

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



**ASOCIACIÓN PARA EVITAR LA CEGUERA  
EN MÉXICO**

**HOSPITAL "DR. LUIS SÁNCHEZ BULNES"**



**TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL  
TÍTULO EN:**

**OFTALMOLOGÍA**

**TÍTULO DE TESIS:**

**EFFECTO DE LA EPIGALOCATEQUINA 3  
GALATO SOBRE LA  
NEOVASCULARIZACIÓN CORNEAL**

**AUTOR:**

**DR. AXEL OROZCO HERNÁNDEZ**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**AUTOR**

**DR. AXEL OROZCO HERNÁNDEZ**

**JURADO**

DR. DANIEL OCHOA CONTRERAS

PRESIDENTE

DR. ABELARDO A. RODRÍGUEZ REYES

SECRETARIO

DRA. VALERIA SÁNCHEZ HUERTA

VOCAL

DRA. SONIA CORREDOR CASAS

VOCAL

DRA. DOLORES RIOS Y VALLES

VOCAL

México, D.F., Agosto de 2011

## **DEDICATORIAS**

A Dios, porque cada día que me ha dado la oportunidad de vivir y disfrutar. Definitivamente sin su guía, no habría tenido todo lo que tengo.

A mis padres que definitivamente sin ellos no hubiese alcanzado los objetivos que me he impuesto, sin cuyo amor y educación no hubiese logrado sobrevivir esta vida.

A mi hermano y familia que siempre me han brindado su ayuda mediante experiencia y consejos.

Al Dr. Daniel Ochoa Contreras por su apoyo, asesoría y disposición al realizar esta tesis y durante toda la residencia.

A los Dres. Abelardo Rodríguez Reyes y Valeria Sánchez Huerta, por su apoyo, paciencia y asesoría a mi persona durante mi formación como especialista.

A mis sinodales por estar siempre dispuestos a apoyarme durante la residencia y en la realización de esta tesis.

# INDICE

INTRODUCCIÓN .....	4-6
SÍNTESIS DEL PROYECTO .....	7
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	8
JUSTIFICACIÓN .....	9
OBJETIVOS .....	10
HIPÓTESIS .....	11
MATERIAL Y MÉTODOS .....	12-16
RESULTADOS .....	17-21
DISCUSIÓN .....	22-23
CONCLUSIONES .....	24
BIBLIOGRAFÍA .....	25-26

# INTRODUCCIÓN

La angiogenesis o neovascularización es una de los factores más importantes en patologías crónico-degenerativas como diabetes, cáncer, aterosclerosis enfermedades cardiovasculares, retinopatía diabética y la neovascularización corneal.

Esta última es considerada como un importante problema de salud; en Estados Unidos se estima que 1.4 millones de pacientes, presentan neovascularización corneal secundaria a enfermedades inflamatorias, degenerativas o por trauma.<sup>1,2</sup>

La respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo son los principales desencadenante de la neovascularización. El daño corneal induce la activación e infiltración de células inflamatorias producen especies reactivas de oxígeno, factores pro-inflamatorios y angiogénicos como un mecanismo de respuesta celular.<sup>1-3</sup> Sin embargo el desbalance hacia la angiogenesis genera neovascularización y cicatrización, esta complicación no solo puede disminuir la agudeza visual sino también es un factor de riesgo para el rechazo inmunológico del trasplante de córnea.<sup>4,5</sup>

Las terapias antiinflamatorias para disminuir la neovascularización, con corticosteroides y actualmente las nuevas terapias antiangiogénicas son motivo de debate debido a los efectos adversos presentados por el uso continuo así como a los pobres resultados.<sup>5-7</sup> Actualmente, se han estudiado nuevas opciones

terapéuticas para inhibir la neovascularización usando tratamientos en basados en laser así como moléculas sintéticas antiangiogénicas.<sup>8,9</sup>

