



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO DE OFTALMOLOGIA "CONDE DE VALENCIANA" I. A. P.

EXPRESIÓN DE NUCLEOLINA EN FIBROBLASTOS CORNEALES

PROLIFERATIVOS INDUCIDOS POR FACTOR DE CRECIMIENTO

ENDOTELIAL VASCULAR

TESIS DE POSGRADO

Para obtener el diplomado de especialidad en:

OFTALMOLOGIA

PRESENTA:

DR. CARLOS EDUARDO ESTRADA REYES

ASESOR DE TESIS:

DR. YONATHAN OMAR GARFIAS BECERRA

MÉXICO D.F. 2014



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. José Luis Rodríguez Loaiza

Jefe de departamento de enseñanza

Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana” I.A.P.

Dr. Yonathan Omar Garfías Becerra

Tutor de tesis

Unidad de investigación

Instituto de Oftalmología Fundación “Conde de Valenciana” I.A.P.

ESTA TESIS SE LLEVÓ A CABO CON FONDOS DE DGAPA-PAPIIT NÚMERO DE
PROYECTO IA203514 y CONACyT Ciencia Básica 167438

Índice.

RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	6
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	10
HIPÓTESIS	10
JUSTIFICACIÓN	10
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
METODOLOGÍA	12
OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS LIMBO-CORNEALES (FLC):.....	12
TITULACIÓN DE ANTICUERPO PARA NUCLEOLINA:	12
WESTERN BLOT:.....	13
ENSAYO DE MTT PARA PROLIFERACIÓN CELULAR:.....	14
INMUNOCITOQUÍMICA:	14
IDENTIFICACIÓN DE NUCLEOLINA EN SUPERFICIE CELULAR POR CITOMETRÍA DE FLUJO:.....	15
DESARROLLO DE UN MODELO DE NEOVASCULARIZACIÓN:.....	16
RESULTADOS	17
OBTENCIÓN DE FIBROBLASTOS CORNEALES:	17
TITULACIÓN DE ANTICUERPO PARA NUCLEOLINA:	17
WESTERN BLOT:.....	17
INMUNOCITOQUÍMICA CON ANTICUERPO PARA NUCLEOLINA:	18
MEDICIÓN DE NUCLEOLINA DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO:	19
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN CON MTT:.....	19
DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE ANGIOGÉNESIS:	20
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIÓN	22
BIBLIOGRAFÍA	23
APÉNDICE	25

Resumen.

Expresión de nucleolina en fibroblastos corneales proliferativos inducido por factor de crecimiento endotelial vascular.

Introducción: La nucleolina es una de las proteínas no ribosomales del núcleo, con un peso molecular de 100kDa. Su función depende de la localización y su expresión en el núcleo se asocia con la proliferación celular debido a su función en la transcripción y maduración del RNA, en el citoplasma funciona como molécula de transporte al núcleo y regula la transcripción del mRNA. Recientemente se ha reportado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) induce la expresión de esta molécula transmembranal en células tumorales y en procesos angiogénicos, demostrando que la inhibición selectiva de la nucleolina de superficie inhibe la neovascularización.

Métodos: Los Fibroblastos limbo-corneales (FLC) fueron tomados de donadores cadavéricos. La expresión de la nucleolina en estos fue demostrada por citometría de flujo. Los FLC fueron cultivados en presencia de diferentes concentraciones de rhVEGF165 por 24hr. Su concentración se determinó por western blot y su distribución por inmunocitoquímica.

Resultados: La nucleolina fue constitutiva en FLC, la citometría de flujo demostró una positividad a esta proteína, corroborado por la expresión total de nucleolina en western blot, interesantemente cuando son estimulados con rhVEGF165 las

concentraciones de esta proteína varían según el estímulo, mostrando el punto máximo de expresión a 100ng/ml de VEGF.

Conclusiones: Tomando todos los resultados en cuenta los FCL son susceptibles a la estimulación de rhVEGF165, siendo este capaz de inducir proliferación y cambios en la distribución de esta proteína.

Introducción

La nucleolina (C23) es una proteína multifuncional que se une a RNA y se dimeriza con otras proteínas, se expresa de manera ubicua en células eucariotas en fase proliferativa. Está involucrada en procesos de transcripción, crecimiento y proliferación celular. La nucleolina se ha encontrado en diversos compartimentos celulares: en el núcleo donde controla diferentes mecanismos del metabolismo del DNA y RNA; en el citoplasma sirve como transportadora de proteínas y tiene una función muy importante en la regulación postranscripcional del mRNA; y su localización transmembranal sirve como receptor de varios ligandos, como factores de crecimiento y partículas virales.^{1,2,3,4} Desde el primer reporte de la expresión membranal de la nucleolina en células de hepatocarcinoma, nuevas evidencias han sugerido que la expresión en la superficie celular de la nucleolina está involucrada en la proliferación celular, crecimiento de células tumorales y recientemente se ha descrito su función en la angiogénesis.⁵ Un aumento en la expresión de la nucleolina de superficie celular se ha reportado en linfocitos activados de órganos linfoides, en superficies de tumores, así como en células endoteliales, determinando que la nucleolina de superficie es un marcador de vasos sanguíneos angiogénicos.^{6,7,8,9} El proceso de translocación de la nucleolina del núcleo a la membrana celular no se conoce del todo, sin embargo, se ha reportado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y la adherencia a la matriz extracelular estimula la expresión membranal de la nucleolina en células endoteliales.⁸

Actualmente se ha descrito que el péptido tumoral F3 que se une de igual manera a células tumorales que a células endoteliales, se internaliza debido a la nucleolina de superficie, mientras que la endostatina que inhibe la angiogénesis se une a la nucleolina de superficie de células endoteliales antes de su translocación al núcleo e inhibe la fosforilación de la nucleolina nuclear que es la responsable de la proliferación de las células endoteliales.^{7, 10} En consecuencia, el bloqueo funcional o la regulación negativa de la nucleolina membranar inhiben la migración de células endoteliales y previenen la formación de túbulos capilares.⁸ De la misma forma, se han utilizado diferentes compuestos para el tratamiento anti-angiogénico que se encuentran dirigidos contra la nucleolina de superficie, como el anticuerpo NCL3, el pseudopéptido HB-19, y un aptámero denominado AS1411; todos ellos tienen funciones antiangiogénicas.^{6, 7, 11, 12}

