la búsqueda y explicación científica de las propiedades inherentes y ventajas del empleo de membrana amniótica como injerto y/o tejido de soporte para el cultivo de diferentes tipos celulares.

La membrana amniótica humana es la capa más interna de la placenta, compuesta por tejido ectodérmico derivado de células columnares, es avascular, su grosor es de 0.02 a 0.5 mm y consiste en una sola capa de células epiteliales, una membrana basal gruesa y un estroma avascular. Su membrana basal contiene colágeno tipo IV, laminina 1, laminina 5, y fibronectina que juegan un importante rol en la adhesión epitelial corneal, promueven la diferenciación epitelial y previenen la apoptosis epitelial; el estroma avascular contiene factores de crecimiento, proteínas antiangiogénicas y antiinflamatorias e inhibidores de proteasas que proveen un micro ambiente no inflamatorio, reduce el crecimiento fibrovascular y la neovascularización anormal. También juega un papel importante en la señalización en la comunicación del estroma y el epitelio limbal; su epitelio produce factores antiinflamatorios y de crecimiento que benefician el tratamiento de las enfermedades inflamatorias corneales. Se absorbe después de ser transplantada en la superficie ocular dentro de 4-6 semanas y , se puede utilizar hasta después de 1 año de preparada, aunque algunos recomiendan almacenarla por un periodo de tiempo indefinido.^{43,73}

Múltiples estudios clínicos han demostrado su utilidad por sus reconocidas propiedades, entre las cuales se encuentran: regulación del transporte hidroelectrolítico, disminución del crecimiento bacteriano, escasa inmunogenicidad, promover una reepitelización adecuada, facilitar la migración de las células epiteliales, evitar la vascularización de la superficie corneal, impedir la apoptosis de las células epiteliales y actuar como inhibidor de la fibrosis entre otras.

10. CONCLUSIONES

Con la técnica de realización de una quemadura química por álcali, descrita en el presente estudio, es posible obtener un modelo de inducción de neovascularización corneal en ratones. Dicha técnica demostró ser sencilla, reproducible, económica y de fácil acceso a los animales de experimentación utilizados, en este caso, ratones C57BL/6.

También la técnica descrita para el trasplante corneal de membrana amniótica en ratones BALB/c permite realizar de manera fácil la colocación de la misma, demostrando también ser reproducible y con acceso fácil a los animales de experimentación utilizados.

Ambos modelos pueden tener utilidad, entre otras aplicaciones, en el estudio de nuevos tratamientos de las enfermedades que cursen con neovascularización corneal y con alteraciones de la superficie corneal en las que el uso de la membrana amniótica pueda utilizarse como tratamiento.

11. REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

1. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999;85:221-228.
2. Beck L Jr, D'Amore PA. Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997;11:365-373.
3. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* 2002;11:171-178.
4. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, et al. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *Embo J* 1999;18:3964-3972.
5. Cohen MM Jr. Vasculogenesis, angiogenesis, hemangiomas, and vascular malformations. *Am J Med Genet* 2002;108:265-274.
6. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27-31.
7. Chan CK, Pham LN, Zhou J, et al. Differential expression of pro- and anti-angiogenic factors in mouse strain-dependent hypoxia-induced retinal neovascularization. *Lab Invest* 2005;85:721-733.

8. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12:242-9. [PMID: 11507336]
9. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992;267:10931-10934.
10. Kato T, Kure T, Chang JH, et al. Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. *FEBS Lett* 2001;508:187-190.
11. Cogan DG. Corneal vascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962;1:253-261.
12. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998;17:611-613.
13. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, et al. Corneal neovascularization after penetrating Keratoplasty. *Cornea* 1995;14:604-609.
14. Lee P, Wang CC, Adamis AP. Ocular neovascularization: epidemiologic review. *Surv Ophthalmol* 1998;43:245-69.
15. Bazan HE. Cellular and molecular events in corneal wound healing: significance of lipid signaling. *Exp Eye Res* 2005;80:453-463.
16. Dimitri T. Azar. Corneal angiogenic privilege: angiogenic and

antiangiogenic factors in corneal avascularity, vasculogenesis, and wound healing. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2006;104:264-302.