Por otro lado los antioxidantes naturales han mostrado tener un efecto benéfico en modelos in vitro e in vivo en cáncer así como en procesos inflamatorios debido en parte a la inhibición de la angiogenesis. Por ejemplo, La Epigallocatequina 3 galato (EGCG) es un flavonoide producido por el metabolismo secundario de la planta del te verde “Camellia sinensis” y es comúnmente utilizado por su excelente propiedad antioxidante en contra de los radicales libres de oxígeno.<sup>10,11</sup>

En estudios epidemiológicos, en animales y modelos in vitro, EGCG presenta excelentes propiedades antitumorales y antiinflamatorias, al inhibir la producción de oxido nítrico (NO) en el tejido afectado, además de suprimir factores proinflamatorios como IL-1, NF-kB e iNOS y angiogénicos como VEGF y MMP-2 y 9.<sup>11-14</sup>

Existen pocos reportes de los efectos de los flavinoides en la neovascularización corneal. Jousen y colb. Reportan los efectos antiangiogenicos de tres flavinoides (Genisteina, Fisetina y Luteolina) como tratamiento tópico en microemulsión, en un modelo de neovascularización por herida quirúrgica.

Por otro lado Cao y cao han demostraron que el consumo oral de EGCG inhibe la angiogenesis corneal. También EGCG ha presentado un efecto protector en las células ganglionares y células del epitelio pigmentado de la retina de ratas con reperfusión isquémica, regulando las vías apoptóticas e inhibiendo la

producción óxido nítrico, mostrando la potencialidad de EGCG como antioxidante sin efecto citotóxico.<sup>17, 18</sup>

En base a estos reportes podemos sugerir que la aplicación directa de EGCG sobre la superficie ocular puede inhibir diversos factores inflamatorios y angiogénicos similares a NF-κB, IL-1β, MMPs y productos del estrés oxidativo como NOS2 los cuales son semejante a los producidos durante la angiogenesis y proliferación de las células cancerosas.

Por lo tanto el presente estudio demuestra el efecto anti-inflamatorio y anti-angiogénico de EGCG en modelo animal con inflamación corneal inducida por alcali. La administración subconjuntival de EGCG produce inhibición de la vascularización corneal post-quemadura por álcali. El efecto anti-inflamatorio de EGCG podría ser utilizado como un tratamiento alternativo para disminuir o inhibir el crecimiento de vasos corneales, disminuyendo el alto riesgo de rechazo del botón corneal transplantado.

# SÍNTESIS DEL PROYECTO

Objetivo: Determinar el efecto de EGCG en la neovascularización corneal inducida por quemadura por álcali en ratas.

Material y Métodos: Estudio prospectivo, longitudinal, experimental. En un modelo de neovascularización corneal en ratas, se aplicó EGCG subconjuntival. Se formaron 4 grupos: Grupo 1 y 2: ratas Quemadas con aplicación 400 µg EGCG y solución salina, Grupo 3 y 4: ratas No quemadas con aplicación de 400 µg y solución salina, respectivamente. Se realizó análisis patológico con microscopio de luz.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

¿La administración subconjuntival de EGCG puede producir inhibición de la neovascularización corneal en un modelo animal con neovascularización e inflamación corneal inducida por quemadura con álcali?

# JUSTIFICACIÓN

La angiogenesis o neovascularización es uno de los factores más importante en patologías degenerativas o crónicas de la cornea y es considerada como un importante problema de salud a nivel mundial.

La respuesta inflamatoria y el estrés oxidativo son los principales desencadenantes de la neovascularización y el desarrollo de terapias antiinflamatorias y antiangiogénicas es motivo de extensa investigación. Actualmente, se han estudiado nuevos tratamientos antiangiogénicos usando moléculas tanto sintéticas como de origen natural.

Los antioxidantes naturales, como el flavinoide epigallocatequina 3 galato, han mostrado tener un efecto la inhibición de la angiogenesis. Por lo que es de relevancia estudiar la aplicación de EGCG sobre la superficie ocular para inhibir diversos factores inflamatorios y angiogénicos y productos del estrés oxidativo y demostrar los efectos anti-inflamatorio y anti-angiogénico de EGCG en un modelo animal con inflamación corneal inducida por alcali.