Por otro lado, la claridad corneal y la avascularidad son dos características elementales para mantener un sistema óptico eficiente en la córnea.¹³ Investigaciones recientes se han enfocado en entender los mecanismos que determinan el proceso de avascularidad corneal en condiciones fisiológicas y en procesos de cicatrización avascular. Estos estudios han determinado que el privilegio angiogénico corneal está mediado por la activación de diversas moléculas y que no se trata de un proceso pasivo.^{14, 15, 16, 17} La neovascularización corneal (NVC) se genera a partir del brote de nuevos vasos que provienen esencialmente de los capilares y vénulas del plexo pericorneal.^{15, 18, 19, 20} Tres entidades clínicas de NVC deben ser tomadas en cuenta cuando se estudia este fenómeno: (1) NVC profunda sobre la membrana de Descemet, observada en queratitis herpética; (2) NVC estromal asociada a la mayoría de queratitis estromales y (3) pannus vascular,

compuesto de tejido conectivo proliferando en la periferia de la córnea superficial y principalmente asociado con enfermedades de la superficie ocular.^{13, 21, 22, 23} La NVC es una condición que predispone a la ceguera comúnmente asociada a una respuesta inflamatoria o a infecciones de la superficie ocular. Existen tres mecanismos involucrados en la regulación de la neovascularización: vasculogénesis o formación de nuevos vasos a partir de angioblastos, principalmente durante la embriogénesis; reclutamiento de células endoteliales vasculares; y angiogénesis o la formación de nuevos vasos a partir de estructuras vasculares pre-existentes.^{20, 24, 25, 26, 27} La angiogénesis es un proceso común en el crecimiento tumoral, en enfermedades corneales y retinianas. En el proceso de angiogénesis corneal al igual que en la angiogénesis tumoral, existe un desequilibrio entre las moléculas anti-angiogénicas reguladas negativamente y los factores angiogénicos, regulados positivamente.¹⁸ Es por esta razón que se han desarrollado diversos fármacos que regulan negativamente a las moléculas responsables de la angiogénesis. El bevacizumab es una inmunoglobulina humanizada recombinante dirigida en contra del VEGF y que se ha utilizado como agente terapéutico en el cáncer colorectal teniendo como función primaria la inhibición de la angiogénesis tumoral.^{29, 30} Sin embargo, desde el año 2005, se ha estado aplicando este fármaco en el tratamiento de enfermedades oculares relacionadas con la angiogénesis por ejemplo en la degeneración macular relacionada con la edad y en la neovascularización coroidea, entre otras.^{31, 32, 33} Recientemente, se han reportado estudios para observar el efecto del bevacizumab en enfermedades de la superficie ocular específicamente en pterigión y en neovascularización corneal con resultados controversiales.^{34, 35, 36} Es

por esta razón que es necesario investigar acerca de nuevas alternativas de tratamiento para la NVC.

A manera de determinar vías alternas de angiogénesis en la superficie ocular, es importante buscar la presencia de estas proteínas relacionadas a los procesos neovasculares en los tejidos oculares como la córnea, así como la dinámica que se presenta al ser activada por un estímulo angiogénico y posteriormente identificar el efecto de la inhibición funcional de la nucleolina de membrana en células endoteliales de córnea neovascularizada, situación que está aún por determinarse.

Pregunta de investigación.

¿Es la núcleolina una proteína que se sobre-expresa en los fibroblastos limbo-corneales inducidos con factor de crecimiento endotelial vascular?

Hipótesis.

Si las células endoteliales de los neovasos de córnea expresan la núcleolina de superficie, la inhibición funcional de esta molécula promoverá un efecto anti-angiogénico.

Justificación.

La identificación de la expresión de núcleolina en células como los fibroblastos limbo-corneales y el estudio de esta proteína en dichas células estimuladas con factor de crecimiento endotelial vascular, nos indica la relación de la núcleolina con el proceso proliferativo y su posible importancia en la neovascularización como proceso patológico.

Objetivos.

Objetivo General.

Identificar la expresión de núcleolina en fibroblastos limbo-corneales inducidos con factor de crecimiento endotelial vascular, su distribución y dinámica dentro de estas células.

Objetivos específicos.

1. Identificar la presencia de núcleolina en fibroblastos limbo-corneales por citometría de flujo.
2. Identificar la cantidad de núcleolina en extractos lisados totales de fibroblastos inducidos a diferentes concentraciones de VEGF y observar si se presentan cambios.
3. Identificar por medio de inmunocitoquímica la presencia y distribución de núcleolina en fibroblastos limbo-corneales estimulados a diferentes concentraciones de factor de crecimiento endotelial vascular.

Metodología.

Obtención de fibroblastos limbo-corneales (FLC):

Para la obtención de fibroblastos limbo- corneales se utilizó un rodete limbo-corneal humano; se retiró cuidadosamente el iris, Descemet y excedentes de esclera. El tejido resultante se incubó con dispasa-II 1:2 UI/ml, por 15 min a 37°C. Se colocó el rodete sobre una base para realizar cortes de 2x2mm, ubicando cada sección de tejido en un pozo distinto de una placa de 24 pozos, se incubó el tejido por 45 min a 37°C, se adicionó 25µl de suero fetal bovino dejando 24 h a 37° C para permitir que las células se adhirieran. Posteriormente se agregó medio DMEM/F12 suplementado al 10% con suero fetal bovino, penicilina y estreptomicina al 1%, que se cambió cada tercer día hasta observar una confluencia celular del 80%. Se crecieron en botellas de cultivo de 25cm².

Titulación de anticuerpo para nucléolina:

Para determinar la cantidad necesaria de anticuerpo en la tinción de los fibroblastos limbo-corneales se obtuvieron 5 tubos eppendorf de 1.5ml con 5×10^4 células cada uno, posteriormente se fijaron con paraformaldehído al 4% durante 10min, se permeabilizaron con saponina, se tiñeron con 5µl de anticuerpo primario para conejo anti-núcleolina humana en las siguientes concentraciones, 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, de una solución stock de 1.6mg/ml por una hora, se lavaron con PBS y tiñeron con 20µl por una hora de anticuerpo secundario 1:50 (allophycocyanin- conjugated

affinepure F donkey anti-rabbit IgG), se lavaron con PBS y finalmente fueron adquiridas por citometría de flujo.

Western blot:

Se tomaron 4 botellas de cultivo de 25cm² y se sembraron fibroblastos limbo-corneales esperando una confluencia del 95%, posterior a esto se agregó a cada caja de cultivo DMEM/F12 Ssuplementado con SFB al 10% con 0ng, 1ng, 10ng y 100ng/ml de rhVEGF165 respectivamente por 24 horas.