17. Amano S, Rohan R, Kuroki M, et al. Requirement for vascular endothelial growth factor in wound and inflammation-related corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Visc Sci* 1998;39:18-22.

18. Kvant A, Sarma S, Fagerholm P, et al. Expression of matrix metalloproteinase-2 and vascular endothelial growth factor in inflammation-associated corneal neovascularization *Exp Eye Res* 2000;70:419-428.

19. Mastuygin V, Mosaed S, Bonazzi A, et al. Corneal epithelial VEGF and cytochrome P450 4 B1 expression in a rabbit model of closed eye contact lens wear. *Curr Eye Res* 2001;23:1-10.

20. Breier G. Angiogenesis in embryonic development-a review. *Placenta* 2000;21 Suppl A:S11-15.

21. Darland DC, D'Amore PA. Cell-cell interactions in vascular development. *Curr Top Dev Biol* 2001;52:107-149.

22. Ferrara N, Gerber HP. The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106:148-156.

23. Ng IO, Poon RT, Lee JM, et al. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma.

AM j Clin Pathol 2001; 116:838-845.

24. Ng YS, Rohan R, Sunday ME, et al Differential expression of VGF isoforms in mouse during development an in the adult. Dev Dyn 2001;220:112-121.

25. Masuda Y, Shimizu A, Mori T, et al. Vascular endothelial growth factor enhances glomerular capillary repair and accelerates resolution of experimentally induced glomerulonephritis. Am J Pathol 2001; 159:599-608.

26. Shima DT, Kuroki M, Deutsch U, et al. The mouse gene for vascular endothelial growth factor. Genomic Structure, definition of the transcriptional unit, and characterization of transcriptional and post-transcriptional regulatory sequences. J Biol Chem 1996;271:3877-3883.

27. Pal S, Datta K, Muhopadhyay D. Central role of p53 on regulation of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) expression in mammary carcinoma. Cancer Res 2001;61:6952-6957.

28. Sugihara T, Wadhwa R, Kaul SC, et al. A novel alternatively spliced form of murine vascular endothelial growth factor, VEGF 115. J Biol Chem 1998;273:3033-3038.

29. Olofsson B, Jeltsch M, Eriksson U, et al. Current biology of VEGF-B and VEGF-C. Curr Opin Biotechnol 1999;10:528-535.

30. Zhan HT, Scott PA, Morbidelli L, et al. The 121 amino acid isoform of vascular endothelial growth factor is more strongly tumorigenic than other splice variants in vivo. *Br J Cancer* 2000;83:63-68.
31. Zheng M, Deshpande S, Lee S, et al. Contribution of vascular endothelial growth factor in the neovascularization process during the pathogenesis of herpetic stromal keratitis. *J Virol* 2001;75:9828-9835.
32. Schlaeppli JM, Siemeister G, Weindel K, et al. characterization of a new potent, in vivo neutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:336-342.
33. Binetruy-Tournaire R, Demangel C, Malavaud B, et al. Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis. *Embo J* 2000;19:1525-1533.
34. De Roth A. Plastic Repair of Conjunctival Defects with Fetal Membranes. *Arch Ophthalmol.*1940;23:522-5.
35. Rodríguez Ares T. Membrana amniótica en enfermedades de la superficie ocular. *Arch Soc Oftalmol.* 2002;77:471-2.
36. Sorsby A, Simons HM. Amniotic Membrana Grafts in Caustic Burns of the Eyes (Burns of the Second Degree). *Br J Ophthalmol.* 1946;30:337-45.