# OBJETIVOS

General:

- Determinar si la administración subconjuntival de EGCG produce inhibición de la neovascularización corneal post-quemadura por álcali

Específicos:

- Medir de manera cualitativa mediante el análisis histopatológico la respuesta inflamatoria y la neovascularización en corneas de ratas quemadas por álcali.
- Medir de manera semicuantitativa mediante el análisis histopatológico la respuesta inflamatoria y la neovascularización en corneas de ratas quemadas por álcali.

# HIPÓTESIS

General:

- La administración subconjuntival de EGCG produce inhibición de la neovascularización corneal post-quemadura por álcali.

Nula

- La administración subconjuntival de EGCG NO produce cambios de la neovascularización corneal post-quemadura por álcali

Alternativa

- La administración subconjuntival de EGCG produce cambios de la neovascularización corneal post-quemadura por álcali

# **MATERIAL Y MÉTODOS**

## **Diseño del estudio**

Se trata de un estudio experimental, de tipo Prospectivo, Transversal, y Comparativo.

## **Población**

En el presente estudio se utilizaron 20 ratas machos de la cepa wistar, con un peso de 180 a 220 gr. Los animales fueron proporcionados por el bioterio de la facultad de medicina de la UNAM. El cuidado y manejo de los animales se realizó de acuerdo a los estatutos de ARVO (American Research For Vision and Ophthalmology) y a las especificaciones técnicas para el cuidado de la producción y usos de animales de laboratorio descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999. Previa a la experimentación los animales se aclimataron por 7 días. Las cajas fueron acondicionadas a una temperatura de  $24 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , con un ciclo de iluminación alternante de 12 horas día/noche. Las ratas fueron alimentadas diariamente con libre acceso de purina (Chow 5001) y agua ad libitum.

## Método

Con anestesia general (pentobarbital sódico, 50 mg/kg) se produjo en todos los grupos de ratas estudiados una quemadura por álcali en la superficie de la córnea central del ojo derecho, La quemadura se produjo con la aplicación por 20 segundos, de un disco de papel filtro de 3 mm de diámetro impregnado con solución de NaOH al 1.0 N (fotografía 1). Posteriormente, para eliminar los remanentes alcalinos la córnea fue irrigada durante 60 segundos con solución salina balanceada (fotografía 2).



Fotografía 1



Fotografía 2

Para administrar la suspensión de EGCG se utilizó una jeringa tipo insulina con aguja calibre 30G. En el ojo izquierdo de todos los animales se administrará como placebo 20  $\mu$ l de solución salina balanceada (SSB) y usado como control normal de estudio (fotografía 3).



Fotografía 3

Setenta y dos horas post-quemadura, 20 ratas divididas en 4 grupos, fueron inyectadas subconjuntivalmente en el ojo derecho (OD). Grupo 1 y 2: ratas Quemadas con aplicación 400  $\mu$ g EGCG y solución salina, Grupo 3 y 4: ratas No quemadas con aplicación de 400  $\mu$ g y solución salina, respectivamente.

En todos los casos las ratas fueron sacrificadas con una sobredosis de anestesia (pentobarbital sódico).

Para evaluar la densidad o el calibre de los vasos corneales, así como los cambios morfológicos en los grupos de tejidos estudiados se realizó el análisis histopatológico con hematoxilina-eosina (H y E).

Los globos oculares fueron enucleados e inmediatamente fijados en una solución de formalina neutra al 10%, deshidratados en etanol y xileno y sumergidos en parafina (fotografía 4).



Fotografía 4

Posteriormente, el tejido ocular fue seccionado a 4  $\mu\text{m}$  de grosor a lo largo del ecuador. El tejido fue montado sobre laminillas y teñidas con H y E y, Subsecuentemente, los cambios morfológicos y la infiltración de células inflamatorias de la cornea fueron examinados bajo el criterio histológico estándar tales como el numero de neovasos formados, presencia de células inflamatorias, grupos de muerte celular, hinchazón y lisis celular.