1. Se obtuvieron las proteínas totales de los FLC, se determinó la concentración de proteína mediante el método de Lowry y se normalizó a 1µg/µl 1:4 con buffer de carga, se mantuvieron a -20 °C hasta su uso.
2. Se preparó un gel de poliacrilamida al 10%, en el que se separaron las proteínas por peso molecular.
3. Posteriormente, las proteínas fueron electrotransferidas a una membrana de nirocelulosa. Se corroboró la presencia de proteínas tiñendo la membrana con rojo de Ponceau S.
4. La membrana se incubó con el anticuerpo primario 1:3000 durante toda la noche, se lavó dos veces con amortiguador de lavado, se incubó con el anticuerpo secundario unido a biotina 1:10000 durante 2h a temperatura ambiente, se lavó dos veces con amortiguador de lavado, se incubó con un anticuerpo anti-biotina conjugado a peroxidasa. La reacción se reveló con

líquido de quimioluminiscencia y se observó en un fotodocumentador. Se normalizó la cantidad de nucleolina con respecto a GAPDH.

Ensayo de MTT para proliferación celular:

Se sembraron en una placa de 96 pozos 2×10^3 células por pozo en 64 pozos esperando a que se adhirieran, fueron inducidos en grupos de 16 pozos con 200 μ l de DMEM/F12 suplementado al 10% de SFB a diferentes concentraciones de VEGF (0ng, 1ng, 10ng, 100ng/ml). Se retiró el sobrenadante de 4 pozos de cada grupo a diferentes tiempos 8, 12, 24 y 48h respectivamente realizando lo siguiente para su análisis:

1. Se retiró el sobrenadante del grupo correspondiente y se agregó 20 μ l de MTT (1:10 sol. stock 6.6mg/ml) por 3hrs
2. Se retiró y agregó 100 μ l de HCL/isopropanol a 0.04M.
3. Se realizó lectura por colorimetría.

Inmunocitoquímica:

Se sembró en una placa de 24 pozos, 4×10^4 células por pozo con DMEM/F12 suplementado al 10% de SFB sobre cubreobjetos redondos previamente esterilizados, esperando a que se adhirieran y confluyeran a un 50%. Posterior a que las células se adhirieran se utilizó un pozo como control al cual no se le agregó rhVEGF165 y se tomaron tres pozos más para añadir rhVEGF165 a concentraciones de 1, 10 y 100ng/ml,

respectivamente durante 24 h. Los pozos se fijaron con paraformaldehído al 4%, durante 10 minutos a temperatura ambiente. Una vez fijadas las células se lavaron con PBS 5 minutos a temperatura ambiente en agitación continua. Se bloqueó la peroxidasa endógena durante 5 min a TA. Se agregó el anticuerpo anti-nucleolina 1:1000 durante 1h a TA; se retiró el sobrenadante y se lavó dos veces con amortiguador de lavado, se incubó por 30 minutos a TA con anticuerpo universal, se retiró el sobrenadante y se lavó dos veces con amortiguador de lavado, se incubó con anti-biotina peroxidasa durante 30 minutos a TA, se lavó dos veces con amortiguador de lavado y se reveló diaminobenzidina. Finalmente se contra tiñó con hematoxilina. Las muestras se observaron al microscopio de luz.

Identificación de Núcleolina en Superficie Celular por Citometría de Flujo:

Los FLC fueron sometidos a diferentes condiciones de cultivo, durante 30min, 1, 2, 4, 12 y 24h respectivamente para ser leídos por citometría de flujo.

1. Para la preparación de los pozos con fibronectina:
 - a. Se tomó 3 μ l de la solución stock de fibronectina (solución stock 1mg/ml) y se diluyó en 1ml de PBS, se incubó a 37°C con esta solución durante 1h.
 - b. Se bloqueó la fibronectina con 0.1% de albumina sérica bovina en PBS por 1h a 37°C y posteriormente se lavo con PBS.
 - c. Se sembraron las células
2. Para la inducción con VEGF:
 - a. Se preparó la solución para inducir a los FLC con 10ng/ml de VEGF diluido en DMEM F12 suplementado al 10% de SFB (se adicionó 500 μ l por pozo).

3. Se realizaron cultivos con VEGF y fibronectina.
4. Para la tinción con citometría de flujo se fijaron las células obtenidas con paraformaldehído al 4% y se incubaron con anticuerpo primario y secundario 1:50 respectivamente como se explica en la titulación de anticuerpo.

Desarrollo de un modelo de neovascularización:

Todos los animales del estudio fueron tratados según la guía de cuidado y uso de animales de laboratorio y en estricto régimen de los estatutos de uso de animales de investigación en oftalmología y visión según ARVO. El modelo de neovascularización corneal, se realizó en ratones C57/BL6J a partir de una quemadura química con NaOH. Los ratones fueron anestesiados vía intraperitoneal con una inyección combinada de Ketamina/Xilazina (50mg/kg y 5mg/kg, respectivamente), además se utilizó anestesia tópica (Clorhidrato de tetracaina 0.5g/100ml). Para la inducción de la neovascularización se retiró el epitelio corneal con una navaja de bisturí número 15 aplicando después una pieza de 2mm de papel filtro con NaOH 1N por un periodo de 50 segundos en el ojo derecho, finalmente se retiró el exceso de NaOH irrigando con solución salina balanceada.

Resultados.

Obtención de fibroblastos corneales:

Al incubar el tejido limbo-corneal se observa una expansión de células que paulatinamente toman una morfología de fibroblastos (figura. 1), célula en forma de huso, disminuyendo de grosor a la periferia, sin conexiones entre célula-célula o algún patrón de distribución aparente (figura. 2).

Titulación de anticuerpo para nucleolina:

Se observó una tinción adecuada cuando se utilizó el anticuerpo primario 1:50 demostrando una positividad de tinción de más del 74% de las células a este anticuerpo específico para nucleolina (figura. 3).

Western blot:

Realizando un índice nucleolina/GAPDH se observó un decremento en la cantidad de proteína de las muestras tratadas con 1ng y 10ng/ml de rhVEGF165 por 24h, en contraste con aquellas muestras tratadas con 100ng/ml de rhVEGF165 donde se observa una cantidad de nucleolina parecida a la muestra no estimulada con factor de crecimiento endotelial vascular (Figura. 4).