37. Tomas J. Human Amniotic Membrane Transplantation: Past, Present and Future. *Ophthalmol Clin N Am.* 2003;16:43-65.
38. Kim JC, Tseng SC. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas. *Cornea* 1995; 14: 473-484.
39. Hyun Park Jung, Wook Jeoung Jin, L, Ryang Wee Won, Hak Lee Jin, Kum Kim Mee, Lim Lee Jae. Clinical Efficacy of Amniotic membrane transplantation in the treatment of various ocular surface diseases. *Contact Lens Anterior Eye* (2008), doi: 10.1016/j.clae.2007.11.004
40. Dekaris I, Gabric N. Preparation and Preservation of Amniotic Membrane. *Dev Ophthalmol.* Besel, Karger, 2009, vol 43, pp 97-104.
41. Azuara-Blanco Augusto, Pillai C T, S Dua Harminder. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction. *Br J Ophthalmol* 1999; 83:399.
42. Z. del Campo, O. Gris. Aplicaciones de la membrana amniótica en patología ocular. *Annals d'Oftalmologia* 2002;10, 3:128-141.
43. Dekaris I, Gabric N. Preparation and Preservation of Amniotic Membrane. *Dev Ophthalmol.* Besel, Karger, 2009, vol 43, pp 97-104.
44. J.R. Fontenla, X. Vázquez, P. Díaz, J. Gatell y D. Pita. Membrana amniótica. Características, efectos y aplicaciones en oftalmología. *Ciencia, tecnología y medicina.* 28 febrero-6 marzo 2003. VOL. LXIV N.º 1.465

45. Robson M, Krizek TJ. The effect of the human amniotic membranes on the bacterial population of infected rat burns. *Ann Surg* 1973;177:144.

46 S. Jain and A. Rastogi. Evaluation of the outcome of amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction in symblepharon. *Eye* 2004; 18:1251-1257.

47. Pérez Parra Zaida, Castillo Pérez Alexeide de la C., Escalona Leyva Elizabeth, López Hernández Silvia, Márquez Villalón Susana. Autoinjerto conjuntival versus injerto de membrana amniótica en la cirugía del pterigión primario. *Rev Cubana de Oftalmol* 2008; 21, 1.

48. Yasemin Arslan Katircioglu, Ugur Emrah Altıparmak, and Sunay Duman. Comparison of Three Methods for the Treatment of Pterygium: Amniotic Membrane Graft, Conjunctival Autograft and Conjunctival Autograft plus Mitomycin C. *Orbit* 2007; 26:5–13.

49. Ahmad Kheirkhah, Victoria Casas, Gabriela Blanco, Wei Li, Yasutaka Hayashida, Ying-Ting Chen, and Scheffer C. G. Tseng. Amniotic membrane Transplantation with Fibrin Glue for Conjunctivochalasis. *Am J Ophthalmol* 2007; 144:311–313.

50. Kiyotaka Kitagawa, Shuichiro Yanagisawa, Kazuhiko Watanabe, Tatsuya Yunoki, Atsushi Hayashi, Motonori Okabe, and Toshio Nikaido. A Hyperdry

Amniotic Membrane Patch Using a Tissue Adhesive for Corneal Perforations and Bleb Leaks. *Am J. Ophthalmol* 2009; 148:383-389.

51. Kim JC, Tseng SCG. The effects on inhibition of corneal neovascularization after human amniotic membrane transplantation in severely damaged rabbit corneas. *Korean J Ophthalmol* 1995;9:32.

52. Boudreau N, Werb Z, Bissell MJ. Suppression of apoptosis by basement membrane requires three-dimensional tissue organization and withdrawal from the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci* 1996;93:3500.

53. Boudreau N, Sympson CJ, Werb Z, et al. Suppression of ICE and apoptosis in mammary epithelial cells by extracellular matrix. *Science* 1995;267:891.

54. Kruse FE, Jousseaume AM, Rohrschneider K. Cryopreserved human amniotic membrane for ocular surface reconstruction. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2000;238:68.

55. Tseng SC, Li D, Ma X: Down-regulation of TGF β 1, TGF β 2, TGF β 3 and TGF β receptor II expression in human corneal fibroblasts by amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:428 S.

56. Kim TH, Lee DY, Rho JH, Rho SH, Yoo KW, Ahn HB, Yoo YH, Park WC. Application of newly developed amniotic membrane ointment for photorefractive keratectomy in rabbits. *Ophthalmic Res* 2006;38:58-61.