La longitud y el radio de la neovascularización fueron fotografiadas con una cámara digital adaptada a un microscopio quirúrgico. Las imágenes fueron archivadas en una tarjeta de memoria con una extensión \*.jpg y transferidas a una computadora de escritorio. El área de neovascularización corneal fue cuantificado con NIH Image software (ver.1.62; disponible por ftp en [zippy.nimh.nih.gov/](ftp://zippy.nimh.nih.gov/) o <http://rsb.info.nih.gov/nih-image>; desarrollado por Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, MD). Se registró la media de tres mediciones, las cuales serán registradas por tres investigadores. El área de neovascularización será expresado como el porcentaje del área total de la cornea neovascularizada (Andrieu-Soler).

## **Análisis Estadístico**

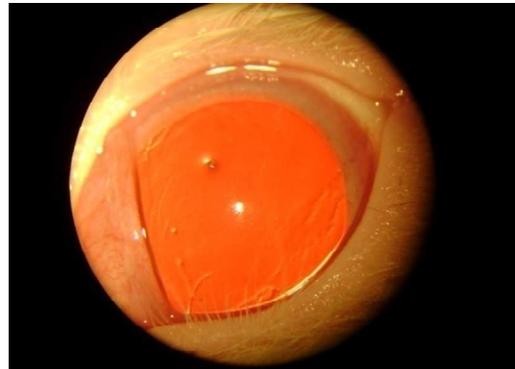
Los datos experimentales obtenidos fueron expresados estadísticamente de acuerdo a las variables dependientes e independientes anteriormente mencionadas. Se medirá promedio, media, mediana, desviación estándar y la media de la desviación estándar. Se realizará el análisis de varianza (ANOVA) seguido por una t student`s. Las diferencias estadísticas se consideraran significantes a un valor de  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS

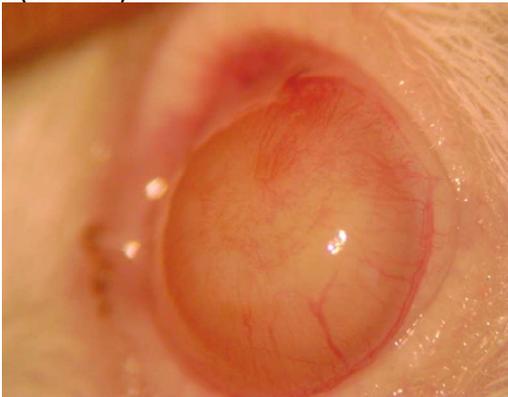
El análisis clínico de los grupo estudiados a 14 días post-quemadura mostró clínicamente que las ratas quemadas con la aplicación subconjuntival de 400  $\mu$ g de EGCG un edema leve con transparencia corneal y rezagos de una quemadura en centro de la cornea, sin la aparente formación de neovasos, en comparación con las ratas que se les aplicó solución salina, las cuales mostraron inflamación marcada así como neovascularización importante (figura 1).



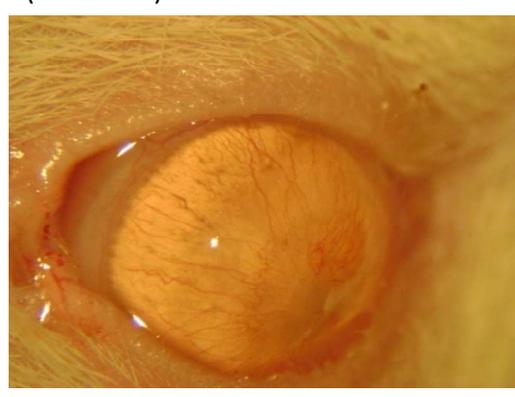
1. No Quemadas c/ SS  
(control)