Inmunocitoquímica con anticuerpo para núcleolina:

En esta parte, se observó una clara diferencia entre aquellas células que fueron tratadas con el anticuerpo para núcleolina y aquellas que sirvieron como control, procesadas de igual manera, con excepción del anticuerpo primario para núcleolina. En esta tinción se observa a la nucleolina teñida en tonalidad sepia y los núcleos con hematoxilina de color azul.

Las células estimuladas a concentraciones de 10 y 100ng. respectivamente de VEGF, toman una distribución organizada en hilera, también fueron claros los cambios observados de distribución de la núcleolina entre las células tratadas a diferentes concentraciones, infiriendo que los fibroblastos corneales al ser estimulados con VEGF producen cambios en la localización de esta proteína.

En los FLC que no fueron estimulados con VEGF se presentó de manera alternante células donde la núcleolina se ve localizada de forma difusa en núcleo y otras en las que se encuentra en el citoplasma, con los núcleos vacíos teñidos con hematoxilina, dando la impresión que estas células se encuentran en varias fases (Figura. 5).

En los fibroblastos corneales estimulados con 1ng/ml de VEGF se presentó una distribución de la núcleolina más homogénea, con los nucléolos bien definidos teñidos de sepia (Figura. 6).

En los fibroblastos corneales estimulados con 10ng/ml de VEGF se formaron hileras de células, teñidos de sepia se observan los nucléolos a los polos del núcleo, alternando células donde la nucleolina se marca en la membrana nuclear (Figura. 7).

En los fibroblastos corneales estimulados con 100ng/ml de VEGF se formaron células nuevamente en disposición lineal y los núcleos no se tiñeron, observándolos de azul por la hematoxilina (Figura. 8).

Medición de nucleolina de superficie por citometría de flujo:

Con la medición de nucleolina en superficie celular se observó una mayor expresión de esta proteína en la membrana de aquellas células estimuladas con factor de crecimiento endotelial, fibronectina sérica bovina y VEGF/fibronectina comparada con la tinción de nucleolina de aquellas células sin estimulación, Se muestra un pico a las 4 horas del estímulo en el histograma de contorno verde sobre las células no estimuladas en morado (Figura. 9) y un descenso posterior a las 12hrs.

Ensayo de proliferación con MTT:

Pasando las mediciones por colorimetría a Excel se realizaron promedios y por medio de prueba de T de student se demostró que incluso a 1ng/ml existe una inducción de la proliferación por el rhVEGF165 en fibroblastos corneales con $p=0.03$.

Desarrollo de un modelo murino de angiogénesis:

Se realizó el modelo de neovascularización como se especifica en el apartado de metodología, donde se observó el inicio del proceso vascular dos días posteriores a la quemadura, con un pico de neovascularización entre los ocho y diez días; En la figura 10 del apéndice se aprecia el modelo de neovascularización murino 4 meses posteriores a la agresión corneal.

Discusión.

Tomando todos nuestros resultados en conjunto se sugiere que los fibroblastos limbo-corneales expresan la nucleolina de forma constitutiva, lo que indica que esta molécula podría tener una función en los de fenómenos sobrevivencia celular antes mencionado por Hovanessian AG y Cols. Además, estas células son susceptibles a la estimulación con factor de crecimiento endotelial vascular, indicando que existen receptores para VEGF en fibroblastos limbo-corneales, estos datos concuerdan con los reportados por Berthaut A y Cols., donde demuestran la presencia del receptor para VEGF en estas células. Interesantemente, la estimulación de los fibroblastos limbo-corneales con VEGF induce la translocación de la nucleolina de citoplasma a núcleo, este fenómeno se encuentra relacionado estrechamente a la proliferación celular. Por otra parte, en el presente estudio se observó que el VEGF y la fibronectina son dos factores que inducen la expresión de nucleolina en superficie celular de fibroblastos limbo-corneales, alcanzando un pico máximo de expresión de membrana a las 4h, sugiriendo que la nucleolina de superficie forma parte de un evento de expresión temprana en proliferación celular, estos datos coinciden con los resultados descritos por Huang Y y cols, donde se propone un sinergismo entre proteínas de la matriz extracelular, proteínas endógenas y VEGF para la expresión de nucleolina membranal en células de microvasculatura y su asociación con la proliferación celular.

Conclusión.

Los hallazgos de la dinámica y distribución de la nucleolina presente en los fibroblastos limbo-corneales de donadores cadavéricos humanos, secundaria a la inducción de estas células con factor de crecimiento endotelial vascular, confirma la participación de esta proteína en el proceso de proliferación, lo que monta un conocimiento de ciencias básicas que puede ser el cimiento de una línea de investigación sobre la angiogénesis, con potencial para un nuevo blanco de la neovascularización patológica corneal y extra ponerlo a otras enfermedades vasculares oculares. Para ello es importante la identificación de la nucleolina de superficie en un modelo in vivo de neovascularización corneal y sus efectos sobre la inhibición de esta. Proyectos que siguen en puerta en nuestro laboratorio.

Bibliografía.