57. Li DQ, Tseng SCG. Three patterns of cytokine expression potentially involved in epithelial-fibroblast interactions of human ocular surface. *J Cell Physiol* 1995;163:61-79.
58. Tsubota K, Satake Y, Ohyama M, et al. Surgical reconstruction of the ocular surface in advanced ocular cicatricial pemphigoid and Stevens-Johnson syndrome. *Am J Ophthalmol* 1996;122:38.
59. Wang MX, Gray T, Park WC, et al. Corneal haze and apoptosis is reduced by amniotic membrane matrix in excimer laser photoablation in rabbits. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:
60. Park WC, Tseng SC. Modulation of acute inflammation and keratocyte death by suturing, blood, and amniotic membrane in PRK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2906.
61. Barton K, Budenz D, Khaw, et al. Amniotic membrane transplantation in glaucoma surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1997;38:S473.
62. Fukuda K, Chikama T, Nakamura M, et al. Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva. *Cornea* 1999;18:73.

63. Tseng SCG, Prabhasawat P, Lee S. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction. *Am J Ophthalmol* 1997;124:765.
64. Prabhasawat P, Barton K, Burkett G. Comparison of conjunctival autografts, amniotic membrane grafts and primary closure for pterygium excision. *Ophthalmology* 1997;104:974.
65. Shimakazi J, Shinokazi N, Tsubota K. Transplantation of amniotic membrane and limbal autograft for patients with recurrent pterygium associated with symblepharon. *Br J Ophthalmol* 1998;82:235.
66. Sellami D, Abid S, Bouaouaja G, Ben Amor S, Kammoun B, Masmoudi M, Dabbeche K, Boumoud H, Ben Zina Z, Feki J. Epidemiology and risk factors for corneal graft rejection. *Transplant Proc* 2007; 39:2609-11. [PMID: 17954190]
67. Dana MR, Streilein JW. Loss and restoration of immune privilege in eyes with corneal neovascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1996;37:2485-94.
68. S. Hayes, C. Boote, J. Lewis et al., "Comparative study of fibrillar collagen arrangement in the corneas of primates and other mammals," *Anatomical Record*, vol. 290, no. 12, pp. 1542–1550, 2007.
69. J. T. Henriksson, A. M. McDermott, and J. P. Bergmanson, "Dimensions and morphology of the cornea in three strains of mice," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 50, no. 8, pp. 3648–3654, 2009.

70. J. V. Jester, A. Budge, S. Fisher, and J.Huang, "Corneal keratocytes: phenotypic and species differences in abundant protein expression and in vitro light-scattering," *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, vol. 46, no. 7, pp. 2369– 2378, 2005.

71. Mary E. Marquart. Models of Bacterial Keratitis. Review article. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2011, Article ID 680642.

72. Peirong Lu, Longbiao Li, Yu Wu, Naofumi Mukaida, Xueguang Zhang. Essential contribution of CCL3 to alkali-induced corneal neovascularization by regulating vascular endothelial growth factor production by macrophages. *Molecular Vision* 2008; 14:1614-1622.

73. Hyun Park Jung, Wook Jeoung Jin, L, Ryang Wee Won, Hak Lee Jin, Kum Kim Mee, Lim Lee Jae. Clinical Efficacy of Amniotic membrane transplantation in the treatment of various ocular surface diseases. *Contact Lens Anterior Eye* (2008), doi: 10.1016/j.clae.2007.11.004.

12. ANEXOS

anexo 1

Handbook for the Use of Animals

In Biomedical Research

The Association for Research in Vision and Ophthalmology

Animals in
Research Committee
Third Edition

© 2009 by The Association for Research in Vision and Ophthalmology, Inc., Third Edition