2. No Quemadas c/ 400  $\mu$ m EGCG  
(Toxicidad)



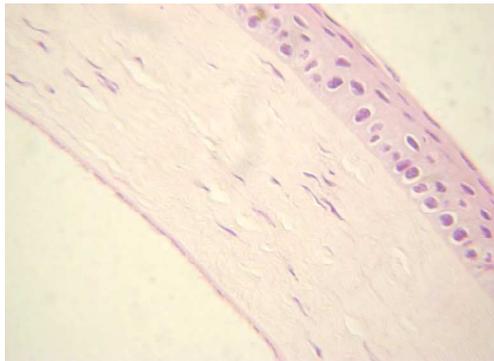
3. Quemadas c/ SS  
(comparativo)



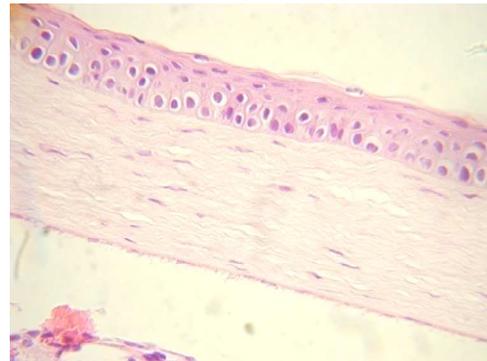
4. Quemadas c/ 400  $\mu$ m EGCG  
(Experimental)

Figura 1

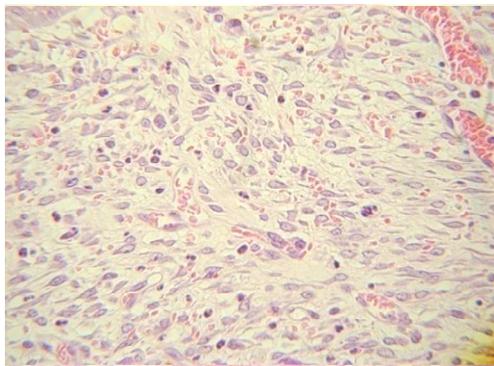
En los hallazgos histopatológicos se muestran escasas formaciones neovasculares e infiltrados inflamatorios. También se apreciaron escasas células endoteliales, aisladas celularidad inflamatoria escasa con segmentados y linfocitos con predominio de células linfoides, también se apreciaron células con cambios compatibles con apoptosis como picnocirosis y cariorexis (figura 2).



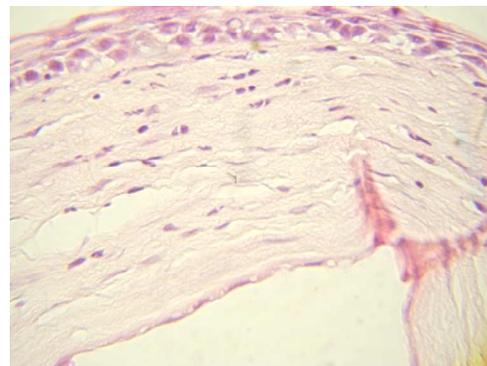
1. No Quemadas c/ SS 10x (control)



2. No Quemadas c/ 400 µm EGCG 10x (Toxicidad)



10x



10x

Figura 2

En comparación con el grupo de ratas quemadas con la aplicación subconjuntival de SSB es observado un edema leve, rezagos de la quemadura central y apreciación de formación neovasos hacia el centro de la cornea. Además en los cortes histológicos se muestra una afección de todo el espesor estromal

con presencia de neoformaciones vasculares caracterizadas por células endoteliales organizadas, con espacios lumbinales de tamaño variable y abundante infiltrado inflamatorio.

Se encontró infiltrado inflamatorio con numerosas células de fase aguda (segmentados) y subaguda (linfocitos), se encontraron múltiples células con cambios compatibles con apoptosis. Los grupos de ratas no quemadas pero tratados subconjuntivalmente con 400 µg de EGCG o SSB presentaron un aspecto normal, sin alteraciones clínicas o histológicas, los resultados semicuantitativos se muestran en la tabla 1.