1. Srivastava M, Pollard HB. Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *FASEB J* 1999; XXXX: 1911-1922.
2. Mongelard F, Bouvet P. Nucleolin: a multifaceted protein. *Trends Cell Biol* 2007; XXX: 80-86.
3. Otake Y, Soundararajan S, Sengupta TK, et al. Overexpression in nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood* 2007; XXX: 3069-3075.
4. Hovanesian AG, Puvion-Dutilleul F, Nisole S, et al. The cell surface expressed nucleolin is associated with the actin cytoskeleton. *Exp Cell Res* 2000; 261: 312-328.
5. Semenkovich CF, Ostlund REJ, Olson, et al. A protein partially expressed on the surface of HepG2 cells that binds lipoproteins specifically is nucleolin. *Biochemistry* 1990; 29: 9708-9713.
6. Destouches D, El Khoury D, Hamma-Kourbali Y, et al. Suppression of tumor growth and angiogenesis by a specific antagonist of the cell-surface expressed nucleolin. *PLoS ONE* 2008; 3: e2518.
7. Christian S, Pilch J, Akerman ME, et al. Nucleolin expressed at the cell surface is a marker of endothelial cells in angiogenic blood vessels. *J Cell Biol* 2008; 163: 871-878.
8. Huang Y, Shi H, Song Z, et al. The angiogenesis function of nucleolin is mediated by vascular endothelial growth factor and nonmuscle myosin. *Blood* 2006; 107: 3564-3571.
9. Krust B, Vienet R, Cardona A, et al. The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 is preferentially taken up in vivo by lymphoid organs where it forms a complex with nucleolin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 14090-14095.
10. Shi H, Huang Y, Zhou H, et al. Nucleolin is a receptor that mediates antiangiogenic and antitumor activity of endostatin. *Blood* 2007; 119: 2899-2906.
11. Fogal V, Sugahara KN, Rouslahti E, et al. Cell surface nucleolin antagonist causes endothelial cell apoptosis and normalization of tumor vasculature. *Angiogenesis* 2009; 12: 91-100.
12. Bates J, Laber DA, Miller DM, et al. Discovery and development of the G-rich oligonucleotide AS1411 as a novel treatment for cancer. *Exp Mol Ther* 2009; 86: 151-164.
13. Chang JH, Gabison EE, Kato T, Azar DT. Corneal neovascularization. *Curr Opin Ophthalmol* 2001; 12: 242-249.
14. Gabison E, Chang JH, Hernández-Quintela E, et al. Anti-angiogenic role of angiostatin during corneal wound healing. *Exp Eye Res* 2004; 78: 579-589.
15. Kato T, Kure T, Chang JH, et al. Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. *FEBS Lett* 2001; 508: 187-190.
16. Kato T, Chang JH, Azar DT. Expression of type XVIII collagen during healing of corneal incisions and keratectomy wounds. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 78-85.
17. Kure T, Chang JH, Kato T, et al. Corneal neovascularization after excimer keratectomy wounds in matrilysin- deficient mice. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 137-144.
18. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 10931-10934.
19. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995; 1: 27-31.
20. Beck L Jr, D'Amore PA. Vascular development: Cellular and molecular regulation. *FASEB J* 1997; 11: 365-373.
21. Cogan DG. Corneal vascularization. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1962; 1: 253-261.
22. Cursiefen C, Kuchle M, Naumann GO. Angiogenesis in corneal diseases: histopathologic evaluation of 254 human corneal buttons with neovascularization. *Cornea* 1998; 17: 611-613.

23. Dana MR, Schaumberg DA, Kowal VO, et al. Corneal neovascularization after penetrating keratoplasty. *Cornea* 1995; 14: 604-609.
24. Asahara T, Masuda H, Takahashi H, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for vasculogenesis in physiological and pathological vascularization. *Circ Res* 1999; 85: 721-733.
25. Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res* 2002; 11: 171-178.
26. 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.
27. Cohen MM Jr. Vasculogenesis, angiogenesis, hemangiomas and vascular malformations. *Am J Med Genet* 2002; 108: 265-274.
28. 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.
29. Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, et al. Humanization of an anti-VEGF monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 1997; 57: 4593-4599.
30. Ferrara N, Hillan KJ, Gerber HP, et al. Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2004; 3: 391-400.
31. Barkmeier AJ, Akduman L. Bevacizumab (avastin) in ocular processes other than choroidal neovascularization. *Ocul Immunol Inflamm* 2009; 17: 109-117.
32. Grisanti S, Ziemssen F. Bevacizumab: off-label use in ophthalmology. *Indian J Ophthalmol* 2007; 55: 417-420.
33. Wickremasinghe SS, Michalova K, Gilhotra J, et al. Acute intraocular inflammation after intravitreal injections of bevacizumab for treatment of neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2008; 115: 1911-1915.
34. Fallah MR, Khosravi K, Hashemian MN, et al. Efficacy of topical bevacizumab for inhibiting growth of impending recurrent pterygium. *Curr Eye Res* 2010; 35: 17-22.
35. Dratviman-Storobinsky O, Lubin B, Hasanreisoglu M, et al. Effect of subconjunctival and intraocular bevacizumab injection on angiogenic gene expression levels in a mouse model of corneal neovascularization. *Mol Vis* 2009; 15: 23-26.
36. Kim TI, Chung JL, Hong JP, et al. Bevacizumab application delays epithelial healing in rabbit cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009; 50: 4653-4659.

Apéndice.

Figura 1.



Figura 2.

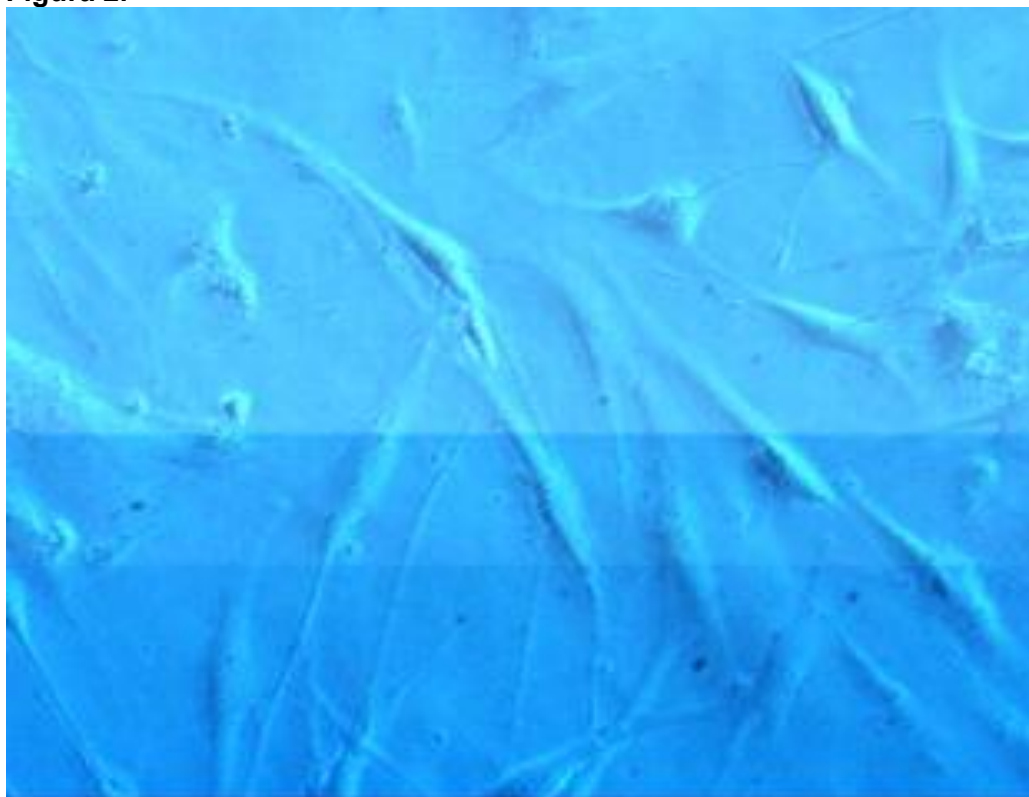


Figura 3.