12300 Twinbrook Parkway · Suite 250 · Rockville, Maryland 20852 · Telephone +1.240.221.2900 · Fax
+1.240.221.0370

Table of Contents

	Page Number
I Introduction	1
II. Protecting Yourself Against an Attack	3
Make Sure Your Research Complies with Applicable Federal and Local Regulations	3
Develop and Maintain an Animal Use Research Project File	3
Coordinate with Your Institutions	4
Establish Security Procedures	4
Use Care in Wording Your Research Documents	5
Write National and Local Law Makers Regarding the Importance of Using Animals in Research	5
III. Responding to Questions About Your Research	6
Contact Your Institutional Representative	6
Contact Your Program Director from Your Funding Source	6

Contact Professional Societies	7
IV. What ARVO Can Do For You?	8
<i>ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research</i>	8
ARVO Procedure for Defending Members	
Attacked by Animal-Rights Activists	8
Educational Materials	8
Annual Meeting Presentations	8
Networking	9
V. Recommended References	10
IV. Other Groups to Contact for information and Assistance	12
National/International Organizations	12
US Government Agencies	12
State Organizations	12
Other Resources	13

Introduction

Extreme acts from animal-rights activists have escalated recently to include personal attacks of researchers' homes, property and, in some cases, family members. The activities range from vandalism and harassment to attempted homicide. Detailed records of illegal activities committed in the name of "animal rights" are maintained by the Foundation for Biomedical Research (FBR), accessible on their education Web site's *Illegal Incidents Report*. The frequency and severity of the acts of terror against scientists underscores the importance of educating the public on the necessity of animal research as well as educating scientists on strategies to prepare for and cope with pressure from an animal-rights group.

Recent events prompted the passage of the Animal Enterprise Terrorist Act (AETA): an amendment to the Animal Enterprise Protection Act of 1992 (Title 18, Sec. 42 or the US Criminal Code) that provides enhanced protection of researchers and their families against intimidation and harassment.

Vision and ophthalmic scientists have faced a disproportionate amount of attention from animal-rights activists, and it seems probable that attacks on the research performed by members of the Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) will only intensify with time. This handbook has been prepared by the ARVO Animals in Research Committee to suggest proactive and reactive strategies for ARVO members who use animals in their research. This handbook contains the following sections:

Protecting yourself against an attack

- Reacting to questions about your research
- What ARVO can do for you?
- Other groups to contact for information and assistance
- Useful literature
- *ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research*

ARVO leadership considers the use of animals in research as one of the most important and critical issues facing scientists today. The use of living animals in properly designed vision research experiments is both ethical and obligatory to protect people and animals from visual diseases and defects. Investigators who use animals must assume responsibility for the proper scientific and ethical design of experiments. The members of this Committee urge ARVO members to

read this handbook and offer suggestions or additions for the next version. If you

are targeted by an animal-rights activist organization, please let ARVO Science Program & Policy staff know how we can help.

Anexo no. 2



Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Visual Research

Introduction

[Guidelines for the Design of Experiments](#)

[Guidelines for the Conduct of Experiments](#)

[Factors That Relate Specifically to the Conduct of Vision and Ophthalmology Experiments](#)

[Investigators Outside the United States](#)

[Recommended References](#)

Introduction

Research in vision and ophthalmology improves the quality of life. This improvement stems in part from progress in ameliorating human disease and disability, in part from advances in animal health and veterinary medicine, and in part from the enlargement of our understanding of human and animal life. Because so much of vision research is aimed at understanding the structure and function of complex and intricately connected biological systems, work with living animals is vital to continued progress in many areas of clinical and basic research on vision. The proper use of animals in research is an honorable and essential contribution to the improvement of human and animal lives.

Our concern for the humane treatment of animals obliges us always to establish that the potential benefits to human and animal health outweigh the cost in animal lives, and it is desirable for scientific societies such as The Association for Research in Vision and Ophthalmology to formulate guidelines for the humane use of laboratory animals in research.

The remainder of this document provides guidelines which are generally considered acceptable and reasonable by the biomedical research community. The guidelines are intended for the investigator who is responsible for the humane care and use of animals in research. The discussion deals mainly with warm-blooded vertebrates, but the principles can be applied generally. Ethical issues involving the use of any species should be considered in relation to the complexity of its central nervous system and its apparent awareness of its environment.