Grupos n= 5	Numero de Vasos por campos* (rango)	Inflamación	Otras Características
1. No quemadas con SS	0	Sin inflamación	Normal
2. No Quemadas con 400µm EGCG	0.2 (0- 1)	Sin inflamación	Sin Datos de toxicidad
3. Quemadas con SS	55 (21- 75)	Moderada a Severa	Infiltrado mixto, granulomatoso, abundante, en estroma; Vasos abundantes, organizados
4. Quemadas con 400 µm EGCG	19 (9- 23)	Leve a Moderada	Inflamación mixta, figuras apoptóticas; Vasos escasos con luz estrecha

Tabla 1

En el análisis semicuantitativo de la neovascularización la comparación entre ratas quemadas a las que se les aplicó 400  $\mu\text{m}$  EGCG y el grupo control con solución salina balanceada se muestra en la tabla 2, las corneas tratadas presentaron cornea transparentes, leve edema, quemadura central, pero no se aprecian formaciones neovasculares (Tabla 2).

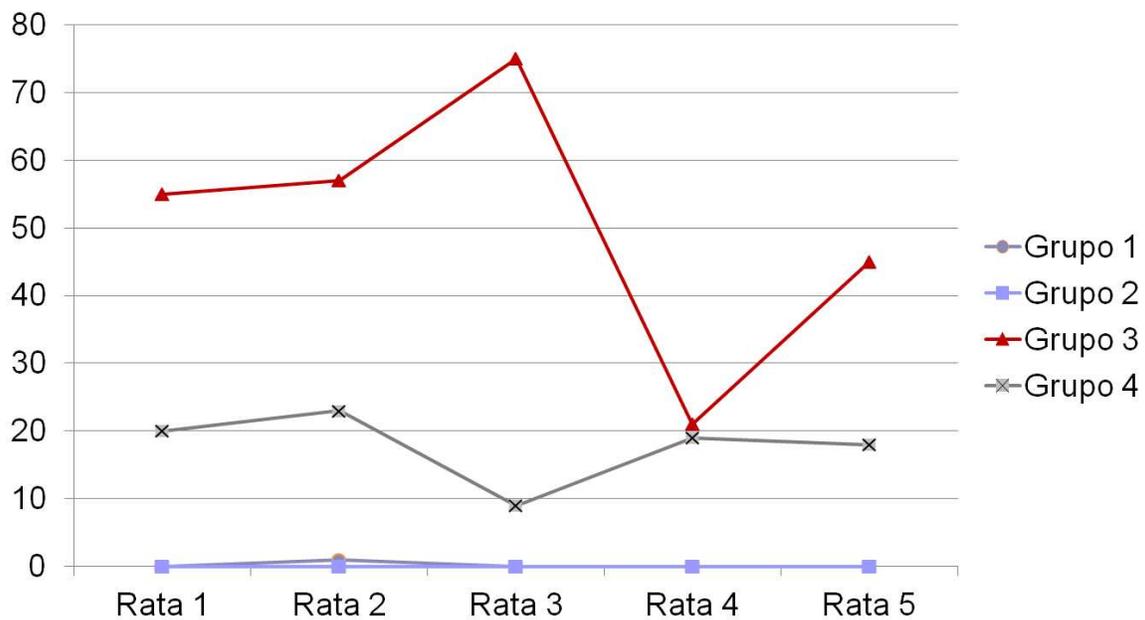


Tabla 2

En el análisis con microscópico de luz las ratas de los grupos 1 y 2 no presentaron neovasos, inflamación o apoptosis, ni alguna alteración estructural (figura 2).

El análisis estadístico de los grupos estudiados se observa que las medianas difieren entre los grupos 3 y 4 siendo menor el número de neovasos por campo para el grupo tratado con EGCG ( $P < 0.05$ ), análisis del número de vasos por campo que se muestra de manera gráfica en la tabla 3. La reacción inflamatoria general se valoró como ausente o presente, esta última dividida en leve, moderada y severa; describen estos hallazgos, encontrando una menor reacción inflamatoria en el grupo 4.