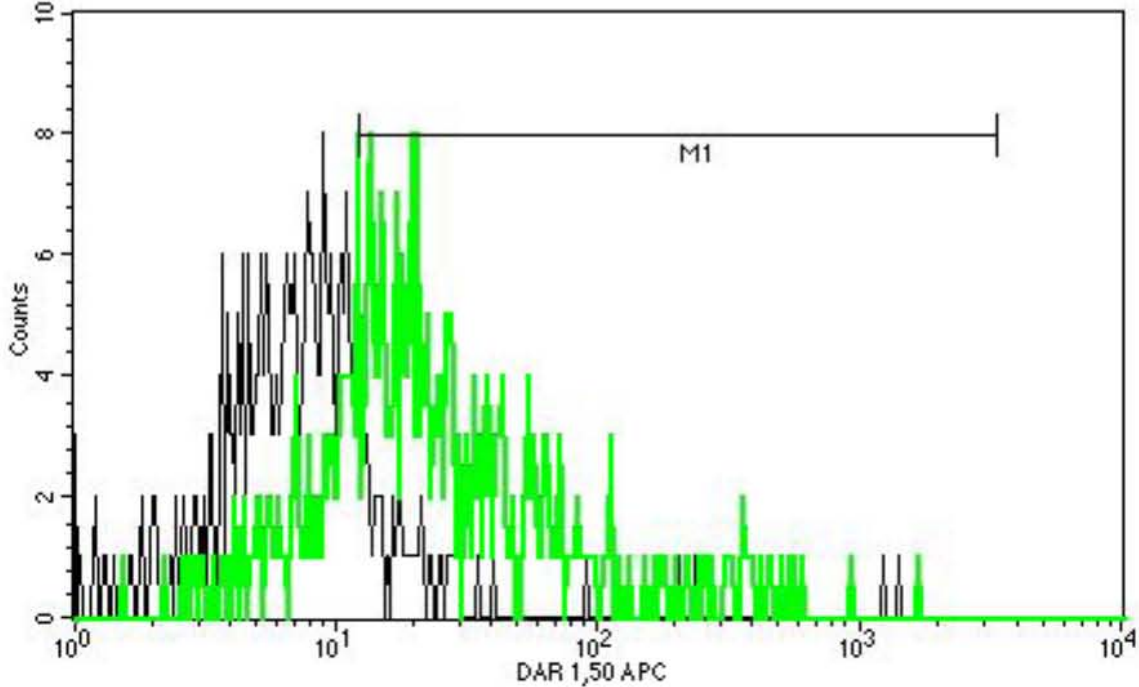


Figura 4.

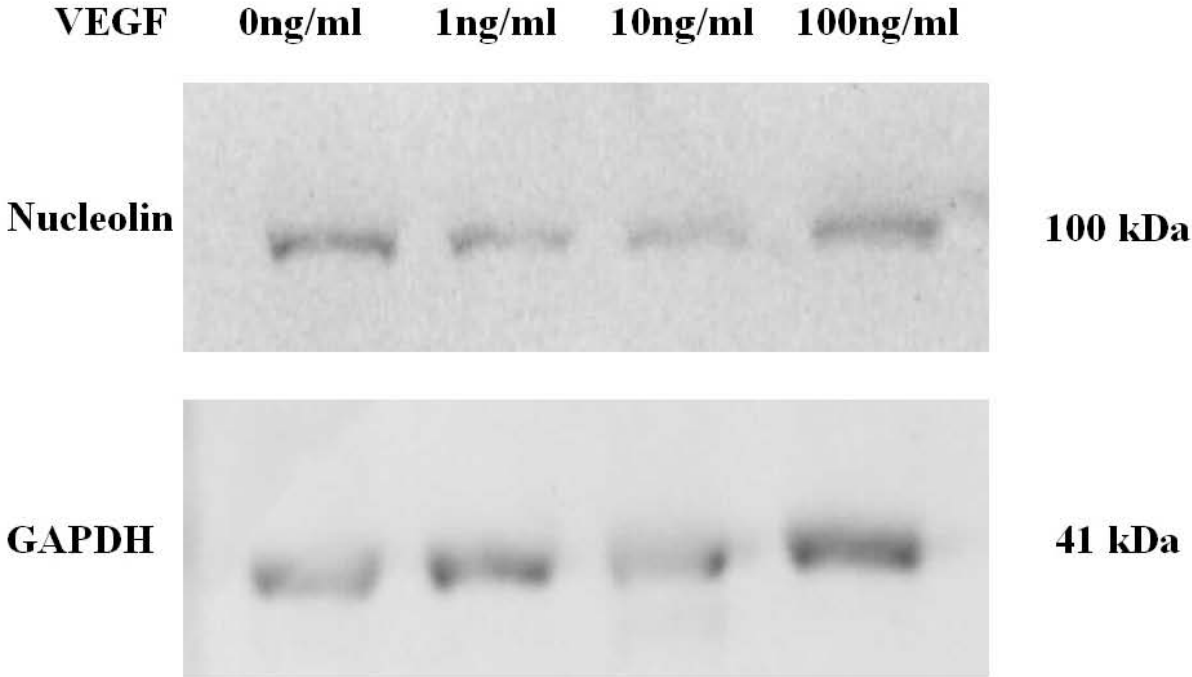


Figura 5.