Guidelines for the Design of Experiments

The fundamental principle is that animals must not be subjected to avoidable distress or discomfort. The investigator's first concern must therefore be to avoid the use of animals when possible.

When it is established that animals must be used, the investigator's obligation is to minimize the animal's distress or discomfort, assessed by anthropomorphic judgments made by reasonable and prudent human observers. Although most research on animals causes little or no distress or discomfort, certain important scientific questions may demand experimental studies that inevitably give rise to discomfort or distress.

In such cases discomfort or distress must be minimized by careful experimental design involving the use of analgesics and/or anesthesia. There is no difference between distress and discomfort that result from the design of a study and distress or discomfort that are its unintended side effects. The investigator must therefore identify and eliminate all avoidable sources of discomfort or distress, taking advantage of veterinary expertise when necessary.

When designing studies that cannot be undertaken without animals, the investigator must justify the use of animals and the species and number needed to provide reliable information. Experiments should be designed to minimize the number of animals used and to avoid depletion of endangered species. Although a few experiments have a risk of unreliable results, advances in experimental methods, within-subjects designs, and modern statistical techniques all help reduce the number of animals used without compromising scientific quality.

Guidelines for the Conduct of Experiments

The quality of the information obtained through research depends in no small measure on the health and general condition of the animals used. Proper animal husbandry is fundamental to the success of any research effort that uses animals.

Research animals must be obtained and cared for in accordance with the recommendations of the [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#), Institute of Laboratory Animal Resources, the [Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals](#), and in Canada, the [Guide to the Care and Use of Experimental Animals by the Canadian Council of Animal Care](#) (if conducting research in Canada).

Experienced investigators can contribute very valuable information about the care of animals rarely used in the laboratory and about the use of animals in particular experimental situations.

Investigators in the United States must comply with relevant local, state and federal laws, including the [U.S. Animal Welfare Act](#), as amended, and its accompanying regulations. An Institutional Animal Care and Use Committee must review and approve the use of animals in vision research in the United States and Canada.

Surgery should be carried out or directly supervised by persons with appropriate levels of experience and training, and surgery performed on animals that will survive (for example, on animals intended for long-term studies) should be undertaken with careful attention to aseptic technique and prevention of infection. Major surgical procedures should be completed under anesthesia that will render the animal insensitive to pain. Muscle relaxants and paralytics have no anesthetic action and must not be used as a substitute for anesthesia. Postoperative care must include efforts to minimize discomfort and the risk of infection.

Some studies require surgical preparation of animals that are not intended to survive. In such cases the animals ordinarily should be maintained unconscious throughout the experiment. At the end of the experiment animals must be euthanized without recovering consciousness.

Where experiments require physical restraint and/or the withholding of food or water, the effects of which are not themselves the objects of study, care must be taken to minimize discomfort or distress and to ensure that good general health is maintained. Only when there is no alternative procedure should animals be subjected to immobilization or restraint to which they cannot be adapted readily. Whenever it is not inconsistent with good experimental design, the experimental schedule should include reasonable periods of rest and readjustment. In the rare cases where distress and discomfort are unavoidable attributes of a well-designed study, the investigator must, within the limits of the design, take all possible steps to minimize these effects and to minimize the duration of the procedure and the number of animals used.

ARVO will amend The Association for Research in Vision and Ophthalmology (ARVO) Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research pending changes to US ([ILAR, updates](#)) and EU guidelines ([FELASA](#) and [EU legislation](#)).

Factors That Relate Specifically to the Conduct of Vision and Ophthalmology Experiments

Besides the considerations generally applicable to all animal experiments, production of visual disability is a special animal welfare consideration that may apply to some vision research protocols. Visual disability of experimental animals may be either an intrinsic or an unplanned consequence of experimental design. In its definition of major survival surgery, [the Guide to the Care and Use of Laboratory Animals](#) includes any surgical intervention that has the potential for producing a permanent handicap in an animal that is expected to recover. Hence, any experimental procedure that results in, or has the potential to result in, a level of visual disability sufficient to disrupt an animal's normal daily activity should be considered a major survival procedure. Such procedures require appropriate justifications and suitable animal care accommodations.