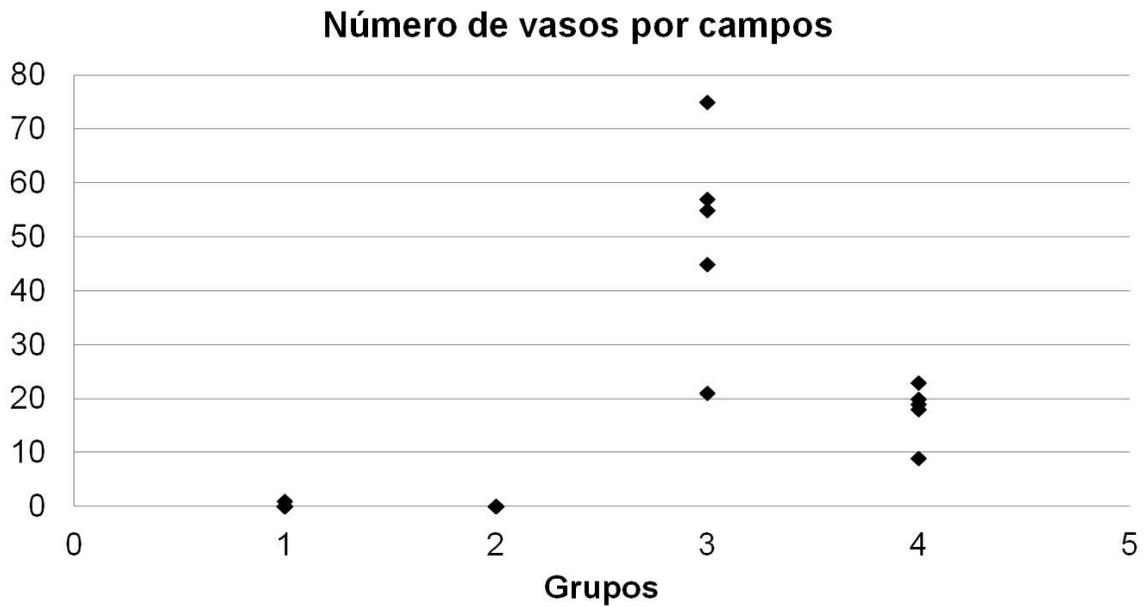


Tabla 3

## DISCUSIÓN

Interesantemente, en nuestro estudio piloto hemos demostrado que la aplicación subconjuntival de EGCG inhibe la neovascularización corneal en un modelo de inflamación corneal inducida por álcali. Hasta la fecha no se ha descrito el uso de EGCG via subconjuntival, quizás por el efecto adverso que EGCG puede presentar a altas concentraciones utilizadas disminuyendo el pH de la solución el cual podría ser considerado como una molécula pro-oxidante con formación de eritema sobre la superficie ocular.

Sin embargo la dosis manejada en este estudio fue inferior a lo reportado sin la aparente toxicidad de este flavonoide. Existe solo un reporte de del uso EGCG en neovascularización corneal. Cao y Cao describen en un modelo de neovascularización corneal inducido por VEGF la disminución de la neovascularización corneal con el consumo vía oral de EGCG en ratas.

Otro estudio usando el flavonoide genisteina y administrado via oral ha mostrado la inhibición de la neovascularización corneal disminuyendo la producción de VEGF.

En nuestro estudio, la aplicación subconjuntival es un método que provee una biodisponibilidad local teóricamente similar a las concentraciones plasmáticas encontradas en estudios epidemiológicos y en modelos animales con patologías neovasculares, ya que en la administración sistémica y su farmacodinamia depende de múltiples sistemas bioquímicos que no garantiza su biodisponibilidad a nivel corneal (Yihai y cols).

Por último nuestro análisis clínico e histopatológico, doble ciego muestran resultados prometedores para continuar el estudio de esta nueva molécula en la neovascularización corneal.