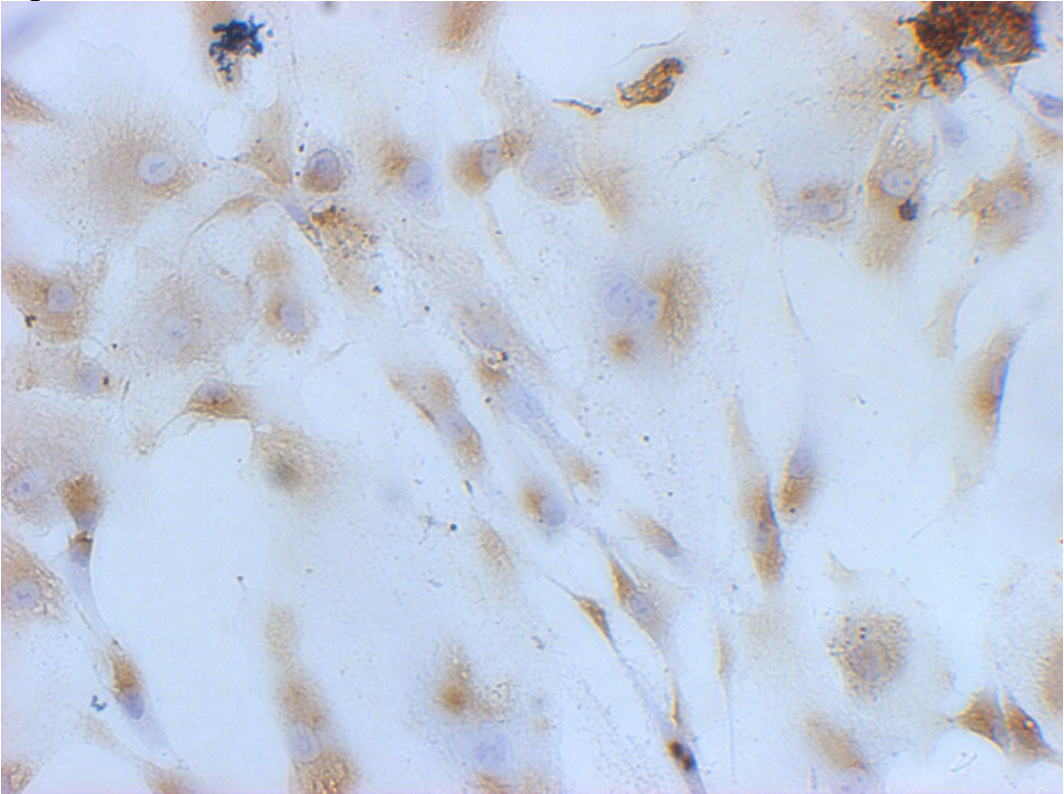


Figura 6.

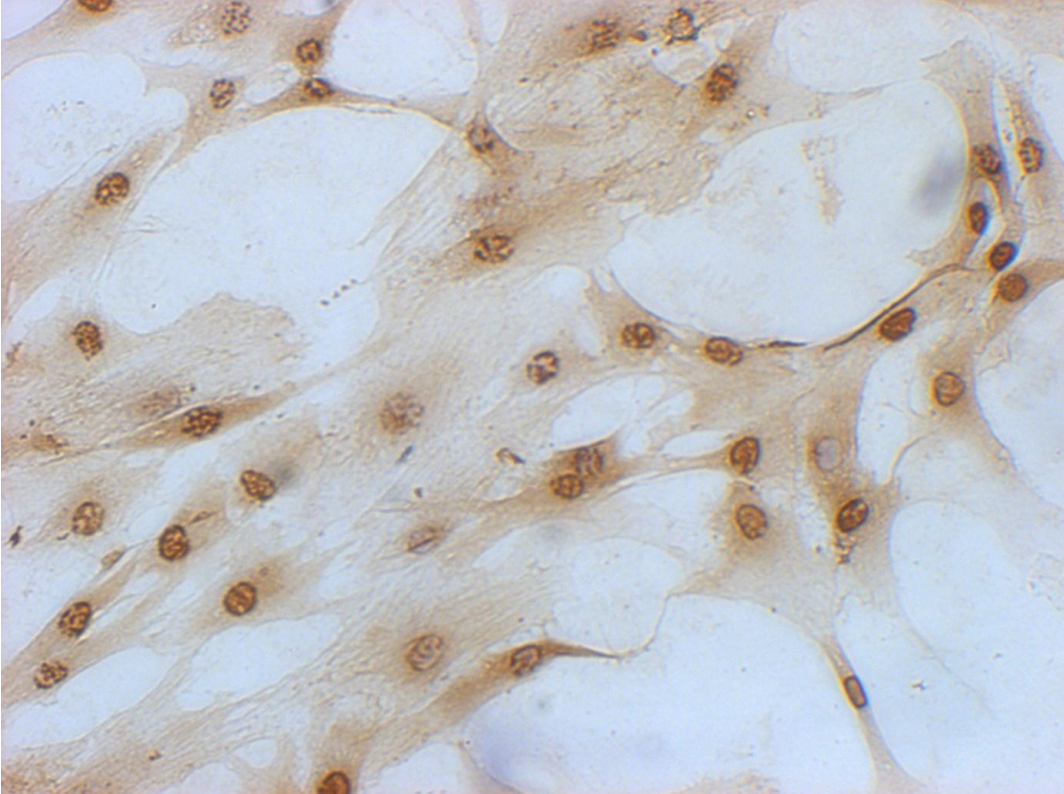


Figura 7.

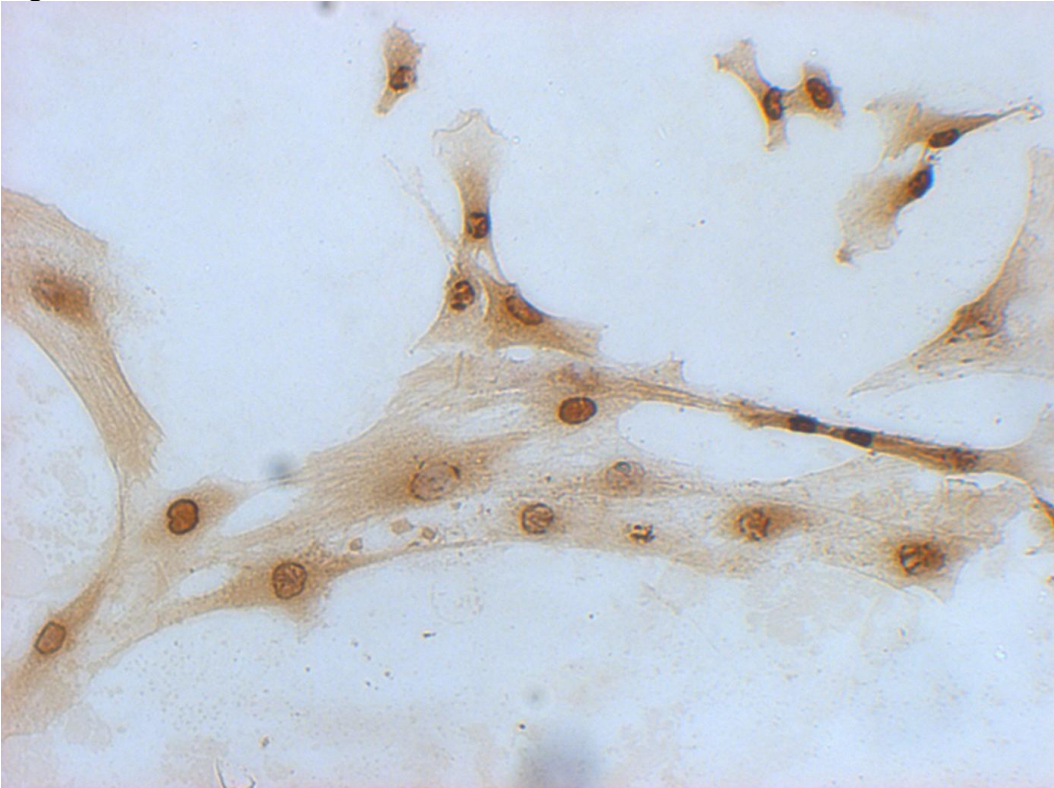


Figura 8.