Protocols involving bilateral survival ocular procedures require special consideration and justification, with particular attention to any visual consequences. Such procedures include bilateral ocular surgeries, whether performed simultaneously or sequentially, and any other experiments with the potential to affect vision bilaterally. [The Guide to the Care and Use of Laboratory Animals](#) recommends that animals not be subjected to multiple major survival surgical procedures unless they are related components of a particular research project. Accordingly, a visually disabling procedure should not be performed bilaterally unless the two procedures are related components of a specific project. As noted in [the Guide to the Care and Use of Laboratory Animals](#), cost savings alone is not an adequate justification for performing multiple survival surgical procedures.

Vision investigators are encouraged to distribute unrelated tissues to investigators in other research areas and, where practical, to obtain suitable ocular tissues from investigators working on other organs. This recommendation applies to all species.

Inherited disorders of the visual system are significant health problems for both humans and animals. Even so, the breeding of animals with genetic disorders leading to blindness needs specific justification. Investigators who breed genetically impaired animals are encouraged to share such animals and tissues with qualified investigators having complementary expertise, including those outside their own institution.

Investigators Outside the United States

Although the laws that regulate the care and use of animals in the United States are not directly applicable to citizens of foreign countries, ARVO endorses the policies in [the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals](#), the [Public Health Service Policy on the Humane Care and Use of Laboratory Animals](#) (revised 1986), and the [U.S. Animal Welfare Act](#), as amended. If ARVO is to support a vision scientist under scrutiny by animal activists, the vision science experiment involving animals must conform to the guidelines established in these documents, even though they are not necessarily enforceable by law in the country in which the experiment is performed. Additional references are below.

Recommended References

In addition to these Guidelines, the following references on the care and use of animals in vision research are recommended.

1. [The Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care \(AAALAC\) International](#): This site contains a listing of international regulations and resources by country.
2. [The Guide for the Care and Use of Laboratory Animals \(NRC1996\)](#) <!--[links to (<http://www.aaalac.org/resources/theguide.cfm>) and (<http://www8.nationalacademies.org/cp/projectview.aspx?key=48959>) and (http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/guide.shtml)]-->: main resource used by Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care's (AAALAC's) Council on Accreditation, also a primary reference on animal care and use (required if research is conducted with PHS funds).
3. [FASS Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Agricultural Research and Teaching](#)
4. [Guide to the Care and Use of Experimental Animals](#): Canadian Council on Animal Care Guidelines.
5. [Guidelines for the Care and Use of Mammals in Neuroscience and Behavioral Research](#), National Academies Press
6. [Institutional Animal Care and Use Committee Guidebook](#)
7. [NIH Anesthesia/Analgesia Formulary](#): Table of commonly used drugs at the National Institutes of Health (NIH) for pre-anesthesia, anesthesia, analgesia, sedation, tranquilization, and restraint of animal species.
8. [NIH 2008 Guidance for Researchers & Institutions](#): *Good animal care and good science go hand-in-hand*
9. [NIH Medical Research with Animals Website](#): The site contains information for researchers and institutions, as well as the general public, including a fact sheet on the benefits of biomedical research and a Frequently Asked Questions section.
10. [NIH Model Organisms for Biomedical Research](#)
11. [NIH Grants Policy Statement \(2003\)](#)
12. [NIH iEdison](#)
13. [Office of Laboratory Animal Welfare](#)

14. [Public Health Service \(PHS\) Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals.](#)
15. [Office of Lab Animal Welfare Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals Tutorial](#): a tutorial for new animal care and use committee members, institutional administrators, investigators, animal care personnel and veterinarians.
16. [USDA - Animal Welfare Act and Regulations](#): a document with regulations to improve animal care and use in research, testing, teaching, and exhibition.

For international members:

17. [Responsibility in the use of animals in bioscience research: Expectations of the major research council and charitable funding bodies](#): Medical Research Council guide for the use of animals.
18. [FELASA](#): Federation of European Laboratory Animal Science Associations.
19. [EU legislation on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes](#): legislation passed by the European Commission that governs the use of laboratory animals.