## CONCLUSIONES

La aplicación de EGCG subconjuntival reduce la neoformación de vasos y la inflamación en las corneas de las ratas quemadas, en comparación con los grupos controles.

La aplicación de EGCG subconjuntival no produce alteraciones o cambios a nivel histológico en corneas sanas.

Nuestros hallazgos sugieren que la EGCG es un agente quimiopreventivo de la neovascularización corneal con potencial uso clínico de relevancia.

# BIBLIOGRAFÍA

1. "Report of the organ transplant panel. Corneal transplantation. Council on Scientific Affairs". JAMA. 1998 259(5): 719-22.
2. Lee, P., C. C. Wang, et al. "Ocular neovascularization: an epidemiologic review." *Surv Ophthalmol* 1998. 43(3): 245-69.
3. Chang, J. H., E. E. Gabison, et al. "Corneal neovascularization." *Curr Opin Ophthalmol* 2001. 12(4): 242-9.
4. Wilson, S. E. and H. E. Kaufman (1990). "Graft failure after penetrating keratoplasty." *Surv Ophthalmol*. 1998 34(5): 325-56.
5. Cursiefen, C., B. Seitz, et al. "Angiogenesis and lymphangiogenesis in the cornea. Pathogenesis, clinical implications and treatment options." *Ophthalmologe*. 2003. 100(4): 292-9.
6. Penfold PL, Wen L, et al. "Triamcinolone acetonide modulates permeability and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression of the ECV304 cell line: implications for macular degeneration." *Clin Exp Immunol*. 2000 121: 458-465.
7. Phillips, G. D., R. A. Whitehead, et al. "Inhibition by methylprednisolone acetate suggests an indirect mechanism for TGF-B induced angiogenesis." *Growth Factors* 1992. 6(1): 77-84.
8. Baer, J. "Corneal argon laser photocoagulation for treatment of neovascularization." *Ophthalmology* 1992 (99): 173-179.
9. Manzano, R., G. Peyman, et al. "Inhibition of experimental corneal neovascularization by Bevacizumab(AVASTIN)." *Br J Ophthalmol*. 2006.

10. Balentine DA, Wiseman SA, and Bouwens LC. The chemistry of tea flavonoids. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 1997. 37:693–704.
11. Marietta K, Karl-Friedrich B, et al. Unravelling Green Tea's Mechanisms of Action: More Than Meets the Eye. *Mol Pharmacol.* 2004. 65:15–17.
12. Fotsis, T., M. S. Pepper, et al. "Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis." *Cancer Res.* 1997. 57(14): 2916-21.
12. Hanneken, A., F. F. Lin, et al. "Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death." *Invest Ophthalmol* 2006. *Vis Sci* 47(7): 3164.
13. Lin Y-L and Lin J-K. Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor KB. *Mol Pharmacol.* 1997. 52:465–472.
14. Suganuma M, Sueoka E, Sueoka N, Okabe S, and Fujiki . Mechanisms of cancer prevention by tea polyphenols based on inhibition of TNF-alfa expression. *Biofactors* 2000. 13:67–72.
15. Jousen, A. M., K. Rohrschneider, et al. "Treatment of corneal neovascularization with dietary isoflavonoids and flavonoids." *Exp Eye Res.* 2000. 71(5): 483-7.
16. Yihai Cao, Renhai Cao. Angiogenesis inhibited by drinking tea. *Nature.* 1999. Vol 398 p381.
17. Peng, P. H., M. L. Ko, et al. "Epigallocatechin-3-gallate reduces retinal ischemia/reperfusion injury by attenuating neuronal nitric oxide synthase expression and activity." *Exp Eye Res.* 2008. 86(4): 637-46.
18. Hanneken, A., F. F. Lin, et al.. "Flavonoids protect human retinal pigment epithelial cells from oxidative-stress-induced death." *Invest Ophthalmol.* 2005. *Vis Sci* 47(7): 3164-77.