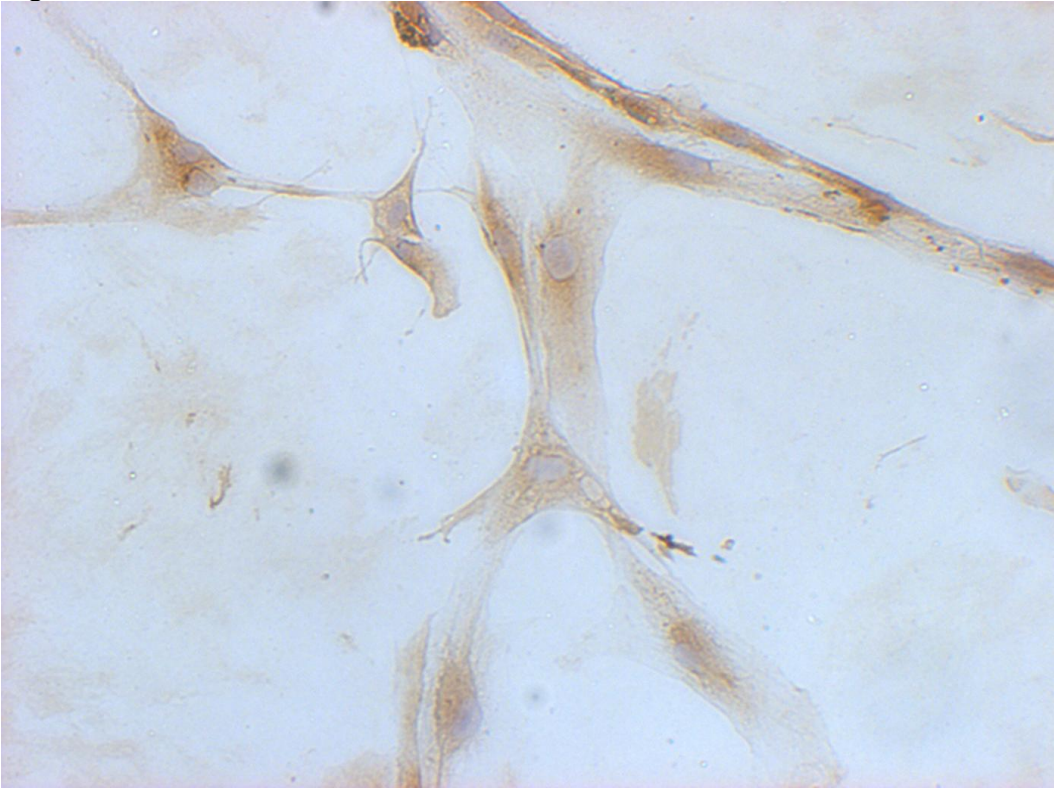


Figura 9.

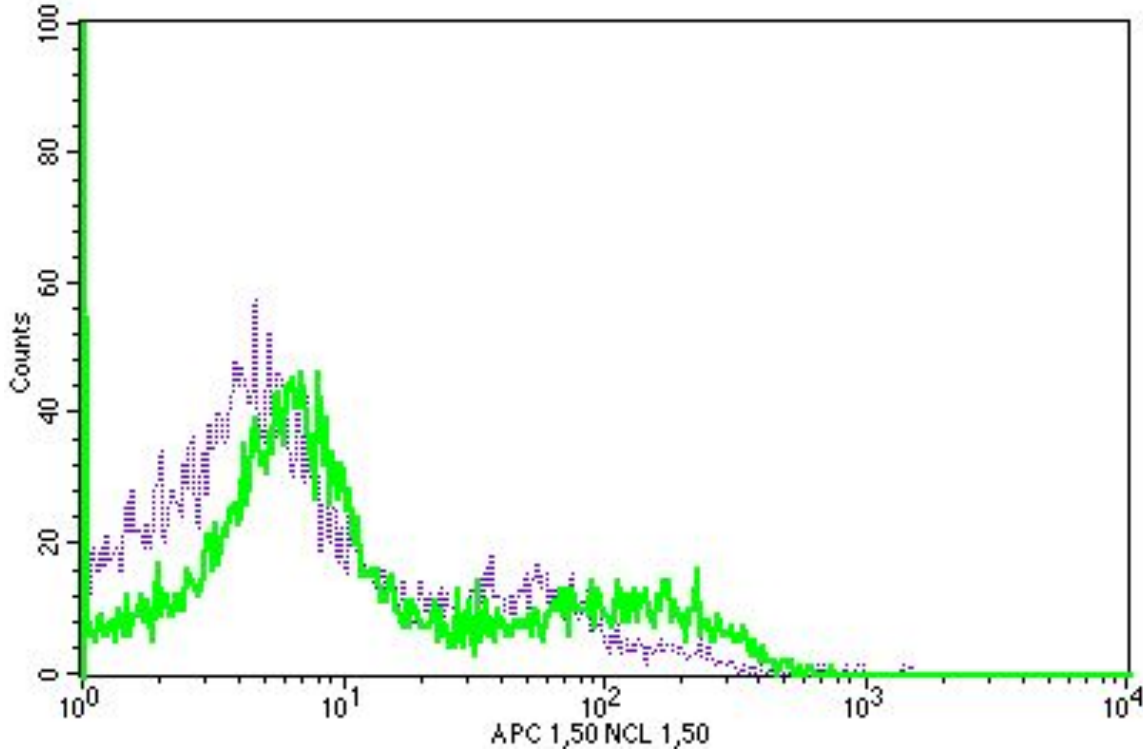


Figura 10.

